

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

Vytautas Kašėta

BALB/c PELIŲ KAULŲ ČIULPŲ HEMOPOETINIŲ KAMIENINIŲ
LĄSTELIŲ MIGRACIJOS TYRIMAI UŽDEGIMO METU

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01B),
Imunologija, serologija, transplantacija (B 500)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006-2010 m. Vilniaus universiteto Imunologijos institute ir po reorganizacijos VMTI Inovatyvios Medicinos Centre.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Genė Biziulevičienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500).

Turinys

SANTRUMPOS.....	5
1. ĮVADAS	7
DARBO TIKSLAS	9
DARBO UŽDAVINIAI.....	9
MOKSLINIS NAUJUMAS.....	9
GINAMIEJI TEIGINIAI	10
2. LITERATŪROS APŽVALGA	11
2.1. Suaugusio organizmo kamieninės ląstelės	11
2.1.1. Suaugusio organizmo kamieninių ląstelių nišos	11
2.1.2. Hemopoetinių kamieninių ląstelių niša.....	16
2.1.3. Hemopoezės schema: klasikinė ir alternatyvi.....	22
2.1.4. Hemopoetinių kamieninių ląstelių žymenys	26
2.1.5. Paviršiaus žymenų deriniai naudojami hemopoetinių kamieninių ląstelių identifikavimui	28
2.1.6. Hemopoetinių kamieninių ląstelių savybės	30
2.2. Kamieninės ląstelės ir uždegimas	36
2.3. Kamieninių ląstelių migracija	39
2.3.1. Hemopoetinių kamieninių ląstelių migracija ir fiziologinė recirkuliacija.....	41
2.3.2. Kamieninių ląstelių migracijos reguliavimas	44
3. METODAI	47
3.1. Laboratoriniai gyvūnai	47
3.2. Kontaktinio hiperjautrumo reakcija	47
3.3. Pelių kaulų čiulpų ląstelių išskyrimas	47
3.4. lin^- ląstelių frakcijos išskyrimas	48
3.5. Ląstelių populiacijų identifikavimas tėkmės citometrijos metodu.....	49
3.6. Ląstelių dažymas PKH67 dažu	50
3.7. Histologinių preparatų paruošimas.....	50
3.8. Citokinų kiekio nustatymas	51
3.9. Fluorescentiškai žymėtų ląstelių migracijos tyrimas	52
3.10. Migracijos kiekybinis tyrimas polimerazinės ciklinės reakcijos metodu	52
3.10.1. Biopsijų medžiagos paruošimas DNR išskyrimui.	53
3.10.2. DNR išskyrimas iš ląstelių.....	53
3.10.3. Realaus laiko polimerazinė ciklinė reakcija	54
3.10.4. Standartinių kreivių sudarymas.....	55
3.11. Statistinė duomenų analizė.....	56

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	57
4.1. Ląstelių populiacijų išskyrimas ir identifikavimas.....	58
4.2. Išskirtų populiacijų priešuždegiminio poveikio įvertinimas <i>in vivo</i>	65
4.2.1. Bendros kaulų čiulpų populiacijos priešuždegiminis poveikis.....	66
4.2.2. Skirtingų koncentracijų lin ⁻ HKL populiacijos priešuždegiminis poveikis	67
4.2.3. lin ⁻ HKL ir lin ⁺ populiacijų priešuždegiminis poveikis	68
4.2.4. lin ⁻ HKL ir lin ⁺ populiacijų poveikis citokinų kiekiams pelių kraujo serume	70
4.3. Transplantuotų hemopoetinių kamieninių lin ⁻ populiacijos ląstelių migracija.....	73
4.3.1. HKL migracijos įvertinimas	74
4.3.2. HKL migracijos kinetika.....	77
4.4. Transplantuotų hemopoetinių kamieninių ląstelių lin ⁻ populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos įvertinimas.....	80
4.4.1. HKL migracija į blužnį.....	83
4.4.2. HKL migracija į inkstus.....	84
4.4.3. HKL migracija į kaulų čiulpus.....	85
4.4.4. HKL migracija į plaučius.....	87
4.4.5. HKL migracija į kepenis.....	89
4.4.6. HKL migracija į pažeistą pėda.....	90
4.4.7. Rezultatų apibendrinimas.....	92
5. IŠVADOS	95
6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	96
7. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE	97
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	98
PADEKA	117

SANTRUMPOS

- ANG – (angl. *angiopoietin*) – angiopoetinas;
- CaR – kalcio jonų receptorius;
- CD – (angl. *cluster of differentiation*) – diferenciacijos antigenas;
- DNR – deoksiribonukleorūgštis;
- EKL – embrioninės kamieninės ląstelės;
- EPO – eritropoetinas;
- FCS – (angl. *fetal calf serum*) – fetalinis veršelių serumas;
- FGF – (angl. *fibroblast growth factor*) – fibroblastų augimo faktorius;
- G-CSF – (angl. *granulocyte-colony stimulating factor*) – granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius;
- GFP – (angl. *green fluorescent protein*) – žaliai fluorescuojantis baltymas;
- GM-CSF – (angl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – granulocitų ir monocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius;
- HA – (angl. *hemagglutination assay*) – hemagliutinacijos tyrimas;
- HIF – (angl. *hypoxia-inducible factor*) – hipoksiją sukeliantis faktorius;
- HKL – hemopoetinės kamieninės ląstelės;
- HLA (angl. *human leucocyte antigens*) – žmogaus leukocitų antigenai;
- ICAM – (angl. *intercellular adhesion molecule*) – tarpląstelinės adhezijos molekulė;
- IL – interleukinai;
- IFN – interferonai;
- KČ – kaulų čiulpai;
- LFA – (angl. *lymphocyte function-associated antigen*) – su limfocitų funkcija susijęs antigenas;
- LIF – (angl. *leukocyte inhibitory factor*) – leukocitus inhibuojantis faktorius;
- MAPK – (angl. *mitogen-activated protein kinase*) – mitogenu aktyvinama proteinkinazė;
- MCF – (angl. *macrophage colony forming factor*) – monocitų citotoksiškumą indukuojantis faktorius;

M-CSF – (angl. *monocyte-colony stimulating factor*) – monocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius;

MHC – (angl. *major histocompatibility complex*) – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas;

MIF – (angl. *macrophage migration inhibitory factor*) – makrofagų migraciją inhibuojantis faktorius;

MIP – (angl. *macrophage inflammatory protein*) – makrofagų uždegiminis baltymas;

MMP – (angl. *matrix metalloproteinase*) – matrikso metaloproteinazė;

OPG – (angl. *osteoprotegerin*) – osteoprotegerinas;

OPN – (angl. *osteopontin*) – osteopontinas;

PBS – (angl. *phosphate buffered saline*) – fosfatinis buferinis tirpalas;

PI-3K – (angl. *phosphoinositide-3 kinase*) – fosfatidilinozitolio-3 kinazė;

PGF – (angl. *platelet growth factor*) – trombocitų augimo faktorius;

PKC – (angl. *proteinkinase C*) – baltymo kinazė C;

RANKL – (angl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) – branduolio faktoriaus κ B ligando receptoriaus aktyvatorius;

SDF-1 – (angl. *stromal cell-derived factor-1*) – stromos ląstelių faktorius;

Sca-1 – (angl. *stem cell antigen 1*) – kamieninių ląstelių antigenas;

S1P – (angl. *sphingosine-1-phosphate*) – sfingozin-1-fosfatas;

TGF – (angl. *transforming growth factor*) – ransformuojantis augimo faktorius;

TLR – (angl. *Toll-like receptor*) – „toll-like“ receptoriaus;

TNF – (angl. *tumor necrosis factor*) – naviko nekrozės faktorius;

TPO – (angl. *thrombopoietin*) – trombopoetinas;

VCAM – (angl. *vascular cell adhesion molecule*) – kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė;

VEGF – (angl. *vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių endotelio augimo faktorius;

VLA – (angl. *very late activation antigen*) – vėlyvasis aktyvavimo antigenas.

1. ĮVADAS

Šiuo metu pasaulyje plačiai atliekami kamieninių ląstelių tyrimai suteikia bei praplečia žinias apie šių ląstelių panaudojimo terapijoje bei regeneracinėje medicinoje perspektyvas. Pastaruoju metu daugėja duomenų, įrodančių teigiamą kamieninių ląstelių poveikį ne tik pažeistų organų struktūros, bet ir jų funkcijų atstatymui. Keliama prielaida, jog kiekvienam funkciškai neveikiam organui galėtų būti taikoma ląstelinė terapija. Embrioninių kamieninių ląstelių naudojimas terapijai dėl įvairių techninių, politinių ir etinių priežasčių yra nepriimtinas, todėl kaip alternatyva šiuo tikslu gali būti naudojamos suaugusio organizmo hemopoetinės kamieninės ląstelės (HKL). Jos dėl savo proliferacinių savybių ir prieinamumo yra ypač tinkamos, o atliktų mokslinių tyrimų duomenys tai patvirtina. Nustatyta, kad iš HKL gali vystytis ne tik kraujo ląstelės, bet ir nehemoetinių audinių ląstelės. Nepaisant to, tebelieka daugybė neatsakytų klausimų apie transplantuotų kamieninių ląstelių elgesį ir funkcijas *in vivo*.

Pagrindinis hemopoetinių kamieninių ląstelių šaltinis suaugusiame organizme yra kaulų čiulpai. Iš jų išskirtos kamieninės ląstelės šiuo metu jau naudojamos transplantacijai. Nors jų populiacija organizme yra labai nedidelė, kiekvieną dieną šios ląstelės pagamina milijonus subrendusių kraujo ląstelių ir jų pirmtakų. Be to, HKL skaičius esant poreikiui, t.y. atsiradus audinių ar organų pažeidimams, netekus daug kraujo, vykstant uždegiminiams procesams padidėja. Šių ląstelių identifikavimas ir išskyrimas dėl joms būdingų žymenų neapibrėžtumo yra pakankamai sudėtingas. Tuos pačius žymenis gali turėti ir kitos kaulų čiulpų ląstelės, o jų raiška gali skirtis tarp įvairių gyvūnų rūšių bei kisti vystymosi eigoje. Nustatyta, kad kaulų čiulpų ląstelės yra heterogeniškos. Norint gauti kuo grynesnes hemopoetinių ląstelių frakcijas, tinkamas naudoti, pvz., transplantacijoje, jas išskiriant tarpusavyje turi būti derinami keliais parametrais besiskiriantys metodai. Tinkamų žymenų derinių parinkimas leidžia identifikuoti ir išskirti hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacijas, kurias vėliau būtų galima tikslingai panaudoti pažeidimo atstatymui. Tačiau

nėra bendro sutarimo, kuri populiacija tinkamiausia ląstelinei terapijai vieno ar kito pažeidimo atveju. Taigi paviršiaus žymenų nustatymas bei hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacijų gavimas ir jų tyrimai *in vivo* yra svarbūs tolesniam selektyviam HKL pritaikymui terapijoje.

Žinoma, kad migracija – tai neatsiejama kraujodaros ląstelių savybė, kurios dėka jos palieka kaulų čiulpus, persikelia į audinius ir/arba grįžta atgal į kaulų čiulpus. Šis procesas vadinamas fiziologine hemopoetinių ląstelių migracija. Nustatyta, kad kamieninės ląstelės gali migruoti į pažeidimo vietą audinyje, tačiau migracijos mechanizmai dar nėra aiškūs. Kadangi patologiniai procesai, kuriems numatoma taikyti ląstelių terapiją, paprastai yra lydimi uždegiminių reakcijų, tai ypač svarbu išsiaiškinti kamieninių ląstelių migraciją uždegimo metu bei jų poveikį uždegimui. Duomenų apie kamieninių ląstelių įtaką uždegiminiam procesui trūksta, o migracijos tyrimų rezultatai, gauti taikant skirtingus pažeidimo modelius (kepenų, inkstų ir kt.), yra prieštaringi. Manoma, kad fiziologinės bei transplantuotų kamieninių ląstelių migracijos procesus reguliuoja bendri mechanizmai, tačiau stinga nuoseklaus migracijos kinetikos įvertinimo, o atskirų tyrimų rezultatai prieštarauja vieni kitiems. Iki šiol neaišku, per kiek laiko transplantuotos kamieninės ląstelės numigruoja į pažeidimo vietą, kur jos lokalizuojasi ir į kokią aplinką patenka. Nežinoma, kiek transplantuotų HKL migruoja į pažeidimo vietą, kiek jų patenka į kitus organus, ir kaip kinta transplantuotų ląstelių kiekiai uždegimo metu. Šiame darbe atlikti transplantuotų hemopoetinių kamieninių ląstelių migracijos tyrimai uždegimo metu prisideda prie kamieninių ląstelių migracijos dėsnų išaiškinimo patologinių procesų metu, kas yra ypač svarbu užtikrinant saugų ir efektyvų kamieninių ląstelių taikymą klinikinėje praktikoje.

DARBO TIKSLAS

Ištirti pelių kaulų čiulpų hemopoetinių kamieninių ląstelių priešuždegiminį poveikį bei migraciją BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Išgryninti ir identifikuoti BALB/c pelių kaulų čiulpų hemopoetinių kamieninių ląstelių populiaciją;
2. Nustatyti išskirtų populiacijų priešuždegiminį poveikį BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*;
3. Įvertinti transplantuotų BALB/c pelių hemopoetinių kamieninių ląstelių migracijos kinetiką;
4. Kiekybiškai įvertinti hemopoetinių kamieninių ląstelių migraciją į pažeidimo vietą ir kitus organus.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Išgryninta ir identifikuota BALB/c suaugusių individų kaulų čiulpų hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacija. Parodyta, kad išgryninta lin⁻ HKL populiacija pasižymėjo hemopoetinėms kamieninėms ląstelėms būdingų žymenų raiška (CD117 ir Sca-1). Pirmą kartą buvo įvertintas hemopoetinių kamieninių ląstelių priešuždegiminis poveikis BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*. Nustatyta, kad išskirtos hemopoetinės ląstelių lin⁻ HKL, lin⁺, lin⁻ HKL kartu su lin⁺ populiacijos pasižymėjo efektyviu priešuždegiminiu poveikiu ir statistiškai reikšmingai slopino edemą. Efektyviausiai (iki 66%) pėdos edemą slopino HKL populiacija. Pirmą kartą buvo iširta HKL populiacijos migracijos kinetika BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*. Nustatyta, kad šios populiacijos ląstelės jau po

1 val. aptinkamos tiriamų pelių pažeistoje pėdoje ir kepenų histologiniuose preparatuose, kiek vėliau jos aptinkamos blužnyje. Pirmą kartą atlikti HKL populiacijos kiekybiniai migracijos kinetikos tyrimai BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*. Nustatyta, kad esant uždegimui pėdoje vyksta transplantuotų HKL antrinė migracija iš kaulų čiulpų į blužnies hemopoetines nišas. Parodyta, kad šios populiacijos ląstelės selektyviai migruoja į uždegimo vietą pažeistoje pėdoje. Transplantuotų ląstelių kiekis pėdos edemos mėginiuose buvo daugiau nei 1000 kartų didesnis lyginant su nepaveikta pėda.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Transplantuotos BALB/c pelių kaulų čiulpų hemopoetinės kamieninės ląstelės pasižymi efektyviu priešuždegiminiu poveikiu ir slopina pėdos edemą.
2. Transplantuotos kaulų čiulpų hemopoetinės kamieninės ląstelės selektyviai migruoja į uždegimo židinių pažeistoje pėdoje.
3. Uždegimo metu sumažėja transplantuotų hemopoetinių kamieninių ląstelių migracija į plaučius, kepenis, blužnį ir kaulų čiulpus.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. SUAUGUSIO ORGANIZMO KAMIENINĖS LĄSTELĖS

Kamieninėms ląstelėms, nepaisant to, iš kokio šaltinio išskirtos, yra būdingos šios išskirtinės savybės – ilgalaikis savaiminis atsinaujinimas, nediferencijuotos būsenos palaikymas ir gebėjimas formuoti skirtingų tipų specializuotas ląsteles (Dzierzak ir Enver, 2008). Embrioninės kamieninės ląstelės (EKL), išskirtos iš embriono blastocistos stadijos gali formuoti daugiausiai specializuotų ląstelių tipų. Tačiau šių ląstelių tyrimai ir panaudojimas medicinoje iki šiol yra griežtai ribojami dėl etinių problemų bei duomenų apie diferenciacijos kryptį lemiančius veiksnius trūkumo. Alternatyva EKL yra suaugusio organizmo kamieninės ląstelės (Gennero ir kt., 2006).

Suaugusio organizmo audiniuose esančios negausios kamieninių ląstelių populiacijos palaiko homeostazę bei dalyvauja pažeidimo regeneracijoje (Pawitan, 2009). Šių ląstelių nuolatinio savaiminio atsinaujinimo, proliferacijos bei diferenciacijos procesus reguliuoja jas supanti specifinė mikroaplinka. Skirtingų audinių mikroaplinka ir nulemia unikalias juose esančių kamieninių ląstelių savybes bei diferenciacijos kryptis (Jones ir Wagers, 2008).

2.1.1. Suaugusio organizmo kamieninių ląstelių nišos

Kamieninių ląstelių savybių palaikymas ir išgyvenimas yra reguliuojamas jų mikroaplinkos signalų. Ši aplinka, kurioje sąveikauja didelė grupė ląstelių bei molekulinė faktorių, lemiančių kamieninių ląstelių būseną, įvardijama kaip kamieninių ląstelių niša (Walker ir kt., 2009). Niša – tai anatomicinis darinys, pateikiantis kamieninėms ląstelėms signalus sekretuojamų ir paviršiaus molekulių pavidalu, kontroliuojantis kamieninių ląstelių proliferaciją, apsprendžiantis dukterinių ląstelių lemtį bei saugantis kamienines ląsteles nuo išsekimo ir žūties (Jones ir Wagers, 2008).

Kamieninių ląstelių nišos yra gana skirtingos, kaip ir kamieninės ląstelės, kurias jos palaiko. Suaugusiame organizme kamieninės ląstelės

aptinkamos daugumoje audinių. Pagrindinė jų funkcija audiniuose yra pakeisti senstančias, negyvas ar pažeistas ląsteles (Walker ir kt., 2009). Tyrimai rodo, jog egzistuoja skirtingos kamieninių ląstelių funkcinės grupės, specializuotai palaikančios tam tikro audinio unikalias funkcijas (Dzierzak ir Enver, 2008). Nišų svarbą pabrėžia duomenys, rodantys, kad jos sutrikdymas yra pagrindinė daugelio pataloginių procesų, siejamų su audinių degeneracija, senėjimu ar vėžio atsiradimu, priežastis (Corre ir kt., 2007). Nuolatinis kamieninių ląstelių atsinaujinimas, kontroliuojamas nišos mikroaplinkoje esančių faktorių, užtikrina normalų organizmo funkcionavimą (Jones ir Wagers, 2008). Niša – tai sudėtinga kompleksinė struktūra, pasižyminti skirtingomis ypatybėmis, priklausančiomis nuo to, kokiam organizme ar audinyje ji yra. Išskiriami trys pagrindiniai kriterijai, apibūdinantys bendrus nišos požymius: 1) vidiniai nišos signalai reguliuoja kamieninių ląstelių atsinaujinimo, savybių palaikymo ir išgyvenimo procesus; 2) adhezinės sąveikos tarp nišos ląstelių, tarpląstelinio matrikso ir kamieninių ląstelių išlaiko kamienines ląsteles nišoje; užtikrina tinkamą nišos signalų veikimą; 3) erdvinis nišos ląstelių išsidėstymas orientuoja kamienines ląsteles nišoje ir taip užtikrina jų asimetrinį dalijimąsi (Yamashita ir kt., 2005). Kamieninių ląstelių niša suteikia struktūrinę bei trofinę palaikymą, topografinę informaciją ir atitinkamus fiziologinius signalus, taip reguliuodama kamienines ląsteles tiek stuburiniuose, tiek bestuburiuose (Jones ir Wagers, 2008).

Kamieninių ląstelių nišų identifikavimas ir charakterizavimas yra gana sudėtingas procesas, kadangi pačių kamieninių ląstelių organizme yra labai mažai, o tinkamų žymenų kamieninių ląstelių identifikavimui *in vivo* dažnai iš viso nėra (Walker ir kt., 2009). Nepaisant to, nemažai pasiekta identifikuojant kamieninių ląstelių nišas, jos nustatytos įvairiuose audiniuose ir organuose. Lyginant tarpusavyje žinomas kamieninių ląstelių nišas buvo suformuluota hipotetinė nišos sudėtis. Pagal ją nišą sudaro: kamieninės ląstelės; stromos pagalbinės ląstelės – sąveikauja su kamieninėmis ląstelėmis ir tarpusavyje per paviršiaus receptorius, gap jungtis ir tirpius faktorius; tarpląstelinio matrikso baltymai – suteikia struktūrą, sąrangą ir mechaninius signalus; kraujagyslės –

nešioja sisteminius signalus ir yra perdavimo kanalas uždegimo bei kitų cirkuliuojančių ląstelių patekimui į nišą; nervinės jungtys – gali perduoti nuotolinius signalus. Kiekviena niša nebūtinai yra sudaryta iš aukščiau išvardintų sudedamųjų dalių (Jones ir Wagers, 2008).

Kamienines ląsteles bei jų nišą veikiantys signalai yra: sekretuojami faktoriai (metaboliniai, humoraliniai, nišos ląstelių sekretuojami faktoriai); nerviniai; fiziniai (ląstelių adhezija, mechaniniai kontaktai); struktūriniai (erdviniai ryšiai, sąranga).

Komunikacija nišos viduje yra svarbi tinkamam kamieninių ląstelių funkcionavimui bei apsprendžia kamieninių ląstelių atsinaujinimo dažnį. Sekretuojami baltyminiai faktoriai, mažos molekulės ir jonai taip pat yra svarbūs nišos signalų perdavime. Sekretuojami nišos faktoriai gali veikti lokaliai vienos ar dviejų ląstelių atstumu arba difunduoti nišoje ir tiesiogiai veikti kamienines ląsteles. Sekretuojami augimo faktoriai taip pat veikia kamieninių ląstelių elgseną. Manoma, jog signalo perdavimo keliai įvairiose kamieninių ląstelių nišose ar skirtinguose audiniuose skiriasi (Jones ir Wagers, 2008). Tiriant šiuos kelius žinomose kamieninių ląstelių nišose buvo nustatytas signalinių kaskadų konservatyvumas, tačiau pastebėta, kad ta pati signalinė seka skirtinguose audiniuose esančiose nišose gali turėti skirtingas pasekmes (Dzierzak ir Enver, 2008). Tiriant skirtingas ląstelių populiacijas buvo įrodytas svarbus Wnt/ β -katenino signalo perdavimo kelio vaidmuo kamieninių ląstelių išgyvenimui nišoje. Šis kelias veikia savaiminio atsinaujinimo, diferenciacijos krypties pasirinkimo, proliferacijos bei diferenciacijos eigą (Niemann, 2006). Wnt signalinio kelio komponentai sudaro didelę sekretuojamų baltymų, sąveikaujančių su ląstelių paviršiaus receptoriais bei tarpląstelinės medžiagos molekulėmis, šeimą. B-kateninas Wnt signaliniame kelyje atlieka efektorinę funkciją perduodant signalą (Nusse ir kt., 2008). Kartu su Wnt/ β -katenino signaliniu keliu kamieninių ląstelių atsinaujinimo procesus nišoje veikia ir Notch bei Hedgehog signaliniai keliai. Notch kelias aktyvinamas sąveikaujant ląstelės paviršiuje ekspresuojamam ligandui ir kaimyninės ląstelės paviršiaus Notch receptoriui. Tyrimai rodo, kad šis signalinis kelias svarbus nišoje

esančių kamieninių ląstelių vystymosi, diferenciacijos, apoptozės procesų reguliavimui tiek įprastinėmis sąlygomis, tiek esant patologijai (Chiba, 2006). Hedgehog signalo perdavimo kelio reguliuoja kamieninių ląstelių funkcijas, jie ypač svarbus kamieninių ląstelių palaikymui nišoje bei diferenciacijos kontrolei (Gao ir kt., 2009). Pusiausvyrą tarp kamieninių ląstelių savaiminio atsinaujinimo ir diferenciacijos procesų nišoje palaiko ir BMP signalinis kelias. Jo komponentai priklauso transformuojančio augimo faktoriaus beta (TGF- β) baltymų šeimai. BMP kelio baltymai kontroliuoja kamieninių ląstelių savaiminį atsinaujinimą veikdami proliferacinį pajėgumą, apoptozę bei diferenciaciją (Zhang ir Li, 2005). Be pagrindinių signalo perdavimo kelių, veikiančių kamieninių ląstelių palaikymą nišoje, procesų reguliavime dalyvauja ir kiti netiesioginiai signalai, kurių poveikis nėra gerai žinomas ir reikalauja išsamių tyrimų (Morrison ir Spradling, 2008).

Kamieninių ląstelių adhezija prie pagalbinių stromos ląstelių ar pamatinės laminos yra svarbi reguliuojant kamieninių ląstelių elgesį bei palaikant kamienines ląsteles nišos pateikiamų signalų įtakoje. Tarpląsteliniai kontaktai, tokie kaip adherentiniai susijungimai, formuojasi kaip vieno tipo sąveikos tarp membraninių baltymų kaderinų. Šių kaderinų jungčių netekimas yra siejamas su kamieninių ląstelių netekimu (Song ir kt., 2002). Kaderinų veikiama ląstelių adhezija palengvina HKL asociaciją su osteoblastais (per N-kaderiną) ir yra siejama su tinkamu raumenų kamieninių ląstelių išsidėstymu ant raumeninių fibrilių (per M-kaderiną) (Zhang ir kt., 2003). Tačiau tyrimų duomenys, gauti tiriant pelių kamieninių ląstelių nišas, verčia abejoti kaderinų svarba. Pelėse M-kaderinas neaptiktas, ir jokie su tuo susiję raumeninio audinio vystymosi bei regeneracijos sutrikimai nepastebėti (Hollnagel ir kt., 2002). Fenotipiškai identifikuotose kaulų čiulpų HKL N-kaderino ekspresija neaptikta, o hemopoetinis aktyvumas kaulų čiulpuose aptiktas zonose, kur esančios ląstelės neekspresuoja N-kaderino. Neaišku, kuriose kamieninių ląstelių nišose specifiniai kaderinai yra svarbūs ir kokiomis aplinkybėmis jie gali būti pakeičiami ekspresuojant kitus kaderinus ir/ar kitas adhezijos molekules (Kiel ir kt., 2007).

Tiriant suaugusio organizmo nišas buvo pastebėta stipri integrinų raiška, kuri gali būti naudojama kaip žymuo nustatant audinių kamienines ląsteles. Manoma, jog integrinai taip pat gali būti svarbūs palaikant kamienines ląsteles prie bazinės laminos (Jones ir Wagers, 2008). Nustatyta, kad integrinas $\alpha 6$ yra gausiai ekspresuojamas bazalinių keratinocitų epidermyje ir naudojamas kaip žymuo atskiriant odos kamienines ląsteles (Ito ir kt., 2005). Tačiau jo vaidmuo kamieninių ląstelių palaikyme nėra įrodytas. Gausi $\beta 1$ integrino raiška būdinga daugelio audinių kamieninėms ląstelėms, įskaitant plauko folikulo kamienines ląsteles, HKL kaulų čiulpuose bei raumens kamienines ląsteles (Wagers ir kt., 2002; Sherwood ir kt., 2004). $\beta 1$ integrino svarba adhezijai ir įtaka kamieninėms ląstelėms skirtinguose audiniuose nevienoda. Ląstelių adhezija tarp kamieninių ir nišos ląstelių yra konservatyvus kamieninių ląstelių palaikymo bruožas, būdingas tiek žinduoliams, tiek kitiems organizmams. Specifinės jungtys ir adhezijos molekulės įvairiose nišose skiriasi. Manoma, jog tai gali veikti specializuotas, audiniams specifines funkcijas (Jones ir Wagers, 2008).

Kamieninių ląstelių adhezija su ląsteliniais ir tarpląstelinio matrikso komponentais nišoje suteikia mechaninius signalus kamieninėms ląstelėms, kurie veikia kamieninių ląstelių funkciją. Specifinis santykinis mikroaplinkos elastingumas ar standumas gali tiesiogiai veikti ir kamieninių ląstelių diferenciacijos kryptį. Mezenchiminių kamieninių ląstelių tyrimuose *in vitro* parodyta, jog substrato elastingumas, panašus į smegenų audinio, skatino neuroninę diferenciaciją. Tuo tarpu elastingumas, panašus į kaulinio audinio, skatino diferenciaciją osteoblastų kryptimi. Vidutinio elastingumo substratai skatino diferenciaciją raumenine kryptimi. Manoma, kad mikroaplinkos elastingumas, kartu su tirpiaisiais faktoriais, geba veikti kamieninių ląstelių diferenciacijos kryptį (Engler ir kt., 2006). *In vivo* tyrimais parodyta, jog mikroaplinkos elastingumo pokyčiai, sukelti pažeidimų, ligos ar senėjimo, veikia audinių kamieninių ląstelių regeneracinį aktyvumą ir pajėgumą (Jones ir Wagers, 2008). Ląstelinės sąveikos nišoje iki šiol nėra gerai iširtos, žinoma tik nedidelė dalis signalo perdavimo kelių, kuriuos jie veikia.

Nustatyta, kad palaikant atitinkamą kamieninių ląstelių kiekį yra svarbus tikslus erdvinis kamieninių ląstelių išsidėstymas nišos ląstelių atžvilgiu. Orientuotas jungimasis su mikroaplinkos ląstelėmis ar tarpląsteliniu matriksu per įvairias jungtis, arba asimetrinis faktorių pasiskirstymas nišoje veikia kamieninių ląstelių orientaciją dalijimosi metu, kas galimai apsprendžia skirtingą dukterinių ląstelių likimą po pasidalijimo (Jones ir Wagers, 2008).

Apibendrinus, kamieninių ląstelių nišos atliekamos funkcijos galima teigti, kad niša užtikrinta kamieninių ląstelių atsinaujinimą ir išgyvenimą; kontroliuoja kamieninių ląstelių funkcionavimą ir jų kiekį; orientuoja kamienines ląsteles nišoje, skatindama asimetrinį jų dalijimąsi; išlaiko kamienines ląsteles nišoje; suteiktia struktūrinį, trofinį palaikymą, topografinę informaciją ir atitinkamus fiziologinius signalus; palaiko kamieninių ląstelių balansą tarp savęs atnaujinimo ir diferenciacijos; saugo nuo galimo naviko susiformavimo. Niša atspindi kompleksą ir dinaminį vientisumą, kurioje susieta daugybė faktorių, atliekančių kamieninių ląstelių skaičiaus bei funkcijos kontrolę (Jones ir Wagers, 2008; Morrison ir Spradling, 2008).

Hemopoetinių kamieninių ląstelių niša viena svarbiausių suaugusiame organizme. Jai skiriamas didelis dėmesys, tiriant hemopoetinių kamieninių ląstelių migraciją bei panaudojimą terapijoje.

2.1.2. Hemopoetinių kamieninių ląstelių niša

Suaugusiame organizme hemopoezė vyksta kaulų čiulpuose, nors hemopoetinio streso metu hemopoezė gali vykti kepenyse ar blužnyje (Kiel ir Morrison, 2008). Žinduolių kaulas sudarytas iš įvairaus diferenciacijos laipsnio kaulo ląstelių, kolageno fibrilių ir mineralų, tokių kaip kalcis ir fosforas, sandarų. Kaulo vidų užpildo kaulų čiulpai bei kraujagyslės. HKL ir pirmtakai tarpsta tarp kaulų čiulpų stromos ląstelių, t.y. įvairaus pobūdžio tiek hemopoetinės, tiek nehemopoetinės kilmės ląstelių populiacijų (Taichman, 2005). Manoma, kad iš kaulų čiulpuose esančių mezenchiminių kamieninių ląstelių vystosi dauguma stromos ląstelių: chondrocitai, osteoblastai, fibroblastai, adipocitai, endotelio ląstelės ir miocitai (Yin ir Li, 2006).

Skirtingai nei kitų kamieninių ląstelių nišų, HKL nišos vieta, ląstelinė sudėtis ir su tuo susiję signalai dar nėra tiksliai nustatyti. Toks neapibrėžtumas siejamas su HKL migraciniu judrumu. HKL įprastinėmis fiziologinėmis sąlygomis nuolat išeina iš nišų į cirkuliaciją ir iš cirkuliacijos grįžta atgal į nišas (Kiel ir Morrison, 2008). Dėl tokio HKL judrumo jų nišos tyrimas yra gana sudėtingas ir neretai prieštaringas (Taichman, 2005). Nustatyta, jog apie 60 % kaulų čiulpuose esančių HKL yra netoli kraujagyslių, apie 20% šalia kaulo endotelio, likusioji dalis išsibarsčiusi po visus kaulų čiulpus (Kiel ir kt., 2007). Anatomicinis HKL išsidėstymas suteikė pagrindą teiginiam apie galimą dvejetainio pobūdžio HKL nišų egzistavimą kaulų čiulpuose, kur niša, išsidėsčiusi šalia kaulo endotelio, pavadinta kauline, o esanti greta kraujagyslių – kraujagysline (Yin ir Li, 2006). Dalis tyrėjų HKL išsidėstymą pačiuose kaulų čiulpuose ir šalia kraujagyslių sieja su HKL migraciniu aktyvumu, tokiu būdu palaikydami vien tik kaulinės nišos idėją (Jones ir Wagers, 2008).

Šalia kaulo endotelio, sudaryto daugiausiai iš osteoblastų, aptiktos HKL leido numanyti galimą šių dviejų ląstelių tipų sąveiką bei osteoblastų įtaką HKL funkcijų reguliavime (Taichman, 2005). Nustatyta, kad osteoblastai gamina eilę hemopoetinių augimo faktorių. Tyrimuose su pelių osteoblastų linijomis nustatyta G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6 ir kitų faktorių produkcija (Taichman ir Emerson, 1998). Tiriant žmogaus osteoblastus nustatyta, kad jie sekretuoja G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-7, LIF, OPG, RANKL, SDF-1, TNF- α , VEGF faktorius (Hofbauer ir kt., 2000). Šių ląstelių sąsajas sustiprino faktas, jog osteoklastai, besiformuojantys iš hemopoetinių pirmtakų, atlieka itin svarbų vaidmenį kaulų rezorbcijoje. Taip pat buvo pastebėta, jog egzistuoja HKL koncentracijos gradientas tarp kaulo endotelio ir centrinės arteriolės, kuris artėjant link kraujagyslės mažėja. Savo ruožtu atvirkštinis gradientas, didėjantis tolstant nuo kaulinio endotelio, pastebėtas tiriant bręstančius granulocitus (Taichman, 2005). Gauti tyrėjų duomenys rodo, jog hemopoetiniai pirmtakai, besiformuojantys kaulinio endotelio aplinkoje, migruoja link kraujagyslių, kur jie proliferuoja ir diferencijuojasi (Heissig ir kt., 2002). Galima osteoblastų įtaka HKL nustatyta

eksperimentuose su pelių linijomis, turinčiomis genetines mutacijas. Parodyta, kad osteoblastų pažeidimas yra tiesiogiai susijęs su HKL netekimu (Visnjic ir kt., 2004). Panašiuose bandymuose su kraujagyslių endotelio ląstelėmis parodyta, jog pažeidus kraujagyslių endotelio ląsteles, hemopoezė nutrūksta (Avecilla ir kt., 2004). Sąsajos tarp HKL ir kraujagyslių endotelio kaulų čiulpuose rodo galimą kraujagyslinės nišos egzistavimą (Kiel ir kt., 2005). Tai sustiprino teiginius apie galimą dvejetainio pobūdžio HKL nišų egzistavimą kaulų čiulpuose.

Literatūroje dažnai pateikiamas HKL skirstymas pagal gebėjimą vykdyti hemopoezę (repopuliacinį aktyvumą) į ilgalaikes HKL ir trumpalaikes HKL. Teigiama, kad ilgalaikės HKL geba palaikyti hemopoezę nuo kelių mėnesių ar per visą individo gyvenimą, jos turi ilgalaikį repopuliacinį aktyvumą. Tuo tarpu trumpalaikės HKL geba palaikyti hemopoezę kelias ar keliolika savaičių, jų repopuliacinis aktyvumas yra trumpalaikis (Christensen ir Weissman, 2001). Ilgalaikės HKL įvardijamos kaip HKL esančios ramybės būsenoje, o trumpalaikės – kaip aktyvios arba sužadintos HKL (Passegue ir kt., 2005). Manoma, kad su ilgalaikėmis HKL siejama kaulinė niša geba palaikyti HKL ramybės būsenoje ir užtikrina pakankamą HKL kiekį, tuo tarpu kraujagyslinė niša, siejama su trumpalaikėmis HKL, palaiko HKL ir jų pirmtakų proliferaciją ir vėlesnę diferenciaciją (Visnjic ir kt., 2004). Kraujagyslinė niša, manoma, yra palankesnė kamieninių ląstelių proliferacijai bei diferenciacijai dėl geresnių mitybinių sąlygų, deguonies kiekio, augimo faktorių ir dėl galimybės subrendusioms hemopoetinėms ląstelėms greitai patekti į cirkuliaciją (Kopp ir kt., 2005). Už kaulų čiulpų ribų, t. y. blužnyje bei kepenyse, esančios kraujagyslinės nišos gali palaikyti kaulų čiulpų nišos funkcijas esant įvairioms stresinėms situacijoms (Kiel ir Morrison, 2008). Be to, kraujagyslinė niša palengvina HKL migraciją per endotelį (Lapidot ir kt., 2005). Palikusios kaulinę nišą HKL mobilizuojasi kraujagyslinėje nišoje, patenka į kraujagysles, kur cirkuliuodamos kraujotakoje būna nuolatinėje sąveikoje su endotelio ląstelėmis. Palyginus ilgalaikių HKL ir mobilizuotų iš kaulinės nišos HKL (trumpalaikių) savybes, pastebėta, kad mobilizuotos HKL pasižymi geresnėmis

proliferacinėmis savybėmis negu ilgalaikės HKL. Taigi HKL, priklausomai nuo aplinkybių, gali būti tiek kaulinėje, tiek kraujagyslinėje nišose.

Su kamieninių ląstelių ir nišos sąveika taip pat susiję įvairios signalo perdavimo ir adhezijos molekulės, kurios suteikia nišoms specifines charakteristikas. Gerai žinomos signalinės molekulės bei jų ligandai, dalyvaujantys hemopoetinės nišos reguliavime, yra: SCF/c-kit, Jagged/Notch, angiopoetinas-1/Tie2 (Ang-1/Tie2) ir kalcio jonų receptoriai (CaR). Be to, žinoma, jog Wnt, BMP, FGF, hedgehog, TPO, IL-3 ir IL-6 signalinės molekulės yra svarbios hemopoetinės nišos reguliacijai (Yin ir Li, 2006). SCF per c-kit receptorių veikia HKL proliferaciją ir išgyvenimą. Taip pat SCF/c-kit sąveika svarbi HKL aktyvacijai bei atsipalaiduojant HKL iš nišos (Heissig ir kt., 2002). Nustatyta, kad Notch yra ekspresuojamas primityviųjų HKL, tuo tarpu jo ligandas Jag1 – osteoblastų ir stromos ląstelių paviršiuje. Parodyta, kad Notch aktyvavimas palaiko HKL ir pirmtakus nediferencijuotoje būsenoje, taip veikdamas hemopoetinių kamieninių ir ląstelių pirmtakų populiacijų pagausėjimą (Yin ir Li, 2006). Osteoblastai ekspresuoja Ang-1, tuo tarpu HKL ir endotelio ląstelės – Tie2. Ang-1 skatina HKL adheziją prie osteoblastų, taip veikdamas HKL palaikymą ramybės būsenoje (Arai ir kt., 2004). CaR padeda išlaikyti HKL kaulinio endotelio aplinkoje. Nustatyta, kad hemopoetinės kamieninės ląstelės neturinčios CaR po transplantacijos negalėdavo išsilaikyti kaulinėje nišoje (Adams ir kt., 2006). Su HKL veiklos reguliacija yra susiję BMP ir Wnt signalo perdavimo keliai. Osteoblastų paviršiuje yra stebima BMP-4 raiška, tačiau nėra žinomas jo receptoriai HKL paviršiuje. Wnt signalinis kelias svarbus kamieninių ląstelių atsinaujinimui, tačiau nežinoma, kurios nišos ląstelės gali ekspresuoti Wnt molekules (Staal ir Clevers, 2005). Panašūs duomenys gauti ir su FGF ir hedgehog signalo perdavimo keliais. Parodyta, kad *in vitro* šių kelių faktoriai stimuliuoja HKL, tačiau neįrodyta, jog jie būtų sintetina nišos ląstelės (de Haan ir kt., 2003). IL-3 ir IL-6 kartu su TPO gali veikti kamieninių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, tačiau nėra duomenų, kad jie būtų sintetiniai kaulinėje ar kraujagyslinėje nišose (Jenkins ir kt., 2005).

Nustatyta, kad HKL nišų funkcijų palaikymui svarbi N-kaderino/ β -katenino, VCAM/integrinų ir osteopontino/ β_1 -integrino (OPN/ β_1 integrino) adhezinė sąveika. Šios molekulės svarbios tiek kamieninių ląstelių išlaikymui nišos aplinkoje, tiek jų migracijai (Yin ir Li, 2006). N-kaderinas ir β -kateninas, orientuodami kamienines ląstes nišoje, veikia kamieninių ląstelių asimetrinį dalijimąsi (Muguruma ir kt., 2006). VCAM/integrinų ir OPN/ β_1 integrino adhezinės sąveikos siejamos su migracija kaulų čiulpuose link kraujagyslių endotelio bei su migracija per endotelinį (Nilsson ir kt., 2005). Tiksliai adhezijos molekulių funkcija nėra žinoma. Pastebėta, kad kamieninių ląstelių adheziniai ryšiai su nišos ląstelėmis koreliuoja su ląstelės ciklo kontrole. Manoma, kad tokia koordinacija reikalinga dinaminei kamieninių ląstelių reguliacijai (Yin ir Li, 2006). Transkripcijos faktorius c-Myc reguliuoja HKL ir jų nišos sąveikas, taip veikdamas HKL palaikymą ramybės būsenoje, proliferaciją ir diferenciaciją. c-Myc ekspresijos padidėjimas yra tiesiogiai susijęs su HKL išėjimu iš nišos, tuo tarpu c-Myc ekspresiją mažina proliferaciją slopinantys faktoriai, tokie kaip TGF- β . Po kamieninių ląstelių pasidalijimo dukterinė ląstelė, ekspresuojanti mažus kiekius c-Myc, išlaikoma ramybės būsenoje nišos aplinkoje; suaktyvėja N-kaderino ir integrinų produkcija. Tuo tarpu dukterinė ląstelė, ekspresuojanti didesnius kiekius c-Myc, pradeda išeiti iš nišos, ir adhezijos molekulių produkcija slopinama (Wilson ir kt., 2004). Išėjusių iš kaulinės nišos HKL patekimą į kraujagyslinę nišą veikia FGF-4 ir chemokinai, tokie kaip SDF-1. VE-kaderinas skatina megakariocitų pirmtakų adheziją kraujagyslinėje nišoje (Avecilla ir kt., 2004). Parodyta, kad FGF-4 pagerina megakariocitų pirmtakų adheziją kraujagyslinėje nišoje, tuo tarpu SDF-1 veikia kaip chemoatraktantas. FGF-4 ir SDF-1 taip pat veikia padidėjusią adhezijos molekulių raišką VLA-4 megakariocitų paviršiuje ir VCAM-1 kraujagyslės endotelio paviršiuje. HKL ląstelės ekspresuoja FGF receptorius: -1, -2 ir -3. Nustatyta, kad FGF skatina HKL atsinaujinimą bei proliferaciją. Manoma, kad kaulų čiulpuose yra nuo kaulinės link kraujagyslinės nišos didėjantis FGF gradientas, kuris veikia HKL ir pirmtakų patekimą į kraujagyslinę nišą (Kopp ir kt., 2005). Nustatyta, kad HKL paviršiuje

ekspresuojamas CXCR4 ir integrinai tai pat veikia HKL migraciją kaulų čiulpuose. Tyrimais įrodyta, kad SDF-1 ir jo receptorius CXCR4 reguliuoja HKL išėjimą iš kaulinės nišos ir kaulų čiulpų bei sugrįžimą atgal į kaulinę nišą. Jie yra svarbūs ir HKL išgyvenimui bei proliferacijai (Kollet ir kt., 2007). SDF-1 nuolatos ekspresuojamas osteoblastuose, endotelyje bei kitose stromos ląstelėse. Osteoblastų paviršiuje ekspresuojamas SDF-1 kartu su N-kaderinu bei β -aktinu padeda išlaikyti HKL kaulinėje nišoje (Muguruma ir kt., 2006). Kraujagyslių endotelio ląstelių ekspresuojamas SDF-1 skatina su E- ir P-selektiniais susijusią migraciją per endotelį. VLA-4 ir LFA-1 taip pat siejami su migracija per endotelį, bei migracija kaulų čiulpuose link kaulinės nišos. Padidėjusi SDF-1 ekspresija osteoblastų paviršiuje skatina HKL grįžimą į kaulinę nišą (Kopp ir kt., 2005). Klinikinėje praktikoje HKL mobilizacijai plačiai naudojamas G-CSF sumažina SDF-1 ekspresiją osteoblastų paviršiuje ir padidina sSDF-1 kiekį cirkuliacijoje. G-CSF reguliuoja SDF-1 lygį veikdamas proteolitinius fermentus (elastazę, katepsiną G, MMP-2, MMP-9 ir kt.) ir gali veikti jo transkripciją (Katayama ir kt., 2006).

Pažymėtina, kad osteoblastų populiacija kaulų čiulpuose yra gana heterogeniška tiek morfologiškai (verpstiškos kaulo endotelio ląstelės, ovalūs osteocitų pirtakai ir kt.), tiek pagal paviršiaus molekulių ekspresiją. Nustatyta tik N-kaderiną savo paviršiuje ekspresuojančių osteoblastų sąveika su HKL. Manoma, jog HKL ir skirtingų tipų pirtakai toje pat nišoje gali sąveikauti su skirtingomis osteoblastų subpopuliacijomis, arba netgi atvirkščiai – HKL sąveika su skirtingų subpopuliacijų osteoblastais galėtų veikti skirtingų hemopoetinių pirtakų formavimąsi. Taigi nustatyta tik nedidelė dalis reguliacinių molekulių bei sąveikų, veikiančių HKL jų nišoje. Mažai duomenų apie procesus vykstančius HKL nišoje esant uždegimui ar kitiems patologiniams procesams. Pati HKL niša, jos sudėtis, reguliuojami procesai ir jų mechanizmai šiuo metu tebelieka tyrimų bei diskusijų objektu.

2.1.3. Hemopoezės schema: klasikinė ir alternatyvi

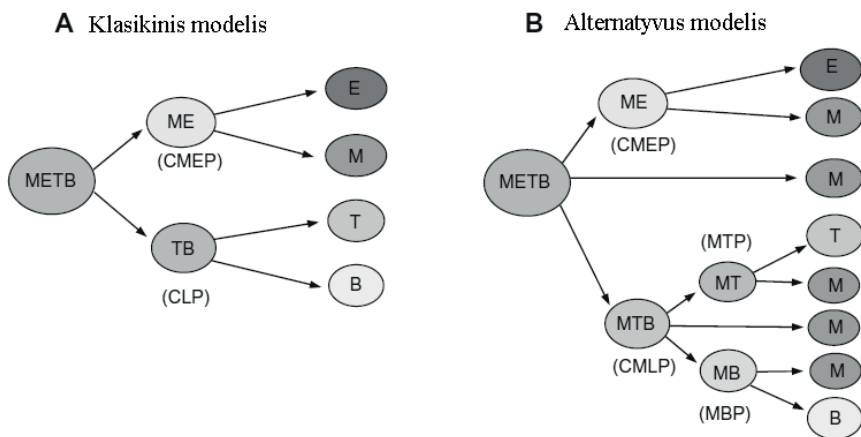
Kraujo ląstelės apima labai skirtingus ląstelių tipus, besiskiriančius savo atliekama funkcija. Jas vienija tai, jog visos kraujo ląstelės vystosi iš hemopoetinių kamieninių ląstelių (HKL). Absoliučios daugumos kraujo ląstelių gyvavimo trukmė yra trumpa. HKL yra būtinos nuolatiniams hemopoetinių multilinjinių pirmtakų papildymui bei vėlesniam jų virsmui į atskiras hemopoetines linijas (Orkin ir Zon, 2008). Kiekviena HKL turi potencialą generuoti milžiniškus kiekius kraujo ląstelių metų metus ar net dešimtmečius (Smith, 2003). Vienintelė pelės HKL per gyvūno gyvenimo trukmę potencialiai gali atstatyti visą hemopoetinę sistemą (Orkin ir Zon, 2008).

Ilgus metus kraujo ląstelės buvo klasifikuojamos remiantis morfologiniais kriterijais. Istoriskai susiklostė, jog XX amžiaus pradžioje mikroskopinių tyrimų dėka buvo nustatyta, jog eritrocitai, trombocitai, monocitai ir granulocitai diferencijuojasi kaulų čiulpuose. Taigi eritrocitai bei trombocitai kartu su fagocituojančiomis ląstelėmis buvo priskirti mieloidinei ląstelių linijai. Tuo tarpu limfocitai, aptikti limfoje bei histologiniuose blužnies, čiobrialaukės ir limfmazgių preparatuose, buvo priskirti limfoidinei linijai. Antroje XX pusėje, atsirandant vis naujiems eksperimentiniams duomenims, schema buvo detalizuojama. Atsirado klasikinis dichotominis hemopoezės modelis, kuriame kraujo ląstelės buvo suskirstytos į dvi pagrindines linijas: limfoidinę ir mieloidinę (Smith, 2003). Ilgainiui šis klasikinis modelis įvairių autorių buvo modifikuojamas, tačiau jo dichotominė koncepcija nekito. Pagal ją limfoidinei linijai priskiriamos: NK ląstelės, T ir B limfocitai, mieloidinei – monocitai (makrofagai; Kupferio; Langerhanso; dendritinės ląstelės), neutrofilai, eozinofilai, bazofilai, eritrocitai, trombocitai ir osteoklastai.

Klasikiniu hemopoezės modeliu buvo remiamasi daugiau nei 30 metų, tačiau pastebėta, jog jis nebegali paaiškinti naujausių atradimų hemopoezės srityje (Kawamoto ir kt., 2010). Atlikus tyrimus buvo nustatyti atskiri mieloidines ir T ląsteles bei mieloidines ir B ląsteles generuojantys pirmtakai

(Kawamoto ir kt., 1999). Pirmtakų, generuojančių tik T ar tik B ląsteles, aptikta nebuvo ir tai prieštaravo išsivyravusiai klasikinei dichotominei hemopoezės schemai. Buvo keliamos prielaidos apie mieloidinio gebėjimo išsaugojimą po bendros T/B linijos atsiskyrimą į T ir B linijas.

2001 metais pirmą kartą buvo pasiūlyta mieloidinio hemopoezės modelio koncepcija (Katsura ir Kawamoto, 2001), teigianti, jog HKL pirmiausiai išsiskiria į bendrą mieloidinį-eritroidinį (CMEP) pirmtaką ir bendrą mieloidinį-limfoidinį (CMLP) pirmtaką. T ir B limfocitai kildinami iš mieloido-limfoidinės linijos pirmtakų, praėjus tarpinėms T-mieloidinio bei B-mieloidinio pirmtakų stadijoms (2.1.1 pav).

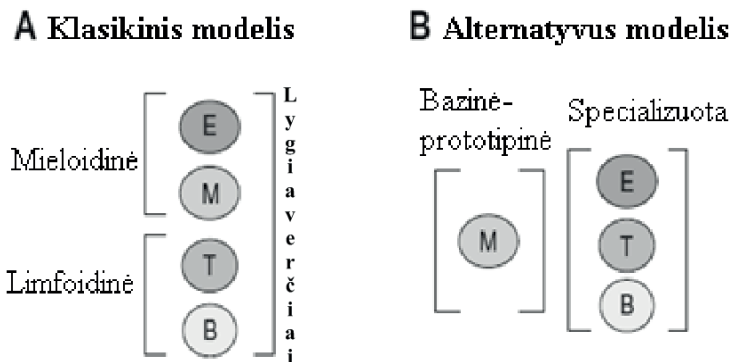


2.1.1 pav. **Klasikinio (A) ir alternatyvaus (B) hemopoezės modelių shemos.** A) Klasikiniame hemopoetinės kamieninės ląstelės (HKL) visų pirmą diferencijuojasi į bendrą mieloidoeritroidinių pirmtakų (CMEP) ir bendrą limfoidinių pirmtakų (CLP) linijas. E, M, T, B žymi pirmtakus pasižyminčius eritroidiniu, mieloidiniu, T ir B proliferacine galimybe atitinkamai. B) Alternatyviame modelyje HKL diferencijuojasi į bendrą mieloidoeritroidinių pirmtakų (CMEP) ir bendrą mielolimfoidinių pirmtakų (CMLP) linijas. Mieloidinio diferenciacijos galimybė išlieka po CMLP atsiskyrimo į T ir B pirmtakų linijas (pagal Kawamoto ir kt., 2010).

Tai vienas esminių skirtumų nuo klasikinio hemopoezės modelio, kur T ir B limfocitai priskiriami vienai linijai, nebaturinčiai mieloidinio potencialo.

Naujai siūlomame modelyje mieloidinę diferenciacijos galimybę išlaiko visos pirminės pirmtakų linijos: T, B ląstelių ir eritroidinė (Kawamoto ir kt., 2010).

Kitas svarbus skirtumas nuo klasikinės hemopoezės schemos yra ląstelių statuso nustatymas. Klasikinėje hemopoezės schemoje kraujo ląstelės yra priskiriamos dviems pagrindinėms linijoms, tačiau galutinės diferenciacijos ląstelės traktuojamos vienodai. Mieloidiniame modelyje siūloma, jog mieloidinė yra hemopoetinių prototipas, tuo tarpu eritroidinės, T ir B ląstelės atstovauja specializuotas ląsteles (2.1.2 pav). Remiantis mieloidine koncepcija, hemopoezė gali būti apibūdinama kaip vystymasis iš eritroidinės, T ir B ląstelių, paremtas prototipine vystymosi programa mieloidinių ląstelių generavimui (Kawamoto ir kt., 2010).



2.1.2 pav. **Klasikinio (A) ir alternatyvaus (B) hemopoezės modelių linijų hierarchinis vertinimas.** A) Klasikiame modelyje eritroidinė (E), mieloidinė (M), T ir B linijos vertinamos lygiavertė. B) Alternatyviame modelyje eritroidinė, T ir B linijos vertinamos kaip specializuotos, tuo tarpu mieloidinė kaip bazinė-prototipinė linija (pagal Kawamoto ir kt., 2010).

Prototipinei mieloidinei ląstelei yra būdingi pagrindiniai gynybiniai mechanizmai: fagocitozė ir mobilumas. Tuo tarpu specializuotos ląstelės įgyja naujus mechanizmus, jų baziniai mechanizmai daugiau ar mažiau yra modifikuojami arba visai išjungiami. Tokiu pavyzdžiu galėtų būti B ląstelė. Jos fagocituojantis aktyvumas nors ir sumažėjęs, tačiau išlikęs, sustiprėjęs

sugebėjimas pateikti antigeną, naujai atsiradęs gebėjimas atpažinti specifines antigenines determinantes.

Nuo 2001 metų, kai buvo pasiūlyta mieloidinės hemopoezės schema, vis daugėja tyrimų duomenų, paremiančių naująją hipotezę, kurių klasikinė hemopoezės schema paaiškinti negali. Nustatyta, jog ankstyvieji limfoidiniai pirmtakai kaulų čiulpuose išlaiko mieloidinį potencialą (Igarashi ir kt., 2002). Šis potencialas išlieka ir čiobrialiaukėje esančiose dendritinėse bei NK ląstelėse (Vosshenrich ir kt., 2006). *In vivo* atlikti tyrimai rodo, jog ~30% čiobrialiaukėje esančių makrofagų ir žymi dalis granulocitų atsiranda iš čiobrialiaukėje esančių T ląstelių pirmtakų (Wada ir kt., 2008). *In vitro* parodyta, jog mieloidiniai pirmtakai gali išsivystyti iš HKL tiesiogiai, tačiau nenustatyta, kad jie išlaikytų T ir/ar B potencialą (Takano ir kt., 2004). Mieloidinės ląstelės, įskaitant granulocitus, dažniausiai išsivysto iš mielo-limfoidinio pirmtako, rečiau iš eritro-mieloidinio (Yoshida ir kt., 2006). Nustatyta, kad ankstyvieji B ląstelių pirmtakai gali funkcionuoti kaip įprastinių dendritinių ląstelių pirmtakai virusinių infekcijų atveju (Nagai ir kt., 2006). B ląstelių pirmtakių virsmas ne į B ląsteles yra tiesiogiai susijęs su organizmo rūšimi, sužadinimu bei infekcijomis (Kawamoto ir kt., 2010). Linijų išsiskyrimas yra palaipsnis procesas, o savybių atsiradimas/išnykimas nesiremia principu: viskas arba nieko (Pelayo ir kt., 2006).

Šiuo metu toks mieloidinis hemopoezės modelis vis dar lieka diskusijų objektu. Diskutuojama, ar išvis gali egzistuoti pagrindinė hemopoezės taisyklė, tuo tarpu supaprastinti hemopoezės modeliai gali iškreipti realybę. Postuluojama, kad transplantuotų HKL gebėjimas diferencijuoti į nehemopoetinės sistemos ląstelių tipus, yra beveik neribotas, kas gali visiškai pakeisti dabartinį hemopoezės modelį. Toks HKL savybių neapibrėžtumas rodo HKL ir jų pirmtakų lankstumą hemopoezės metu, kas svarbu taikant jas terapijoje. Tuo galima pasinaudoti taikant terapiją, koreguojant naudojamų ląstelių grynumą bei heterogeniškumą, kas palengvintų ląstelių, reikalingų terapijai, gavimą, bei padidinti ląstelinės terapijos saugumą ir efektyvumą.

2.1.4. Hemopoetinių kamieninių ląstelių žymenys

Atliekant hemopoetinių kamieninių ląstelių tyrimus susiduriama su problema – HKL atpažinimu. Tai lemia keletas veiksnių: išskiriama keletas tipų HKL; itin nedidelė šių ląstelių populiacija bei šios populiacijos dažnis bendroje ląstelių populiacijoje; vizualiai HKL neįmanoma atskirti nuo daugumos kraujo ar kitų jas supančių subrendusių ląstelių. Šiuo metu labiausiai paplitęs HKL atskyrimo ar identifikavimo būdas yra paremtas ląstelių paviršiaus žymenų raiška. HKL diferencijuojantis kinta ir jų paviršiaus žymenų ekspresija (Musina ir kt., 2004). Vienų žymenų ląstelės diferenciacijos metu raiška atsiranda, kitų raiška nutrūksta arba įvyksta žymūs raiškos lygio pokyčiai. Taigi remiantis paviršiaus žymenų raiška, yra įmanoma nusakyti ląstelės diferenciacijos laipsnį.

Literatūroje yra aprašyta daug žymenų, naudojamų HKL atpažinimui ir išskyrimui. Dauguma jų yra paviršiaus baltyminės molekulės, kurios nustatomos naudojant žymėtus monokloninius antikūnus, likusioji dalis nustatoma metaboliniais žymenimis-dažais.

Hemopoetinės kamieninės ląstelės neturi subrendusioms kraujo ląstelėms charakteringų paviršiaus žymenų arba jų raiška labai skiriasi. Subrendusių ląstelių žymenys vadinami linijiniais žymenimis. Tokių žymenų kompleksai apima nuo 8 iki 14 paviršiaus baltyminių žymenų, charakteringų eritrocitų, T ląstelių, B ląstelių, NK ląstelių, monocitų bei granulocitų ląstelėms. Žmogaus HKL atskyrimui dažniausiai naudojami linijiniai žymenys – tai glikoforinas A, CD2, CD3, CD8, CD14, CD15, CD16, CD20, CD56 ir CD66b; pelių – CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, TER-119, Gr-1. Tiek pelių, tiek žmogaus ląstelių frakcija, išgryninta naudojant linijinius žymenis, pagal šiuos žymenis yra neigiama ir apibrėžiama kaip lin neigiama (lin⁻) (*angl.* lineage negative). Priklausomai nuo naudotos linijinių žymenų kombinacijos, lin⁻ ląstelių populiacijoje būna nuo 20 iki 500 kartų daugiau HKL, nei negrynintoje populiacijoje (Wognum ir kt., 2003). Kiti paviršiaus žymenys, naudojami HKL identifikavimui, yra: pelės – Sca-1, CD34, CD38, CD90.1(Thy1.1), CD117(c-kit), AA4.1, CD150, MHC I, CD43, CD27, FGFR,

VEGFR2; žmogaus – CD34, CD38, CD90, CD43, CD45RO, CD59, CD109, CD117, CD133, CD166, KDR, HLA DR. Plačiau aptarsime atpažinime bei gryninime naudojamus paviršiaus žymenis: CD34, CD38, c-kit ir Sca-1.

CD34 – ląstelių paviršiaus glikoproteinas, tarpląstelinės adhezijos faktorius. CD34 naudojamas kaip primityvių žmogaus hemopoetinių ląstelių žymuo, tačiau žinoma, kad HKL potencialu pasižymi ir CD34⁻ ląstelių populiacija (Alison ir kt., 2006). CD34⁺ HKL naudojamos tiek atliekant autologines, tiek alogenines transplantacijas. Nustatyta, kad jos greitai atstato kraujodarą, rečiau pasireiškia transplantanto prieš šeimininką reakcija lyginant su nefrakcionuotomis kaulų čiulpu ar periferinio kraujo ląstelėmis (Guo ir kt., 2003). Ilgą laiką CD34 buvo pagrindinis žymuo atrenkant HKL transplantacijoms, kuris šiuo metu vis dar tebenaudojamas klinikinėje praktikoje (Alison ir kt., 2008). Tyrimais parodyta, jog atskiriant CD34⁺ HKL galima atmesti primityvesnes t.y. ramybės būsenoje esančias HKL (Bonnet, 2002). Nustatyta, kad dauguma pelių HKL yra CD34⁻ (Guo ir kt., 2003). Tačiau ramybės būsenoje esančios pelių hemopoetinės ląstelės turi CD34, tačiau kiek skirtingai nei žmogaus HKL. CD34 žymens raiška pelių HKL paviršiuje priklauso ne tik nuo vystymosi stadijos, bet ir nuo ląstelės aktyvacijos būsenos (Wognum ir kt., 2003). Manoma, kad CD34 neturinčios pelių HKL yra ramybės būsenoje, tuo tarpu CD34 turinčios HKL yra sužadintos, joms būdingas aktyvus savęs atnaujinimas. Tai labiau panašu į lanksčią pusiausvyrą nei į hierarchinį susiskirstymą (Alison ir kt., 2006). Kadangi CD34 yra nepastovus žymuo HKL paviršiuje, tai pastaruoju metu mokslinėje praktikoje jį naudoti vengiama kaip pagrindinį HKL žymenį.

CD38 - glikoproteinas, ciklinė ADP ribozės hidrolazė. Dalyvauja ląstelių adhezijoje, signalo perdavime, kalcio reguliavime. Ilgą laiką, kartu su CD34, CD38 buvo vertinamas kaip svarbus HKL žymuo. Buvo manoma, jog žmogaus HKL yra neigiamos pagal CD38, o pelių kaulų čiulpu HKL pasižymi šio žymens raiška (Higuchi ir kt., 2003). Manoma, kad panašiai kaip ir CD34 atveju pelėse CD38 raiška yra susijusi su HKL aktyvacijos būseną. Nustatyta, kad aktyvintos HKL turi CD38, o grįžtant HKL į ramybės būseną CD38 raiška

yra slopinama (Tajima ir kt., 2009). Dėl raiškos svyravimų, susijusių su HKL aktyvacija, CD38 retai naudojamas mokslinėje praktikoje kaip pagrindinis žymuo.

CD117 (c-Kit) - tirozino kinazės receptorių, dalyvaujantis ląstelių diferenciacijoje, proliferacijoje, o taip pat įvairių medžiagų sekrecijoje. HKL ekspresuojančios c-Kit receptorių po transplantacijos dalyvauja ilgalaikiame hemopoezės atstatyme. Iki dviejų trečiųjų CD34⁺ kaulų čiulpų ląstelių turi šį žymenį. Su c-Kit receptoriais sąveikauja kamieninių ląstelių faktorius SCF, kurio biologinės funkcijos, susijusios su savaiminiu HKL atsinaujinimu, padeda HKL išgyventi *in vitro*.

Sca-1 – paviršiaus baltymas, dalyvauja HKL savaiminio atsinaujinimo, aktyvavimo bei vystymosi procesuose. Vienas dažniausiai naudojamų žymenų pelių HKL identifikavimui, priklauso Ly-6 antigenų šeimai. Sca-1 žymens raiška įvairuoja tarp skirtingų pelių linijų. C57BL/6J linijoje jo raiška yra ypač didelė, tuo tarpu BALB/c – kur kas mažesnė (Alison ir kt., 2006).

Taip pat HKL atpažinimui naudojami įvairūs metaboliniai žymenys- dažai. Dažniausiai jie naudojami kombinuojant kartu su antikūnais prieš paviršinius ląstelių žymenis. HKL identifikavimui naudojami metaboliniai žymenys: rodaminas 123 – dažo mitochondrijas (Spangrude ir Scollay, 1990); hoechst33342 – nusako dažo išstūmimo aktyvumą (Goodell ir kt., 1996); pyronin-Y – dažo RNR (Gothot ir kt., 1997); BAAA – nustato aldehiddehidrogenazės aktyvumą (Storms ir kt., 1999).

Dėl raiškos svyravimų ir tų pačių žymenų raiškos kitų ląstelių paviršiuje identifikuojant HKL nesiremiama kuriuo nors vienu žymeniu. Identifikuojant HKL naudojami keletas žymenų bei įvairūs žymenų deriniai.

2.1.5. Paviršiaus žymenų deriniai naudojami hemopoetinių kamieninių ląstelių identifikavimui

Nors HKL yra bene geriausiai ištyrinėtos kamieninės ląstelės, tačiau vienintelis žymuo, kuriuo remiantis būtų galima atpažinti jas, nėra aptiktas. HKL gryninimui taikomos įvairios atskyrimo strategijos besiremiančios

skirtingais žymenimis. Dažniausiai HKL ir/ar ląstelių-pirmtakių atpažinimui magnetinio ląstelių atskyrimo ir/ar tėkmės citometrijos metodais remiasi ląstelių paviršiaus molekulių deriniais. Šiuo metu žinomi beveik visų tolimesnės HKL diferenciacijos stadijų turimi paviršiaus žymenys, ir remiantis jais norimos ląstelės gali būti išskiriamos iš kaulų čiulpų ar periferinio kraujo (Challen ir kt., 2009). Nuolatos pranešama apie naujus HKL atpažinimui naudotinus žymenis

Plačiausiai paplitusi HKL atskyrimo strategija yra paremta skirtingu ląstelių fenotipu. HKL būdinga c-kit bei Sca-1 žymenų ekspresija ir tai, kad šios ląstelės neekspresuoja linijinių žymenų. Minėti kriterijai apibūdina taip vadinamą KLS (c-kit, Lin ir Sca-1 žymenų trumpinys) populiaciją, kurios būdingiausias bruožas – labai geras hemopoezės atstatymas. Manoma, jog kaulų čiulpų KLS populiacija nėra homogeniška. Ją sudaro ilgalaikės HKL, trumpalaikės HKL bei hemopoetiniai pirmtakai (Okada ir kt., 1992; Challen ir kt., 2009).

Nors naudojama daug ir įvairių HKL atskyrimo strategijų, tačiau beveik visas jas būtų galima suskirstyti į dvi grupes: pirmajai priskiriamos tos, kurios kaip atskyrimo pagrindą naudoja KLS identifikavimą, antrajai – tos, kurios nenaudoja. Siekiant išgryninti HKL ir/ar išskirti specifines hemopoetinių ląstelių-pirmtakių populiacijas, KLS kombinacija praturtinama papildomais žymenimis ir/arba tiesiog skiriasi Sca-1 ir/ar c-kit dėmenų ekspresija.

Siekiant gauti grynesnes pelių HKL populiacijas naudojamos žymenų kombinacijos: Flk2⁺CD34⁺KLS (Kiel ir kt., 2007); CD150⁺CD48⁻CD41⁻KLS (Goodell ir kt., 1996); CD45^{mid}lin⁻Rhodamine^{low}SP (Dykstra ir kt., 2006); SP^{KLS} (Adolfsson ir kt., 2001); CD90.1^{-/low}KLS (Morrison ir Weissman, 1994); CD90.1^{low}lin⁻Sca-1⁺Rhodamine^{low} (Kim ir kt., 1998); CD34^{-/low}KLS (Osawa ir kt., 1996); CD150⁺CD48⁻CD244⁻ (Kiel ir kt., 2005). Autorių, atskyrimo besiremenčių šiais žymenų deriniais, teigimu jų naudojamomis atskyrimo strategijomis galima gauti beveik homogeniškas HKL populiacijas. Tokių skirtingų atskyrimo strategijų, kurių dėka, kaip teigiama, galima atskirti HKL populiaciją, atsiradimo priežastis gana paprasta. Įvardindami atskirtą

populiaciją kaip HKL dažniausiai autoriai remiasi atskirtųjų populiacijų savybėmis, tokiomis kaip: letaliai apšvitintų pelių hemopoezės atstatymu ar proliferacinėmis bei diferenciacinėmis savybėmis *in vitro*.

Nė vienas iš šiuo metu naudojamų žymenų neturėtų būti siejamas su kuria nors esmine HKL funkicine savybe, kadangi žymenys gali varijuoti priklausomai nuo genetinių alelių, individo amžiaus, linijos (pelių ar kitų laboratorinių gyvūnų), vystymosi stadijos ar ląstelių aktyvacijos, ir šie skirtumai pasireiškia netgi rūšies viduje (Challen ir kt., 2009). Juo labiau žymenų raiškos skirtumai išryškėja tarp rūšių, pvz.; tarp žmogaus ir pelės. Be to, galima išvelgti ir konservatyvių ir/ar analogiškų žymenų. Naudojamų HKL atpažinimui žymenų įvairavimas apsunkina eksperimentinių duomenų vertinimą bei jų palyginimą su literatūros duomenimis.

Šiuo metu itin grynos žmogaus HKL naudojamos praktiškai beveik išimtinai tik eksperimentinėje praktikoje, tuo tarpu klinikinėje praktikoje naudojamos nefrakcionuotos kaulų čiulpu ląstelės arba atskyrimui naudojami vienas ar du žymenys, įskaitant plačiausiai taikomą CD34. Tokia su žmogaus HKL panaudojimu susijusi situacija tik apsunkina gryninimo strategijos pasirinkimą. Susiklosčiusi klinikinė praktika skatina HKL tyrimus, kuriuose HKL nagrinėjamos ne itin grynose ir/ar homogeniškos populiacijose. Tokios aplinkybės iš dalies apsprendė ir šiame darbe naudotos populiacijos pasirinkimą.

2.1.6. Hemopoetinių kamieninių ląstelių savybės

Hemopoetinės kamieninės ląstelės pasižymi tam tikromis savybėmis, kurių derinys, kaip ir pusiausvyra tarp jų, apibūdina kamienines ląsteles (Gazit ir kt., 2008). Viena išskirtinių kamieninių ląstelių, įskaitant HKL, savybių yra gebėjimas „pasirinkti“ kontroliuojamo dalijimosi pobūdį: simetrinį arba asimetrinį. Be to labai svarbu, kad kamieninės ląstelės paklūsta reguliuojamai migracijai bei senėjimo ir apoptozės mechanizams. Yra palaikoma pusiausvyra tarp dalijimosi pobūdžio, migracijos, senėjimo ir apoptozės

(Martinez-Agosto ir kt., 2007). Palaikoma pusiausvyra apsprendžia HKL kieki bei paplitimą organizme (Gazit ir kt., 2008). Savybių charakteristikos apibrėžia esminius kriterijus, kuriais remiantis apibūdinamos HKL (Martinez-Agosto ir kt., 2007).

2.1.6.1. HKL savęs atnaujinimas ir diferenciacija

Pusiausvyra tarp kamieninių ir diferencijuotų ląstelių yra itin svarbi ilgalaikiam funkciniam audinių gyvavimui (Martinez-Agosto ir kt., 2007). Ši pusiausvyra užtikrinama kamieninėms ląstelėms „pasirenkant“ kontroliuojamo dalijimosi pobūdį – simetrinį arba asimetrinį.

Įprastinėmis sąlygomis kamieninių ląstelių dalijimasis būna asimetrinis, t.y. pasidalijus viena dukterinė ląstelė išlaiko tokias pat savybes kaip ir motininė, kita – pasuka diferenciacijos keliu, vyksta hemopoezės procesas (Smith, 2003). Kamieninių ląstelių savybė save atnaujinti apibūdinama kaip sugebėjimas pasidalijus generuoti savo kopiją su tokiu pat arba labai panašiu potencialu (Alison ir kt., 2008). Tai esminė kamieninių ląstelių savybė, kadangi labiau diferencijuoti pirmtakai savęs atnaujinti nebegali. Savęs atnaujinimas yra svarbus, nes užtikrina diferencijuotų ląstelių produkciją viso organizmo gyvavimo metu. HKL atveju tai nenutrūkstama kraujo ląstelių gamyba.

Kitas galimas dalijimosi pobūdis – simetrinis. Po tokio pasidalijimo susidaro dvi dukterinės ląstelės, turinčios vienodą potencialą, t.y. po dalijimosi susidaro dvi kamieninės ląstelės arba dvi ląstelės, praradusios savęs atnaujinimo gebėjimą ir pasukusios diferenciacijos keliu. Simetrinio dalijimosi metu kamieninės ląstelės gali pagausinti arba sumažinti savo populiaciją. Itin svarbų vaidmenį apsprendžiant dalijimosi pobūdį bei jį palaikant vaidina kamieninių ląstelių niša (Martinez-Agosto ir kt., 2007).

2.1.6.2. Hemopoetinių kamieninių ląstelių plastiškumas

Nepaisant plačiai atliekamų kamieninių ląstelių tyrimų, jie vis dar tebėra pradinėje stadijoje ir tik pradeda suprasti, kaip kamieninės ląstelės veikia

organizmo pusiausvyros palaikymą. Egzistuoja daugybė reguliacinių mechanizmų, susijusių su pažeistų ar senų audinių ląstelių pakeitimu naujomis. Daugėja duomenų, įrodančių, jog regeneracinės ląstelių terapijos taikymas gali atstatyti ir organų funkcijas. Šiuo tikslu naudojamos kamieninės ląstelės turėtų sugebėti diferencijuotis į organui specifines ląsteles su jam būdingomis funkcinėmis savybėmis. Dėl įvairių techninių, politinių ir etinių priežasčių embrioninių kamieninių ląstelių panaudojimas šiuo tikslu yra nepriimtinas, todėl ieškoma alternatyvos – kitų kamieninių ląstelių, sugebančių diferencijuotis ir proliferuoti į tam tikras subrendusias ląsteles. HKL dėl savo proliferacinių savybių ir prieinamumo yra itin tinkamos ląstelinei terapijai, o mokslinių tyrimų duomenys šį teiginį patvirtina.

Kaip ir kitos kamieninės ląstelės HKL geba diferencijuotis į kur kas platesnį audinių spektrą, nei buvo manoma anksčiau. Postuluojama, kad transplantuotų HKL transdiferenciacinis pajėgumas, t.y. gebėjimas diferencijuoti į nehemopoetinės sistemos ląstelių tipus, yra beveik neribotas, kas gali visiškai pakeisti dabartinį hierarchinį hemopoezės modelį. Eksperimentiniuose tyrimuose, atliktuose su dalinai ar visiškai grynomis HKL populiacijomis, buvo parodytas jų gebėjimas diferencijuotis į skirtingo tipo ląsteles: raumenines (Jackson ir kt., 2001; Orlic ir kt., 2001), kepenų (Lagasse ir kt., 2000), odos, plaučių, inkstų bei žarnyno (Krause ir kt., 2001). Pastarųjų metų tyrimai alogeninių HKL transplantacijos srityje rodo, kad donoro ląstelės yra aptinkamos beveik visuose recipiento audiniuose. Tai palaiko prielaidą, jog kiekvienam funkciškai neveikiam organui galėtų būti taikoma ląstelinė terapija (Rovo ir Gratwohl, 2008).

Maža to, iškelta prielaida, jog HKL nėra galutinai ar negrįžtamai užprogramuotos diferencijuotis į hemopoetines ląsteles. Tam tikromis aplinkybėmis HKL gali dalyvauti ir nehemopoetinio audinio ląstelių regeneracijoje ar jo funkcijų atstatyme. Taigi iškelta hipotezė, jog kamieninių ląstelių lemtis yra „plastiška“ arba permaininga. Reikalui esant leidžianti kamieninėms ląstelėms keisti savo lemtį, kaip atsaką į audinių pažeidimo-regeneracinius signalus. Kamieninių ląstelių gebėjimas peržengti savo linijos

barjerą buvo pavadintas platiškumu ir siejamas su transdiferenciacija. Nors šie terminai įvairių autorių vartojami skirtingai, tačiau, jų teigimu, pilnas klinikinis kamieninių ląstelių potencialas gali būti atskleistas tik tiriant suaugusio organizmo kamienines ląsteles (Gennero ir kt., 2006).

Kita dalis mokslininkų abejoja tokiu kamieninių ląstelių sugebėjimu peržengti savo linijos barjerą. Jų manymu, HKL gali susilieti su nehemopoetinėmis ląstelėmis ir tokiu būdu imituoti jų virsmą. Taigi kalbant apie plastiškumą verta aptarti chimerizmą, transdiferenciaciją bei susiliejamą (Rovo ir Gratwohl, 2008).

Chimerizmas (mozaikizmas). Tyrimuose, atliktuose dar septintame dešimtmetyje, buvo suliejami dviejų skirtingų pelių linijų ankstyvos stadijos embrionai. Gautos pelės turėjo abiemis pelių linijoms būdingų ląstelių, kadangi ankstyvoje vystymosi stadijoje atsidūrusios kartu tėvinių pelių ląstelės bendrai diferencijavosi į įvairius organus. Kad dalyvautų organų formavime, šioms ląstelėms nereikėjo susilieti ar transdiferencijuoti. Tokios pelės vadinamos chimeromis, jos turi skirtingos kilmės ląsteles, kurioms būdinga įprasta chromosomų sudėtis ir normalus kariotipas, nebent sulieti embrionai turėjo XX ir XY ląsteles (Zech, 2005).

Transplantacinėje medicinoje vartojamas terminas mišrus chimerizmas apibūdina ląstelinį fenomeną, kuomet transplantato recipientas tarp savo ląstelių turi ir organo donorui būdingų ląstelių (Rovo ir Gratwohl, 2008). Alogeninės HKL transplantacijos atveju mišrus chimerizmas įprastai apibrėžiamas kaip situacija, kurioje viena hemopoetinių ląstelių dalis priskiriama recipientui, kita – donorui. Terminas mišrus nehemopoetinis chimerizmas vartojamas alogeninėje HKL transplantacijoje, kai nehemopoetinės ląstelės recipiente gali būti tiek recipiento, tiek donoro kilmės (Reed ir kt., 2007). Mišraus chimerizmo priežastys gali būti kelios: fetomaternalinis mikrochimerizmas, transdiferenciacija, plastiškumas ir susiliejimas (Rovo ir Gratwohl, 2008).

Mikrochimerizmo atveju genetiškai besiskiriančių nuo šeimininko ląstelių aptinkama labai mažai. Dažniausiai pasitaikantis yra fetomaternalinis

mikrochimerizmas. Kai vaisiaus kilmės ląstelės yra aptinkamos motinos organizme (Reed ir kt., 2007). Nustatyta, jog vaisiaus kilmės ląstelės motinos organizme cirkuliuoja ar išlieka audiniuose iki 38 metų (Evans ir kt., 1999). Teigiama, kad moters, kuri buvo nėščia, audiniuose galima aptikti vaisiaus ląstelių, įskaitant ir kamienines ląsteles (Rovo ir Gratwohl, 2008). Tokios chimerinės ląstelių populiacijos gali pasižymėti skirtingomis biologinėmis savybėmis, skirtingai nei ląstelių populiacijos, išskirtos iš vyrų ar niekada kūdikių nesilaukusių moterų (Bianchi ir Fisk, 2007). Kur kas retesnis yra transmaternalinis mikrochimerizmas, atsirandantis tarp dviejų (ar daugiau) neidentišκών dvynių, esančių motinos organizme (Rovo ir Gratwohl, 2008). Be to, mikrochimerizmas buvo nustatytas ir pacientuose su pažeistu imunitetu, kuriems dėl traumos buvo atliktas kraujo perpylimas (Reed ir kt., 2007).

Ląstelių susilieјimas. Genetiškai GFP žymėtas transgeninių pelių kaulų čiulpų ląsteles *in vitro* sumaišius su embrioninėmis kamieninėmis ląstelėmis, nedidelė dalis kaulų čiulpų ląstelių susilieja su embrioninėmis kamieninėmis ląstelėmis, dėl ko atsiranda ląstelės įvairiu laipsniu ekspresuojančios abiejų sulietų ląstelių genus. Susidaro skirtingos kilmės chromosomų mozaika, gautos ląstelės perima dalį embrioninių kamieninių ląstelių fenotipinių savybių, nors toks perėmimas yra gana atsitiktinis. Fenotipinės savybės priklauso nuo to, kieno genai po susilieјimo nuslopinami (Terada ir kt., 2002). Ląstelių susilieјimas daugialąščiuose organizmuose vyksta ir įprastinėmis sąlygomis. Susilieјant kiaušinėliui ir spermatozoidui apvaisinimo metu, susilieјant mioblastams daugiabranduolių miofibrilių formavimosi metu ar formuojantis osteoklastams (Rovo ir Gratwohl, 2008). Ląstelių susilieјimas stebimas ir įvairiomis pataloginėmis sąlygomis: po ląstelių pažeidimo, virusinių ar bakterinių infekcijų metu ar esant piktybiniam ląstelių augimui (Zech, 2005). Manoma, jog spontaninio susilieјimo tikimybė svyruoja nuo 1:100 iki 1:1000000, priklausomai nuo ląstelių tipo ir aplinkos veiksnių (Terada ir kt., 2002).

Ląstelių susilieјimas galėtų paaiškinti dalį rezultatų, gautų tiriant pažeistų audinių atstatymą kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis (Medvinsky

ir Smith, 2003). Buvo parodyta, kad kaulų čiulpų kamieninės ląstelės spontaniškai susilieja *in vitro* su neuronų pirmtakais, o *in vivo* – su kepenų hepatocitais, Purkinje neuronais smegenyse, kardiomiocitais širdyje, dėl ko susiformuoja daugiabranduolės ląstelės (Alvarez-Dolado ir kt., 2003). Remiantis tyrimų duomenimis, kaulų čiulpų kamieninės ląstelės gali perimti ląstelių recipienčių fenotipą (Ying ir kt., 2002).

Plastiškumas ir transdiferenciacija. Hemopoetinių kamieninių ląstelių gebėjimas diferencijuotis į raumens ląsteles nėra ypač stebinantys reiškinys, kadangi hemopoetinės ir raumeninės ląstelės kilusios iš to paties gemalinio lapelio – mezodermos (Peault ir kt., 2002). Maža to, toks procesas gali būti dvikryptis. Apibūdinant kamieninių ląstelių gebėjimą diferencijuotis į to paties ar kito gemalinio lapelio kilmės ląsteles dažniausiai vartojami skirtingi terminai. Bendro sutarimo vis dar nėra. Vienų autorių darbuose terminas kamieninių ląstelių plastiškumas vartojamas kaip bendrinis pavadinimas, apibūdinantis gebėjimą diferencijuotis į kito audinio ląsteles. Tuo tarpu terminas transdiferenciacija yra vartojamas apibūdinant procesą, kurio metu kamieninės ląstelės diferencijuojasi į kito audinio ląsteles, neatskiriant, jos kilusios iš to paties ar kito gemalinio lapelio (Zech, 2005). Kiti autoriai terminą kamieninių ląstelių plastiškumas vartoja tiek apibūdinant gebėjimą diferencijuotis į kito audinio ląsteles, tiek kalbant apie procesą, kurio metu vyksta tokia diferenciacija. Dažniausiai plastiškumu apibrėžiamas kamieninių ląstelių gebėjimas diferencijuotis į to paties gemalinio lapelio kilmės audinio ląsteles, o transdiferenciacija – į kito gemalinio lapelio kilmės audinio ląsteles (Rovo ir Gratwohl, 2008).

In vitro nustatyta, kad transdiferenciacija siejasi su signalais branduolyje, pakeičiančiais genų raiškos pobūdį (Reyes ir kt., 2001; Collas, 2003). Tai susiję su branduolio struktūros ir chromatino komponentų pertvarkomis branduolyje vykstant DNR ir chromatino kovalentinei modifikacijai bei chromatino ir genų reorganizacijai. Šio proceso metu slopinama įprastinė genų ekspresija. Transdiferenciacijos, dediferenciacijos ir kamieninių ląstelių plastiškumo molekuliniai veiksniai gali būti traktuojami

kaip nukrypimas, vykstantis įprastinės ląstelių diferenciacijos metu (Rovo ir Gratwohl, 2008). Epigenominis genų reguliavimo lygis paprastai padeda palaikyti transkripcinių programų stabilumą ir perdavimą. Kai epigenominiai komponentai pažeidžiami, numatyta ląstelinė programa gali pakisti kita vystymosi kryptimi (Rizzino, 2007).

Plastiškumo ir transdiferenciacijos priežastys nėra aiškios, manoma, kad tai galėtų būti siejama su sąlygomis, atsirandančiomis organizme pažeidimų metu. Kaip pirminis gynybinis atsakas pažeidus audinį vyksta nekrotinių ląstelių pakeitimas kamieninėmis. Audinio kamieninių ląstelių ištekliams išsekus, cirkuliuojančios kamieninės ląstelės yra skatinamos atstatyti audinio kamieninių ląstelių populiaciją ir dalyvauti audinio atstatyme. Taigi cirkuliuojančios kamieninės ląstelės gali tarnauti kaip atsarginė pagalbos sistema. Trumpalaikis jos veikimas pagerina regeneraciją, tačiau ilgalaikis cirkuliuojančių kamieninių ląstelių įtraukimas gali būti pavojingas ir yra siejamas su auglių formavimusi (Korbling ir Estrov, 2003). Tyrimai, atlikti po alogeninių HKL transplantacijų, parodė, kad donoro ląstelės didesniu ar mažesniu tankiu yra identifikuojamos beveik visuose recipiento audiniuose, išskyrus plauko folikulus (Rovo ir Gratwohl, 2008). Vis tik HKL plastiškumas bei gebėjimas transdiferencijuoti itin svarbūs nehemopoetinio audinio pažeidimų regeneracijoje.

2.2. KAMIENINĖS LAŠTELĖS IR UŽDEGIMAS

Uždegimas – tipiškas patologinis procesas, susiformavęs vykstant evoliucijai kaip apsauginė prisitaikomoji organizmo reakcija į patogeninius faktorius, kuriuos būtina lokalizuoti, sunaikinti ir pašalinti, likviduojant uždegimo padarinius (Vane ir Botting, 1987). Tai stiprus fiziologinis stresas, veikiantis daugelį organų sistemų ir lydymas ženklių energetinio metabolizmo, imuninės funkcijos bei širdies ir kraujagyslių homeostazės pakitimų (Bone, 1991). Uždegimo metu pakenkto organo ar audinio plote vyksta pakitimai. Sutrikus kraujo ir limfos apytakai, išsiplėtus kraujagyslėms ir padidėjus kraujoplūdžiui atsiranda patinimas, o padidėjus kraujagyslių pralaidumui

vykstanti skysčių, plazmos baltymų ir leukocitų eksudacija (uždegiminė edema) sukelia paraudimą ir audinio temperatūros pakilimą. Už tai atsakingi uždegimo židinyje susikaupę – histaminas, bradikininas, prostaglandinas, komplemento komponentai ir kiti mediatoriai. Pakinta ląstelių struktūra ir funkcijos, o jungiamojo audinio pažeidimą uždegimo židinyje sustiprina iš aktyvintų neutrofilų atsipalaidavę laisvieji deguonies radikalai bei lizosominiai fermentai. Taigi uždegimo židinyje mobilizuojamos specifinės ir nespecifinės apsaugos reakcijos. Skatinama kamieninių ląstelių migracija į uždegimo židinių diferenciacija į priešuždegimines ląsteles bei dalyvavimas uždegimo slopinime (Sehmi ir kt., 2003). Atlikti moksliniai tyrimai rodo, kad į pažeidimo vietą atkeliavusios kamieninės ląstelės dalyvauja pažeisto audinio regeneracijos procesuose (Coulombel, 2003; Direkze ir kt., 2003; Kahn ir kt., 2004; Malgieri ir kt., 2010). Be to, HKL dalijantis ir diferencijuojantis į efektorines ląsteles yra nuolat atnaujinamos imuninės sistemos ląstelės (Jaiswal ir Weissman, 2009).

Uždegimas, remiantis skirtingais kriterijais, gali būti: ūminis ir lėtinis (pagal laiką), paviršinis ir gilus (pagal audinio pažeidimo laipsnį), specifinis ir nespecifinis (pagal imuninio atsako tipą), greito ir lėto tipo hiperjautrumas (pagal efektorinį mechanizmą). Imuninių reakcijų sukelti pažeidimai ir autoimuninės reakcijos paprastai vadinami padidėjusio jautrumo reakcijomis. Padidėjusio jautrumo reakcijų klasifikacija pagrįsta efektorinių mechanizmų, atsakingų už ląstelių ir audinių pažeidimus, ypatumais (Plitz ir kt., 2003). Tai IgE (greito tipo padidėjusio jautrumo) reakcijos, antikūnų, nukreiptų prieš ląstelių paviršiaus ar audinių antigenus reakcijos, imuninių kompleksų ir sensibilizuotų T limfocitų (lėto tipo padidėjusio jautrumo) reakcijos. Pirmasis lėto tipo padidėjusio jautrumo reakciją dar 1882 metais pastebėjo tuberkuliozės sukėlėjo atradėjas Robertas Kochas (Black, 1999). Kontaktinio hiperjautrumo reakcija – tai lėto tipo padidinto jautrumo reakcija, sukeliama sensibilizuotų T limfocitų reakcijos į antigeną (Tajima ir kt., 2009). Pagal vystymosi etapus skiriamos dvi kontaktinio hiperjautrumo reakcijos fazės: 1) sensibilizacijos, kai T limfocitai susiduria su cheminiu

alergenu/haptenu ir diferencijuojasi į specifines atminties ląsteles; 2) efektorinė, kai pakartotino kontakto su alergenu/haptenu metu pasireiškia klinikiniai simptomai. Atliekant eksperimentus dažniausiai naudojami kontaktinio hiperjautrumo reakcijos induktoriai yra haptenui: dinitrofluorbenzolas, oksozolonas bei trinitrochlorbenzolas. Šiomis medžiagomis sukelta pelių pėdos edema yra populiarus moksliniuose tyrimuose naudojamas lėtinio uždegimo modelis *in vivo*.

Remiantis literatūros duomenimis, kontaktinio hiperjautrumo reakciją sukelia pro odą į dermą patekęs antigenas. Susidariusį antigeno ir odos baltymų kompleksą atpažįsta Langerhanso ląstelės (Black, 1999). Pastarosios, patekusios į limfmazgius, virsta dendritinėmis ląstelėmis ir pateikia antigeną T limfocitams. Šie proliferuoja, diferencijuojasi ir virsta pagalbines T (Th) ląstelėmis bei atminties ląstelėmis. Kontaktinio hiperjautrumo reakcijai itin svarbios yra Th ląstelės, kurios palieka limfinį mazgą, yra nunešamos į odą, kur reaguoja su jos paviršiuje esančiais antigenais. Th atpažįsta antigeną, kurį pateikia Langerhanso ląstelės kartu su jų paviršiuje esančia MHC II molekule (Bacci ir kt., 1997; Bouloc ir kt., 1998). Th ląstelės, savo paviršiuje turinčios CD4 diferenciacijos antigenus, atpalaiduodamos citokinus reguliuoja imuninį atsaką (Girolomoni ir kt., 2001; Gomariz ir kt., 2001). Th1 subpopuliacijos ląstelių sekretuojamas TNF- α didina prostacikliną produkuojančių fermentų ekspresiją kraujagyslių endotelio ląstelėse. Prostaciklinas sukelia kraujagyslių išsiplėtimą bei kontroliuoja imunokompetentinių ląstelių pristatymą į uždegimo židinį. Be to, Th1 išskiriamas IFN γ sukelia ICAM-1 ir HLA II klasės molekulių ekspresiją keratinocitų membranose bei juos aktyvina. Keratinocitai pradeda išskirti uždegimą sukeliančius citokinus ir tokiu būdu palaiko uždegimą.

Th1 limfocitų produkuojami citokinai stimuliuoja B ląsteles, todėl formuojasi plazminės antikūnus produkuojančios ląstelės. Šie citokinai stimuliuoja ir citotoksines T ląsteles bei sutelkia aktyvintus makrofagus sensibilizacijos/uždegimo vietoje. Aktyvinti makrofagai išskiria uždegimą palaikančius citokinus, tokius kaip IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , bei aktyvina

fagocitozę (Azuma ir Ohura, 2002). Literatūroje skelbiami kamieninių ląstelių tyrimų duomenys, gauti taikant įvairius eksperimentinius modelius, rodo, kad esant audinio ar organo pažeidimui, kamieninės ląstelės selektyviai migruoja į pažeidimo zoną, dalijasi ir diferencijuojasi, sudarydamos toje vietoje naują audinį (Malgieri ir kt., 2010; Manieri ir Stappenbeck, 2010). Pastebėtas teigiamas transplantuotų kamieninių ląstelių poveikis sisteminių autoimuninių ligų atveju (Zhou ir kt., 2008; Sun ir kt., 2009; Gu ir kt., 2010; Sun ir kt., 2010), regeneruojant kepenis (Ribeiro, 2009), atstatant kaulinį audinį (Lee ir kt., 2010), neurodegeneracinių, širdies ir kitų ligų atvejais (Dantuma ir kt., 2010; Vertes, 2010; Wolfe, 2010). Taigi moksliniai darbai, susiję su kamieninių ląstelių poveikio uždegimui tyrimais, yra vykdomi pakankamai intensyviai, tačiau tebelieka nemažai klausimų, į kuriuos dar reikia atsakyti.

2.3. KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ MIGRACIJA

Kamieninės ląstelės dalyvauja organogenezėje, ląstelių kaitoje ir pažeidimų atstatyme. Kiekvienai šių funkcijų būtinas kamieninių ląstelių judėjimas (migracija), kuris apibrėžiamas kaip orientuotas ar nukreiptas ląstelių judėjimas į tam tikrą organizmo vietą. Kamieninių ląstelių migracija svarbi tiek embriogenezei, tiek įprastiniam suaugusio organizmo funkcionavimui. Išskiriami du kamieninių ląstelių migracijos pobūdžiai: „homingas“ (iš *angl. homing* – grįžimas namo ar namų suradimas) ir tarpląstelinė migracija (Laird ir kt., 2008). „Homingas“ apibrėžiamas kaip procesas, kurio metu kamieninės ląstelės kartu su krauju keliaudamos organizme atpažįsta specifines molekules ir pradeda sąveikauti su kraujagyslių endotelio ląstelėmis, esančiomis tam tikrame organe. Šiuo metu geriausiai ištirtas yra HKL „homingas“, tačiau nustatyti dėsniumai gali būti taikomi ir kitų tipų kamieninėms ląstelėms, pavyzdžiui, įvestoms mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms ar metastazuojančioms vėžio kamieninėms ląstelėms (Burger ir Kipps, 2006). Kamieninių ląstelių kelionė kraujagyslių sistema kartu su krauju yra pasyvus procesas, tačiau prieš „homingą“ ir po jo vyksta aktyvios migracijos etapai. Jo metu kamieninės ląstelės iš savo nišos keliauja iki

kraujagyslių ir per jų sienelę pasiekia kraujotaką bei iš kraujotakos pereina į organą. Gebėjimas atpažinti organui specifines kraujagysles ir po atpažinimo vykstanti stipri adhezija yra būtini kamieninių ląstelių perėjimui į organą (Smart ir Riley, 2008). Vykstant „homingui“ būdingos nuoseklios receptoriaus-ligando sąveikos. Išskiriamos mažiausiai trys tokių sąveikų etapai: pirminio sukibimo, stimuliavimo ir prikibimo. Pirminis sukibimas vyksta sąveikaujant pirminėms adhezijos molekulėms (selektinams ir $\alpha 4$ -integrinams). Jis pasižymi sparčia sąveikos kinetika ir dideliu tamprumu, tačiau yra trumpalaikis. Stimuliavimo metu prisikabinusias ląsteles ir jų membraninius receptorių veikia tirpūs ir paviršiniai chemoatraktantai. Prikibimas vyksta sąveikaujant antrinėms adhezijos molekulėms (dažniausiai $\beta 2$ - ir $\alpha 4$ - integrinams), kurios sąveikauja su imunoglobulinų superšeimos ligandais kraujagyslių endotelio paviršiuje (Laird ir kt., 2008).

Tarpląstelinė kamieninių ląstelių migracija vyksta dėl jų gebėjimo atpažinti tarpląstelinėje erdvėje esančius signalus bei jiems paklusti. Skirtingai nuo „homingo“ tarpląstelinei migracijai reikalingas aktyvus ameboidinis judėjimas, kuris nepriklauso nuo kraujotakos. Tarpląstelinė migracija geriausiai ištirta skeleto raumenyse, tiriant raumeninių kamieninių ląstelių ir pirmtakų migraciją (Smart ir Riley, 2008). Raumenų regeneracinis potencialas siejamas su specifiniais miogeniniais pirmtakais. Jie išsidėstę ant miofibrilių bazinės membranos per adhezijos molekules (M kaderiną, $\beta 1$ integriną) kaip satelitinės ląstelės, įprastiniu atveju esančios ramybės būsenoje. Pažeidimo atveju sekretuojamas SDF-1 moduliuoja satelitinių ląstelių sąveiką su bazine membrana, veikdamas paviršinio SDF-1 ir CXCR4 (C-X-C tipo chemokino receptorių 4) sąveiką. Satelitinės ląstelės gali atkibti, migruoti į pažeidimo židinį bei dalyvauti šalia esančių fibrilių atstatyme (Laird ir kt., 2008). Satelitinių ląstelių aktyvacija, migracija ir susiliejimas siejami su raumeninio audinio atsinaujinimu ir regeneracija. Migraciją audinyje apsprendžia aktyvus ameboidinis judėjimas tarpląstelinėje erdvėje (Smart ir Riley, 2008).

Tiriant nukreiptą migraciją į pažeistą audinį nustatyta, jog dalis mechanizmų yra tokie pat, kaip ir vykstant „homingui“ į kaulų čiulpus, o

vertinant tarpląstelinę migraciją vadovaujamosi migracijos raumeniniame audinyje principais. Manoma, jog daugelio kamieninių ląstelių mobilizacijos ir „homingo“ mechanizmai gali sutapti (Laird ir kt., 2008). Nors yra duomenų, jog migraciją į tam tikrus pažeistus organus gali nulemti visiškai kiti migraciją reguliuojantys mechanizmai (Stroo ir kt., 2009).

2.3.1. Hemopoetinių kamieninių ląstelių migracija ir fiziologinė recirkuliacija

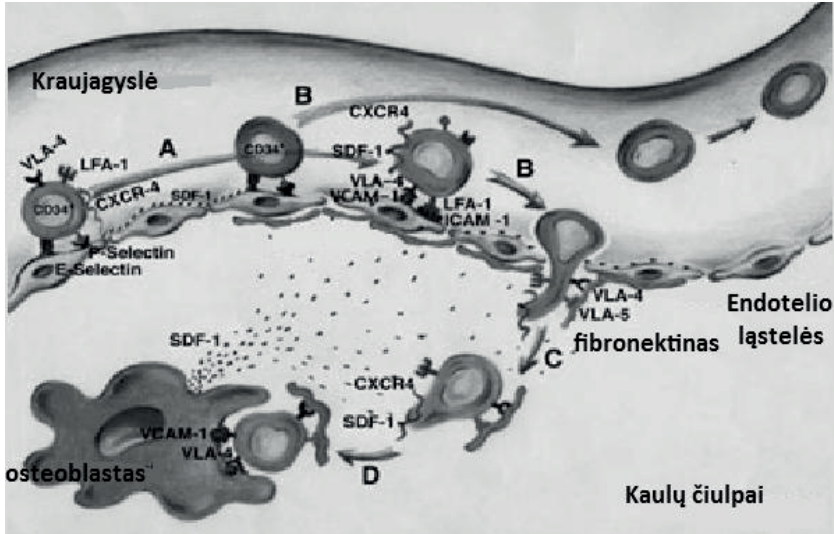
Kontroliuojama HKL migracija yra įprastinės hemopoezės dalis suaugusiame organizme. Migracija užtikrina subrendusių kraujo ląstelių pasklidimą ir yra būtina jų funkcijai užtikrinti. Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad kontroliuojama HKL migracija suaugusiame organizme yra ne tik įprastas reiškinys, bet ir svarbi HKL savybė (Laird ir kt., 2008). Didžioji dauguma HKL aptinkamos kaulų čiulpuose, tačiau nedidelė jų dalis gali būti nuolat aptinkama cirkuliacijoje. Kraujyje cirkuliuojančios HKL funkciškai ir fenotipiškai buvo identifikuotos tiriant periferinių kraujo ląstelių transplantaciją, ir eksperimentuose su parabiotinėmis pelėmis, kai chirurginiu būdu buvo sujungiami skirtingų individų kraujotaka (Wright ir kt., 2001; Massberg ir kt., 2007). Tyrimai su parabiotinėmis pelėmis parodė, jog cirkuliuojančios HKL gali greitai prigyti kito individo kaulų čiulpuose ir palaikyti hemopoezę. Pabrėžtina, kad toks prigijimas nebuvo susijęs su uždegimu dėl chirurginės intervencijos. Be to, nebuvo stebimas hemopoetinių ląstelių kiekio sumažėjimas viename ar abiejuose individuose (Wright ir kt., 2001). Tokie duomenys sustiprina teiginius apie HKL įprastinę-fiziologinę cirkuliaciją. Fiziologinės pelių HKL cirkuliacijos tyrimai *in vivo* atskleidė neįtikėtiną šių ląstelių kelionę po organizmą. HKL iš kaulų čiulpų patenka į kraujotaką, iš jos į įvairius audinius (kepenis, inkstus, plaučius ar kitus). Iš audinių HKL pereina į limfą, o iš jos grįžta atgal į kraujotaką, į kaulų čiulpus ar kartoja savo kelionę po organizmą (Massberg ir kt., 2007). Fiziologinę HKL recirkuliaciją būtų galima suskirstyti į sekančius santykinius etapus: mobilizaciją ir išėjimą į kraujotaką; „homingą“; tarpląstelinę migraciją;

prigijimą/repopuliaciją arba sugrįžimą į cirkuliaciją; sugrįžimą į kaulų čiulpus arba pakartotinį išėjimą į cirkuliaciją.

HKL mobilizaciją ir „homingą“ reguliuoja tos pačios molekulės (citokinai, chemokinai ir proteazės), tik skiriasi jų veikimo eiliškumas. Mobilizacija apibūdinama tarpląstelių adhezinių kontaktų tarp HKL ir nišos ląstelių praradimu bei paviršinio SDF-1 ir CXCR4 sąveikos sutrikdymu. „Homingui“ būdingas tarpląstelių adhezinių ryšių formavimas ir paviršinio SDF-1 bei CXCR4 sąveikos formavimas (Smart ir Riley, 2008). HKL išėjimas iš jų nišos kaulų čiulpuose vyksta nuolatos, skirtingai nei kitų kamieninių ląstelių, kurių išėjimas iš nišos tiesiogiai siejamas su atsaku į audinio pažeidimą. HKL mobilizaciją skatina: nišos ląstelių paviršiuje ekspresuojamo SDF-1 koncentracijos sumažėjimas ir tirpus SDF-1, kurį į cirkuliaciją išskiria kiti audiniai, koncentracijos kaulų čiulpuose padidėjimas (Laird ir kt., 2008). Pirmuoju atveju kaulų čiulpų ląstelėms ir neutrofilams išskyrus proteolitinius fermentus (CD26, elastazę, proteinazę-3, katepsiną K-G) yra suardomas HKL nišos ląstelių ekspresuojamas SDF-1 ir inaktyvinamas HKL paviršiuje ekspresuojamas CXCR4. Tirpus SDF-1 skatina nišos aplinkoje esančias ląsteles sekretuoti MMP-9, kas sukelia SCF atpalaidavimą. SCF kartu su proteinaze-3 skatina HKL proliferaciją bei palaipsnių išėjimą iš nišos aplinkos. Iš nišos išeinančių HKL judėjimą veikia transendotelinis SDF-1 gradientas (Kollet ir kt., 2006). HKL mobilizacija iš kaulų čiulpų siejama su įvairių citokinų (G-CSF, GM-CSF, Flt-3 ligandu, EPO, SCF), augimo faktorių (VEGF, ang-1, PGF) ir chemokinų (SDF-1, IL-8, GRO-β, MIP-2) poveikiu. Veikiant citokinams HKL mobilizacija savo piką pasiekia po 5-6 dienų, tuo tarpu chemokinai mobilizaciją skatina nuo 30 min iki kelių valandų (Smart ir Riley, 2008).

Manoma, kad HKL migracija per endotelį, vykstant mobilizacijai, „homingui“ ar išėjimui iš periferinio audinio į cirkuliaciją, yra sutampantys procesai, kuriuose skiriasi migracijos kryptis ir su tuo siejami ląstelių bei faktorių pokyčiai. Transendotelinė migracija geriausiai charakterizuota tiriant HKL „homingą“ atgal į kaulų čiulpus (2.3.1 pav.). Aprašant hemopoetinių

kamieninių ląstelių migraciją remiamasi “homingo” į kaulų čiulpus mechanizmu.



2.3.1 pav. Hemopoetinių kamieninių ląstelių “homingas” į kaulų čiulpus. A) pirminis prisikabinimas vyksta HKL sąveikaujant su endotelio ląstelių paviršiuje esančiais E ir P selektiniais. SDF-1 aktyvina CXCR4 ekspresuojančias ląsteles. Inicijuojamos VLA-4/VCAM-1 ir LFA-1/ICAM-1 sąveikos. (B) Ląstelės, neekspresuojančios ar nepakankamai ekspresuojančios CXCR4, atkimba nuo endotelio ir grįžta į cirkuliaciją. (C) Kaip atsakas į SDF-1 vyksta prikibusių ląstelių perėjimas per endotelį, sukeltas VLA-4/VLA-5 sąveikos su fibronektinu. (D) HKL pasiekia savo nišą, ekspresuojančią tam tikras adhezijos molekules, SDF-1 ir augimo faktorius (pagal Peled ir kt., 2000).

Hemopoetinių kamieninių ląstelių “homingas” gali vykti ir į įvairius periferinius audinius bei organus, kur galima HKL diferenciacija mieloidine ar nehemopoetiniam audiniui specifine kryptimi. HKL diferenciacija mieloidine kryptimi periferiniame audinyje siejama su TLR2 ir TLR4 aktyvavimu, tuo tarpu diferenciacijos audiniui specifine kryptimi faktoriai mažai žinomi ir tokia galima diferenciacija diskutuotina. HKL periferiniuose organuose ar audiniuose gali išbūti iki 36 val. Jei diferenciacijos signalų nėra, vyksta nuo sfingozin-1-fosfato (S1P) priklausomas HKL išėjimas į limfinę sistemą. S1P koncentracija limfoje yra aukšta, tuo tarpu audinyje S1P nuolat skaidomas S1P

liazių. HKL išėjimas iš audinio yra skatinamas didėjančio S1P gradiento. Iš limfinės sistemos HKL patenka atgal į kraujotaką (Laird ir kt., 2008). HKL „homingas“ į periferinius audinius ir galimi diferenciacijos procesai kol kas yra menkai ištirti. Nustatyta, kad esant audinio ar organo pažeidimui, kamieninės ląstelės selektyviai migruoja į pažeidimo zoną, dalijasi ir diferencijuojasi (Malgieri ir kt., 2010; Manieri ir Stappenbeck, 2010). Nėra vieningos nuomonės apie galimus migracijos mechanizmus periferiniame audinyje, o HKL transdiferenciacinis pajėgumas, nors ir nustatytas tyrimais *in vivo*, lieka diskutuotinas. Grįžusios atgal į kraujotaką HKL gali grįžti ir į kaulų čiulpus arba pasilikti cirkuliacijoje. Įvykus „homingui“ kaulų čiulpuose, HKL gali grįžti į savo nišą arba išeiti atgal į kraujotaką. Pakartotinis HKL išėjimas į cirkuliaciją yra siejamas su laisvų nišų buvimu kaulų čiulpuose. Tokio HKL klajojimo po organizmą biologinis racionalumas nėra aiškus. Manoma, kad cirkuliuojančios HKL gali būti greitos vietinės imuninių ir uždegiminių ląstelių gamybos šaltinis. Be to, HKL cirkuliavimas padeda išvengti perteklinio jų susikaupimo kaulų čiulpuose, taip veikdamas bendrą šių ląstelių kiekį organizme (Laird ir kt., 2008).

2.3.2. Kamieninių ląstelių migracijos reguliavimas

Chemokinai ir uždegiminiai chemoatraktantiniai citokinai, sąveikaujantys su septynių vijų membraniniais receptoriais, susietais su G baltymais, yra pagrindiniai ląstelių judėjimo reguliatoriai (Schier, 2003). Įprastai chemokinai gali jungtis prie kelių receptorių, o šie receptoriai su daugiau nei vienu chemokinu. Išimtis SDF-1 ir CXCR4 sąveika. Nustatyta, jog SDF-1 jungiasi išskirtinai tik su CXCR4 (Kucia ir kt., 2005). Toks sąveikos specifiškumas yra siejamas su unikalia biologine funkcija. Manoma, jog SDF-1/CXCR4 ašis yra pagrindinis kamieninių ląstelių migracijos reguliatorius (Smart ir Riley, 2008). Teisingas SDF-1/CXCR4 ašies veikimas yra esminis veiksnys nukreiptam HKL „homingui“/prigijimui kaulų čiulpuose po transplantacijos. SDF-1/CXCR4 sąveika taip pat svarbi reguliuojant CXCR4⁺ HKL, pirmtakų, pre-B ir T limfocitų migraciją (Kucia ir kt., 2005). Tyrimų

metu nustatyta, kad funkcionalus CXCR4 yra ekspresuojamas įvairių audinių kamieninių ląstelių, įskaitant nervines, skeleto raumens, širdies raumens, kepenų ir epitelio ląsteles, paviršiuje (Laird ir kt., 2008). CXCR4 gali būti vertinamas kaip universalus kamieninių ląstelių žymuo, ekspresuojamas tiek embrioninių kamieninių ląstelių, tiek suaugusio organizmo specifinių audinių kamieninių ląstelių (Kucia ir kt., 2005). Įvairių organų/audinių kamieninės ląstelės, savo paviršiuje turinčios funkcionalų CXCR4, paklūsta SDF-1 gradientui. Organizmo vystymesi SDF-1 yra vienas iš svarbiausių motomorfogeninių faktorių ir chemoatraktantų ne vien HKL, bet ir nehemopoetinėms, CXCR4 turinčioms, kamieninėms ląstelėms bei ląstelėms pirmtakėms (Smart ir Riley, 2008). CXCR4 svarbus kamieninių ląstelių migracijoje vystymosi metu, esant audinių pažeidimui ar vykstant jų regeneracijai, jo ekspresija reguliuojama transkripcijos faktorių, siejamų su organų vystymusi, audiniui būdingais PAX genais, su stresu/hipoksija ir audinių pažeidimais siejamais faktoriais (NF-κB, HIF-1, gliukokortikoidais, lizofosfatidilcholinais, TGF-β, VEGF, IFN-α) bei įvairiais interleukinais (IL-2, IL-4, IL-7). Per CXCR4 ir su juo susietą G baltymą yra aktyvinami įvairūs signalų perdavimo keliai. Jų aktyvavimas reguliuoja kamieninių ląstelių: judėjimą (PI-3K; MAPK p42/44); chemotaksį (MEK, fosfatazės); adheziją (Fak ir kt.); sekreciją (PKC-ζ, NF-κB) (Kucia ir kt., 2005). Nustatyta, jog SDF-1 ekspresuoja kaulų čiulpų endotelio ląstelės, fibroblastai ir osteoblastai, širdies raumens, kepenų, smegenų bei inkstų stromos ir endotelio ląstelės (Smart ir Riley, 2008). Chemoatraktantų, tokių kaip SDF-1, sekrecija audinio pažeidimo vietoje sukuria palankias sąlygas kamieninių ląstelių migracijai link pažeidimo ir tokiu būdu skatina audinio regeneraciją (Laird ir kt., 2008). SDF-1/CXCR4 sąveika reguliuoja HKL išlaikymą nišoje, migraciją ir mobilizaciją tiek įprastinėmis fiziologinėmis sąlygomis, tiek esant pažeidimui (Lapidot ir kt., 2005)

Kol kas mažai žinoma apie SDF-1/CXCR4 sąveikos reguliaciją *in vivo* ir tik pradedamas suprasti įvairių biologinių mechanizmų poveikis. Nustatyta, kad SDF-1/CXCR4 ašį moduliuoja įvairūs faktoriai, kurie veikia: CXCR4

raiškos lygį ląstelių paviršiuje (SCF, IL6, HIF-1); CXCR4 N-terminalinio galo modifikaciją (gliukozaminoglikanai); SDF-1 ekspresiją ir biologinį prieinamumą audiniuose (heparinas, uždegiminės/audinių pertvarkos molekulės); kirpdami SDF-1 ir CXCR4 (MMP, CD26, dipeptidilpeptidazė-4, serino proteazės); heterologinę inaktyvaciją per CCR5 receptorių (MIP, RANTES); CXCR4 inkorporaciją lipidiniame sluoksnyje (Kucia ir kt., 2005).

Manoma, kad SDF-1/CXCR4 sąveika atlieka svarbiausią vaidmenį HKL migracijos reguliacijoje. Nors yra duomenų, kad SDF-1/CXCR4, galbūt, nėra vienintelis reguliacinis mechanizmas. Tiriant HKL migraciją inkstų pažeidimo modelyje nustatyta, jog SDF-1/CXCR4 sąveikos blokavimas nesutrikdo įvestų HKL migracijos į pažeidimo vietą (Stroo ir kt., 2009). Kamieninių ląstelių migracijos reguliavimas iki šiol menkai suprastas. Trūksta duomenų apie reguliacinius mechanizmus. Prieštaringų duomenys apie tai kaip elgiasi kamieninės ląstelės *in vivo*, per kiek laiko jos migruoja į patologinį židinį, į kokius kitus organus ir audinius jos migruoja.

Literatūros apžvalgoje pateikti duomenys rodo, kad transplantacijai naudojamos įvairios kamieninių ląstelių populiacijos, tačiau nėra bendro sutarimo, kuri populiacija tinkamiausia terapijai. Be to, šių populiacijų išskyrimas yra pakankamai sudėtingas dėl žymenų neapibrėžtumo, dėl to tarpusavyje turi būti derinami keliais parametrais besiskiriantys metodai. Ypač trūksta duomenų apie skirtingų HKL populiacijų savybes *in vivo* esant įvairioms patologijoms, kurios paprastai lydimos uždegimo. Neaišku kaip uždegimas veikia kamieninių ląstelių migraciją ir kaip kamieninės ląstelės veikia uždegimą. Šių ląstelių migracijos tyrimai esant uždegimui svarbūs saugesnei ir efektyvesnei ląstelinei terapijai.

3. METODAI

3.1. LABORATORINIAI GYVŪNAI

Bandymai su laboratoriniais gyvūnais atlikti VMTI Inovatyvios Medicinos Centro Imunologijos departamento Laboratorinių gyvūnų veisimo, auginimo ir tyrimu centre. Leidimas darbui su laboratoriniais gyvūnais buvo gautas iš Lietuvos laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos komisijos, leidimo Nr. 0160 (2007m). Eksperimentams naudojome 7 savaičių (22–24g) BALB/c linijos peles. Gyvūnai buvo laikomi specialiuose narvuose, esant pastoviai temperatūrai ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) ir 55% santykinei oro drėgmei. Pelės buvo maitinamos įprastu pašaru ir girdomos vandeniu *ad libidum*.

3.2. KONTAKTINIO HIPERJAUTRUMO REAKCIJA

Kontaktinio hiperjautrumo reakcija buvo sukeliama 2,4-dinitrofluorbenzenu (DNFB, Sigma, JAV) pagal Hiltz (1990) su tam tikromis modifikacijomis. DNFB tirpalas acetono ir alyvuogių aliejaus (santykiu 4:1) pagrindu buvo ruošiamas prieš pat naudojimą. Pelės sensibilizuojamos įtrinant DNFB tirpalu (20 μl 0.5%) dešinio šono 1x1 cm odos plotą, kuriame pašalinti plaukai. Praėjus 2-3 dienoms po sensibilizacijos, į pelių dešinę pėdą buvo įvedama po 10 μl 0.3% DNFB tirpalo edemai sukelti. Praėjus 24 val. po injekcijos, pelėms į uodegos veną buvo sušvirkščiamos tiriamos ląstelės. Neigiamos kontrolės pelėms suleista 100 μl PBS į uodegos veną, teigiamos kontrolės – prednizolono (100 mg/kg gyvūno masės) į peritoneumą. Poveikis pėdos edemai vertinamas lyginant to paties individo DNFB paveiktos ir sveikos pėdų svorių skirtumus.

3.3. PELIŲ KAULŲ ČIULPŲ LAŠTELIŲ IŠSKYRIMAS

Pelių kaulų čiulpų ląstelės buvo išskiriamos pagal Juopperi (2007) metodą, taikant tam tikras modifikacijas. Pelei atliekama cervikalinė dislokacija. Ji dezinfekuojama 70% etanolio tirpalu. Steriliais įrankiais paruojami ilgieji užpakalinių galūnių kaulai (šlaunikauliai ir blauzdikauliai).

Kaulai dedami į sterilią Petri lėkštelę ir 3 kartus plaunami 5 ml PBS su 3% FCS (Biological Industries, Izraelis); paruošto tirpalo pH 7.2. Abu kaulų galai nukerpami ir čiulpų ląstelės išskiriamos perfuzijos būdu. Gauta ląstelių suspensija skiedžiama iki 5 ml tuo pačiu buferiu ir centrifuguojama $300 \times g$ 10 min. Supernatantas pašalinamas. Nuosėdos plaunamos 3 kartus 5 ml to paties buferio, centrifuguojant po $300 \times g$ 5 min. Atlikus plovimą, nuosėdos suspenduojamos 2 ml to paties buferio. Skaičiuojama ląstelių koncentracija ir gyvybingumas.

Ląstelių koncentracijos ir gyvybingumo nustatymas. Ląstelių koncentracija ir gyvybingumas buvo nustatomi pagal standartines metodikas, naudojant ląstelių skaičiavimo kamerą su Neubauerio tinkleliu. Skaičiavimai atlikti šviesiniu mikroskopu. Ląstelių gyvybingumas buvo nustatomas remiantis negyvų ląstelių membranos pralaidumu vitaliniam dažui, naudotas tripano mėlio tirpalas (0.4%) (Sigma, JAV). Negyvos ląstelės dažosi mėlyna spalva.

Ląstelių frakcionavimas tankio gradientu. Kaulų čiulpų ląstelės tankio gradientu buvo frakcionuojamos pagal Juopperi (2007) metodą, taikant tam tikras modifikacijas. Pelių kaulų čiulpų HKL išgrynintos frakcionuojant kaulų čiulpų ląsteles PercolTM tankio gradientu (1,087g/ml). Į centrifuginį mėgintuvėlį įpilama po 5ml paruošto Percol (1.077-1.081-1.087 g/ml) tirpalo, ant viršaus atsargiai užnešama 5ml paruoštos ląstelių suspensijos RPMI-1640 terpėje (ne daugiau nei 2×10^7 ląst/ml). Centrifuguojama $1200 \times g$ 30 min. Tarp fazių esanti ląstelių frakcija surenkama Pastero pipete ir plaunama 3 kartus RPMI-1640 terpėje, centrifuguojant $300 \times g$ 10 min. Ląstelės suspenduojamos PBS su 3% FCS. Skaičiuojamas ląstelių gyvybingumas ir koncentracija.

3.4. LIN⁻ LĄSTELIŲ FRAKCIJOS IŠSKYRIMAS

Pagal linijinius žymenis neigiamos ląstelės (lin⁻) buvo atskiriamos naudojant magnetinį ląstelių atskyrimo metodą (MACS – *angl.* Magnetic cell sorting), pagal „BDTM IMag Cell Separation“ (BD Biosciences, JAV) technologiją, naudojant “Mouse hematopoietic progenitor (stem) cell

enrichment set – DM” (BD Biosciences, JAV), vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Po frakcionavimo tankio gradientu gauta ląstelių suspensija skiedžiama šaltu ląstelių žymėjimo buferiu iki galutinės 2×10^7 ląst/ml koncentracijos. Įpilama “Mouse BD Fc BlockTM” antikūnų tirpalo ($0,25 \mu\text{g}/10^6$ ląstelių) ir inkubuojama 15 minučių lede. Sumaišoma su biotinilintų monokloninių antikūnų prieš subrendusių hemopoetinių ląstelių linijinius žymenis (CD3e; CD11b; CD45R/B220; Ly-6G ir Ly-6C (Gr-1); TER-119/erythroid cells (Ly-76)) mišiniu ($5 \mu\text{l}/10^6$ ląstelių), inkubuojama 15 min lede. Žymėtos ląstelės plaunamos 10 kartų jas skiedžiant BD ImagTM buferiu. 7 min centrifuguojama esant $300 \times g$, supernatantas nusiurbiamas. Nuplautos ląstelės inkubuojamos su streptavidinu konjuguotomis DB Imag magnetinėmis dalelėmis ($5 \mu\text{l}/10^6$ ląstelių). Sumaišoma ir 30 min laikoma $6^\circ\text{C} - 12^\circ\text{C}$ temperatūroje. Suspensija, jeigu reikia, skiedžiama BD IMagTM buferiu iki galutinės $2 - 8 \times 10^7$ ląst/ml koncentracijos. Žymėtos ląstelės perkeliama į mėgintuvėlį ir 8 minutėms įstatomos į BD IMagnetTM magnetą. Neišimant mėgintuvėlio iš magneto, Pastero pipete nusiurbiamas supernatantas, t. y. neigiama frakcija (lin⁻). Ji perkeliama į naujus mėgintuvėlius ir gražinama į DB IMagnet prietaisą 6 min. Pastero pipete nusiurbiamas supernatantas. Mėgintuvėliai su lin⁻ neigiama frakcija perkeliama į ledą. Skaičiuojamas ląstelių gyvybingumas ir koncentracija.

3.5. LAŠTELIŲ POPULIACIJŲ IDENTIFIKAVIMAS TĖKMĖS CITOMETRIJOS METODU

Pelių kamieninių ląstelių paviršiaus struktūrų identifikavimas buvo atliekamas tėkmės citometrijos metodu pagal Suzuki (Suzuki ir kt., 2001).

Išskirtos ląstelės plaunamos PBS tirpale centrifuguojant 3 kartus $300 \times g$ po 5 min. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos PBS tirpale, turinčiame 2% FCS. Dviejų spalvų tėkmės citometrijos analizei naudojami fikoeritrinu (PE) ir fluoresceinizotiocianatu (FITC) žymėti monokloniniai antikūnai prieš pelių paviršiaus antigenus: CD34 (CD34-PE) (Santa Cruz Biotechnology, JAV); CD38 (CD38-PE)(Santa Cruz Biotechnology, JAV);

Sca-1 (Sca1-PE)(Abcam, Cambridge, UK); CD117 (CD117-FITC)(Chemicon International, JAV). Naudotos monokloninių antikūnų poros: CD34-PE/CD117-FITC; CD38-PE/CD117-FITC; Sca1-PE/CD117-FITC. Paruošiama suspensija, kurios koncentracija 2×10^5 ląst/ml. Pridedama po fluoresceino izotiocianatu ir fikoeritrinu žymėtų antikūnų. Inkubuojama 30 min tamsoje 2 – 8 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos du kartus PBS tirpalu. Tyrimas atliktas tėkmės citometru FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, JAV). Kontrolei naudoti nespecifiniai atitinkamų izotipinių kontrolių antikūnai: žiurkės IgG2 α , žymėti FITC (BD Biosciences, JAV) ir žiurkės IgG2 α , žymėti PE (Chemicon International, JAV).

3.6. LAŠTELIŲ DAŽYMAS PKH67 DAŽU

Išskirtos iš kaulų čiulpų lin⁺ ląstelės buvo dažomos žaliai fluorescuojančiu PKH67 dažu (Sigma, JAV) vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Paruošiama 1×10^7 ląstelių/ml suspensija. Centrifuguojama 300×g 5 min. Supernatantas pašalinamas. Nuosėdos suspenduojamos 1 ml komercinio skiediklio (Diluent C). Paruošiamas 4×10^{-6} mol/l PKH67 dažas. Atsargiai sumaišoma 1 ml ląstelių suspensijos ir 1 ml paruošto dažo. Inkubuojama 5 min periodiškai pamaišant. Po inkubavimo reakcija stabdoma pridedant 2 ml FCS. Pridedama 4 ml RPMI-1640 terpės. Centrifuguojama 400×g 10 min. Supernatantas pašalinamas. Ląstelės plaunamos 3 kartus 10 ml RPMI-1640 terpės su 10% FCS, centrifuguojama 400×g 10 min. Po paskutinio plovimo ląstelės suspenduojamos reikiamame kiekyje PBS. Skaičiuojamas ląstelių gyvybingumas ir koncentracija.

3.7. HISTOLOGINIŲ PREPARATŲ PARUOŠIMAS

Tam tikrais laiko intervalais po ląstelių transplantacijos, tyrimams buvo imamos pelių audinių biopsijos: pėdos edemos, sveikos pėdos, blužnies ir kepenų. Audinių gabalėliai, prieš pjaustymą kriotomu, laikyti -70° C temperatūroje. Užšaldyti audiniai pjaustymui paruošti naudojant O.C.T. junginį – glikolių ir dervų vandeninio tirpalo preparatą (Tissue-Tek) (Sakura, NE).

Kriotomu atliekami 4 – 5 mikrometrų storio pjūviai, tyrimui imamas kas dešimtas pjūvis. Biopsijų pjūviai uždedami ant objekcinio stikliuko ir kambario temperatūroje (20-22°C) džiovinami 1 val tamsoje. Histologiniai preparatai uždengiami stikleliu, naudojant 1–2 lašus cianoakrilatinių klijų. Preparatai paruošti bendradarbiaujant su Valstybinio patologijos centru. Histologinių preparatų analizė atlikta fluorescenciniu mikroskopu Nikon TE2000U. Kontrolei naudoti sveikos pėdos histologiniai preparatai.

3.8. CITOKINŲ KIEKIO NUSTATYMAS

Citokinų nustatymui buvo naudojami ELISA rinkiniai: “TNF- α Mouse, ELISA Biotrak System” ir “Interleukin-10 Mouse, ELISA Biotrak System” (Amersham Biosciences, Didžioji Britanija). Imunofermentinė analizė atlikta vadovaujantis gamintojo nurodymais.

Citokinų kiekiai pelių kraujo serume buvo nustatyti praėjus 48 val. po ląstelių sušvirškštimo. Imunofermentinė reakcija vykdyta polistirolo mikroplokštelėse su imobilizuotais specifiniais antikūnais prieš pelių citokinus (IL-10, TNF- α).

a) IL-10 atveju, į antikūnais padengtus mikroplokštelių šulinėlius įnešama po 50 μ l komercinio buferio, standartinių bei serumo pavyzdžių. Inkubuojama 3 val. kambario temperatūroje. 3 kartus plaunama PBS buferiu, pridedama 50 μ l antikūnų, konjuguotų su biotinu, ir inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. 3 kartus plaunama PBS buferiu, pridedama 100 μ l streptavidino-krienų peroksidazės konjugato ir inkubuojama 30 min. 3 kartus plaunama PBS buferiu, pridedama 100 μ l tetrametilbenzidino dihidrochlorido (TMB) substrato ir inkubuojama 30 min. tamsoje. Reakcija stabdoma 100 μ l 2 N H₂SO₄.

b) TNF- α atveju, į mikroplokštelės šulinėlius pridedama po 50 μ l komercinio buferio, standartinių ir serumo pavyzdžių bei 50 μ l antikūnų, konjuguotų su biotinu. Inkubuojama 2 val. kambario temperatūroje. 3 kartus plaunama PBS buferiu, pridedama 100 μ l streptavidino-krienų peroksidazės konjugato ir inkubuojama 30 min. 3 kartus plaunama PBS buferiu, pridedama

100 μ l TMB substrato ir inkubuojama 30 min. tamsoje. Reakcija stabdoma 100 μ l 2 N H_2SO_4 .

Optinis tankis 450 nm bangos ilgyje buvo matuojamas Sunrise (Tecan, Švedija) plokštelių skaitytuvu. Serumo pavyzdžių citokinų koncentracija apskaičiuojama remiantis standartinėmis kreivėmis.

3.9. FLUORESCENTIŠKAI ŽYMĖTŲ LĄSTELIŲ MIGRACIJOS TYRIMAS

Fluorescenciniu dažų žymėtų lin⁻ HKL migracijos tyrimuose pelės buvo suskirstytos į 4 grupes po 5 individus ($n=5$). Grupės sudarytos remiantis pėdos edemos sukėlimu (sukelta arba nesukelta pėdos edema) ir sušvirkštų ląstelių žymėjimu (įvestos žymėtos arba nežymėtos lin⁻ HKL). Tiriamoms pelėms į uodegos veną buvo sušvirkščinama po 10^6 lin⁻ HKL. Praėjus 48 val. po ląstelių sušvirkštimo, pelėms atlikta cervikalinė dislokacija. Sveriamos užpakalinių galūnių pėdos, imamos kepenų, blužnies, sveikos ir pažeistos pėdos biopsijos. Atlikti 3 nepriklausomi eksperimentai.

Fluorescenciniu dažų žymėtų lin⁻ HKL migracijos kinetikos tyrimuose pelės suskirstytos į 14 grupių po 5 individus ($n=5$). Grupės sudarytos remiantis pėdos edemos sukėlimu (sukelta arba nesukelta pėdos edema) ir skirtingu biopsijų ėmimo (praėjus tam tikram laikui po ląstelių sušvirkštimo) laiku (biopsijos imtos 7 laiko intervalais po ląstelių įvedimo) (4.3.1 lentelė). Tiriamoms pelėms į uodegos veną buvo transplantuojama po 10^6 lin⁻ HKL. Praėjus 1, 4, 8, 12, 24, 48 ir 72 valandoms po ląstelių sušvirkštimo, pelėms buvo atliekama cervikalinė dislokacija, imami pelių kepenų, blužnies, sveikos ir pažeistos pėdos audinių mėginiai. Atlikti 3 nepriklausomi eksperimentai.

3.10. MIGRACIJOS KIEKYBINIS TYRIMAS POLIMERAZINĖS CIKLINĖS REAKCIJOS METODU

Kiekybiniuose lin⁻ HKL migracijos kinetikos tyrimuose pelėms buvo transplantuojamos iš priešingos lyties pelių išskirtos lin⁻ HKL ląstelės (patelėms buvo transplantuotos ląstelės, išskirtos iš patinėlių). Pelės suskirstytos į 14 grupių po 5 individus ($n=5$). Grupės, kaip ir žymėtų PKH67

lin⁷ HKL migracijos kinetikos eksperimente, sudarytos remiantis pėdos edemos sukėlimu (sukelta arba nesukelta pėdos edema) ir skirtingu biopsijų ėmimo laiku. Tiriamoms pelėms į uodegos veną buvo tran splantuojama po 10⁶ lin⁷ HKL. Praėjus 1, 4, 8, 12, 24, 48 ir 72 valandoms po ląstelių įvedimo, pelėms buvo atliekama cervikalinė dislokacija, imami kaulų čiulpu, blužnies, kepenų, plaučių, inkstų, sveikos ir pažeistos pėdos audinių mėginiai. Atlikti 3 nepriklausomi eksperimentai.

3.10.1. Biopsijų medžiagos paruošimas DNR išskyrimui.

Mėginių iš pelių kaulų čiulpu paruošimas. Nukirpus pelės šlaunikaulio galus buvo atliekama perfuzija 500μl TE buferinio tirpalo. Tolimesniam DNR atskyrimui naudota 200μl ląstelių suspensijos.

Mėginių iš pelių audinių paruošimas. Blužnies, kepenų, plaučių, inkstų, sveikos ir pažeistos pėdos audinių pavyzdžiai buvo ruošiami naudojantis TissueLyser2 homogenizatoriumi. 40 – 50 mg audinio patalpinama į specialius mėgintuvėlius kartu su 4,5 mm skersmens plieniniu rutuliuku. Užpilama 400μl TE buferinio tirpalo. Purtoma 2 min 30 Hz dažniu. Tolimesniam DNR atskyrimui naudota 200μl ląstelių homogenizato.

3.10.2. DNR išskyrimas iš ląstelių

DNR buvo išskiriama iš ląstelių naudojant „Genomic DNA purification kit“ rinkinį ir vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Ant 200 μl paruoštos ląstelių suspensijos užpilama 400 μl lizės buferinio tirpalo ir inkubuojama vandens vonelėje 10 min 65 °C temperatūroje. Po inkubavimo įnešama 600 μl chloroformo ir centrifuguojama 10000 aps/min greičiu 2 min. Vandeninė fazė, esanti viršuje, perkeliama į naują mėgintuvėlį, įdedama 800 μl precipitacijos buferinio tirpalo ir centrifuguojama 10000 aps/min greičiu 2 min. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos ištirpinamos 100 μl 1,2 M NaCl. Po to įnešama 300 μl šalto etanolio ir laikoma -20 °C temperatūroje 10 – 20 min. Etanolis nupilamas, susidariusios nuosėdos ištirpinamos 50 μl dejonizuoto vandens.

DNR koncentracija nustatyta matuojant absorbciją (A) 260 nm bangos ilgyje. Išskirtos DNR grynumo įvertinimui absorbcija buvo matuojama 260 (A_{260}) ir 280 (A_{280}) nm bangos ilgiuose. DNR grynumas nustatomas apskaičiuojant A_{260} ir A_{280} absorbcijų santykį. DNR grynumas laikomas pakankamu, jeigu $A_{260} : A_{280} > 1,5$. Matavimai atlikti Synergy 2 (Biotek) plokštelių skaitytuvu.

3.10.3. Realus laiko polimerazinė ciklinė reakcija

Realaus laiko polimerazinė ciklinė reakcija (qPCR) buvo atliekama naudojant Rotor-Gene 6000 (Corbet Research) rotorinį analizatorių. Naudoti pradmenys ir zondai (pagal Wang ir kt., 2002) parinkti pelės TSPY (*angl.* mouse testis-specific Y-encoded protein) pseudogenui ir pelės β -aktinui aptikti. Mėginiuose buvo nustatinėjami TSPY pseudogeno kiekiai, jį turi tik iš patinėlių išskirtos ląstelės (aptinkamas Y chromosomoje). Amplifikuoto TSPY specifinio produkto kiekiai buvo normalizuojami tikrinant β -aktino (aptinkamas patinėlių ir patelių ląstelėse) specifinio produkto amplifikavimu. Specifinio produkto aptikimui naudoti FAM (karboksifluoresceinas) žymėti zondai specifiški TSPY ir β -aktino pradmenų produktams (3.1 lentelė).

Realaus laiko polimerazinės ciklinės reakcijos produktų amplifikavimui su FAM žymėtais zondais buvo naudojamas „Absolute Blue“ qPCR mišinys (Thermo scientific). Kiekvieno pradmens galutinė koncentracija reakcijos mišinyje buvo 200 μ M, zondo – 100 μ M. Reakcijos atliktos 15 μ l reakcijos mišinio tūryje. Buvo vykdoma 40 temperatūrinių ciklų su pasirinkta termociklerio temperatūrine programa (3.2 lentelė). Kiekvienoje reakcijų grupėje naudotos skirtingų koncentracijų teigiamos kontrolės (BALB/c patinėlių DNR, nuo 0,0001 iki 200 ng), neigiamos kontrolės (PCR reagentai be DNR; PCR reagentai su BALB/c patelių DNR), bei kalibraciniai mėginiai (įvairios koncentracijos BALB/c patinėlių ir patelių DNR kombinacijos bendras kiekis 100 ng, santykiai nuo 1/10 iki 1/100 000). Tiriamieji mėginiai dubliuojami, atlikti du nepriklausomi bandymai. Susidariusio produkto kiekis įvertinamas kiekvieno ciklo metu matuojant specifinę zondo fluorescensiją

(sužadınimas 470±10 nm; detekcija 510±5nm). Produkto dydis tikrinamas agarozės gelyje. Kiekybinė duomenų normalizacija atlikta lyginamojo skaičiavimo metodu (*angl.-comparative quantification*), naudojant Rotor-Gene programinę įrangą (Wilhelm ir kt., 2003; Skern ir kt., 2005). Remiantis kalibracinių ir standartinių kreivių duomenimis, pagal β-aktino produktą buvo normalizuojama TSPY produkto fluorescencija ir lyginant su standartais išskaičiuojama santykinė koncentracija.

3.1 lentelė. Naudoti pradmenys ir zondai.

Genas	Pradmuo	Zondas
TSPY	tiesioginis: 5'-GAG AAC CAC CTT GGT GAT TCT CT- 3'	5'-/56-FAM/-TCC TGG ATC-/ZEN/-AGA GTG
	atvirkštinis: 5' -TCC TTG GGC TCT TCA TTA TTC TTA AC- 3'	GCT TAC CCA GG- /3IABkFQ/-3'
β-aktinas	tiesioginis: 5'-ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG- 3'	5'-/56-FAM/-CAA CGA GCG-/ZEN/-GTT CCG
	atvirkštinis: 5' -CAA GAA GGA AGG CTG GAA AAG A- 3'	ATG CCC T- /3IABkFQ/-3'

3.2 lentelė. Realus laiko polimerazinės ciklinės reakcijos temperatūrinė programa.

Temperatūrinės programos etapas	Temperatūra (°C)	Trukmė (min)
DNR pirminė denatūracija	95	15
DNR denatūracija	95	0,25
Pradmenų prisikabinimas	60	1
DNR sintezė	72	0,5

3.10.4. Standartinių kreivių sudarymas

Standartinių kreivių sudarymui buvo naudojama iš BALB/c pelių kaulų čiulpų vienbranduolių ląstelių išskirta DNR. Ląstelių gavimas aprašytas 3.3

skyriuje. DNR išskyrimui naudota 2×10^6 ląstelių, suspenduotų TE buferyje. DNR išskyrimo procedūra aprašyta 3.10.2 skyriuje.

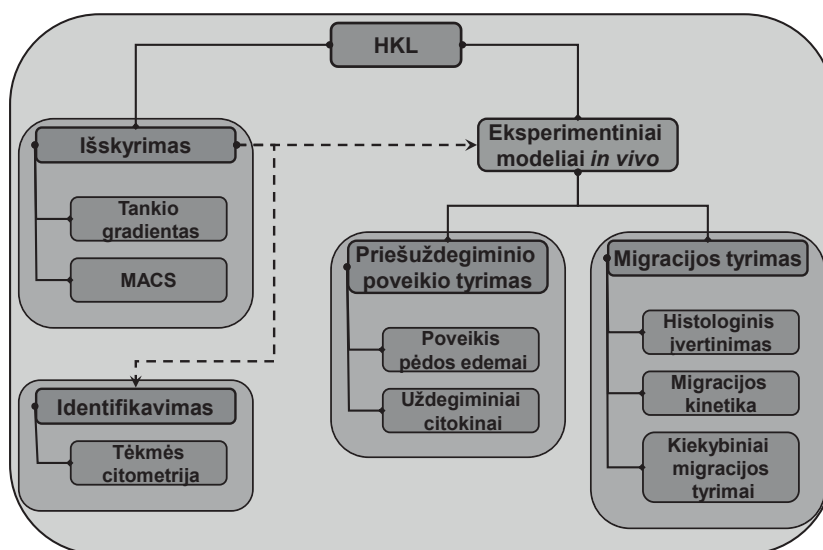
Standartiniai mišiniai sudaryti sumaišius DNR, išskirtą iš BALB/c linijos patinėlių ir patelių, santykiu nuo 1:100000 iki 1:10. Buvo nustatomas TSPY ir β -aktino genų specifinių amplifikavimo produktų kiekiai. Tiriamieji mėginiai dubliuojami, atlikti du nepriklausomi bandymai. Susidariusio produkto kiekis įvertinamas kiekvieno ciklo metu matuojant specifinę zondo fluorescensiją. Produkto dydis tikrinamas agarozės gelyje. Duomenų apdorojimas atliktas naudojant Rotor-Gene programinę įrangą. Kiekvienoje reakcijų grupėje naudota teigiama kontrolė (BALB/c patinėlių DNR, nuo 0,0001 iki 200 ng) ir neigiamos kontrolės (PCR reagentai be DNR; PCR reagentai su BALB/c patelių DNR). Iš gautų duomenų sudarytos standartinės kreivės, vėliau naudotos nustatant patinėlių ir patelių DNR santykius tiriamuose mėginiuose.

3.11. STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ

Visi šiame darbe atlikti eksperimentai buvo pakartoti tris kartus, jeigu nenurodyta kitaip. Eksperimentinių duomenų analizė buvo atliekama naudojantis SigmaPlot (v11.0) programa. Kiekybiniai duomenys pateikiami kaip aritmetiniai vidurkiai \pm standartinė paklaida. Dviejų imčių duomenų patikimumai įvertinti taikant nesuporuotų dviejų imčių Stjudento testą. Rezultatai laikyti statistiškai patikimais, kai $P < 0,05$.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe atliktų tyrimų tikslas - ištirti hemopoetinių kamieninių ląstelių priešuždegiminį poveikį bei migraciją *in vivo* uždegimo metu. Darbe iš bendros BALB/c pelių kaulų čiulpų ląstelių populiacijos išgryninta ir identifikuota hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacija. Ištyrėme atskirtų ir identifikuotų ląstelių populiacijų priešuždegiminį poveikį BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*, vertinome poveikį pėdos edemai bei uždegiminių citokinų koncentracijai kraujo serume. Taip pat ištyrėme transplantuotų HKL migraciją BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje bei kiekybiškai įvertinome jų migraciją į uždegimo židinių pėdoje ir nepažeistus organus, praėjus 1, 4, 8, 12, 24, 48 ir 72 val. po HKL įvedimo. Atlikome histologinę analizę, kiekybiniam vertinimui taikėme realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos metodą. Bendra atliktų tyrimų schema pateikta 4.1.1 paveiksle.



4.1.1 pav. Hemopoetinių kamieninių ląstelių (HKL) tyrimų schema.

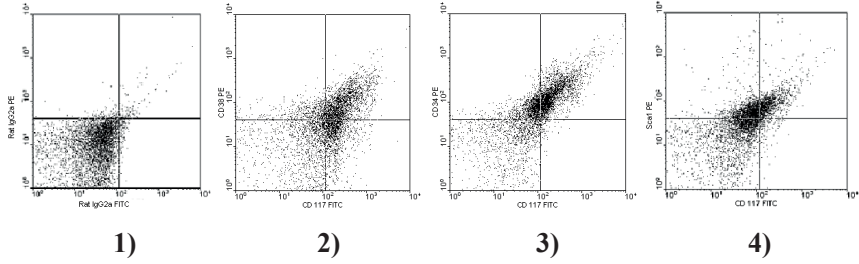
4.1. LAŠTELIŲ POPULIACIJŲ IŠSKYRIMAS IR IDENTIFIKAVIMAS

Kaulų čiulpų laštelės yra heterogeniškos, atskiros jų populiacijos gali diferencijuotis į skirtingas lašteles ir audinius. Hemopoetinių laštelių išskyrimas yra pakankamai sudėtingas, nesutariama kokia populiacija tinkamiausia terapijai. Pagal paviršiaus žymenis hemopoetinių laštelių populiacijas galima identifikuoti ir išskirti bei vėliau tikslingai panaudoti vieno ar kito pažeidimo atstatymui. Paviršiaus žymenų nustatymas bei hemopoetinių kamieninių laštelių ir pirmtakų populiacijų gavimas yra svarbus jų selektyviam pritaikymui terapijoje.

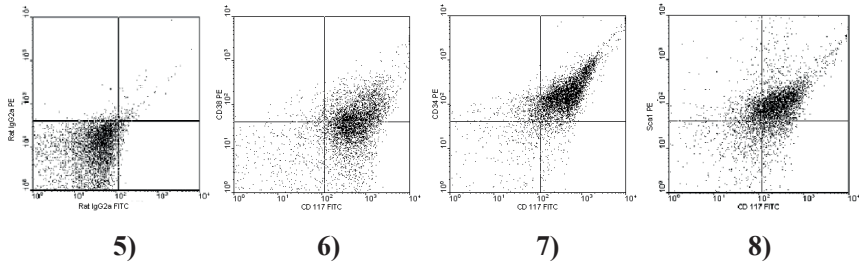
Kaulų čiulpuose yra kelios skirtingos laštelių populiacijos. Hemopoetinės kamieninės laštelės juose tesudaro 0.1–3% bendros populiacijos, likusioji dalis – subrendusios hemopoetinės laštelės, jų pirmtakai, kaulų čiulpų stromos laštelės ir nedidelė dalis, iki 0,01% nuo stromos laštelių, mezenchiminės kamieninės laštelės (Jones ir McGonagle, 2008). Hemopoetinių kamieninių laštelių gryninimas ir identifikavimas remiasi diferenciacijos antigenų raiška. Naudojant specifinius antikūnus galima atskirti net labai mažas laštelių populiacijas (Challen ir kt., 2009). Preparatyviai išskirtus nedidelius laštelių kiekius galima padauginti *in vitro* ir, sukūrus atitinkamą mikroaplinką, diferencijuoti norima kryptimi bei panaudoti laštelių migracijos ir terapinio poveikio tyrimuose *in vivo*.

Darbo metu iš BALB/c pelių kaulų čiulpų išskyrėme lašteles ir jas identifikavome tėkmės citometru (4.1.2 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad 27.73±8.69% laštelių yra CD38⁺CD117⁺, 40.43±15.57% yra CD34⁺CD117⁺, o 21.94±3.17% yra teigiamos pagal Sca1 ir CD117 (4.1.1 lentelė).

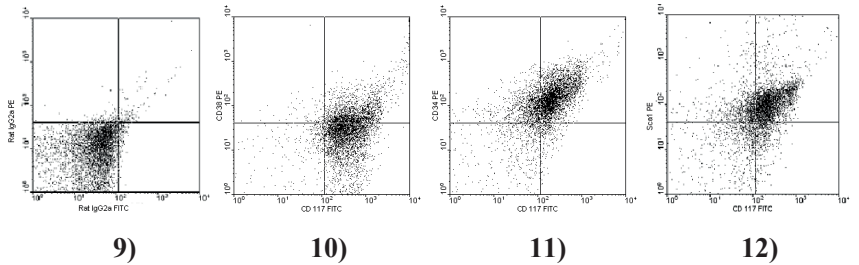
Bendra kaulų čiulpų populiacija



lin⁻ populiacija



lin⁻CD117⁺ populiacija



4.1.2 pav. CD žymenų pasiskirstymas kaulų čiulpų ląstelėse. Bendroje kaulų čiulpų (2-4), lin⁻ (6-8) ir lin⁻CD117⁺ (10-12) populiacijose. Izotipinė kontrolė - žiurkių IgG2a (FITC) ir IgG2a (PE) antikūnai (1, 5, 9). CD38 ir CD117 žymenų raiška (2, 6, 10), CD34 ir CD117 žymenų raiška (3, 7, 11), Sca-1 ir CD117 žymenų raiška (4, 8, 12).

4.1.1 lentelė. Kaulų čiulpų ląstelių frakcijų pasiskirstymas pagal CD34, CD38, CD117 ir Sca1 paviršiaus žymenis.

Ląstelių paviršiaus žymenys	Ląstelių populiacija (%)		
	Bendra kaulų čiulpų	lin ⁻	lin ⁻ CD117 ⁺
CD38 ⁺ CD117 ⁻	7.17±2.92	2.16±0.57	11.78±0.84
CD38 ⁺ CD117 ⁺	27.73±8.69	27.39±7.54	32.59±5.74
CD38 ⁻ CD117 ⁺	35.13±13.08	48.93±8.46	40.52±9.86
CD38 ⁻ CD117 ⁻	29.97±11.82	21.52±1.74	15.11±1.68
CD34 ⁺ CD117 ⁻	30.50±9.41	13.79±7.53	18.57±7.45
CD34 ⁺ CD117 ⁺	40.43±15.74	73.10±11.79	68.52±9.85
CD34 ⁻ CD117 ⁺	1.19±0.05	3.92±0.43	3.59±0.84
CD34 ⁻ CD117 ⁻	27.88±6.38	9.19±4.69	9.32±10.23
Sca1 ⁺ CD117 ⁻	31.20±0.93	9.91±3.64	16.29±3.22
Sca1 ⁺ CD117 ⁺	21.94±3.17	73.36±4.96	60.94±5.43
Sca1 ⁻ CD117 ⁺	2.84±0.23	8.33±2.00	9.42±2.36
Sca1 ⁻ CD117 ⁻	44.02±3.86	8.46±1.43	13.35±2.34

Reikšmių vidurkis ± standartinis nuokrypis; n=7; CD – diferenciacijos antigenas; lin – linijiniai žymenys; Sca1 – kamieninių ląstelių antigenas 1.

Mūsų darbe hemopoetinių kamieninių ląstelių atskyrimas iš bendros pelių kaulų čiulpų suspensijos buvo atliekamas centrifugavimo tankio gradiente (1.087g/ml) ir magnetinio ląstelių frakcionavimo, panaudojant antikūnus prieš pelių hemopoetinių ląstelių pirmtakų antigenus, metodais. Literatūros duomenimis po centrifugavimo tankio gradiente dauguma HKL lieka vienbranduolių ląstelių frakcijoje, gaunama nuo 2 iki 5 kartų grynesnė HKL frakcija (Juopperi ir kt., 2007). HKL atskiriant tankio gradiente (nuo 1.064 iki 1.087 g/ml) bendroje kaulų čiulpų vienbranduolių ląstelių frakcijoje HKL sudaro apie 1-3% (Civin ir kt., 1996), tuo tarpu mezenchiminės kamieninės ląstelės tik - 0.0001-0.01% (Dazzi ir kt., 2006). Ląstelių frakcija, išsidėsčiusi 1.081-1.087 g/ml tankyje, pašalinus subrendusias hemopoetines ląsteles (teigiamas pagal linijinius žymenis), atstatė hemopoezę letaliai apšvitintose pelėse bei pasižymėjo ilgalaikiu repopuliaciniu aktyvumu (praėjus 6 mėnesiams pelių recipientų periferiniame kraujyje 91% ląstelių buvo donorinės kilmės). Kitos frakcijos (1.064-1.075, 1.075-1.081, >1.087g/ml), pašalinus subrendusias hemopoetines ląsteles, nepasižymėjo arba pasižymėjo kur kas silpnesniu hemopoezės atstatymu letaliai apšvitintose pelėse ir neturėjo ilgalaikio repopuliacinio aktyvumo (praėjus 6 mėnesiams periferiniame kraujyje donorinės kilmės ląstelių nebuvo aptinkama). Itin praturtintos HKL populiacijos gaunamos surenkant ląstelių frakciją išsidėsčiusią 1.081-1.087 g/ml tankyje (Juopperi ir kt., 2007).

Ląstelių atskyrimui mes naudojome nanodaleles su monokloniniais antikūnais prieš subrendusių hemopoetinių ląstelių linijų žymenis, kurie paprastai yra difrencijuotų arba pradėjusių diferencijuoti hemopoetinių ląstelių paviršiuje. Ląstelės, kurios šių žymenų turi labai mažai arba išvis neturi, vadinamos lin neigiamomis (lin⁻). Literatūros duomenimis linijinių žymenų nebuvimas būdingas hemopoetinėms kamieninėms ir pirmtakinėms ląstelėms (Mikkola ir Orkin, 2006). Su teigiama pagal šiuos žymenis frakcija pašalinama difrencijuotos arba pradėjusios diferencijuoti hemopoetinės ląstelės, tokios kaip T limfocitai, B limfocitai, monocitai/makrofagai, granulocitai, eritrocitai ir jų pirmtakai. Neigiamą pagal naudotus linijinius žymenis frakciją sudaro

nediferencijuotos hemopoetinės ląstelės, t.y. lin⁻ (lin, *angl.* – *lineage markers*) populiacija. Mūsų darbe po frakcionavimo neigiamoje frakcijoje liko 3.5±1.5%, o teigiamoje frakcijoje – 96.5±1.5% ląstelių. Neigiamoje frakcijoje lieka ne tik HKL, bet ir primityviausios ląstelės pirmtakės. Norint gauti labai grynas ląstelių frakcijas, teigiama ir neigiama selekcija derinamos tarpusavyje (Wognum ir kt., 2003). Tačiau ne visos hemopoetinės kamieninės ląstelės turi vienodas paviršiaus žymenų kombinacijas. Kartais ankstyvosios kamieninės ląstelės neturi c-kit receptoriaus (Baum ir kt., 1992). Be to, nėra vieno specifinio paviršiaus žymens, kurį turėtų išimtinai hemopoetinės kamieninės ląstelės, todėl identifikuojant nustatomi žymenų deriniai.

Mūsų atskirtos 1.087 g/ml tankio gradientu mononuklearų frakcijos populiacijų atskyrimui naudotos magnetinės BDTM Imag nanodalelės buvo pagamintos iš biodegraduojančios matricos, todėl jų pašalinti iš tirpalo nereikėjo, toliau buvo galima atlikti tėkmės citometrijos analizę ir ištirti mūsų atskirtos lin⁻ populiacijos paviršiaus žymenų raišką (4.1.2 pav.). Tėkmės citometru nustatėme, jog CD38 ir CD117 žymenis lin⁻ populiacijoje turėjo 27.39±7.54% ląstelių, CD117 ir CD34 73.92±11.79%. Sca-1 žymenį lin⁻ populiacijoje turėjo 83.27±2.92% ląstelių, CD117 – 81.69±3.22%. Abu žymenis Sca-1 ir CD117 turėjo 73.36±4.96% ląstelių (4.1.1 lentelė).

Panaudojus specifiniais antikūnais padengtas nanodaleles, iš lin⁻ ląstelių populiacijos teigiamos selekcijos būdu buvo atskirta lin⁻CD117⁺ populiacija. Tiriant pasiskirstymą pagal paviršiaus žymenų raišką nustatyta, kad 32.59±5.74% turėjo CD38 ir CD117, 68.52±9.85% - CD34 ir CD117, o 60.94±1.43% - Sca1 ir CD117 (4.1.1 lentelė). Pažymėtina, kad po atskyrimo teigiamoje lin⁻CD117⁺ frakcijoje gaunama mažiau nei 0.1% ląstelių nuo bendro kaulų čiulpų ląstelių kiekio.

Visoms hemopoetinėms ląstelėms, tame tarpe ir hemopoetinėms kamieninėms ląstelėms, būdinga CD117 raiška. Iki dviejų trečdalių CD34⁺ žmogaus kaulų čiulpų ląstelių ekspresuoja šį žymenį. CD117 yra susijęs su HKL atsinaujinimu, išgyvenimu, proliferacija ir diferenciacija. Šios savybės

svarbios efektyviam ląstelių panaudojimui terapijoje (Edling ir Hallberg, 2007). Sca-1 – vienas dažniausiai naudojamų žymenų pelių HKL identifikavimui (Alison ir kt., 2006). Šis žymuo taip pat gali būti naudojamas ir pelių kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių identifikavimui, tačiau skirtingomis aplinkybėmis. Iš pelių kaulų čiulpų išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės nepasižymi Sca-1 raiška, tačiau auginant jas *in vitro* (po 10-12 persėjimo) šis žymuo nustatytas. Be to autoriai nurodo, kad kolagenazė, naudojama MKL išskyrimui iš kaulų čiulpų, gali indukuoti Sca-1 raišką (Hegyri ir kt., 2010; Morikawa ir kt., 2009). Labiau diferencijuotiems pelių hemopoetiniams pirmtakams, tokiems kaip megakariocitų-eritrocitų, granulocitų-makrofagų ir bendriems mieloidiniams pirmtakams, Sca-1 žymens raiška nebūdinga (Akashi ir kt., 2000). Mūsų išskirta lin⁻ ląstelių populiacija pasižymėjo aukšta CD117 ir Sca-1 žymenų raiška (73.36±4.96%) ir neturėjo linijinių žymenų (lin⁻ ląstelės). Tokios populiacijos ląsteles galima priskirti KLS (c-kit, lin⁻ ir Sca-1 trumpinys) populiacijai. Kitų autorių analizuojamoje pelių HKL “šoninėje populiacijoje” (angl. side population, SP) apie 85% ląstelių buvo CD117⁺lin⁻Sca-1⁺, tačiau šioje populiacijoje buvo rasta iki 25% lin⁺ ląstelių (Challen ir kt., 2009). Remiantis literatūros duomenimis, pelių kaulų čiulpų KLS populiacija nėra homogeniška, ją sudaro ilgalaikės HKL, trumpalaikės HKL bei primityvieji hemopoetiniai pirmtakai (Okada ir kt., 1992; Challen ir kt., 2009). Iš lin⁻ hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacijos išskirtoje lin⁻CD117⁺ populiacijoje nustatėme hemopoetinėms kamieninėms ląstelėms būdingų žymenų raiškos sumažėjimą. Ši populiacija sudarė iki 0.1% bendros kaulų čiulpų ląstelių populiacijos. Atskirtoje lin⁻CD117⁺ populiacijoje nustatėme CD117 (71.86±5.68%) ir Sca-1 (77.23±4.32%) žymenų raišką bei abu žymenis turinčių ląstelių (60.94±5.43%) kiekio sumažėjimą. Tai rodo hemopoetinių kamieninių ląstelių kiekio sumažėjimą šioje populiacijoje.

Primityvios pelių hemopoetinės ląstelės gali ekspresuoti CD34 paviršiaus molekulę, tačiau kiek skirtingai, nei žmogaus hemopoetinės kamieninės ląstelės. Pelių kaulų čiulpų ilgalaikėms HKL būdinga CD38

žymens raiška (Higuchi ir kt., 2003). CD34 ir CD38 žymenų raiška pelių HKL paviršiuje priklauso ne tik nuo vystymosi stadijos, bet ir nuo ląstelės aktyvacijos būsenos (Wognum ir kt., 2003). Manoma, kad CD34 neturinčios HKL yra ramybės būsenoje, tuo tarpu CD34 turinčios HKL yra sužadintos, joms būdingas aktyvus savęs atnaujinimas (Alison ir kt., 2006). Atskiriant pelių ilgalaikes HKL išskiriamos CD34 neturinčios ląstelės (Kiel ir kt., 2007), tuo tarpu atskiriant trumpalaikes HKL ir primityvius hemopoetinius pirmtakus atrenkamos CD34 turinčios ląstelės (Yang ir kt., 2005). Panašūs pokyčių dėsningumai būdingi ir pelių HKL CD38 raiškai. CD38 turinčios pelių HKL yra ramybės būsenoje, tuo tarpu CD38 neturinčios HKL yra sužadintos. Tai labiau panašu į lanksčią pusiausvyrą nei į hierarchinį susiskirstymą (Alison ir kt., 2006). Aukšta CD34 žymens raiška mūsų atskirtose lin⁻ HKL ir lin⁻ CD117⁺ populiacijose (77 ir 72%) rodo aktyvintą HKL būseną atskirtose populiacijose. Mūsų gauti duomenys parodė, kad lin⁻ HKL populiacijoje CD38 neturinčių ląstelių dalis yra didesnė nei 70%, tai reiškia, kad šioje populiacijoje esančios HKL yra sužadintoje būsenoje. Didelė (daugiau nei 85%) CD34 žymenį turinčių ląstelių dalis mūsų atskirtoje lin⁻ HKL populiacijoje tai patvirtina. Tuo tarpu mūsų atskirtoje lin⁻CD117⁺ populiacijoje nustatytos CD38⁻ ir CD34⁺ ląstelių populiacijos (55% ir 70%) tik dalinai patvirtina teiginį apie šioje populiacijoje esančių HKL buvimą aktyvintoje būsenoje.

Paviršiaus žymenų nustatymas bei hemopoetinių kamieninių ląstelių ir pirmtakų populiacijų gavimas yra svarbūs sėkmingam kamieninių ląstelių panaudojimui klinikinėje praktikoje. Kadangi CD117 yra susijęs su HKL atsinaujinimu, išgyvenimu, proliferacija ir diferenciacija (Edling ir Hallberg, 2007), o Sca-1 dalyvauja HKL savaiminio atsinaujinimo, aktyvavimo bei vystymosi procesuose (Alison ir kt., 2006), tokiomis savybėmis pasižyminčios ląstelės gali būti efektyviai panaudojamos terapijoje.

Atlikti tyrimai parodė, kad bendroje kaulų čiulpų populiacijoje HKL būdingus žymenis – CD117 ir Sca-1 – turėjo apie 22% ląstelių, o atskirtoje lin⁻ HKL populiacijoje šiuos žymenis turinčių ląstelių dalis buvo daugiau nei 3 kartus didesnė (daugiau nei 73%). Iš lin⁻ HKL populiacijos atskirtoje lin⁻

CD117⁺ populiacijoje HKL būdingus žymenis turinčių ląstelių dalis sumažėjo daugiau nei 12%. Apibendrinant galime teigti, kad mūsų atskirta pelių kaulų čiulpų lin⁻ HKL populiacija pasižymėjo aukšta pelių kaulų čiulpų HKL būdingų žymenų (CD117 ir Sca-1) raiška bei neturėjo hemopoetinių linijinių žymenų. Remiantis mūsų gautais duomenimis ir lyginant juos su literatūroje aprašytais, galime teigti, kad mūsų išskirta pelių kaulų čiulpų lin⁻ HKL populiacija yra priskirtina KLS populiacijai, kurią sudaro ilgalaikės HKL, trumpalaikės HKL bei hemopoetiniai pirmtakai (Okada ir kt., 1992; Challen ir kt., 2009). Aukšta CD34 žymens raiška (daugiau nei 85%) ir CD38 neturinčių ląstelių dalis (daugiau nei 70%) mūsų atskirtoje lin⁻ HKL populiacijoje rodo, kad dauguma šioje populiacijoje esančių HKL yra aktyvintoje būsenoje, t.y. trumpalaikės HKL. Taigi mūsų atskirtoje pelių kaulų čiulpų lin⁻ HKL populiacijoje daugumą sudarė trumpalaikės HKL, likusioji dalis - ilgalaikės HKL ir ankstyvieji hemopoetiniai pirmtakai.

Atsižvelgę į gaunamą po aiskyrimo ląstelių kiekius (apie 3.5%) ir aukštą pelių kaulų čiulpų hemopoetinėms kamieninėms ląstelėms būdingų žymenų (CD117 ir Sca-1) raišką tolesniems tyrimams pasirinkome lin⁻ HKL populiaciją.

4.2. IŠSKIRTŲ POPULIACIJŲ PRIEŠUŽDEGIMINIO POVEIKIO ĮVERTINIMAS *IN VIVO*

Uždegimas – tai evoliucijos eigoje susiformavęs patologinis procesas. Jo metu pakenkto audinio plote vyksta progresuojantys pakitimai: pakinta ląstelių struktūra ir funkcijos, uždegimo židinyje mobilizuojamos specifinės ir nespecifinės apsaugos reakcijos. Literatūroje pateikiami duomenys rodo, kad lėtinis uždegimas žalingai veikia ilgalaikių HKL aktyvumą (Zhao ir kt., 2010). Tačiau iki šiol neišaiškinti mechanizmai uždegimo metu reguliuojantys HKL palaikymą. Kadangi susirgimai, kuriems numatoma taikyti ląstelių terapiją, paprastai yra lydimi uždegimo (Schwartzing ir kt., 2008; Zhao ir kt., 2010; Mueller ir kt., 2011), manome, kad kamieninių ląstelių priešuždegiminio poveikio tyrimas yra svarbus ir tikslingas. Remiantis literatūros duomenimis,

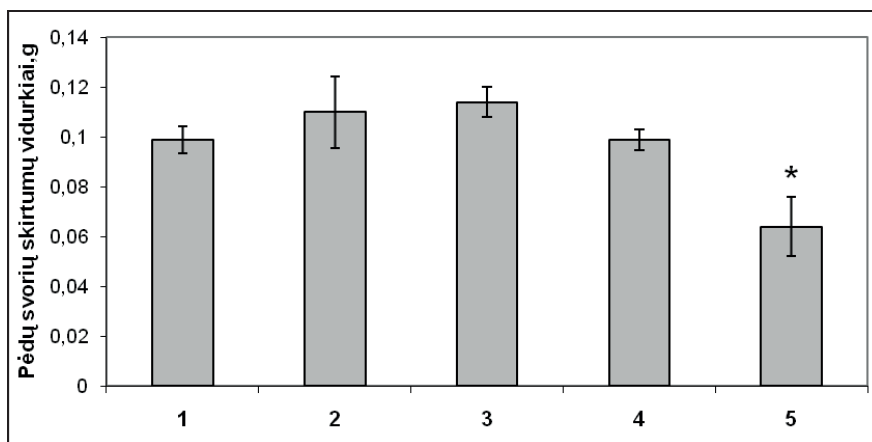
po širdies ar neuroninių išeminių pažeidimų transplantuotos HKL skatina audinio atstatymą. HKL ir pirmtakai gali mažinti uždegimą po išeminio smegenų pažeidimo, mažina periferinę imuninę aktyvaciją ir skatina neuroapsaugą po išeminio insulto (Schwartzing ir kt., 2008). Duomenų apie sisteminius skirtingų hemopoetinių ląstelių populiacijų priešuždegiminius tyrimus aptikti nepavyko.

Siekdami išsiaiškinti atskirtų ir identifikuotų hemopoetinių ląstelių populiacijų priešuždegiminį poveikį tyrėme šių populiacijų įtaka pėdos edemai BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*. Tyrėme bendros kaulų čiulpų, lin^- HKL ir lin^+ ląstelių populiacijų priešuždegiminį poveikį, kurį nustatėme įvertinę ląstelėmis paveiktos ir sveikos tos pačios pelės užpakalinių galūnių pėdų svorių skirtumą.

4.2.1. Bendros kaulų čiulpų populiacijos priešuždegiminis poveikis

Rezultatai, gauti tiriant bendrą kaulų čiulpų ląstelių populiaciją (4.2.1 pav.) parodė, kad skirtingos šios populiacijos ląstelių koncentracijos (2×10^6 ; 10^6 ; 10^5 ląstelių/pelei), praėjus 48 val. po įvedimo, priešuždegiminiu poveikiu nepasižymi (nenustatyti žymesni pėdų svorių skirtumo sumažėjimai lyginant su kontroline grupe). Šios ląstelės pėdos edemos neslopino, o įvedus 10^6 ir 10^5 ląstelių buvo stebimas statistiškai nereikšmingas edemos padidėjimas.

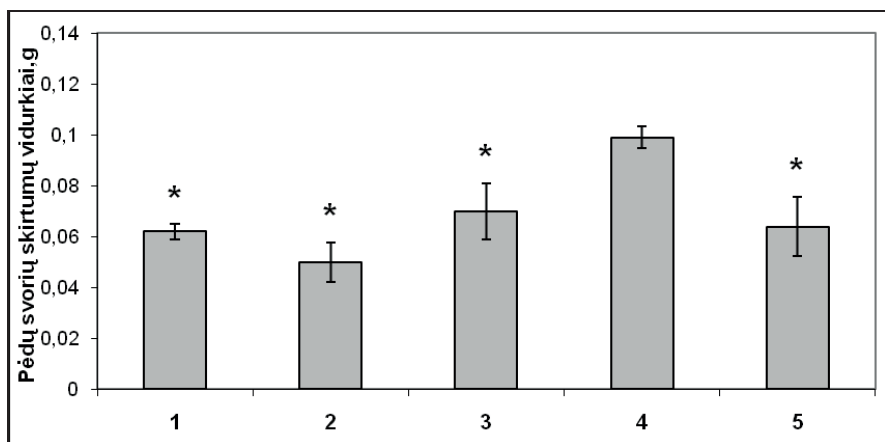
Manome, kad priešuždegiminis poveikis nepasireiškė dėl per mažo santykinio kamieninių ląstelių kiekio transplantuotoje bendroje kaulų čiulpų ląstelių populiacijoje, o šioje populiacijoje esančios diferencijuotos stromos ląstelės galėjo veikti edemos padidėjimą. Todėl tolimesniems tyrimams pasirinkome iš bendros pelių kaulų čiulpų ląstelių populiacijos išskirtą lin^- HKL populiaciją.



4.2.1 pav. Bendros kaulų čiulpų ląstelių populiacijos priešūždegiminis poveikis BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje. 1) 2×10^6 ląstelių/pelei; 2) 10^6 ląstelių/pelei; 3) 10^5 ląstelių/pelei; 4) Neigiama kontrolė - 100 μ l HBSS; 5) Teigiama kontrolė - prednizolonas (100 mg/kg gyvūno svorio); $n=10$ grupėje. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. * $P < 0.05$ lyginant su neigiama kontrole.

4.2.2. Skirtingų koncentracijų lin⁻ HKL populiacijos priešūždegiminis poveikis

Įvertinome skirtingų koncentracijų lin⁻ HKL populiacijos priešūždegiminį poveikį BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos metu. Nustatėme, kad praėjus 48 val. po ląstelių įvedimo visos tirtosios koncentracijos (5×10^6 ; 10^6 ; 10^5 ląstelių/pelei) efektyviai ir statistiškai reikšmingai (lyginant su neigiama kontrole) slopino edemą (4.2.2 pav.). Remiantis literatūros duomenimis, tiriant HKL poveikį uždegimui bei migraciją įvairiuose pažeidimo modeliuose (inkstų, smegenų, kepenų, kaulų čiulpų) buvo naudojamos nuo 1×10^5 iki 3×10^7 ląstelių pelei koncentracijos (Daldrup-Link ir kt., 2005; Colvin ir kt., 2007; Schwarting ir kt., 2008; Stroo ir kt., 2009). Mūsų tirtoji 10^6 ląstelių/pelei lin⁻ HKL koncentracija net 1,28 karto efektyviau nei prednizolonas inhibavo edemą. Todėl vėlesniuose skirtingų populiacijų priešūždegiminio poveikio ir lin⁻ HKL migracijos tyrimuose naudojome 10^6 ląstelių/pelei koncentraciją.

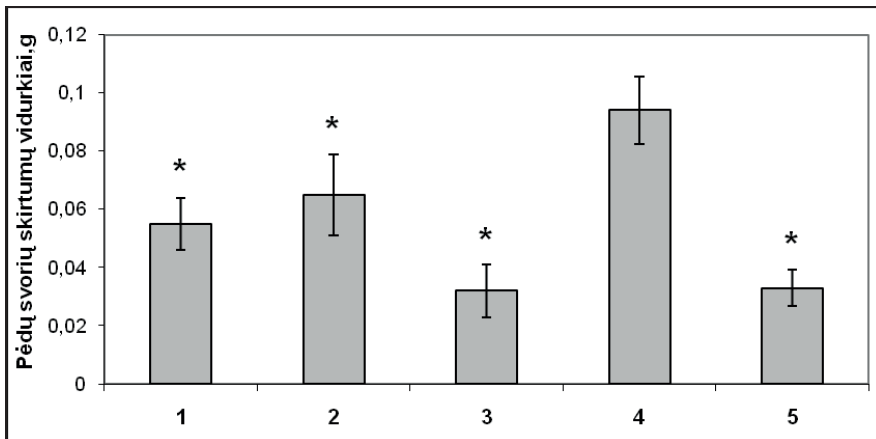


4.2.2 pav. lin^{-} HKL populiacijos priešūždegiminis poveikis BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje. 1) 5×10^6 ląstelių/pelei; 2) 10^6 ląstelių/pelei; 3) 10^5 ląstelių/pelei; 4) Neigiama kontrolė - 100 μ l HBSS; 5) Teigiama kontrolė - prednizolonas (100 mg/kg gyvūno svorio); $n=10$ grupėje. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. * $P < 0.05$ lyginant su neigiama kontrole.

4.2.3. lin^{-} HKL ir lin^{+} populiacijų priešūždegiminis poveikis

Ištyrę išskirtų lin^{-} HKL, lin^{+} , lin^{-} HKL kartu su lin^{+} (1:10) ląstelių populiacijų priešūždegiminį poveikį BALB/c pelių pėdos edemai kontaktinio hiperjautrumo reakcijos metu nustatėme, kad visos tirtos ląstelių populiacijos efektyviai ir statistiškai reikšmingai slopino edemą (4.2.3 pav.). Lyginant su neigiama kontrole, pėdos edema, veikiant skirtingomis hemopoetinių ląstelių populiacijomis, sumažėjo nuo 1,4 iki beveik 3 kartų. Efektyviausiai (net iki 66%) edema buvo inhibuojama veikiant lin^{-} HKL populiacija (4.2.3 pav.; 3). Nustatėme, kad mūsų išskirta lin^{+} populiacija slopina pėdos edemą (4.2.3 pav.; 2). Lyginant su neigiama kontrole, ji buvo 31% mažesnė. Tačiau lin^{+} populiacija, praturtinta 10% lin^{-} HKL, 18% efektyviau slopino pėdos edemą (4.2.3 pav.; 1), nors lyginant su lin^{-} HKL populiacijos priešūždegiminiu poveikiu, lin^{+} populiacija veikė dvigubai silpniau. Mūsų tyrimų duomenys, gauti tiriant skirtingas kaulų čiulpų hemopoetines populiacijas, parodė, kad šių populiacijų priešūždegiminio poveikio efektyvumas yra tiesiogiai susijęs su santykinu populiacijoje esančių lin^{-} HKL kiekiu. Panašių duomenų apie kelių

skirtingų hemopoetinių ląstelių populiacijų priešuždegiminio poveiko tyrimus mokslinėje literatūroje neaptikome, nors atskiros šių ląstelių populiacijos buvo tiriamos taikant įvairius pažeidimo modelius (Dalakas ir kt., 2005; Loebinger ir Janes, 2007; Stroo ir kt., 2009; Zhao ir kt., 2010; Mueller ir kt., 2011). Nepaisant jau atliktų mokslinių tyrimų, hemopoetinių kamieninių ląstelių funkcionavimas uždegimo metu nėra gerai žinomas, o atliktų tyrimų duomenys yra prieštaringi.



4.2.3 pav. Hemopoetinių ląstelių populiacijų: lin^- HKL, lin^+ , lin^- HKL + lin^+ (1:10), 10^6 ląstelių/pelei koncentracijos priešuždegiminis poveikis BALB/c pelių pėdos edemai kontaktinio hiperjautrumo reakcijos atveju. 1) lin^- HKL + lin^+ ; 2) lin^+ ; 3) lin^- HKL; 4) Neigiama kontrolė - 100 μ l HBSS; 5) Teigiama kontrolė - prednizolonas (100 mg/kg gyvūno svorio); $n=10$. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. * $P<0.05$ lyginant su neigiama kontrole.

Literatūroje yra duomenų, kad tiriant neurologinius išeminius pažeidimus buvo pastebėtas priešuždegiminis HKL poveikis. Nustatyta, kad transplantuotos HKL slopina periferinį imuninį atsaką bei mažina imuninių ląstelių infiltraciją pažeidimo vietoje (Schwartzing ir kt., 2008). Žmogaus virkštelės kraujo HKL sutrikdo CD8+ limfocitų mobilizaciją iš blužnies bei pasižymi priešapoptoziniu poveikiu (Newcomb ir kt., 2006). Tiriant neurologinius pažeidimus nustatyta, kad įvestos HKL mažina uždegiminių citokinų receptorių transkriptų kiekį blužnyje esančiose ląstelėse bei sutrikdo

jose esančių imuninių genų transkripciją (Schwartzing ir kt., 2008). Nustatyta, kad HKL paviršiuje esančio TLR aktyvavimas skatina su hemopoeze susijusių transkripcijos aktyvatorių slopinimą, ilgalaikės HKL kaulų čiulpuose skatinamos išeiti iš ramybės būsenos (Zhao ir kt., 2010). Panašu, kad esant pažeidimui cirkuliuojančios HKL, moduluodamos imuninį atsaką, geba mažinti uždegimą pažeidimo vietoje. Taip būtų galima paaiškinti mūsų tirtos lin⁻ HKL populiacijos priešuždegiminį poveikį, pasireiškiantį pėdos edemą slopinančiu efektu pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje. Kita vertus cirkuliuojančios HKL gali būti šaltiniu vietinei imuninių efektorinių ląstelių gamybai ir taip dalyvauti uždegimo slopinime. Nustatyta, kad TL receptoriaus aktyvavimas pažeidimo vietoje esančių HKL paviršiuje skatina jų diferenciaciją į imunines efektorines ląsteles (Jaiswal ir Weissman, 2009). Tai taip pat padėtų paaiškinti mūsų išskirtos lin⁻ HKL populiacijos teigiamą priešuždegiminį poveikį pėdos edemai. Nors lin⁺ ląstelių populiacijos poveikis ir buvo kur kas silpnesnis lyginant su lin⁻ HKL populiacija, tačiau labiau diferencijuotų hemopoetinių ląstelių įvedimas slopino pėdos edemą pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje. Diferencijuotų ar besidiferencijuojančių lin⁺ populiacijos ląstelių patekimas į pažeistą pėdą galėjo padidinti efektorinių imuninių ląstelių, dalyvaujančių uždegimo slopinime, skaitlingumą. Silpnesnis lin⁺ populiacijos poveikis pėdos edemos inhibicijai paaiškinamas ląstelių heterogeniškumu šioje populiacijoje ir silpnesnėmis proliferacinėmis savybėmis. Galbūt lin⁺ ir lin⁻ populiacijose esančių mezenchiminių kamieninių ląstelių edemą slopinantis poveikis *in vivo* be šių ląstelių padauginimo *in vitro* yra mažai tikėtinas.

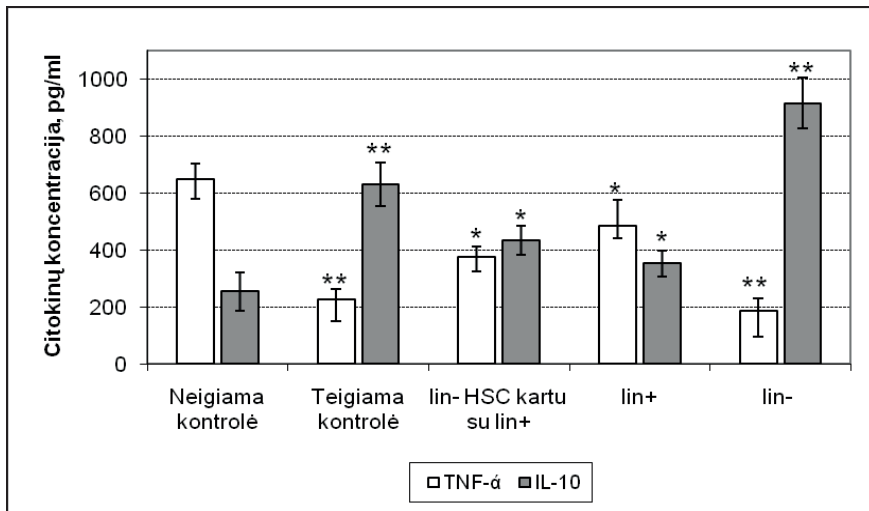
4.2.4. lin⁻ HKL ir lin⁺ populiacijų poveikis citokinų kiekiams pelių kraujo serume

Žinoma, kad uždegimo metu pažeistame audinyje aktyvinama citokinų, chemokinų ir proteolitinių fermentų produkcija, kas gali padidinti audinio pažeidimą (Emsley ir Tyrrell, 2002). Citokinai, tokie kaip TNF- α , IL-1 ir IL-8, dalyvauja uždegimo reguliavime sustiprindami uždegimą pažeistame audinyje.

Jie skatina leukocitų infiltraciją į uždegimo židinį (Bemeur ir kt., 2005). Nustatyta, kad prouždegiminis monocitų/makrofagų, T ir NK ląstelių produkuojamas citokinas TNF- α veikia kaip uždegimo mediatorius (Wellen ir Hotamisligil, 2005). Makrofagų sintetinamas IL-10 atlieka priešuždegiminio citokino vaidmenį (Gomariz ir kt., 2007) – slopina prouždegiminių citokinių gamybą, saugodamas audinį nuo galimų pernelyg intensyvių uždegiminių procesų (Hallenbeck, 2002). Kadangi šių uždegimo reguliatorių (TNF- α ir IL-10) kiekiai kraujyje yra svarbūs rodikliai vertinant uždegimą, mes siekėme įvertinti skirtingų hemopoetinių ląstelių populiacijų įtaką šių citokinių kiekiams kontaktinio hiperjautrumo modelyje.

Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad visų skirtingomis hemopoetinių ląstelių populiacijomis paveiktų pelių kraujo serume TNF- α koncentracija buvo nuo 1.2 iki 3.5 karto mažesnė, nei neigiamos kontrolinės grupės pelių kraujyje (4.2.4 pav). Tuo tarpu IL-10 koncentracija buvo nuo 1.3 iki 3.6 karto didesnė. Remiantis literatūros duomenimis, po fetalinių kepenų HKL transplantacijos stebimas TNF- α kiekio sumažėjimas ir IL-10 koncentracijos padidėjimas (Biziuleviciene ir kt., 2007). Kitų autorių darbai rodo, kad esant CNS pažeidimui transplantuotos kamieninės ląstelės sumažina TNF- α ir padidina IL-10 kiekius pažeidimo regione, bei sumažina neuroninius pažeidimus, atsirandančius uždegimo metu (Liu ir kt., 2009). Mūsų darbe nustatyti šių citokinių kiekiai ląstelėmis paveiktų pelių kraujyje parodė, kad uždegiminiai procesai kontaktinio hiperjautrumo modelyje, įvedus skirtingas hemopoetinių ląstelių populiacijas, yra slopinami. Citokinių koncentracijos pokyčiai pelių kraujo serume įvedus skirtingas hemopoetinių ląstelių populiacijas (lin^- HKL, lin^+ , lin^- HKL + lin^+ (1:10)) kontaktinio hiperjautrumo reakcijos metu, praėjus 48 val. po ląstelių (10^6 ląstelių/pelei) įvedimo, yra proporcingi pėdos edemos inhibicijai praėjus 48 val. po atitinkamų hemopoetinių ląstelių (10^6 ląstelių/pelei) populiacijų įvedimo. Tai patvirtina išskirtų lin^- HKL, lin^+ , lin^- HKL kartu su lin^+ populiacijų priešuždegiminį poveikį. Mes nustatėme, kad mažiausi citokinių kiekių pokyčiai, kaip ir poveikis pėdos edemai, nustatyti pelių, kurioms buvo transplantuotos lin^+ populiacijos ląstelės, kraujo serume.

TNF- α koncentracija jame buvo 1.2 karto mažesnė, o IL-10 – 1.3 karto didesnė, lyginant su nustatytais šių citokininų kiekiais neigiamos kontrolinės grupės pelių kraujyje. Žymiausi šių citokininų pokyčiai nustatyti pelių, kurioms buvo įvestos lin⁻ HKL populiacijos ląstelės, kraujyje. TNF- α koncentracija jame buvo 3.5 karto mažesnė, o IL-10 – 3.6 karto didesnė, negu neigiamos kontrolinės grupės pelių kraujyje. Ši populiacija taip pat pasižymėjo efektyviausiu edemą slopinančiu poveikiu. Nustatyti citokininų koncentracijos pokyčiai, įvedus skirtingas hemopoetinių ląstelių populiacijas, patvirtina šių populiacijų priešuždegiminį poveikį.



4.2.4 pav. Hemopoetinių ląstelių populiacijų: lin⁻, lin⁺, lin⁻ kartu su lin⁺(1:10), poveikis citokininų TNF- α ir IL-10 koncentracijai BALB/c pelių kraujo serume kontaktinio hiperjautrumo reakcijos metu, praėjus 48 val. po ląstelių (10^6 ląstelių/pelei) įvedimo. Neigiama kontrolė - 100 μ l PBS; Teigiama kontrolė - prednizolonas (100 mg/kg gyvūno svorio). Rezultatai pateikti kaip vidurkiai \pm SN. Pažymėti duomenys rodo skirtumo nuo neigiamos kontrolės reikšmingumą: *P<0.01; **P<0.001.

Sistemiškai įvestų HKL priešuždegiminis aktyvumas gali būti siejamas su netiesioginiu jų poveikiu uždegimui, tačiau galimas ir tiesioginis HKL dalyvavimas uždegimo slopinime. Literatūroje yra duomenų apie transplantuotų HKL lokalizaciją pažeidimo vietoje kepenų, smegenų, inkstų, plaučių pažeidimo modeliuose (Dalakas ir kt., 2005; Loebinger ir Janes, 2007;

Schwarting ir kt., 2008; Stroo ir kt., 2009). Kita vertus klinikiniuose alogeninių HKL transplantacijų tyrimuose donorinės kilmės ląstelės buvo aptinkamos beveik visuose recipientų organuose ir audiniuose (Rovo ir Gratwohl, 2008; Mueller ir kt., 2011). Gali būti, kad cirkuliuojančios HKL, esant pažeidimui, pasižymi dvejopu poveikiu: moduliuoja imuninį atsaką ir tarnauja šaltiniu vietinei efektorinių imuninių ląstelių gamybai pažeidimo vietoje. Tokiu būdu slopinamas uždegimas ir skatinama audinio regeneracija.

Hemopoetinių kamieninių ląstelių priešuždegiminis poveikis nėra pakankamai suprastas ir reikalauja išsamesnių tyrimų tiek esant uždegimui dėl pažeidimų, tiek esant patologijų veikiamam chroniškam uždegimui. Norėdami nustatyti galimą mūsų tirtos lin⁺ HKL populiacijos priešuždegiminio poveikio pobūdį, nusprendėme iširti šių ląstelių migraciją BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

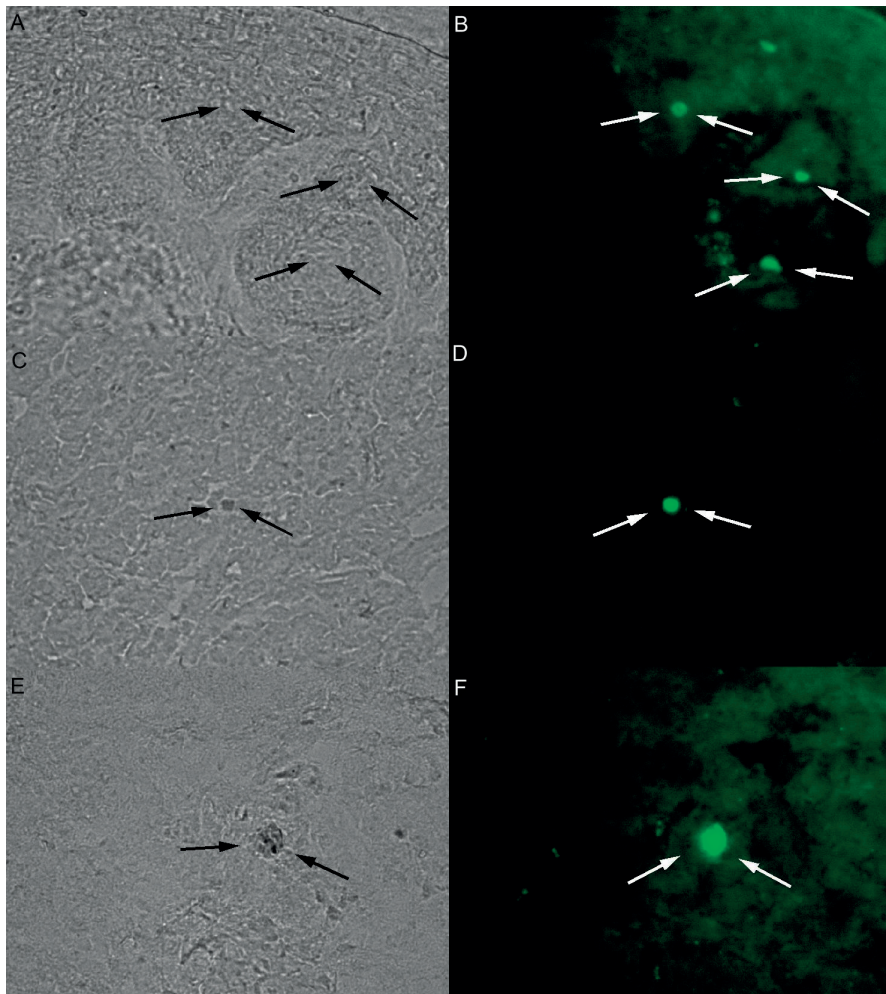
4.3. TRANSPLANTUOTŲ HEMOPOETINIŲ KAMIENINIŲ LIN⁺ POPULIACIJOS LĄSTELIŲ MIGRACIJA

Hemopoetinių kamieninių ląstelių migracija į pažeistus periferinius audinius ir galimi jų diferenciacijos procesai kol kas yra menkai iširti. Literatūroje aprašyti duomenys leidžia manyti, kad HKL ir jų pirmtakai geba tiesiogiai dalyvauti uždegime (Jaiswal ir Weissman, 2009). Manoma, kad uždegimo vietoje HKL gali diferencijuotis mieloidine ar audiniui specifine kryptimis. HKL diferenciacija mieloidine kryptimi periferiniame audinyje, manoma, yra susijusi su TLR aktyvavimu, tuo tarpu diferenciacija audiniui specifine kryptimi, nors ir nustatyta tyrimais *in vivo*, lieka ginčytina (Laird ir kt., 2008). Periferiniame audinyje esančių hemopoetinių kamieninių ir pirmtakinių ląstelių TLR receptorių aktyvavimas gali paskatinti greitą HKL ir/ar pirmtakų diferenciaciją į makrofagus ir/ar dendritines ląsteles, kurios yra esminiai greito imuninio atsako į įvairius patogenus komponentai (Jaiswal ir Weissman, 2009). Literatūroje pateikiami transplantuotų ląstelių migracijos ir kinetikos tyrimų rezultatai nėra vienareikšmiai. Nesutariama, kur migruoja

transplantuotos HKL esant pažeidimui, ar migracija link pažeidimo vietos yra specifinė, ir koks laiko tarpas reikalingas migracijai.

4.3.1. HKL migracijos įvertinimas

Mūsų eksperimentų tikslas buvo nustatyti, kur *in vivo* migruoja transplantuotos lin⁻ HKL esant pažeidimui. Šios populiacijos migracijos tyrimui pasirinkome BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelį. Tiriamųjų ląstelių membranas pažymėjome nespecifiniu fluorescuojančiu PKH67 dažu. Norėdami išsiaiškinti, ar lin⁻ HKL migruoja tik į pažeistą audinį ar tam tikra jų dalis migruoja ir į kitus organus, praėjus 48 val. po ląstelių (10^6 lin⁻ HKL) sušvirkštimo, atlikome pėdos edemos, sveikos pėdos, kepenų ir blužnies audinių histologinę analizę. Mūsų atlikti lin⁻ HKL populiacijos migracijos tyrimai BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje parodė, kad PKH67 dažu žymėtos lin⁻ HKL po 48 val. aptinkamos BALB/c pelių pėdos edemos histologiniuose mėginiuose, tuo tarpu mūsų tirtuose sveikos pėdos histologiniuose preparatuose žymėtos lin⁻ HKL aptiktos nebuvo. Kiti autoriai tirdami migraciją inkstų pažeidimo modelyje pastebėjo, kad HKL yra aptinkamos pažeistame inkste praėjus 24 val. po jų transplantacijos (Stroo ir kt., 2009). Išanalizavę kepenų ir blužnies histologinius preparatus, praėjus 48 val. po ląstelių sušvirkštimo, mes pastebėjome juose žymėtas ląsteles (4.3.1 pav.), kas rodo transplantuotų ląstelių migraciją bei atitinka literatūroje aptinkamus duomenis apie ląstelių pasiskirstymą minėtuose organuose praėjus 48 val. po hemopoetinių ląstelių sušvirkštimo (Daldrup-Link ir kt., 2005). Magnetinio rezonanso metodu hemopoetinės kamieninės ląstelės buvo aptiktos pelių limfoidiniuose organuose praėjus 1 ir 24 val. po transplantacijos (Daldrup-Link ir kt., 2005). Kiti autoriai transplantuotų hemopoetinių kamieninių ląstelių sankaupas kaulų čiulpuose aptinka tik po 4-5 dienų (Askenasy ir Farkas, 2002; Askenasy ir kt., 2002).



4.3.1 pav. **Histologiniai BALB/c pelių audinių preparatai:** pėdos edemos (A, B), blužnies (C, D) ir kepenų (E, F). Biopsijos histologiniam vertinimui paimtos praėjus 48 val. po žymėtų ląstelių įvedimo. Dešinėje fluorescencinės mikroskopijos vaizdas, kairėje – šviesinės (originalus didinimas 20x(A-D), 40x(E,F)). Rodyklės nurodo žymėtas donorines ląstelės.

Įvertinę gautus rezultatus nustatėme, kad po 48 val. lin⁻ HKL yra aptinkamos pažeistoje pėdoje, blužnyje ir kepenyse. Blužnis ir kepenys gali būti vertinami kaip tarpiniai migracijos organai, iš kur vyksta tolesnė HKL migracija. Remiantis literatūros duomenimis, taikant pelių ksenotransplantacijos modelį buvo parodyta, kad sistemiskai *in vivo* įvesti HKL pirmtakai migruoja į tarpinius organus (blužnį ir kepenis) ir į organą „taikini“ – kaulų čiulpus (Daldrup-Link ir kt., 2005). Mūsų tyrimų metu žymėtų lin⁻ HKL sveikoje pėdoje, praėjus 48 val. po įvedimo, aptikta nebuvo. Tai rodo, kad migracija į pažeistą pėdą nėra atsitiktinė, lin⁻ HKL selektyviai migruoja į pažeidimo vietą. Literatūroje yra nemažai duomenų apie transplantuotų kamieninių ląstelių migraciją. Tyrimai *in vivo* rodo, kad pelėms intraveniškai įvedus žymėtas hemopoetines kamienines ląsteles, jos yra aptinkamos recipientinių pelių kaulų čiulpuose, blužnyje bei kepenyse (Askenasy ir kt., 2002; Daldrup-Link ir kt., 2005; Colvin ir kt., 2007). Eksperimentinių ar klinikinių tyrimų metu nustatyta, kad hemopoetinės kamieninės ląstelės gali migruoti į pažeistą audinį (Laird ir kt., 2008). HKL migracija į pažeistas kepenis, inkstus, smegenis, bei kitus organus nustatyta taikant įvairius pažeidimų modelius (Dalakas ir kt., 2005; Colvin ir kt., 2007; Schwarting ir kt., 2008; Stroo ir kt., 2009). Pastebėta, kad taikant inkstų pažeidimo modelį vyksta selektyvi kamieninių ląstelių migracija į pažeistą inkstą (Stroo ir kt., 2009), o taikant uždegimo modelį nustatyta, kad vaisiaus kepenų HKL selektyviai migruoja į pėdos edemą (Biziuleviciene ir kt., 2007). Manoma, kad HKL migraciją reguliuoja SDF-1, kurio koncentracija pažeistame audinyje uždegimo metu padidėja (Guo ir kt., 2003). Kepenų pažeidimo atveju nustatyta, kad HKL ne tik selektyviai migruoja į kepenis, bet ir dalyvauja jų regeneracijoje (Dalakas ir kt., 2005). Mūsų atlikti tyrimai kontaktinio hiperjautrumo modelyje rodo, kad HKL pasižymi priešuždegiminiu poveikiu – mažina pėdos edemą. Literatūroje nėra bendro sutarimo apie galimus mechanizmus veikiančius HKL pažeidimo vietoje. Yra duomenų, kad audinių atstatymas gali vykti dėl spontaninio HKL susiliejimo su pažeisto audinio ląstelėmis arba transdiferenciacijos (Dalakas ir kt., 2005). Kitų autorių

duomenys, gauti tiriant širdies ir smegenų pažeidimus rodo, kad HKL gali dalyvauti pažeisto audinio atstatyme skatindamos neoangiogenezę ir mažindamos pažeisto audinio ląstelių apoptozę (Schwartz ir kt., 2008). Taip pat parodyta, kad HKL paviršiuje esančio TLR aktyvavimas gali paskatinti pažeidimo vietoje esančių HKL spačią diferenciaciją į makrofagus ir dendritines ląsteles, bei tiesioginį jų dalyvavimą uždegime (Jaiswal ir Weissman, 2009). Tikėtina, kad šie mechanizmai gali veikti kartu pažeidimo vietoje kaip bendro regeneracijos proceso dalis. Gali būti, kad pats pažeidimo pobūdis nulemia vieno ar kito mechanizmo stipresnę pasireiškimą pažeidimo vietoje. Nepaisant to, kokie mechanizmai veikia, po transplantacijos HKL pasiekia pažeidimo vietą. Tačiau nėra aišku, per kiek laiko transplantuotos ląstelės patenka į pažeistą audinį ir kitus svarbius audinius ar organus. Įvertinę tai, toliau nusprendėme ištirti mūsų išskirtų lin⁻ HKL ląstelių migracijos kinetiką.

4.3.2. HKL migracijos kinetika

Nuoseklių hemopoetinių kamieninių ląstelių migracijos kinetikos tyrimų duomenų literatūroje mums aptikti nepavyko. Siekdami išsiaiškinti lin⁻ HKL migracijos kinetiką į pažeistą ir kitus audinius BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje, atlikome pėdos edemos, sveikos pėdos, kepenų ir blužnies audinių histologinę analizę praėjus 1, 4, 8, 12, 24, 48 ir 72 val. po žymėtų ląstelių (10^6 lin⁻ HKL) įvedimo (4.3.2 paveikslas).

Mūsų atlikti HKL migracijos tyrimai parodė, kad jau po 1 val. žymėtos lin⁻ HKL yra aptinkamos tiriamų pelių pėdos edemos ir kepenų histologiniuose preparatuose, tuo tarpu blužnyje žymėtas ląsteles aptikome tik praėjus 4 val. po transplantacijos (4.3.1 lentelė).

Remiantis literatūros duomenimis, praėjus 1 val. po HKL įvedimo, jos aptinkamos ir kaulų čiulpuose bei periferiniame kraujyje (Colvin ir kt., 2007). Kitų autorių tyrimai rodo, kad žymėti hemopoetinių ląstelių pirmakai kepenyse ir blužnyje aptinkami ir praėjus 1, 4, 24 bei 48 val. po transplantacijos, o kaulų čiulpuose – tik po 24 val. (Daldrup-Link ir kt., 2005).

Naudojant inkstų pažeidimo modelį nustatyta, kad HKL inkstuose aptinkamos praėjus 24 val. po transplantacijos (Stroo ir kt., 2009). O vos po 3 val. transplantuotų kamieninių ląstelių periferiniame kraujyje jau nebeaptinkama (Colvin ir kt., 2007). Mūsų atlikti HKL migracijos kinetikos tyrimai parodė, kad lin⁻ HKL kepenyse aptinkamos ir praėjus 48 val. po įvedimo, tuo tarpu blužnyje ir pėdos edemoje jas galima aptikti net ir po 72 val. Visais mūsų tirtais laiko intervalais žymėtų lin⁻ HKL sveikoje pėdoje aptikta nebuvo.

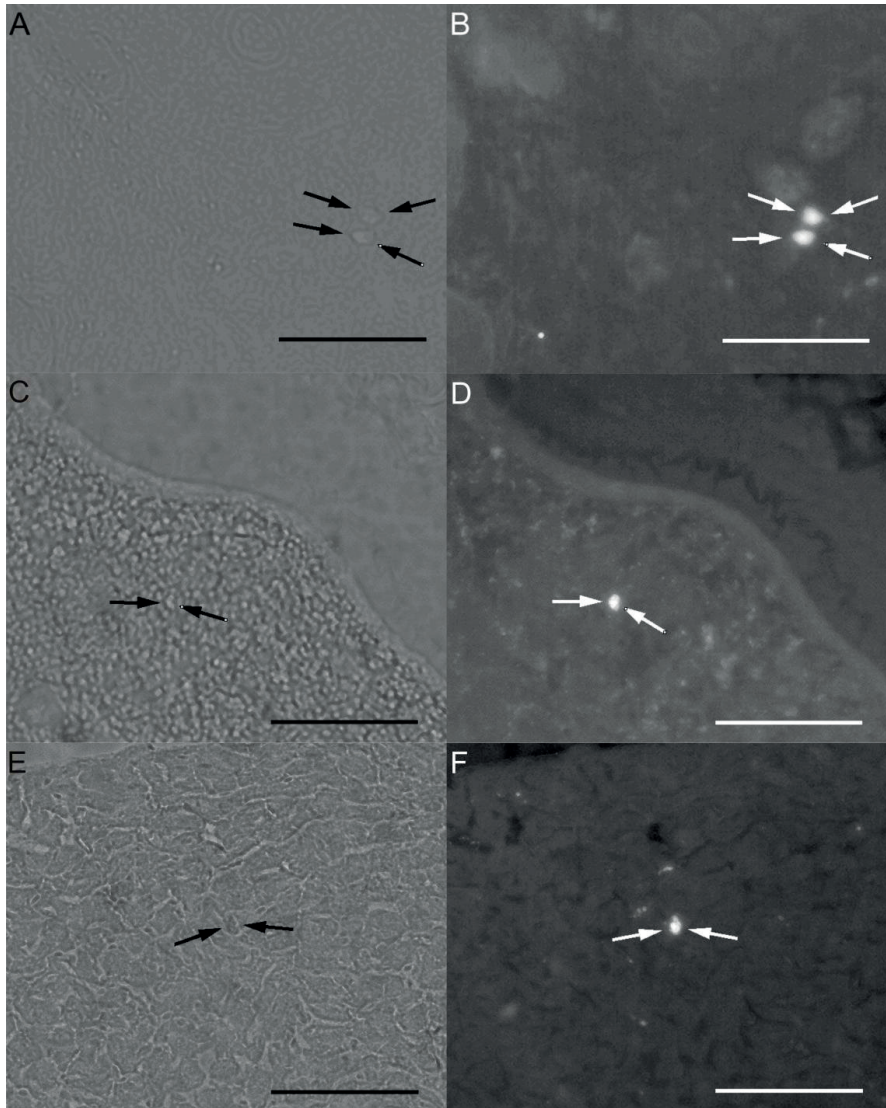
4.3.1 lentelė. Donorinių ląstelių nustatymas sveikos pėdos, pėdos edemos, blužnies ir kepenų histologiniuose preparatuose po ląstelių transplantacijos praėjus skirtingiems laiko intervalams.

Valandos	1	4	8	12	24	48	72
Mėginys							
Pėdos edema	+	+	+	+	+	+	+
Blužnis	-	+	+	+	+	+	+
Kepenys	+	+	+	+	+	+	-
Nepaveikta pėda	-	-	-	-	-	-	-

(+) - teigiamas; (-) – neigiamas. Eksperimentas kartotas 3 kartus.

Įvertinę savo gautus rezultatus nustatėme, kad transplantuotos lin⁻ hemopoetinės kamieninės ląstelės BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje pirmiausiai migruoja į pelės pėdos edemą (kur dalyvauja uždegimo slopinime) ir kepenis, kiek vėliau jos aptinkamos blužnyje. Kadangi praėjus 72 val. lin⁻ HKL kepenyse jau nebuvo aptinkamos, tai patvirtino prielaidą apie šių ląstelių migraciją į kepenis kaip į tarpinį organą, iš kurio vėliau pasišalinama. Tačiau blužnyje po 4 val. aptiktos lin⁻ HKL joje išliko iki 72 val. Tai prieštarauja prielaidai, kad transplantuotos HKL migruoja į blužnį, kaip į tarpinį organą. Literatūroje yra duomenų, kad esant hemopoetiniam stresui galima HKL migracija į blužnyje esančias HKL ektopines nišas (Jaiswal ir Weissman, 2009). Todėl pelėms sukeltas pėdos uždegimas galėjo veikti lin⁻ HKL migraciją į blužnies ektopines HKL nišas, o blužnis šiuo atveju galbūt

nėra tik tarpinis migracijos organas, nes tam tikromis aplinkybėmis ji gali būti ir dalies HKL migracijos „taikynys“. Tačiau norint tai patvirtinti reikalingi išsamesni migracijos tyrimai.



4.3.2 pav. **Histologiniai BALB/c pelių audinių preparatai:** pėdos edema (A, B), blužnis (C, D) ir kepenys (E, F). Dešinėje fluorescencinės mikroskopijos vaizdas, kairėje – šviesinės (originalus didinimas 20x). Rodyklės nurodo žymėtas donorines ląsteles (100 μm skalėje).

Visais mūsų tirtais laiko intervalais žymėtų lin⁻ HKL sveikoje pėdoje neaptikome, galime teigti, kad lin⁻ HKL migracija į pažeistą pėdą yra selektyvi. Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad lin⁻ HKL greitai migruoja į pėdos edemą kontaktinio hiperjautrumo modelyje: jau po 1 val. jos aptinkamos pažeidimo vietoje, kur išlieka iki 72 val. Tai patvirtina teiginius apie selektyvią įvestų lin⁻ HKL migraciją į uždegimo židinių bei galimą tiesioginių jų dalyvavimą uždegimo slopinime ir pažeisto audinio atstatyme.

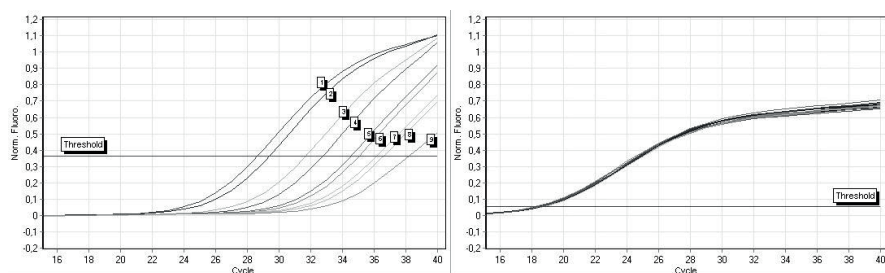
Kadangi tiriant histologinius preparatus sunku įvertinti, kiek migravusių žymėtų ląstelių yra tiriamajame audinyje, o atskiri histologiniai pjūviai neatspindi migravusių donorinės kilmės lin⁻ HKL kiekių tiriamame audinyje, negalima daryti išvadų apie įvestų lin⁻ HKL kiekių pokyčius tyrimo eigoje. Tai paskatino mus atlikti kiekybinį lin⁻ HKL migracijos kinetikos vertinimą.

4.4. TRANSPLANTUOTŲ HEMOPOETINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ LIN⁻ POPULIACIJOS KIEKYBINIS MIGRACIJOS KINETIKOS ĮVERTINIMAS

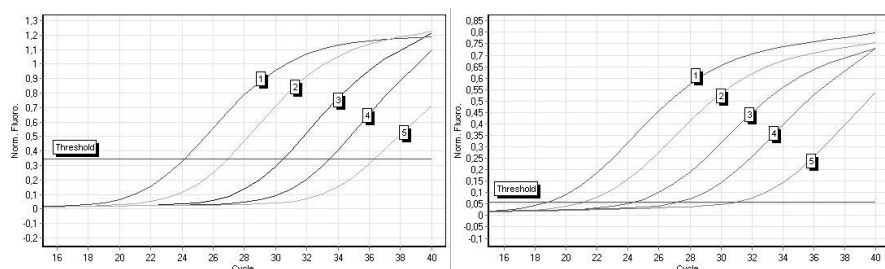
Remiantis literatūros duomenimis, donoro HKL po alogeninių transplantacijų gali būti aptinkamos beveik visuose recipiento organuose bei audiniuose: CNS, odoje, endotelėje, naguose, kepenyse, žarnyne, gimdoje, plaučiuose ir raumenyse (Alison ir kt., 2000; Korbling ir kt., 2002; Tran ir kt., 2003; Cogle ir kt., 2004; Spyridonidis ir kt., 2004). Donorinės ląstelės nebuvo aptiktos tik recipiento plauko folikule (Hong ir kt., 2007). Įvairių autorių duomenimis, donorinių ląstelių recipiento audiniuose aptinkama nuo 0.04% (žarnyno epitelėje) iki 72.9% (rankų naguose) (Meignin ir kt., 2004; Imanishi ir kt., 2007). Tačiau šiuose darbuose nebuvo tirta migracijos į audinius kinetika. Mes ištyrėme transplantuotų lin⁻ HKL migracijos kinetiką BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje ir kiekybiškai įvertinome transplantuotų lin⁻ HKL migraciją į uždegimo židinių pėdoje ir kitus nepažeistus organus. Tyrimus atlikome realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos (RT-PCR) metodu, prieš tai sudarę standartines kreives.

Standartinių kreivių sudarymas. Iš BALB/c pelių patinėlių išskirta DNR buvo maišoma tam tikru santykiu su BALB/c pelių patelių DNR. Naudojome šiuos

patinėlių ir patelių DNR mišinio santykius: 1:10; 1:30, 1:100; 1:300; 1:1000; 1:3000; 1:10 000; 1:30 000; 1:100 000. RT-PCR metodu nustatėme TSPY (eančio tik patinėlių Y chromosomoje) ir β -aktino (esančio abiejų lyčių ląstelių DNR) genų kiekius mėginiuose (4.4.1 pav). Tai atspindi atitinkamų ląstelių DNR kiekius mėginiuose. Taip pat analizavome įvairias patinų ir patelių DNR koncentracijas (4.4.2 pav). Šie duomenys reikalingi vėlesniam tiriamųjų mėginių normalizavimui (pagal β -aktiną) ir kalibravimui (pagal TSPY) esant nežinomam BALB/c patinėlių ir patelių kilmės DNR kiekiui mėginyje. Siekdami įsitikinti, kad nespecifiniai fragmentai nėra amplifikuojami RT-PGR metu, produkto dydžius analizavome elektroforetiškai agarozės gelyje (4.4.3 pav). Nespecifinės amplifikacijos neaptikome.



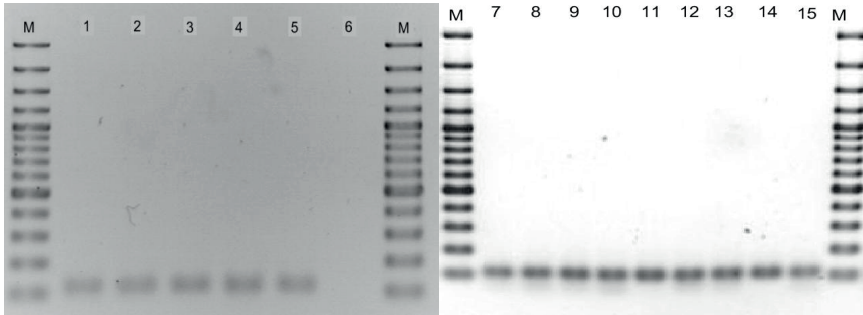
4.4.1 pav. **TSPY amplifikacijos kalibracinė kreivė.** Skirtingu santykiu maišytos patelių ir patinėlių DNR amplifikacija pagal TSPY (kairėje) ir β -aktino (dešinėje) genus. Skaičiai žymi pavyzdžių, su skirtingu patinėlių DNR kiekiu, TSPY geno amplifikaciją 100 ng patinėlių ir patelių DNR mišinio: 1) 1:10; 2) 1:30; 3) 1:100; 4) 1:300; 5) 1:1000; 6) 1:3000; 7) 1:10 000; 8) 1:30 000; 9) 1:100 000.



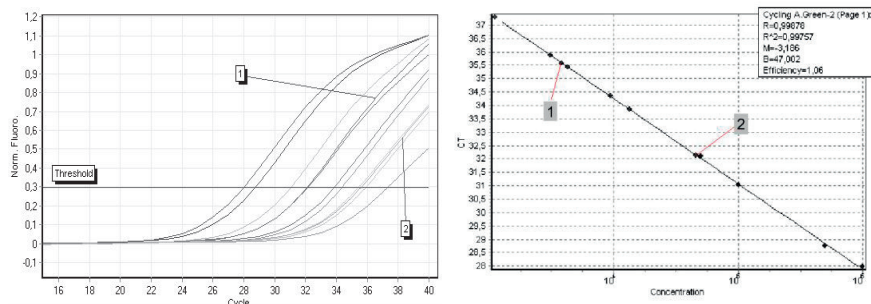
4.4.2 pav. **Skirtingų koncentracijų DNR amplifikacija:** patinėlių – pagal TSPY (kairėje) ir patelių pagal β -aktino (dešinėje) genus. Skaičiai nurodo DNR kiekį: 1) 100 ng; 2) 10 ng; 3) 1 ng; 4) 0.1 ng; 5) 0.01ng.

Standartines kreives patikrinome analizuodami mėginius, kuriuose tam tikru santykiu prieš išskiriant DNR buvo sumaišytos patinėlių ir patelių ląstelės santykiais: 1:10; 1:30; 1:100; 1:300; 1:1000; 1:3000; 1:10 000; 1:30 000; 1:100 000. Kiekybiškai nustatėme TSPY ir β -aktino genų amplifikaciją, kuri atspindi patinėlių ir patelių DNR kiekius mėginiuose. Atlikę duomenų apdorojimą, gautus rezultatus palyginome su standartinėmis kreivėmis (4.4.4 pav).

Po HKL transplantacijos praėjus 1, 4, 8, 12, 24, 48 ir 72 val. ėmėme blužnies, inkstų, kaulų čiulpu, plaučių, kepenų, pažeistos ir/arba sveikos pėdos audinių mėginius. Nustatėme TSPY ir β -aktino genų kiekius mėginiuose. Atlikę duomenų apdorojimą, gautus rezultatus palyginome su standartinės kreivės duomenimis.



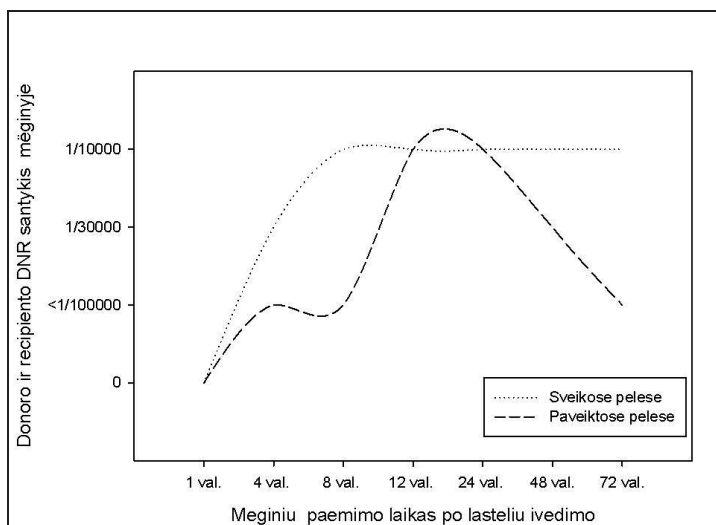
4.4.3 pav. Polimerazinės ciklinės reakcijos produktų elektroforetinė analizė. Gauti TSPY (1-5) ir β -aktino (7-15) genų produktų dydžiai atitinka teoriškai išskaičiuotus (110 ir 103 bp atitinkamai); 6 – neigiama kontrolė; M – žymi DNR dydžio standartus (nuo viršaus 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).



4.4.4 pav. TSPY amplifikacijos kalibracinės kreivės tikrinimas. Skaičiu pažymėtas mėginys, išskirtas iš ląstelių suspensijos, kurioje patinėlių ir patelių ląstelių santykiai: 1) 1:300; 2) 1:1000.

4.4.1. HKL migracija į blužnį

Tirdami blužnies audinio mėginius pastebėjome, kad transplantuotos lin⁻ HKL ląstelės po 4 val. yra aptinkamos patelių recipienčių blužnyje, kur išlieka iki 72 val. (4.4.5 pav) Tai patvirtina anksčiau mūsų atliktų migracijos tyrimų su žymėtomis lin⁻ HKL rezultatus.



4.4.5 pav. Transplantuotos lin⁻ HKL populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos į blužnį įvertinimas BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

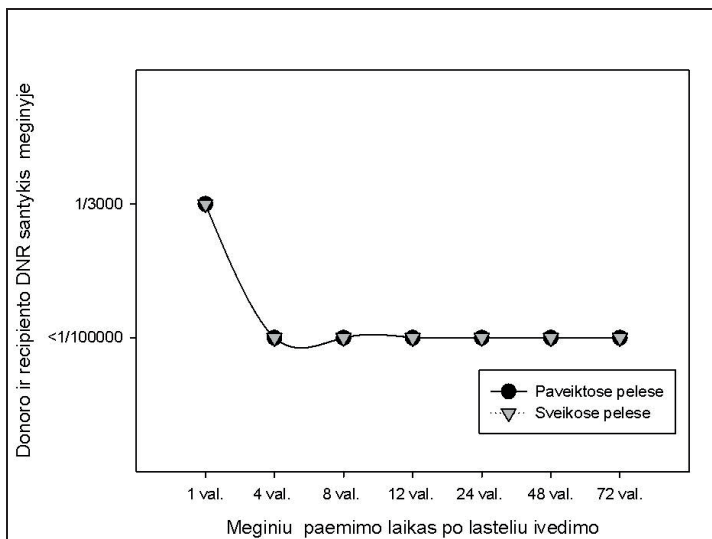
Literatūroje skelbiami duomenys rodo, kad žymėti hemopoetinių ląstelių pirmtakai blužnyje pirmą kartą aptinkami praėjus 1, 4, 24 ir 48 val. po transplantacijos (Daldrup-Link ir kt., 2005). Manome, jog gautų rezultatų skirtumai gali būti susiję su skirtingų hemopoetinių ląstelių populiacijų panaudojimu. Taip pat nustatėme, kad transplantuotų donorinių ląstelių kiekiai sveikų ir paveiktų pelių blužnyse skiriasi (4.4.5 pav). Praėjus 4 val. po lin⁻ HKL transplantacijos, paveiktos pelės (kuriai sukelta pėdos edema) blužnyje aptinkami donorinių ląstelių pėdsakai ($< 1:100\ 000$), tuo tarpu sveikos pelės blužnyje donorinės kilmės ląstelių kiekis buvo daugiau nei 3 kartus didesnis – $1:30\ 000$. Po 8 val donorinės kilmės ląstelių sveikos pelės blužnyje aptinkama santykiu $1:10\ 000$, ir toks kiekis išlieka iki 72 val. Esant uždegimui toks

donorinės kilmės ląstelių kiekis (1:10 000) blužnyje aptinkamas tik praėjus 12 val. po lin⁻ HKL transplantacijos. Praėjus 48 val. jų randama net 3 kartus mažiau (1:30 000), o po 72 val. aptinkami tik pėdsakai (< 1:100 000). Manome, kad transplantuotų lin⁻ HKL kiekių skirtumus blužnyje skirtingais laiko intervalais veikia uždegimas pėdoje. Remiantis literatūra, streso metu HKL iš kaulų čiulpų gali migruoti į blužnies ektopines nišas (Jaiswal ir Weissman, 2009). Gauti tyrimų duomenys apie transplantuotų lin⁻ HKL kiekių pokyčius blužnyje, esant pėdos uždegimui, leidžia manyti, kad vėlesnis šių ląstelių migravimas į blužnį yra susijęs su laisvų hemopoetinių ektopinių nišų blužnyje nebuvimu. Po transplantacijos praėjus 12 val., atsiradusios laisvos nišos paskatino antrinę ląstelių migraciją į blužnį, o dar po 12 val. donorinės kilmės ląstelių kiekis blužnyje pradėjo mažėti. Toks sumažėjimas gali būti susijęs su nišose esančių lin⁻ HKL sunykimu arba išėjimu į cirkuliaciją.

4.4.2. HKL migracija į inkstus

Tirdami inkstų audinio mėginius nustatėme, kad transplantuotos lin⁻ HKL po 1 val. aptinkamos patelių recipientų inkstuose, kur jų pėdsakai išlieka iki 72 val. (4.4.6 pav).

Remiantis literatūros duomenimis, taikant inkstų pažeidimo modelį nustatyta, kad įvestos HKL inkstuose aptinkamos po 24 val. (Stroo ir kt., 2009). Mes po 1 val. inkstuose donorinės kilmės ląstelių aptikome gana gausiai (1:3000), tačiau jau po 4 val. inkstuose jų liko tik pėdsakai (< 1:100 000), kuriuos dar buvo galima aptikti ir praėjus 72 val. Toks didelis donorinės kilmės ląstelių kiekis inkstuose po 1 val. ir greitas jų pašalinimas iš inkstų rodo, kad po 1 val. inkstuose buvo aptinkamos kraujotakoje esančios donorinės kilmės ląstelės. Pastebėta, kad praėjus 3 val. po HKL įvedimo, kamieninių ląstelių periferiniame kraujyje jau nebeaptinkama (Colvin ir kt., 2007). Donorinės kilmės lin⁻ HKL kiekių skirtumų sveikų ir paveiktų pelių inkstuose nenustatėme.

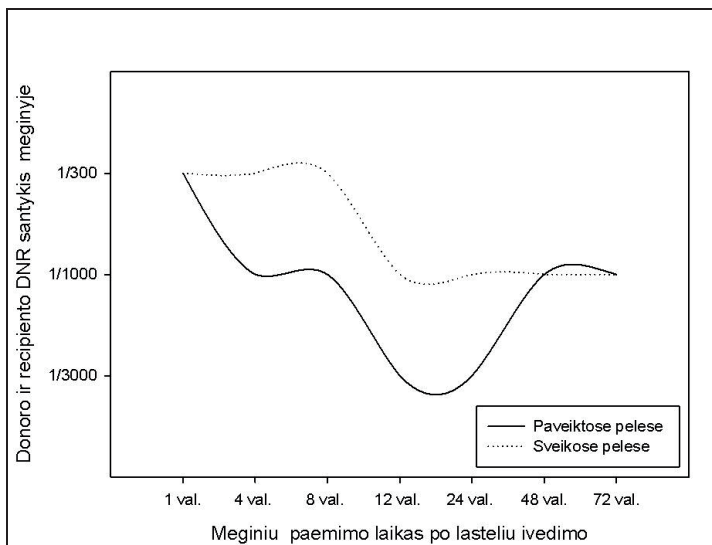


4.4.6 pav. Transplantuotos lin⁻ HKL populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos į inkstus įvertinimas BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

4.4.3. HKL migracija į kaulų čiulpus

Mūsų tirtuose kaulų čiulpų mėginiuose, praėjus 1 val. po ląstelių įvedimo, nustatytas didelis transplantuotų lin⁻ HKL kiekis pelių recipientų kaulų čiulpuose (1:300), kur jos išlieka iki 72 val. (4.4.7 pav). Kitų autorių duomenys, gauti tiriant lin⁻Sca-1⁺ hemopoetinių kamieninių ląstelių migraciją singeninėse C57BL/6J linijos pelėse, rodo, kad donorinės ląstelės kaulų čiulpuose aptinkamos po 1, 3 ir 6 val. (Colvin ir kt., 2007). Remiantis mūsų gautais duomenimis, donorinės kilmės ląstelių kiekiai sveikų ir paveiktų (sukeltas uždegimas pėdoje) pelių kaulų čiulpuose tam tikrais laiko intervalais skiriasi (4.4.7 pav). Praėjus 1 val. po ląstelių įvedimo, donorinės kilmės ląstelių kiekiai tiek sveikų, tiek paveiktų pelių kaulų čiulpuose yra vienodi, tačiau po 4 val. paveiktose pelėse stebimas donorinės kilmės ląstelių sumažėjimas (iki 1:1000), tuo tarpu sveikose pelėse jis išlieka toks pat ir praėjus 12 val. Po 12 val. donorinės kilmės ląstelių kiekio sumažėjimas nustatytas tiek paveiktose, tiek sveikose pelėse (1:3000 ir 1:1000 atitinkamai). Sveikose pelėse toks donorinės kilmės ląstelių kiekis išlieka iki 72 val. Paveiktose pelėse po 48 val.

stebimas donorinės kilmės ląstelių kiekio padidėjimas (1:1000), jis išlieka iki 72 val. Manome, kad donorinės kilmės lin⁻ HKL kiekio mažėjimas kaulų čiulpuose susijęs su nuolatiniu jų išėjimu į cirkuliaciją, o kiekio svyravimai – su HKL cirkuliacija. Literatūroje yra duomenų rodančių, kad iš kaulų čiulpų į kraujotaką patekusios HKL gali migruoti į įvairius audinius (blužnį, kepenis, inkstus, plaučius ir pan.). Nesant atitinkamų signalų, HKL iš audinių pereina į limfą, o iš jos grįžta atgal į kraujotaką, toliau į kaulų čiulpus arba kartoja savo kelionę po organizmą (Massberg ir kt., 2007).



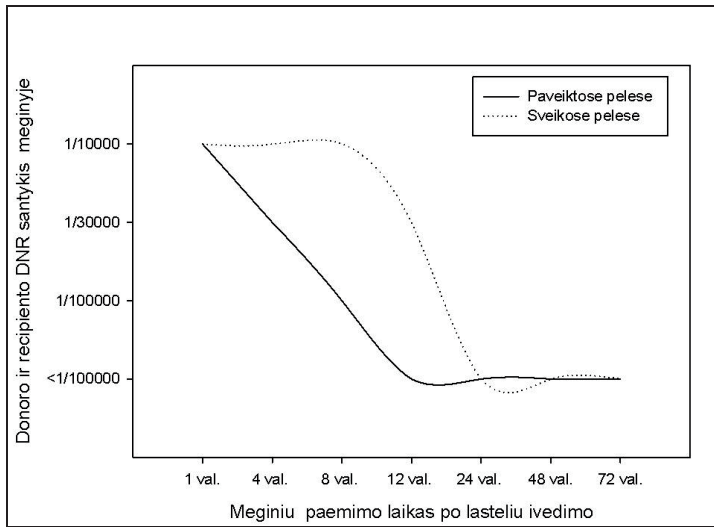
4.4.7 pav. Transplantuotos lin⁻ HKL populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos į kaulų čiulpus įvertinimas BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

Savo tyrimuose pastebėjome, kad transplantuotų lin⁻ HKL ląstelių kiekio sumažėjimas paveiktų pelių kaulų čiulpuose po 12 val. ir padidėjimas po 48 val. (4.4.7 pav.) atitinka šių donorinės kilmės ląstelių kiekio blužnyje padidėjimą po 12 val. ir sumažėjimą po 48 val. (4.4.5 pav.) Literatūroje pateikiami duomenys teigia, kad dėl citotoksinių veiksnių ar citokinų poveikio HKL kiekiai pelių periferiniame kraujyje ir blužnyje padidėja. Prieš vykstant *en masse* migracijai iš kaulų čiulpų į blužnį ir/ar kepenis, kamieninių ląstelių

kiekiai padidėja ir pačiuose kaulų čiulpuose. Toks HKL ir jų pirmtakų kiekio padidėjimas bei mobilizacija vyksta infekcijų ar kitų organizmui stresinių situacijų, pvz., uždegimo, metu, kai būtina greitai generuoti didelius efektorinių ląstelių kiekius (Jaiswal ir Weissman, 2009). Mūsų gauti duomenys rodo, kad transplantuotos lin⁺ HKL kontaktinio hiperjautrumo modelyje migruoja į kaulų čiulpus. Praėjus 12 val. po transplantacijos, prasideda uždegimo veikiama antrinė donorinės kilmės ląstelių migracija į blužnies ektoepines HKL nišas. Po 48 val. ląstelės palieka šias nišas. Šiuo metu stebimas donorinės kilmės ląstelių kiekio padidėjimas kaulų čiulpuose leidžia manyti, kad vyksta iš blužnies išėjusių ląstelių „homingas“ į kaulų čiulpus. Manome, HKL blužnies ektoepines hemopoetines nišas palieka silpstant uždegimui, o išėjusios į cirkuliaciją šios ląstelės migruoja normaliomis fiziologinėmis sąlygomis įprastu maršrutu, t.y. į kaulų čiulpus.

4.4.4. HKL migracija į plaučius

Tirdami plaučių mėginius nustatėme, kad transplantuotos lin⁺ HKL po 1 val. aptinkamos patelių recipienčių plaučiuose, kur jų pėdsakai išlieka iki 72 val. (4.4.8 pav.). Praėjus 1 val. donorinės kilmės ląstelės plaučiuose aptinkamos gana gausiai (1:10 000), tačiau jau po 12 val. uždegimo paveiktose ir po 24 val. sveikose pelėse donorinės kilmės ląstelių plaučiuose buvo aptinkami tik pėdsakai (< 1:100 000), kurie išliko ir po 72 val. Po 1 val. donorinės kilmės ląstelių kiekiai buvo vienodi, tačiau jau po 4 val. uždegimo paveiktose pelėse buvo stebimas donorinės kilmės ląstelių sumažėjimas (iki 1:30 000), tuo tarpu sveikose pelėse jis išliko toks pat iki 12 val. Uždegimo paveiktose pelėse donorinės kilmės ląstelių kiekio sumažėjimas buvo nustatytas ir po 8 bei 12 val. (4.4.4 lentelė). Po 24 val. paveiktų ir sveikų pelių plaučiuose donorinės kilmės ląstelių aptikome tik pėdsakus (< 1:100 000).

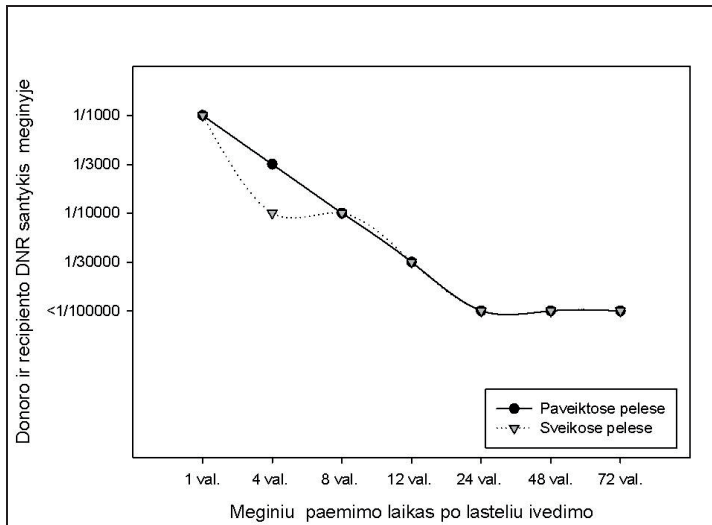


4.4.8 pav. Transplantuotos lin⁺ HKL populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos į plaučius įvertinimas BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

Remiantis literatūros duomenimis, į kraujotaką patekusios HKL gali migruoti į įvairius audinius (kepenis, inkstus, plaučius ar kitus) ir, jei tuose audiniuose neužsilaiko, gali grįžti atgal į kraujotaką (Massberg ir kt., 2007). Atlikę tyrimus mes nustatėme, kad transplantuotos lin⁺ HKL žymesniais kiekiais plaučiuose aptinkamos praėjus 1 val. po transplantacijos, kur jos išlieka iki 12 val. Atliekant alogenines transplantacijas pastebėta, kad HKL migruoja į plaučius (Loebinger ir Janes, 2007). Mes nustatėme, kad praėjus 1 val. po transplantacijos paveiktų ir sveikų pelių plaučiuose lin⁺ HKL kiekiai yra vienodi, tačiau po 4 val. pelėse, kurioms sukeltas uždegimas, šių ląstelių aptikome 3 kartus mažiau, o po 8 val. – net 10 kartų mažiau. Tai rodo, kad uždegimas pėdoje veikia greitesnį migravusių lin⁺ HKL išėjimą iš plaučių. Praėjus 24 val. po šių ląstelių transplantacijos tiek paveiktų, tiek sveikų pelių plaučiuose donorinių ląstelių buvo aptinkami tik pėdsakai. Ilgesnis HKL užlaikymas plaučiuose nebuvo nustatytas, tai rodo, kad uždegimo metu plaučiai yra tarpinis migracijos organas.

4.4.5. HKL migracija į kepenis

Mūsų tyrimai parodė, kad transplantuotos hemopoetinės lin⁻ HKL po 1 val. aptinkamos patelių recipienčių kepenyse, kur jų pėdsakai išlieka iki 72 val. (4.4.9 pav.).



4.4.9 pav. Transplantuotos lin⁻ HKL populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos į kepenis įvertinimas BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

Tai iš dalies patvirtina anksčiau mūsų gautus rezultatus tiriant žymėtų lin⁻ HKL migraciją. Atlikti tyrimai parodė, kad žymesni transplantuotų lin⁻ HKL kiekiai kepenyse aptinkami praėjus nuo 1 iki 12 val. po transplantacijos. Po 24 val. donorinės kilmės ląstelių kepenyse aptinkami tik pėdsakai. Remiantis literatūros duomenimis, tiriant donorinės kilmės ląstelių kiekį kepenyse, praėjus 13-867 dienoms po alogeninės HKL transplantacijos, aptikta nuo 2 iki 7 % donorinės kilmės hepatocitų (Korbling ir kt., 2002). Tačiau transplantuotų ląstelių migraciją į kepenis galėjo paskatinti prieš alogeninę transplantaciją atliekama chemo- ar radioterapija. Remiantis kitų mokslinių tyrimų duomenimis, įvesti žymėti hemopoetinių ląstelių pirmtakai kepenyse aptinkami praėjus 1, 4, 24 ir 48 val. po transplantacijos (Daldrup-Link ir kt., 2005). Manome, kad hemopoetinių ląstelių pirmtakų aptikimą kepenyse po 24

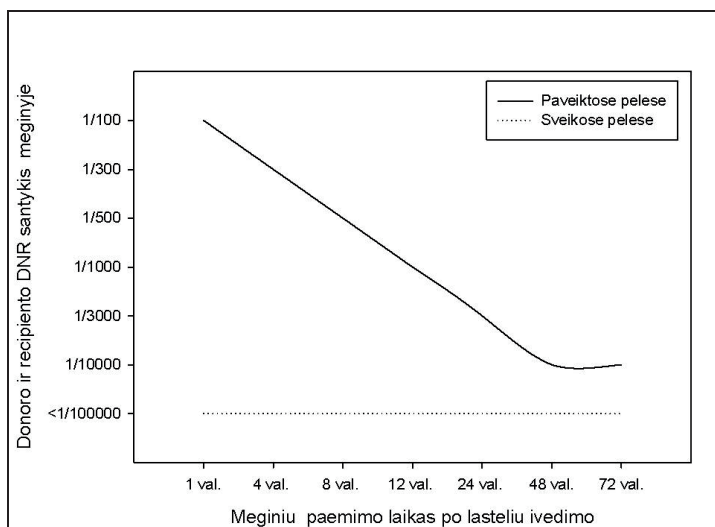
ir 48 val. nulėmė didelė transplantuotų ląstelių dozė. Ji, lyginant su mūsų pasirinkta doze, buvo net 30 kartų didesnė ir siekė 3×10^7 ląst/pelei. Tokia transplantuotų ląstelių dozė galėjo lemti šių ląstelių susikaupimą kepenyse.

Mes pastebėjome, kad uždegimo paveiktų ir sveikų pelių kepenyse transplantuotų lin⁻ HKL kiekių skirtumai yra aptinkami tik praėjus 4 val. po transplantacijos (4.4.9 pav.). Paveiktų pelių kepenyse šių ląstelių kiekis buvo daugiau nei 3 kartus didesnis. Visais kitais tirtais laiko intervalais donorinės kilmės ląstelių kiekio skirtumų nenustatėme. Tai rodo, kad uždegimas neturėjo poveikio transplantuotų lin⁻ HKL išėjimo iš kepenų kinetikai. O tai, kad praėjus 24 val. po transplantacijos šių ląstelių kepenyse aptinkami tik pėdsakai rodo, kad jose nevyksta ilgesnis HKL užlaikymas ir patvirtina prielaidą, kad uždegimo metos kepenys yra tarpinis migracijos organas.

4.4.6. HKL migracija į pažeistą pėda

Tirdami pėdos edemos mėginius nustratėme, kad transplantuotos lin⁻ HKL, praėjus 1 val. po jų įvedimo, yra aptinkamos pelių recipientų uždegimo paveiktoje pėdoje, kur išlieka iki 72 val. (4.4.10 pav.). Sveikose pėdose visais tirtais laiko intervalais, tiek paveiktos pelės, tiek sveikos, donorinės kilmės ląstelių buvo aptinkami tik pėdsakai ($< 1:100\ 000$). Praėjus 1 val. po lin⁻ HKL transplantacijos, donorinės kilmės ląstelės buvo gausiai aptinkamos pėdos edemos mėginiuose (1:100). Lyginant su nepaveikta/sveika pėda šių ląstelių kiekis buvo daugiau nei 1000 kartų didesnis. Tai patvirtina, kad transplantuotos lin⁻ HKL selektyviai migruoja į uždegimo židinį pėdoje. Kiti autoriai nustatė selektyvią HKL migraciją į pažeistą inkstą (Stroo ir kt., 2009), kepenis (Dalakas ir kt., 2005), blužnį ir kaulų čiulpus (Kollet ir kt., 2001; Tavor ir kt., 2004). Analizuodami savo gautus duomenis, pastebėjome, kad praėjus nuo 1 iki 48 val. po lin⁻ HKL transplantacijos, šių ląstelių kiekis pažeistoje pėdoje palaipsniui mažėjo, o nuo 48 val. nebekito. Nors donorinės kilmės ląstelių kiekis, praėjus 48 val. po transplantacijos, ir sumažėjo 100 kartų (lyginant su nustatytu praėjus 1 val), tačiau vistiek išliko daugiau nei 10 kartų didesnis, nei sveikoje pėdoje. Mūsų gauti rezultatai, tiriant priešuždegiminį lin⁻ HKL

populiacijos poveikį, parodė, kad šios ląstelės efektyviai slopina pėdos edemą. Manome, kad palaipsnių šių ląstelių kiekio mažėjimą pažeidimo vietoje veikė uždegimo slopinimas. Praėjus 72 val. po lin⁻ HKL transplantacijos, šių ląstelių kiekiai pažeistoje pėdoje išliko daugiau nei 10 kartų didesni, lyginant su sveikoje pėdoje nustatytais.



4.4.10 pav. Transplantuotos lin⁻ HKL populiacijos kiekybinis migracijos kinetikos į užpakalinės galūnės pėdą įvertinimas BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje.

Remiantis literatūros duomenimis, donorinės kilmės ląstelės po alogeninės HKL transplantacijos yra aptinkamos beveik visuose recipiento audiniuose (Alison ir kt., 2000; Korbling ir kt., 2002; Tran ir kt., 2003; Cogle ir kt., 2004; Spyridonidis ir kt., 2004). Audinių biopsijos buvo imamos praėjus keletui mėnesių ar net metų po alogeninės transplantacijos, neretai po paciento mirties. Klinikiniai alogeninių HKL transplantacijos tyrimai leidžia nustatyti donorinių HKL dalyvavimą organų atstatyme. Kadangi dauguma pacientų prieš alogeninę HKL transplantaciją veikiama chemo ar radioterapija, kurios metu recipiento organuose pažeidžiama dalis ląstelių, išsivysto uždegimas (Rovo ir Gratwohl, 2008). Manome, kad toks transplantuotų HKL pasklidimas

ir prigijimas organizme yra chemo- ar radioterapijos pasekmė. Vertindami savo gautus rezultatus literatūroje skelbiamų duomenų šia tematika kontekste manome, kad pažeistas nehemopoetinis pėdos audinys yra galutinis dalies transplantuotų lin⁻ HKL migracijos taikiny.

4.4.7. Rezultatų apibendrinimas

Darbo metu iš bendros BALB/c pelių kaulų čiulpų ląstelių populiacijos centrifugavimo tankio gradientu (1.087g/ml) ir magnetinio ląstelių frakcionavimo, panaudojant antikūnus prieš pelių hemopoetinių ląstelių pirmtakų antigenus, metodais išskyrėme hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacijas. Atskirta pelių kaulų čiulpų lin⁻ HKL populiacija pasižymėjo aukščiausia pelių kaulų čiulpų HKL būdingų žymenų raiška bei neturėjo hemopoetinių linijinių žymenų. Ši populiacija buvo lin⁻CD117⁺Sca-1⁺ fenotipo. Daugumą lin⁻ HKL populiacijos sudarė trumpalaikės HKL, likusiąją dalį - ilgalaikės HKL ir ankstyvieji hemopoetiniai pirmtakai.

Kadangi susirgimai, kuriems numatoma taikyti ląstelių terapiją, paprastai yra lydimi uždegimo – kamieninių ląstelių priešuždegiminio poveikio tyrimai yra svarbūs ir tikslingi. Mes ištyrėme atskirtų ir identifikuotų ląstelių populiacijų priešuždegiminį poveikį BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*. Rezultatai, gauti tiriant bendrą kaulų čiulpų ląstelių populiaciją, parodė, kad ji priešuždegiminiu poveikiu nepasižymi. O visos tirtos lin⁻ HKL populiacijos (5×10^6 ; 10^6 ; 10^5 ląstelių/pelei) efektyviai slopino edemą. Efektyviausiai edemą inhibavo 10^6 ląstelių/pelei dozė, kuri 1,28 karto geriau nei prednizolonas slopino edemą. Tokia ląstelių koncentracija buvo naudota visuose vėlesniuose tyrimuose. Ištyrę išskirtų lin⁻ HKL, lin⁺, lin⁻ HKL kartu su lin⁺(1:10) ląstelių populiacijų priešuždegiminį poveikį nustatėme, kad efektyviausiai (net iki 66%) edemą inhibavo lin⁻ HKL populiacija. Gali būti, kad cirkuliuojančios HKL, esant pažeidimui, pasižymi dvejopu poveikiu: moduliuoja imuninį atsaką ir tarnauja šaltiniu vietinei efektorinių imuninių ląstelių gamybai pažeidimo vietoje. Tokiu būdu slopinamas uždegimas ir skatinama audinio regeneracija. Mūsų tyrimų duomenys, gauti tiriant skirtingas

kaulų čiulpų hemopoetines populiacijas, parodė, kad šių populiacijų priešuždegiminio poveikio efektyvumas yra tiesiogiai susijęs su santykinu populiacijoje esančių HKL kiekiu. O citokinų koncentracijos pokyčiai pelių kraujo serume, įvedus skirtingas hemopoetinių ląstelių populiacijas, yra proporcingi pėdos edemos inhibicijai. Mažiausi citokinų kiekių pokyčiai, kaip ir poveikis pėdos edemai, nustatyti įvedus lin^+ populiacijos ląsteles, o žymiausi – lin^- HKL. Šiuo atveju TNF- α koncentracija sumažėjo 3.5 karto, o IL-10 padidėjo 3.6 kartais, lyginant su kontrole.

Taip pat ištyrėme transplantuotų lin^- HKL migraciją BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje bei kiekybiškai įvertinome jų migraciją į uždegimo židinių pėdoje ir nepažeistus organus, praėjus 1, 4, 8, 12, 24, 48 ir 72 val. po fluorescenciškai žymėtų lin^- HKL (10^6) įvedimo. Atlikome histologinę analizę, kiekybiniam vertinimui taikėme realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos metodą. Pastebėjome, kad transplantuotos lin^- HKL, praėjus 1 val. po jų įvedimo, yra aptinkamos uždegimo vietoje (pažeistoje pėdoje). Sveikose pėdose visais tirtais laiko intervalais jų aptikome tik pėdsakus. Praėjus 1 val. po lin^- HKL transplantacijos, šių ląstelių kiekis pėdos edemos mėginiuose buvo daugiau nei 1000 kartų didesnis negu sveikoje pėdoje. Tai patvirtina selektyvią transplantuotų lin^- HKL migraciją į uždegimo židinių. Be to, praėjus 1 val. po transplantacijos, lin^- HKL žymesniais kiekiais buvo aptinkamos inkstuose, plaučiuose, kepenyse bei kaulų čiulpuose, o kiek vėliau ir blužnyje. Šios ląstelės inkstuose išliko iki 4 val., plaučiuose ir kepenyse iki 12 val., o blužnyje ir kaulų čiulpuose iki 72 val. Esant uždegimui, transplantuotų lin^- HKL ląstelių kiekio sumažėjimas pelių kaulų čiulpuose po 12 val. ir padidėjimas po 48 val. atitinka šių ląstelių kiekio blužnyje padidėjimą po 12 val. ir sumažėjimą po 48 val. Tai rodo, kad kontaktinio hiperjautrumo modelyje vyksta transplantuotų lin^- HKL migracija į kaulų čiulpus, o praėjus 12 val. po transplantacijos, prasideda uždegimo veikiama antrinė šių ląstelių migracija į blužnies ektopines HKL nišas. Po 48 val. ląstelės šias nišas palieka, o šiuo metu stebimas donorinės kilmės ląstelių kiekio padidėjimas kaulų

čiulpuose leidžia manyti, kad vyksta iš blužnies išėjusių ląstelių „homingas“ į kaulų čiulpus.

Kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelyje transplantuotų lin⁻ HKL plaučiuose, kepenyse, kaulų čiulpuose ir blužnyje įvairiais laiko intervalais buvo aptinkama iki 30 kartų mažiau. Uždegimas sumažino HKL migraciją į šiuos organus, tai gali būti susiję su chemoatraktantų poveikiu pažeidimo vietoje (pėdos edemoje). Ląstelių migracija į sveiką pėdą nebuvo stebima.

5. IŠVADOS

1. Išgrynintos ir identifikuotos BALB/c pelių kaulų čiulpų hemopoetinių kamieninių ląstelių populiacijos. Nustatyta, kad išskirta lin^- populiacija pasižymi HKL būdingu, $lin^-CD117^+Sca-1^+$, fenotipu.
2. Išskirtos kaulų čiulpų hemopoetinių ląstelių populiacijos pasižymi priešūždegiminiu poveikiu BALB/c pelių kontaktinio hiperjautrumo modelyje *in vivo*. Veiksmingiausiai (iki 66%) edemą slopina HKL populiacija.
3. Transplantuotų HKL priešūždegiminis poveikis pasireiškia veikiant pro- ir priešūždegiminio citokinų kiekius kraujyje. IL-10 koncentracija padidėja, o TNF- α sumažėja daugiau nei 3 kartus.
4. Hemopoetinės kamieninės ląstelės selektyviai migruoja į uždegimo židinį. Praėjus 1 val. po transplancijos jų kiekis pėdos edemoje yra iki 1000 kartų didesnis nei sveikoje pėdoje.
5. Transplantuotų HKL kiekių pelių kaulų čiulpuose ir blužnyje pokyčių laike dėsningumai rodo uždegimo veikiamą antrinę hemopoetinių kamieninių ląstelių migraciją.
6. Kiekybiniais kamieninių ląstelių migracijos tyrimais nustatyta, kad uždegimas lemia iki 30 kartų silpnesnę HKL migraciją į plaučius, kepenis, kaulų čiulpus ir blužnį.

6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Biziulevičienė G, **Kašėta V**, Ramanauskaitė G, Vaitkuvienė A. Investigation of unmaturred hematopoietic cell migration in a mouse model. *Central European Journal of Biology*, 2010, 5(5):585-589.

Ramanauskaitė G, **Kašėta V**, Vaitkuvienė A, Biziulevičienė G. Skin regeneration with bone marrow-derived cell populations. *International Immunopharmacology*, 2010, 10(12):1548-1551.

Vaitkuvienė A, **Kašėta V**, Ramanauskaitė G, Biziulevičienė G. Cytotoxicity of the pharmaceutical and cosmetic gel-forming polymers, preservatives and glycerol on primary murine cell cultures. *Acta Medica Lituanica*, 2009, 16(3-4):92-97.

Kašėta V, Biziulevičienė G, Ramanauskaitė G, Vaitkuvienė A, Biziulevičius GA. Magnetic cell sorting isolation of therapeutically effective BALB/c mouse bone marrow hematopoietic stem cell population. *Biologija*, 2008, 54(4):269–273.

7. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

1. Annual Conference of the German Society of Immunology, Leipcigas, Vokietija. „Skin regeneration with bone marrow-derived cell populations“, 2010 m. rugsėjo mėn. 22-25d.
2. Lietuvos imunologų draugijos ir Lietuvos mokslų akademijos organizuota konferencija „Kamieninės ląstelės: galimybės ir panaudojimas“, Vilnius, Lietuva. „Kamieninių ląstelių nišos ir migracija, 2009 m. spalio 1d.“
3. Lietuvos onkologų draugijos organizuota konferencija „Kamieninės ląstelės ir vėžys“, Vilnius, Lietuva. „Kamieninių ląstelių migracija“, 2009 m. gegužės mėn. 19d.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adams G. B., Chabner K. T., Alley I. R., Olson D. P., Szczepiorkowski Z. M., Poznansky M. C., Kos C. H., Pollak M. R., Brown E. M. ir Scadden D. T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 439(7076): 599-603.
2. Adolfsson J., Borge O. J., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Astrand-Grundstrom I., Sitnicka E., Sasaki Y. ir Jacobsen S. E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15(4): 659-69.
3. Akashi K., Traver D., Miyamoto T. ir Weissman I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774): 193-7.
4. Alison M. R., Brittan M., Lovell M. J. ir Wright N. A. (2006). Markers of adult tissue-based stem cells. *Handb Exp Pharmacol*(174): 185-227.
5. Alison M. R., Murphy G. ir Leedham S. (2008). Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res* 331(1): 109-24.
6. Alison M. R., Poulson R., Jeffery R., Dhillon A. P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J. ir Wright N. A. (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406(6793): 257.
7. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J. M., Fike J. R., Lee H. O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S. J. ir Alvarez-Buylla A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425(6961): 968-73.
8. Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G. Y. ir Suda T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118(2): 149-61.

9. Askenasy N. ir Farkas D. L. (2002). Optical imaging of PKH-labeled hematopoietic cells in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells* 20(6): 501-13.
10. Askenasy N., Zorina T., Farkas D. L. ir Shalit I. (2002). Transplanted hematopoietic cells seed in clusters in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells* 20(4): 301-10.
11. Avecilla S. T., Hattori K., Heissig B., Tejada R., Liao F., Shido K., Jin D. K., Dias S., Zhang F., Hartman T. E., Hackett N. R., Crystal R. G., Witte L., Hicklin D. J., Bohlen P., Eaton D., Lyden D., de Sauvage F. ir Rafii S. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10(1): 64-71.
12. Azuma Y. ir Ohura K. (2002). Endomorphin-2 modulates productions of TNF-alpha, IL-1beta, IL-10, and IL-12, and alters functions related to innate immune of macrophages. *Inflammation* 26(5): 223-32.
13. Bacci S., Alard P., Dai R., Nakamura T. ir Streilein J. W. (1997). High and low doses of haptens dictate whether dermal or epidermal antigen-presenting cells promote contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* 27(2): 442-8.
14. Baum C. M., Weissman I. L., Tsukamoto A. S., Buckle A. M. ir Peault B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 2804-8.
15. Bemeur C., Ste-Marie L., Desjardins P., Vachon L., Butterworth R. F., Hazell A. S. ir Montgomery J. (2005). Dehydroascorbic acid normalizes several markers of oxidative stress and inflammation in acute hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochem Int* 46(5): 399-407.
16. Bianchi D. W. ir Fisk N. M. (2007). Fetomaternal cell trafficking and the stem cell debate: gender matters. *Jama* 297(13): 1489-91.

17. Biziuleviciene G., Puidokaite G., Siaurys A. ir Mauricas M. (2007). An anti-inflammatory effect of murine fetal liver cells in BALB/c mouse contact hypersensitivity model. *Int Immunopharmacol* 7(6): 744-9.
18. Black C. A. (1999). Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J* 5(1): 7.
19. Bone R. C. (1991). The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115(6): 457-69.
20. Bonnet D. (2002). Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 197(4): 430-40.
21. Bouloc A., Cavani A. ir Katz S. I. (1998). Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 111(1): 44-9.
22. Burger J. A. ir Kipps T. J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107(5): 1761-7.
23. Challen G. A., Boles N., Lin K. K. ir Goodell M. A. (2009). Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* 75(1): 14-24.
24. Chiba S. (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 24(11): 2437-47.
25. Christensen J. L. ir Weissman I. L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14541-6.
26. Civin C. I., Trischmann T., Kadan N. S., Davis J., Noga S., Cohen K., Duffy B., Groenewegen I., Wiley J., Law P., Hardwick A., Oldham F. ir Gee A. (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14(8): 2224-33.
27. Cogle C. R., Yachnis A. T., Laywell E. D., Zander D. S., Wingard J. R., Steindler D. A. ir Scott E. W. (2004). Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363(9419): 1432-7.
28. Collas P. (2003). Nuclear reprogramming in cell-free extracts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1436): 1389-95.

29. Colvin G. A., Lambert J. F., Dooner M. S., Cerny J. ir Quesenberry P. J. (2007). Murine allogeneic in vivo stem cell homing. *J Cell Physiol* 211(2): 386-91.
30. Corre J., Mahtouk K., Attal M., Gadelorge M., Huynh A., Fleury-Cappellesso S., Danho C., Laharrague P., Klein B., Reme T. ir Bourin P. (2007). Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 21(5): 1079-88.
31. Coulombel L. (2003). Adult stem cells: seing is not being. *Med Sci (Paris)* 19(6-7): 683-94.
32. Dalakas E., Newsome P. N., Harrison D. J. ir Plevris J. N. (2005). Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *Faseb J* 19(10): 1225-31.
33. Daldrup-Link H. E., Rudelius M., Piontek G., Metz S., Brauer R., Debus G., Corot C., Schlegel J., Link T. M., Peschel C., Rummeny E. J. ir Oostendorp R. A. (2005). Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment. *Radiology* 234(1): 197-205.
34. Dantuma E., Merchant S. ir Sugaya K. (2010). Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther* 1(5): 37.
35. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones S. P. ir Roberts I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 20(3): 161-71.
36. de Haan G., Weersing E., Dontje B., van Os R., Bystrykh L. V., Vellenga E. ir Miller G. (2003). In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell* 4(2): 241-51.
37. Direkze N. C., Forbes S. J., Brittan M., Hunt T., Jeffery R., Preston S. L., Poulosom R., Hodivala-Dilke K., Alison M. R. ir Wright N. A. (2003). Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells* 21(5): 514-20.
38. Dykstra B., Ramunas J., Kent D., McCaffrey L., Szumsky E., Kelly L., Farn K., Blaylock A., Eaves C. ir Jervis E. (2006). High-resolution video monitoring of hematopoietic stem cells cultured in single-cell arrays

- identifies new features of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21): 8185-90.
39. Dzierzak E. ir Enver T. (2008). Stem cell researchers find their niche. *Development* 135(9): 1569-73.
 40. Edling C. E. ir Hallberg B. (2007). c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11): 1995-8.
 41. Emsley H. C. ir Tyrrell P. J. (2002). Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(12): 1399-419.
 42. Engler A. J., Sen S., Sweeney H. L. ir Discher D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126(4): 677-89.
 43. Evans P. C., Lambert N., Maloney S., Furst D. E., Moore J. M. ir Nelson J. L. (1999). Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 93(6): 2033-7.
 44. Gao J., Graves S., Koch U., Liu S., Jankovic V., Buonamici S., El Andaloussi A., Nimer S. D., Kee B. L., Taichman R., Radtke F. ir Aifantis I. (2009). Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell* 4(6): 548-58.
 45. Gazit R., Weissman I. L. ir Rossi D. J. (2008). Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system. *Semin Hematol* 45(4): 218-24.
 46. Gennero L., Mortimer P., Sperber K., Carloni G. ir Ponzetto A. (2006). Stem cells: an alternative to organ transplantation in chronic, degenerative and infectious diseases? *New Microbiol* 29(3): 151-67.
 47. Girolomoni G., Sebastiani S., Albanesi C. ir Cavani A. (2001). T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol* 13(6): 733-7.
 48. Gomariz R. P., Arranz A., Juarranz Y., Gutierrez-Canas I., Garcia-Gomez M., Leceta J. ir Martinez C. (2007). Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity. *Peptides* 28(9): 1825-32.

49. Gomariz R. P., Martinez C., Abad C., Leceta J. ir Delgado M. (2001). Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des* 7(2): 89-111.
50. Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S. ir Mulligan R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183(4): 1797-806.
51. Gothot A., Pyatt R., McMahon J., Rice S. ir Srouf E. F. (1997). Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0/G1 phase of the cell cycle. *Blood* 90(11): 4384-93.
52. Gu Z., Akiyama K., Ma X., Zhang H., Feng X., Yao G., Hou Y., Lu L., Gilkeson G. S., Silver R. M., Zeng X., Shi S. ir Sun L. (2010). Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus* 19(13): 1502-14.
53. Guo Y., Lubbert M. ir Engelhardt M. (2003). CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. *Stem Cells* 21(1): 15-20.
54. Hallenbeck J. M. (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 8(12): 1363-8.
55. Hegyi B., Sagi B., Kovacs J., Kiss J., Urban V. S., Meszaros G., Monostori E. ir Uher F. (2010). Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunol* 22(7): 551-9.
56. Heissig B., Hattori K., Dias S., Friedrich M., Ferris B., Hackett N. R., Crystal R. G., Besmer P., Lyden D., Moore M. A., Werb Z. ir Rafii S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109(5): 625-37.
57. Higuchi Y., Zeng H. ir Ogawa M. (2003). CD38 expression by hematopoietic stem cells of newborn and juvenile mice. *Leukemia* 17(1): 171-4.
58. Hofbauer L. C., Khosla S., Dunstan C. R., Lacey D. L., Boyle W. J. ir Riggs B. L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand

- in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15(1): 2-12.
59. Hollnagel A., Grund C., Franke W. W. ir Arnold H. H. (2002). The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol* 22(13): 4760-70.
60. Hong Y. C., Liu H. M., Chen P. S., Chen Y. J., Lyou J. Y., Hu H. Y., Yi M. F., Lin J. S. ir Tzeng C. H. (2007). Hair follicle: a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 40(9): 871-4.
61. Igarashi H., Gregory S. C., Yokota T., Sakaguchi N. ir Kincade P. W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17(2): 117-30.
62. Imanishi D., Miyazaki Y., Yamasaki R., Sawayama Y., Taguchi J., Tsushima H., Fukushima T., Yoshida S., Sasaki H., Hata T. ir Tomonaga M. (2007). Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants. *Blood* 110(7): 2231-4.
63. Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R. J. ir Cotsarelis G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 11(12): 1351-4.
64. Yamashita Y. M., Fuller M. T. ir Jones D. L. (2005). Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J Cell Sci* 118(Pt 4): 665-72.
65. Yang L., Bryder D., Adolfsson J., Nygren J., Mansson R., Sigvardsson M. ir Jacobsen S. E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3-short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105(7): 2717-23.
66. Yin T. ir Li L. (2006). The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116(5): 1195-201.
67. Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P. ir Smith A. G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416(6880): 545-8.

68. Yoshida T., Ng S. Y., Zuniga-Pflucker J. C. ir Georgopoulos K. (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 7(4): 382-91.
69. Jackson K. A., Majka S. M., Wang H., Pocius J., Hartley C. J., Majesky M. W., Entman M. L., Michael L. H., Hirschi K. K. ir Goodell M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107(11): 1395-402.
70. Jaiswal S. ir Weissman I. L. (2009). Hematopoietic stem and progenitor cells and the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci* 1174: 118-21.
71. Jenkins B. J., Roberts A. W., Najdovska M., Grail D. ir Ernst M. (2005). The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis. *Blood* 105(9): 3512-20.
72. Jones D. L. ir Wagers A. J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 11-21.
73. Jones E. ir McGonagle D. (2008). Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 47(2): 126-31.
74. Juopperi T. A., Schuler W., Yuan X., Collector M. I., Dang C. V. ir Sharkis S. J. (2007). Isolation of bone marrow-derived stem cells using density-gradient separation. *Exp Hematol* 35(2): 335-41.
75. Kahn J., Byk T., Jansson-Sjostrand L., Petit I., Shvitiel S., Nagler A., Hardan I., Deutsch V., Gazit Z., Gazit D., Karlsson S. ir Lapidot T. (2004). Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood* 103(8): 2942-9.
76. Katayama Y., Battista M., Kao W. M., Hidalgo A., Peired A. J., Thomas S. A. ir Frenette P. S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124(2): 407-21.
77. Katsura Y. ir Kawamoto H. (2001). Stepwise lineage restriction of progenitors in lympho-myelopoiesis. *Int Rev Immunol* 20(1): 1-20.

78. Kawamoto H., Ohmura K., Fujimoto S. ir Katsura Y. (1999). Emergence of T cell progenitors without B cell or myeloid differentiation potential at the earliest stage of hematopoiesis in the murine fetal liver. *J Immunol* 162(5): 2725-31.
79. Kawamoto H., Wada H. ir Katsura Y. (2010). A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol* 22(2): 65-70.
80. Kiel M. J., Yilmaz O. H., Iwashita T., Yilmaz O. H., Terhorst C. ir Morrison S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121(7): 1109-21.
81. Kiel M. J. ir Morrison S. J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8(4): 290-301.
82. Kiel M. J., Radice G. L. ir Morrison S. J. (2007). Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* 1(2): 204-17.
83. Kim M., Cooper D. D., Hayes S. F. ir Spangrude G. J. (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood* 91(11): 4106-17.
84. Kollet O., Dar A. ir Lapidot T. (2007). The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization. *Annu Rev Immunol* 25: 51-69.
85. Kollet O., Dar A., Shvitz S., Kalinkovich A., Lapid K., Sztainberg Y., Tesio M., Samstein R. M., Goichberg P., Spiegel A., Elson A. ir Lapidot T. (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12(6): 657-64.
86. Kollet O., Spiegel A., Peled A., Petit I., Byk T., Herschkoviz R., Guetta E., Barkai G., Nagler A. ir Lapidot T. (2001). Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* 97(10): 3283-91.

87. Kopp H. G., Avecilla S. T., Hooper A. T. ir Rafii S. (2005). The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 20: 349-56.
88. Korbling M. ir Estrov Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349(6): 570-82.
89. Korbling M., Katz R. L., Khanna A., Ruifrok A. C., Rondon G., Albitar M., Champlin R. E. ir Estrov Z. (2002). Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 346(10): 738-46.
90. Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S. ir Sharkis S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3): 369-77.
91. Kucia M., Reza R., Miekus K., Wanzeck J., Wojakowski W., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J. ir Ratajczak M. Z. (2005). Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23(7): 879-94.
92. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I. L. ir Grompe M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6(11): 1229-34.
93. Laird D. J., von Andrian U. H. ir Wagers A. J. (2008). Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell* 132(4): 612-30.
94. Lapidot T., Dar A. ir Kollet O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106(6): 1901-10.
95. Lee K., Kim H., Kim J. M., Kim J. R., Kim K. J., Kim Y. J., Park S. I., Jeong J. H., Moon Y. M., Lim H. S., Bae D. W., Kwon J., Ko C. Y., Kim H. S., Shin H. I. ir Jeong D. (2010). Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function. *J Cell Mol Med*.

96. Liu N., Chen R., Du H., Wang J., Zhang Y. ir Wen J. (2009). Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. *Cell Mol Immunol* 6(3): 207-13.
97. Loebinger M. R. ir Janes S. M. (2007). Stem cells for lung disease. *Chest* 132(1): 279-85.
98. Malgieri A., Kantzari E., Patrizi M. P. ir Gambardella S. (2010). Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* 3(4): 248-69.
99. Manieri N. A. ir Stappenbeck T. S. (2010). Mesenchymal stem cell therapy of intestinal disease: are their effects systemic or localized? *Curr Opin Gastroenterol*.
100. Martinez-Agosto J. A., Mikkola H. K., Hartenstein V. ir Banerjee U. (2007). The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* 21(23): 3044-60.
101. Massberg S., Schaerli P., Knezevic-Maramica I., Kollnberger M., Tubo N., Moseman E. A., Huff I. V., Junt T., Wagers A. J., Mazo I. B. ir von Andrian U. H. (2007). Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 131(5): 994-1008.
102. Medvinsky A. ir Smith A. (2003). Stem cells: Fusion brings down barriers. *Nature* 422(6934): 823-5.
103. Meignin V., Soulier J., Brau F., Lemann M., Gluckman E., Janin A. ir Socie G. (2004). Little evidence of donor-derived epithelial cells in early digestive acute graft-versus-host disease. *Blood* 103(1): 360-2.
104. Mikkola H. K. ir Orkin S. H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133(19): 3733-44.
105. Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y., Nagai Y., Niibe K., Hiratsu E., Suzuki S., Miyauchi-Hara C., Nagoshi N., Sunabori T., Shimmura S., Miyawaki A., Nakagawa T., Suda T., Okano H. ir Matsuzaki Y. (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of

- multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206(11): 2483-96.
106. Morrison S. J. ir Spradling A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132(4): 598-611.
107. Morrison S. J. ir Weissman I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1(8): 661-73.
108. Mueller R. J., Stussi G., Puga Yung G., Nikolic M., Soldini D., Halter J., Meyer-Monard S., Gratwohl A., Passweg J. R., Odermatt B., Schanz U., Biedermann B. C. ir Seebach J. D. (2011). Persistence of recipient-type endothelium after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 96(1): 119-27.
109. Muguruma Y., Yahata T., Miyatake H., Sato T., Uno T., Itoh J., Kato S., Ito M., Hotta T. ir Ando K. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 107(5): 1878-87.
110. Musina R. A., Egorov E. E. ir Beliavskii A. V. (2004). Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use. *Mol Biol (Mosk)* 38(4): 563-77.
111. Nagai Y., Garrett K. P., Ohta S., Bahrn U., Kouro T., Akira S., Takatsu K. ir Kincade P. W. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24(6): 801-12.
112. Newcomb J. D., Ajmo C. T., Jr., Sanberg C. D., Sanberg P. R., Pennypacker K. R. ir Willing A. E. (2006). Timing of cord blood treatment after experimental stroke determines therapeutic efficacy. *Cell Transplant* 15(3): 213-23.
113. Niemann C. (2006). Controlling the stem cell niche: right time, right place, right strength. *Bioessays* 28(1): 1-5.

114. Nilsson S. K., Johnston H. M., Whitty G. A., Williams B., Webb R. J., Denhardt D. T., Bertoncello I., Bendall L. J., Simmons P. J. ir Haylock D. N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106(4): 1232-9.
115. Nusse R., Fuerer C., Ching W., Harnish K., Logan C., Zeng A., ten Berge D. ir Kalani Y. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 59-66.
116. Okada S., Nakauchi H., Nagayoshi K., Nishikawa S., Miura Y. ir Suda T. (1992). In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 80(12): 3044-50.
117. Orkin S. H. ir Zon L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132(4): 631-44.
118. Orkin S. H. ir Zon L. I. (2008). SnapShot: hematopoiesis. *Cell* 132(4): 712.
119. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A. ir Anversa P. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10344-9.
120. Osawa M., Hanada K., Hamada H. ir Nakauchi H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273(5272): 242-5.
121. Passegue E., Wagers A. J., Giuriato S., Anderson W. C. ir Weissman I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* 202(11): 1599-611.
122. Pawitan J. A. (2009). Prospect of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy* 2009(1729-CTTT-Prospect-of-Adipose-Tissue-Derived-Mesenchymal-Stem-Cells-in-Regenerat.pdf): 7.

123. Peault B., Oberlin E. ir Tavian M. (2002). Emergence of hematopoietic stem cells in the human embryo. *C R Biol* 325(10): 1021-6.
124. Pelayo R., Welner R. S., Nagai Y. ir Kincade P. W. (2006). Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* 18(1): 2-11.
125. Peled A., Kollet O., Ponomaryov T., Petit I., Franitza S., Grabovsky V., Slav M. M., Nagler A., Lider O., Alon R., Zipori D. ir Lapidot T. (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95(11): 3289-96.
126. Plitz T., Saint-Mezard P., Satho M., Herren S., Waltzinger C., de Carvalho Bittencourt M., Kosco-Vilbois M. H. ir Chvatchko Y. (2003). IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity. *J Immunol* 171(3): 1164-71.
127. Reed W., Lee T. H., Norris P. J., Utter G. H. ir Busch M. P. (2007). Transfusion-associated microchimerism: a new complication of blood transfusions in severely injured patients. *Semin Hematol* 44(1): 24-31.
128. Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L. ir Verfaillie C. M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98(9): 2615-25.
129. Ribeiro M. A., Jr. (2009). Liver regeneration, stem cells and beyond. *World J Gastrointest Surg* 1(1): 6-7.
130. Rizzino A. (2007). A challenge for regenerative medicine: proper genetic programming, not cellular mimicry. *Dev Dyn* 236(12): 3199-207.
131. Rovo A. ir Gratwohl A. (2008). Plasticity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Chem* 389(7): 825-36.
132. Schier A. F. (2003). Chemokine signaling: rules of attraction. *Curr Biol* 13(5): R192-4.

133. Schwarting S., Litwak S., Hao W., Bahr M., Weise J. ir Neumann H. (2008). Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke* 39(10): 2867-75.
134. Sehmi R., Dorman S., Baatjes A., Watson R., Foley R., Ying S., Robinson D. S., Kay A. B., O'Byrne P. M. ir Denburg J. A. (2003). Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology* 109(4): 536-46.
135. Sherwood R. I., Christensen J. L., Conboy I. M., Conboy M. J., Rando T. A., Weissman I. L. ir Wagers A. J. (2004). Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 119(4): 543-54.
136. Skern R., Frost P. ir Nilsen F. (2005). Relative transcript quantification by quantitative PCR: roughly right or precisely wrong? *BMC Mol Biol* 6(1): 10.
137. Smart N. ir Riley P. R. (2008). The stem cell movement. *Circ Res* 102(10): 1155-68.
138. Smith C. (2003). Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 10(1): 9-16.
139. Song X., Zhu C. H., Doan C. ir Xie T. (2002). Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science* 296(5574): 1855-7.
140. Spangrude G. J. ir Scollay R. (1990). A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 18(8): 920-6.
141. Spyridonidis A., Mertelsmann R. ir Finke J. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation: more than just hematopoietic? *J Cancer Res Clin Oncol* 130(3): 127-34.
142. Staal F. J. ir Clevers H. C. (2005). WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5(1): 21-30.

143. Storms R. W., Trujillo A. P., Springer J. B., Shah L., Colvin O. M., Ludeman S. M. ir Smith C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9118-23.
144. Stroo I., Stokman G., Teske G. J., Florquin S. ir Leemans J. C. (2009). Haematopoietic stem cell migration to the ischemic damaged kidney is not altered by manipulating the SDF-1/CXCR4-axis. *Nephrol Dial Transplant* 24(7): 2082-8.
145. Sun L., Akiyama K., Zhang H., Yamaza T., Hou Y., Zhao S., Xu T., Le A. ir Shi S. (2009). Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 27(6): 1421-32.
146. Sun L., Wang D., Liang J., Zhang H., Feng X., Wang H., Hua B., Liu B., Ye S., Hu X., Xu W., Zeng X., Hou Y., Gilkeson G. S., Silver R. M., Lu L. ir Shi S. (2010). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62(8): 2467-75.
147. Suzuki A., Zheng Y. W., Fukao K., Nakauchi H. ir Taniguchi H. (2001). Clonal expansion of hepatic stem/progenitor cells following flow cytometric cell sorting. *Cell Transplant* 10(4-5): 393-6.
148. Taichman R. S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105(7): 2631-9.
149. Taichman R. S. ir Emerson S. G. (1998). The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16(1): 7-15.
150. Tajima A., Iwase T., Shinji H., Seki K. ir Mizunoe Y. (2009). Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun* 77(1): 327-34.
151. Takano H., Ema H., Sudo K. ir Nakauchi H. (2004). Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells:

- inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med* 199(3): 295-302.
152. Tavor S., Petit I., Porozov S., Avigdor A., Dar A., Leider-Trejo L., Shemtov N., Deutsch V., Naparstek E., Nagler A. ir Lapidot T. (2004). CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res* 64(8): 2817-24.
153. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D. M., Nakano Y., Meyer E. M., Morel L., Petersen B. E. ir Scott E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416(6880): 542-5.
154. Tran S. D., Pillemer S. R., Dutra A., Barrett A. J., Brownstein M. J., Key S., Pak E., Leakan R. A., Kingman A., Yamada K. M., Baum B. J. ir Mezey E. (2003). Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet* 361(9363): 1084-8.
155. Vane J. ir Botting R. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Faseb J* 1(2): 89-96.
156. Vertes A. (2010). 2010 world stem cell summit - part 2. *IDrugs* 13(12): 822-4.
157. Visnjic D., Kalajzic Z., Rowe D. W., Katavic V., Lorenzo J. ir Aguila H. L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103(9): 3258-64.
158. Vosshenrich C. A., Garcia-Ojeda M. E., Samson-Villeger S. I., Pasqualetto V., Enault L., Richard-Le Goff O., Corcuff E., Guy-Grand D., Rocha B., Cumano A., Rogge L., Ezine S. ir Di Santo J. P. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 7(11): 1217-24.
159. Wada H., Masuda K., Satoh R., Kakugawa K., Ikawa T., Katsura Y. ir Kawamoto H. (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452(7188): 768-72.

160. Wagers A. J., Allsopp R. C. ir Weissman I. L. (2002). Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin(-/lo)Thy1.1(lo)Sca-1(+)c-kit(+) hematopoietic stem cells following mobilization by cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 30(2): 176-85.
161. Walker M., Patel K. ir Stappenbeck T. (2009). The stem cell niche. *J Pathol* 217(2): 169-80
162. Wellen K. E. ir Hotamisligil G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115(5): 1111-9.
163. Wilhelm J., Pingoud A. ir Hahn M. (2003). Validation of an algorithm for automatic quantification of nucleic acid copy numbers by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 317(2): 218-25.
164. Wilson A., Murphy M. J., Oskarsson T., Kaloulis K., Bettess M. D., Oser G. M., Pasche A. C., Knabenhans C., Macdonald H. R. ir Trumpp A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18(22): 2747-63.
165. Wognum A. W., Eaves A. C. ir Thomas T. E. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34(6): 461-75.
166. Wolfe M. S. (2010). Alzheimer's disease drug discovery - 11th international conference - promising new therapeutic approaches. *IDrugs* 13(12): 825-7.
167. Wright D. E., Wagers A. J., Gulati A. P., Johnson F. L. ir Weissman I. L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294(5548): 1933-6.
168. Zech N. H. (2005). Plasticity of stem cells: cell-fusion versus transdifferentiation. *J Reproductionmed Endokrinol* 2(4): 239-45.
169. Zhang J. ir Li L. (2005). BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* 284(1): 1-11.
170. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J. Q., Harris S., Wiedemann L. M., Mishina Y. ir Li L.

- (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425(6960): 836-41.
171. Zhao Y., Ling F., Wang H. ir Sun X. (2010). Understanding the Impact of Inflammation on Hematopoietic Stem Cells. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL., *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts).
172. Zhou K., Zhang H., Jin O., Feng X., Yao G., Hou Y. ir Sun L. (2008). Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cell Mol Immunol* 5(6): 417-24.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti visiems , kurie prisidėjo prie šio darbo atsiradimo.
Ypač norėčiau padėkoti:

- darbo vadovei prof., dr. G.Biziulevičienei už idėjas, nuolatinę pagalbą ir padaršinius;
- bendradarbiams už nuoširdžią pagalbą ruošiant šį darbą;
- visiems kolegoms už kritinį mąstymą bei vertingas pastabas;
- savo šeimai ir draugams už kantrybę, nuolatinį palaikymą ir supratimą.

Finansinė parama

- Lietuvos valstybinis mokslo studijų fondo mokslinių tyrimų darbas “Fundamentiniai kamieninių ląstelių funkcionavimo mechanizmų tyrimai (Citoterapija 2)“ (No. C-07023/2007-2009).
- Lietuvos valstybinis mokslo studijų fondo Stipendija (2008-2010).