

VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
INOVATYVIO MEDICINOS CENTRAS

Virginijus Tunaitis

SKIRTINGŲ SUAUGUSIO ŽMOGAUS AUDINIŲ MEZENCHIMINIŲ
KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ FUNKCIONAVIMO MECHANIZMŲ TYRIMAI

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01B),
Imunologija, serologija, transplantacija (B500)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006-2010 m. Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas:

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

Turinys

1. ĮVADAS	7
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1. Kamieninių ląstelių savybės	13
2.2. Mezenchiminės kamieninės ląstelės	15
2.2.1. Mezenchiminių kamieninių ląstelių savybės	15
2.2.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių niša	18
2.2.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių funkcijų reguliavimas	20
2.2.4. Kamieninių ląstelių imunomoduliacinės savybės	26
2.2.5. Mezenchiminių kamieninių ląstelių migracija į pažeistą audinį	28
2.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių kultivavimas <i>in vitro</i>	29
2.3.1. Auginimo terpės sudėties įtaka mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms	30
2.3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos sudėtis	33
3. METODAI	35
3.1. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas iš riebalinio audinio	35
3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas iš pieninių dantų pulpos	36
3.3. Ląstelių auginimas	36
3.4. Ląstelių augimo greičio įvertinimas	37
3.5. Ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimas	37
3.6. Diferenciacijos inicijavimas adipogenine ir osteogenine kryptimis	38
3.7. RNR išskyrimas	39
3.8. Komplementarios DNR sintezė	40
3.9. Realaus laiko polimerazinė grandininė reakcija	40
3.10. Kolonijų formavimo efektyvumo indekso apskaičiavimas	42
3.11. Pirminės kultūros individualių ląstelių klonų išskyrimas	42
3.12. Mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikis alfa1-antitripsinu	42
3.13. Ląstelių migravimo tyrimai	42
3.14. Želatinazinio aktyvumo įvertinimas	43
3.15. Imunofluorescentinė mikroskopija	44
3.16. Ląstelių lizatų ruošimas ir imunobloto analizė	45
3.17. Ląstelių baltymų išskyrimas ir dvikryptė elektroforezė	46
3.18. Baltymų paruošimas masių spektrometrijai	47
3.19. Statistinė duomenų analizė	48

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	49
<i>4.1. Skirtingos sudėties auginimo terpių poveikis riebalų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms</i>	<i>50</i>
4.1.1. Riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių morfologija ir augimo greitis	51
4.1.2. Poveikis mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijai	54
4.1.3. Auginimo terpės poveikis osteogeninei ir adipogeninei diferenciacijai	56
4.1.4. Auginimo terpės komponentų poveikis adipogeninę ir osteogeninę diferenciaciją reguliuojančių genų transkripcijai	58
4.1.5. Baltymų identifikavimas skirtingos sudėties terpėje augintose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse	62
<i>4.2. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos in vitro tyrimai</i>	<i>69</i>
4.2.1. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas	69
4.2.2. Klonavimas ir gautų klonų morfologija bei proliferacinis aktyvumas	71
4.2.3. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių kultūros bei jos klonų diferenciacijos tyrimai	73
4.2.4. Paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai	74
4.2.5. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių ir jos dukterinių klonų proteominė analizė	75
<i>4.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių migravimo į uždegiminį židinį mechanizmo tyrimas</i>	<i>78</i>
4.3.1. Alfa1-antitripsino poveikis mezenchiminių kamieninių ląstelių proliferaciniam aktyvumui	78
4.3.2. Alfa1-antitripsino poveikis ląstelių migraciniam aktyvumui	80
4.3.3. Pieninio danties mezenchiminių kamieninių ląstelių želatinazinio aktyvumo tyrimas	82
4.3.4. Alfa1-antitripsino poveikis ląstelių signaliniams keliams	83
<i>4.4. Rezultatų apibendrinimas</i>	<i>85</i>
IŠVADOS	90
Literatūros sąrašas	91
Publikacijų disertacijos tema sąrašas	107

Santrumpos

AAT, alfa1-antitripsinas;

APC, antigeną prezentuojanti ląstelė (angl. *antigen presenting cell*);

AŽ, alogeninis žmogaus serumas;

BSA, jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*);

CD, paviršiaus žymuo (angl. *Cluster of differentiation*);

DAPI, 4,6'-diamidino-2-phenylindole (DNR dažas);

DC, dendritinės ląstelės;

EGF, epiderminis augimo faktorius (angl. *epidermal growth factor*);

EKL, embrioninės kamieninės ląstelės;

ERK, angl. *extracellular signal-regulated kinases*;

FBS, fetalinis veršelio serumas (angl. *fetal bovine serum*);

FGF, fibroblastų augimo faktorius (angl. *fibroblast growth factor*);

HAT, histonų acetiltransferazė;

HDAC, histonų deacetilazė;

HGF, hepatocitų augimo faktorius;

HKL, hemopoetinės kamieninės ląstelės;

IDO, *indoleamine 2,3-dioxygenase*;

IFN- γ , interferonas- γ (angl. *interferon- γ*);

IGF, insulino augimo faktorius (angl. *insulin-like growth factor*);

IL, interleukinas (angl. *interleukin*);

iPL, indukuotos pluripotentinės ląstelės;

KFE, kolonijų formavimo efektyvumas;

KL, kamieninės ląstelės;

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

MKL, mezenchiminės kamieninės ląstelės;

MMP, matrikso metalo proteazės;

NGF, nervinis augimo faktorius (angl. *nerve growth factor*);

NK, natūralūs naikintojai (angl. *natural killer*);
PBS, fosfatinės druskos tirpalas;
PDGF, trombocitų augimo faktorius (angl. *platelet derived growth factor*);
PD-MKL, pieninio danties mezenchiminės kamieninės ląstelės;
PFA, paraformaldehidas;
PGE-2, prostaglandinas E2;
PGR, polimerazinė grandininė reakcija;
PKC, proteino kinazė C;
PKD, proteino kinazė D;
PPAR, angl. *peroxisome proliferator-activated receptor*;
R-MKL, riebalų mezenchiminės kamieninės ląstelės;
SDS-PAGE, SDS poliakrylamido gelio elektroforezė;
TGF, transformuojantis augimo faktorius (angl. *transforming growth factor*);
Th, pagalbiniai T limfocitai (angl. *T helper*);
TLR, angl. *toll-like receptor*;
TNF, auglio nekrozės faktorius (angl. *tumor necrosis growth factor*);
Treg, reguliaciniai T limfocitai;
VEGF, kraujagyslių endotelio augimo faktorius (angl. *vascular endothelial growth factor*);
2DE, dvikryptė elektroforezė.

1. ĮVADAS

Suaugusio organizmo mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) terapija yra viena iš perspektyviausių sričių šiuolaikinėje medicinoje. Tyrimai ir klinikiniai bandymai parodė, kad MKL gali būti sėkmingai panaudotos pažeistų audinių regeneracijai ir uždegiminio proceso slopinimui. Šiuo metu vykdoma virš šimto klinikinių bandymų, grindžiamų MKL panaudojimu. Vis dėlto lauktas terapinis mezenchiminių kamieninių ląstelių efektas dar nepasiektas. Šiuo metu nėra aiškus gydomąjį poveikį turinčių ląstelių likimas terapijos metu, nepilnai išnagrinėti MKL dauginimosi, diferencijavimosi į skirtingų tipų audinius, migracijos mechanizmai, nežinoma visų sekretuojamų molekulių sudėtis. Bazinių žinių stoka trukdo sukurti standartizuotą ir efektyvią, MKL savybėmis paremtą, terapiją. Kadangi apie 85 % klinikinių tyrimų atliekama su laboratorijoje padaugintomis ląstelių kultūromis, ypatingą svarbą MKL savybėms turi tinkamų auginimo sąlygų parinkimas. Sėkmingai padauginti mezenchimines kamienines ląsteles iki terapijai pakankamo kiekio trukdo ne tik žinių apie ląstelių biologiją trūkumas, bet ir MKL padauginimo protokolų įvairovė, susijusi su sunkiai standartizuojama auginimo terpės sudėtimi, skirtingomis MKL donoro organizmo savybėmis ir nevienodomis auginimo sąlygomis (nevienodas auginimo indų plastikas, persėjimų dažnumas, ląstelių tankis ir kt.). Siekiant surasti tinkamą MKL padauginimo būdą, kuris ne tik nepablogintų, bet galbūt ir pagerintų jau nustatytas terapijai svarbias savybes, būtina nustatyti kaip ir kokiu būdu auginimo sąlygų pakeitimas veikia mezenchiminių kamieninių ląstelių funkcijas.

Viena iš svarbiausių ir heterogeniškiausių auginimo terpės sudėtinųjų dalių yra serumas. Ląstelių padauginimui šiuo metu dažniausiai yra naudojama auginimo terpė su fetaliniu veršelio serumu (FBS). Kadangi tai yra gyvulinės kilmės komponentas, jo naudojimas terapijai skirtų MKL auginimui kelia potencialų pavojų, susijusį su tarprūšiniu žinomų ir dar nenustatytų ligų pernešimu ir imuninio atsako prieš FBS baltymus sukėlimu. Dėl šios priežasties daugėja

tyrimų, kuriuose, kaip alternatyvą fetaliniam veršelio serumui, rekomenduojama naudoti žmogaus serumą ar beseruminę auginimo terpę. Keičiant auginimo terpės sudėtį siekiama kompleksiskai įvertinti ląstelėje atsirandančius pokyčius, kurie gali būti svarbūs MKL funkcijoms. Naujausiuose skirtingų laboratorijų atliktuose darbuose yra lyginamas serumų poveikis mezenchiminių kamieninių ląstelių proliferacijai, diferenciacijai ir imunosupresijai. Pirminiai duomenys parodė, kad FBS naudojimui puiki alternatyva gali būti terpė su žmogaus serumu. Nežiūrint to, šiame serume tirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių ir augintų terpėje su FBS savybės nebuvo identiškos. Iki šiol nežinoma, kas nulemia šiuos skirtumus ir kiek jie gali būti svarbūs terapiniam MKL panaudojimui.

Auginamų mezenchiminių kamieninių ląstelių svarbi savybė yra populiacijos heterogeniškumas. MKL savybėmis dažniausiai pasižymi tik tam tikra dalis ląstelių, o kita populiacijos dalis gali turėti skirtingas savybes. Jau seniai žinoma, kad retai išsėtos kaulų čiulpų MKL formuoja kolonijas, sudarytas iš skirtingu greičiu augančių ląstelių. Šių subpopuliacijų savybės skiriasi tiek gebėjimu diferencijuotis, tiek paviršiaus žymenų ekspresija bei proteominiu profiliu. Daugelyje laboratorijų atlikti kaulų čiulpų MKL populiacijos tyrimai padėjo geriau suprasti ląstelių savybių pokyčius ir ilgo jų kultivavimo galimybes. Mūsų atliktų MKL populiacijų tyrimų objektas buvo kito potencialaus MKL šaltinio – pieninio danties pulpos kilmės mezenchiminės kamieninės ląstelės (PD-MKL). Iki šiol dar nebuvo atlikta šio MKL šaltinio populiacijos analizė, taigi ir jos priskyrimas mezenchiminių kamieninių ląstelių grupei galėjo remtis tik proliferacijos ir diferenciacijos duomenimis. Palyginamieji PD-MKL kultūros ir jos iš vienos ląstelės kilusių klonų proteomos tyrimai, taip pat paviršiaus žymenų, diferenciacijos ir proliferacijos analizė parodė šio šaltinio ląstelių savybes ir jų panašumą į kitų audinių mezenchimines kamienines ląsteles.

Terapijai ypatingai svarbi mezenchiminių kamieninių ląstelių savybė yra jų migravimas į pažeistą vietą. Jau nustatyta, kad uždegimo metu organizme išskiriami mediatoriai, chemokinaai ir specifiniai faktoriai yra svarbūs ląstelių migracijai. Vienas iš pagrindinių uždegiminės aplinkos komponentų yra neutrofilų

gaminamos serino proteinazės, kurios remodeliuoja ekstraląstelinį matriksą, taip pat reguliuoja daugelio uždegimui svarbių citokinų ir jų receptorių aktyvumą. Natūralus neutrofilų gaminamų serino proteinazių inhibitorius yra antiproteinazė alfa1-antitripsinas (AAT), kurio koncentracijos padidėjimas yra susijęs su uždegimine organizmo būseną. Tačiau iki šiol dar nebuvo jokių AAT poveikio mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms tyrimų.

Mezenchiminių kamieninių ląstelių tyrimai paprastai yra skirti šių ląstelių panaudojimui terapijoje. Kartu jie leidžia geriau suprasti fundamentinius organizmo funkcionavimo principus ir pavienių ląstelių veiklos reguliavimą. Šiame darbe atlikti auginimo terpės serumo poveikio riebalinės kilmės MKL tyrimai ir pieninio danties pulpos MKL populiacijos ir funkcinų savybių analizė leis geriau suprasti MKL padauginimo *in vitro* galimybes ir šių ląstelių funkcionavimo mechanizmus.

Darbo tikslas

Įvertinti ląstelių padauginimui naudojamos auginimo terpės serumo įtaką riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių augimo greičiui, paviršiaus žymenims, diferenciacijai ir baltymų ekspresijai bei ištirti pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos savybes ir jų atsaką į uždegimui būdingą alfa1-antitripsiną.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti terpėje su fetaliniu veršelio serumu, alogeniniu žmogaus serumu ir sintetiniu serumo pakaitalu augintų žmogaus riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos, augimo greičio ir gebėjimo diferencijuotis skirtumus.
2. Nustatyti skirtingų rūšių serumų įtaką su adipogenine ir osteogenine diferenciacijomis susijusių genų (*PPAR γ* , *Msx2*, *osteopontino*) transkripcijai riebalinio audinio mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse.
3. Įvertinti ir palyginti baltymų ekspresijos visumą riebalinio audinio mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse, augintose skirtingais serumais praturtintose terpėse.
4. Ištirti iš žmogaus pieninio danties pulpos išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių ir iš šios kultūros kilusių klonų morfologijos, proliferacijos, diferenciacijos, paviršiaus žymenų ekspresijos bei baltymų ekspresijos ypatumus.
5. Nustatyti žmogaus alfa1-antitripsino subfiziologinės, fiziologinės ir uždegiminės koncentracijų poveikį pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių augimo greičiui ir migracijai.

Mokslinis naujumas

Ištirtas auginimo terpės įvairių rūšių serumų (fetalinio veršelio serumo (FBS), žmogaus alogeninio serumo (ŽS), sintetinio serumo pakaitalo Ultroser G) poveikis riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių (R-MKL) auginimo greičiui ir diferenciacijai. Nustatyta, kad R-MKL, augintos su sintetiniu serumo pakaitalu, pasižymėjo didesniu augimo greičiu ir stipresne diferenciacija, nei ląstelės, augintos terpėje su FBS ir ŽS.

Iki šiol dar nebuvo informacijos apie bazinę *Msx2*, *PPAR γ* ir *osteopontino* genų ekspresiją skirtingos sudėties terpėse auginamose nediferencijuotose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Gauti rezultatai parodė, kad auginimo

terpės serumo sukelti R-MKL gebėjimo diferencijuoti skirtumai yra tiesiogiai susiję su tirtų *Msx2*, *PPAR γ* ir *osteopontino* genų transkripcijos lygiu proliferuojančiose ląstelėse.

Riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai atskleidė CD146 žymens ekspresijos priklausomybę nuo serumo sudėties. Iki šiol ši savybė buvo pastebėta tik iš kaulų čiulpų išskirtose MKL, o riebalinio audinio mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse dar nebuvo tyrinėta. Analizuojant tirtų serumų įtaką CD146 ekspresijai nustatyta, kad R-MKL populiacija, auginta terpėje su FBS, turėjo daugiau CD146 teigiamų ląstelių nei terpėje su HS. Terpėje su sintetiniu serumu pakaitalu Ultroser G augintos R-MKL CD146 neekspresavo.

Ląstelių kultūrose, auginamose terpėse su skirtingais serumais, yra ekspresuojamas skirtingos sudėties baltymų rinkinys. Atlikus proteominius tyrimus buvo nustatyta skirtingomis sąlygomis auginamų R-MKL ekspresuojamų baltymų visuma. Analizuojant baltymų ekspresijos tyrimo rezultatus, daugiausiai skirtumų nustatėme terpėje su sintetiniu serumu pakaitalu Ultroser G augintose ląstelėse. Šis rezultatas patvirtino šiame tyrime gautus diferenciacijos genų transkripcijos ir paviršiaus žymenų ekspresijos duomenis, rodančius ypatingą sintetinio serumo poveikį R-MKL.

Tiriant MKL populiacijos sudėtį, mūsų grupė pirmoji atliko iš žmogaus pieninio danties pulpos išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių (PD-MKL) klonų kompleksinę analizę. Išanalizavus PD-MKL klonų morfologiją, augimo greitį ir gebėjimą diferencijuoti, buvo išskirtos trijų tipų populiaciją sudarančių ląstelių grupės. Pirmą kartą atlikti PD-MKL kiekybiniai baltymų ekspresijos tyrimai atskleidė tipinius mezenchiminių kamieninių ląstelių baltymų profilius ir parodė atskirų klonų ekspresuojamų baltymų sudėtį.

Tiriant ląstelių migravimo mechanizmus, iki šiol dar nebuvo naudotas alfa1-antitripsino (AAT) poveikio tyrimas nei pieninio danties pulpos MKL, nei kito audinio mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms. Nustatėme, kad uždegiminės

AAT koncentracijos aktyvina pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių augimą ir migraciją.

Ginamieji teiginiai

1. Serumo kilmė ir sudėtis yra kritiškai svarbūs reguliuojant žmogaus riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių funkcines savybes.
2. Iš žmogaus pieninio danties pulpos galima išskirti ląstelių populiacijas, kurios pagal savo morfologiją, funkcines savybes bei ekspresuojamų baltymų sudėtį yra giminingos kitų audinių mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms.
3. Alfa1-antitripsino baltymas stimuliuoja mezenchiminių kamieninių ląstelių augimą ir migraciją *in vitro*, todėl gali veikti, kaip organizmo audinių regeneraciją reguliuojantis veiksnys.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Kamieninių ląstelių savybės

Kamieninių ląstelių sąvoka vartojama apibūdinant ląsteles, pasižyminčias totipotentine, pluripotentine ir multipotentine diferenciacija. Šių tipų ląstelės yra svarbios embriogenezei, audinio vystymuisi ir regeneracijai bei organogenezei. Kamieninės ląstelės (KL) turi unikalią savybę tam tikrą laiką daugintis nediferencijuotoje būsenoje (*self renewing*) ir, gavus atitinkamą signalą, diferencijuotis į įvairių tipų audinius [Mitalipov and Wolf, 2009; Weissman et al., 2001]. Gebėjimas diferencijuotis yra svarbi KL charakteristika. Totipotentinėms ląstelėms priskiriamos zigotos ląstelės, iš kurių formuojasi ne tik embrionas, bet ir ekstraembrioniniai audiniai (placenta). Totipotentinių ląstelių nėra pavykę kultivuoti dirbtinėmis sąlygomis, nes jos savo savybes praranda po 3–4 zigotos pasidalijimų blastomeros stadijoje [Mitalipov and Wolf, 2009]. Blastocistos stadijoje susiformuoja pluripotentinį pajėgumą turinčios ląstelės. Pluripotentinės ląstelės sugeba diferencijuotis į visų gemalinių lapelių (mezodermos, ektodermos, endodermos) audinius. Be šios savybės, išskirtinis jų bruožas yra telomerazinis aktyvumas, dėl kurio įmanomas ilgalaikis jų kultivavimas *in vitro* [Carpenter et al., 2003]. Pluripotentinėms ląstelėms priskiriamos embrioninės kamieninės ląstelės (EKL), kurios yra išskiriamos iš blastocistos vidinės ląstelių masės (*inner cell mass*, ICM), epiblasto kilmės kamieninės ląstelės ir primordialinės gemalo ląstelės. Į atskirą grupę galima išskirti indukuotas pluripotentines ląsteles (iPL), kurių pluripotentiškumas yra indukuotas *in vitro* naudojant genetines manipuliacijas ar cheminius poveikius. iPL pasižymi EKL būdingomis savybėmis, tačiau jų pritaikomumas terapiniams tikslams dar yra diskutuotinas [Ralston and Rossant, 2009].

Gastruliacijos metu susiformuoja trys embrioniniai lapeliai, sudaryti iš multipotentinių (*multi* – daug) ląstelių. Susiformavusio organizmo įvairiuose

audiniuose taip pat randamos multipotentinės kamieninės ląstelės. Suaugusio žmogaus KL yra nediferencijuotos ląstelės, randamos įvairiose nišose. Priimta manyti, kad suaugusio žmogaus KL būdingas multipotentiškumas, nors kai kurie autoriai suaugusiame organizme randa nedidelį kiekį pluripotentinių ląstelių, pasižyminčių EKL savybėmis [Zuba-Surma et al., 2009]. Multipotentinių suaugusio žmogaus KL grupę sudaro hemopoetinės kamieninės ląstelės (HKL), specifinės audinio kamieninės ląstelės, pvz., nervinio, epiderminio, raumens ir kt. audinių kamieninės ląstelės ir visame organizme paplitę mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL). Suaugusio žmogaus skirtingų tipų KL organizme atlieka įvairias funkcijas, kurios yra susijusios su atskiro audinio funkcija, regeneracija arba bendru organizmo homeostazės palaikymu. Vienos plačiausiai nagrinėtų hemopoetinės kamieninės ląstelės yra gyvybiškai svarbios kraujotakos ir imuninės sistemų funkcionavimui. Kaulų čiulpuose esančios HKL diferencijuojasi į leukocitus, eritrocitus ir trombocitus ir taip palaiko tinkamą jų kiekį organizme homeostazės ar uždegimo metu [Carlesso and Cardoso, 2010]. Specifinių audiniui KL funkcija dažniausiai susijusi su regeneracija ir pasireiškia diferencijavimusi į organui ar audiniui būdingų tipų ląsteles. Visų tipų KL veikimas yra koordinuojamas sekretuojamomis biologiškai aktyviomis molekulėmis ir tarpląsteliniais kontaktais. Audinio pažeidimo vietoje padidėja skirtingų ląstelių gaminamų citokinų koncentracija, kurie aktyvina HKL kilmės imuninio atsako ląstelių diferenciaciją, proliferaciją ir migraciją, bei audinio KL diferenciaciją ir migraciją į pažeistą vietą. Tuo tarpu mezenchiminės kamieninės ląstelės yra susijusios ir su imuniniu atsaku, ir su audinio regeneracija. Pirmiausia organizme MKL buvo rastos kaulų čiulpuose. Kaulų čiulpuose esančios MKL, dar vadinamos kaulų čiulpų mezenchiminėmis stromos ląstelėmis, yra ypatingai svarbios HKL diferenciacijai ir proliferacijai [Battiwalla and Hematti, 2009]. Vėlesni tyrimai parodė, kad MKL gali būti išskirtos ir iš daugelio kitų audinių. Pagal dabartinę sampratą MKL yra šalia kraujagyslių esančioje (perivaskulinėje) nišoje ir, gavusios atitinkamą tirpių biologiškai aktyvių molekulių signalą, geba migruoti į pažeistą vietą, sekretuoti imuninį atsaką reguliuojančias molekules ir/ar

diferencijuotis į audinio ląsteles [Prockop, 2009]. Taigi mezenchiminės kamieninės ląstelės tiesiogiai susijusios tiek su imuninio atsako reguliavimu, tiek su audinio regeneracija. Šios MKL savybės padeda organizmui palaikyti homeostazę ir gydyti nedidelius pažeidimus, tačiau esant didelėms pažeidoms MKL kiekis gali būti nepakankamas. Be to, organizmui senstant MKL kiekis stipriai mažėja [Caplan, 2009]. Siekiant panaudoti MKL gydomąjį poveikį susirgimų metu yra bandoma terapiniais tikslais padauginti autologines ar alogenines MKL *ex vivo*. Nors jau vyksta nemažai klinikinių tyrimų, tačiau nevienareikšmiai jų rezultatai dažniausiai susiję su *ex vivo* auginimo skirtingu poveikiu MKL savybėms [Salem and Thiemermann, 2010].

2.2. Mezenchiminės kamieninės ląstelės

2.2.1. Mezenchiminių kamieninių ląstelių savybės

Mezenchiminės kamieninės ląstelės, pasižyminčios panašiomis savybėmis, yra išskirtos iš daugelio audinių (kaulų čiulpų, riebalų, odos, sausgyslės, sinovijaus membranos ir kt.) [da Silva Meirelles et al., 2006]. Iš audinio išskirtos ląstelės apibūdinamos kaip MKL pagal jų morfologiją, paviršiaus molekules ir funkcinės savybes. Skirtingos kilmės MKL pasižymi panašiomis dauginimosi, diferenciacijos ir MKL būdingų paviršiaus žymenų ekspresijos savybėmis. Dažniausiai randami skirtumai susiję su šių savybių išraiškos laipsniu. Lyginant kaulų čiulpų kilmės MKL su danties pulpos MKL (PD-MKL) nustatytas pastarųjų didesnis proliferacinis ir klonogeninis aktyvumas, lengviau indukuojama osteogeninė diferenciacija [Huang et al., 2009]. Riebalinio audinio MKL adipogeninis aktyvumas didesnis nei kaulų čiulpų MKL [Liu et al., 2007].

Viena iš plačiausiai paplitusių ląstelių charakteristikų yra ląstelės paviršiaus žymenų (CD) ekspresija. Naudojant specifinius paviršiaus žymenis yra nustatomas ląstelės tipas ir diferenciacijos laipsnis. Šie žymenis dažnai būna susiję su ląstelės signalo perdavimu (receptorius ar ligandas) arba atlieka kitas funkcijas, tokias kaip ląstelės adhezija. Kadangi paviršiaus žymenis nėra būdingi tik vienam

ląstelės tipui ir jų ekspresija gali kisti priklausomai nuo ląstelės ciklo ar aktyvacijos, MKL charakterizavimui paprastai naudojama kelių žymenų kombinacija. Tarptautinė ląstelių terapijos bendrija („International Society for Cellular Therapy“, ISCT) išskyrė tris minimalius kriterijus [Dominici et al., 2006], pagal kuriuos MKL, išskirta iš kaulų čiulpų ar kitų mezenchiminių audinių, *in vitro* turi pasižymėti šiomis savybėmis:

- 1) Esant standartinėms kultivavimo sąlygoms ląstelės turi lipti prie auginimo indo dugno;
- 2) Ekspresuoti CD73 (*ecto – 5 – nucleotidase*), CD90 (*Thy-1*) ir CD105 (*endoglin*) paviršiaus žymenis ir neturėti CD34, CD45, CD11b ar CD14, CD19 ar CD79 α ir HLA-DR žymenų;
- 3) Pasižymėti gebėjimu diferencijuotis osteogenine, adipogenine ir chondrogenine kryptimis.

Mezenchiminės kamieninės ląstelės paprastai iš audinio išskiriamos nenaudojant selekcijos pagal būdingą paviršiaus žymenį. Tačiau net ir be atrankos MKL populiacija yra gana homogeniška ir sudaryta iš ≥ 95 % CD73, CD90 ir CD105 ląstelių ir ne daugiau nei 2 % ląstelių, ekspresuojančių CD34, CD45, CD11b ar CD14, CD19 ar CD79 α ir HLA-DR. Nežiūrint to, MKL kultūros atskiros subpopuliacijos pasižymi nevienodomis savybėmis [Phinney, 2007]. Viena iš seniausiai žinomų MKL savybių yra kolonijų formavimas, kurį lemia greitai besidalijančių ląstelių subpopuliacija. Jau ankstyvieji tyrimai parodė, kad MKL kultūra, turinti didelį kolonijų formavimo efektyvumą (KFE), geba nediferencijuotoje būsenoje greitai dalintis ir pasižymi didesniu gebėjimu diferencijuotis [Friedenstein et al., 1976]. Bandant charakterizuoti kolonijas formuojančias ląsteles yra ieškoma tik joms būdingų paviršiaus žymenų. Kelios laboratorijos, naudodamos standartizuotus išskyrimo protokolus, prie teigiamų žymenų taip pat priskyrė CD271 (*low-affinity nerve growth receptor*), MSCA-1 (*mesenchymal stem cell antigen-1*), CD56 (*NCAM*) [Battula et al., 2009; Buhring et al., 2009]. Atrinkta MKL CD271 teigiama populiacija pasižymėjo būdingomis

kamieninių ląstelių savybėmis, tačiau buvo nustatyta, kad ji ekspresavo ir HLA-DR (pagal ISCT kriterijus yra neigiamas MKL žymuo) [Parolini et al., 2008; Soncini et al., 2007]. Kitas spėjamas MKL teigiamas žymuo yra CD146, kuris būdingas subendotelinėms ląstelėms, gebančioms diferencijuotis osteogenine, adipogenine ir chondrogenine kryptimis [Tarnok et al., 2010]. Buvo nustatyta, kad ląstelės, turinčios PDGF receptorių ir CD146 paviršiaus žymenį, pasižymi didesniu klonogeniškumu ir diferenciacine geba [Schwab and Gargett, 2007]. Pažymėtini CD49a, STRO-1, CD200 MKL būdingi teigiami žymenys, kurie buvo naudojami atrinkti MKL nuo kitų audinio ląstelių skyrimo metu [Buhring et al., 2009; Stewart et al., 2003]. Nežiūrint vis didėjančio atrandamų MKL būdingų paviršiaus žymenų skaičiaus, bandymai gauti „švarią“ kamieninių ląstelių kultūrą nėra sėkmingi. Manoma, kad MKL populiacija *in vitro* yra hierarchiškai susiskirsčiusi ir, priklausomai nuo sąlygų, jų savybės grįžtamai arba negrįžtamai keičiasi. Remiantis šiuo metu vykdomų naujų MKL būdingų paviršiaus žymenų paieškos rezultatais, bus galima geriau suprasti MKL prigimtį ir *in vitro* kultivavimo įtaką jų savybėms.

Mezenchiminių kamieninių ląstelių charakterizavimas pagal paviršiaus žymenis yra patogus, greitas ir sąlyginai paprastas metodas, tačiau vien juo remiantis negalima spręsti apie MKL savybes. Viena iš problemų yra tai, kad minėti paviršiaus žymenys gali būti būdingi ir kito tipo ląstelėms. Ištyrus įvairių audinių kilmės MKL (kaulų čiulpų, riebalų, virkštelės kraujo) 22 paviršiaus žymenų ekspresiją ir palyginus su diferencijuotų fibroblastų paviršiaus žymenimis skirtumų nebuvo rasta. Atskirti MKL nuo morfologiškai panašių fibroblastų linijos pavyko tik atlikus diferenciacijos eksperimentus, kai MKL sėkmingai diferencijavosi osteogenine, adipogenine ir chondrogenine kryptimis, o fibroblastai diferenciacijos požymių nerodė [Wagner et al., 2005]. Deja, *in vitro* diferenciaciją sunku standartizuoti dėl ląstelių populiacijos heterogeniškumo ir protokolų nevienodumo. Eksperimentai, kuriuose lyginant MKL savybes su skirtingų audinių fibroblastų savybėmis buvo nustatyti fibroblastų diferenciacijos požymiai, gali rodyti tiek šios kultūros užterštumą kamieninėmis ląstelėmis, tiek

skirtingų diferenciacijos metodų nevienodą įtaką ląstelėms [Covas et al., 2008]. Taigi minimalūs MKL apibūdinimo kriterijai yra naudingi, tačiau būtina ištirti ir kitus šioms ląstelėms būdingus požymius.

Tobulėjantys tyrimų metodai suteikė galimybę nustatyti įvairių tipų ląstelių savybes nulemiančių molekulių sudėtį. Mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingų genų ir baltymų ekspresijos nustatymas gali padėti apibūdinti ir reguliuoti ląstelės savybes ir funkcijas. Genominiais ir proteominiais metodais nustatytas nemažas skaičius MKL būdingų baltymų, susijusių su proliferacijos ir diferenciacijos procesais [Menicanin et al., 2009; Wagner et al., 2006]. Remiantis besikaupiančiais MKL proteomos tyrimų duomenimis buvo prieita prie išvados, kad dėl *in vitro* adaptacijos pirminės kultūros negali būti lyginamos su vėlesnių persėjimų ląstelėmis. Jau po antro išskirtų ląstelių persėjimo buvo nustatyti aštuoni nebeekspresuojami baltymai. Vėlesniuose persėjimuose (12p) identifikuoti 27 naujai gaminami baltymai [Angelucci et al., 2010]. Lyginant žmogaus skirtingų tipų kamieninių ląstelių RNR ir baltymų ekspresiją mikrogardelių bei proteominiais metodais gaunami gana prieštaringi duomenys ir nepasiekiamas patikimas atsikartojamumas [Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002]. Priežastys gali būti įvairios – jau minėtas ląstelių populiacijos heterogeniškumas, susijęs su kamieninių ląstelių kultūroje atsiradusiais pavieniais progenitoriais ar diferencijuotomis ląstelėmis, taip pat nevienodi ląstelių išskyrimo būdai bei ląstelių auginimo sąlygos [Wagner et al., 2006].

Standartizavus MKL išskyrimo iš audinio ir auginimo protokolus ateityje kamieninėms ląstelėms būdingų genų ir baltymų ekspresijos tyrimų duomenys gali būti papildoma MKL charakteristika. Šie duomenys, šalia dabar patvirtintų MKL savybių, ne tik padės apibūdinti kamienines ląsteles, bet ir suteiks informacijos apie jų funkcines savybes.

2.2.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių niša

Ląstelės mikroaplinką organizme sudaro palaikančios ląstelės, kurios sekretuodamos produktus ir kontaktuodamos viena su kita sudaro sąlygas ląstelių

išgyvenimui ir funkcionavimui [Jones and Wagers, 2008]. Kitų, ne MKL, suaugusio žmogaus audiniui specifinių kamieninių ląstelių nišos yra randamos tame pačiame audinyje, pvz., HKL – kaulų čiulpuose [Zhang et al., 2003], nervinės KL – galvos smegenų subventrikuliarinėje zonoje [Gould et al., 1999], epiderminės KL – žinduolių plaukų folikuluose [Braun et al., 2003]. Mezenchiminės kamieninės ląstelės, pasižyminčios panašiomis savybėmis, yra išskirtos iš daugelio audinių (kaulų čiulpų, riebalų, odos, sausgyslės, sinovijaus membranos ir kt.) [da Silva Meirelles et al., 2006]. Kaip jau minėta, įvairių audinių MKL pasižymi tokia pat paviršiaus žymenų ekspresija ir gebėjimu diferencijuotis į skirtingų tipų audinius, tačiau skirtingo audinio kilmės ar net to paties audinio skirtingos MKL populiacijos gali turėti nevienodą gebėjimą daugintis ir diferencijuotis [Phinney and Prockop, 2007].

Pagal dabartinius duomenis, MKL lokalizacija *in vivo* yra susijusi su kraujagyslių perivaskuline niša, kurioje esantys pericitai ir yra įvardijami kaip MKL [da Silva Meirelles et al., 2006; Shi and Gronthos, 2003]. Pericitai (dar vadinami periendotelio ląstelėmis, Rouget ląstelėmis, sienos (*mural*) ląstelėmis, inkstuose – *mezangial* ląstelėmis, kepenyse – Ito ląstelėmis) yra randami kapiliaruose, mikrokraujagyslėse ir didelėse kraujagyslėse šalia endotelinių ląstelių [Andreeva et al., 1998; Hirschi and D'Amore, 1996; Sims, 1986]. Kraujagyslių sienelė sudaryta iš trijų lamina atskirtų sluoksnių – vidinio (*intima*), vidurinio (*media*) ir išorinio (*adventicija*). Tiriant pericitų pasiskirstymą mikroskopiškai buvo nustatytas skirtingas jų kiekis atskiruose arterijos ir venos sienelės sluoksniuose. Arterijose pericitų didžiausias kiekis rastas vidinėje (*intima*) kraujagyslės dalyje, kur jie jungėsi su bazine membrana bei plyšinėmis jungtimis su endotelinėmis ląstelėmis. Venose pericitai rasti ne tik vidinėje dalyje, jie taip pat buvo tolygiai pasiskirstę viduriniame ir išoriniame sluoksnyje [Andreeva et al., 1998; Iijima and Zhang, 2002]. Pericitai dalyvauja reguliuojant kraujagyslių susitraukimą, kraujo spaudimą, endotelinių ląstelių dalijimąsi, angiogenezę [Kutcher and Herman, 2009]. Manoma, kad, priklausomai nuo audinio tipo, pericitai gali diferencijuotis į kaulinio audinio, kremzlės, riebalų ar

odontoplastų pirmtakus ir taip audinį atnaujinti ar atstatyti po pažeidimo [Farrington-Rock et al., 2004]. Pericitų sekretuojami augimo faktoriai ir citokinai taip pat reguliuoja imuninį atsaką ir regeneraciją. Sekretuotos pericitų/MKL molekulės veikia kaip imunomodulatoriai, sumažina pažeidimo laipsnį, slopina uždegiminį atsaką [English et al., 2007; Zhukareva et al., 2010]. Yra nustatyta, kad aktyvinti pericitai praranda kontaktą su bazine membrana ir sugeba migruoti į pažeistą audinį bei diferencijuotis į mezenchiminiuosius audinius [da Silva Meirelles et al., 2008; Diaz-Flores et al., 1992; Richardson et al., 1982].

Manoma, kad iš audinio išskirtos ir *in vitro* auginamos MKL yra kontakto su endotelinėmis ląstelėmis ir bazine membrana netekę pericitai. Jų būseną turėtų atitikti audinio pažeidimo metu organizme aktyvintų MKL būseną. Tačiau ar *in vitro* auginamų ląstelių ir endogeninių MKL savybės yra identiškios, ar jos sugeba migruoti į pažeistą audinį – tai dar neatsakyti klausimai [Karp and Leng Teo, 2009; Khaldoyanidi, 2008].

2.2.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių funkcijų reguliavimas

Tiriant mezenchimines kamienines ląsteles svarbu nustatyti jų funkcijų reguliavimo mechanizmus. Molekuliniu lygmeniu identifikavus MKL atsinaujinimo, diferenciacijos, aktyvių molekulių sekrecijos reguliaciją būtų įmanoma sukurti metodus, kurie padėtų dauginant ląsteles išvengti jų senėjimo bei indukuotų pilnavertę diferenciaciją. Ląstelės paviršiaus receptorių ekspresijos ir transkribuojamų genų analizė parodė, kad MKL veiklą reguliuoja kompleksas jau seniai žinomų signalinių kelių. Mikrogardelių metodu palyginus įvairių audinių MKL ekspresuojamus genus ir naudojant specifinius kinazių inhibitorius atlikus funkcinę analizę, nustatyti trys MKL diferenciacijai ir augimui ypatingai svarbūs signaliniai keliai, aktyvinami trombocitų augimo faktoriumi (PDGF), fibroblastų augimo faktoriumi (FGF) ir transformuojančiu augimo faktoriumi β (TGF- β) [Liu et al., 2007; Ng et al., 2008]. Cituojami autoriai nustatė augimo faktoriais indukuotų signalinių kelių įtaką MKL funkcijoms. Kaip šių signalinių kelių svarbos tiesioginis įrodymas buvo sukurta beseruminė terpė, turinti tik TGF- β ,

PDGF ir β -FGF. Šios terpės sudėtis buvo pakankama MKL auginimui mažiausiai iki penkių persėjimų [Ng et al., 2008]. Po šios publikacijos komercinės kompanijos pradėjo MKL skirtų beseruminių terpių gamybą (STEMPRO (Invitrogen); MesenCult (STEMCELL technologies)). Jų tinkamumas įvertintas vienoje publikacijoje, kurios autoriai parodė beseruminėje terpėje augintų ląstelių ypatingai gerą proliferaciją ir osteogeninę diferenciaciją [Agata et al., 2009]. Nuo PDGF, FGF ir TGF- β priklausomi signaliniai keliai mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse yra svarbūs tiek proliferacijai, tiek diferenciacijai. PDGF signalinio kelio svarbą proliferacijai rodo stipriai ekspresuojami šio kelio komponentai nediferencijuotose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse [Ng et al., 2008]. Be to, nustatyta, kad MKL gali būti sėkmingai auginamos serumo pakaitale, turinčiame didesnę kiekį PDGF [Muller et al., 2006]. PDGF signalo inhibitorius tyrfostinas toksiškai veikė ląstelių kultūrą ir blokavo osteogeninę diferenciaciją. Įdomu, kad PDGF receptoriaus inhibicija visiškai neužblokavo adipogeninės ar chondrogeninės diferenciacijos. Taip pat įrodyta, kad PDGF indukuoja ir MKL migraciją, tačiau ląsteles paveikus PDGF kartu su FGF migracija nevyko [Ozaki et al., 2007].

Tiriant MKL diferenciacijos aktyvinimą osteogenine ir chondrogenine kryptimis yra parodyta TGF- β kelio svarba [Kulterer et al., 2007; Li and Xu, 2005]. Priešingai osteogeninei ir chondrogeninei diferenciacijai, adipogeninėje diferenciacijoje TGF- β signalas mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse veikia kaip adipogeninės diferenciacijos blokuotojas [Roelen and Dijke, 2003]. Kiti eksperimentai, atlikti naudojant MKL, parodė, kad TGF- β signalas yra svarbus proliferacijai ir veikia nuo Smad-3 priklausomu keliu [Jian et al., 2006]. Šis signalinis kelias yra gana universalus tarp skirtingų tipų kamieninių ląstelių, nes TGF- β receptoriumi aktyvinamas signalinis kelias kartu su FGF signalinimu dalyvauja ir palaikant EKL pluripotentiškumą [Vallier et al., 2005].

Eksperimentai, kuriuose naudojant terpę su FGF buvo stebėtas didesnis MKL dalinimosi greitis ir ilgesnis auginimo kultūroje laikas, parodė, kad FGF kelias yra svarbus MKL padauginimui *in vitro* [Benavente et al., 2003; Tsutsumi et al.,

2001]. Nors ir FGF receptoriaus (FGFR1) ekspresijos lygis yra žemas tiek nediferencijuotose, tiek diferencijuojančiose ląstelėse, tačiau šis signalas yra svarbus ne tik proliferacijai, bet ir osteogeninei [Jacob et al., 2006] bei chondrogeninei [Solchaga et al., 2005] diferenciacijai.

Šalia šių, kaip manoma, pakankamų MKL auginimui beseruminėje terpėje faktorių, yra išskiriamas epiderminis augimo faktoriaus (EGF) signalinis kelias. Teigiama, kad EGF yra svarbus MKL proliferacijos aktyvatorius ir, priešingai nei PDGF, FGF ir TGF- β , jis nedalyvauja diferenciacijos procesuose [Tamama et al., 2006]. Ši savybė svarbi kuriant beserminę auginimo terpę, kuri leistų padauginti MKL supresuojant jų diferenciaciją arba bent jos neaktyvinant. Tačiau atsakas į EGF ląstelėje priklauso nuo dozės ir poveikio laiko. Įrodyta, kad mažos EGF dozės sustiprina MKL proliferaciją *in vitro*, padidina klonogeniškumą, blokuoja osteogeninę diferenciaciją [Tamama et al., 2010]. Tuo tarpu didelės dozės ar prie substrato pritvirtintas EGF priešingai, indukuoja osteogenezę ir sustiprina MKL kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) ir hepatocitų augimo faktoriaus (HGF) parakrininę sekreciją [Kratchmarova et al., 2005; Platt et al., 2009]. Pagal pasiūlytą modelį, EGF veikimas pagrįstas PLC γ , PI3K/Akt ir p42/44 MAPK signaliniais keliais. Pažymėtina, kad šie signalo perdavimo keliai yra universalūs tirozino kinazės tipo receptoriams (pvz., PDGFR) [Salaszyk et al., 2004; Satomura et al., 1998].

Per pastarąjį dešimtmetį buvo nustatyta Wnt signalo reikšmė kamieninių ląstelių veiklos reguliacijai [Bakre et al., 2007; Ling et al., 2009; Willert et al., 2003]. Wnt reguliuoja ląstelių proliferaciją, migraciją, diferenciaciją. Išskiriami pagrindinis ir nepagrindinis Wnt signaliniai keliai, kurių vieno ar kito aktyvavimas ar inhibavimas lemia MKL veiklą. Prisijungus Wnt prie *Frizzled* receptoriaus yra reguliuojama genų ekspresija per β -kateniną (pagrindinis kelias) arba per JNK, Rho, proteino kinazę C (PKC) ir kalcio signalinimą (nepagrindinis kelias) [Huelsenken and Behrens, 2002]. MKL dauginimasi nediferencijuotoje būsenoje palaiko pagrindinis kelias per β -kateniną aktyvinant ciklino D1 ir c-Myc ekspresiją [Baek et al., 2003]. Priešingai, nepagrindinis Wnt supresuoja β -

katenino signalą, mažina proliferacinį aktyvumą. Vykstant MKL diferenciacijai pagrindinis Wnt kelias supresuoja osteogenezę ir adipogenezę, tačiau aktyvina miogenezę. Nepagrindinis kelias svarbus aktyvinant osteogenezę, chondrogenezę bei miogenezę [Boland et al., 2004; de Boer et al., 2004].

Dar paminėtini Notch, TLR, Hedgehog signaliniai keliai, kurie, nors ir nėra intensyviai tyrinėjami mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse, turi ypatingą reikšmę MKL imunomoduliacijai, diferenciacijai ir proliferacijai [Kim et al., 2010; Liotta et al., 2008; Mead and Yutzey, 2009; Zanotti and Canalis, 2010].

Išorinio signalo realizavimui svarbi proteino kinazė D (PKD). Ji yra daugelyje ląstelių aptinkama serino/treonino kinazė, kurią nuo PKC priklausomu keliu aktyvina įvairūs reguliatoriniai peptidai, tokie kaip trombinas, bombezinas, bradykininas, endotelinas ir vasopresinas, lizofosfatinė rūgštis, augimo faktoriai (PDGF, IGF) arba stresinis poveikis. Aktyvinta PKD fosforilina nemažai substratų, kurie vienaip ar kitaip lemia ląstelės veiklą. Serino/treonino kinazė PKD dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose, tokiuose kaip vėžinių ląstelių metastazės, baltymų sekrecija, genų veiklos reguliacija, ląstelių proliferacija, apoptozės inhibicija [Van Lint et al., 2002]. PKD yra svarbi ląstelės išgyvenimui po streso. Ląstelės atsakas į stresą vyksta per Src-Abl ir PKC, kurie aktyvina proteino kinazę D. Aktyvinta PKD inicijuoja transkripcijos faktoriaus NF-kappaB (*nuclear factor kB*) aktyvaciją per šiam faktoriui specifinės kinazės IKK kompleksą, tačiau tikslus aktyvacijos ir jos panaikinimo mechanizmas dar neištirtas [Storz and Toker, 2003]. Paprastai šis transkripcijos faktorius suaktyvina genus, kurie reguliuoja greitą ląstelės atsaką į uždegiminiuosius procesus, virusinę ir bakterinę infekciją ir kitus stresinius veiksnius, tuo tarpu vėžinėse ląstelėse NF-kappaB inhibicija lemia apoptozę ir auglio augimo sustabdymą [Zerbini et al., 2004].

Ląstelės diferenciacijos procesą lemia tam tikros genetinės programos, kurios atsakingos už naujo fenotipo formavimą. Chromatino modifikacijos histonų lygyje kaip ir DNR metilinimas yra vieni svarbiausių elementų reguliuojant specifinio genų rinkinio transkripciją [Grozinger and Schreiber, 2002; Kuo and Allis, 1998].

Chromatino modifikacijos gali būti kelių tipų post-transliacinės kovalentinės histonų modifikacijos: acetilinimas, fosforilinimas, metilinimas, ubikvitinavimas, poli(ADP)-ribozilinimas [Wolffe et al., 2000]. Histonų acetiltransferazei (HAT) acetilinant histonus atpalaiduojamas chromatinas, skirtas efektyviai genų transkripcijai. Priešingai, histonų deacetilazės (HDAC) panaikina acetilinimą taip slopindamos genų aktyvumą. Išskiriamos dvi HDAC klasės: I HDAC klasė, kuriai priklauso 1, 2, 3, 8 ir 11 deacetilazės, bei II HDAC klasė – 4, 5, 7 ir 9 deacetilazės. I HDAC yra daugelyje ląstelių, tuo tarpu II HDAC dažniausiai randama specifiniuose audiniuose (raumenyse, smegenyse, T ir B limfocituose, chondrocituose ir kt.) [Gray and Ekstrom, 2001]. HDAC aktyvumą ir lokalizaciją reguliuoja Ca^{2+} /kalmodulino kinazės (CAMK) ir proteino kinazė D, jos fosforilina HDAC baltymo N-galą, prie kurio jungiasi 14-3-3 adaptorius, palengvinantis eksportą iš branduolio [Dressel et al., 2001; Parra et al., 2005]. HDAC migracija į citoplazmą leidžia HAT acetilinti chromatiną ir suaktyvinti genų ekspresiją. Be fosforilinimo, HDAC aktyvumas dar gali būti reguliuojamas ubikvitinimu ir sumoilinimu [Garcia-Dominguez and Reyes, 2009].

Chromatino modifikavimas mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse yra svarbus diferenciacijos procesui. HDAC inhibavimas valproine rūgštimi (VPA) ir trichostatinu sustiprina osteogeninę diferenciaciją. Nustatyta, kad efektas susijęs su padidėjusia Runx2, osterix ir osteopontino genų aktyvacija [Cho et al., 2005]. Kitų autorių duomenimis adipogeninę, chondrogeninę ir neurogeninę diferenciaciją HDAC inhibavimas sumažino. Be to, paveikus MKL natrio butiratu ir VPA, ląstelių morfologija pasikeitė ir proliferacinis aktyvumas sumažėjo. Nustatyta, kad HDAC inhibavimas padidina p21 (CIP1/WAF1) geno ekspresiją ir sustabdo ciklą G2/M fazėje. Be to, nustatyta, kad vykstant senėjimo procesui HDAC ekspresijos sumažėjimas lemia polykombo grupės genų (PcGs), tokių kaip BMI1, EZH2 and SUZ12, išjungimą ir demetilazės (JMJD3) padidėjusią ekspresiją [Lee et al., 2009b].

Su diferenciacija susiję chromatino persitvarkymai aktyvina specifinių genų transkripciją. Diferenciacijos procesas yra susijęs su diferenciacijai būdingų genų

padidėjusia transkripcija ir transliacija (pvz. osteogeninei diferenciacijai – Msx2, Runx2, osteopontinas, ALP; adipogeninei – PPAR γ , leptinas, GLUT4). Nustatyta, kad adipocitams būdingi baltymai gali blokuoti osteogeninę diferenciaciją (PPAR γ) [Takada et al., 2007b] ir atvirkščiai – osteogeninės diferenciacijos metu aktyvių Msx2, Runx2 ekspresija blokuoja adipocitų formavimąsi [Cheng et al., 2003].

Aprašytų MKL veiklos reguliavimo mechanizmų tyrimai leis ateityje geriau suprasti ir kontroliuoti MKL savybes. Tačiau dar nėra žinomas išsamus MKL veiklos reguliavimo signalinių kelių tinklas. 1-oje lentelėje pateikiamas sąrašas MKL paviršiuje ekspresuojamų molekulių, kurios gali būti svarbios ląstelių funkcijų reguliacijai [Stagg, 2007]. Pažymėtina, kad skirtingose laboratorijose nustatyti MKL paviršiaus žymenų rinkinio duomenys ne visada sutampa [da Silva Meirelles et al., 2008; Salem and Thiernemann, 2010].

1 lentelė. Mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų ekspresija [Stagg, 2007]

Ląstelių žymenys	Chemokinių receptoriai	Augimo faktorių receptoriai	Citokinių receptoriai	Adhezijos baltymai	Imuniniams atsakai svarbūs baltymai	Kita
CD45 ⁻ CD34 ⁻ CD31 ⁻ CD11b ⁻ (Mac1) CD19 ⁻ Glycophorin A ⁻ Stro-1 ⁺ SSEA-4 ⁺	CXCR1 ⁻ CXCR2 ⁻ CXCR3 ⁻ CXCR4 ^{+/-} CXCR5 ⁺ CXCR6 ⁺ CCR1 ⁺ CCR2 ⁻ CCR3 ⁻ CCR4 ⁻ CCR5 ⁻ CCR6 ⁻ CCR7 ⁺ CCR8 ⁻ CCR9 ⁺ CX3CR1 ⁻ CX3CL1 ⁺	TGF- β s-R ⁺ CD105 ⁺ (endoglin) PDGF-R ⁺ EGF-R ⁺ IGF1-R ⁺ NGF-R ⁺ FGF-R ⁺ VEGF-R ^{+?} Frizzled ⁺ LRP6 ⁺	IL-1R ⁺ IL-3R ⁺ IL-4R ⁺ IL-6R ⁺ IL-7R ⁺ IL-15R ⁺ IFN-gR ⁺ TNF-a1R ⁺ TNF-a2R ⁺	CD44 ⁺ VCAM-1 ⁺ PECAM-1 ⁻ NCAM-1 ⁺ HCAM-1 ⁺ ALCAM ⁺ (CD166) ICAM-1 ⁺ ICAM-2 ⁺ ICAM-3 ⁺ MUC18 ⁺ CD90 ⁺ LFA3 ⁺ a-4 integrin ⁺ a-5 integrin ⁺ CD29 ⁺ (VLA-41, VLA-51) b-2 integrin ⁻ b-4 integrin ⁺ L-selectin ⁻ PSGL-1 ⁻ CD24 ⁻ Cadherin-5 ⁻	MHC I low ^a MHC II ^a CD80 ⁻ CD86 ⁻ CD40 ⁻ TLR-2 ⁺ TLR-9 ⁻ B7H1 ^{+/-} Nectin-2 ⁺ PVR ⁺ ULBP-3 ⁺ ULBP-1 ^{+/-} ULBP-2 ^{+/-} ULBP-4 ^{+/-} MICA ⁺ (30% of human donors) CD48 ⁻ NTBA ⁻	CD73 ⁺

^a padidėja po IFN- γ poveikio

2.2.4. Kamieninių ląstelių imunomoduliacinės savybės

Klinikiniam kamieninių ląstelių panaudojimui ypatingai svarbus yra recipiento imuninis atsakas į donoro ląsteles. Imunokompetentiškai recipiento imuninei sistemai identifikavus svetimą ląstelę, ji sunaikinama, o ląstelių terapija paprastai baigiasi nesėkme. Tačiau remiantis eksperimentų duomenimis ir klinikiniais tyrimais MKL, patekusi į alogeninį organizmą, aktyvaus imuninio atsako nesukelia. Tiriant šio fenomeno priežastis nustatyta, kad, be kitų savybių, MKL dar pasižymi gebėjimu reguliuoti imuninį atsaką [Jones and McTaggart, 2008]. Vienas svarbiausių paviršiaus žymenų, kuris sukelia imuninį svetimų ląstelių atmetimą, yra pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas MHC I (*major histocompatibility complex I*). Nustatyta, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės paviršiuje silpnai ekspresuoja MHC I ir neturi MHC II komplekso [Le Blanc et al., 2003]. Nors imuninė sistema ir gali atpažinti svetimą ląstelę, MKL populiacija dėl endogeninių imunosupresinių savybių pasižymi imunoprivilegiuotu statusu [Tasso and Pennesi, 2009]. Nustatyta, kad tai yra ne pasyvus, bet su MKL sekretuojamų faktorių poveikiu ir imuninei sistemai specifiniu tarpląstelinio kontaktu susijęs efektas [Krampera et al., 2003]. Imunosupresinės MKL savybės šiuo metu yra intensyviai tyrinėjamos, tačiau atsiranda ir prieštaringų duomenų. Literatūroje aprašyta, kad alogeninės transplantacijos metu MKL kartais gali prarasti *in vitro* stebėtą imunosupresinį poveikį [Prigozhina et al., 2008; Rameshwar, 2009]. Šio prieštaravimo priežastis dar neįrodyta, tačiau vienas iš paaiškinimų yra neseniai atskleistas specifinių TLR (*toll-like receptor*) stimuliacinis poveikis MKL [Waterman et al., 2010]. Cituojamame darbe parodyta, kad TLR4 aktyvinimas sukuria pro-uždegiminį MKL fenotipą, o aktyvius TLR3 MKL įgauna imunosupresinių savybių. Kita potenciali atmetimo reakcijos priežastis po alogeninės MKL transplantacijos gali būti recipiento organizme esantis interferonas γ (IFN γ), kuris padidina MHC I ir aktyvina MHC II ekspresiją [Stagg et al., 2006].

Jau 2002 metais tiriant transplantuotos odos prigijimą primatuose buvo parodyta, kad žmogaus MKL gali inhibuoti T ląstelių proliferaciją *in vitro* kultivuojant MLR (*mixed lymphocyte reaction-MLR*) ir *in vivo* [Bartholomew et al., 2002]. Nustatyta, kad MKL blokuoja T limfocitų proliferaciją G0 ląstelės ciklo stadijoje. T ląstelių proliferacijos inhibicija sumažino Th1 citokinų ekspresiją, todėl citokinų indukuojama imuninio atsako ląstelių stimuliacija tapo neefektyvi. Imuninį atsaką MKL reguluoja įvairiais faktoriais, tokiais kaip TGF- β 1, hepatocitų augimo faktorius (HGF), indoleamine 2,3-dioksigenazė (IDO), prostaglandinas E2 (PGE-2), IL-10 [Fibbe et al., 2007; Nauta and Fibbe, 2007]. Kitas imunomoduliacijos kelias yra tarpląsteliniai kontaktai. MKL kontaktiniu būdu bei sekretuojamais faktoriais gali inhibuoti ne tik T, bet ir B limfocitų proliferaciją [Gur-Wahnon et al., 2007; Nasef et al., 2007]. Yra duomenų, kad alogeninės MKL gali inhibuoti IL-2 ar IL-15 sukeltą natūralių naikintojų (NK) proliferaciją. Nors šios inhibicijos mechanizmas neaiškus, manoma, kad NK ląstelių proliferaciją, taip pat kaip ir T limfocitų, inhibuoja MKL sekretuojamas TGF- β 1 ir PGE-2 [Spaggiari et al., 2006]. MKL poveikis monocitų kilmės dendritinėms ląstelėms (DC) pasireiškia jų brendimo ir funkcijų inhibavimu. MKL kultivavimas su monocitais stipriai inhibavo diferencijuotų DC atsiradimą, o auginimas kartu su subrendusiomis dendritinėmis ląstelėmis nulėmė šių ląstelių MHC II, CD80 ir CD86 molekulių ekspresijos sumažėjimą [Jiang et al., 2005]. Nustatyta, kad MKL indukuota DC diferenciacijos ir funkcijos inhibicija priklauso nuo PGE-2 sekrecijos, padidėjusios po tarpląstelinio kontakto. Panašiai kaip T ląstelėse MKL sustabdo dendritinių ląstelių ciklą G0/G1 ciklo fazėse [Aggarwal and Pittenger, 2005; Ramasamy et al., 2007]. Mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciacijos procesas gali pakeisti jų savybę supresuoti imuninį atsaką. Nors *in vitro* eksperimentai rodo, kad diferenciacijos metu MKL imunomoduliacinės savybės išlieka, gauti *in vivo* rezultatai yra prieštaringi [Le Blanc et al., 2003]. Tą iliustruoja MKL, diferencijuotų į kaulinį audinį ant trimačio karkaso, imuninis atmetimas alogeninėse pelėse [Tasso et al., 2009]. Panašus eksperimentas su šunų modeliu buvo sėkmingas ir imuninis atmetimas neįvyko [Arinze et al., 2003].

Kitas svarbus atradimas yra tai, kad žmogaus ir pelių MKL gali indukuoti CD4+ CD25+ T limfocitų, turinčių reguliacinę funkciją (Treg) gamybą *in vitro* ir *in vivo*. Šis fenomenas yra svarbus supresuojant imuninį atsaką autoimuniniuose susirgimuose, MKL terapiniam efektui kolageno indukuotame artrite ir, deja, vėžinių ląstelių apsaugojimui. Manoma, kad Treg proliferaciją, šalia kitų faktorių, indukuoja MKL sekretuojamos neklasikinės MHC I molekulės [Djouad et al., 2006; Maccario et al., 2005; Selmani et al., 2008].

Paveikus IFN γ MKL gali veikti kaip antigeną prezentuojančios ląstelės (APC). Priešingai nei MHC I, kurio aptinkamas nedidelis kiekis, MHC II MKL paviršiuje nėra. Poveikis IFN γ padidina ir MHC I, ir MHC II ekspresiją. Įdomu tai, kad IFN γ indukuotas MHC II ekspresijos lygis, priešingai nei APC, mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse sumažėja paveikus jas didele IFN γ koncentracija [Tang et al., 2008]. Kitas neseniai nustatytas mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingas APC bruožas yra antigeninio svetimumo baltymo kros-prezentacija MHC I komplekse, sugebanti indukuoti specifinių CD 8+ T limfocitų proliferaciją *in vitro* ir *in vivo* [Francois et al., 2009].

Nors sukaupta nemažai duomenų apie MKL poveikį imuninei sistemai, šių ląstelių imunomoduliacinės savybės yra dar ne iki galo ištirtas fenomenas. Dauguma šiuo metu kuriamų terapijų, paremtų MKL, susijusios būtent su šia jų savybe, todėl imunomoduliacijos mechanizmų tyrimai yra ypatingai svarbi sritis.

2.2.5. Mezenchiminių kamieninių ląstelių migracija į pažeistą audinį

Manoma, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymi savybe kryptingai migruoti į pažeidimo židinį pradinėse pataloginio proceso stadijose. Tai yra kompleksiškas procesas, susijęs su atsiskyrimu nuo ekstraląstelinio matrikso, migracija iš pradinės nišos, išlikimu migracijos metu, invazija į naują audinį ir migravusių ląstelių sąveika su nauja mikroaplinka [Mehlen and Puisieux, 2006]. Pritraukiant MKL į patologijos židinį svarbų vaidmenį atlieka uždegimo metu išskiriami mediatoriai, chemokinai ir specifiniai faktoriai [Saito et al., 2002]. Šiuo metu yra nustatyta keletas signalinių kelių, susijusių su MKL migracija į

pažeidimo zoną. Įrodyta, kad hepatocitų augimo faktoriaus signalas yra susijęs su MKL mobilizacija ir patekimu į pažeistą audinį [Neuss et al., 2004]. Hipoksijos sąlygomis MKL migracija sužadinama FGF ir VEGF molekulėmis [Okuyama et al., 2006; Schmidt et al., 2006]. Manoma, kad MKL migracijos proceso reguliacija gali būti panaši į hemopoetinių kamieninių ląstelių, kurių vienas svarbiausių migracijos reguliatorių yra stromos kilmės faktorius SDF-1 [Dar et al., 2006]. Vėlesni MKL tyrimai parodė, kad blokuojant SDF-1 receptorių ląstelių migracinis gebėjimas nekinta [Ip et al., 2007]. Viena iš svarbiausių migruojančių ląstelių savybių – jų gebėjimas išvengti apoptozės-anoikio, kuri indukuoja substrato netekimas. Galima aktyvintų signalinių kelių reikšmė yra anti-apoptozinių molekulių, tokių kaip Akt/PKB, aktyvinimas supresuojant anoikio signalinį kelią [Benoit et al., 2007]. Vykstant migracijos procesui ekstraląstelinio matrikso degradacijoje dalyvauja proteolitiniai fermentai – matrikso metalo proteazės (MMP) [Ravanti and Kahari, 2000]. Lyginant greitai ir lėtai migruojančių MKL populiacijų MMP1 ekspresiją buvo parodyta šios proteazės reikšmė MKL migracijoje [Ho et al., 2009]. Vienas iš svarbiausių uždegiminės aplinkos komponentų yra neutrofilų gaminamos serino proteinazės, kurios remodeliuoja ekstraląstelinį matriksą, taip pat reguliuoja daugelio uždegimui svarbių citokinų ir jų receptorių aktyvumą [Wiedow and Meyer-Hoffert, 2005]. Natūralus neutrofilų gaminamų serino proteinazių inhibitorius yra antiproteinazė alfa1-antitripsinas (AAT). Uždegimo metu šio baltymo koncentracija sisteminėje kraujotakoje, taip pat pažeidimo židinyje padidėja keletą kartų [Law et al., 2006]. Tačiau AAT veikia ne tik kaip serino proteinazių inhibitorius, bet gali paveikti ir įvairias ląstelių funkcijas, tarp jų aktyvinti proliferaciją ir migraciją [Dabbagh et al., 2001; Janciauskiene et al., 2007].

2.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių kultivavimas *in vitro*

Mezenchiminės kamieninės ląstelės turi didelę terapinio panaudojimo perspektyvą, tačiau daugeliui gydymo metodikų, grindžiamų MKL, reikalingas didelis ląstelių kiekis, kuris gali būti gautas tik auginant jas *in vitro*. MKL

išskyrimas iš skirtingo amžiaus donorų ir iš skirtingų audinių naudojant skirtingus skyrimo protokolus, auginimas skirtingose terpėse ir skirtingomis sąlygomis gali suteikti ląstelėms nevienodas savybes [Mannello and Tonti, 2007]. Šių skirtumų padariniai dažniausiai yra nesutampantys tyrimų rezultatai ar nepavykę klinikiniai bandymai.

Išskirtos iš organizmo MKL patiria įvairių tipų pokyčių. Netekus kontakto su jas supusiomis ląstelėmis, pasikeitus deguonies koncentracijai, substratui, parakrininio signalo faktorių sudėčiai įvyksta grįžtami ir negrįžtami fiziologiniai pokyčiai. Auginant ląsteles *in vitro* keičiasi jų morfologija, paviršiaus žymenų ekspresija, citokinų ir augimo faktorių gamyba, augimo greitis ir gebėjimas diferencijuotis [Wagner and Ho, 2007]. Po 40–50 pasidalijimų atsiranda morfologinių senėjimo požymių, sulėtėja augimas [Fehrer and Lepperdinger, 2005]. Kadangi šie procesai tiesiogiai priklauso nuo MKL auginimo sąlygų, šiuo metu atliekama daug tyrimų, susijusių su optimalių auginimo sąlygų parinkimu.

2.3.1. Auginimo terpės sudėties įtaka mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms

Auginant MKL *in vitro* ir ruošiant ląsteles klinikiams bandymams kaip terpės priedas yra naudojamas fetalinis veršelio serumas (*fetal bovine serum*, FBS). Tiksliai FBS sudėtis nėra žinoma, todėl dažnai skirtingų gamintojų ir to paties produkto skirtingų gamybos serijų savybės labai skiriasi. Gyvulinės kilmės terpės komponentai taip pat kelia rimtą pavojų MKL ruošiant terapijos tikslams. Aktuali ir infekcijų grėsmė (zoonozės, prionai, virusai) [Shahdadfar et al., 2005]. Kadangi veršelio serumo baltymai patenka į ląstelės vidų ar gali prikibti prie ląstelių paviršiaus, transplantacijos metu jie veikia kaip antigenas ir gali sukelti nepageidaujamą imuninį atsaką [Heiskanen et al., 2007]. Yra aprašyta keletas ląstelėms auginti naudoto FBS sukeltų komplikacijų. Pacientams po pakartotinės terpėse su FBS kultivuotų T limfocitų ar dendritinių ląstelių transplantacijos išsivystė anafilaksinės reakcijos [Tuschong et al., 2002]. Taip pat išsiaiškinta, kad skeleto raumenų mioblastų kultivuotų terpėse su FBS, transplantacija sukėlė

skilvelių aritmijas ir pacientų mirtį [Chachques et al., 2004]. Šio tyrimo autoriai mano, kad šias komplikacijas galėjo sukelti naudotos terpės gyvulinės kilmės komponentai. Kitoje klinikinėje studijoje terpėse su FBS kultivuotos MKL buvo naudojamos *osteogenesis imperfecta* gydymui. Atlikus kraujo tyrimą, paciento kraujyje buvo aptikti antikūnai prieš jaučio serumo albuminą [Horwitz et al., 2002]. MKL kultūros sugebėjimas endocituoti terpėje esančius FBS komponentus buvo eksperimentiškai parodytas naudojant FITC fluorochromu pažymėtą FBS [Spees et al., 2004]. Panaudojus fluorescencinės mikroskopijos ir ELISA metodus pavyko nustatyti, kad su 100 milijonų standartinėmis sąlygomis išaugintų MKL asocijavu nuo 7 iki 10 mg FBS baltymų. Žinant, kad standartinė vienkartinė terapinė MKL dozė yra 2 – 4 milijonai ląstelių/kg kūno masės, buvo paskaičiuota, kad, persodinus 70 kg sveriančiam pacientui 140 milijonų MKL, į organizmą kartu patektų net apie 14 mg gyvulinės kilmės baltymų. FBS keliamų problemų padeda išvengti autologinis žmogaus serumas (AS) [Dimarakis and Levicar, 2006]. Autologinis serumas gali būti sėkmingai naudojamas išskiriant ir dauginant mezenchiminės kamieninės ląsteles [Stute et al., 2004]. Žmogaus MKL šiame serume proliferuoja greičiau, bet diferenciacija yra lėtesnė, nei ląstelių, augintų terpėje su FBS. Lyginant MKL, augintų terpėje su FBS ir AS, genų ekspresiją įrodyta, kad FBS stipriau aktyvina diferenciacijos procesus [Shahdadfar et al., 2005]. Tačiau autologinio serumo kiekiai dažnai yra riboti, jis netinkamas ir kai kurių susirgimų atveju. Kaip alternatyvą bandoma naudoti alogeninį žmogaus serumą, tačiau jo tinkamumas MKL auginimui vertinamas prieštaringai. Vienu autorių duomenimis, auginant terpėje su alogeniniu žmogaus serumu, MKL pasidalina tik kelis kartus, gali pasiekti tik 60 % paviršiaus padengimą, o augimas sustoja jau po pirmo persėjimo [Shahdadfar et al., 2005; Spees et al., 2004]. Kitiems autoriams, priešingai – sėkmingai pavyko auginti MKL naudojant terpę su alogeniniu serumu [Anselme et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002]. Šių nesutapimų priežastis gali būti skirtinga alogeninio serumo sudėtis, todėl ateityje turi būti nustatyti aiškūs serumo tinkamumo MKL kultivavimui kriterijai.

Kadangi suaugusio žmogaus serumas nepasižymi dideliu augimo faktorių kiekiu, greitam MKL padauginimui yra bandoma naudoti trombocitais praturtintą plazmą (*platelet rich plasma*). Šio tipo serume yra padidintas kiekis augimui svarbaus augimo faktoriaus – PDGF. Tyrimai, kuriuose buvo palygintas terpių su skirtingais serumais (FBS, alogeninis žmogaus serumas, trombocitais praturtinta plazma) poveikis mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, parodė, kad alogeninis žmogaus serumas ir trombocitais praturtinta plazma yra tinkama alternatyva auginant tiek kaulų čiulpų MKL [Bieback et al., 2009], tiek riebalinio audinio MKL [Kocaoemer et al., 2007].

Nustačius MKL proliferacijoje dalyvaujančius signalinius kelius, yra bandoma naudoti beseruminę auginimo terpę, praturtintą augimo faktorių rinkiniu [Agata et al., 2009; Ng et al., 2008]. Beseruminė terpė yra patraukli alternatyva, kadangi nelieka ksenogeninio FBS keliamų problemų, nesunkiai pasiekiamas atsikartojamumas. Komercinių sintetinių serumo pakaitalų tinkamumas MKL auginimui tyrinėtas keliuose straipsniuose. Specialiai kurtas kamieninių ląstelių auginimui STEMPRO (Invitrogen) serumo pakaitalas pilnai tiko kaulų čiulpų kilmės MKL padauginimui [Agata et al., 2009]. Nežiūrint FBS ir sintetinio serumo pakaitalo poveikio panašumų, autoriai nustatė, kad terpėje su STEMPRO kaulų čiulpų MKL buvo mažesnės, greičiau dauginosi, geriau diferencijavosi osteogenine kryptimi, pasižymėjo stipresne paviršiaus žymens CD105 ir mažesne CD146 ekspresija. Panašūs tyrimai atlikti ir su riebalų kilmės mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis. Palyginus terpės su FBS ir su STEMPRO serumo pakaitalu poveikį riebalų kilmės MKL buvo nustatytas žymiai didesnis proliferacijos greitis ir gebėjimas diferencijuotis auginant beseruminėje terpėje [Lindroos et al., 2009]. Paviršiaus žymenų ekspresija skyrėsi nežymiai – beseruminėje terpėje CD49d ekspresija sumažėjo trečdaliu, CD44, CD166 tiek pat padidėjo. Pažymėtina, kad šiame tyrime CD146 ekspresijos riebalinio audinio MKL iš viso nebuvo nustatyta. Kitas sintetinis serumo pakaitalas, naudotas MKL kultivavimo *in vitro* tyrimuose, buvo Ultroser G (Pall Biosepra). Tikrinant jo poveikį kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms nustatytas žymiai

geresnis proliferacijos greitis ir gebėjimas diferencijuoti nei auginant terpėje su FBS [Meuleman et al., 2006]. Kadangi terpėje su Ultroser G MKL buvo padaugintos per palyginti trumpą laiką, autorių nuomone, terpė su šiuo serumu pakaitalu yra optimali ląstelių kultivavimui *ex vivo* ir gali būti naudojama klinikiams tikslams. Tačiau žinant, kad ląstelių veiklą reguliuoja daugybė tiek žinomų, tiek dar nenustatytų signalinių kelių, prieš rutininį beseruminės terpės naudojimą dar būtina atlikti nemažai tyrimų.

2.3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos sudėtis

Mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacija sudaryta iš skirtingu greičiu besidalijančių ląstelių. Viena iš svarbiausių charakteristikų, apibūdinančių šią MKL kultūros atsinaujinimo savybę, yra kolonijų formavimas. Viena proliferuojanti ląstelė intensyviai dalindamasi turi savybę suformuoti makroskopiškai matomą koloniją (1 – 10 mm). Ankstyvuose persėjimuose esant mažam MKL tankiui dalis ląstelių pasižymi ypatingai dideliu proliferacijos greičiu pasidalindamos mažiau nei kas 12 val. [Sekiya et al., 2002]. Susiformavusios MKL kolonijos skiriasi savo dydžiu, morfologija ir augimo greičiu. Klonavus pirminę MKL kultūrą nustatyta, kad dideles kolonijas sudarančios mažos verpstės formos ląstelės pasižymi žymiai didesnėmis diferenciacinėmis ir proliferacinėmis galimybėmis, kai tuo tarpu mažoms kolonijoms būdingos didesnės ir plokščios ląstelės dauginasi lėčiau ir jų gebėjimas diferencijuotis yra silpnesnis [Colter et al., 2000; Digirolamo et al., 1999]. Pačias MKL kolonijas taip pat sudaro ne vieno tipo ląstelės. Išskiriamos vidinė ir išorinė kolonijų sritys, kurias sudarančių ląstelių savybės skiriasi [Ylostalo et al., 2008]. Vidinio kolonijos regiono ląstelės nuo išorinio skyrėsi lėtesniu dalijimusi ir atsiradusia su diferenciacijos procesu susijusių baltymų gamyba. Kolonijas paveikus adipogenine diferenciacijos terpe, diferenciacija prasideda vidiniame regione. Tačiau prediferencijuota šios kolonijos srities būsena buvo grįžtama. Persėjus vidinės ir išorinės kolonijos srities ląsteles, jos pasižymėjo vienodomis diferenciacijos, proliferacijos ir kolonijų formavimo savybėmis [Ylostalo et al., 2008; Prockop, 2009]. Tačiau pastebėta, kad MKL

klonogeniškumas ir diferenciacija sumažėja negrįžtamai leidus ląstelėms augti iki 100% substrato paviršiaus padengimo [Lee et al., 2009a].

Kolonijų formavimas mezenchiminėse kamieninėse ląstelių kultūrose yra skirtingas ir priklauso nuo donoro, ląstelių išskyrimo iš audinio protokolo ir auginimo sąlygų. Lyginant skirtingų donorų kaulų čiulpų MKL klonogeniškumas buvo nuo 3% iki 28% ir nepriklausė nuo lyties ar amžiaus. Be to, kultivuojant ląsteles *in vitro* jų savybė formuoti kolonijas silpnėjo ir 12-ame persėjime visai išnyko [Digirolamo et al., 1999]. Kadangi MKL klonogeniškumas yra susijęs su šių ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos savybėmis, jo nustatymas svarbus įvertinant šias ląstelių savybes. Bandant praturtinti ląstelių kultūrą kolonijas formuojančiomis ląstelėmis yra bandoma nustatyti tik joms būdingus paviršiaus žymenis. Buvo nustatyta, kad ląstelės, turinčios PDGF receptorių ir CD146 paviršiaus žymenį, pasižymi didesniu klonogeniškumu ir stipresne diferenciacija [Schwab and Gargett, 2007]. Tačiau kitų autorių duomenimis greitai besidalijanti ir kolonijas formuojanti ląstelių populiacija ekspresuoja VEGFR, CD44, bet neturi PDGF receptoriaus [Colter et al., 2001].

3. METODAI

3.1. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas iš riebalinio audinio

Mezenchimines kamienines ląsteles išskyrėme iš riebalinio audinio, gauto po krūtų ir pilvo plastinių operacijų (riebalų nusiurbimo) pagal aprašytą metodiką [Zuk et al., 2001] su nežymiais pakeitimais. Tyrimams buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas (2005 11 29 Nr.: 56).

15–20 g riebalinio audinio buvo plaunama steriliu fosfatiniu buferiu (PBS). Riebalų masė suspenduota vienodo tūrio I tipo kolagenazės (Biochrom) tirpale (0,2% kolagenazės DMEM terpėje su 1 % BSA, 100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) ir mechaniškai susmulkinta. Homogenatas purtant laikytas inkubatoriuje 45 min 37°C temperatūroje. Stambūs audinio fragmentai pašalinti filtruojant per sterilų nailoninį audinį ir 100 µM filtrą. Centrifuguota 630 x g, 10 min. Supernatantas su riebaline mase pašalintas, nuosėdos (stromos-kraujagyslių frakcija) suspenduotos eritrocitų lizės buferyje (160 mM NH₄Cl) ir laikytos 20 minučių. Ląstelės nusodintos centrifuguojant 630 x g, 10 min, resuspenduotos DMEM (Hyclone) terpėje ir suskaičiuotos. Ląstelių suspensija padalyta į keturias lygias dalis ir išsėta į keturias skirtingos sudėties terpes, kuriose buvo:

- 1.10 % fetalinio veršelio serumo (FBS), (Hyclone);
- 2.10 % fetalinio veršelio serumo, kuris gamintojo buvo specialiai pritaikytas MKL auginimui (FBS-Sp), (Invitrogen);
- 3.10 % žmogaus alogeninio serumo (ŽS), (Lonza);
- 4.2 % sintetinio serumo Ultroser G (U), (Biosepra).

Skirtingi serumai visais atvejais buvo dedami į bazinę to paties gamintojo (Hyclone) DMEM terpę, kurioje buvo 2 mM glutamino, 1 mM natrio pirofosfato, 1 g/l gliukozės, 100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino.

3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas iš pieninių dantų pulpos

Pieninio danties pulpos mezenchiminės kamieninės ląstelės išskirtos pagal aprašytą metodiką [Miura et al., 2003] su nežymiais pakeitimais.

Iškritęs pieninis dantis laikytas 4 °C temperatūroje DMEM (Hyclone) terpėje su 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu (Biological Industries) ne ilgiau 24 val. MKL skyrimo metu pieninis dantis tris kartus plautas steriliu PBS tirpalu su antibiotikais (200 VV/ml penicilino ir 200 µg/ml streptomicino ir 2,5 µg/mL amfotericino B (Biological Industries)). Danties pulpa iš pulpos kameros pašalinta mechaniškai, naudojant sterilią adatą. Pulpos audinys mechaniškai susmulkintas, suspenduotas 1 ml I tipo kolagenazės (Biochrom) tirpale (3 U/ml, DMEM terpėje su 1 % BSA, 100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) ir 60 min inkubuotas 37 °C temperatūroje. Homogenatas skiestas 1:10 santykiu DMEM (Hyclone) terpėje ir centrifuguotas 250 x g, 15 min kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, nuosėdų frakcija suspenduota 5 ml auginimo terpės (DMEM su 10 % FBS (Hyclone), 2 mM glutamino, 1 mM natrio pirofosfato, 1 g/l gliukozės ir antibiotikais (100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) ir išsėta į 25 cm² flakoną. Kitą dieną prie plastiko neprikibusios ląstelės pašalintos plaunant 37°C DMEM terpe, likusios substratinės ląstelės augintos DMEM auginimo terpėje su 10% FBS ir antibiotikais (100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino).

3.3. Ląstelių auginimas

Auginimo terpės (sudėtis aprašyta aukščiau) buvo keičiamos du kartus per savaitę. Ląstelių kultūrai pasiekus 70–80% kultivavimo indo paviršiaus padengimą, ląstelės persėtos. Persėjant ląstelės 3 kartus plautos šiltu PBS buferiu, atkabintos nuo substrato naudojant 0,25% tripsino/1 mM EDTA tirpalą (Hyclone) ir resuspendavus auginimo terpėje išsėtos į naujus auginimo indus. Ląstelės augintos drėkinamame inkubatoriuje su 5 % CO₂, 37°C temperatūroje.

3.4. Ląstelių augimo greičio įvertinimas

Augimo greičio skaičiavimui ląstelės buvo sėtos po 2500, 7500 ir 25000 ląstelių į $1,9 \text{ cm}^2$ ploto 24 šulinėlių lėkšteles, naudojant tris pakartojimus. Skaičiuota kas 24 val., naudojant Neubauer skaičiavimo kamerą. Pirmas skaičiavimas buvo vykdomas po 24 val. nuo išsėjimo, antras – po 48 val., trečias – po 72 val., ketvirtas – po 96 valandų. Kiekvieną dieną buvo skaičiuojamas aritmetinis kiekvieno ląstelių tipo skaičiaus vidurkis (kol ląstelės pasiekė 100% konfluenciją).

Ląstelių augimo greitis taip pat buvo įvertintas spektrofotometru. Naudojome augimo greičio skaičiavimo rinkinį su XTT reagentu (Biological Industries). Absorbicija skaičiuota spektrofotometru Asys UVM 340, bangos ilgis – 475 nm. Šiems eksperimentams ląstelės buvo sėjamos į 24 šulinėlių ($1,9 \text{ cm}^2$ ploto) lėkšteles po 2500 ir 5000 ląstelių į šulinėlį, naudojant tris atkartojimus. Skaičiuota kas 24 valandos. Pirmas skaičiavimas buvo vykdomas po 24 val. nuo išsėjimo, antras – po 48 val., trečias – po 72 val., ketvirtas – po 96 valandų. Kiekvieną dieną buvo skaičiuojamas aritmetinis ląstelių skaičiaus vidurkis, įvertinus skirtingo pradinio ląstelių skaičiaus šulinėlyje duomenis. Pagal gautus rezultatus buvo sudaromos augimo kreivės.

Populiacijos padvigubėjimo laikas buvo skaičiuojamas pagal augimo kreives. Analizuodami skirtingų ląstelių kultūrų augimo kreives, eksponentinėje augimo fazėje pasirinkome tris periodus, per kuriuos ląstelių skaičius padvigubėjo. Išvedę aritmetinį vidurkį, apskaičiavome populiacijos padvigubėjimo laiką.

3.5. Ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimas

Vieno paviršiaus žymens matavimui buvo imama po 0,5 mln. ląstelių. Ląstelės buvo atkabinamos nuo substrato naudojant tripsino/EDTA tirpalą arba 5 mM EDTA PBS tirpalą. Plauta du kartus šaltame PBS tirpale. Į 200 μl ląstelių suspensijos PBS tirpalą dėta 2 μl fluorochromu žymėto antikūno ir 30 min inkubuota lede. Du kartus buvo plaunama šaltu PBS, ląstelės 30 min fiksuotos 4 % paraformaldehido tirpalu (suspensijos tūris 300 μl) lede tamsoje. Prieš tyrimą

centrifuguota 500 x g 5 min, supernatantas pašalintas, ląstelės buvo resuspenduotos 500 µl PBS tirpale ir naudotos tėkmės citometrijos tyrimuose.

Tyrimams naudojome šiuos antikūnus: CD34-FITC, CD45-FITC, CD105-APC (Invitrogen), CD14-PE (Santa Cruz Biotechnology), CD73-PE, CD146-PE (BD), CD90-FITC (Millipore). Nespecifinės fluorescencijos signalų įvertinimui naudojome atitinkamais fluorochromais žymėtą antikūno izotipinę kontrolę.

Tėkmės citometrinius tyrimus buvo vykdoma FACS Aria aparatu (BD Biosciences). Duomenų analizei naudojome BD FACSDiva (BD Biosciences) programinę įrangą.

3.6. Diferenciacijos inicijavimas adipogenine ir osteogenine kryptimis

Adipogeninės diferenciacijos tyrimui ląstelės buvo sėjamos $5 \times 10^2/\text{cm}^2$ koncentracija į 35 mm diametro plastiko lėkštes. Kultūroms pasiekus 80 – 90% kultivavimo indo paviršiaus padengimą, ląstelės buvo veikiamos adipogeninės indukcijos mišiniu (StemCell Technologies). Adipogeninės indukcijos mišinys buvo keičiamas du kartus per savaitę. Kontrolinės kultūros buvo auginamos įprastinėje auginimo terpėje.

Po 3 savaičių adipogeninė diferenciacija buvo vertinama citochemiškai pagal viduląstelinį lipidų susikaupimą. Ląstelės plautos PBS tirpalu, fiksuotos 4 % paraformaldehido tirpale kambario temperatūroje 30 minučių. Vėl plautos PBS tirpalu, lipidai dažyti inkubuojant 1 valandą Oil Red O (Sigma) tirpale.

Osteogeninės diferenciacijos indukcijai ląstelės buvo sėjamos $5 \times 10^2/\text{cm}^2$ koncentracija į 35 mm diametro plastiko lėkštes. Kultūroms pasiekus 70 – 80% kultivavimo indo paviršiaus padengimą, ląstelės buvo veikiamos osteogeninės indukcijos mišiniu (StemCell Technologies), į kurį pagal gamintojo instrukciją papildomai dėjome deksametazono (galutinė koncentracija 10^{-8}M) ir askorbo rūgšties (galutinė koncentracija 50 µg/ml). Ląstelėms pradėjus formuoti daugybinius sluoksnius (*multilayering*) į osteogeninės indukcijos mišinį papildomai buvo dedama β-glicerofosfato (galutinė koncentracija 10^{-6}M). Osteogeninės indukcijos mišinys buvo keičiamas du kartus per savaitę.

Osteogeninė diferenciacija buvo vykdoma 2 – 3 savaites. Kontrolinės kultūros buvo auginamos įprastinėje kultivavimo terpėje.

Osteogeninė diferenciacija buvo vertinama citochemiškai, dažant kaulinio audinio ekstraląsteliniam matriksui būdingas hidroksiapatitų sankaupas sidabro nitratu (von Kossa metodas). Ląstelės plautos PBS tirpalu, fiksuotos 4 % paraformaldehido tirpale kambario temperatūroje. Plautos dejonizuotu vandeniu ir inkubuotos su 1 % sidabro nitrato tirpalu 30–60 min kambario temperatūroje po šviesos šaltiniu. Fiksuotos 5 % natrio tiosulfato tirpale 5 minutes.

Osteogeninė diferenciacija taip pat buvo vertinama dažant ląsteles alizarino raudonuoju dažu (nudažomos kalcio sankaupos būdingos kauliniam audiniui). Ląstelės buvo plaunamos PBS tirpalu, fiksuojamos 4 % paraformaldehido tirpale kambario temperatūroje 20 minučių. Plautos dejonizuotu vandeniu ir 5 min inkubuotos su 2 % alizarino raudonuoju tirpalu (pH 4,2).

3.7. RNR išskyrimas

Ląstelių kultūra buvo auginama DMEM terpėje su atitinkamu serumu iki 80–90% konfluencijos. Nuplovus šiltu PBS buferiu ląstelės lizuotos auginimo inde TRIzol reagentu (Invitrogen) pagal gamintojo rekomendacijas. Lizei naudota 0,3 ml TRIzol reagento/10 cm² indo paviršiui, kuriame buvo auginamos ląstelės. Lizuoti mėginiai inkubuoti 5 min kambario temperatūroje. Pridėta 1/5 tūrio chloroformo. Sandariai uždaryti mėgintuvėliai buvo supurtomi 15 s ir 2–3 min inkubuojami kambario temperatūroje. Mėginiai centrifuguoti 12000 x g, 10 min, 4°C temperatūroje. Vandeninė fazė atskirta ir sumaišyta su izopropanoliu (0,5 ml izopropanolio/1 ml TRIzol reagento). Užpylus izopropanolio, mišinys buvo inkubuojamas kambario temperatūroje 10 min, centrifuguojamas 12000 x g, 10 min, 4 °C temperatūroje. Išsodinta RNR plauta 75 % etanolio tirpalu (ne mažiau 1 ml etanolio tirpalo 1 ml TRIzol reagento). Išsodinta ir plauta RNR trumpai padžiovinta ir ištirpinta vandenyje be RNAzių. RNR koncentracija įvertinta spektrofotometru 260/280 nm bangos ilgiu.

3.8. Komplementarios DNR sintezė

Atvirkštinės transkriptazės reakcija (pirmos komplementarios DNR (kDNR) grandinės sintezė) buvo atliekama naudojant 20 μ l Revert Aid M-MuLV Reverse transkriptazės rinkinį (Fermentas). Mėgintuvėlyje sumaišyta 3 μ g RNR ir 100 pmol dT pradmenų. Tirpalo tūris buvo papildomas dejonizuotu vandeniu iki 12 μ l ir inkubuojamas +70°C 5 min. Patalpinus mėgintuvėlį ant ledo, į jį įdėta 4 μ l 5x reakcijos buferio (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 μ l ribonukleazijų inhibitoriaus (20u/ μ l) ir 2 μ l dNTP (10 mM). Sumaišyta, centrifuguota. Mišinys buvo inkubuojamas +37°C 5 minutes. Įdėta 1u RevertAid™ M-MuLV atvirkštinės transkriptazės (Fermentas). Reakcijos mišinys inkubuotas +37 °C 60 minučių. Komplementarios DNR grandies sintezė buvo sustabdyta pakaitinus reakcijos mišinį 10 min +70 °C temperatūroje.

3.9. Realus laiko polimerazinė grandininė reakcija

Realus laiko polimerazinė grandininė reakcija (qPGR) buvo atliekama su MX3005P® (Stratagene) aparatu. Tiriamų genų (*osteopontin*, *Msx2*, *PPAR γ*) ekspresija tirta su dvigrande DNR besijungiančiu dažu (SYBR-Green), naudojant Maxima SYBR Green qPCR Master reakcijos mišinį (Fermentas). Kiekviena tyrime naudotų tiriamų genų pradmenų pora (4 lentelė) buvo analizuojama naudojant standartinę kreivę su skirtingais kDNR skiedimais (nuo 0,125 iki 1 μ l), tikrinant produkto lydymosi temperatūrą ir produkto dydį agarozės gelyje. Siekiant patvirtinti qPGR reakcijų patikimumą, įvertintas nuokrypis (*slope*) ir reakcijos efektyvumas. Pradmenų sekos pateikiamos 2 lentelėje.

Tyrimo 25 μ l qPGR tūryje naudota 0,5 μ l kDNR mišinio ir 0,1 μ M pradmenų. Polimerazinėje grandininėje reakcijoje po 10 min inkubacijos +95°C temperatūroje buvo vykdomi 45 PGR ciklai:

1. +95°C – 20s
2. +55°C – 40s
3. +72°C – 40s

Reakcijos produktai buvo analizuojami nustatant jų lydymosi temperatūrą nuo +55°C iki +95°C, keliant temperatūrą kas 0,5°C.

Gauti SYBR Green dažo fluorescencijos duomenys buvo koreguojami pasyviu dažu ROX. Kaip negatyvi kontrolė naudotas atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinys be RNR (no-RT) bei reakcija be DNR (*no template control*, NTC). Susintetinta kDNR realaus laiko polimerazinėse grandininėse reakcijose buvo normalizuojama tikrinant stabiliai ekspresuojamą β -aktino geną. Gauti rezultatai analizuoti naudojant MxPro programą (4 versija) (Stratagene) remiantis $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu [Livak and Schmittgen, 2001]. Kalibracijai naudojome ląsteles, augintas terpėje su FBS (augančių ląstelių tyrimas) arba nediferencijuotas ląsteles (kontrolinės) (ląstelių diferenciacijos tyrimas). Eksperimentus du kartus pakartojome, atlikome du nepriklausomus tyrimus. Rezultatai pateikti su MxPro programos suskaičiuotomis paklaidomis, atspindinčiomis nuokrypius tarp pakartojimų, ir įvertinant normalizatoriaus netikslumus.

Statistinei analizei palyginti dvi grupės naudojome Stjudento t testą. Kelių grupių palyginimas buvo atliktas naudojant vieno koeficiento dispersijos analizę (Anova). Skirtumai įvertinti kaip patikimi, kai $p < 0,05$.

2 lentelė. Realaus laiko polimerazinėse grandininėse reakcijose naudoti pradmenys ir jų charakteristika

Genas	Pradmenų seka (5' to 3')	Produkto dydis, bp	Nuokrypis (<i>Slope</i>)	Efektyvumas %
β -aktinas	Forward TGACGGGGTCACCCACACTGTGCC	660	-3.39	97.4
	Reverse TAGAAGCATTGCGGTGGACGATG			
Msx2	Forward GCCATTTTCAGCTTTTCCAG	229	-3.55	91.3
	Reverse CCCTGAGGAAACACAAGACC			
Osteopontinas	Forward AGCCAGGACTCCATTGACTCGAAC	416	-3.38	97.6
	Reverse GTTTCAGCACTCTGGTCATCCAGC			
PPAR γ	Forward GCTCTAGAATGACCATGGTTGAC	269	-3.50	93.1
	Reverse ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC			

3.10. Kolonijų formavimo efektyvumo indekso apskaičiavimas

Kolonijų formavimo efektyvumas (KFE) apskaičiuotas pirminę kultūrą išsėjant po 100, 200, 500 ir 1000 ląstelių į 9,5 cm² ploto lėkšteles. Po 7 dienų susiformavusios kolonijos suskaičiuotos, mikroskopu įvertintas jų dydis ir morfologija. KFE apskaičiuotas pagal formulę: kolonijų skaičius lėkštelėje/išsėtų ląstelių skaičius x 100 %. Palygintas kolonijų formavimo efektyvumas lėkštelėse su skirtingu ląstelių išsėjimo tankiu ir išvestas KFE vidurkis.

3.11. Pirminės kultūros individualių ląstelių klonų išskyrimas

Pirminės kultūros klonavimui naudojome riboto praskiedimo metodiką (*limiting dilution*). Persėjant suskaičiuotos ląstelės buvo suspenduojamos įprastinėje auginimo terpėje po 3 ląsteles/ml ir po 100 µl išsėtos į 96 šulinėlių plokštelę (galutinė koncentracija 0,3 ląstelės šulinėlyje). Šulinėliai kiekvieną dieną buvo tikrinami mikroskopu. Šulinėliai, kuriuose aptikta po vieną koloniją, buvo pažymimi. Ląstelių kolonijai šulinėlyje pasiekus maksimalų dydį, jos buvo persėjamos paskleidžiant į 12,5 cm² flakonus.

3.12. Mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikis alfa1-antitripsinu

Alfa1-antitripsino (AAT) poveikio MKL proliferacijos, migracijos, proteolitinio aktyvumo ir kt. tyrimuose prieš eksperimentą ląstelių auginimo terpė su serumu buvo nusiurbama, ląstelės du kartus plautos šiltu PBS tirpalu ir užpilta DMEM terpė (be serumo ir antibiotikų). Po 12 valandų buvo atliekami AAT poveikio ląstelėms eksperimentai pridedant 0,5 mg/ml, 1mg/ml arba 5 mg/ml žmogaus alfa1-antitripsino baltymo (Bayer), ištirpinto DMEM terpėje.

3.13. Ląstelių migravimo tyrimai

Ląstelių migravimo eksperimentai buvo vykdomi naudojant daugkartinę Boyden tipo kamerą (Neuroprobe) ir polikarbonatinę membraną, kurios porų diametras 8 µm. Prieš surenkant kamerą membrana buvo padengiama 50 µg/ml

Matrigeliu (BD Biosciences) +37°C temperatūroje. Ląstelės 12 val. laikytos terpėje be serumo (kontrolė) arba 12 val. terpėje, į kurią buvo įdėta 0,5 mg/ml, 1mg/ml arba 5 mg/ml alfa1-antitripsino. Ląstelės buvo atkabintos nuo substrato, suspenduotos DMEM terpėje ir įdėtos į viršutinį šulinėlį. Į apatinį šulinėlį buvo dedama terpė su 10 % FBS. Migravimo kamera buvo inkubuojama per naktį inkubatoriuje 5 % CO₂, +37 °C temperatūroje. Po inkubavimo membrana išimta iš aparato, nuo išorinės membranos pusės mechaniškai pašalintos ląstelės, vidinėje pusėje esančios migravusios ląstelės dažytos May-Grünwald-Giemsa dažais pagal anksčiau aprašytą metodiką [Schulte and Wittekind, 1989]. Membrana nuplauta PBS, 15 min. šaltai (+4°C) fiksuota metanolyje, išdžiovinta kambario temperatūroje ir 15 min inkubuota su May-Grünwald dažų. Plauta vandeniu, 15 min inkubuota su Giemsa dažų, plauta vandeniu ir įvertinta mikroskopu. Per membraną migravusios ląstelės suskaičiuotos atsitiktinai pasirinktuose regėjimo laukuose, išvedant aritmetinį vidurkį.

Migracijos skirtumai taip pat buvo vertinami panaudojant „žaizdos gijimo“ (*wound healing*) metodą. Kontrolinių arba kultivuočių su įvairiomis AAT koncentracijomis ląstelių monosluoksnyje buvo padaromas įbrėžimas ir po 12 val. mikroskopu stebimas defekto uždengimas.

3.14. Želatinazinio aktyvumo įvertinimas

Ląstelių, paveiktų AAT (koncentracijos 0,5 mg, 1 mg, 5 mg), supernatantai buvo surenkami ir analizuojami 10 % poliakrilamidiniuose Tris-glicino geliuose su 0,1 % kopolimerizuota želatina (substratas). Po elektroforezės gelis plautas su 2,5 % Triton X-100 tirpalu ir +37°C temperatūroje 20 val. inkubuotas 50 mmol/l Tris-HCl buferyje (pH 8,0), turinčiame 0,5 mmol/l CaCl₂ ir 1 mmol/l ZnCl₂. Gelis dažytas su Coomassie blue R-250 (Fermentas), po to blukintas ir analizuotas. MMP aktyvumas buvo nustatomas pagal šviesių juostelių atsiradimą mėlyname fone, o MMP tipas – pagal molekulinę masę.

In situ zimoigrafijai naudojome EnzCheck želatinazės aktyvumo nustatymo rinkinį (Molecular Probes) pagal gamintojo rekomenduojamą protokolą.

Kontrolinės ir AAT paveiktos ląstelės 30 min buvo inkubuojamos su DQ-želatinos-FITC +37⁰C temperatūroje, plautos PBS buferiu ir stebėtos fluorescenciniu mikroskopu. DQ-želatinos-FITC substratas naudotas ląstelių kultūrų želatinolitiniam aktyvumui tirti (fluorescuoja po suskaldymo).

3.15. Imunofluorescentinė mikroskopija

Imunofluorescentinės mikroskopijos tyrimui ląstelės augintos 24 šulinėlių (šulinėlio plotas 2 cm²) plokštelėse (Falcon, Becton Dickinson) ant mikroskopinių dengiamųjų stiklelių. Po poveikio ATT MKL du kartus plautos PBS (pH 7,3) buferiu be Ca²⁺, fiksuotos 4 % paraformaldehido (PFA) tirpalu 30 min kambario temperatūroje, tris kartus plautos PBS tirpalu ir ląstelių membranos permeabilizuotos 0,1 % Triton X-100/PBS tirpalu 5 minutes kambario temperatūroje. Po to tris kartus buvo plaunama PBS ir vieną kartą 1 % BSA/PBS tirpalu. Blokavimas buvo atliekamas 30 min 1 % BSA/PBS tirpalu kambario temperatūroje. Inkubacija su pirminiais antikūnais vyko blokavimo buferyje kambario temperatūroje. Po 60 min keturis kartus buvo plaunama PBS ir vieną kartą 1 % BSA/PBS tirpalu. Inkubuota su antriniais antikūnais, konjuguotais su Alexa Fluor® 488 arba Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes), skiedimo santykis 1:400. Inkubacija vyko 30 min kambario temperatūroje tamsoje. Buvo plaunama tris kartus PBS tirpalu, trumpai pamirkoma PBS su 1µg/ml DAPI ir vėl plaunama tris kartus PBS tirpalu. Po dažymo dengiamieji stikleliai perkelti ant objektyvinio stiklelio su dengiamosios terpės (Dako) lašu. Paruošti stikleliai buvo laikomi +4⁰C temperatūroje tamsoje.

Tyrimams buvo naudojamas fluorescentinis mikroskopas Eclipse TE 2000 su DS-2M skaitmenine kamera (Nikon) ir Nis-Elements BR programinė įranga (Nikon). Konfokalinei mikroskopijai naudotas Bio-Rad Radiance 2100 (Carl Zeiss) lazerinis skenuojantis konfokalinis mikroskopas, nuotraukos apdorotos Image Space Software programine įranga (Molecular Dynamics).

3.16. Ląstelių lizatų ruošimas ir imunobloto analizė

Ląstelės buvo plaunamos šaltu PBS (pH 7,3) tirpalu du kartus ir lizuotos lizės buferyje (1 % NP-40, 1 % natrio dezoksicholato, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA, 1 x Complete (proteazių inhibitorių kokteilis), 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF) 30 min + 4°C temperatūroje. Pridėta 2,5 VV/ml benzonazės (Merck) ir ląstelių lizatai homogenizuoti per 21 G adatą. Centrifuguota 15000 x g, 30 min +4°C temperatūroje. Supernatanto frakcija buvo surinkta, išfasuota ir saugota –70°C temperatūroje.

Baltymų ekstraktų mėginiai SDS-poliakrilamido gelio elektroforezei (SDS/PAGE) paruošti į 100 µl baltymų ekstraktą įpilant 12,5µl pavyzdžio buferio (0,5M Tris/HCl pH 6,8, 30 µl 10 % SDS, 20 µl 0,5 M DTT, 20 µl glicerino, 5 µl 0,5 % bromfenolio mėlio). Mėginiai buvo virinami 5 min ir tuoj pat naudojami elektroforezei arba saugomi –70°C temperatūroje. SDS/PAGE elektroforezei buvo naudojami 12 % SDS-poliakrilamido geliai, elektroforezės buferis (25 mM bazinio Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS) ir elektroforezės aparatas Mini Protean (Biorad); elektroforezės sąlygos: srovės stiprumas 30 mA/geliui, laikas: 1,5 valandos. Po SDS/PAGE elektroforezės baltymai buvo pernešami ant Immobilon PVDF membranos (Biorad) naudojant aparatą Mini Transblot cell (Biorad). Baltymų pernešimas buvo vykdomas pernešimo buferyje (48 mM bazinio Tris, 40 mM glicino, 20 % metanolio, 0,01 % SDS) 12 valandų esant 125 mA srovės stiprumui.

PVDF membranos buvo blokuojamos bloto buferyje (5 % sauso pieno, ištirpinto PBS tirpale, turinčio 0,1 % Tween-20) 1 val. kambario temperatūroje, po to nuplautos PBS tirpalu, turinčiu 0,18 % Tween-20 (PBS-Tween-20) ir inkubuotos su pirminiais antikūnais 1 val. kambario temperatūroje arba per naktį +4°C temperatūroje. Tyrime naudoti totaliniai anti-PKD antikūnai (Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfo-PKD (pSer916 ir pSer744/748), anti-PKB (Akt), anti-fosfo-PKB (pThr308 ir pSer473) ir anti-ERK bei anti-fosfo-ERK antikūnai (Cell Signaling Technology), skiesti bloto buferyje santykiu 1:1000. Lizatuose AAT tirtas naudojant anti-AAT antikūnus (Dako) skiedžiant 1:2500. Po inkubacijos su

pirminiais antikūnais membranos buvo plaunamos su PBS-Tween-20 tirpalu tris kartus po 5 min ir inkubuotos su antriniais antikūnais, konjuguotais su krienų peroksidaze (Pierce), praskiestais bloto buferyje santykiu 1:2000, 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos su antriniais antikūnais membranos buvo plaunamos penkis kartus po 5 min PBS-Tween-20 buferiu ir analizuojamos naudojant ECL reagentus (General Electric) pagal gamintojo metodiką. Naudojant tas pačias membranas analizei su kitais antikūnais, jos 2 val. buvo plaunamos nuo naudotų antikūnų glicino buferyje (0,1 M glicino, pH 2,9) kambario temperatūroje smarkiai kratant, po to plautos PBS-Tween-20 tirpalu.

3.17. Ląstelių baltymų išskyrimas ir dvikryptė elektroforezė

Ląstelių citozolio ir branduolių baltymų išskyrimui naudojome rinkinį iš Sigma-Aldrich pagal gamintojo protokolą su nežymiais pakeitimais. Atkabintos nuo substrato ir du kartus šaltame PBS plautos ląstelės buvo suspenduotos lizės buferyje su inhibitoriais (1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1x Complete (proteazių inhibitorių kokteilis)). Ląstelių ir lizės buferio suspensija (tūrio santykis 1:10) inkubuota lede 15 minučių. Centrifuguota 500 x g 5 min +4 °C ir surinktas supernatantas (pirma citozolio frakcija). Ląstelės antrą kartą suspenduotos lizės buferyje (tūrio santykis 1:5) ir inkubuotos 15 min lede. Centrifuguota 500 x g 5 min +4 °C, supernatantas surinktas (antra citozolio frakcija). Abi citozolio frakcijos sujungtos, centrifuguotos 15000 x g 15 min +4 °C. Supernatantas (citozolio frakcija) surinktas ir saugotas –70°C temperatūroje. Likusių nuosėdose branduolių švarumas buvo vertinamas mikroskopu (suspensiją praskiedus santykiu 1:1 su tripano mėliu), ląstelių branduoliai saugti –70°C temperatūroje.

Visų ląstelės baltymų išskyrimui ląstelės buvo du kartus nuplautos kambario temperatūros PBS tirpale ir lizuotos naudojant dvikryptės elektroforezės (2DE) rehidratacijos buferį (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 8 M Urea, 50 mM DTT, 10 % glicerolio, 5 % NP40 ir 6 % amfolito (Biorad)). Baltymų lizatas cetrifuguotas, supernatantas buvo naudojamas dvikryptės elektroforezės tyrimui arba saugomas –70°C temperatūroje.

Baltymai izoelektrofokusuoti Immobiline Dry Strip pH 3–10 11 cm – IEF juostelėse (General Electrics). Kiekviena IEF juostelė 12 val. kambario temperatūroje buvo prisotinama rehidracijos buferyje ištirpintu baltymu. Baltymų izoelektrofokusavimas IEF juostelėje vyko 22 kV/val. Po izoelektrofokusavimo pagal krūvį skirstyti baltymai antroje kryptyje buvo išskirstyti pagal molekulinį svorį 4–18 % SDS-PAGE ir nudažyti sidabru (Fermentas) arba Brilliant Blue G – Colloidal (Sigma) dažu.

3.18. Baltymų paruošimas masių spektrometrijai

Nudažyti baltymai buvo iškerpami iš 2DE gelių ir plaunami su 100 µl H₂O 5 min kratant ant purtyklės. Vanduo buvo pašalinamas ir užpilamas 100 µl 100 % acetonitrilo ir 10–15 min kratoma purtykle. Skystis pašalintas ir geliai 1 valandą džiovinti vakuminėje centrifugoje (Eppendorf). Ant išdžiūvusių gelių buvo užpilama 100 µl 100 mM NH₄HCO₃ ir purtoma 10–15 min, praėjus laikui buvo užpilama 100 µl 100% acetonitrilo ir centrifuguojama 20 minučių. Tirpalas pašalintas ir ant gelių užpiltas toks pat tūris 100% acetonitrilo. Pašalinus acetonitrilą geliai buvo džiovinami vakuminėje centrifugoje 2 valandas. Baltymai geliuose skaldyti iki peptidų su Arg-C endoproteaze (Roche) 12 val. +37°C temperatūroje (50 µl bendras tūris: 5 µl Arg-C, 35 µl inkubacijos buferio (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 10 µl H₂O)). Po inkubacijos buvo pridėdama 10–15 µl H₂O ir laikoma 15 min +37°C temperatūroje, po to pridėdama 20 µl 100% acetonitrilo ir inkubuojama 15 min +37°C kratant purtyklėje. Po inkubacijos supernatantas buvo surenkamas į naują mėgintuvėlį. Ant nuosėdų užpilta 40 µl 5% forminės rūgšties, sumaišyta ir inkubuota 15 min +37°C kratant ant purtyklės. Supernatantas buvo nusiurbtas, sujungtas su pirmuoju supernatantu ir išdžiovintas vakuminėje centrifugoje. Prieš analizavimą MALDI-TOF Voyager (Applied Biosystems) ir ESI MS-MS Q STAR (Applied Biosystems) peptidai buvo ištirpinami 5 µl 5% acetonitrilo ir pridėta TCA (trifluoroacto rūgštis), galutinė koncentracija 0,01%. Mėginys užneštas ant specialios plokštelės ir atlikta MALDI-TOF MS (ant kieto paviršiaus jonizuojama lazeriu ir nustatoma masė

pagal jonų skriejimo laiką) analizė. Gauti masių spektrai buvo analizuojami *in silico* lyginant juos su duomenimis duomenų bazėse. Baltymų spektrai, gauti MALDI-TOF Voyager (Applied Biosystems), apdoroti Data Explorer programa, o ESI MS-MS Q STAR (Applied Biosystems) – Analyst programa.

Baltymų identifikavimui naudotos šios duomenų bazės:

<http://www.matrixscience.com/>

<http://www.expasy.org/tools/pepident.html>

<http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>

<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msfit.htm>

3.19. Statistinė duomenų analizė

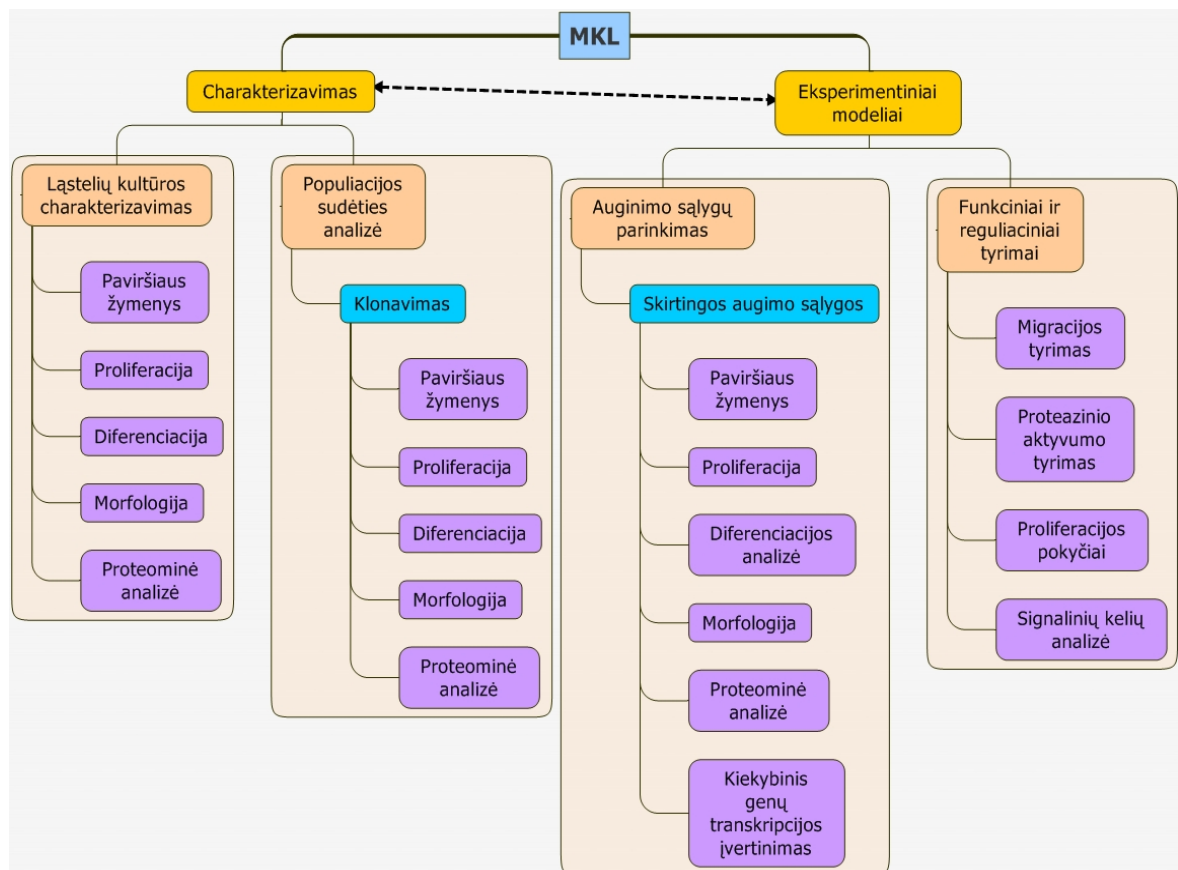
Visi šiame darbe aprašyti eksperimentai buvo pakartoti tris kartus (jei nepažymėta kitaip). Kiekybiniai duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida. Statistinei analizei dviems grupėms palyginti naudojome Stjudento t testą. Kelių grupių palyginimas atliktas naudojant vieno koeficiento dispersijos analizę (Anova). Skirtumai įvertinti kaip patikimi, kai $p < 0,05$.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe atliktų tyrimų tikslas – ištirti mezenchiminių kamieninių ląstelių kultivavimo *in vitro* galimybes ir nustatyti uždegimo indukuotus procesus. Atliekant tyrimus iš skirtingų žmogaus audinių buvo išskirtos ir charakterizuotos mezenchiminės kamieninės ląstelės, tyrinėta auginimo terpės komponentų įtaka MKL auginimui ir diferenciacijai, kompleksiškai analizuota *in vitro* auginamos MKL kultūros sudėtis, tirtas galimas MKL migracijos į uždegiminį židinių mechanizmas bei MKL veiklos reguliavimo būdai. Bendra atliktų tyrimų schema pateikiama 1 paveiksle.

Pagal šiuo metu vyraujantį supratimą mezenchiminės kamieninės ląstelės yra pasiskirsčiusios visame organizme kraujagyslių perivascularinėje nišoje, o skirtingų audinių kilmės nulemtos MKL savybės dažniausiai susijusios su tų audinių nevienoda mikroaplinka [da Silva Meirelles et al., 2006]. Nežiūrint kai kurių skirtumų, visos MKL pasižymi bendromis savybėmis, tokiomis kaip būdingų paviršiaus žymenų ekspresija, gebėjimu daugintis nediferencijuotoje būsenoje, *in vitro* diferenciacija į mezodermos kilmės audinius, taip pat imunoreguliacinių savybių panašumu. Šiuose tyrimuose naudojome iš riebalų (R-MKL) ir iš pieninio danties pulpos (PD-MKL) išskirtas ląsteles, kurios buvo apibūdintos kaip mezenchiminės kamieninės ląstelės. Mūsų naudotos ląstelių kultūros (R-MKL ir PD-MKL) atitiko Tarptautinės ląstelių terapijos bendrijos nustatytus minimalius MKL būdingus požymius [Dominici et al., 2006]. Kadangi tiek R-MKL, tiek PD-MKL pasižymi savybėmis, susijusiomis su išskyrimo iš audinio būdu, donoro skirtingu amžiumi ir galbūt su nišos mikroaplinka, skirtinguose tyrimuose buvo naudotos tik vieno iš audinių kilmės MKL. Eksperimentuose, kuriuose tyrėme terpės tinkamumą MKL auginimui buvo pasirinktos R-MKL, kadangi, išskyrus jas iš riebalinio audinio, gaunamas pakankamas ląstelių kiekis vienodam išsėjimui į keturių tipų terpes. Tuo tarpu PD-MKL ląstelių gaunama nedaug ir jas sunku lygiai paskirstyti į keturis indus. Tačiau pieninio danties pulpos MKL buvo nepakeičiamos populiacijos sudėties tyrimo eksperimentuose. Kadangi pieninio

danties donoro (vaiko) amžius yra mažesnis, PD-MKL, lyginant su R-MKL, pasižymėjo stipria proliferacija ir aukštu klonogeniniu aktyvumu. Būtent šios savybės yra svarbios atliekant klonavimo ir klonų analizės eksperimentus. Uždegiminės aplinkos poveikio tyrime taip pat buvo pasirinktos dideliu proliferaciniu ir migraciniu aktyvumu pasižyminčios PD-MKL.



1 pav. Atliktų mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) tyrimų schema

4.1. Skirtingos sudėties auginimo terpių poveikis riebalų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms

Serumas yra viena iš svarbiausių ir heterogeniškiausių mezenchiminių kamieninių ląstelių auginimui naudojamos terpės dalių. Dažniausiai MKL tyrimuose yra naudojamas fetalinis veršelio serumas (FBS), kuris tinkamas

daugeliui eksperimentų *in vitro*. Tačiau duomenys apie šio serumo keliamus pavojus, naudojant jame padaugintas mezenchimines kamienines ląsteles terapijai, verčia ieškoti alternatyvų. Viena iš alternatyvų – alogeninis žmogaus serumas (ŽS). Nors skirtinguose darbuose jo tinkamumas MKL auginimui vertinamas prieštaringai, tačiau rizika, kurią MKL transplantacijos metu recipientui gali sukelti serumo komponentai, yra žymiai mažesnė, nei fetalinio veršelio serumo [Dimarakis and Levicar, 2006]. Kaupiantis žinioms apie MKL proliferacijos reguliavimo mechanizmus, atsirado patraukli FBS alternatyva – sintetinis beseruminis serumo pakaitalas. Pagal dabartinius duomenis sintetinėse beseruminėse terpėse MKL sėkmingai proliferuoja, tačiau dar lieka neaiškus serumo pakaitalo poveikis ląstelių diferenciacijai ir imunomoduliacinėms savybėms. Mes palyginome FBS, kamieninėms ląstelėms pritaikyto FBS (FBS-sp), alogeninio žmogaus serumo (ŽS) ir sintetinio serumo pakaitalo Ultroser G poveikį iš riebalų išskirtų ląstelių (R-MKL) paviršiaus žymenų ekspresijai, morfologijai, diferenciacijai, proliferacijai ir bendrai baltymų ekspresijai.

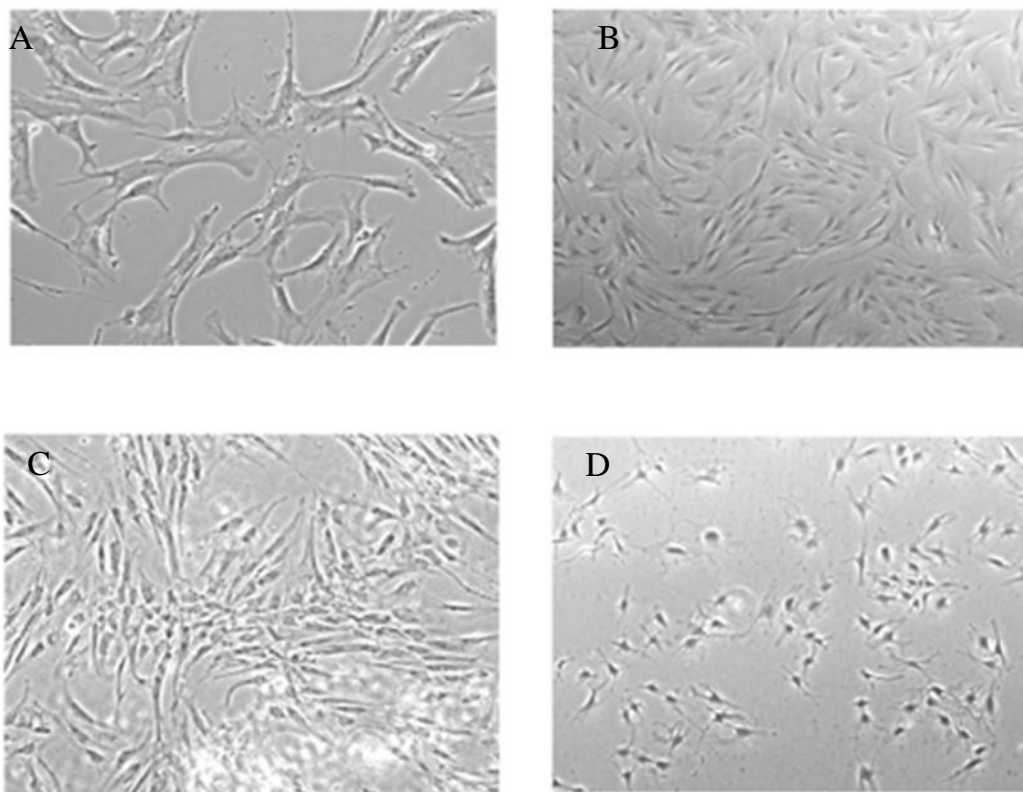
4.1.1. Riebalinio audinio mezenchiminių kamieninių ląstelių morfologija ir augimo greitis

Riebalinio audinio MKL pirmą kartą išskirtos ir charakterizuotos dar 2001 metais [Zuk et al., 2001]. Šios ląstelės pasižymi pagrindinėmis MKL būdingomis savybėmis ir dėl gero prieinamumo yra puikus autologinių MKL šaltinis. Mes naudojome dvi R-MKL kultūras, išskirtas iš sveikų donorų: 26 metų moters krūties riebalinio audinio (R-MKL-1) ir 40 metų moters pilvo riebalinio audinio (R-MKL-2) (3 lentelė). Abi ląstelių kultūros pasižymėjo MKL būdinga paviršiaus žymenų ekspresija ir gebėjimu diferencijuotis į riebalinį ir kaulinį audinius.

3 lentelė. R-MKL kultūrų savybės

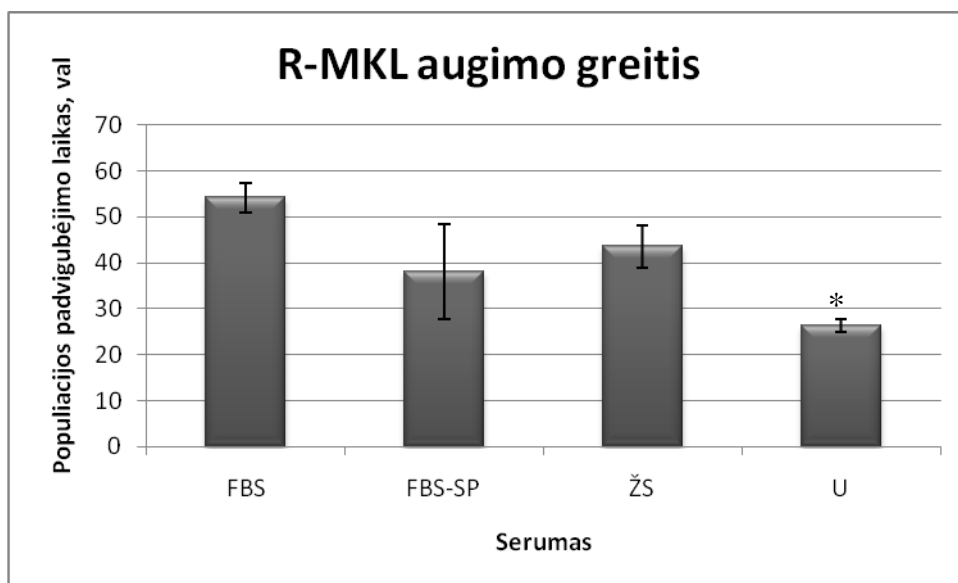
	<i>R-MKL-1</i>	<i>R-MKL-2</i>
MKL audinys	krūties riebalinio audinio	pilvo riebalinio audinio
Donoro amžius	26	40
CD ekspresija	CD14-;CD34-;CD45- CD73+;CD90+;CD105+;CD146+/-	CD14-;CD34-;CD45- CD73+;CD90+;CD105+;CD146+/-
Osteogeninė dif.	+	+
Adipogeninė dif.	+	+
Vidutinis populiacijos padvigubėjimo laikas, val.	40	50
Maksimalus persėjimų skaičius	>8	8

R-MKL-1 ir R-MKL-2 išskyrimo metu buvo išsėtos auginimo terpėje, turinčioje FBS (R-MKL-FBS), FBS-sp (R-MKL-FBS Sp), ŽS (R-MKL-ŽS) ar Ultroser G (R-MKL-U). Išskirtos R-MKL kultūros buvo auginamos kiekvieno tipo terpėje nuo išskyrimo iš audinio iki trečio persėjimo. Padauginus ląsteles (3 persėjimas) buvo atliekama skirtingos sudėties serumų poveikio analizė. R-MKL pasižymėjo mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdinga morfologija, tačiau terpėje su Ultroser G augintos tiek R-MKL-1, tiek R-MKL-2 buvo mažesnės. Paveiksle (2 pav.) parodytas R-MKL-2 skirtingų serumų poveikio morfologijai vaizdas, būdingas abiem R-MKL kultūroms.



2 pav. Serumo įtaka R-MKL-2 morfologijai. Nuotraukose parodyta tipinė R-MKL morfologija po 3 persėjimų skirtingą serumą turinčiose terpėse: A – FBS, B – FBS Sp, C – ŽS, D – U. Padidinimas x100.

Žinant, kad gydymui mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis yra labai svarbu padauginti jas iki pakankamo terapiniams tikslams kiekio per kuo trumpesnę laiką, tyrėme skirtingų serumų poveikį R-MKL proliferaciniam aktyvumui. Abiejų tirtų MKL kultūrų proliferacija (R-MKL-1 ir R-MKL-2) vienodose auginimo terpėse buvo panaši. Pagal gautus rezultatus R-MKL-1 ir R-MKL-2 kultūrose nustatytas mažiausias populiacijos padvigubėjimo laikas buvo naudojant terpę su sintetiniu serumo pakaitalu Ultroser G (vidutiniškai 26 val.). Auginant ląsteles terpėse su kitų tipų serumais (FBS, FBS-Sp, ŽS) populiacijos padvigubėjimo laikas buvo ilgesnis (3 pav.).



3 pav. R-MKL-1 ir R-MKL-2 augimo greičių vidurkis. Parodytas terpėse su skirtingais serumais augintų R-MKL-1 ir R-MKL-2 populiacijos padvigubėjimo laiko vidurkis. \pm - standartinis nuokrypis. Skirtumų statistinis patikimumas: * $p < 0.05$, lyginant su FBS.

Taigi, kaip ir tikėtasi, greičiausiai dauginosi R-MKL sintetiniame serume ir tai sutapo su anksčiau kitų autorių publikuotais duomenimis [Meuleman et al., 2006]. Į klausimus, ar greitas augimas nepakeitė kitų šių ląstelių savybių ir ar jos liko tos pačios kaip ląstelių, augintų terpėje su FBS, buvo bandoma atsakyti kituose eksperimentuose.

4.1.2. Poveikis mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijai

Paviršiaus žymenų ekspresija priklauso nuo ląstelės tipo. Tyrime naudojome nustatytą mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingų žymenų rinkinį, sudarytą iš ekspresuojamų CD73, CD90, CD105 ir neekspresuojamų CD14, CD45, CD34 [Dominici et al., 2006]. Kitas tyrime naudotas CD146 yra tipiškas pericitų žymuo, kuris dažnai randamas ir mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse [Schwab and Gargett, 2007]. Ląstelėms diferencijuojantis CD146 prarandamas. Mes tyrėme šių paviršiaus žymenų ekspresijos pokyčius skirtingomis sąlygomis auginamų ląstelių paviršiuje. Tėkmės citometrijos būdu nustatėme, kad skirtingos auginimo terpės nekeičia MKL nebūdingų CD14, CD45, CD34 ir būdingų CD73,

CD90, CD105 žymenų ekspresijos. 4-oje lentelėje pateikiami duomenys rodo, kad, nepriklausomai nuo kultivavimo sąlygų, R-MKL-1 ir R-MKL-2 gausiai ekspresuoja MKL būdingus paviršiaus žymenis CD90, CD73 ir CD105. Tačiau tiriant CD146 nustatėme ekspresijos pokyčius. Ląstelės, augintos terpėje su sintetiniu serumu pakaitalu Ultroser G (R-MKL1-U ir R-MKL2-U), skirtingai nuo ląstelių, kultivuočių kitokios sudėties terpėse, visiškai neekspresavo CD146 žymens. Pagal kitų autorių duomenis tiriant Invitrogen gaminamo STEMPRO poveikį MKL, šis sintetinis serumo pakaitalas taip pat neigiamai veikė CD146 ekspresiją [Agata et al., 2009]. Šis rezultatas yra įdomus, nes pastarųjų metų tyrimai parodė, kad MKL subpopuliacijos, ekspresuojančios CD146, pasižymi klonogeniškumu bei sugebėjimu atsinaujinti (*self-renewal*). Šios ląstelės sugebėjo atkurti hemopoetinę aplinką po transplantacijos imunodeficitinėms pelėms [Sacchetti et al., 2007]. Priešingai aprašytiems tyrimams, R-MKL-U (CD146⁻) ląstelių proliferacija vyko greičiau (populiacijos padvigubėjimo laikas apie 25–27 val.), nei augintose kitu serumu praturtintose terpėse R-MKL CD146⁺ (apie 40–50 val.). Lyginant R-MKL-ŽS su ląstelėmis, augintomis FBS, taip pat buvo stebimas CD146 sumažėjimas, tačiau ekspresijos buvimas nekėlė abejonių. Duomenų apie žmogaus serumo įtaką CD146 ekspresijai nepavyko rasti.

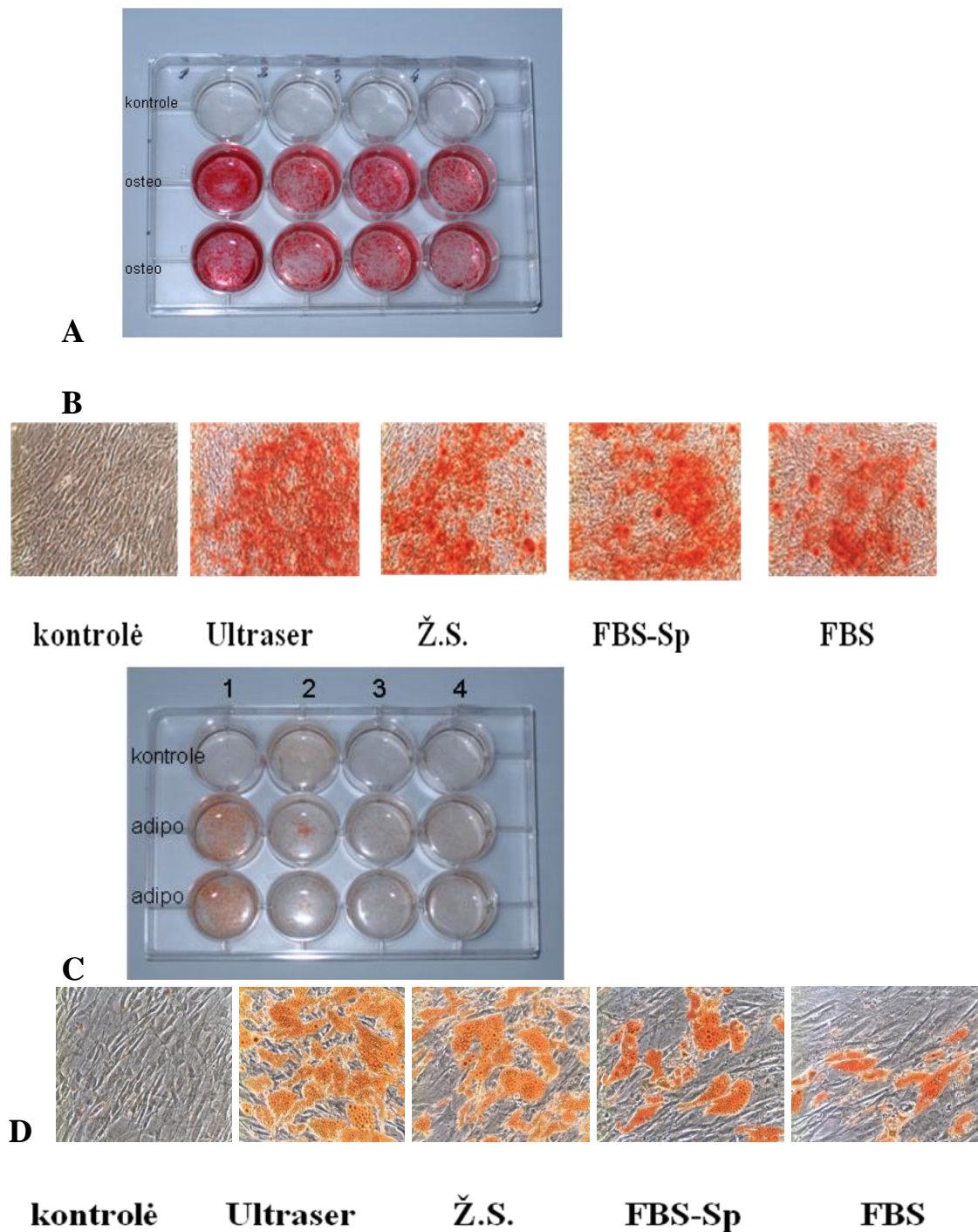
Manome, kad ląstelėse, kultivuotose su Ultroser G, gali vykti CD146 populiacijos selekcija ar/ir Ultroser G komponentai gali slopinti CD146 baltymo ekspresiją riebalų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Mūsų duomenys rodo, kad skirtingų rūšių serumas veikia tik CD146 žymens ekspresiją, o kitų MKL būdingų žymenų ekspresija išlieka nepakitusi.

4 lentelė. Skirtinguose serumuose augintų R-MKL kultūrų paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimas (Nurodytas paviršiaus žymenį ekspresuojančių ląstelių procentas lyginant su izotipine kontrole, tipinis eksperimentas)

	CD14	CD34	CD45	CD73	CD90	CD105	CD146
<i>R-MKL1-FBS</i>	1.9	0.3	5.3	99.8	98.4	100	46.2
<i>R-MKL1-FBS Sp</i>	0.4	1.6	0.9	93	99	99.9	52.8
<i>R-MKL1-ŽS</i>	1.7	1.5	9.9	96.9	90.1	100	13.5
<i>R-MKL1-U</i>	3.0	0.3	2.0	98.4	98	99.9	0.5
<i>R-MKL2-FBS</i>	0.7	0.6	0.6	97.2	99.7	97.9	17.7
<i>R-MKL2-FBS Sp</i>	2	5.2	0.1	99.9	100	99.7	13.5
<i>R-MKL2-ŽS</i>	0.2	0.9	0.2	99.7	99.8	98.6	5.8
<i>R-MKL2-U</i>	0.2	0.8	0.0	97.2	99.9	98.4	0.2

4.1.3. Auginimo terpės poveikis osteogeninei ir adipogeninei diferenciacijai

Indukuodami osteogeninę ir adipogeninę diferenciaciją tyrėme, kaip skirtingos kultivavimo sąlygos veikia MKL gebėjimą diferencijuotis minėtomis kryptimis. Trečio persėjimo ląstelės buvo inkubuojamos su diferenciacijos indukcijos mišiniais tris savaites. Diferenciacijos požymiai buvo nustatomi naudojant citocheminius metodus (plačiau skyriuje „Metodai“). Abi ląstelių kultūros (R-MKL-1 ir R-MKL-2) pasižymėjo panašiu gebėjimu diferencijuotis į riebalinį ir kaulinį audinius. Tipiškas osteogeninės ir adipogeninės diferenciacijos vaizdas parodytas 4-ame paveiksle. Matyti, kad ląstelės, kultivuotos skirtingose terpėse, gerai diferencijavosi tiek adipogenine, tiek osteogenine kryptimis. 4-ame paveiksle A ir C matyti, kad R-MKL-2, augintų terpėse be gyvulinės kilmės komponentų (ypatingai Ultroser G), adipogeninė ir osteogeninė diferenciacija buvo žymiai stipresnė, nei ląstelių, augintų gyvulinės kilmės serumuose.



4 pav. Skirtingos sudėties kultivavimo terpių poveikis osteogeninei ir adipogeninei MKL diferenciacijai. Tyrimams naudojome iš riebalinio audinio išskirtas MKL (R-MKL-2). Ląstelės buvo auginamos terpėse, praturtintose skirtingomis serumų rūšimis. Adipogeninės diferenciacijos požymiai nustatyti ląsteles dažant Oil Red O, osteogeninės – Alizarino raudonuoju. **A** – osteogeninė diferenciacija, bendras vaizdas; **B** – osteogeninė diferenciacija, padidinimas 200x; **C** – adipogeninė diferenciacija; bendras vaizdas; **D** – adipogeninė diferenciacija, padidinimas 200x.

Įdomu, kad R-MKL-1, o ne R-MKL-2, kultivuotoms terpėse su sintetiniu ir alogeniniu žmogaus serumais, pasireiškė spontaninės adipogeninės diferenciacijos požymiai (paveiksle neparodyta). Taip pat nustatėme, kad ląstelės, augintos terpėse, praturtintose serumais su gyvulinės kilmės komponentais (FBS, FBS-Sp), geriau diferencijavosi osteogenine nei adipogenine kryptimi (tačiau abiem atvejais silpniau, nei ląstelės, augintos be gyvulinės kilmės komponentų).

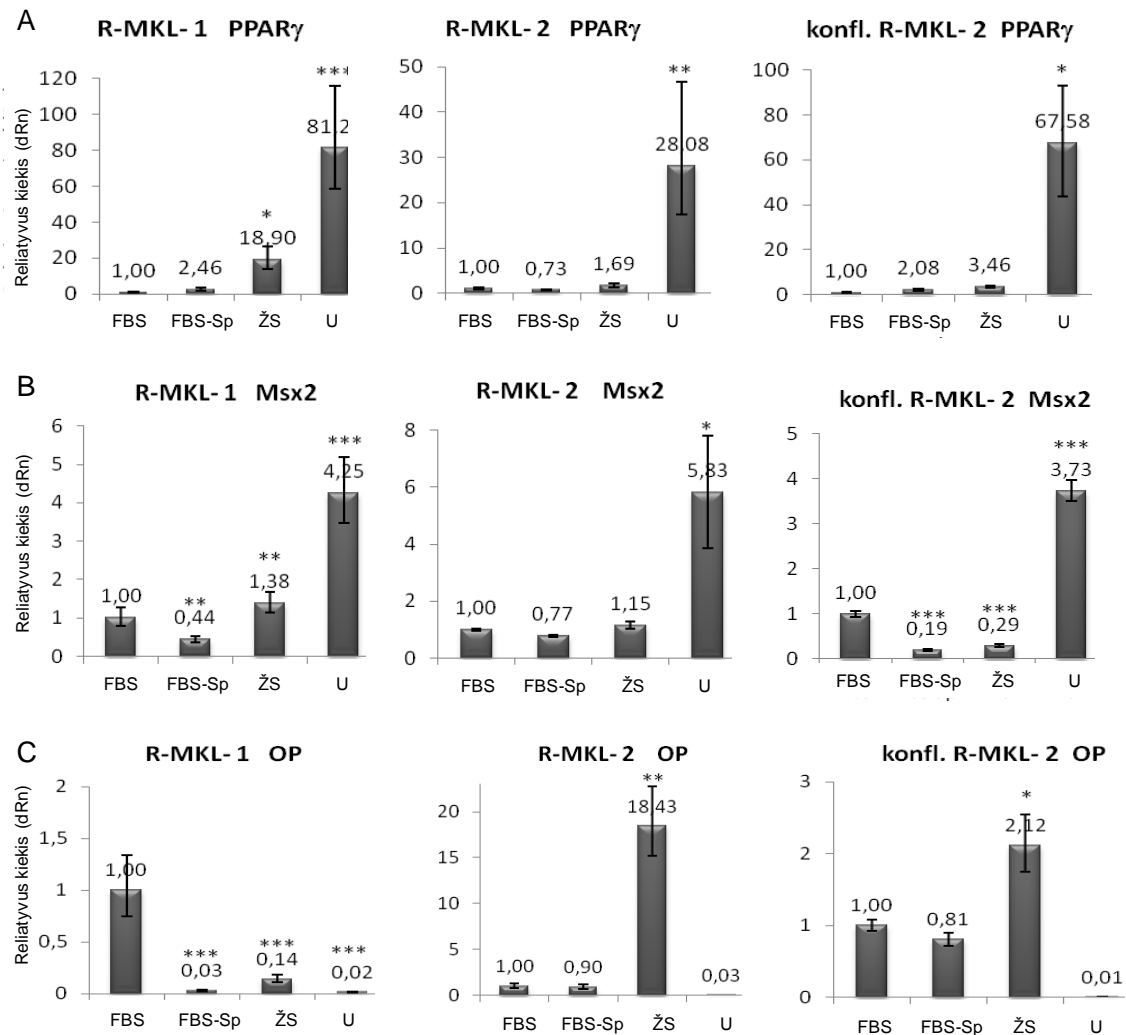
Osteogeninės ir adipogeninės diferenciacijos tyrimo rezultatai rodo, kad skirtingos sudėties terpės (su gyvulinės kilmės komponentais arba be jų) skirtingai veikia MKL gebėjimą diferencijuotis. Riebalinės kilmės MKL, kultivuotos terpėse be gyvulinės kilmės komponentų, geriau diferencijuojasi adipogenine ir osteogenine kryptimis už tas pačias ląsteles, augintas terpėse, praturtintose gyvuliniais serumais.

4.1.4. Auginimo terpės komponentų poveikis adipogeninę ir osteogeninę diferenciaciją reguliuojančių genų transkripcijai

Su diferenciacija susijusių genų mRNR transkripcijos pokyčių nustatymas realaus laiko polimerazine grandinine reakcija yra naudojamas diferencijuojančių ląstelių charakterizavimui. Ši su audiniu ar su diferenciacijos procesu susijusių molekulių pakitusi ekspresija yra bendra *in vitro* ir *in vivo* diferenciacijos savybė [Jeong and Mangelsdorf, 2009]. Šiuo metu nustatyta daugelis osteogeninei (pvz., *Msx2*, *Runx2*, osteopontinas, ALP) ir adipogeninei (pvz., *PPAR γ* , leptinas, GLUT4) diferenciacijoms būdingų baltymų. Pažymėtina, kad adipocitams būdingi baltymai gali blokuoti osteogeninę diferenciaciją (*PPAR γ*) [Takada et al., 2007b] ir atvirkščiai – osteogeninės diferenciacijos metu aktyvių *Msx2*, *Runx2* [Cheng et al., 2003] ekspresija blokuoja adipocitų formavimąsi.

Naudodami realaus laiko PGR (qPGR) metodą, nustatėme, kaip kinta osteogeninę ir adipogeninę diferenciaciją reguliuojančių genų mRNR transkripcija terpėse su skirtingais serumais kultivuotose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Buvo tirta, kaip skiriasi adipogeninei ir osteogeninei diferenciacijai svarbių genų (*PPAR γ* , *Msx2*, *osteopontino*) transkripcija skirtingos sudėties

terpėse kultivuojamose proliferuojančiose R-MKL-1 ir R-MKL-2 kultūrose (5 pav.).



5 pav. Skirtingų serumų poveikis osteogeninės ir adipogeninės diferenciacijos genų transkripcijai proliferuojančiose ir monosluksnyje esančiose (konfl.) riebalų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Tyrime naudojome dvi proliferuojančias iš riebalinio audinio išskirtas MKL kultūras (R-MKL-1; R-MKL-2), monosluksnyje esančias R-MKL-2, kultivuotas terpėse su FBS, FBS-SP, ŽS ir U. **A** – *PPAR γ* , **B** – *Msx2*, **C** – *osteopontino* (OP) transkripcijos tyrimai. Kiekybiniai tiriamų genų RNR transkripcijos pokyčiai buvo įvertinti panaudojus realaus laiko PGR. Skirtumų statistinis patikimumas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ir *** $p < 0.001$, lyginant su FBS.

Tiriant bazinio transkripcijos lygio įtaką diferenciacijos metu atsirandantiems šių genų transkripcijos pokyčiams, analizavome adipogeninę ir osteogeninę kryptimis diferencijuojančias R-MKL-2 (6 pav.). Šio diferenciacijos eksperimento kontrolinių monosluksnyje esančių ląstelių *PPAR γ* , *Msx2* ir *osteopontino* genų

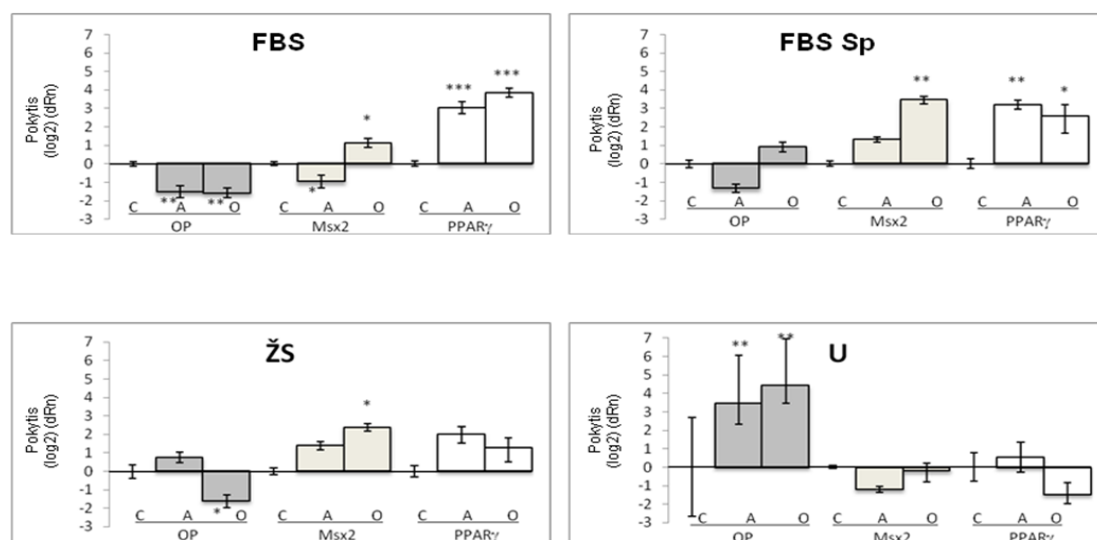
transkripcijos lygis buvo palygintas su proliferuojančių R-MKL-2 (5 pav. konfl. R-MKL-2).

Gauti duomenys rodo, kad augančiose ląstelėse sintetinis serumo pakaitalas Ultroser G turi žymiai stipresnę adipogeninę diferenciaciją reguliuojančio geno *PPAR γ* transkripciją nei kitos sudėties terpėse augintų R-MKL. R-MKL-1-U kultūroje *PPAR γ* mRNR transkriptų buvo net 80 kartų daugiau, nei tos pačios kilmės ląstelėse, kultivuotose su fetaliniu veršelio serumu (5 pav. A). R-MKL-2 kultūroje šis santykis siekė beveik 30 kartų. Panašius rezultatus gavome palyginę *PPAR γ* kiekius ląstelėse, kultivuotose terpėse, praturtintose su FBS-Sp ar ŽS (5 pav. A). Svarbu, kad tokį pat efektą stebėjome mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse, išskirtose iš skirtingų donorų. Literatūros duomenys teigia, kad *PPAR γ* yra pagrindinis adipogeninės diferenciacijos reguliatorius mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse [Takada et al., 2007a]. Tai transkripcijos faktorius, formuojantis heterodimerus su retinoidiniu X receptoriu (RXR). Šie heterodimerai, prisijungę ligandus (riebiosios rūgštys, antidiabetiniai vaistai), jungiasi prie adipogenezei svarbių genų promotorių ir aktyvina jų transkripciją [Cock et al., 2004]. Įdomu tai, kad vykstant adipogeninei diferenciacijai *PPAR γ* ekspresijos lygis nežymiai padidėjo mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse, kultivuotose su Ultroser G, ir stipriai padidėjo su FBS, FBS-Sp, bei ŽS kultivuotose ląstelėse (6 pav.). Tai paaiškinti galima tuo, kad proliferuojančiose R-MKL-U ląstelėse *PPAR γ* geno ekspresija pasiekia maksimalią ribą ir beveik nekinta net po adipogeninės indukcijos. Šie duomenys siejasi su mūsų *in vitro* adipogeninės diferenciacijos tyrimais, kurie taip pat parodė, kad R-MKL-U ląstelės turi didžiausią adipogeninį aktyvumą. Kaip ir buvo minėta, diferenciacijos metu stebėjome spontaninės adipogeninės diferenciacijos požymius kontrolinėse ląstelėse.

Taip pat buvo tirtas osteogeninę diferenciaciją reguliuojančio geno *Msx2* transkripcijos lygis ląstelėse, kultivuotose skirtingos sudėties terpėse. Nustatėme, kad ląstelėse, augintose terpėje su sintetiniu serumo pakaitalu Ultroser G, šio geno ekspresija yra didžiausia (5 pav. B). R-MKL-1-U ląstelėse *Msx2* geno mRNR

transkriptų buvo maždaug 4x daugiau nei su FBS, FBS-Sp ar ŽS kultivuotose ląstelėse. R-MKL-2-U ląstelėse šis skirtumas siekė 10x. Osteogeninės diferenciacijos metu *Msx2* ekspresijos lygis ląstelėse, kultivuotose su Ultroser G, beveik nepakito, tuo tarpu ląstelėse, kultivuotose su ŽS, FBS-Sp ir FBS, stebėjome ryškų pakilimą (6 pav.). Taigi *Msx2* ir *PPAR γ* genų ekspresija R-MKL-U ląstelėse svyruoja panašiai (didelis transkriptų kiekis proliferuojančiose ląstelėse diferenciacijos metu padidėja nedaug). *In vitro* diferenciacijos eksperimentai parodė, kad ląstelių, kultivuočių skirtingos sudėties terpėse, osteogeninė diferenciacija yra panaši.

Nustatyti aukšti *PPAR γ* ir *Msx2* genų transkripcijos lygiai proliferuojančiose ląstelėse (5 pav.), kurios buvo kultivuojamos terpėse su sintetiniu serumu pakaitalu Ultroser G, buvo netikėtas rezultatas, nes literatūros šaltiniai teigia, kad *PPAR γ* ir *Msx2* vienas kitą reguliuoja reciprokiškai [Cheng et al., 2003]. Pavyzdžiui, *Msx2* veikia C/EBP β , kuris yra *PPAR γ* induktorius, ir taip blokuoja jo ekspresiją (sąveika vyksta baltymų lygyje) bei adipogeninę diferenciaciją mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse [Ichida et al., 2004].



6 pav. Skirtingo kultivavimo serumo poveikis osteogeninės ir adipogeninės diferenciacijos žymenų ekspresijai diferencijuojančiose riebalų kilmės mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Tyrime naudojome iš riebalinio audinio išskirtas R-MKL-2, augintas terpėse su FBS, FBS-SP, ŽS ir U. Kiekybiniai tiriamų genų RNR ekspresijos pokyčiai adipogeninės (A) ir osteogeninės (O) diferenciacijos metu buvo įvertinti panaudojus realaus laiko PGR. Statistinis patikimumas parodytas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ir *** $p < 0.001$ lyginant su kontrole (C).

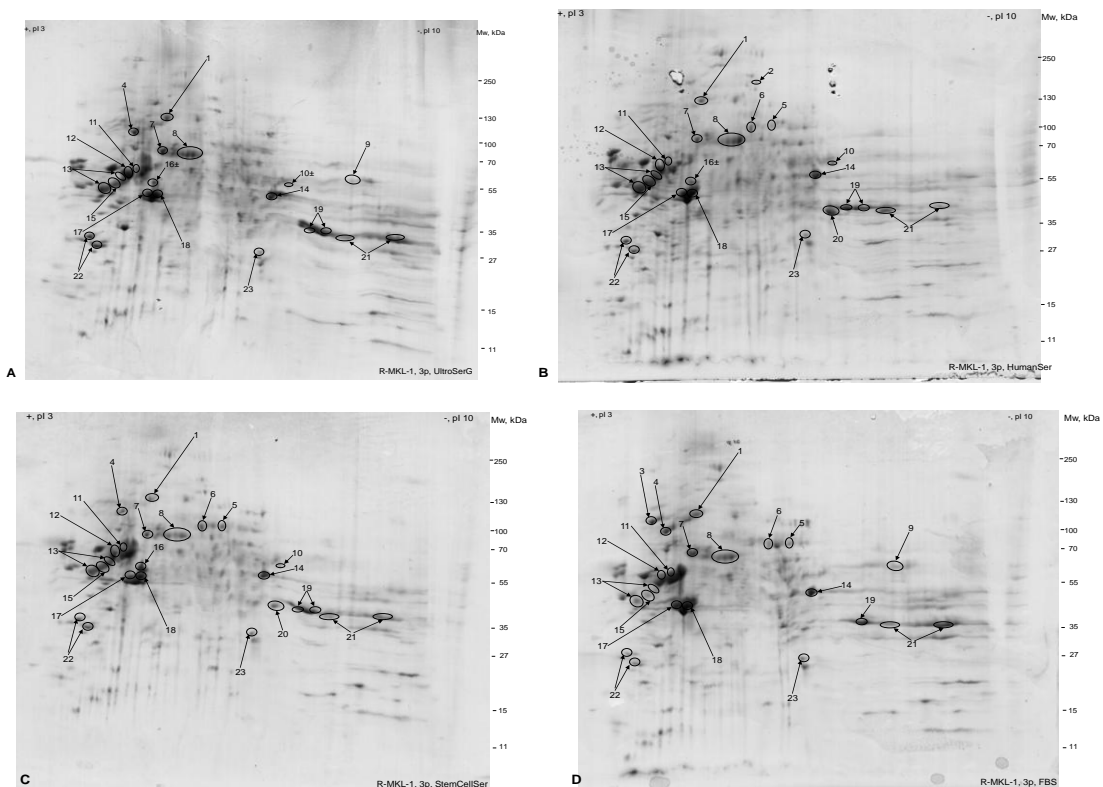
Taip pat tyrėme dar vieno osteogeninės diferenciacijos žymens – *osteopontino* geno transkripcijos pokyčius ląstelėse, augintose skirtingos sudėties terpėse. Osteopontinas yra sekretuojamas glikoproteinas, kuris svarbus kaulų remodeliavimui. Šį baltymą išskiria osteoblastai. Tai vėlyvos osteogeninės diferenciacijos žymuo [Rangaswami et al., 2006]. Rezultatai parodė, kad proliferuojančiose ląstelėse didžiausia *osteopontino* geno transkripcija pasižymėjo su FBS ir ŽS kultivuotose ląstelėse. (5 pav. C), o ląstelėse, augintose su sintetiniu serumu pakaitalu Ultroser G, *osteopontino* transkripcija buvo ypatingai silpna.

Vykstant osteogeninei diferenciacijai *osteopontino* geno transkripcija labiausiai pakilo ląstelėse, kultivuotose su Ultroser G, tuo tarpu ląstelėse, kultivuotose su FBS ir ŽS, šio geno ekspresija sumažėjo (palyginus su osteogeniniu indukcijos mišiniu neveiktomis kontrolinėmis ląstelėmis) (6 pav.).

Taigi mes tyrėme ne tik diferenciacijos metu atsirandančius genų transkripcijos pokyčius, bet ir šių genų transkripciją proliferuojančiose ląstelėse. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad su diferenciacija susijusių genų transkripcijos pokyčiai turi būti vertinami remiantis baziniu mRNR lygiu.

4.1.5. Baltymų identifikavimas skirtingos sudėties terpėje augintose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse

Siekdami kompleksiskai įvertinti skirtingos sudėties auginimo terpės poveikį mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, tyrėme baltymų ekspresijos profilius. Augančių R-MKL lizatai tirti pasitelkus dvikryptę elektroforezę. Buvo nustatyti baltymai, kurie skirtingai ar unikaliai ekspresavo skirtingu serumu praturtintoje terpėje kultivuotose ląstelėse. Tirdami R-MKL-1 kultūrą, augintą terpėse su Ultroser G, FBS, FBS-Sp ar ŽS, masių spektrometrijos būdu identifikavome 22 baltymus (7 pav., 5 lent.). Lyginant šių baltymų ekspresijos priklausomumą nuo terpės sudėties nustatėme, kad daugiausiai skirtumų yra auginant ląsteles su sintetiniu serumu pakaitalu Ultroser G.



7 pav. Baltymai, identifikuoti R-MKL-1 kultūroje, išskirtoje iš riebalinio audinio ir kultivuotoje skirtingos sudėties terpėse. Ląstelės buvo kultivuojamos terpėse, praturtintose sintetiniu serumu (Ultroser G) – A; komerciniu alogeniniu žmogaus serumu (ŽS) – B; fetaliniu veršelio serumu, pritaikytu mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms (FBS-Sp) – C ir fetaliniu veršelio serumu (FBS) – D. Trečio persejimo ląstelės buvo lizuotos, baltymai frakcionuoti dvikryptėje elektroforezės sistemoje, išryškinti nudažius gelius su Brilliant Blue G Colloidal dažų bei identifikuoti masių spektrometrijos būdu.

R-MKL-1-U kultivuotose ląstelėse nenustatėme prostaglandino F2 negatyvaus reguliatoriaus baltymo ir aksino1 baltymo ekspresijos. Kitos sudėties terpėse kultivuotose ląstelėse šių baltymų aptikta. Prostaglandino F2 negatyvus reguliatorius blokuoja prostaglandino F2 α (PGF2 α) sąveiką su specifiniu jo receptoriumi, taip slopindamas šios signalinės molekulės efektus. PGF2 α viena iš funkcijų – adipogenezės reguliacija [Samar, 2007]. Tai, kad R-MKL-1-U ląstelėse nebuvo rastas PGF2 α receptoriaus negatyvus reguliatorius, gali būti susiję su mūsų stebėtais proadipogeniniais efektais, taip pat su *PPAR γ* geno ekspresija. Aksinas 1 dalyvauja Wnt ir β -katenino signalinio kelio reguliacijoje. Aksinas 1 yra viduląstelinis pagrindinio Wnt signalinio kelio inhibitorius, kontroliuojantis

ląstelių proliferaciją bei augimą [Logan and Nusse, 2004]. Šis signalinis kelias svarbus osteoblastų proliferacijai, brendimui ir aktyvumui [Bodine and Komm, 2006]. Taigi aksino 1 baltymo ekspresijos išnykimas arba sumažėjimas R-MKL-1 ląstelėse, kultivuotose su Ultroser G, gali būti sietinas su padidėjusiu jų proliferaciniu ir osteogeniniu aktyvumu (lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis kitose terpėse). Nenustatėme nei vieno baltymo, kurį su Ultroser G kultivuotos ląstelės ekspresuotų unikaliai.

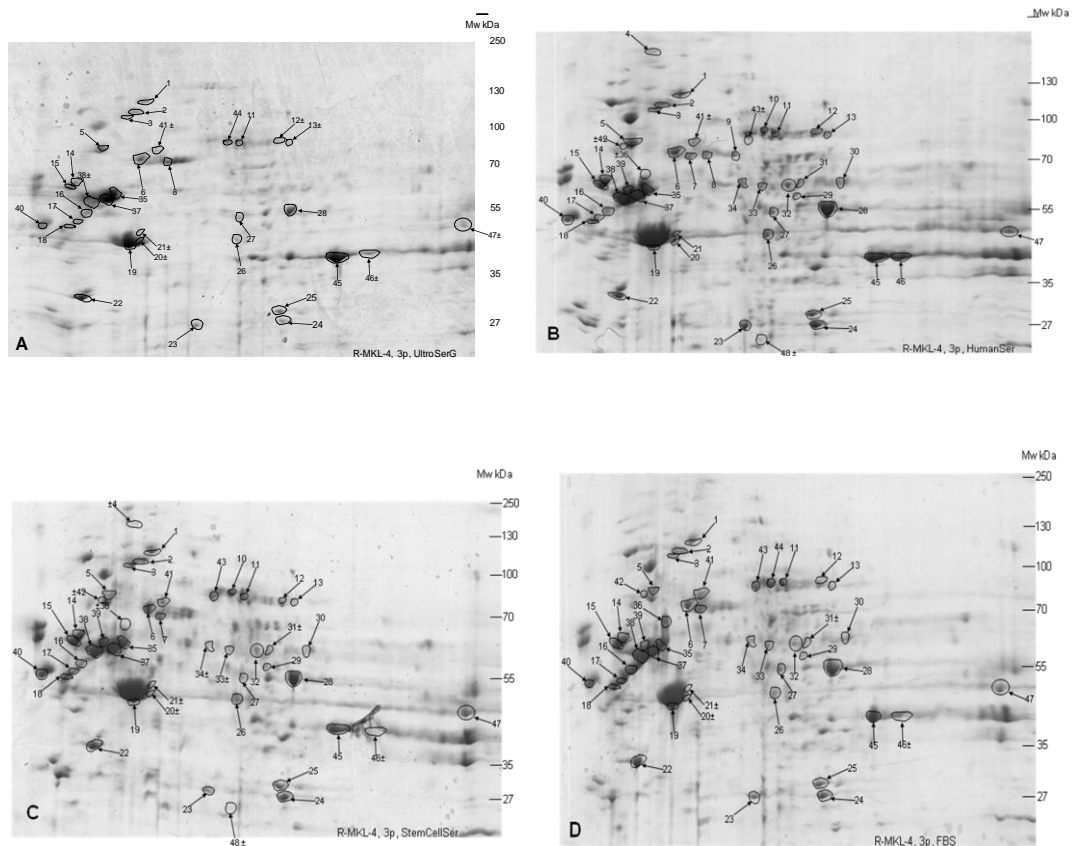
R-MKL-1-ŽS ląstelėse buvo rastas baltymas, kurio neidentifikavome ląstelėse, kultivuotose kitokios sudėties terpėse. Tai leucinu turtingas, PPR motyvą turintis mitochondrinis baltymas (*Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial*). Šis baltymas svarbus RNR metabolizmui, jis taip pat palaiko sąveiką su PPAR γ koreceptoriumi ir reguliuoja kai kurių gliukoneogenezei svarbių mitochondrinių genų transkripciją [Lightowers and Chrzanowska-Lightowers, 2008]. Įdomu, kad, pagal mūsų genų transkripcijos duomenis, su ŽS kultivuotose R-MKL-1, taip pat rasti dideli PPAR γ transkripto kiekiai. R-MKL-1-ŽS ląstelėse, skirtingai nuo kitų, neidentifikavome šiluminio šoko baltymo 90 (HSP90AB1). Tai citoplazminis streso atsako baltymas, kurio funkcija dar nėra pilnai iširta [Choi et al., 2009].

R-MKL-1-FBS ląstelėse nebuvo nustatytas gama taksilino baltymas, kuris dalyvauja vezikulių transporte. Be to, R-MKL-1-FBS ląstelėse neaptikome serpino β 9. Tai serino proteinazių inhibitorius, veikiantis antiapoptoziškai.

Tirdami R-MKL-2, kultivuotas Ultroser G, FBS, FBS-Sp ir ŽS, identifikavome 48 baltymus (8 pav., 6 lentelė). Reikia pažymėti, kad R-MKL-1 ir R-MKL-2 ląstelėse identifikuoti baltymai gana stipriai skyrėsi. Tai galėjo nulemti individualūs donorų skirtumai arba anatomiškai skirtinga ląstelių kilmės vieta (krūties ir pilvo riebalinis audinys). Kaip ir R-MKL-1, R-MKL-2 daugiausiai skirtumų radome auginant ląsteles su Ultroser G.

5 lentelė. Baltymai, identifikuoti R-MKL-1 kultūroje, išskirtoje iš riebalinio audinio ir kultivuotoje skirtingos sudėties terpėse

Baltymo dėmės Nr	Baltymo pavadinimas	Baltymo Nr UniPro/Swiss-Prot duomenų bazėje	Sekos padengimas (%)	Mol. masė (kDa); pI	Ultr SerG	ŽS	FBS-Sp	FBS
1.	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (UBA1)	P22314	24%	118,858; 5,49	+	+	+	+
2.	Leucine rich PPR motif. (LRPPRC)	P42704	7%	159,003; 5,81	-	+	-	-
3.	Glucose regulated protein GRP94 (HSP90B1)	P14625	7%	92,696; 4,76	-	+	-	+
4.	Heat shock protein 90 (HSP90AB1)	P08238	10%	83,423; 4,97	+	-	+	+
5.	Prostaglandin F2 receptor reg (PTGFRN)	Q9P2B2	12%	99,464; 6,16	-	+	+	+
6.	Axin-1 (AXIN1)	O15169	7%	96,488; 6,5	-	+	+	+
7.	Heat shock protein 70-8 (HSPA8)	P11142	29%	71,082; 5,37	+	+	+	+
8.	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2)	P14618	21%	58,339; 7,95	+	-	-	+
9.	Gamma Taxilin (TXLNG)	Q9NUQ3	19%	61,061; 7,23	±	+	+	-
10.	Tioredoxin domain-cont. protein 2 (TXNDC2)	Q86VQ3	23%	60,766; 4,83	+	+	+	+
11.	Tubulin α (TUA1B)	P68363	40%	50,804; 4,9	+	+	+	+
12.	Vimentin (VIME)	P08670	32%	53,676; 5,06	+	+	+	+
13.	α-Enolase (ENO1)	P06733	20	47,350; 6,99	+	+	+	+
14.	Tubulin- β (TUBB4Q)	Q99867	16%	48,917; 5,11	+	+	+	+
15.	Serpin β9 (SERPINB9)	P50453	15%	43,004; 5,61	±	+	+	-
16.	β actin-like protein 2 (ACTBL2)	Q 562R1	12%	42,318; 5,39	+	+	+	+
17.	Actin, cytoplasmic (ACTB)	P60709	27%	42,052; 5,29	+	+	+	+
18.	Annexin A2 (ANXA2)	P07355	38%	38,808; 7,57	+	+	+	+
19.	Torsin 1A (TOR1A)	O14656	18%	38,127; 6,51	-	+	+	-
20.	GAPDH	P04406	17%	36,201; 8,57	+	+	+	+
21.	14-3-3 protein zeta delta (YWHAZ)	P63104	45%	27,899; 4,73	+	+	+	+
22.	Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM 1)	P18669	30%	28,769 6,75	+	+	+	+



8 pav. Baltymai, identifikuoti R-MKL-2 kultūroje, išskirtoje iš riebalinio audinio ir kultivuotoje skirtingos sudėties terpėse. Ląstelės buvo auginamos terpėse, praturtintose sintetiniu serumu (Ulteroser G) – A; komerciniu alogeniniu žmogaus serumu (ŽS) – B; fetaliniu veršelio serumu, pritaikytu mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms (FBS-Sp) ir fetaliniu veršelio serumu (FBS) – D. Trečio persėjimo ląstelės buvo lizuotos, baltymai frakcionuoti dvikryptėje elektroforezės sistemoje, išryškinti nudažius gelius su Brilliant Blue G Colloidal dažų bei identifikuoti masių spektrometrijos būdu.

Iš pažymėtinų R-MKL-2-U ląstelėse nerastų baltymų yra plastino 3 baltymas. Šis baltymas yra svarbus aktino polimerizacijai ir fibroblastų filopodijų formavimuisi [Delanote et al., 2005]. Iš dalies tai galėtų paaiškinti morfologijos skirtumus tarp R-MKL-2-U ir kitų ląstelių. Dar vienas baltymas, kurio ekspresijos nenustatėme R-MKL-2-U ląstelėse yra AP4 komplekso subvieneto baltymas, susijęs su baltymų transportu iš trans-Goldi tinklo į endolizosomas [Hirst et al., 1999]. Palyginę R-MKL-2 ląsteles, augintas terpėse su ŽS, FBS ir FBS-Sp, žymių skirtumų nepastebėjome.

6 lentelė. Baltymai, identifikuoti R-MKL-2 kultūroje, išskirtoje iš riebalinio audinio ir kultivuotoje skirtingos sudėties terpėse

Baltymo dėmės Nr	Baltymo pavadinimas	Baltymo Nr UniPro/Swiss-Prot duomenų bazėje	Mol. masė (kDa); pl	Sekos padengimas (%)	UltraserG	ŽS	FBS-Sp	FBS
1.	E3 Uiquitin-protein ligase (RE1A)	Q5VTR2	114,220; 5,73	16%	+	+	+	+
2.	Alpha-actinin-4 (ACTN4)	O43707	105,246; 5,27	21%	+	+	+	+
3.	Transportin-3 (TNPO3)	Q9Y5L0	105,961; 5,35	8%	+	+	+	+
4.	Methionine synthase (METH)	Q99707	141,749; 5,39	7%	-	+	±	-
5.	78 kDa glucose-regulated protein (GRP78)	P11021	72,402; 5,07	17%	+	+	+	+
6.	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C)	P11142	71,082; 5,37	11%	+	+	+	+
7.	Plastin-3 (PLST)	P13797	70,904; 5,52	32%	-	+	+	+
8.				31%	+	+	-	-
9.	Serum albumin (ALBU)	P02768	71,317; 5,92	25%	-	+	-	-
10.	Serine/threonine-protein kinase (TBK1)	Q9UHD2	84,216; 6,32	10%	-	+	+	-
11.				8%	+	+	+	+
12.	Lamin-A/C (LMNA)	P02545	74,380; 6,57	17%	±	+	+	+
13.				14%	±	+	+	+
14.	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	P07237	57,480; 4,76	32%	+	+	+	+
15.				19%	+	+	+	+
16.	Vimentin (VIME)	P08670	53,676; 5,06	22%	+	+	+	+
17.				22%	+	+	+	+
18.				17%	+	+	+	+
19.	Actin, cytoplasmic 1 (ACTB)	P60709	42,052; 5,27	30%	+	+	+	+
20.				12%	±	+	±	±
21.	Actin, cytoplasmic 2 (ACTG)	P63261	42,108; 5,31	17%	±	+	±	±
22.	Annexin A5 (ANXA5)	P08758	35,971; 4,94	42%	+	+	+	+
23.	Heat shock protein beta-1 (HSPB1)	P04792	22,826; 5,98	37%	+	+	+	+
24.	Triosephosphate isomerase (TPIS)	P60174	26,938; 6,45	78%	+	+	+	+
25.	Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)	P18669	28,900; 6,67	43%	+	+	+	+
26.	Septin-2 (SEPT2)	Q15019	41,689; 6,15	25%	+	+	+	+
27.	Perilipin-2 (PLIN2)	Q99541	48,274; 6,34	11%	+	+	+	+
28.	Alpha-enolase (ENOA)	P06733	47,481; 70,1	33%	+	+	+	+
29.	AP-4 complex subunit mu-1 (AP4M1)	O00189	50,231; 6,7	18%	-	+	+	+
30.	UDP-glucose dehydrogenase (UGDH)	O60701	55,672; 6,73	32%	-	+	+	+
31.	Fascin (FSCN1)	Q16658	55,123; 6,84	24%	-	+	±	±
32.	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (SYDC)	P14868	57499; 6,11	29%	-		+	+
33.				19%	-	+	±	+
34.	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (SYWC)	P23381	53,474; 5,8	20%	-	+	±	+
35.	Vimentin (VIME)	P08670	53,676; 5,06	34%	+	+	+	+
36.				39	-	±	±	+

37.				30%	+	+	+	+
38.	Tubulin beta chain (TBB5)	P07437	50,095; 4.78	25%	±	+	+	+
39.	Tubulin alpha-1C chain (TBA1C)	TBA1C	50,548; 4.96	21%	-	+	+	+
40.	Ataxin-3 (ATX3)	P54252	43,732; 4.86	21%	+	+	+	+
41.	Annexin A6 (ANXA6)	P08133	76,168; 5.42	40%	±	±	+	+
42.	78 kDa glucose-regulated protein (GRP78)	P11021	72,402; 5.07	27%	-	±	±	+
43.	Serine/threonine-protein kinase (TBK1)	Q9UHD2	84,216; 6.32	12%	-	±	+	+
44.				15%	+	-	-	+
45.	Annexin A2 (NXA2)	P07355	38,808; 7.57	61%	+	+	+	+
46.				33%	±	+	±	±
47.	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2 (DRG2)	P55039	41,120; 9.02	18%	±	+	+	+
48.	Peroxiredoxin-6 (PRDX6)	P30041	25,133; 6.00	49%	-	±	±	+

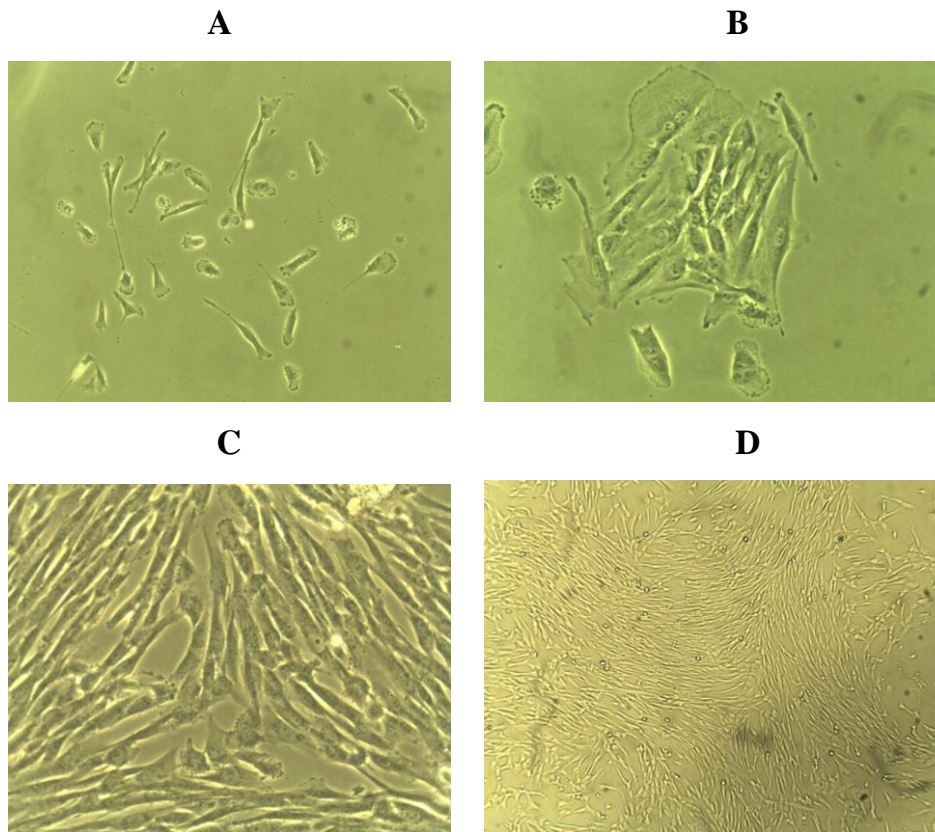
Apibendrinant proteominių tyrimų rezultatus, galima teigti, kad ląstelių, kultivuotų skirtingos sudėties terpėse, proteomo ekspresijos profiliai yra labai panašūs. Šis rezultatas atspindi tai, kad buvo lyginti tų pačių ląstelių (to paties donoro) proteomos ekspresijos profiliai. Daugiausiai skirtumų aptikta analizuojant riebalų mezenchiminių kamieninių ląstelių, kultivuotų su sintetiniu serumo pakaitalu Ultroser G, proteomos ekspresijos profilį. Galima daryti prielaidą, kad mažesnis ekspresuojamų baltymų kiekis gali būti susijęs su mažiau kompleksiška sintetinio serumo pakaitalo sudėtimi.

4.2. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos *in vitro* tyrimai

Laboratorijose *in vitro* sąlygomis auginamų MKL populiacija nėra homogeniška [Colter et al., 2000]. Populiacijos sudėtis yra kintama, tai priklauso nuo auginimo sąlygų, ląstelių tankio, arba ji gali būti sudaryta iš įvairaus diferenciacijos laipsnio ląstelių [Prockop, 2009]. Sunku pasakyti, koks procentas kamieninių ląstelių yra MKL populiacijoje ir kokios jų savybės. Gali būti, kad vienos ląstelės MKL populiacijoje pasižymi vieno tipo diferenciacinėmis ar imunomoduliacinėmis galimybėmis, kitos – kitokio. Norėdami nustatyti MKL populiaciją sudarančių atskirų ląstelių savybes, išskyrėme pavienius klonus ir padauginę analizavome jų morfologiją, proliferacines savybes, paviršiaus žymenų ekspresiją ir lyginome baltymų ekspresiją. Tyrimui naudojome pieninio danties pulpos mezenchiminės kamieninės ląstelės (PD-MKL).

4.2.1. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas

Pieninio danties pulpos mezenchiminės kamieninės ląstelės, kitaip SHED (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) [Miura et al., 2003], yra dar vienas lengvai pasiekiamas MKL šaltinis. Mūsų laboratorijoje pieninio danties pulpos mezenchiminės kamieninės ląstelės (PD-MKL) buvo sėkmingai išskirtos iš 6 metų vaiko iškritusio danties. Ląstelės buvo augintos standartinės sudėties DMEM terpėje su FBS ir antibiotikais. Kaž tik išskirtos ląstelės demonstravo fibroblastų verpstės formos morfologiją, formavo kolonijas (9 pav. A, B). Pažymėtina, kad išskirtų ląstelių kolonijos buvo skirtingos morfologijos. Ląstelėms dauginantis formavosi tankios, kompaktiškos, griežtai apribotos kolonijos (9 pav. D) iki ląstelės pasiekdavo 70–80% konfluenciją (9 pav. C). Kolonijų forma ir struktūra atitiko literatūroje aprašytą MKL išvaizdą [Colter et al., 2000].



9 pav. Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės, išskirtos iš pieninio danties pulpos audinio. Nuotraukose PD-MKL pirminė kultūra. A – besiformuojanti ląstelių kolonija trečią dieną po išskyrimo. B – ląstelių kolonijos vaizdas penktą dieną po išskyrimo; C, D – ląstelių kultūros vaizdas dvyliktą dieną po išskyrimo. Padidiniai A-100x; B,C – 200x; D - 40x.

Paviršiaus žymenų ekspresijos tyrime parodėme, kad PD-MKL neekspresavo hemopoetinėms ląstelėms būdingų CD14, CD45, CD34, bet buvo teigiamos CD73, CD90, CD105, CD146 (12 pav). PD-MKL pasižymėjo aktyvia proliferacija (virš 28 persėjimų) ir kolonijų formavimo efektyvumu (KFE) (7 lentelė). Klonogeninės ląstelės sudaro mažą bendros audinio populiacijos dalį. Šio tipo kultūros ląstelėms būdingas aukštas proliferacinis aktyvumas, jos gali ilgą laiką atsinaujinti, taip pat duoti pradžią skirtingo diferenciacijos laipsnio dukterinėms populiacijoms [Ylostalo et al., 2008]. Šių autorių duomenimis, vėlesniuose persėjimuose, atsirinkus geriausiai augančioms ląstelėms arba įvykus prisitaikymui prie kultivavimo sąlygų, proliferaciniai ir morfologiniai skirtumai sumažėja. Ląstelėms senstant, paskutiniuose persėjimuose jų forma suapvalėja, jos kelis kartus padidėja, proliferacija sustoja [Hayflick, 2003].

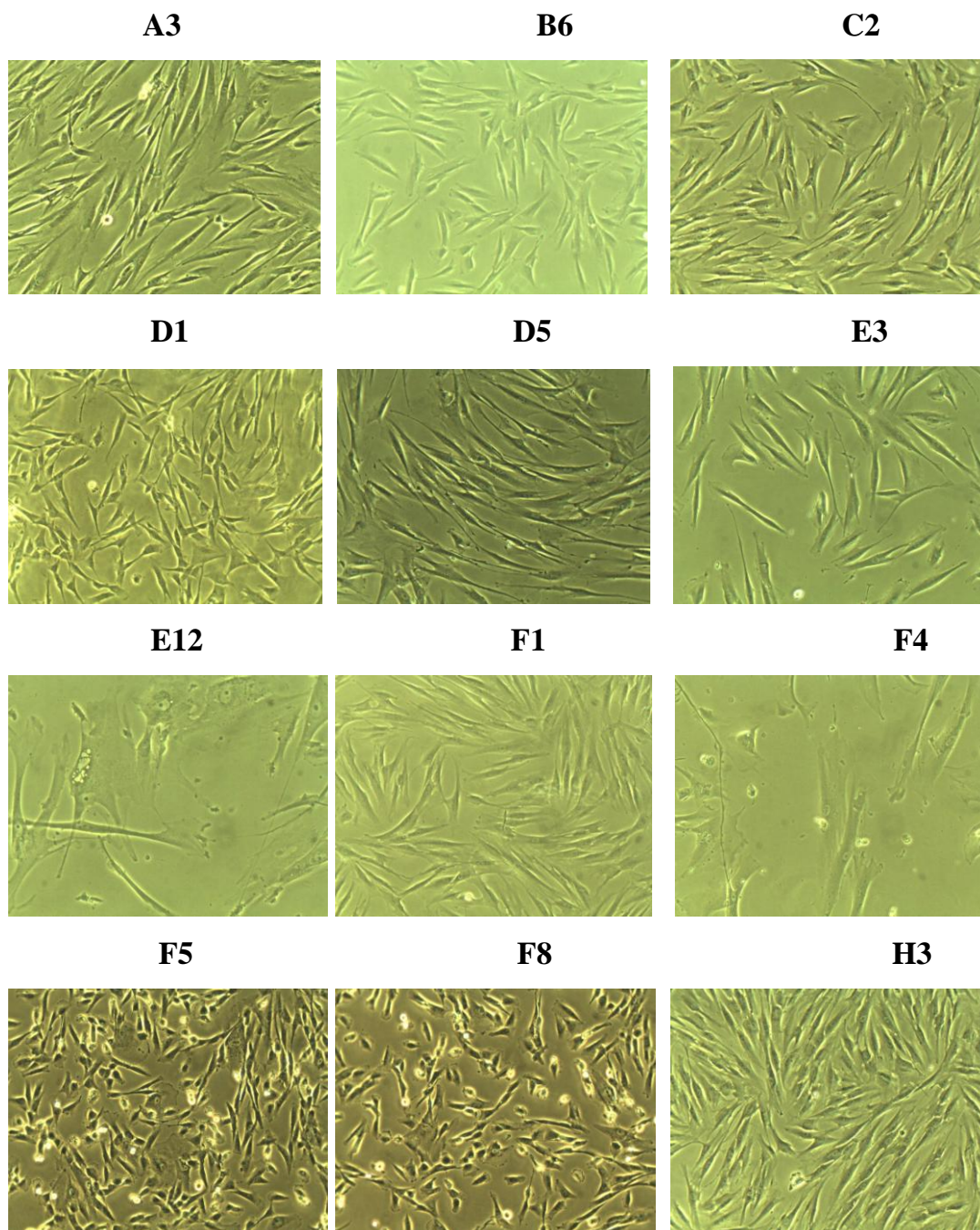
7 lentelė. PD-MKL charakteristika

	<i>PD-MKL</i>
MKL audinys	iškritusio pieninio danties pulpos
Donoro amžius	6
CD ekspresija	CD14-;CD34-;CD45- CD73+;CD90+;CD105+;CD146+/-
Osteogeninė dif.	+
Adipogeninė dif.	+/-
Vidutinis populiacijos padvigubėjimo laikas, val.	24
KFE	16%
Maksimalus persėjimų skaičius	>28

4.2.2. Klonavimas ir gautų klonų morfologija bei proliferacinis aktyvumas

MKL klonavimui ypatingai svarbi ląstelių savybė yra gebėjimas formuoti kolonijas. PD-MKL pasiekė aukštą kolonijų formavimo efektyvumo (KFE) laipsnį (16 %) ir gerokai viršijo rekomenduojamą minimalią 5 % klonavimui tinkamos populiacijos KFE ribą. Klonavimo eksperimentams naudojome trečio persėjimo pieninio danties pulpos mezenchimines kamienines ląsteles. Naudojant limituojančio praskiedimo (*limiting dilution*) metodiką pavyko išskirti ir padauginti 16 individualių klonų. Ląstelių klonų morfologija buvo nevienoda (10 pav.), todėl ląsteles suskirstėme į tris grupes. Pirmoji grupė – pailgos formos ląstelės (klonai A3, B6, C2, D5, E3, F1, H3); antroji grupė – dominuoja smulkios, ataugomis nuo substrato pakilusios ląstelės (klonai D1, F5, F8); trečioji grupė – stambios, grūdėtos ląstelės su ilgomis ataugomis. Pastarosios ląstelės turėjo senėjimo (*senescense*) požymių, tokių kaip lėtas ar sustojęs augimas, ir buvo didesnės lyginant su kitomis grupėmis (klonai E12, F4). Dėl lėto augimo trečios grupės klonų analizė buvo neįmanoma, todėl tolimesniems tyrimams pasirinkome pirmųjų dviejų grupių C2 ir F5 klonus. Vėlesniuose persėjimuose (4–6 persėjimai) tarp pirmos ir antros grupių klonavimo metu stebėti morfologiniai skirtumai išnyko. Tiriant proliferacinį aktyvumą klonavimo metu stebėti pirmos ir antros

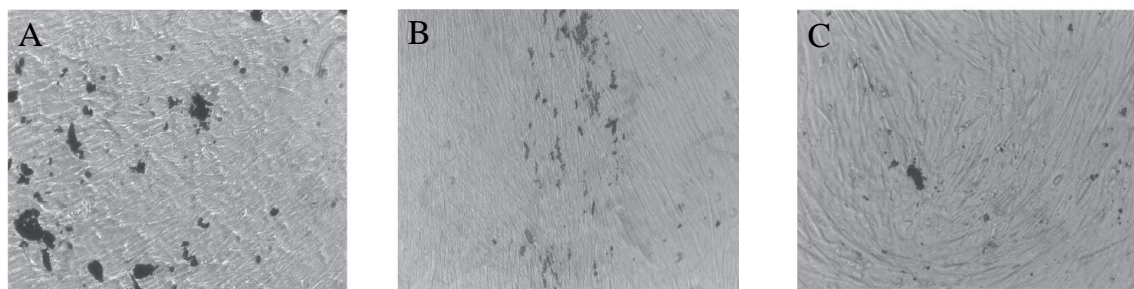
grupės ląstelių dalijimosi greičio skirtumai vėlesniuose persėjimuose išnyko ir populiacijos padvigubėjimo laikas buvo apie 24 valandas.



10 pav. Tipinė klonų, išskirtų iš pirminės PD-MKL kultūros morfologija. PD-MKL buvo klonuota naudojant limituojančio praskiedimo (*limiting dilution*) metodą (aprašymas skyriuje „Metodai“). Fazės kontrastas, padidinimas 100x.

4.2.3. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių kultūros bei jos klonų diferenciacijos tyrimai

Osteogeninė diferenciacija tirta PD-MKL pirminėje kultūroje ir dviejuose iš jos išskirtuose tiriamuose klonuose. Inkubuojant osteogeninės diferenciacijos indukcijos mišinyje jau po 2 sav. nustatytos būdingos kristalų sankaupos (11 pav). Įdomu tai, kad skirtingų klonų osteogeninės diferenciacijos greitis buvo nevienodas. Pavyzdžiui, F5 klonu ląstelių kultūroje diferenciacijos požymiai (mikroskopiškai matomos kristalų sankaupos) buvo pastebėti jau pirmą savaitę, o PD-MKL ir C2 osteogeninės diferenciacijos pradžia stebėta antrą savaitę po indukcijos.



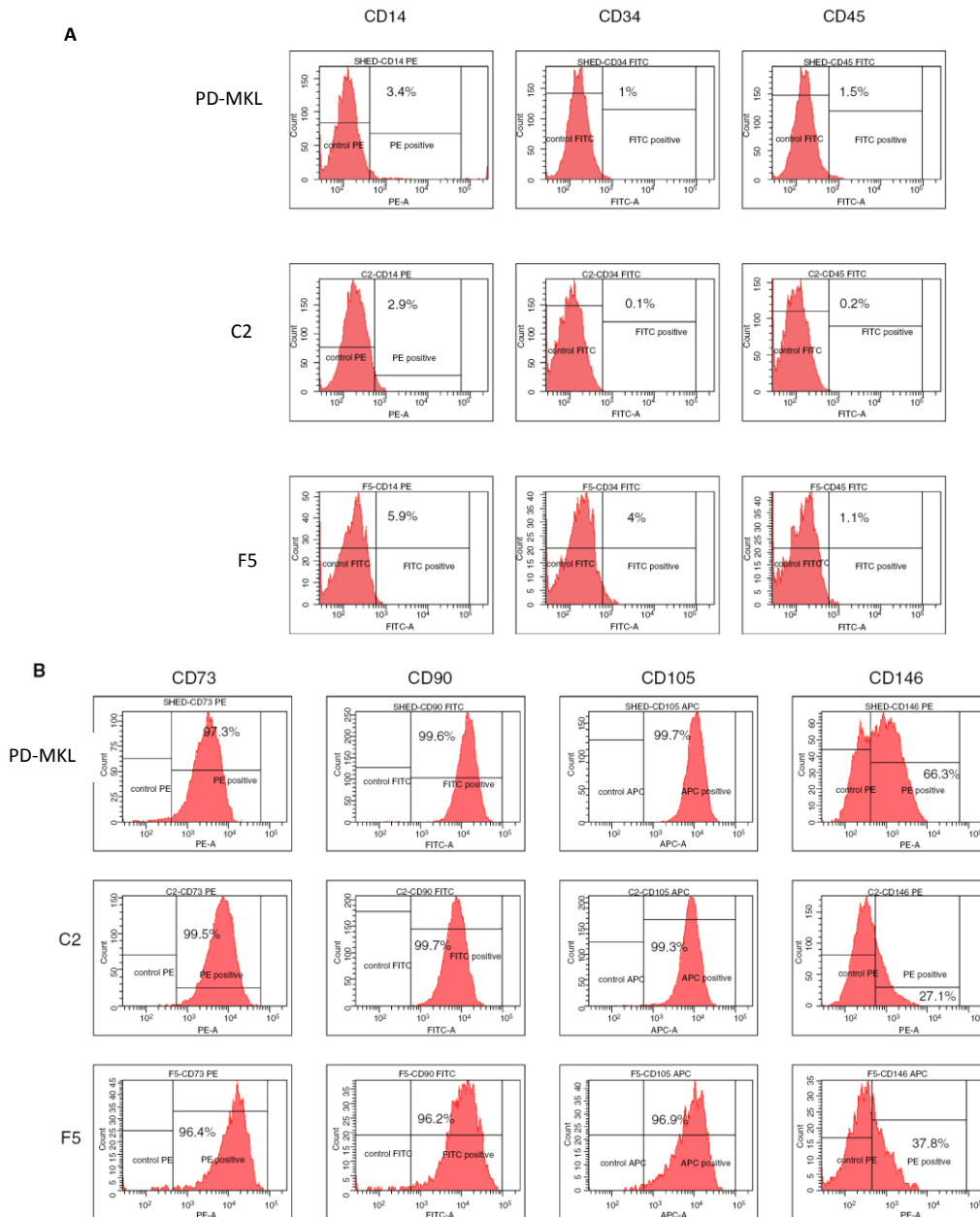
11 pav. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių bei C2 ir F5 klonų osteogeninės diferenciacijos tyrimas. Ląstelių diferenciacija buvo vykdoma 2 savaites inkubuojant osteogeninės diferenciacijos indukcijos mišinyje. Osteogeninė diferenciacija vertinta dažant kaulinio audinio ekstraląsteliniam matiksui būdingas hidroksiapatitų sankaupas sidabro nitratu. **A** – PD-MKL; **B** – C2 klonas; **C** – F5 klonas. Padidinimas 100x.

Adipogeninės diferenciacijos tyrimams naudojome specialius priedus iš StemCell Technologies, tačiau mums nepavyko indukuoti pilnavertės adipogeninės diferenciacijos pirminėse PD-MKL. Pagal protokolą ląstelės buvo kultivuojamos adipogeninės indukcijos mišinyje 3–4 savaites, tačiau nei su mikroskopu, nei dažant Oil Red O nepavyko aptikti didesnių intraląstelinių lipidų sankaupų. Tirdami klonų F5 ir C22 adipogeninį aktyvumą pilnavertės adipogeninės diferenciacijos taip pat negavome. Įdomu, kad F5 klone mikroskopu aptikome būdingų intraląstelinių lipidų nedideles sankaupas.

Diferenciacijos eksperimentų rezultatai rodo, kad PD-MKL kultūra bei jos dukterinių klonų ląstelės gerai diferencijuojasi osteogene kryptimi. PD-MKL adipogeninė diferenciacija nenustatyta.

4.2.4. Paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai

Kadangi paviršiaus žymenys svarbūs apibūdinant ląsteles ir jų diferenciacijos laipsnį, tolimesniuose tyrimuose palyginome PD-MKL ir jos klonų C2, F5 paviršiaus žymenų ekspresiją (12 pav.).



12 pav. Paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai tėkmės citometrijos būdu. (A) Pirminės ląstelių kultūros PD-MKL bei C2 ir F5 klonų paviršiaus neekspresuojamų žymenų ir **(B)** MKL būdingų ląstelių paviršiaus žymenų ekspresija. Vieno paviršiaus žymens matavimui buvo imama po 10 000 ląstelių.

Nustatėme, kad nors prieš tai tirtos savybės (morfologija, proliferacija, diferenciacija) nebuvo vienodos, tačiau visų tirtų ląstelių paviršiaus žymenų ekspresija atitiko tipinį MKL paviršiaus žymenų rinkinį (teigiami CD73, CD90, CD105; neigiami CD34, CD45, CD14). Skirtumai buvo stebėti CD146 ekspresijoje (12 pav.). Pirminėje PD-MKL kultūroje daugiausia ląstelių ekspresavo CD146 (66 %), F5 šį žymenį turėjo 37 % ląstelių, o C2 klonas pasižymėjo silpniausia jo ekspresija (27 %). Yra žinoma, kad CD146 ekspresuojančios ląstelės pasižymi klonogeniškumu, sugebėjimu atsinaujinti (*self-renewal*) ir geresniu gebėjimu diferencijuotis [Schwab and Gargett, 2007]. Šio darbo pradžioje tirtas PD-MKL ir jos dukterinių klonų klonogeniškumas siejasi su CD146 ekspresijos lygiu, todėl manome, kad jo ekspresijos kiekis gali būti svarbi kokybinė MKL populiacijos charakteristika *in vitro*.

4.2.5. Pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių ir jos dukterinių klonų proteominė analizė

Kitas tikslas buvo nustatyti ir palyginti MKL, išskirtų iš pieninio danties pulpos (PD-MKL) bei jos dukterinių klonų ekspresuojamus baltymus. Kad įvykdytume šį uždavinį, atlikome palyginamąją proteominę analizę. Analizei pasirinkome 2DE gelius: pirminės PD-MKL kultūros, taip pat dukterinius klonus F5 ir C2. Siekdami sumažinti 2DE kompleksškumą ir nustatyti galimus baltymų lokalizacijos skirtumus, tyrimui išskyrėme branduolio ir citoplazmos baltymų frakcijas. Visais atvejais mikroskopu buvo tikrinama branduolio frakcijos užterštumas citoplazmos komponentais (žr. „Metodai“).

Atlikome skaitmeninę lyginamąją analizę ir atrinkome baltymus, kurių ekspresija skyrėsi pirminėse ląstelėse ir dukteriniuose klonuose. Pasirinkti baltymai buvo tirti atliekant 2D gelių skaitmeninę lyginamąją analizę ir identifikuojami naudojantis MALDI-TOF MS. 8 lentelėje pateikiami duomenys apie identifikuotus baltymus ir trumpi jų funkcijų aprašymai. Mūsų duomenys rodo, kad F5 ir C2 klonų ląstelių baltymų sudėtis nežymiai skiriasi nuo pirminių

(motininių) ląstelių. Dauguma identifikuotų baltymų sutapo su literatūroje aprašytais MKL būdingais baltymais, tokiais kaip vimentinas, aktininas, Hsp70, aneksinas, laminas ir kiti [Mareddy et al., 2009; Wagner et al., 2006]. MKL būdingas vimentinas yra citoskeleto baltymas ir susijęs su ląstelių prikibimu prie substrato bei migracija. Šis baltymas yra stipriai ekspresuojamas MKL kultūrose, išskirtose iš kaulų čiulpu, riebalinio audinio, virkštelės venos kraujo [Feldmann et al., 2005; Ivaska et al., 2007; Park et al., 2007]. Aktininas yra su aktinu besijungiantis baltymas, svarbus viduląstelinių struktūrų susidarymui [Otey and Carpen, 2004]. Šalia šios pagrindinės funkcijos, aktininas dar susijęs su ląstelių diferenciacijos reguliacija, kaip manoma, reguliuojant diferenciacijai svarbių genų transkripciją [Goffart et al., 2006]. Fibronektino 1 baltymo ekspresija buvo nustatyta tik F5 klone. Šis baltymas svarbus ekstraląstelinio matrikso gamybai ir ląstelės sąveikai su matriksu [Sottile and Hocking, 2002]. Atlikus skaitmeninę lyginamąją baltymų ekspresijos analizę PD-MKL ir dukterinių klonų lizatuose, didžiausius skirtumus nustatėme tarp lamino B1 bei Paf/RNR polimerazės II komplekso komponento baltymų ekspresijos. Klonas F5 šių baltymų ekspresavo žymiai mažiau nei PD-MKL ir C2 klonas. Šie abu baltymai yra susiję su RNR transkripcijos reguliacija, tačiau kokių genų transkripcija priklauso nuo lamino B1 bei Paf/RNR polimerazės II komplekso komponento skirtingo kiekio yra nežinoma [Martin et al., 2009]. Kitų tyrime identifikuotų baltymų ekspresija tarp PD-MKL ir dukterinių klonų skyrėsi nežymiai.

8 lentelė. Branduoliuose ir citoplazmoje identifikuoti PD-MKL (PD) ir C2 bei F5 klonų baltymai ir jų ekspresijos palyginimas

<i>Acc numeris</i>	<i>Baltymo pavadinimas</i>	<i>Baltymo funkcija</i>	<i>Sekos padengim as, %</i>	<i>Vidutinis kiekio santykis</i>					
				<i>Citoplazma</i>			<i>Branduolys</i>		
				<i>C2 PD</i>	<i>F5 PD</i>	<i>C2 F5</i>	<i>C2 PD</i>	<i>F5 PD</i>	<i>C2 F5</i>
Gi/15277503	Actin, beta (ACTB)	Cytoskeleton protein	61	1.30	1.10	1.18	-1.14	-1.39	1.22
Gi/4501887	Actin, gamma (ACTG1)	Cytoskeleton protein	66	-1.12	-1.12	1.00	-1.97	-2.42	1.23
Gi/12025678	Actinin, alpha 4	Cytoskeleton protein, Actin-binding protein	60				-1.21	-2.53	2.10
Gi/4757756	Annexin II, isoform 2 (ANX2)	Calcium-binding protein	70	1.24	1.12	1.11	-2.31	-1.92	-1.21
Gi/63162572	Chaperonin containing TCP1 subunit 3	Molecular chaperone	53				-2.00	-2.87	1.44
Gi/62089266	Fibronectin 1	Fibroblastic marker	27						
Gi/119590943	Fibronectin 1, is. CRA_h		27						
Gi/386758	Glucose-regulated protein GRP78 (HSPA5, Bip)	Glucose-dependent molecular chaperone	42	1.57	1.02	1.55			
Gi/5729877	Heat shock 70-kDa protein isoform 1 (HSPA8 or Hsc70)	Molecular chaperone	39	-1.38	-1.11	-1.24	-1.28	-1.93	1.50
Gi/13384620	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRPK)	Pre-mRNA-binding protein	43				-1.25	-2.24	1.78
Gi/15126742	Lamin B1	Nuclear matrix protein	58				-1.38	-22.91	16.63
Gi/13508448	Nucleoporin NYD-SP7 (or TSGA10)	Nuclear pore complex protein	49				-1.50	-1.14	-1.32
Gi/24308005	Paf/RNA polymerase II complex component	Transcription	52				-4.88	-14.90	3.06
Gi/114657944	Pyruvate kinase 3, isoform 2 (PK3)	Glycolysis	56	1.07	1.95	-1.82	-1.44	-1.49	1.04
Gi/4506667	Ribosomal protein PO (RPLPO)	Ribosomal protein	35				-1.46	-1.46	1.00
Gi/4758158	Septin 2 (SEPT2)	Cytokinesis	37				-2.85	-3.90	1.37
Gi/7706041	TBC1 domain family, member 7	Cytokinesis	38	1.16	1.58	-1.36			
Gi/4507645	Triose phosphate isomerase 1 (TPI1)	Glycolysis	59	-1.72	-1.23	-1.41			
Gi/18088719	Tubulin, beta (TUBB)	Cytoskeletal protein	28				-1.91	-1.49	-1.28
Gi/62414289	Vimentin (VIM)	Cytoskeletal protein, mesenchymal tissue marker	84				-1.34	-2.62	1.95

Remdamiesi mūsų tyrimų rezultatais darome išvadą, kad pirminė iš pieninio danties pulpos išskirta MKL kultūra yra heterogeniška, t.y. sudaryta iš skirtingomis savybėmis pasižyminčių ląstelių subpopuliacijų.

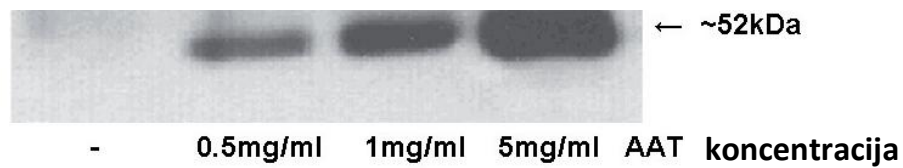
4.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių migravimo į uždegiminį židinį mechanizmo tyrimas

Bet kokio tipo audinių pažeidimą visada lydi uždegiminė reakcija, kurios metu išskiriamos cheminės medžiagos (įvairūs chemokinais, citokinais ir kt.) skatina lokalią ir galbūt sisteminę MKL migraciją į pažeidimo zoną. Tokiu būdu šios ląstelės patenka į uždegiminę mikroaplinką. Vienas iš svarbiausių uždegiminės aplinkos komponentų yra neutrofilų produkuojamos serino proteinazės, kurios remodeliuoja ekstraląstelinį matriksą, taip pat reguliuoja daugelio uždegimui svarbių citokinių ir jų receptorių aktyvumą [Wiedow and Meyer-Hoffert, 2005]. Natūralus neutrofilų gaminamų serino proteinazių inhibitorius yra antiproteinazė alfa1-antitripsinas (AAT). Uždegimo metu šio baltymo koncentracija sisteminėje kraujotakoje, taip pat ir pažeidimo židinyje, padidėja keletą kartų [Law et al., 2006]. Tačiau AAT veikia ne tik kaip serino proteinazių inhibitorius, jis taip pat gali turėti įtakos įvairioms ląstelių funkcijoms [Janciauskiene et al., 2007]. Šiame darbe kompleksiskai tyrėme AAT poveikį pieninio danties mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms.

4.3.1 Alfa1-antitripsino poveikis mezenchiminių kamieninių ląstelių proliferaciniam aktyvumui

Siekdami įvertinti AAT poveikį proliferaciniam PD-MKL aktyvumui, naudojome subfiziologines (0,5 mg/ml), fiziologines (1 mg/ml) ir uždegimui būdingas (5 mg/ml) AAT baltymo koncentracijas. Paveikus MKL skirtingomis AAT koncentracijomis patekimas į ląsteles priklausė nuo AAT kiekio (13 pav. A). AAT patekimas į ląstelę stebėtas jau po 20 min ir didžiausias jo kiekis buvo po 12 valandų. Konfokalinės mikroskopijos tyrimas parodė, kad AAT ląstelėje randamas šalia branduolio esančiose mažose granulėse, galbūt endoplazminiame retikuliume. Didėjant dozei granulių kiekis taip pat didėjo (13 pav. B).

A

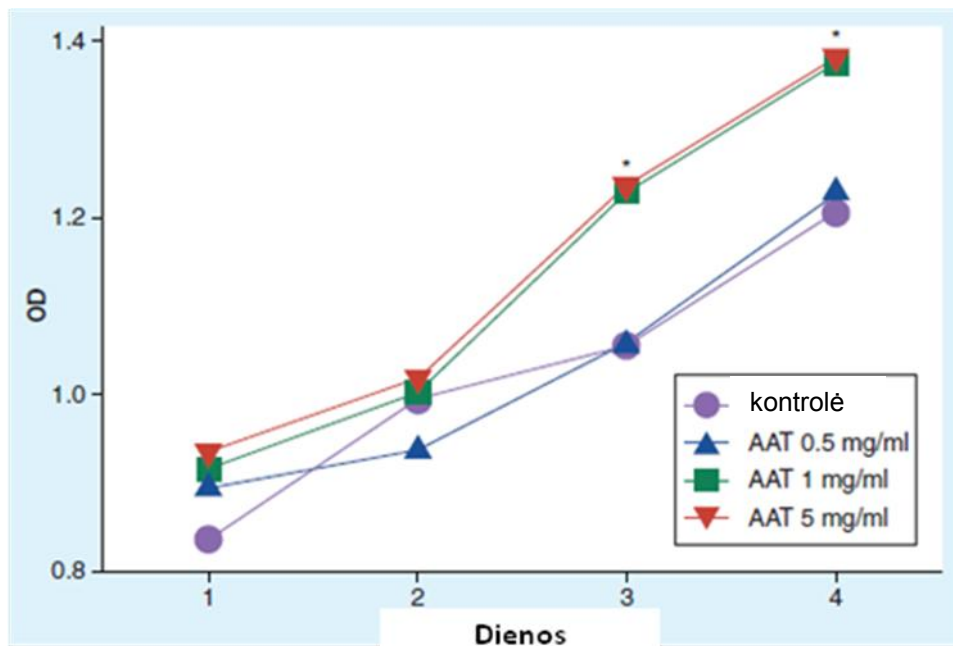


B.



13 pav. Alfa1-antitripsino patekimas į pieninio danties pulpos mezenchimines kamienines ląsteles. Priklausomai nuo dozės, AAT detektuotas imunobloto būdu (A) ir imunocitochemiškai, naudojant konfokalinę mikroskopiją (B). Padidinimas 400x.

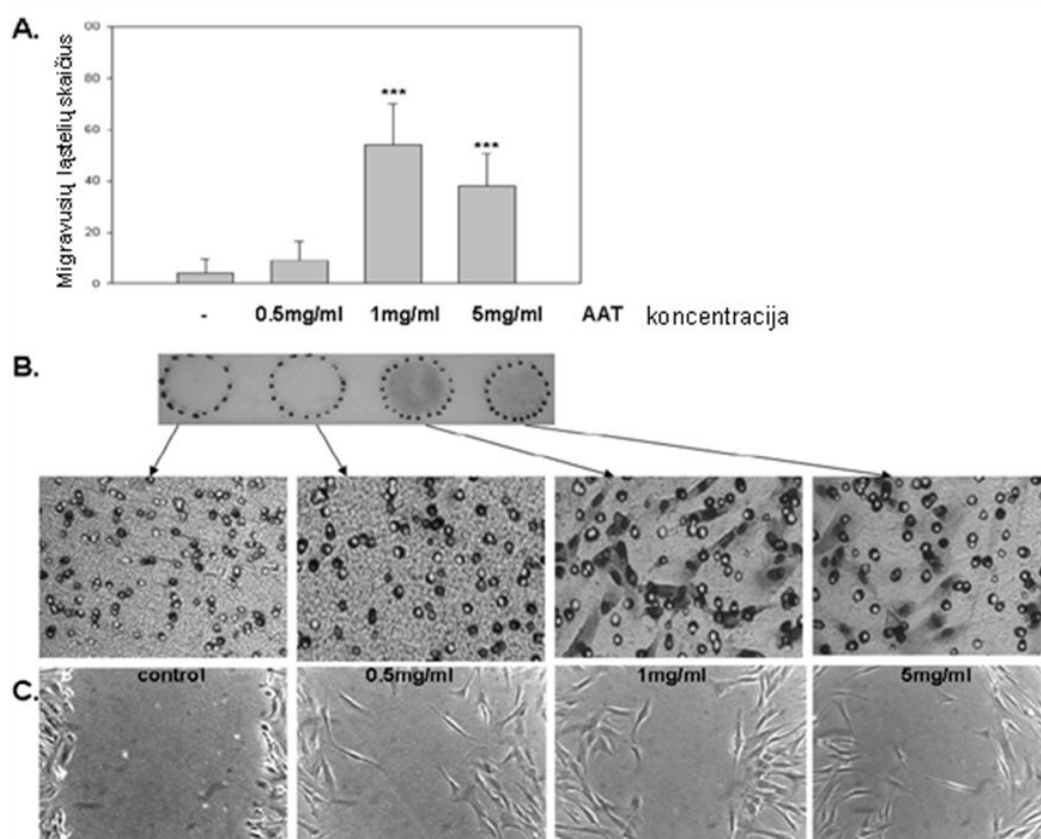
Proliferacinio aktyvumo tyrimai buvo atliekami keturias dienas. MKL veiktos AAT (0.5, 1 ir 5 mg/ml) visą savaitę, kontrolinės ląstelės augintos terpėje be serumo. Nustatėme statistiškai reikšmingą ląstelių, kultivuočių su 1 mg/ml ir 5 mg/ml AAT, proliferacinio aktyvumo padidėjimą (14 pav.). Šis efektas išryškėjo tik trečią dieną. Įdomu, kad tiek fiziologinės, tiek uždegiminės AAT baltymo koncentracijos vienodai stimuliuo PD-MKL proliferacinį aktyvumą. Tuo tarpu ląstelių, paveiktų subfiziologinėmis AAT baltymo dozėmis, augimo greitis beveik nesiskyrė nuo kontrolinių. Šis rezultatas rodo, kad AAT baltymas gali būti svarbus reguliuojant PD-MKL populiacijos atsinaujinimą *in vivo* sąlygomis.



14 pav. AAT poveikis PD-MKL proliferacijai. Ląstelės buvo veiktos AAT (0.5, 1 ir 5 mg/ml) visą savaitę. Statistiškai patikimi, palyginus su kontrole, skirtumai paženklinėti *, kuris nurodo $p < 0.05$, $n = 3$.

4.3.2. Alfa1-antitripsino poveikis ląstelių migraciniam aktyvumui

Toliau tyrėme, kaip subfiziologinės, fiziologinės ir uždegiminės AAT baltymo koncentracijos veikia PD-MKL gebėjimą migruoti. Nustatėme, kad AAT aktyvina MKL migraciją (15 pav.). Ląstelės 12 val. buvo augintos paveikus skirtingomis AAT dozėmis: 0,5, 1 ir 5 mg/ml, tada perkeltos į viršutinius Boydeno kameros šulinėlius. Apatiniuose šulinėliuose buvo įpilta terpė su 10 % FBS (chemoatraktantas). Naudojome membranas su 8 μm poromis. Pažymėtina, kad stipriausią migravimo per membraną efektą gavome panaudoję fiziologinę AAT baltymo koncentraciją.

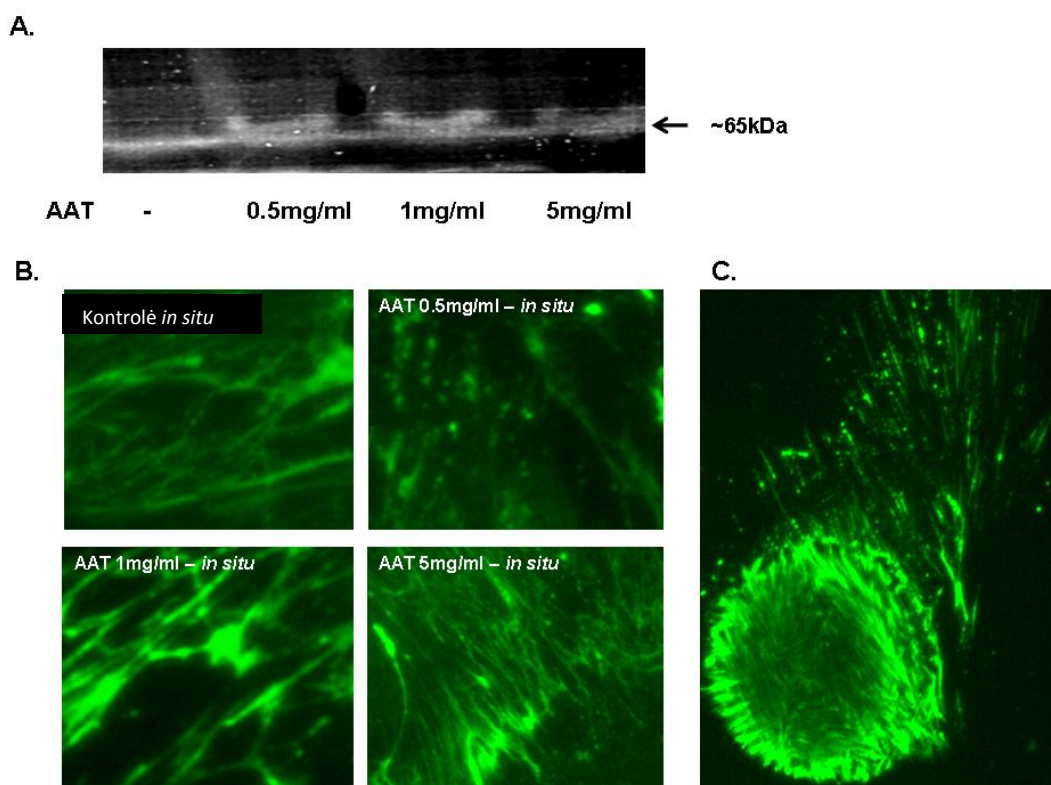


15 pav. AAT poveikis PD-MKL migracijai. **A** – grafike pavaizduotas vidutinis migravusių ląstelių kiekis trijuose regėjimo laukuose kiekvienam eksperimentiniam taškui; \pm SD. Buvo gauti patikimi skirtumai: $p < 0,001$ – ***. **B** – atitinkami membranos makro- ir mikrovaizdai (didinimas $\times 100$). **C** – monosluoksnyje esančios ląstelės, 12 val. augintos veikiant AAT, 0,5, 1 ir 5 mg/ml koncentracijomis. Prieš pat pridendant AAT į kultūrą, ląstelių monosluoksnyje pipetės antgaliu buvo padaryti įbrėžimai (dirbtinės žaizdos). Nuotraukos darytos po 24 val. Didinimas $\times 100$.

Naudojant fiziologinę 1mg/ml AAT koncentraciją migravusių per membraną ląstelių buvo atitinkamai apie 80 % ir 30 % daugiau, nei ląstelių, kultivuočių su 0,5 mg/ml ar 5 mg/ml AAT. Šis rezultatas rodo, kad PD-MKL, kultivuočių aplinkoje su AAT, baltymo migracinis aktyvumas didėja. Eksperimentai panaudojant žaizdos gijimo modelį patvirtino šiuos duomenis (15 pav. C).

4.3.3. Pieninio danties mezenchiminių kamieninių ląstelių želatinazinio aktyvumo tyrimas

Zimografijos tyrimai parodė, kad želatinaziniu aktyvumu pasižymėjo supernatantai, surinkti nuo PD-MKL, inkubuotų su AAT (16 pav.). Šis aktyvumas didėjant AAT baltymo koncentracijai mažėjo. Didžiausias želatinazinis aktyvumas stebėtas po poveikio AAT subfiziologine (0,5 mg/ml) ir fiziologine (1 mg/ml) koncentracijomis. Tuo tarpu uždegiminė AAT koncentracija (5mg/ml) želatinazinį aktyvumą turinčių baltymų sekreciją tirtose ląstelėse aktyvavo silpniau. Pagal nustatytą molekulinę masę tirtas želatinazinį aktyvumą turintis baltymas gali būti matrikso metaloproteinazė 2 (MMP2), tačiau to patvirtinimui dar turi būti atlikti papildomi eksperimentai.



16 pav. Alfa1-antitripsno poveikis proteolitiniam PD-MKL aktyvumui. A–zimografijos gelyje matomas želatinazės aktyvumas, aptiktas AAT paveiktų ląstelių auginimo terpėje. Gelis dažytas Coomassie Blue dažu ir skaidrios juostelės rodo želatinazinio aktyvumo turinčių baltymų vietą. **B** – aktyvių želatinazių pasiskirstymas demonstruojamas tiriant *in situ* zimografijos būdu. Fluorescentinės zonos rodo aktyvias želatinazes (padidinimas 200x). **C** – *in situ* zimografijos būdu ištirta viena ląstelė iškart po pasėjimo (400x didinimas).

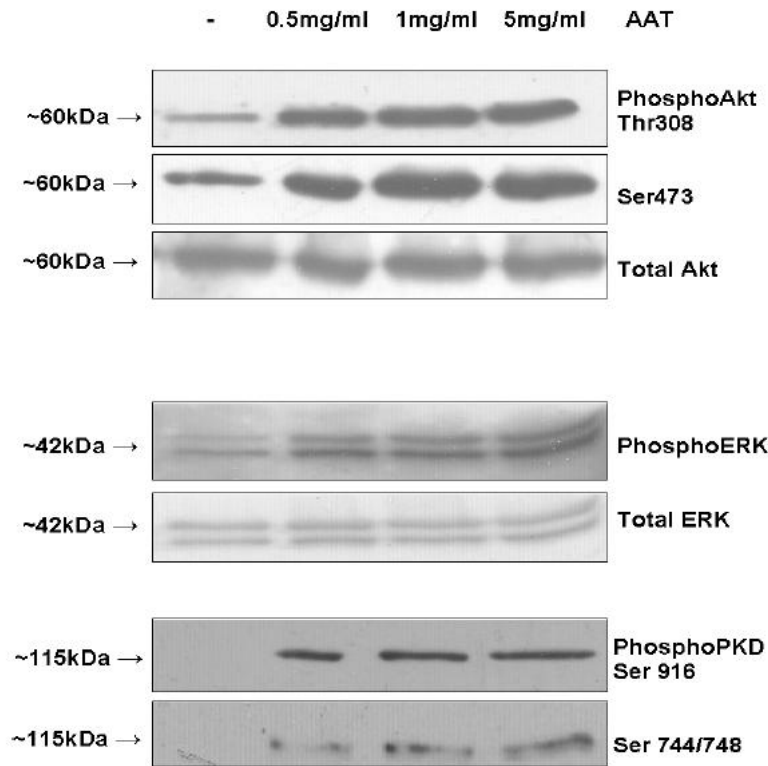
In situ zimografijos eksperimentai parodė, kad želatinaziniu aktyvumu pasižymėjo tiek kontrolinės, tiek įvairiomis AAT baltymo koncentracijomis veiktos mezenchiminės kamieninės ląstelės (16 pav. B). Stebėjome šiek tiek didesnę želatinazinį aktyvumą ląstelėse, veiktose 1 mg/ml ir 5 mg/ml AAT. Įdomu, kad želatinazinio aktyvumo sritys buvo lokalizuotos ląstelių struktūrose, primenančiose fokales adhezijas. *In situ* zimografijos būdu ištirta viena ląstelė iš karto po pasėjimo pavaizduota 16 pav. C. Gerai matyti migracijos metu paliktas „pėdsakas“ bei pati migruojanti ląstelė. Mūsų duomenys rodo, kad AAT didina želatinazinį MKL aktyvumą. Šis aktyvumas yra būtinas ląstelių audiniuose migracijos metu vykstančiam ekstraląstelinio matrikso remodeliavimui ir skaidymui.

4.3.4. Alfa1-antitripsino poveikis ląstelių signaliniams keliams

Įvairūs išoriniai signalai aktyvina skirtingas signalo perdavimo kaskadas, kurios nulemia ląstelės funkcinį atsaką (migracijos pokyčiai, citoskeleto reorganizacija, pagreitėjusi ar sulėtėjusi proliferacija ir kt.).

Mes nustatėme, kad fiziologinės ir uždegiminės AAT baltymo koncentracijos keičia PD-MKL gebėjimą migruoti ir želatinazinį bei proliferacinį aktyvumą. Todėl tolesniame etape ištyrėme, kaip kinta šioms ląstelės funkcijoms svarbių signalinių kelių aktyvumas. Akt signalinis kelias yra svarbus ląstelių gyvybingumui, proliferacijai, metabolizmui ir kitoms funkcijoms. Mes nustatėme bazinį Akt signalinio kelio aktyvumą proliferuojančiose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse (17 pav.). Pilnai Akt kinazės aktyvacijai reikalingi du fosforilinimai: Thr 308 (fosforilina PDK1) ir Ser 473 (fosforilina neseniai identifikuotą mTORC2) [Manning and Cantley, 2007]. Poveikis su 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ir 5 mg/ml AAT po 20 min indukavo Thr 308 ir Ser 473 fosforilinimą. Pabrėžtina, kad fosforilinimo lygis beveik nepriklausė nuo AAT koncentracijos. Taip pat nustatėme, kad AAT baltymas aktyvina Erk signalinį kelią

mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse (17 pav.). Aktyvacijos lygis nepriklausė nuo AAT dozės.



17 pav. AAT poveikio sukelti viduląstelinio signalo perdavimo molekulių aktyvumo pokyčiai PD-MKL. Ląstelės buvo veiktos skirtingomis AAT koncentracijomis: 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ir 5 mg/ml 20 minučių; Akt, Erk ir PKD aktyvumo pokyčiai buvo nustatyti imunobloto būdu, naudojant atitinkamus polikloninius antikūnus.

Pasak literatūros šaltinių, AAT *in vitro* stimuliuoja fibroblastų augimą. Šiam efektui buvo būtina Erk signalinio kelio aktyvacija [Dabbagh et al., 2001]. Todėl gali būti, kad mūsų nustatytam MKL proliferacinio aktyvumo padidėjimui, kurį indukuoja AAT, svarbus Erk signalinis kelias. Proteino kinazė D (PKD) yra ląstelių proliferacijos, migracijos ir invazyvumo reguliatorius. Todėl šis signalinis kelias gali būti svarbus AAT poveikio MKL mediatorius. Nustatėme, kad kontrolinėse (AAT nestimuliuotose) ląstelėse PKD signalinis kelias yra neaktyvus (17 pav.). Po poveikio AAT nustatėme tiek Ser744/748, tiek Ser916 fosforilinimą. Įrodyta, kad Ser916 fosforilinimas yra svarbus PKD molekulės konformacijos palaikymui, ši modifikacija taip pat turi įtakos kinazinio aktyvumo trukmei [Vertommen et al., 2000]. Įdomu tai, kad PKD Ser916, o ne Ser744/748

fosforilinimas, buvo būtinas kaulų morfogenetinio baltymo 2 (BMP2) indukuotai MKL osteogeninei diferenciacijai [Lemonnier et al., 2004]. Mūsų rezultatai rodo, kad AAT aktyvina PKD pieninio danties pulpos mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse abiem būdais – fosforilinant ir Ser744/748, ir Ser916.

4.4. Rezultatų apibendrinimas

Šiuo metu vienas iš perspektyviausių sunkių sveikatos sutrikimų gydymo būdų yra kamieninių ląstelių terapija. Jau dabar sėkmingai taikomos ląstelių terapijos, dažniausiai susijusios su mezenchiminių kamieninių ląstelių imunomoduliacinėmis savybėmis bei kuriami MKL paremti metodai audinių regeneracijai ir transplantacijai [Shi et al., 2010]. Tačiau rezultatai rodo, kad, be teigiamo poveikio, gali pasireikšti ir šalutiniai efektai, kartais net nesuderinami su gyvybinėmis funkcijomis. Dažniausiai taip nutinka dėl sunkiai pasiekiamo atsikartojamumo, o to priežastys yra standartizuotos MKL išskyrimo iš organizmo ir kultivavimo sąlygų metodikos nebuvimas, ląstelių heterogeniškumas, taip pat žinių apie kamieninių ląstelių savybes ir funkcijas trūkumas [Prockop, 2009].

Šiame darbe buvo kompleksiskai tirta *in vitro* kultivuojamų ląstelių funkcijų priklausomybė nuo vienos svarbiausių ir heterogeniškiausių auginimo terpės sudėtinių dalių – serumo. Nagrinėta MKL populiacijos sudėtis ir atlikta jos klonų analizė bei MKL migracinės savybės, naudojant *in vitro* migravimo į uždegiminį židinių modelį. Be to, analizuoti MKL migracijoje dalyvaujantys signaliniai keliai, tiriant universalių viduląstelinio signalo perdavimo molekulių aktyvinimą.

Saugus mezenchiminių kamieninių ląstelių padauginimas iki pakankamo terapijai kiekio yra vienas iš svarbiausių uždavinių. Žinant, kad *in vitro* kultivuojamų MKL savybės keičiasi labai greitai, būtinybė gauti kuo daugiau ląstelių neturi pakenkti jų funkcijoms [Petersen and Niklason, 2007]. Kompleksiniuose terpės serumo poveikio MKL tyrimuose naudojome iš riebalinio

audinio išskirtas ląsteles, kurios nuo pat išskyrimo buvo augintos tik vienos rūšies serume. Šio tyrimo modelio unikalumas pasižymėjo tuo, kad buvo lyginamos to paties donoro ląstelės, kurių auginimas skyrėsi tik vienu komponentu – serumu. Darbe naudoti keturių rūšių serumai ar jo pakaitalai: pritaikytas MKL auginimui fetalinis veršelio serumas (FBS-Sp), atsitiktinai parinktas fetalinis veršelio serumas (FBS), alogeninis žmogaus serumas (ŽS) ir sintetinis serumo pakaitalas (Ultroser G).

Charakterizuojant MKL stebėti morfologiniai skirtumai rodė, kad terpėje su FBS-Sp ir FBS ląstelės buvo didesnės. Ląstelės terpėje su FBS rodė morfologinius ankstyvo senėjimo požymius. Su Ultroser G serumu pakaitalu augintos ląstelės pasižymėjo didžiausiu greičiu ir stipriausia adipogenine ir osteogenine diferenciacija. Skirtingos sudėties terpėse augintų MKL tėkmės citometrijos tyrimų rezultatai, naudojant MKL būdingus paviršiaus žymenis (CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 ir CD105), buvo panašūs. Nepaisant nežymių skirtumų, visuose serumuose augintos ląstelės atitiko charakterizavimui keliamus reikalavimus. CD146 paviršiaus žymuo yra randamas tam tikroje kultivuojamų MKL populiacijos dalyje [Schwab and Gargett, 2007]. Paviršiaus žymenų tyrimai parodė, kad, jei ląstelė auginama Ultroser G serume, jos paviršiuje CD146 neaptinkamas. Vertinant populiacijos padvigubėjimo greičio ir diferenciacijos charakteristikas patraukliausios buvo terpėje su Ultroser G augintos ląstelės. Tačiau diferenciacijos metu ekspresuojamų genų mRNR kiekybiniai tyrimai realaus laiko PGR metodu parodė, kad sintetinis serumo pakaitalas gali aktyvinti atitinkamų osteogeninės diferenciacijos (*Msx2*) ir adipogeninės diferenciacijos (*PPAR γ*) žymenų ekspresiją. Tiriant diferenciacijos metu atsiradusius šių genų transkripcijos pokyčius, ląstelės, augintos terpėje su Ultroser G, nesustiprino šių genų transkripcijos po diferenciacijos indukcijos. Kito vėlyvos osteogeninės diferenciacijos žymens – *osteopontino* – analizė parodė, kad bazinė jo transkripcija proliferuojančiose Ultroser G ląstelėse buvo labai silpna ir, lyginant su kitomis ląstelėmis, augintomis natūralios kilmės serumuose, diferenciacijos metu yra aiškiai padidėjusi. Tyrimas parodė, kad ląsteles auginant terpėje su FBS-

Sp, FBS ar ŽS, genų *Msx2*, *PPARγ* ir *osteopontino* genų bazinė transkripcija ir diferenciacijos indukuoti transkripcijos pokyčiai iš esmės atitiko literatūroje publikuojamus rezultatus. Tyrimai buvo atlikti iš dviejų skirtingo amžiaus donorų skirtingos anatomicinės vietos išskirtų riebalų mezenchiminių kamieninių ląstelių. Kokia rastų skirtumų priežastis ir ar tai gali būti kliūtis naudojant skirtingo tipo ląsteles terapijai, yra ateities tyrimų objektas. Galima spėti, kad sintetiniame serumo pakaitale esantys augimo faktoriai galėjo aktyvinti su diferenciacija susijusius signalinius kelius ir tuo pačiu išlaikyti didelį proliferacijos greitį. Galimos terpėje su Ultroser G augintų ląstelių indukuotos pradinės diferenciacijos būsenos galimybę patvirtina ir dvikryptės elektroforezės duomenys, pagal kuriuos R-MKL-U ląstelėse rasta mažiau ekspresuojamų ir identifikuotų baltymų nei su kitais serumais augintose ląstelėse. Taigi remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad naudojant sintetinius serumo pakaitalus būtina patikrinti, ar MKL funkcijos identiškos kaip ir literatūroje aprašytų, dažniausiai terpėje su FBS augintų, kamieninių ląstelių. Mūsų nuomone, siekiant išvengti FBS keliamų problemų (zoonozės, imuninio atsako prieš serumo baltymus), gali būti naudojamas žmogaus serumas – viena iš tinkamiausių ląstelių auginimo terpės serumo alternatyvų.

Kultivuojama MKL populiacija nėra homogeniška. Heterogeniškumą gali sukelti kultūros išskyrimo metu atsiradęs užterštumas kito tipo ląstelėmis, skirtingo diferenciacijos laipsnio kamieninės ląstelės ar hierarchija [Ylostalo et al., 2008]. Norėdami nustatyti, ar tiriamą MKL populiaciją yra heterogeniška ir kuo skiriasi atskiri populiacijos klonai, atlikome iš pieninio danties pulpos išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių (PD-MKL) populiacijos individualių klonų išskyrimo ir padauginimo *in vitro* eksperimentus. Sėkmingai išskyrę, padauginę ir charakterizavę individualius MKL klonus, galėjome eksperimentiškai palyginti jų savybes ir įvertinti pirminės MKL populiacijos homogeniškumą. Ištyrę pirminės kultūros ir jos klonų paviršiaus žymenių (CD) ekspresiją, nustatėme MKL būdingą teigiamų ir neigiamų CD rinkinį. Analizuodami klonų ląstelių morfologiją, fiksavome jos skirtumus. Siekdami rasti MKL populiaciją sudarančių ląstelių

skirtumus ir panašumus, atlikome pasirinktų PD-MKL klonų proteominę analizę. Daugelis šio tyrimo metu identifikuotų baltymų sutapo (tarp pirminės ląstelių kultūros PD-MKL ir jos dukterinių klonų F5 ir C2) ir sudėtis buvo panaši į iš kitų audinių išskirtų MKL baltymų sudėtį. Tai rodo, kad pirminė ląstelių kultūra ir jos dukteriniai klonai išlaiko pastovų gausiai ekspresuojamų (dažniausiai citoskeleto) baltymų visumą. Analizuodami 2DE gelius taip pat nustatėme, kad daugelis skirtumų tarp pirminės ląstelių kultūros ir jos dukterinių klonų yra nežymūs, dažniausiai susiję su skirtingu to paties baltymo ekspresijos lygiu. Remdamiesi mūsų tyrimų rezultatais darome išvadą, kad pirminė MKL, išskirtų iš pieninio danties pulpos, kultūra yra heterogeniška, t.y. sudaryta iš skirtingomis savybėmis pasižyminčių ląstelių subpopuliacijų, tačiau išsamiam skirtumų charakterizavimui būtini funkciniai tyrimai.

MKL migravimui į uždegiminį židinį yra svarbūs uždegiminės aplinkos komponentai. Vieni iš jų, neutrofilų gaminamos serino proteinazės, remodeliuoja ekstraląstelinę matriksą, taip pat reguliuoja daugelio uždegimui svarbių citokinų ir jų receptorių aktyvumą [Wiedow and Meyer-Hoffert, 2005]. Neutrofilų gaminamų serino proteinazių natūralus inhibitorius yra antiproteinazė alfa1-antitripsinas (AAT). Uždegimo metu šio baltymo koncentracija sisteminėje kraujotakoje ir pažeidimo židinyje padidėja keletą kartų [Law et al., 2006]. Tačiau AAT veikia ne tik kaip serino proteinazių inhibitorius, jis gali paveikti įvairias ląstelių funkcijas (proliferaciją, migraciją) [Janciauskiene et al., 2007]. Uždegimo poveikį mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms atlikome kompleksiskai tirdami AAT įtaką pieninio danties pulpos mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms. Nustatėme, kad uždegiminės ATT dozės sukelia PD-MKL proliferacinį aktyvumą. Be to, rezultatai, gauti naudojant Boydeno kamerą, rodė, kad PD-MKL, kultivuotų aplinkoje su fiziologine ir uždegimine AAT koncentracija, migracinis aktyvumas didėja. Eksperimentai panaudojant žaizdos gijimo modelį tai patvirtino. Ląstelėms migruojant audiniuose proteazinis ląstelių aktyvumas yra būtinas ekstraląstelinio matrikso remodeliavimui ir skaidymui. Mūsų duomenys rodo, kad AAT gali didinti želatinazinį PD-MKL aktyvumą. Tolesniame etape ištyrėme, kaip kinta

minėtoms ląstelės funkcijoms svarbių signalinių kelių aktyvumas. Akt signalinis kelias yra svarbus ląstelių gyvybingumui, proliferacijai, metabolizmui ir kitoms funkcijoms. Mes nustatėme bazinį Akt signalinio kelio aktyvumą proliferuojančiose mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse ir šio kelio aktyvinimą nepriklausomai nuo AAT dozės. Rezultatai parodė, kad AAT mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse suaktyvina kitą svarbų ląstelės veiklos moduliatorių proteino kinazę D (PKD) ir nuo PKC ϵ priklausomu (Ser744/748 fosforilinimas), ir nepriklausomu (Ser916 fosforilinimas) keliu.

Manome, kad šio disertacinio darbo metu atlikti tyrimai pagilins fundamentinio mokslo žinias apie MKL savybes, jų kultivavimo *in vitro* sąlygomis galimybes. Atlikti kompleksiniai MKL tyrimai gali būti naudingi kuriant naujus MKL terapinio panaudojimo protokolus ir leis geriau suprasti šių ląstelių funkcionavimo ypatumus.

IŠVADOS

1. Žmogaus riebalinio audinio mezenchiminės kamieninės ląstelės, augintos terpėje su sintetiniu serumo pakaitalu Ultroser G, pasižymėjo didesniu proliferaciniu ir diferenciaciniu aktyvumu nei ląstelės, augintos su natūralios kilmės serumais.
2. Sintetinis serumo pakaitalas Ultroser G mažina iš riebalinio audinio išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymens CD146 ekspresiją.
3. Skirtingai nuo gyvulinės kilmės ir žmogaus serumų, sintetinis serumo Ultroser G pakaitalas nediferencijuotose riebalinio audinio mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse aktyvina su adipogenine ir osteogenine diferenciacijomis susijusių genų *PPAR γ* , *Msx2* ekspresiją, tačiau blokuoja *osteopontino* geno ekspresiją.
4. Palyginę riebalinio audinio išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių, kultivuotų su skirtingais serumais, baltymų ekspresijos visumą, savitų baltymų nustatėme ląstelėse, kultivuotose su natūralios kilmės serumais, o terpė su sintetiniu serumo pakaitalu jokių unikalių baltymų ekspresijos ląstelėse neindukavo.
5. Iš pieninio danties pulpos išskirtos ląstelės pasižymėjo mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdinga baltymų ir paviršiaus žymenų CD73, CD90, CD105 ir CD146 ekspresija ir turėjo didelį proliferacinį bei klonogeninį aktyvumą.
6. Klonavimo eksperimentai parodė, kad pirminė pieninio danties pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių kultūra yra heterogeniška, sudaryta iš mažiausiai trijų tipų morfologiškai ir funkciškai skirtingų subpopuliacijų.
7. Fiziologinės ir uždegimui būdingos 1mg/ml ir 5mg/ml alfa1-antitripsino baltymo koncentracijos stimuliuoja pieninių dantų pulpos mezenchiminių kamieninių ląstelių proliferaciją ir migraciją.

Literatūros sąrašas

1. Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H. 2009. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 382:353-8.
2. Aggarwal S, Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-22.
3. Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. 1998. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 30:127-35.
4. Angelucci S, Marchisio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Sulpizio M, Eleuterio E, Lanuti P, Sabatino G, Miscia S, Di Ilio C. 2010. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome Sci* 8:18.
5. Anselme K, Broux O, Noel B, Bouxin B, Bascoulergue G, Duderme AF, Bianchi F, Jeanfils J, Hardouin P. 2002. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 8:941-53.
6. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. 2003. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:1927-35.
7. Baek SH, Kiousi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rose DW, Rosenfeld MG. 2003. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3245-50.
8. Bakre MM, Hoi A, Mong JC, Koh YY, Wong KY, Stanton LW. 2007. Generation of multipotential mesendodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation. *J Biol Chem* 282:31703-12.
9. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30:42-8.
10. Battiwalla M, Hematti P. 2009. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy* 11:503-15.
11. Battula VL, Trembl S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, Muller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Buhring HJ. 2009. Isolation of

- functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* 94:173-84.
12. Benavente CA, Sierralta WD, Conget PA, Minguell JJ. 2003. Subcellular distribution and mitogenic effect of basic fibroblast growth factor in mesenchymal uncommitted stem cells. *Growth Factors* 21:87-94.
 13. Benoit DS, Tripodi MC, Blanchette JO, Langer SJ, Leinwand LA, Anseth KS. 2007. Integrin-linked kinase production prevents anoikis in human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 81:259-68.
 14. Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Kluter H. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27:2331-41.
 15. Bodine PV, Komm BS. 2006. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7:33-9.
 16. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. 2004. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 93:1210-30.
 17. Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM. 2003. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 130:5241-55.
 18. Buhring HJ, Treml S, Cerabona F, de Zwart P, Kanz L, Sobiesiak M. 2009. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci* 1176:124-34.
 19. Caplan AI. 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217:318-24.
 20. Carlesso N, Cardoso AA. 2010. Stem cell regulatory niches and their role in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 17:281-6.
 21. Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5:79-88.
 22. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, Genovese J. 2004. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 95 Suppl 1:S29-33.
 23. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. 2003. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 278:45969-77.
 24. Cho HH, Park HT, Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. 2005. Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 96:533-42.

25. Choi SR, Lee SA, Kim YJ, Ok CY, Lee HJ, Hahm KB. 2009. Role of heat shock proteins in gastric inflammation and ulcer healing. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 7:5-17.
26. Cock TA, Houten SM, Auwerx J. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: too much of a good thing causes harm. *EMBO Rep* 5:142-7.
27. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3213-8.
28. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7841-5.
29. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 36:642-54.
30. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:2287-99.
31. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204-13.
32. Dabbagh K, Laurent GJ, Shock A, Leoni P, Papakrivopoulou J, Chambers RC. 2001. Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways. *J Cell Physiol* 186:73-81.
33. Dar A, Kollet O, Lapidot T. 2006. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 34:967-75.
34. de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, van Blitterswijk C. 2004. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 34:818-26.
35. Delanote V, Vandekerckhove J, Gettemans J. 2005. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol Sin* 26:769-79.
36. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. 1992. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*:280-6.

37. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107:275-81.
38. Dimarakis I, Levcicar N. 2006. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 24:1407-8.
39. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Pence P, Jorgensen C, Noel D. 2006. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 82:1060-6.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-7.
41. Dressel U, Bailey PJ, Wang SC, Downes M, Evans RM, Muscat GE. 2001. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J Biol Chem* 276:17007-13.
42. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. 2007. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 110:91-100.
43. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. 2004. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110:2226-32.
44. Fehrer C, Lepperdinger G. 2005. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol* 40:926-30.
45. Feldmann RE, Jr., Bieback K, Maurer MH, Kalenka A, Burgers HF, Gross B, Hunzinger C, Kluter H, Kuschinsky W, Eichler H. 2005. Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis* 26:2749-58.
46. Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. 2007. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1106:272-8.
47. Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J. 2009. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood* 114:2632-8.
48. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-74.
49. Garcia-Dominguez M, Reyes JC. 2009. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* 1789:451-9.

50. Goffart S, Franko A, Clemen CS, Wiesner RJ. 2006. Alpha-actinin 4 and BAT1 interaction with the cytochrome c promoter upon skeletal muscle differentiation. *Curr Genet* 49:125-35.
51. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. 1999. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-52.
52. Gray SG, Ekstrom TJ. 2001. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262:75-83.
53. Grozinger CM, Schreiber SL. 2002. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9:3-16.
54. Gur-Wahnon D, Borovsky Z, Beyth S, Liebergall M, Rachmilewitz J. 2007. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Exp Hematol* 35:426-33.
55. Hayflick L. 2003. Living forever and dying in the attempt. *Exp Gerontol* 38:1231-41.
56. Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J. 2007. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25:197-202.
57. Hirschi KK, D'Amore PA. 1996. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32:687-98.
58. Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 10:2787-802.
59. Ho IA, Chan KY, Ng WH, Guo CM, Hui KM, Cheang P, Lam PY. 2009. Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. *Stem Cells* 27:1366-75.
60. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8932-7.
61. Huang GT, Gronthos S, Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88:792-806.
62. Huelsken J, Behrens J. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115:3977-8.
63. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T. 2004. Reciprocal roles of

- MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:34015-22.
64. Iijima T, Zhang JQ. 2002. Three-dimensional wall structure and the innervation of dental pulp blood vessels. *Microsc Res Tech* 56:32-41.
 65. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. 2007. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell* 18:2873-82.
 66. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298:601-4.
 67. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 313:2050-62.
 68. Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N, Ikebuchi K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Azuma H, Ikeda H. 2002. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 42:921-7.
 69. Ylostalo J, Bazhanov N, Prockop DJ. 2008. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Exp Hematol* 36:1390-402.
 70. Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. 2006. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol* 296:315-28.
 71. Janciauskiene SM, Nita IM, Stevens T. 2007. Alpha1-antitrypsin, old dog, new tricks. Alpha1-antitrypsin exerts in vitro anti-inflammatory activity in human monocytes by elevating cAMP. *J Biol Chem* 282:8573-82.
 72. Jeong Y, Mangelsdorf DJ. 2009. Nuclear receptor regulation of stemness and stem cell differentiation. *Exp Mol Med* 41:525-37.
 73. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, Wang XF. 2006. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev* 20:666-74.
 74. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120-6.
 75. Jones BJ, McTaggart SJ. 2008. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol* 36:733-41.
 76. Jones DL, Wagers AJ. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:11-21.

77. Karp JM, Leng Teo GS. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4:206-16.
78. Khaldoyanidi S. 2008. Directing stem cell homing. *Cell Stem Cell* 2:198-200.
79. Kim WK, Meliton V, Bourquard N, Hahn TJ, Parhami F. 2010. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress. *J Cell Biochem*.
80. Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. 2007. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* 25:1270-8.
81. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101:3722-9.
82. Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. 2005. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 308:1472-7.
83. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. 2007. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 8:70.
84. Kuo MH, Allis CD. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20:615-26.
85. Kutcher ME, Herman IM. 2009. The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res* 77:235-46.
86. Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 7:216.
87. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31:890-6.
88. Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. 2009a. The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood* 113:816-26.
89. Lee S, Park JR, Seo MS, Roh KH, Park SB, Hwang JW, Sun B, Seo K, Lee YS, Kang SK, Jung JW, Kang KS. 2009b. Histone deacetylase inhibitors

- decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 42:711-20.
90. Lemonnier J, Ghayor C, Guicheux J, Caverzasio J. 2004. Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem* 279:259-64.
 91. Li WG, Xu XX. 2005. The expression of N-cadherin, fibronectin during chondrogenic differentiation of MSC induced by TGF-beta(1). *Chin J Traumatol* 8:349-51.
 92. Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. 2008. PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression. *Biochem J* 416:e5-6.
 93. Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R, Vemuri M, Suuronen R, Miettinen S. 2009. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy* 11:958-72.
 94. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. 2009. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 433:1-7.
 95. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 2008. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 26:279-89.
 96. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. 2007. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 25:750-60.
 97. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
 98. Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
 99. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90:516-25.

100. Mannello F, Tonti GA. 2007. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 25:1603-9.
101. Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-74.
102. Mareddy S, Broadbent J, Crawford R, Xiao Y. 2009. Proteomic profiling of distinct clonal populations of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106:776-86.
103. Martin C, Chen S, Maya-Mendoza A, Lovric J, Sims PF, Jackson DA. 2009. Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli. *J Cell Sci* 122:1551-62.
104. Mead TJ, Yutzey KE. 2009. Notch pathway regulation of chondrocyte differentiation and proliferation during appendicular and axial skeleton development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14420-5.
105. Mehlen P, Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6:449-58.
106. Menicanin D, Bartold PM, Zannettino AC, Gronthos S. 2009. Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 5:36-50.
107. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, Bron D, Lagneaux L. 2006. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol* 76:309-16.
108. Mitalipov S, Wolf D. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114:185-99.
109. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5807-12.
110. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M. 2006. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8:437-44.
111. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebe L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. 2007. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* 13:217-26.

112. Nauta AJ, Fibbe WE. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110:3499-506.
113. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. 2004. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 22:405-14.
114. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmiopathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. 2008. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112:295-307.
115. Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. 2006. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 281:15554-63.
116. Otey CA, Carpen O. 2004. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* 58:104-11.
117. Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, Suehiro F, Kanawa M, Nikawa H, Hamada T, Kato Y. 2007. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16:119-29.
118. Park HW, Shin JS, Kim CW. 2007. Proteome of mesenchymal stem cells. *Proteomics* 7:2881-94.
119. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. 2008. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 26:300-11.
120. Parra M, Kasler H, McKinsey TA, Olson EN, Verdin E. 2005. Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* 280:13762-70.
121. Petersen T, Niklason L. 2007. Cellular lifespan and regenerative medicine. *Biomaterials* 28:3751-6.
122. Phinney DG. 2007. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle* 6:2884-9.
123. Phinney DG, Prockop DJ. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25:2896-902.

124. Platt MO, Roman AJ, Wells A, Lauffenburger DA, Griffith LG. 2009. Sustained epidermal growth factor receptor levels and activation by tethered ligand binding enhances osteogenic differentiation of multi-potent marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 221:306-17.
125. Prigozhina TB, Khitrin S, Elkin G, Eizik O, Morecki S, Slavin S. 2008. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol* 36:1370-6.
126. Prockop DJ. 2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 17:939-46.
127. Ralston A, Rossant J. 2009. The genetics of induced pluripotency. *Reproduction* 139:35-44.
128. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298:597-600.
129. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83:71-6.
130. Rameshwar P. 2009. Casting doubt on the safety of "off-the-shelf" mesenchymal stem cells for cell therapy. *Mol Ther* 17:216-8.
131. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. 2006. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol* 16:79-87.
132. Ravanti L, Kahari VM. 2000. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 6:391-407.
133. Richardson RL, Hausman GJ, Champion DR. 1982. Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats. *Acta Anat (Basel)* 114:41-57.
134. Roelen BA, Dijke P. 2003. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFβ family members. *J Orthop Sci* 8:740-8.
135. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131:324-36.
136. Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khaldi A, Chiu RC. 2002. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 74:19-24; discussion 24.
137. Salaszyk RM, Klees RF, Hughlock MK, Plopper GE. 2004. ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun Adhes* 11:137-53.

138. Salem HK, Thiernemann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28:585-96.
139. Samar B. 2007. Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin from physiology to new principles in inflammation. *Medicinal Research Reviews* 27:435-468.
140. Satomura K, Derubeis AR, Fedarko NS, Ibaraki-O'Connor K, Kuznetsov SA, Rowe DW, Young MF, Gehron Robey P. 1998. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 177:426-38.
141. Schmidt A, Ladage D, Schinkothe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ, Brixius K, Arnhold S, Desai B, Mehlhorn U, Schwinger RH, Staib P, Addicks K, Bloch W. 2006. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:1750-8.
142. Schulte E, Wittekind D. 1989. The influence of Romanowsky-Giemsa type stains on nuclear and cytoplasmic features of cytological specimens. *Anal Cell Pathol* 1:83-6.
143. Schwab KE, Gargett CE. 2007. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 22:2903-11.
144. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20:530-41.
145. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* 26:212-22.
146. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. 2005. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23:1357-66.
147. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, Xu C, Chen X, Huang Y, Zhu Z, Huang X, Han X, Xie N, Ren G. 2010. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20:510-8.
148. Shi S, Gronthos S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18:696-704.
149. Sims DE. 1986. The pericyte--a review. *Tissue Cell* 18:153-74.
150. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. 2005. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human

- adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 203:398-409.
151. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. 2007. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 1:296-305.
 152. Sottile J, Hocking DC. 2002. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 13:3546-59.
 153. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107:1484-90.
 154. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu SC, Smith J, Prockop DJ. 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 9:747-56.
 155. Stagg J. 2007. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* 69:1-9.
 156. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 107:2570-7.
 157. Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. 2003. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res* 313:281-90.
 158. Storz P, Toker A. 2003. Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J* 22:109-20.
 159. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 32:1212-25.
 160. Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S. 2007a. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9:1273-85.
 161. Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S. 2007b. Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116:182-95.

162. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. 2006. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:686-95.
163. Tamama K, Kawasaki H, Wells A. 2010. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. *J Biomed Biotechnol* 2010:795385.
164. Tang KC, Trzaska KA, Smirnov SV, Kotenko SV, Schwander SK, Ellner JJ, Rameshwar P. 2008. Down-regulation of MHC II in mesenchymal stem cells at high IFN-gamma can be partly explained by cytoplasmic retention of CIITA. *J Immunol* 180:1826-33.
165. Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J. 2010. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 77:6-10.
166. Tasso R, Augello A, Carida M, Postiglione F, Tibiletti MG, Bernasconi B, Astigiano S, Fais F, Truini M, Cancedda R, Pennesi G. 2009. Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds. *Carcinogenesis* 30:150-7.
167. Tasso R, Pennesi G. 2009. When stem cells meet immunoregulation. *Int Immunopharmacol* 9:596-8.
168. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. 2001. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 288:413-9.
169. Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. 2002. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 13:1605-10.
170. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118:4495-509.
171. Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T. 2002. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 12:193-200.
172. Vertommen D, Rider M, Ni Y, Waelkens E, Merlevede W, Vandenheede JR, Van Lint J. 2000. Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 275:19567-76.
173. Wagner W, Feldmann RE, Jr., Seckinger A, Maurer MH, Wein F, Blake J, Krause U, Kalenka A, Burgers HF, Saffrich R, Wuchter P, Kuschinsky W, Ho AD. 2006. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell

- preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol* 34:536-48.
174. Wagner W, Ho AD. 2007. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 3:239-48.
 175. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33:1402-16.
 176. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5:e10088.
 177. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403.
 178. Wiedow O, Meyer-Hoffert U. 2005. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med* 257:319-28.
 179. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448-52.
 180. Wolffe AP, Urnov FD, Guschin D. 2000. Co-repressor complexes and remodelling chromatin for repression. *Biochem Soc Trans* 28:379-86.
 181. Zanotti S, Canalis E. 2010. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol* 30:886-96.
 182. Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F, Goldring MB, Zhou JR, Libermann TA. 2004. NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13618-23.
 183. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836-41.
 184. Zhukareva V, Obrocka M, Houle JD, Fischer I, Neuhuber B. 2010. Secretion profile of human bone marrow stromal cells: donor variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine* 50:317-21.
 185. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. 2009. "Small stem cells" in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytometry A* 75:4-13.

186. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28.

Publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. Pivoriūnas A, Surovas A, Borutinskaitė V, Matuzevičius D, Treigyte G, Savickienė J, **Tunaitis V**, Aldonytė R, Jarmalavičiūtė A, Suriakaitė K, Liutkevičius E, Venalis A, Navakauskas D, Navakauskienė R, Magnusson K-E. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth *Stem Cells and Development*, 2010 Jul;19(7):1081-93.

2. Aldonyte R, **Tunaitis V**, Surovas A, Suriakaite K, Jarmalaviciute A, Magnusson K-E, Pivoriunas A. Effects of major human antiprotease alpha-1-antitrypsin on the motility and proliferation of stromal stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regenerative Medicine*, 2010 Jul;5(4):633-43.

3. **Tunaitis V**, Borutinskaitė V, Navakauskienė R, Treigyte G, Unguryte A, Aldonytė R, Magnusson K-E, Pivoriūnas A. Different serum additions have distinct effects on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2010 (priimtas spaudai).

Konferencijų tezės:

1. Pivoriūnas A, Surovas A, **Tunaitis V**, Treigyte G, Borutinskaitė V, Ivanovas E, Savickienė J, Magnusson K-E, Navakauskienė R. Different functional properties and proteomic signatures are displayed by single colony-derived strains from human stromal cells of dental pulp origin. *33rd FEBS Congress June 28-July 3, 2008, Athens, Greece*.

2. Pivoriūnas A, Surovas A, Aldonytė R, Suriakaitė K, **Tunaitis V**, Navakauskienė R, Borutinskaitė V, Magnusson K-E. Proteomic profiling of primary and secondary clones of dental pulp-derived human stromal cells. *22nd IGB MEETING CNR - Department of Life Sciences "Stem Cells: From Molecular Physiology to Therapeutic Applications": Capri, 10 - 13 October 2009*.

Padėkos

- Nuoširdžiai dėkoju darbo moksliniam konsultantui dr. Augustui Pivoriūnui už idėjas, entuziazmą ir nuolatinę pagalbą.
- Dėkoju prof. Algirdui Venaliui už suteiktą galimybę gintis disertaciją.
- Nuoširdi padėka prof. Karlui-Ericui Magnussonui už neįkainojamą pagalbą rengiant publikacijas ir galimybę susipažinti su švedišku darbo stiliumi ir pačia Švedija.
- Esu dėkingas visiems disertacijos rengime dalyvavusiems imunologams už vertingas pastabas, redagavimą ir pagalbą.
- Ačiū visiems kolegoms už disertacijos rašymo inicijavimą, vertingas pastabas, palaikymą ir produktyvų bendradarbiavimą.
- Dėkoju visiems buvusiems darbo vadovams už teorines žinias ir praktinius įgūdžius.
- Labai esu dėkingas savo šeimai už supratimą ir palaikymą; atsiprašau Dominyko ir Emilijos už neskirtą laiką.