

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

Giedrė Ramanauskaitė

KAULŲ ČIULPŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ ĮTAKOS ODOS
REGENERACIJAI TYRIMAS BALB/c LINIJOS PELIŲ MODELyje
IN VIVO

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

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2009-2013 m. VMTI Inovatyvios medicinos centre.

Mokslinis vadovas:

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

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
1. ĮVADAS.....	7
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
2.1. KAMIENINĖS LĄSTELĖS.....	11
2.1.1. Kamieninių ląstelių šaltiniai.....	11
2.1.2. Kamieninių ląstelių ir ląstelių pirmtakių nišos kaulų čiulpuose.....	13
2.1.3. Kaulų čiulpų ląstelių identifikavimas.....	16
2.2. ODA IR PAŽEIDIMAI.....	19
2.2.1. Odos struktūra.....	19
2.2.2. Žaizdos gijimo procesas.....	25
2.2.3. Citokinų vaidmuo žaizdų gijimo procese.....	29
2.2.4. Odos pažeidimų modeliai.....	31
2.3. ODOS AUDINIO REGENERACIJA.....	35
2.3.1. Medžiagos, naudojamos odos audinio inžinerijoje.....	37
2.3.2. Odos audinio regeneracijai naudojamos ląstelės.....	41
3. METODAI.....	47
3.1. Laboratoriniai gyvūnai.....	47
3.2. Pelių kaulų čiulpų ląstelių išskyrimas.....	47
3.3. Lin ⁻ populiacijos ląstelių atskyrimas.....	47
3.4. Lin ⁻ ląstelių fenotipinė analizė.....	48
3.5. Lin ⁻ ląstelių proliferacijos įvertinimas <i>in vitro</i>	49
3.6. Lin ⁻ ląstelių migracijos įvertinimas <i>in vitro</i>	50
3.7. Lin ⁻ ląstelių žymėjimas fluorescuojančiu PKH26 dažu.....	51
3.8. Visų odos sluoksnių pažeidimo modelis <i>in vivo</i>	51
3.9. Lin ⁻ ląstelių transplantacija <i>in vivo</i>	52
3.10. Gyjančio odos audinio analizė.....	52
3.11. RNR išskyrimas.....	53
3.12. Atvirkštinės transkripcijos reakcija.....	54
3.13. Polimerazinė grandininė reakcija.....	54

3.14. Statistinė duomenų analizė.....	55
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	56
4.1. Kaulų čiulpų ląstelių fenotipinė analizė.....	57
4.2. Lin ⁻ ląstelių proliferacijos ir migracijos įvertinimas <i>in vitro</i>	62
4.3. Lin ⁻ ląstelių įtakos odos audinio regeneracijai įvertinimas <i>in vivo</i>	68
4.3.1. Pažeisto odos audinio atsistatymo makroskopinė analizė.....	68
4.3.2. Lin ⁻ ląstelių integracija pažeidimo židinyje.....	72
4.3.3. Lin ⁻ ląstelių įtakos pažeisto odos audinio atsistatymui įvertinimas.....	75
4.3.4. Lin ⁻ ląstelių poveikis citokinų genų raiškai.....	85
4.4. Rezultatų apibendrinimas.....	92
5. IŠVADOS.....	96
6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	97
7. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE.....	98
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	99
PADĖKA.....	119

SANTRUMPOS

ANG – angiopoetinas

APC (angl. allophycocyanin) – alofikocianinas

BMP (angl. bone morphogenetic protein) – kaulo morfogeninis baltymas

CD (angl. cluster of differentiation) – diferenciacijos antigenas

CXCR4 (angl. C-X-C chemokine receptor 4) – C-X-C chemokino receptorių 4

EKL – embrioninės kamieninės ląstelės

ELP – endotelio ląstelių pirmtakės

FBS (angl. fetal bovine serum) – veršelių serumas

FITC (angl. fluorescein isothiocyanate) – fluoresceino izotiocianatas

Flk-1 (angl. fetal liver kinase 1) – vaisiaus kepenų kinazė 1

G-CSF (angl. granulocyte-colony stimulating factor) – granulocitų kolonijas stimuliuojantis augimo veiksnys

GDF (angl. growth and differentiation factors) – augimo ir diferenciacijos veiksniai

HKL – hemopoetinės kamieninės ląstelės

Ig – imunoglobulinas

IL – interleukinas

LIF (angl. leukemia inhibitory factor) – leukemiją slopinantis veiksnys

Lin⁻ (angl. lineage negative) – linijinių žymenų neekspresuojančios ląstelės

MACS (angl. magnetic-associated cell sorting) – magnetinis ląstelių atskyrimo metodas

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

NK (angl. natural killer) – natūralūs kileriai

B220 – B limfocitų žymuo

TER-119 – eritroidinių ląstelių žymuo

Gr-1 – mieloidinių ląstelių žymuo

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

PE (angl. phycoerythrin) – fikoeritrinas

PGL (angl. polyglycolic acid) – poliglikolinė rūgštis

PLGA (angl. poly-dl-lactic-co-glycolic acid) – poli-dl-laktinė-ko-glikolinė rūgštis

PLLA (angl. poly-l-lactic acid) – poli-l-laktinė rūgštis

RNR – ribonukleorūgštis

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

SCF (angl. stem cell factor) – kamieninių ląstelių veiksnys

SDF (angl. stromal derived factor) – stromos ląstelių išskiriamas veiksnys

TGF- β (angl. transforming growth factor- β) – transformuojantis augimo veiksnys beta

TNF- α (angl. tumor necrosis factor alpha) – naviko nekrozės veiksnys alfa

VEGF (angl. vascular endothelial growth factors) – kraujagyslių endotelio augimo veiksniai

VWF (angl. von Willebrand factor) – von Vilebrando veiksnys

1. ĮVADAS

Žaizdų gijimo metu vykstančios kompleksinės sąveikos privalo būti tikslios ir griežtai kontroliuojamos, bet kuriame etape nutrūkusios, nukrypusios nuo normalaus vystymosi ar uždelstos reakcijos lemia lėtinių žaizdų atsiradimą (Guo ir DiPietro, 2010). Odos pažeidimų gydymui klinikinėje praktikoje šiuo metu taikomos dvi pagrindinės strategijos – gyvo audinio persodinimas ir dirbtinių odos pakaitalų naudojimas (Chen ir kt., 2009). Pirmuoju atveju autogeninė transplantacija yra tinkamiausias pasirinkimas, tačiau esant didelio paviršiaus ploto pažeidimams, susiduriama su donorinio audinio trūkumu. Alogeninės arba ksenogeninės odos audinio transplantacijos trūkumas yra neišvengiama imunologinio atmetimo rizika. Pasirinkus pastaruosius transplantacijos būdus, reikalinga imunosupresija, kuri pasižymi stipriu neigiamu šalutiniu poveikiu (Zhou ir kt., 2013). Alternatyvus pasirinkimas odos pažeidimų gydymui yra audinių inžinerijos metodais sukurtas dirbtinis audinys. Šiam tikslui pasirenkamos natūralios arba sintetinės biomedžiagos, kurios pasižymi kontroliuojamu degradacijos procesu ir sukelia minimalias uždegimines reakcijas (Polak ir Bishop, 2006). Iki šiol klinikinėje praktikoje naudojami dirbtiniai odos pakaitalai atlieka pirminio barjero, apsaugančio nuo infekcijų bei dehidratacijos, funkciją, tačiau neskatina regeneracijos, todėl gijimas baigiasi rando susiformavimu, kuris nei struktūriškai, nei funkciškai neatitinka natyvaus audinio. Odos audinio regeneracijos trūkumo problemą bandoma spręsti panaudojant kamienines ląsteles (Muscari ir kt., 2013).

Kamieninių ląstelių taikymo terapijoje sėkmę lemia jų diferenciacijos potencialas (Baraniak and McDevitt, 2010). Daugiausiai specializuotų ląstelių tipų gali formuoti embrioninės kamieninės ląstelės, išskirtos iš blastocistos stadijos embriono. Tačiau šių ląstelių tyrimai ir panaudojimas medicinoje iki šiol yra griežtai ribojami etinių problemų bei duomenų, apie diferenciacijos kryptį lemiančius veiksnius, trūkumas (Vazin ir Freed, 2010). Alternatyva embrioninėms kamieninėms ląstelėms yra suaugusio organizmo audinių kamieninės ląstelės. Kaulų čiulpai yra vienintelis suaugusio organizmo organas,

kuriame aptinkamos funkciškai susijusios dviejų skirtingų tipų kamieninių ląstelių populiacijos: už visų subrendusių kraujo ląstelių produkciją atsakingos hemopoetinės kamieninės ląstelės (HKL) ir mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL), kurios formuoja kaulinio, kremzlinio bei riebalinio audinių ląsteles. Be kamieninių ląstelių, kaulų čiulpuose aptinkamos ir žemo diferenciacijos laipsnio ląstelės pirmtakės, pasižyminčios regeneracinėmis savybėmis (Wu ir kt., 2010).

Atliekant tyrimus nustatyta, kad MKL reikšmingai sumažina didelio paviršiaus ploto pažeidimus, kurie prieš tai pasižymėjo sutrikusiu gijimu (Vojtassák ir kt., 2006; Falanga ir kt., 2007; Ravari ir kt., 2011). Intensyviai tiriamos endotelio ląstelių pirmtakės (ELP) dėl savo savybės dalyvauti kraujagyslių tinklo formavime, nuo kurio priklauso gyjančio audinio aprūpinimas maisto medžiagomis (Watt ir kt., 2010). Ikiklininiai tyrimai parodė tiesioginį HKL poveikį gyjant odos žaizdoms. Nustatyta, kad uždegimo stadijoje reikšmingai padidėja ląstelių, kilusių iš kaulų čiulpų HKL, kiekis (Fathke ir kt., 2004). Odos regeneracijos procesas priklauso nuo skirtingų tipų ląstelių sąveikų, todėl jos skatinimui reikalingos daugiafunkcinės ląstelių populiacijos (Sorrell ir Caplan, 2010). Nepaisant teigiamų rezultatų, ląstelių terapija kol kas netaikoma kasdienėje žaizdų gydymo praktikoje, nes nėra vieningos nuomonės, koks yra ilgalaikis transplantuotų ląstelių poveikis. Nėra aišku, kokie veiksniai lemia transplantuotų ląstelių įsitvirtinimą pažeidimo židinyje, skatina jų prisitaikymą prie svetimios mikroaplinkos ir užtikrina ilgalaikes funkcijas (Charruyer ir Ghadially, 2009). Prieinamo šaltinio, kuriame būtų pakankamas kiekis ląstelių, bei tinkamų biomedžiagų, kurios užtikrintų efektyvią ląstelių transplantaciją, pasirinkimas yra pagrindinės užduotys, reikalaujančios intensyvių tyrimų, norint saugiai, sėkmingai ir patikimai taikyti kamieninių ląstelių terapiją (Huang ir Burd, 2012).

Šiame darbe buvo tiriama kaulų čiulpų ląstelių, kurios neekspresuoja linijinių žymenų (Lin^{-}), būdingų subrendusioms ląstelėms, įtaka odos audinio regeneracijai *in vivo*. Buvo atlikti palyginamieji tyrimai, įvertinantys, kaip šių ląstelių poveikis priklauso nuo lokaliai transplantacijai pasirinktų medžiagų. Gauti rezultatai svarbūs sutrikusio gijimo žaizdų gydymo metodų vystymui.

DARBO TIKSLAS

Įvertinti pelių kaulų čiulpų Lin⁻ populiacijos ląstelių reikšmę odos audinio regeneracijai *in vivo*, taikant BALB/c linijos pelių visų odos sluoksnių pažeidimo modelį.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Išgryninti ir identifikuoti BALB/c linijos pelių kaulų čiulpų Lin⁻ ląstelių populiaciją.
2. Palyginti odos audinio tarpląstelinės medžiagos komponentų įtaką Lin⁻ ląstelių proliferacijai ir migracijai *in vitro*.
3. Įvertinti Lin⁻ ląstelių, integruotų skirtingose biomedžiagose, įsitvirtinimą pažeidimo židinyje ir įtaką pažeisto odos audinio gijimui *in vivo*.
4. Nustatyti Lin⁻ ląstelių poveikį citokinų genų raiškai gyjančiame audinyje *in vivo*.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Kaulų čiulpų nediferencijuotų ląstelių panaudojimas sutrikusio gijimo odos žaizdoms gydyti yra perspektyvus dėl jų savybės formuoti skirtingų tipų subrendusias ląsteles. Teigiamų rezultatų gauta tiriant atskirų kamieninių ląstelių populiacijų įtaką odos pažeidimų modeliuose, tačiau iki šiol nėra aišku, kokie veiksniai lemia transplantuotų ląstelių įsitvirtinimą pažeidimo židinyje, palaiko jų aktyvumą ir užtikrina efektyvų pažeisto audinio struktūros bei funkcijų atsinaujinimą. Šiame darbe pirmą kartą atlikti palyginamieji pelių kaulų čiulpų Lin⁻ populiacijos ląstelių regeneracinių savybių tyrimai, kuriuose buvo panaudoti skirtingi odos audinio tarpląstelinės medžiagos komponentai.

Buvo atlikta Lin⁻ ląstelių fenotipinė analizė. *In vitro* sąlygomis ištirta I tipo kolageno ir pamatinės membranos komponentų įtaka ląstelių proliferacinėms bei migracinėms savybėms, nuo kurių priklauso žaizdų gijimo sėkmė. Pirmą kartą atlikti tyrimai, kuriuose įvertintas skirtingose biomedžiagose lokaliai transplantuotų Lin⁻ ląstelių vaidmuo audinio atsinaujinimui *in vivo*, taikant BALB/c linijos pelių visų odos sluoksnių pažeidimo modelį. Nustatyta,

kad nuo transplantacijai pasirinktos medžiagos priklauso ląstelių integracija ir išlikimas pažeidimo židinyje, uždegimo slopinimas, žaizdos pasidengimo nauju epidermiu trukmė bei atsinaujinusio audinio pagalbinių struktūrų formavimasis. Pirmą kartą atlikti citokinų, dalyvaujančių pažeisto odos audinio gijimo reakcijose, genų raiškos pokyčių po Lin^{-} ląstelių transplantacijos tyrimai.

Gauti rezultatai papildė žinias, kurios reikalingos vystant metodus, skirtus sutrikusio gijimo žaizdų regeneracijos skatinimui.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Kaulų čiulpų Lin^{-} populiaciją sudaro nediferencijuotos ląstelės, pasižyminčios regeneracinėmis savybėmis.
2. Lin^{-} ląstelių proliferacinės ir migracinės savybės *in vitro* priklauso nuo odos audinio tarpląstelinės medžiagos komponentų.
3. Lin^{-} ląstelės, priklausomai nuo lokaliai transplantacijai panaudotos medžiagos, skirtingai veikia visų odos audinio sluoksnių pažeidimo regeneraciją *in vivo*.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. KAMIENINĖS LAŠTELĖS

Pagrindinės skiriamosios kamieninių ląstelių savybės yra nuolatinis atsinaujinimas bei gebėjimas fiziologinėmis ar eksperimentinėmis sąlygomis formuoti specifinius subrendusių ląstelių tipus (Prentice, 2006). Organizme šių ląstelių populiacijos išsidėsčiusios specializuotose nišose. Kamieninių ląstelių niša yra specifinė ląstelinė ir molekulinė mikroaplinka, reguliuojanti šių ląstelių funkcijas, palaikanti balansą tarp jų ramybės būsenos, atsinaujinimo ir diferenciacijos, taip pat atsakinga už aktyvios būsenos sužadimą atsiradus išoriniams neigiamiems veiksniams (Ehninger ir Trumpp, 2011).

2.1.1. Kamieninių ląstelių šaltiniai

Kamieninės ląstelės gali būti išskiriamos iš dviejų šaltinių – embrionų bei suaugusio organizmo audinių. Abiejuose šaltiniuose esančios primityvios ląstelės pasižymi nuolatinio atsinaujinimo savybėmis bei gali diferencijuotis į skirtingus ląstelių tipus. Iš skirtingų šaltinių išskirtoms kamieninėms ląstelėms identifikuoti ir charakterizuoti naudojami kompleksiniai įvairių metodų deriniai.

Embrioninės kamieninės ląstelės (EKL) išskiriamos iš blastocistos vidinės ląstelių masės. Jos yra daugiagalės, *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis gali formuoti visų vaisiaus ar suaugusio organizmo audinių ląsteles (Keller, 2005). Pirmieji duomenys apie šių ląstelių galimybes *in vitro* sąlygomis gauti tiriant pelių EKL. Parinkus tinkamas sąlygas, tokių ląstelių nediferencijuota būseną išlaikoma beveik neribotą laiką. Anksčiau nediferencijuotai EKL būsenai išlaikyti *in vitro* sąlygomis buvo naudojamos pagalbinės maitinančios ląstelės ir jų išskiriamas citokinas LIF (angl. leukemia inhibitory factor). Vėlesniuose tyrimuose nustatyta, kad mikroaplinkoje esant veršelio serumui, rekombinantinis LIF gali būti naudojamas be pagalbinių maitinančių ląstelių sluoksnio. Nustatyta, kad kaulo morfogeninių baltymų šeimos narys BMP4

(angl. bone morphogenetic protein 4), veikiantis kartu su LIF, palaiko nediferencijuotų EKL būseną papildomai nenaudojant serumo. Šios žinios leido vystyti EKL tyrimų metodus griežtai kontroliuojamomis *in vitro* sąlygomis nenaudojant serumo bei maitinančių ląstelių ir gauti tikslesnius duomenis (Lin ir Talbot, 2011). Nors žmogaus EKL negali būti išlaikomos identiškoms sąlygomis *in vitro* kaip pelių ląstelės, pradiniai tyrimai leido sėkmingai vystyti metodus stabilų žmogaus ląstelių linijų gavimui. Galimybė tirti žmogaus EKL atsinaujinimo ir diferenciacijos procesus suteikia daug žinių apie daugiagaliąją ląstelės būseną. Žmogaus ląstelių tyrimai *in vitro* yra alternatyva kai kurių sutrikimų modeliavimui, nes dažna problema naudojant gyvūnų modelius yra sunkus gautų rezultatų atkartojimas specifiniam tikslui pasiekti žmogaus organizme (Ben-David ir kt., 2012). EKL panaudojimas *in vivo* susiduria su didelėmis problemomis. Be etinių prieštaravimų, yra daug neatsakytų klausimų apie šių ląstelių nekontroliuojamo augimo ir diferenciacijos, išlikimo po transplantacijos bei funkcinio aktyvumo organizme galimybes. Saugiai EKL terapijai taip pat reikalingi metodai, kurie padėtų identifikuoti ir pašalinti nediferencijuotas ląsteles, linkusiais formuoti navikus (Vazin ir Freed, 2010). Alternatyva šioms ląstelėms yra suaugusio organizmo audinių kamieninės ląstelės.

Suaugusiame organizme kamieninių ląstelių aptinkama beveik visuose audiniuose ir organuose (Nardi, 2005). Pagrindinė jų funkcija yra nenutrūkstama diferenciacija į skirtingus ląstelių tipus fiziologinėmis sąlygomis bei aktyvus dalyvavimas pažeisto audinio atstatymo procese. Nepažeistuose audiniuose paprastai randamos vienagalės kamieninės ląstelės, galinčios formuoti vieno tipo ląsteles ir palaikyti normalų audinių būvį. Dvigalės ląstelės gali formuoti iki dviejų ląstelių linijų. Kai kurios suaugusių organizmų audinių kamieninės ląstelės formuoja daugiau kaip dviejų tipų mezodermines, endodermines ir ektodermines ląsteles (Gennero ir kt., 2006). Pusiausvyrą tarp atsinaujinimo ir diferenciacijos palaiko keletas procesų. Vienas jų yra asimetrinio ir simetrinio dalijimosi kontrolė. Po asimetrinio pasidalijimo viena dukterinė ląstelė lieka savo nišoje ir toliau nesidiferencijuoja. Antra dukterinė ląstelė palieka nišą ir yra

pasiruošusi diferencijuotis. Po simetrinio pasidalijimo abi dukterinės ląstelės išlaiko kamieninių ląstelių savybes. Asimetrinio ir simetrinio dalijimosi kaita priklauso nuo fiziologinės organizmo būsenos. Sveikame organizme kamieninių ląstelių skaičius kontroliuojamas dalijantis asimetriškai. Vykstant patologiniams procesams ir atsiradus didesniam kamieninių ląstelių poreikiui suintensyvėja simetrinis dalijimasis (Yin ir Li, 2006).

Suaugusio organizmo kamieninių ląstelių savybės varijuoja priklausomai nuo audinio, kuriame jos yra. Konkrečiam tikslui pasirenkant reikiamą populiaciją, būtina įvertinti pagrindines jų savybes, tinkamas terapijai. Ypač patrauklus suaugusio organizmo kamieninių ląstelių šaltinis yra kaulų čiulpai, kuriuose aptinkamos kelios nediferencijuotų ląstelių populiacijos, pasižyminčios regeneracinėmis savybėmis.

2.1.2. Kamieninių ląstelių ir ląstelių pirtakių nišos kaulų čiulpuose

Suaugusiame organizme pagrindinis kamieninių ląstelių šaltinis yra kaulų čiulpai. Juose aptinkamos dviejų skirtingų tipų kamieninių ląstelių populiacijos – HKL, kurios atsakingos už nenutrūkstamą subrendusių kraujo ląstelių gamybą, ir MKL, kurios formuoja kaulinio, kremzlinio bei riebalinio audinių ląsteles. Kaulų čiulpuose taip pat egzistuoja ląstelės pirtakės, kurios pasižymi kamieninių ląstelių savybėmis. Funkciniu požiūriu ypač svarbios ELP, dalyvaujančios kraujagyslių tinklo formavime tiek fiziologinėmis sąlygomis, tiek patologiniuose procesuose (Wu ir kt., 2010). Visos šios populiacijos kaulų čiulpuose užima specifines anatomines vietas ir sąveikaudamos tarpusavyje bei su mikroaplinkoje esančiais veiksniais išlaiko savo unikalias savybes.

Kaulų čiulpuose išskiriamos dvi HKL nišos – osteoblastinė ir kraujagyslinė. Osteoblastinėje nišoje išlaikoma neaktyvi ilgalaikė HKL būseną, kraujagyslinėje – trumpalaikė aktyvi, kurios metu šios ląstelės proliferuoja, pradeda diferencijuotis bei patenka į cirkuliacinę sistemą (Wilson ir Trumpp, 2006). Osteoblastinėje nišoje, kuri išsidėsčiusi vidinio antkaulio paviršiuje, aptinkama keletas skirtingų ląstelių tipų, bet dominuojantys ląsteliniai

komponentai joje yra mezenchiminės kamieninės ląstelės ir osteoblastai (Wang ir kt., 2013). Osteoblastai yra pagrindinė ląstelių populiacija, dengianti vidinio antkaulio paviršių ir formuojanti kaulinį audinį. Šios ląstelės ekspresuoja keletą signalinių molekulių, svarbių HKL atsinaujinimui, išgyvenimui bei palaikymui kaulų čiulpų nišoje (Guerrouahen ir kt., 2011). Osteoblastinėje nišoje MKL atsakingos ne tik už osteoblastų formavimąsi, bet ir už veiksnius, kurie svarbūs HKL savybėms išlaikyti bei kontroliuoti, produkciją (Chen ir kt., 2008). Šioje nišoje pagrindinis neląstelinis komponentas yra I tipo kolagenas. Šį baltymą atpažįsta ląstelių paviršiuje esantys receptoriai, kurie priklauso integrinų šeimai. Kolageno I ir ląstelių tarpusavio sąveika palaiko nediferencijuotą primityvių ląstelių būseną bei išlikimą osteoblastinėje nišoje neaktyvioje būsenoje (Dominici ir kt., 2009). Kraujagyslinė niša, esanti centrinėje kaulų čiulpų dalyje šalia kraujagyslių, sudaryta iš endotelinių ląstelių ir tarpląstelinės medžiagos baltymų, iš kurių pagrindiniai yra IV tipo kolagenas, fibronektinas, lamininas, fibrinogenas bei glikoproteinas VWF (angl. von Willebrand factor). Šios nišos tarpląstelinės medžiagos komponentus atpažįsta ląstelių paviršiaus adhezijos molekulės, kurios priklauso selektinų šeimai. Endotelinių ląstelių, kurios yra pagrindinis ląstelinis kraujagyslinės nišos elementas, paviršiuje išskirtinai ekspresuojamas E-selektinas prijungia atitinkamus ligandus, esančius HKL paviršiuje. Ši sąveika reguliuoja primityvių ląstelių proliferacijos suaktyvėjimą ir pasiruošimą migracijos procesams (Kopp ir kt., 2005).

Abi nišos kaulų čiulpuose tarpusavyje glaudžiai susijusios, nors jas galima atskirti pagal kai kuriuos struktūrinius elementus bei funkcines ypatybes. Keletas molekulinų reguliuojančių veiksnių nuolat veikia tiek osteoblastinėje, tiek kraujagyslinėje nišose, nepriklausomai nuo to, kurioje iš jų yra produkuojami. Prie šių veiksnių priskiriami signaliniuose keliuose dalyvaujantys sekretuojami ligandai ir jų receptoriai bei adhezijos molekulės (Celso ir Scadden, 2011).

Gyvybiškai svarbi kaulų čiulpų kamieninių ląstelių ir pirmtakių savybė yra gebėjimas judėti tarp nišų bei įgauti aktyvią būseną patologinėmis sąlygomis. Stromos ląstelių išskiriamo veiksnio 1 SDF-1 (angl. stromal derived

factor 1) ir jo pagrindinio receptoriaus CXCR4 (angl. C-X-C chemokine receptor 4) sąveika lemia primityvių kaulų čiulpų ląstelių migraciją, proliferaciją ir išgyvenimą. Kaulų čiulpuose SDF-1 išskiria keletas tipų stromos ląstelių. Osteoblastinėje nišoje už jo produkciją atsakingos nesubrendusios osteoblastinės ląstelės, kraujagyslinėje – endotelio ląstelės. Šio chemokino aktyvinimas vyksta jam jungiantis prie hemopoetinės ir nehemopoetinės kilmės primityvių ląstelių paviršiuje ekspresuojamo receptoriaus CXCR4. Tyrimuose nustatyta, kad sekretuojamo SDF-1 kiekis mikroaplinkoje tiesiogiai veikia nesubrendusių ląstelių būsenos aktyvavimą ir padidėjusią proliferaciją bei migraciją. Visos šios savybės būtinos ne tik fiziologinėms funkcijoms palaikyti, bet ir transplantuotų ląstelių įsitvirtinimui pažeidimo židinyje (Juarez ir Bendall, 2004). Kitos ligandų ir receptorių poros kaulų čiulpuose atsakingos už kamieninių ląstelių ir pirmtakų likimą. Kamieninių ląstelių veiksnio SCF (angl. stem cell factor), kurį sekretuoja didžioji dalis endotelinių ląstelių, ir jo receptoriaus tirozino kinazės KIT, esančio skirtingos vystymosi stadijos kamieninių ląstelių paviršiuje, sąveika kontroliuoja ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją. Angiopoetino 1 (ANG1), dažniausiai ekspresuojamo kraujagyslinės nišos ląstelių, ir jo receptoriaus tirozino kinazės (TIE2), esančio hemopoetinių pirmtakų paviršiuje, sąveika atsakinga už neaktyvios kamieninių ląstelių būsenos išlaikymą kaulų čiulpuose (Arai ir kt., 2004). Kamieninių ląstelių atsinaujinimo procesą kaulų čiulpų nišose reguliuoja trys pagrindiniai signaliniai keliai – Wnt, Notch ir Hedgehog. Tyrimų duomenys apie šių signalinių kelių įtaką primityvių ląstelių funkcinėms savybėms yra priešaringi dėl jų sudėtingumo. Kaulų čiulpuose Wnt signalinio kelio molekulės daugiausiai atsakingos už HKL ir stromos ląstelių tarpusavio sąveikas. Taip pat parodytas jo vaidmuo HKL brendimo procese. Veikiant Wnt signalų perdavimui, primityvios ląstelės praranda savo daugiagaliąsias savybes ir pradeda diferencijuotis į mažesniu plastiškumu pasižyminčius specifinių linijų pirmtakus. Notch signalinis kelias svarbus palaikant pusiausvyrą tarp HKL atsinaujinimo ir diferenciacijos. Abiejų procesų reguliavimas užtikrina normalų hemopoezės procesą. Šio kelio veikimas kaulų čiulpuose taip pat palaiko MKL populiaciją,

stabdydamas osteoblastų diferenciaciją. Hedgehog signalinio kelio aktyvavimas slopina kamieninių ląstelių atsinaujinimą ir prigijimą po transplantacijos (Celso ir Scadden, 2011). Svarbus kaulų čiulpų nišų mikroaplinkoje veikiantis komponentas yra deguonis. Šio elemento kiekio pokyčiai reguliuoja HKL būseną. Kraujagyslinėje nišoje, kuri gerai aprūpinama mitybinėmis medžiagomis bei deguonimi, vyksta aktyvi ląstelių proliferacija, tuo tarpu osteoblastinėje nišoje, kurioje mažas deguonies kiekis, jos išlaiko ramybės būseną (Xie ir kt., 2009).

2.1.3. Kaulų čiulpų ląstelių identifikavimas

Skirtingo diferenciacijos laipsnio ląstelių identifikavimas pagrįstas jų paviršiuje esančių molekulių raiška. Bendra kaulų čiulpų kamieninių ląstelių ir ląstelių pirmtakių savybė yra ta, kad jos neekspresuoja subrendusioms kraujo ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų, kurie apibrėžiami kaip linijiniai žymenys. Ląstelės, atskirtos neigiamos selekcijos būdu naudojant magnetines nanodaleles, padengtas antikūnais prieš linijinius paviršiaus žymenis, apibrėžiamos kaip bendra Lin^{-} populiacija (angl. lineage negative). Žmogaus ląstelių atskyrimui dažniausiai naudojami linijiniai žymenys yra glikoforinas A, CD2, CD3, CD8, CD14, CD15, CD16, CD20, CD56 ir CD66b, pelių – CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD31, CD45, NK1.1, B220, TER-119, Gr-1, ir glikoforinas A. Visi jie ekspresuojami eritrocitų, T ląstelių, B ląstelių, NK ląstelių, monocitų, granulocitų bei endotelinių ląstelių paviršiuje. Priklausomai nuo to, kokios linijinių žymenų kombinacijos naudojamos, Lin^{-} populiacijoje gali būti nuo 20 iki 500 kartų daugiau primityvių ląstelių, nei negrynintoje (Wognum ir kt., 2003; Tyndall ir kt., 2007). Kitas etapas, reikalingas primityvių ląstelių identifikavimui, yra teigiamų žymenų fenotipinė analizė. Nei vienas kamieninių ląstelių ar ląstelių pirmtakių tipas neturi vienos išskirtinės paviršiaus molekulės, kuri išskirtų jas iš heterogeniškos populiacijos, todėl identifikavimo metu būtina naudoti keletą žymenų derinius.

Pirmasis atrastas žymuo žmogaus HKL identifikavimui ir gryninimui yra ląstelių paviršiaus glikoproteinas CD34. Šią molekulę ekspresuoja iki 5% visų vienbranduolių ląstelių kaulų čiulpuose, iki 1% – virkštelės kraujo ląstelių ir tik apie 0.1% ląstelių periferiniame kraujyje. CD34⁺ ląstelių skaičius periferiniame kraujyje gali padidėti po veikimo citokiniais, pvz., granulocitų kolonijas stimuliuojančiu augimo veiksmu G-CSF (angl. granulocyte-colony stimulating factor). Nors CD34 naudojamas kaip primityvių žmogaus hemopoetinių ląstelių žymuo, yra žinoma, kad HKL potencialu pasižymi ir CD34⁻ ląstelių populiacija. Tyrimais įrodyta, kad tokių ląstelių pasitaiko daugiau ankstyvojoje ontogenezėje (Zanjani ir kt., 1998). Primityvios pelių hemopoetinės ląstelės taip pat ekspresuoja CD34 paviršiaus molekulę, tačiau kiek skirtingai nuo žmogaus HKL. Visos HKL pelių vaisiaus kepenyse yra CD34⁺ ir tik apie 50% tokių ląstelių išlieka jaunikių kaulų čiulpuose bei tik apie 10% - suaugusių pelių kaulų čiulpuose. CD34 žymens raiška pelių HKL paviršiuje priklauso ne tik nuo vystymosi stadijos, bet ir nuo ląstelės aktyvumo būsenos (Wognum ir kt., 2003). Tyrimuose parodyta, kad šis žymuo taip pat būdingas pelių kaulų čiulpų ELP, dalyvaujančioms audinio kraujagyslių tinklo formavimesi (Yang ir kt., 2011).

Tikslesnei pelių HKL identifikacijai CD34 žymuo derinamas su c-Kit (CD117) bei Sca-1 (Ly-6A/E) žymenimis. C-Kit yra tirozino kinazės receptorių, dalyvaujantis tokiuose procesuose kaip ląstelių proliferacija, diferenciacija ir kai kurių medžiagų sekrecija. Ląstelių transplantacijos tyrimai įrodė, kad HKL, ekspresuojančios c-Kit receptorių, dalyvauja ilgalaikiame hemopoezės atstatyme. Iki 2/3 CD34⁺ kaulų čiulpų ląstelių ekspresuoja šį žymenį. Su c-Kit receptoriumi sąveikauja kamieninių ląstelių veiksnys SCF, kurio biologinės funkcijos susijusios su HKL atsinaujinimu. Šis veiksnys padeda išgyventi kamieninėms ląstelėms *in vitro*. Sca-1 priklauso Ly-6 antigenų šeimai ir yra vienas dažniausiai naudojamų žymenų pelių HKL identifikavimui. Ši HKL paviršiuje ekspresuojama molekulė dalyvauja jų atsinaujinimo, aktyvavimo bei vystymosi procesuose. Tačiau Sca-1 žymens raiška varijuoja tarp skirtingų pelių

linijų. Kai kuriose linijose jo raiška ypač didelė (pvz., C57BL/6J), kitose – kur kas mažesnė (pvz., Balb/c) (Bradfute ir kt., 2005).

Žmogaus HKL selekcijai taip pat naudojamas CD133 žymuo, kuris ekspresuojamas didžiosios dalies CD34⁺ ląstelių paviršiuje (nepakankamai subrendusių ląstelių pirmtakių, monocitų/granulocitų pirmtakų, bet neaptinkamas ant didžiosios dalies eritroidinių pirmtakų) ir CDCP1 (angl. cubdomain containing protein), kurio raiška panaši į CD133. Ši molekulė gali būti naudojama kaip papildoma priemonė žmogaus HKL ir ląstelių pirmtakių gryninimui, bet ne kaip vienintelis žymuo atskyrimui. Pelių HKL ekspresuoja fibroblastų augimo veiksnio receptorių FGFR (angl. fibroblast growth factor receptor). Nors ši molekulė aptinkama tik ant 0.2% Lin⁻ pelių kaulų čiulpų ląstelių, taip pat ekspresuojančių ir Sca-1 bei c-Kit, ji ypač naudinga tų HKL gryninimui, kurios pasižymi maža Sca-1 raiška. Gana įdomus žymuo yra CD201 (taip pat žinomas kaip endotelinio baltymo C receptorių), kuris taip pat aptinkamas ant endotelinių ląstelių ir dalyvauja koaguliacijos bei uždegimo reguliavime. CD201 raiška kaulų čiulpų ląstelių populiacijoje, iš kurios pašalintos HKL, yra iki 40 kartų mažesnė nei toje, kurioje yra HKL (Ivanova ir kt., 2002).

Fenotipinei MKL analizei tarpusavyje derinami kelių teigiamų ir neigiamų žymenų kompleksai (Abdi ir kt., 2008). Žmogaus MKL paviršiuje ekspresuojama molekulė Stro-1 yra geriausiai charakterizuota ir dažniausiai įtraukiama į šių ląstelių identifikacijai naudojamų žymenų grupes. Įrodyta, kad ląstelės, neekspresuojančios Stro-1, nepasižymi MKL būdinga savybe formuoti kolonijas. Ląstelės, kurioms būdinga stipri šio žymens raiška, diferencijuojasi į fibroblastus, kurie atlieka atraminę funkciją hemopoezėje dalyvaujančioms ląstelėms. Be to, šios MKL diferencijuojasi į lygiųjų raumenų ląsteles, riebalinio, kaulinio bei kremzlinio audinių ląsteles. Visos šios diferenciacijos kryptys yra būdingos MKL. Stro-1 negali būti vienintelis žymuo šių ląstelių identifikavimui dėl dviejų pagrindinių priežasčių. Pirma, ši paviršiaus molekulė ekspresuojama ne tik primityvių MKL paviršiuje, bet aptinkama ir aukštesnės diferenciacijos eritroidinių pirmtakų paviršiuje. Dėl šios priežasties teigiama

selekcija pagal Stro-1 derinama su neigiama selekcija pagal glikoforiną A. Antra, Stro-1 palaiptiui prarandamas kultivavimo metu, todėl gali būti naudojamas MKL identifikavimui tik ankstyvosiose kultūrose. Pelių MKL šio žymens neekspresuoja (Kolf ir kt., 2007).

Ląstelės, kurių paviršiuje aptinkama Stro-1 molekulė ir kurios pasižymi MKL būdingomis proliferacinėmis savybėmis, ekspresuoja CD106 ir CD73 paviršiaus antigenus. CD106 dalyvauja ląstelių adhezijos, chemotaksio ir signalo perdavimo reakcijose. Tyrimų duomenimis, Stro-1⁺CD106⁺ ląstelės *in vitro* pasižymi didesniu proliferacijos potencialu ir platesniu diferenciacijos spektru nei Stro-1⁺CD106⁻ ląstelės (Gronthos ir kt., 2003). Paviršiaus molekulė CD73 apibūdina aktyviai proliferuojančią MKL populiaciją. Šis žymuo prarandamas jau anstyvuosiuose diferenciacijos etapuose, todėl CD73 raiška leidžia identifikuoti visiškai nediferencijuotas, primityvias MKL (Nauta ir Fibbe, 2007).

Tiek žmogaus, tiek pelių MKL pasižymi skirtinga CD105, CD44, CD90, CD117, Flk-1, Sca-1 ir adhezijos molekulių CD116, CD54/CD102, CD49, CD29 bei jų receptorių raiška (Tyndall ir kt., 2007). Paviršiaus žymenys CD90 ir CD29, kuriuos turi ir žmogaus, ir pelių MKL, reikalingi šių ląstelių migracijai pažeidus audinius. Pelių MKL pasižymi silpna HKL būdingų žymenų CD34 ir Sca-1 raiška (Chamberlain ir kt., 2007; Abdi ir kt., 2008).

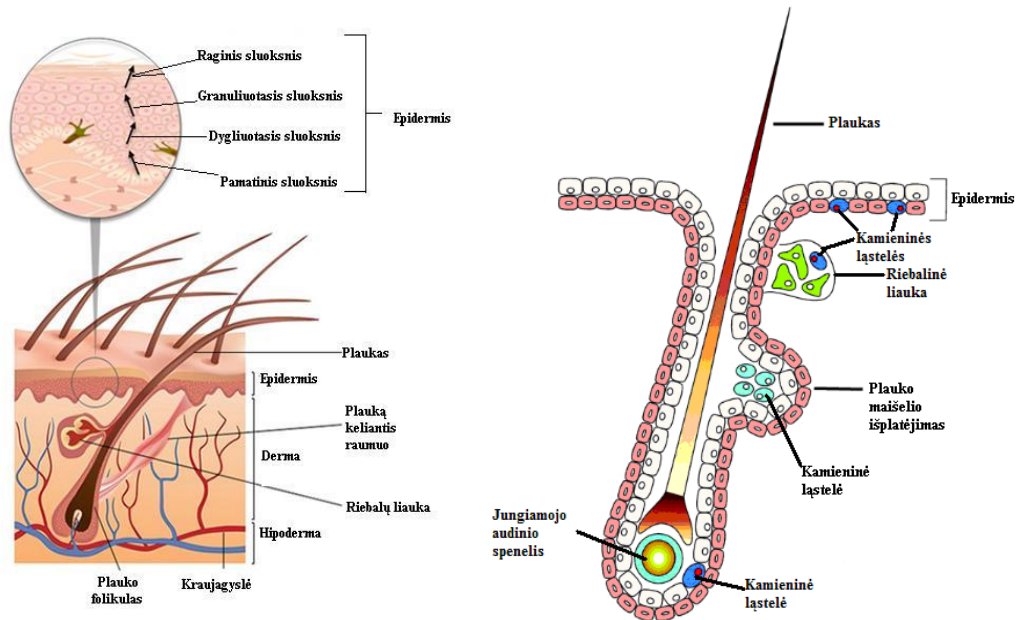
Tinkamai išgrynintos ląstelės sumažina nesėkmingos transplantacijos tikimybę. Norint kaulų čiulpų kamienines ląsteles panaudoti odos regeneracijai, būtina tinkamai parinkti ir suderinti gryninimo bei identifikacijos metodus.

2.2. ODA IR PAŽEIDIMAI

2.2.1. Odos struktūra

Oda yra nuolat atsinaujinantis organas, atliekantis gyvybiškai svarbias termoreguliacijos, imunologines, neurosensorines bei metaboline funkcijas.

Audinių sudaro trys atskiri, unikaliomis struktūrinėmis ypatybėmis pasižymintys sluoksniai – epidermis, derma ir hipoderma (2.1 pav.).



2.1 pav. Odos audinio struktūra (Blainpain ir Fuchs, 2009).

Epidermis yra išorinis, sluoksniuotas epitelis, neturintis kraujagyslių ir nervų, jo storis skirtingose kūno vietose gali būti nuo 75 iki 150 μm (delnuose ir paduose jo storis gali siekti iki 600 μm). Šis sluoksnis beveik neturi tarpląstelinės medžiagos ir yra sudarytas iš tarpusavyje sąveikaujančių ląstelių. Epidermyje aptinkami keturi pagrindiniai ląstelių tipai – keratinocitai, melanocitai, Langerhanso ląstelės ir Merkelio ląstelės (Simpson ir kt., 2011). Didžiąją dalį ląstelių populiacijos odos epidermyje sudaro keratinocitai. Pagrindiniai šių ląstelių citoskeleto struktūriniai baltymai yra keratinai, užtikrinantys epidermio mechaninį stabilumą ir vientisumą. Audiniuose šie baltymai formuoja heterodimerus, sudarytus iš dviejų tipų keratinų – rūgštinio (I tipo) ir bazinio (II tipo). Izomerai yra specifiski audiniui bei ląstelių diferenciacijos stadijai, todėl šių molekulių raiška galima remtis identifikuojant keratinocitus. Diferenciacijos metu keratinocitai formuoja keturis morfologiškai besiskiriančius epidermio sluoksnius – pamatinį (lot. Stratum germinativum), dygliuotąjį (lot. Stratum spinosum), granuliuotąjį (lot. Stratum granulosum) ir raginį (lot. Stratum corneum) (Costin ir Hearing, 2007). Giliausias pamatinis

sluoksnis sudarytas iš vieno sluoksnio kubinių ląstelių. Tai vienintelis epidermio sluoksnis, kuriame vyksta nuolatinis ląstelių dalijimasis. Aukščiau esančiuose sluoksniuose normaliomis sąlygomis ląstelės nesidalija, tačiau šis procesas gali būti indukuojamas pažeidus odą (Radoja ir kt., 2006). Pamatiniame sluoksnyje esančios ląstelės prie pamatinės membranos tvirtinasi specialiomis baltyminėmis struktūromis hemidesmosomomis. Ši sąveika yra kritiškai svarbi odos struktūros vientisumui palaikyti (Litjens ir kt., 2006). Besidalindamos giliausiame epidermio sluoksnyje, mažo diferenciacijos laipsnio ląstelės suformuoja dvi dukterines ląsteles. Viena ląstelė lieka pamatiniame sluoksnyje ir toliau proliferuoja, kita – migruoja į aukštesnius epidermio sluoksnius, praranda proliferacines savybes ir galutinai diferencijuojasi (Suter ir kt., 2009). Giliausiame epidermio sluoksnyje, be keratinocitų aptinkamos retomis grupelėmis išsidėsčiusios dviejų tipų ląstelės – pigmentą melaniną produkuojantys melanocitai ir nervinius impulsus perduodančios Merkelio ląstelės. Viršutinėje pamatinio sluoksnio dalyje taip pat yra Langerhanso ląstelių, kurios dalyvauja imuninėse reakcijose (Kanitakis, 2002). Iš pamatinio epidermio sluoksnio į dygliuotąjį sluoksnį patekę keratinocitai pradeda diferencijuotis, keičiasi jų morfologija bei genų raiška. Šį sluoksnį sudaro keliomis eilėmis išsidėsčiusios, netaisyklingos formos ląstelės, kurios tarpusavyje jungiasi desmosomų pagalba. Dygliuotojo sluoksnio keratinocituose pradeda formotis prie membranos prisijungusios ovalios granulės, užpildytos glikoliais ir fosfolipidais. Jos padeda atlikti barjerinę odos funkciją. Keratino filamentai jungiasi į pluoštus ir sudaro tonofilamentus, kurie gerai matomi pro šviesinį mikroskopą (Norlén ir kt., 2003). Iš dygliuotojo į granuliuotąjį sluoksnį patekę keratinocitai suplokštėja, jų branduoliai sumažėja, citoplazmoje gerai matomos didelės bazofilinės keratohialino granulės. Šios granulės nėra atskirtos membranomis, todėl dažnai apibūdinamos kaip netirpūs baltyminiai junginiai. Keratohialino granulių paskirtis nėra visiškai aiški, tačiau manoma, kad jos svarbios keratinizacijos procesui bei barjerinei funkcijai, taip pat dėl savo junginių sudėtyje esančios sieros dalyvauja formuojantis visiškai diferencijuotų

keratinocitų apvaskalui išoriniame epidermio sluoksnyje (Wickett ir Visscher, 2006).

Viršutinis epidermio sluoksnis sudarytas iš galutinai diferencijuotų keratinocitų, vadinamų korneocitais, ir tarpląstelines ertmes užpildančių lipidų. Korneocitai yra nebegyvos, suplokštėjusios ląstelės, neturinčios branduolių ir kitų organelių. Šių ląstelių vidus užpildytas keratino tarpiniais filamentais, kuriuos supa iš vandens, jonų, laisvųjų amino rūgščių ir kitų tirpių mažos molekulinės masės nejoninių komponentų sudarytas mišinys (Akinshina ir kt., 2013). Kiekvieną korneocitą supa baltyminis apvaskalas, kurio pagrindą sudaro lorikrinas ir involukrinas. Globulinis baltymas lorikrinas išskiriamas yrant keratohialino granulėms, jo struktūroje dominuoja hidrofobinės amino rūgštys, dėl kurių šis baltymas vandens turinčioje aplinkoje yra netirpus. Involukrinas pradedamas sintetinti keratinocitų citoplazmoje gilesniuose epidermio sluoksniuose, vėliau modifikuojamas ir įjungiamas į baltyminio korneocitų apvaskalo struktūrą (Zahn ir kt., 2005). Prie baltyminio apvaskalo komponentų kovalentinėmis jungtimis jungiasi riebalinės molekulės, formuodamos lipidinį tarpląstelinių ertmių užpildą. Pagrindiniai lipidai raginiame sluoksnyje yra keramidai, riebalų rūgštys ir cholesterolis. Epidermio diferenciacijos metu, lipidų išsidėstymas ir kiekių santykis kinta bei priklauso nuo lokalizacijos vietos. Lipidinio apvaskalo formavimosi procesas yra griežtai kontroliuojamas, neigiami struktūros pokyčiai lemia odos barjerinės funkcijos sutrikimus bei kai kurias patologijas (Marks, 2004).

Epidermį nuo dermos skiria plona specializuota tarpląstelinės medžiagos struktūra, vadinama bazine membrana. Ji užtikrina struktūrinį stabilumą, taip pat kontroliuoja ląstelių judėjimą tarp sluoksnių ir abipusę biologiškai aktyvių medžiagų difuziją. Paminėta membrana yra augimo veiksnių ir citokinų rezervuaras, atsiradus pažeidimams šios medžiagos išskiriamos į mikroaplinką ir dalyvauja audinio atstatymui būtinose reakcijose. Pagrindiniai struktūriniai komponentai šioje membranoje yra lamininų šeimos baltymai, IV tipo kolagenas, nidogenas ir perlekanas (Segal ir kt., 2008).

Derma yra jungiamojo audinio sluoksnis, atliekantis atraminę bei mitybinę funkcijas. Šis sluoksnis, atvirkščiai nei epidermis, turi retai išsidėsčiusių ląstelių populiacijas, jo pagrindą sudaro tarpląstelinė medžiaga. Trys vyraujantys dermos tarpląstelinės medžiagos komponentai yra kolagenas, elastinas ir hialurono rūgštis (Frantz ir kt., 2010). Kolagenas yra vyraujantis dermos tarpląstelinės medžiagos fibrilinis baltymas, pasižymintis unikaliomis struktūrinėmis ypatybėmis ir užtikrinantis odos audinio mechaninį atsparumą. Šeimai priklauso daugiau kaip 20 tipų baltymų, iš kurių bent 11 tipų aptinkami odoje. Saugusio organizmo dermoje dominuoja I tipo kolagenas, kuris sudaro apie 80% visų šeimos baltymų masės. Mažesniais kiekiais dermoje aptinkamas III tipo kolagenas, kurio raiška ypač didelė ankstyvosiose organizmo vystymosi stadijose. Kolageno tipų kiekio santykis dermoje kinta ir priklauso nuo natūralių fiziologinių procesų, vykstančių organizme, taip pat nuo išorinių aplinkos veiksnių sukeltų audinio pažeidimų (Shoulders ir Raines, 2009). Tarp kolageno fibrilių dermoje išsidėsčiusios elastino skaidulos suteikia odai tamprumo. Elastino skaidulų tinklas lemia ne tik odos audinio mechanines savybes, bet ir kontroliuoja ląstelių chemotaksį, diferenciaciją, proliferacines bei migracines savybes, vaidina svarbų vaidmenį perduodant signalus. Organizmui senstant, elastino kiekis odoje dėl sulėtėjusios sintezės ir padidėjusios degradacijos sparčiai mažėja, todėl audinys praranda elastingumą, yra labiau pažeidžiamas ir sunkiau atstatomos pirminės jo struktūrinės bei funkcinės savybės (Waller ir Maibach, 2006). Pagrindinis glikozaminoglikanas dermoje yra hialurono rūgštis. Tarpląstelines ertmes užpildanti hialurono rūgštis atlieka daug fiziologinių funkcijų: veikia ląstelių proliferaciją, adheziją, migraciją, diferenciaciją, dalyvauja uždegiminio atsako ir žaizdų gijimo procesuose (Oh ir kt., 2011). Pagal struktūrines ypatybes skiriami du dermos regionai – papildinis ir retikulinis. Abu regionai charakterizuojami pagal kolageno ir elastino skaidulų, suteikiančių skirtingas mechanines savybes, išsidėstymą (Simpson ir kt., 2011). Pagrindinės dermoje aptinkamos ląstelės yra fibroblastai. Jie ne tik produkuoja tarpląstelinės medžiagos komponentus, bet ir sąveikaudami tarpusavyje bei su kitų tipų ląstelėmis užtikrina fiziologines odos funkcijas. Dermos fibroblastai formuoja

heterogeninę ląstelių populiaciją, priklausomai nuo lokalizacijos audinyje. Dvi unikalios fibroblastų subpopuliacijos aptinkamos papiliniame ir retikuliniame dermos regionuose. Tarpusavyje šios subpopuliacijos skiriasi morfologinėmis ir proliferacinėmis savybėmis, paviršiaus molekulių raiška, tarpląstelinės medžiagos komponentų sinteze (Sorrell ir Caplan, 2004). Specifines odos funkcijas užtikrina dermoje išsidėsčiusios papildomos struktūros. Tai prakaito ir riebalų liaukos, plaukai, nagai, įvairių tipų kraujagyslių tinklas ir nervų galūnėlės. Jos dalyvauja termoreguliacijoje, atlieka apsaugines bei jutimines funkcijas ir yra būtinos odos funkcionavimui užtikrinti tiek normaliomis, tiek pataloginėmis sąlygomis (Tse ir Hoang, 2012).

Po derma esanti hipoderma, dar vadinama poodiniu sluoksniu, sudaryta iš riebalinio audinio. Šiame sluoksnyje randamos ląstelės yra fibroblastai, riebalinės ląstelės ir makrofagai. Hipodermoje taip pat yra laisvai išsidėsčiusių elastinių fibrilių, kraujagyslių, limfagyslių, plauko šaknys, dalis liaukų, nervų, raumenų pluoštų. Šis sluoksnis yra organizmo energijos rezervuaras bei apsaugo nuo didelių temperatūros pokyčių (Kanitakis, 2002).

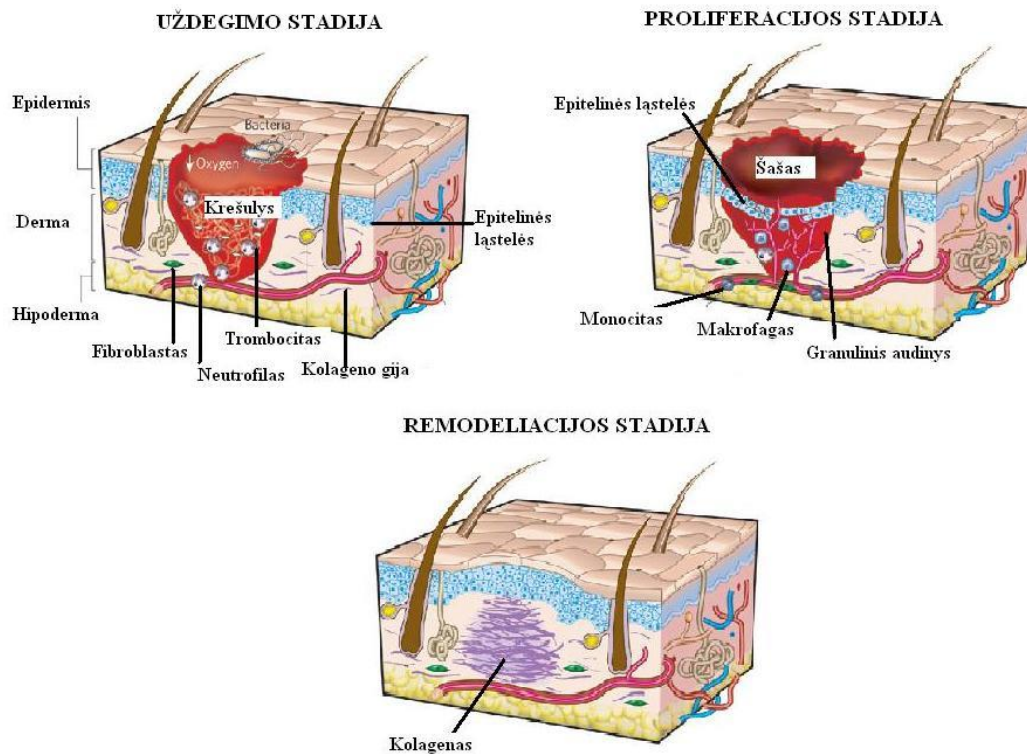
Nuolatinį odos viršutinių sluoksnių atsinaujinimą fiziologinėmis sąlygomis užtikrina epitelinės kamieninės ląstelės (EpKL), kurios lokalizuotos trijose pagrindinėse nišose – pamatiniame epidermio sluoksnyje, plauko maišelyje ir riebalinių liaukų pamatinėje dalyje (2.1 pav.) (Fuchs, 2008). Pamatiniame epidermio sluoksnyje esančios kamieninės ląstelės dalijasi asimetriniu būdu, po kurio suformuojamos dukterinės ląstelės, pasižyminčios skirtingomis savybėmis. Viena dukterinė ląstelė išlaiko tokį pat aukštą proliferacijos potencialą kaip ir motininė ląstelė. Kita dukterinė ląstelė pasižymi ribotu proliferacijos potencialu ir po keleto pasidalijimų diferencijuojasi (Watt, 2001). Pamatinio sluoksnio kamieninės ląstelės pasižymi dideliu proliferaciniu aktyvumu, tačiau normaliomis sąlygomis dalijasi retai. Pagrindinė jų užduotis odoje yra išlaikyti tokio dydžio ląstelių populiaciją, kurios užtektų sveiko audinio homeostazės palaikymui (Watt, 2002). Plauko folikulo kamieninės ląstelės atsakingos už šios struktūros formavimą vykstant plauko augimo ciklams. Kamieninės ląstelės įsitvirtinusios atskirtoje mikroaplinkoje, kuri

išlaikoma visos plauko morfogenezės metu (Blainpain ir Fuchs, 2006). Anageno (augimo) fazėje šios ląstelės pasižymi didžiausiu aktyvumu ir savybe migruoti iš nišos tam, kad suformuotų folikulo struktūras. Katageno (nykimo) ir telogeno (ramybės) fazėse plauko folikulo kamieninės ląstelės yra neaktyvios ir tokią būseną išlaiko iki kito ciklo pradžios (Alonso ir Fuchs, 2006). Plauko folikulo nišoje esančios kamieninės ląstelės pasižymi didesniu diferenciacijos potencialu nei epidermio pamatiniame sluoksnyje esančios kamieninės ląstelės. Po odos audinio pažeidimo jos gali palikti savo įprastą nišą ir dalyvauti epidermio atstatymo procese bei riebalinių liaukų formavime (Amoh ir kt., 2009). Nors plauko folikulo kamieninės ląstelės pažeidimų metu dalyvauja riebalinių liaukų regeneracijoje, tačiau normaliomis sąlygomis už šį procesą atsakinga specifinėje nišoje esanti atskira nediferencijuotų ląstelių populiacija. Panašiai kaip ir epidermio kamieninės ląstelės, riebalų liaukų pamatinėje dalyje esančios kamieninės ląstelės gali formuoti tik joms būdingus subrendusių ląstelių tipus, bet negali palikti savo nišos pažeidimų metu ir dalyvauti kitų struktūrinių vienetų regeneracijoje (Li ir kt., 2013).

Odos audinys yra sudėtinga struktūra, atliekanti gyvybiškai svarbias funkcijas, kurias užtikrina griežtai kontroliuojamos sąveikos tarp ląstelių, tarpląstelinės medžiagos komponentų ir mikroaplinkoje esančių įvairių molekulių. Sutrikęs audinio vystymasis lemia funkcijų praradimą ir gali sukelti patologijas. Oda yra puikus tyrimų modelis pagrindinių audinių atsinaujinimo principų vertinimui regeneracinėje medicinoje.

2.2.2. Žaizdos gijimo procesas

Žaizdos gijimas yra dinamiškas procesas, kuriame dalyvauja skirtingų tipų ląstelės, tarpląstelinės medžiagos molekulės ir įvairūs tirpūs mediatoriai (Haihong ir kt., 2006; Li ir kt., 2007). Nors šis procesas yra vieningai vykstančių reakcijų visuma, jo apibūdinimui skiriamos trys pagrindinės nenutrūkstamos bei viena kitą palaipsniui keičiančios stadijos: uždegimo, proliferacijos ir remodeliacijos (Velnar ir kt., 2009).



2.2 pav. Odos pažeidimo gijimo stadijos (Gurtner ir kt., 2008).

Pažeidus audinį, nedelsiant aktyvinamas hemostazės procesas, formuojama laikina žaizdos matrica bei sužadinamas uždegiminis atsakas. Uždegimo stadijoje atpažistami bei pašalinami galimi patogenai ir svetimkūniai, skatinama ląstelių migracija į pažeidimo vietą, vyksta jų aktyvinimas ir proliferacija. Uždegiminis atsakas svarbus formuojantis naujai tarpląstelinei medžiagai ir reepitelizacijos procesui (Jones ir kt., 2004). Šios stadijos metu vykstančios reakcijos skirstomos į ankstyvasias ir vėlyvasias. Ankstyvojo uždegimo metu aktyvinamas komplementas, pažeidimo vietoje dominuojančios ląstelės yra neutrofilai ir monocitai. Pirmieji pataloginį židinį pasiekia neutrofilai, jų pagrindinis tikslas pradėti fagocitozę, kurios metu šalinami mikroorganizmai, svetimkūniai ir pažeistas audinys. Fagocitinis aktyvumas yra kritiškai svarbus sekantiems gijimo procesams, kadangi infekcijos apimtame audinyje nevyksta regeneraciją užtikrinančios reakcijos (Hart, 2002). Vėlyvosiose uždegimo reakcijose keičiasi monocitų fenotipas, šios kraujo ląselės tampa audinių makrofagais. Makrofagų aktyvumas ir funkcijos priklauso nuo žaizdos mikroaplinkos. Pirminės šių ląstelių funkcijos gyjant žaizdoms yra

fagocitozė, antigeno pateikimas bei uždegiminių citokinų ir augimo veiksmų produkavimas. Vėlesnėse gijimo stadijose jie stimuliuoja fibroblastų, keratinocitų ir endotelinių ląstelių proliferaciją. Makrofagų įsitvirtinimas pažeidimo židinyje yra ženklas, kad uždegimo stadiją pradeda keisti proliferacijos stadija (Rodero ir Khosrotehrani, 2011).

Proliferacijos stadijos metu intensyviai vyksta epitelizacija, angiogenezė ir granulinio audinio formavimasis. Anksčiausiai pradedamas epitelizacijos procesas, kuris būtinas barjerinės funkcijos atstatymui. Žaizdos kraštuose esančio epidermio pamatinės ląstelės ilgėja, praranda hemidesmosomas, kuriomis tvirtinasi prie pamatinės membranos, bei desmosomas, kurių pagalba sąveikauja tarpusavyje, citoplazmoje susiformuoja aktino filamentai ir jos pradeda migruoti į pažeidimo vietą. Jei nepažeidžiamos papildomos epitelio struktūros, pvz., plaukų folikulai ir prakaito liaukos, jose esančios epitelinės ląstelės taip pat dalyvauja re-epitelizacijos procese. Ląstelės migruoja tol, kol visame žaizdos paviršiuje susidaro vientisas monosluoksnis. Migruojančioms ląstelėms reikalingas atraminis pagrindas, kurio vaidmenį gali atlikti pamatinė membrana, tačiau jei ji pažeidžiama, tokią funkciją atlieka laikina fibrino-fibronektino matrica (Monaco ir Lawrence, 2003). Proliferacijos stadijoje naujas kraujagyslių tinklas formuojamas angiogenezės proceso metu iš greta žaizdos esančių kraujagyslių. Angiogenezės sėkmė priklauso nuo ląstelių tarpusavio bei ląstelių ir tarpląstelinės medžiagos sąveikų, mikroaplinkoje esančių tirpių molekulių veikimo. Ji pradeda, kai prie žaizdos kraštuose esančių kraujagyslių endotelinių ląstelių paviršiaus receptorių jungiasi angiogeniniai veiksniai. Ši sąveika aktyvina signalinius kelius endotelinių ląstelių viduje. Aktyvintos formos ląstelės išskiria proteolitinius fermentus, kurie padeda suardyti motines kraujagysles supančią pamatinę membraną, pradeda migraciją į pažeidimo židinį. Endotelinėms ląstelėms į žaizdos mikroaplinką migruoti padeda jų paviršiuje esančios adhezijos molekulės. Įsitvirtinusios žaizdos pamate, ląstelės intensyviai proliferuoja ir suformuoja smulkias vamzdelių pavidalo struktūras. Vėliau atstatoma pamatinės membranos struktūra ir pradedamas naujų kraujagyslių brendimas. Procesas

svarbus visai vėliau vykstančiai gijimo eigai, nes naujai besiformuojančių audinių elementus būtina aprūpinti maisto medžiagomis bei deguonimi (Braiman-Wiksmann ir kt., 2007). Baigiamuosiuose proliferacijos stadijos etapuose formuojamas granulini audinys. Šį audinį sudaro įvairios ląstelės, naujai susiformavusios kraujagyslės ir laikina tarpląstelinė medžiaga. Ląstelių ir neląstelių komponentų tipai bei kiekiai granuliniame audinyje kinta visą jo formavimosi laiką. Ankstyvosiose vystymosi stadijose jame dominuoja uždegiminės ląstelės, vėliau didžiausią dalį ląstelių populiacijos granuliniame audinyje sudaro fibroblastai, sintetinantys tarpląstelinės medžiagos komponentus. Galutinai susiformavus granuliniam audiniui, ląstelių proliferacijos procesas inhibuojamas, tarpląstelinės medžiagos komponentus produkujančių ląstelių kiekis nebedidėja, proliferacijos stadiją palaipsniui keičia remodeliacijos stadija (Häkkinen ir kt., 2012).

Remodeliacijos stadija yra galutinė ir ilgiausiai trunkanti žaizdos gijimo stadija. Priklausomai nuo žaizdos dydžio, ši stadija gali trukti iki metų ar ilgiau. Pagrindinis remodeliacijos stadijos metu vykstantis procesas yra tarpląstelinės medžiagos komponentų keitimas (MacDougall ir kt., 2006). Proliferacijos stadijos metu susiformavusio granulinio audinio laikinojoje tarpląstelinėje medžiagoje pagrindinis komponentas yra III tipo kolagenas, kuris remodeliacijos metu keičiamas sveikos odos audinio tarpląstelinės medžiagos komponentu I tipo kolagenu. Procesas yra griežtai kontroliuojamas, jam vykstant išlaikoma pusiausvyra tarp naujo kolageno sintezės ir senojo kolageno lizės, vykdomos veikiant matriksu metaloproteinazėms. Pasibaigus žaizdos gijimo procesui, naujai susiformavusio audinio tamprumas siekia iki 80% nepažeisto audinio tamprumo, pasisavina mažiau deguonies bei maisto medžiagų, funkcinu atžvilgiu yra pasyvesnis (Li ir kt., 2007).

Kiekvienoje žaizdos gijimo stadijoje vykstančios reakcijos privalo būti tikslios ir kontroliuojamos. Proceso metu nutrūkusios, nuo normalaus vystymosi nukrypusios ar uždelstos reakcijos lemia negyjančių, chroniškų žaizdų atsiradimą (Guo ir DiPietro, 2010).

2.2.3. Citokinių vaidmuo žaizdų gijimo procese

Visose žaizdos gijimo stadijose svarbų vaidmenį atlieka augimo veiksniai, citokinai ir chemokinai, jungiantys sudėtingus signalinius kelius, kurie tiesiogiai veikia ląstelinius procesus pažeisto audinio atstatymo metu. Prisijungdamos prie ląstelių paviršiaus receptorių ar tarpląstelinės medžiagos baltymų, šios molekulės gali pasižymėti parakrininiu, autokrininiu arba endokrininiu veikimu (Barrientos ir kt., 2008).

Plačiausiu biologinio veikimo spektru pasižymi transformuojantis augimo veiksnys beta TGF- β (angl. transforming growth factor- β), pažeidimo židinyje išliekantis visą gijimo laiką ir veikiantis skirtingus jo metu vykstančius procesus (Penn ir kt., 2012). TGF- β superšeimai taip pat priklauso BMP (angl. bone morphogenetic proteins), augimo ir diferenciacijos veiksniai GDF (angl. growth and differentiation factors), aktyvinantys baltymai (angl. activin) ir inhibuojantys baltymai (angl. inhibin). TGF- β šeimos veiksniai prisijungia prie heteromerinio receptorių komplekso, aktyvinančio viduląstelių signalų kaskadas. Tiriant odos pažeidimus, geriausiai charakterizuotos trys transformuojančio augimo veiksnio izoformos TGF- β 1-3, kurios yra panašios struktūros, bet atlieka skirtingas funkcijas. Jų receptorius sudarytas iš dviejų atskirų transmembraninių glikoproteinų TGF- β RI ir TGF- β RII, kurie yra serinotreonino kinazės. Dauguma ląstelių tipų sekretuoja neaktyvią TGF- β formą, kuri negali jungtis prie receptorių komplekso. Latentinę veiksnio formą aktyvina proteazės, rūgštinė aplinka, reaktyvus deguonis (Groppe ir kt., 2008). Atsinaujinant pažeistam audiniui TGF- β tiesiogiai veikia procese dalyvaujančias ląsteles. Pirmosiomis pažeidimo minutėmis veiksnys yra vienas pagrindinių chemoatraktantų, skatinančių uždegiminių ląstelių migraciją. Uždegimo stadijos metu svarbi TGF- β funkcija yra proteazių, kurias išskiria makrofagai, inhibicija. Veikdamas proteolitinę žaizdos aplinką, veiksnys skatina proliferacijos stadijos progresavimą. Šioje stadijoje TGF- β veikia endotelines ląsteles, dalyvaujančias naujų kraujagyslių formavimesi atsinaujinančiame granuliaciniame audinyje. Angiogenezeje jo poveikis priklauso ir nuo kitų ląstelių tipų bei veikiančių

citokinių. TGF- β taip pat stimuliuoja fibroblastų proliferaciją. Šios ląstelės atsakingos už tarpląstelinės medžiagos, sudarytos iš kolageno ir fibronektino, atsinaujinimą. Įrodyta, kad TGF- β , veikdamas fibroblastus, didina šių medžiagų produkciją. Epitelizacijos procese šis veiksnys sąveikauja su keratinocitais, skatindamas jų migraciją. Galutinė TGF- β funkcija audinio reparacijos procese yra dalyvavimas formuojantis miofibroblastams remodeliacijos stadijoje (Faler ir kt., 2006).

Gyjant žaizdoms, proliferacijos stadijoje ypač svarbūs kraujagyslių endotelio augimo veiksniai VEGF (angl. vascular endothelial growth factors). Jie funkcionuoja kaip endotelinių ląstelių mitogenai, chemotaktiniai ir kraujagyslių pralaidumą skatinantys veiksniai. Išskiriamos penkios VEGF izoformos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ir placentos augimo veiksnys PLGF (angl. placenta growth factor). Izoformos gali būti laisvai sekretuojamos arba iškart prijungiamos prie ląstelių paviršiuje esančio heparino molekulių. Tokių formų balanso palaikymas lemia sisteminių bei lokalių VEGF efektą (Bao ir kt., 2009). *In vivo* ir *in vitro* studijų metu VEGF-A identifiкуotas kaip pagrindinis angiogenezės reguliatorius normaliaame organizmo vystymesi, todėl iškelta hipotezė, kad šis veiksnys dalyvauja formuojantis kraujagyslėms ir gyjant žaizdoms (Lauer ir kt., 2000). Hipotezei patvirtinti buvo tiriama VEGF-A receptorių VEGFR-1 ir VEGFR-2 raiška. Įrodyta, kad receptoriai intensyviausiai ekspresuojami pažeidimo vietoje atsinaujinančio granuliacinio audinio kraujagyslėse, o pagrindinės VEGF-A sekretuojančios ląstelės yra makrofagai ir keratinocitai (Werner ir Grose, 2003). Kadangi angiogenezės procesas yra kritiškai svarbus pažeisto audinio atsinaujinimui, intensyvūs unikalių VEGF šeimos narių savybių tyrimai reikalingi norint sėkmingai taikyti šiuos veiksnius chroniškų žaizdų terapijai.

Ankstyvosiose odos audinio gijimo stadijose reikšmingą vaidmenį atlieka uždegiminiai ir priešuždegiminiai citokinai. Pusiausvyros palaikymas tarp šių grupių citokinių užtikrina laiku prasidedančias ir pasibaigiančias gijimo proceso reakcijas, lemia nuoseklų ir sėkmingą naujo audinio formavimąsi (Behm ir kt., 2012). Uždegiminiai citokinai pažeidimo židinyje stimuliuoja

fibroblastų ir keratinocitų proliferaciją, tarpląstelinės medžiagos baltymų sintezę ir suardymą, fibroblastų chemotaksį, reguliuoja imuninio atsako reakcijas. Pažeidus audinį, iškart padidėja uždegiminių citokinų interleukino (IL) 1 α , IL-1 β , IL-6 ir naviko nekrozės veiksnio alfa TNF- α (angl. tumor necrosis factor alpha) kiekiai. Baigiantis ankstyvosioms uždegimo stadijos reakcijoms, šių citokinų kiekiai sumažėja, kadangi jų perteklius lemtų uždelsto gijimo chroniškas žaizdas (Broughton ir kt., 2006). Pažeisto odos audinio gijimo tyrimuose ypatingas dėmesys skiriamas citokinui TNF- α , kadangi jis ne tik dalyvauja vystantis uždegimui, tačiau vėlesnėse stadijose sąveikaudamas su kitais augimo veiksniais prisideda prie angiogenezės proceso (Girauda ir kt., 1998). Kartu su uždegiminiais citokinais, atsiradus pažeidimui veikia ir priešuždegiminiai citokinai. Išsamūs tyrimai atliekami vertinant IL-10 įtaką odos audinio atsinaujinimui. Šis citokinas atlieka pagrindinį vaidmenį apribojant ir užbaigiant uždegimines reakcijas, taip pat reguliuoja įvairių imuninių ląstelių, keratinocitų bei endotelinių ląstelių augimo ir/arba diferenciacijos procesus (Barrientos ir kt., 2008).

Visas žaizdos gijimo stadijose vykstančias reakcijas tiesiogiai arba netiesiogiai veikia tirpūs mediatoriai, todėl šių molekulių sąveikos tyrimai būtini modeliuojant pažeidimus tiek *in vitro*, tiek *in vivo*.

2.2.4. Odos pažeidimų modeliai

Išorinių veiksnių įtakos odos žaizdų gijimui tyrimuose naudojami įvairūs eksperimentiniai modeliai, kurie gali būti formuojami *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis. Eksperimentinio modelio pasirinkimas priklauso nuo tyrėjo tikslų ir galimybių (Gal ir kt., 2008).

In vitro sistemų kūrimas yra nesudėtingas, rezultatai gaunami greičiau, jos yra pigesnės ir nesukelia, arba sukelia minimalias, etines problemas. Žaizdų gijimas *in vivo* yra daugybės persidengiančių reakcijų visuma, kurias tirti vienu metu yra sudėtinga, todėl *in vitro* sąlygomis modeliuojami atskiri gijimo etapai suteikia pirminių žinių, reikalingų vėlesniems tyrimams. Ląstelių migracija ir

prolifracija yra pagrindiniai procesai, užtikrinantys pažeisto audinio regeneraciją. Abu procesai priklauso nuo specifinės mikroaplinkos, kurioje lokalizuotos ląstelės. *In vitro* sąlygomis galima modeliuoti proliferacijos bei migracijos procesus ir gauti kiekybinių palyginamųjų duomenų, reikalingų sudėtingiems *in vivo* modeliams kurti. *In vivo* modelių naudojimas reikalingas, nes juos taikant galima tirti žaizdas, panašias į sutinkamas klinikinėje praktikoje. Rezultatus, gautus atliekant tyrimus su gyvūnais, įmanoma taikyti žmogaus žaizdų gydymui (Gottrup ir kt., 2000).

Gyvūnų modelių panaudojimas yra svarbus norint suprasti pagrindinius audinių reparacijos principus. Nors visų žinduolių pagrindiniai audinių atsinaujinimo metu vykstantys procesai yra panašūs, visiško atitikimo tarp įvairių gyvūnų rūšių nėra. Žmogaus žaizdų gijimas yra unikalus procesas, priklausantis nuo fiziologijos, amžiaus, aplinkos, tačiau klinikiniai eksperimentai yra griežtai ribojami medicininės etikos reikalavimų. Modeliuojant žaizdas *in vivo*, galima tirti atskirus žaizdos gijimo etapus, priklausomai nuo tyrėjo tikslų (Ševeljevič-Jaran, 2003).

Atliekant eksperimentus taikomi ūminės žaizdos ir lėtinės (sutrikusio gijimo) žaizdos modeliai. Modeliuoti lėtines žaizdas yra sudėtinga, tokių žaizdų gijimas susijęs su nepakankama audinių kraujotaka, aprūpinimu maisto medžiagomis, lėtiniais fiziologiniais sutrikimais. Kuriant lėtinių žaizdų modelius *in vivo*, eksperimentiniams gyvūnams medikamentais sukeliama sisteminiai metaboliniai sutrikimai (Davidson, 1998). Realių situacijų atitikimą pasiekti yra lengviau modeliuojant ūmines žaizdas. Šių žaizdų gijimo įvykių eiga labiau sutampa su analogiškais žmogaus audinių gijimo etapais. Ūminių žaizdų modeliai atitinka autentiškas chirurgines procedūras ir trauminius pažeidimus. Priklausomai nuo tyrimo tikslų, kuriami skirtingi tokių žaizdų modeliai:

- Pjautinė žaizda: pirminis ir antrinis gijimas.
- Uždaros ertmės žaizda.
- Nudegimo žaizda: terminis, cheminis ir radiacinis pažeidimai.

- Ekscizinė žaizda: paviršinis nubrozdinimas, serozinių pūslių sukėlimas, dalies ir visų odos sluoksnių pažeidimai.

Pjautinė žaizda, sukelta įpjaujant odą ar kitą audinį skalpeliu, pasižymi greitu gijimu. Pirminio gijimo pjautinės žaizdos sugyja greičiau ir su ne tokiu ryškiu randu nei antrinio gijimo pjautinės žaizdos. Šis modelis tinkamas biomechaninėms atsinaujinančių audinių savybėms tirti, bet netinka biocheminiams, epitelizacijos ir histologiniams žaizdos gijimo tyrimams dėl riboto tūrio (Gottrup, 2001).

Uždaros ertmės žaizdos modelyje jungiamojo audinio formavimasis atskiriamas nuo kitų reparacijos procesų, pvz., epitelizacijos ar kontrakcijos, implantuojant poodinius svetimkūnius. Priklausomai nuo medžiagos, iš kurios pagamintas implantas (viskozinės, celiuliozinės ar polivinilinės kempinės, nerūdijančio plieno, nailoniniai ar tefloniniai tinkleliai ir pan.), aplink jį susidaro įvairaus storio jungiamojo audinio randėjanti kapsulė. Žaizdos sritis yra apibrėžto tūrio, implantuotą medžiagą nesudėtinga pašalinti kartu su aplink ją susiformavusiu jungiamuoju audiniu tolimesniems tyrimams. Modelis tinkamas biocheminiams gijimo tyrimams, t. y., galima vertinti kolageno, DNR, įvairių biocheminių medžiagų kiekių pokyčius žaizdai gyjant. Implanto ertmė gali būti panaudota tirti injekuojamų medžiagų (pvz., citokinių, augimo veiksnių, ląstelių populiacijų) poveikiui. Modelio trūkumas – neigiama implantų įtaka rando formavimuisi, nevyksta epitelizacijos procesas, galimybė tirti tik pirmąsias reparacijos proceso savaites (Davidson, 2001).

Terminis, cheminis ir radiacinis nudegimas skiriasi gijimo metu vykstančiomis reakcijomis, kurios lemia ląstelių ir audinių gyvybingumą. Lyginant su mechaninio pobūdžio žaizdų modeliais, nudegimo žaizdos pasižymi savo sukkelto atsako išskirtinumu. Nudegimo zonoje formuojasi atvira audinių nekrozė su negyvybingomis ląstelėmis, denatūruotais baltymais, jungiamuoju audiniu. Aplink ją formuojasi zona, kurioje plazmos denatūracija ir ląstelių baltymų fragmentai sukelia audinių paburkimą, nepakankamą audinių aprūpinimą mitybos medžiagomis. Priklausomai nuo gydymo būdo ir išsivysčiusios infekcijos, ši zona gali progresuoti arba regresuoti. Nudegimo

žaizdų modeliai kuriami naudojant įvairias priemones – aukštos temperatūros vandenį, etanolį, įkaitintus metalus, chemines medžiagas. Kuriant tokius modelius, reikia atsižvelgti į tai, kad nekroziniai audiniai žaizdoje sudaro palankias sąlygas vystytis infekcijai, sunku kontroliuoti tokios žaizdos gylį ir apibrėžti tikslias ribas (Ševeljevič-Jaran, 2003).

Ekscizinės žaizdos modeliuojamos pašalinant apibrėžto dydžio audinio dalį. Paviršinis nubrozdinimas yra paprasčiausias odos pažeidimas, jam būdingas Stratum corneum ir Stratum granulosum sluoksnių suardymas, atidengiamas pamatinis keratinocitų sluoksnis, pamatinė membrana lieka sveika, neprarandama kraujo, laikinai sutrikdomas odos skysčių balansas. Tai švelnus pažeidimas, aktyvinantis epidermio atsinaujinimo procesus, naudojamas tiriant epiderminių ląstelių fenotipą. Sukeliant serozines pūsles pažeidžiama pamatinė membrana, epidermis atskiriamas nuo dermos. Šiam modeliui sudėtinga naudoti graužikus dėl plonos jų odos, pažeistas audinys sunkiai aprūpinamas maisto medžiagomis, vystosi audinių nekrozė. Pūslės tinkamos tiriant epitelinių ląstelių transplantacijos tyrimams. Dalies odos sluoksnių pažeidimams būdinga tai, kad dalis dermos, dažniausiai retikulinės, ir didžioji dalis epiderminių priedų (riebalinės ir prakaito liaukos, plaukų folikulai) lieka nepažeisti. Todėl reepitelizacijos procesas yra greitas ir vyksta ne tik nuo žaizdos kraštų, bet ir visame pažeidimo plote iš likusių odos priedų. Modelis palankus tiriant epitelizacijos procesą, tačiau yra ribotas dėl eksperimentinių gyvūnų pasirinkimo, nes pvz., graužikai nėra labai tinkami dėl per daug plaukuotos odos. Visų odos sluoksnių pažeidimo modelyje pašalinama oda iki fascijos arba poodžio, apimant ir odos raumenį *Panniculus carnosus*, tvirtai suaugusį su pamatinėmis odos struktūromis. Žaizdos gylis ir plotas priklauso nuo eksperimentinio gyvūno. Pažeidus visus odos sluoksnius būdingas kraujavimas ir skysčių netekimas lemia didesnę infekcijos tikimybę. Šis modelis dėl pakankamo žaizdos tūrio ypač tinkamas cheminiams, histologiniams bei ląstelių populiacijų, esančių gijimo srityje, tyrimams. Gijimo greitis nustatomas vertinant granuliacinio audinio atsinaujinimą, reepitelizacijos laipsnį, jungiamojo audinio histologinius rodiklius, naujų kraujagyslių formavimąsi,

kolageno bei proteoglikanų biocheminius rodiklius pažeidimo srityje. Gyjant ekscizinei žaizdai eksperimentiniuose gyvūnuose, granuliacinio audinio atsinaujinimas vyksta sparčiau, tačiau šis etapas artimiausias žmogaus odos audinio randėjimo procesui (Galiano, 2004).

Tinkamas odos pažeidimo modelio pasirinkimas suteikia reikiamų žinių apie išorinių veiksnių įtaką atskiruose žaizdos gijimo etapuose vykstančioms reakcijoms bei gali padėti kuriant sėkmingas chroniškų žaizdų terapijos strategijas.

2.3. ODOS AUDINIO REGENERACIJA

Audinių inžinerijos principų taikymas yra svarbus etapas regeneracinėje medicinoje tiriant prarastą, pažeistą ar nusidėvėjusių audinių atsistatymą (Gurtner ir kt., 2007). Šiame etape pagrindiniai elementai yra ląstelės, biomedžiagos ir signalinės molekulės, kurių tarpusavio sąveikų tyrimai yra būtini kuriant funkcionalias struktūras. Audinių inžinerijoje naudojamos medžiagos privalo atitikti keletą kriterijų: atkurti barjerinę funkciją, pasižymėti adhezinėmis savybėmis, tinkamomis fizinėmis bei mechaninėmis ypatybėmis, kontroliuojamu degradacijos procesu, būti sterilios, netoksiškos, neantigeniškos, sukelti minimalias uždegimines reakcijas. Svarbu ir tai, kad jomis būtų paprasta manipuliuoti, lokalizuoti pažeidimo vietoje, integracija patologiniame židinyje sukeltų minimalų skausmą, stabdytų randėjimo procesą bei skatintų angiogenezę (Metcalfė ir Ferguson, 2007). Lentelėje 2.1 pateikiami šiuo metu komerciškai prieinami ir skirtingiems tikslams naudojami odos pakaitalai.

2.1 lentelė. Dirbtiniai odos pakaitalai (Greaves ir kt., 2013).

Produktas	Aprašymas	Panaudojimo tikslas
Epiderminiai pakaitalai		
BioSeed-S™	Autologiniai keratinocitai fibrino matricoje	Dalies odos storio nudegimai, trofinės opos
Epicel®	Autologiniai keratinocitai	Visų arba dalies odos sluoksnių nudegimai, trofinės opos, diabetinės opos
Cryoskin™	Užšaldyti alogeniniai keratinocitai su silikonine atramine medžiaga	Nudegimai, trofinės opos

Myskin™	Kultivuoti autologiniai keratinocitai su silikonine atramine medžiaga	Dalies odos sluoksnių nudegimai, trofinės opos, lėtinės žaizdos
Epidex™	Kultivuoti autologiniai plauko folikulo keratinocitai su silikonine atramine medžiaga	Dalies odos sluoksnių nudegimai, trofinės opos, lėtinės žaizdos
CellSpray™	Nekultivuotų autologinių keratinocitų suspensija	Dalies odos storio nudegimai
Celaderm	Alogeniniai keratinocitai	Trofinės opos
Suprathel	Beląstelinis laktido, trietilenarbonato ir kaprolaktono ko-polimeras	Visų arba dalies odos sluoksnių nudegimai
Derminiai pakaitalai		
Dermagraft™	Užšaldyti alogeniniai fibroblastai absorbuojamoje dermos matricoje	Visų odos sluoksnių pažeidimai, pooperacinė priežiūra
Integra®	Beląstelinė atraminė medžiaga iš kolageno ir chondroitino sulfato	Dalies ir visų odos sluoksnių pažeidimai, trofinės opos
Alloderm™	Beląstelinė alogeninė derma	Rekonstrukcinė chirurgija, nudegimai, lėtinės žaizdos
Oasis™	Beląstelinė kolageninė matrica	Įvairios kilmės opos
Matriderm™	Beląstelinė matrica iš elastino ir kolageno (I, III ir V tipų)	Dalies ir visų odos sluoksnių pažeidimai, lėtinės žaizdos
Strattice™	Kiaulės derma, iš kurios pašalintos ląstelės	Rekonstrukcinė chirurgija
TransCyte™	Polimerinė membrana, turinti alogeninių fibroblastų	Laikina dalies arba visų odos sluoksnių pažeidimų priežiūra
EZ-Derm™	Beląstelinė ksenogeninė kolageno matrica	Laikina nudegimo žaizdų priežiūra
Biobrane™	Kiaulės kolagenas, chemiškai pritvirtintas prie silikoninės membranos	Laikina dalies arba visų odos sluoksnių pažeidimų priežiūra
Repliform™	Alogeninė derma, iš kurios pašalintos ląstelės	Rekonstrukcinė chirurgija
MatriStem®	Matrica, suformuota iš kiaulės šlapimo pūslės audinio tarpląstelinės medžiagos	Dalies ir visų odos sluoksnių pažeidimai, trofinės opos
Primatrix™	Jaučio dermos kolageno matrica be ląstelių	Opos, nudegimai
Cymetra™	Alloderm™ injekuojama forma	Opos, plastinė chirurgija
Dvisluoksniai pakaitalai		
OrCel®	Dvisluoksnė kolageninė kempinė, turinti alogeninių fibroblastų ir keratinocitų	Trofinės ir diabetinės opos
Apligraf®	Kolageno gelis, turintis alogeninių fibroblastų ir keratinocitų	Trofinės opos, lėtinės žaizdos
TissueTech™	Kultivuoti autologiniai keratinocitai ir autologinė derma su hialurono rūgštimi	Lėtinės žaizdos
Theraskin	Alotransplantas su donoro fibroblastais ir keratinocitais	Diabetinės žaizdos, trofinės opos
StrataGraft®	Alogeninė derma su iš keratinocitų suformuotu daugiasluoksniu epidermiu	Kompleksiniai odos defektai

2.3.1. Medžiagos, naudojamos odos audinio inžinerijoje

Ląstelių funkcijos organizme priklauso nuo tarpląstelinės medžiagos struktūrinių ypatybių, todėl biomedžiagų pasirinkimas transplantacijai lemia, ar pažeisto audinio regeneracija bus sėkminga. Priklausomai nuo audinio ypatybių, pasirenkamos atraminės medžiagos pagal kilmę gali būti natūralios arba sintetinės (Polak ir Bishop, 2006).

Keletas sintetinių biodegraduojančių polimerų naudojami kuriant atramines medžiagas pažeisto audinio atstatymui (Chen ir kt., 2002). Teigiamų rezultatų gauta tiriant poliesterių šeimos narius poli-l-laktinę rūgštį PLLA (angl. poly-l-lactic acid), poliglikolinę rūgštį PGL (angl. polyglycolic acid) ir poli-dl-laktinę-ko-glikolinę rūgštį PLGA (angl. poly-dl-lactic-co-glycolic acid). Šių medžiagų pranašumas yra pagal tikslus pritaikomos struktūrinės ypatybės bei kontroliuojama degradacija. Tačiau didelė kliūtis, su kuria susiduriama norint sėkmingai manipuluoti šiomis medžiagomis, yra mažas jų biologinis suderinamumas, dėl kurio atsiranda didelė atmetimo reakcijų rizika. Taip pat prieštaringai vertinamas PLLA ir PGA degradacijos procesas, vykstantis hidrolizės keliu, po kurio išskiriamas anglies dioksidas, mažinantis mikroaplinkos pH ir galintis sukelti ląstelių bei audinių nekrozę (O'Brien, 2011). Polianhidridai intensyviai tiriami dėl jų biosuderinamumo bei paprastai kontroliuojamos biodegradacijos, kurios produktai yra netoksiški. Šių polimerų poodiniai implantai gyvūnų modeliuose sukelia minimalias uždegimo reakcijas bei leidžia formuotis kraujagyslių tinklui naujame audinyje. Tačiau šios klasės polimerai nepasižymi geromis mechaninėmis savybėmis, todėl jų vienu taikymas odos audinio inžinerijoje kol kas yra ribotas (Gunatillake ir Adhikari, 2003). Kiti biodegraduojantys sintetiniai polimerai, tokie kaip polikaprolaktonai, polikarbonatai ir polifumaratai, dėl savo mechaninių savybių ir ilgos biodegradacijos trukmės dažniau naudojami kaulinio audinio inžinerijoje. Odos audiniui regeneruoti šie polimerai pasirenkami rečiau ir yra naudojami deriniuose su natūraliais polimerais (Chen ir kt., 2009). Visų sintetinių polimerų panaudojimo galimybes odos audinio inžinerijoje stipriai

riboja tai, kad šios medžiagos neturi specifinių struktūrinių sekų, kurias atpažintų ląstelių paviršiuje esantys receptoriai, todėl tokiose atraminėse medžiagose sunkiai vyksta ląstelių adhezija, proliferacija bei migracija. Dėl šios priežasties, odos audinio inžinerijoje dažnesnis pasirinkimas yra natūralios kilmės polimerinės medžiagos.

Natūralios kilmės polimerai išskiriami iš audinių tarpląstelinės medžiagos, kuri organizme palaiko struktūrinį vientisumą ir suteikia pagrindą ląstelėms atlikti savo funkcijas. Pagrindiniai odos tarpląstelinės medžiagos komponentai yra struktūriniai baltymai, proteoglikanai ir kitos tirpios molekulės, formuojantys unikalios struktūros tinklą ir užtikrinantys specifines ląstelių funkcijas audinyje (Aszódi ir kt., 2006).

Kolagenas, kaip pagrindinis tarpląstelinės medžiagos komponentas, yra dažniausiai pritaikomas natūralios kilmės polimeras. Šio baltymo privalumai yra puikus biosuderinamumas, tinkama porų struktūra bei mažas imunogeniškumas. Organizme kolagenas sąveikauja su jungiamųjų audinių ląstelėmis ir tarpininkauja perduodant signalus, būtinus ląstelių tvirtinimuisi, migracijai, proliferacijai, diferenciacijai bei išgyvenimui (Chunlin ir kt., 2004). Identifikuota daugiau kaip dvidešimt kolageno tipų, tačiau pagrindinis tarpląstelinėje medžiagoje aptinkamas ir plačiausiai biomedicininiais tikslais naudojamas I tipo kolagenas (Shoulders ir Raines, 2009). Šio baltymo molekulę sudaro trys α grandinės, tarpusavyje formuojančios tvirtą trigubą spiralinę struktūrą. Kiekviena α grandinė sudaryta iš daugiau kaip tūkstančio aminorūgščių, kurios išsidėsčiusios -Gly-X-Y- sekomis. Glicinas (Gly), esantis kas trečioje aminorūgšties pozicijoje, būtinas tvirtam grandinių susipakavimui į pagrindinį struktūrinį kolageno vienetą tropokolageną. Aminorūgštys X ir Y pozicijose gali būti bet kokios, tačiau dažniausiai tai yra prolinas ir 4-hidroksiprolinas (Parenteau-Bareil ir kt., 2010). Kolageno pagrindu kuriamoms biomedžiagoms audinių inžinerijoje naudojamos dvi pagrindinės technikos. Pirmoji, kuomet iš kolageno matricos pašalinamos ląstelės, išlaikant pradinę audinio formą ir tarpląstelinės medžiagos struktūrą. Audinio ląstelių pašalinimui naudojami metodai gali būti fizikiniai, cheminiai ir fermentiniai. Fizikiniai

metodai paremti staigiu audinio atšaldymu, kuris suardo ląsteles formuojantis ledo kristalams, arba aukštu slėgiu, suplėšančiu ląsteles (Lin ir Liu, 2006). Cheminiuose metoduose naudojami specifiniai reagentai, iš tarpląstelinės medžiagos pašalinantys ląstelinius elementus. Tai gali būti rūgštinės arba šarminės medžiagos, chelantai (pvz., etilendiamintetraacto rūgštis), joniniai ir nejoniniai detergentai, didelio osmosinio slėgio tirpalai. Fermentiniais metodais, pvz., naudojant tripsiną, specifiskai suardomi ląstelių baltymai arba nukleazėmis pašalinamos ląstelių nukleorūgštys. Šių metodų trūkumas ruošiant kolagenines biomedžiagas yra tai, kad negaunama visiškai švari, suardytų ląstelių likučių neturinti, tarpląstelinė medžiaga, todėl turi būti naudojamos papildomos biomedžiagos gryninimo technikos (Song ir kt., 2006). Antroji technika, naudojama audinių inžinerijoje kolageninėms medžiagoms paruošti, yra tiesioginė kolageno ekstrakcija iš audinio, gryninimas ir polimerizacija, formuojant funkcionuojančią atraminę medžiagą. Kolageno ekstrakcija ir gryninimas iš gyvūninės ar augalinės kilmės audinio atliekami naudojant fermentus arba organines rūgštis, vėliau baltymas precipituojamas druskomis ir liofilizuojamas. Taip paruoštas kolagenas vėliau gali būti polimerizuojamas, kontroliuojant galutinio produkto mechaninį atsparumą, degradacijos greitį, citotoksiškumą bei fizinę formą (Cen ir kt., 2008).

Sudėtingesnės struktūros natūralios kilmės biomedžiagos odos audinio inžinerijai formuojamos pamatinės membranos komponentų pagrindu. Organizme pamatinė membrana yra daugiakomponentė struktūra, skirianti epidermio ir dermos sluoksnius bei užtikrinanti odos audinio vientisumą ir jame esančių ląstelių funkcijas. Pagrindiniai komponentai pamatinėje membranoje yra baltymai (lamininas, IV tipo kolagenas ir entaktinas) bei angliavandenis perlekanas. Audinių inžinerijoje kiekvienas komponentas, kaip atskiras vienetas, turi savų privalumų ir gali būti panaudojamas skirtingiems tikslams (Segal ir kt., 2008). Lamininai yra trimerai, sudaryti iš α -, β -, ir γ -grandinių, kurios formuoja skirtingų tipų izomerus. Be pagrindinės struktūros formavimo ir palaikymo funkcijos, lamininai taip pat veikia kai kurias ląstelių funkcijas, svarbiausios iš jų yra adhezija, proliferacija ir migracija. Dėl šių ypatumų, lamininai puikus

pasirinkimas modifikuojant tokių savybių neturinčias biomedžiagas. Tokius paviršius padengus šiomis baltyminėmis medžiagomis, skatinama ląstelių adhezija, migracija ir reikiama diferenciacija, todėl implantai teigiamai veikia audinio gijimo reakcijas (Colognato ir Yurchenko, 2000). Kartu su lamininiais, odos pamatinės membranos struktūrą palaiko IV tipo kolagenas. Išskirtinė šio baltymo savybė yra ta, kad jo struktūrai nebūdinga Gly aminorūgštis kas trečioje grandinės pozicijoje. Todėl IV tipo kolagenas neformuoja tvirtos spiralinės struktūros ir yra lankstesnis nei I tipo kolagenas. Unikali IV tipo kolageno struktūra formuoja tinklą, reikalingą kitų pamatinės membranos komponentų įsitvirtinimui ir turi didelę įtaką jų biologinėms funkcijoms. Ląstelės šį baltymą atpažįsta paviršiaus receptoriais, priklausančiais integrinų šeimai. Dėl teigiamų sąveikų tiek su ląstelėmis, tiek su kitomis biomedžiagomis, IV tipo kolagenas yra tinkamas pasirinkimas pažeisto audinio regeneracijos skatinimui (Miranda Coelho ir kt., 2010). Pamatinės membranos komponentų pagrindu suformuotos biomedžiagos dažniau naudojamos *in vitro* tyrimuose, siekiant pagerinti ląstelių adhezinės savybes, skatinant proliferaciją ir migraciją, tačiau neginčijamai svarbi šios struktūros funkcija *in vivo* lemia intensyvius tyrimus, kurie reikalingi ląstelių integracijai biomedžiagose prieš transplantaciją.

Naudojant skirtingus apdorojimo metodus, gali būti gaunamos įvairios biomedžiagų, tinkamų odos audinio inžinerijai, fizinės formos. Po skirtingų modifikacijų, polimerams gali būti suteikiama porėtos kempinės, plonasluoksnės plėvelės, skaidulinė, tinklinė, gelinė formos. Tinkamas biomedžiagos būvio pasirinkimas lemia, ar po transplantacijos sėkmingai vyks pažeisto audinio regeneracija (Vacanti, 2006). Pastarąjį dešimtmetį ypač didelis dėmesys skiriamas hidrogelinei atraminių medžiagų formai. Hidrogelis formuojasi polimero grandinėms jungiantis į tridimensinius tinklus, kurie sudaro netirpias hidrofilines struktūras. Tokio pavidalo polimerai dėl susisiekančių porų sugeba absorbuoti didelius kiekius vandens bei biologinių skysčių, tačiau brinkimo metu nepažeidžiama jų struktūra, todėl hidrogeliai yra artimi organizmo jungiamųjų audinių tarpląstelinei medžiagai. Didelis skysčių kiekis hidrogeliuose ne tik suteikia drėgmės mikroaplinkai, kuri yra svarbi tiek

fiziologiniuose, tiek patologiiniuose procesuose (pvz., gyjant žaizdoms), bet ir kontroliuoja mitybinių medžiagų pernašą bei metabolitų pašalinimą (Geckil ir kt., 2010). Dėl savo fizinės formos, šios medžiagos gali būti išvirkščiamos į organizmą, todėl jų transplantacija atliekama minimaliai invaziniu keliu. Hidrogeliai pasižymi puikiomis biosuderinamumo savybėmis, kontroliuojama biodegradacija, kurios produktai nėra toksiški ir pašalinami natūraliais metaboliniais keliais. Tokios formos biomedžiagoms formuoti yra tinkami daugelis natūralios kilmės komponentų, tarp jų kolagenas ir pamatinės membranos struktūriniai vienetai (Tan ir Marra, 2010).

Odos audinio inžinerijos tikslas yra atkurti funkcionuojančią odą, turinčią visas natyviame audiniui reikalingas pagalbines struktūras, atskirus diferencijuotus sluoksnius bei integruotą kraujagyslių bei nervų tinklą. Iki šiol dauguma ne tik eksperimentiniuose darbuose, bet ir klinikinėje praktikoje naudojamų biomedžiagų atlieka pirminio barjero, apsaugančio nuo infekcijų bei dehidratacijos, funkciją, tačiau neskatina regeneracijos, todėl gijimas baigiasi randinio audinio susiformavimu. Sprendžiant šią problemą, į biomedžiagų tyrimus įjungiamos ir ląstelės, kurios galėtų užtikrinti sėkmingą funkcionalaus audinio formavimąsi po pažeidimo.

2.3.2. Odos audinio regeneracijoje naudojamos ląstelės

Vystant audinių inžinerijos strategijas regeneracijos skatinimui, svarbus etapas yra ląstelių šaltinio identifikavimas. Pasirinktas ląstelių tipas privalo pasižymėti tokiais funkcionavimo mechanizmais, kurie užtikrintų visišką pažeisto audinio regeneraciją. Odos audinio inžinerijoje, priklausomai nuo tikslo, gali būti naudojamos pirminės diferencijuotos ląstelės (keratinocitai, fibroblastai, melanocitai ir kt.), mažo diferenciacijos laipsnio ląstelės pirmtakės ir kamieninės ląstelės (Bi ir Jin, 2013).

Pirmosios ląstelės, panaudotos odos audinio pažeidimams gydyti, buvo keratinocitai. Šios ląstelės fiziologinėmis sąlygomis formuoja viršutinį odos sluoksnį, kurio pagrindinė funkcija yra apsauginio barjero tarp organizmo

ir išorinės aplinkos palaikymas. Parinkus tinkamas sąlygas *in vitro*, keratinocitai formuoja keletą ląstelių storio sluoksnius, kurie transplantuojami *in vivo* ir formuoja paviršinį odos sluoksnį, apsaugantį nuo neigiamo išorinės aplinkos poveikio (MacNeil, 2008). Keratinocitų panaudojimas esant visų odos sluoksnių pažeidimams yra ribotas, nes šios ląstelės neformuoja dermos struktūrinių vienetų bei neužtikrina jungiamojo sluoksnio tarp dermos ir epidermio atsinaujinimo. Šiam tikslui naudojami fibroblastai. Tai mezenchiminės kilmės ląstelės, kurios taip pat kaip ir keratinocitai gali būti kultivuojami *in vitro*. Jų funkcijos *in vivo* yra įvairių augimo veiksnių ir citokinų sekrecija, reikalinga tarpląstelinės medžiagos formavimuisi, epidermio ląstelių proliferacijai bei diferenciacijai (Wong ir kt., 2007). Kuriant dirbtinį audinį keratinocitai ir fibroblastai kultivuojami ne kaip atskiri sluoksniai, skirti transplantacijai, bet tokiems tyrimams derinami abu ląstelių tipai. Diferencijuotų ląstelių panaudojimas pažeisto audinio atstatymui susiduria su keletu problemų. Dėl ribotų keratinocitų ir fibroblastų proliferacinių savybių, transplantų paruošimas trunka kelias savaites, todėl jų panaudojimas ūmiems visų odos sluoksnių pažeidimams gydyti dažnai netinkamas. Taip pat dažna problema yra *in vitro* sąlygomis suformuotų transplantų mechaninis nestabilumas, dėl kurio neužtikrinamas tinkamas ląstelių lokalizavimas, integracija ir funkcijos pažeidimo židinyje. Norint išvengti imuninio atmetimo reakcijų rizikos, tinkamiausia transplantacija yra autologinė. Tačiau esant didelio paviršiaus ploto pažeidimams, paties paciento audinių donorinių ląstelių gavimui nepakanka. Naudojant diferencijuotas ląsteles atkuriamas tik maža dalis sveiko audinio pirminių funkcijų, nes naujame audinyje nesiformuoja papildomos odos struktūros, tokios kaip plauko folikulai, riebalų bei prakaito liaukos (Sriwiriyanont ir kt., 2012). Ieškant problemų sprendimo būdų, intensyvūs tyrimai atliekami su kamieninėmis ląstelėmis. Dėl didelio proliferacinio aktyvumo, nenutrūkstamo atsinaujinimo bei plastiškumo, šios ląstelės galėtų būti naudojamos atkuriant ne tik struktūrines, bet ir funkcines pažeisto odos audinio savybes (Hodgkinson ir kt., 2009).

Žinomos suaugusio organizmo kamieninių ląstelių savybės formuoti ne tik to audinio, kuriame yra, bet ir kitų tipų audinių ląsteles, suteikia joms pranašumą renkantis ląstelių šaltinių audinių regeneracijai *in vivo* (Muscari ir kt., 2013). Kaulų čiulpai yra ypač patrauklus ląstelių šaltinis audinių inžinerijos metodams vystyti, kadangi tai vienintelis organas, kuriame aptinkamos ne tik dviejų tipų kamieninės ląstelės, bet ir ląstelės pirmtakės, pasižyminčios panašiomis proliferacinėmis savybėmis bei dalyvaujančios pažeisto audinio gijimo metu vykstančiose reakcijose (Blanco ir Robey, 2001).

Taikant chimerinių pelių modelius, parodyta endogeninių kaulų čiulpų ląstelių įtaką pažeisto odos audinio regeneracijai. Fathke su grupe nustatė, kad gyjančio odos audinio dermoje reikšmingas kiekis fibroblastinių ląstelių yra kilusios iš kaulų čiulpuose esančių hemopoetinių ląstelių pirmtakių. Šie autoriai taip pat nustatė, kad kaulų čiulpų ELP aptinkamos ankstyvosiose gijimo stadijose, tačiau pasibaigus reepitelizacijos procesui bei vykstant remodeliacijos stadijai, atsinaujinančiame audinyje jų nebelieka. Atvirkščiai nei ELP, kaulų čiulpų hemopoetinės ir mezenchiminės ląstelių populiacijos pasižymėjo ilgalaikiu išlikimu gyjančioje dermoje bei savybe produkuoti I ir III tipų kolageno molekules, svarbias naujos tarpląstelinės medžiagos struktūros atsinaujinimui (Fathke ir kt., 2004). Kiti autoriai nustatė endogeninių kaulų čiulpų ląstelių vaidmenį odos audinio regeneracijoje, priklausantį nuo pažeidimo tipo. Panašiai kaip ir ankstesniuose tyrimuose, Rae su grupe ūminėse žaizdose nustatė kaulų čiulpų ląstelių diferenciaciją į uždegimines ląsteles ankstyvosiose gijimo stadijose ir į fibroblastus vėlyvosiose, bet neaptiko endotelinių pirmtakų ilgalaikio stebėjimo metu. Tačiau sutrikusio gijimo žaizdose šie autoriai, be diferenciacijos į uždegimines bei fibroblastines ląsteles, ilgalaikiuose stebėjimuose nustatė kaulų čiulpų kilmės endotelinių ląstelių atsiradimą gyjančiame audinyje vystantis remodeliacijos stadijai (Rea ir kt., 2009).

Egzogeninių kaulų čiulpų populiacijų panaudojimo odos regeneracijai tyrimuose iki šiol gaunama prieštaringų rezultatų. Ląstelių terapijos vystyme svarbų vaidmenį atlieka MKL. Šios ląstelės gali migruoti į pažeidimo židinį, stimuliuoti skirtingų gijime dalyvaujančių ląstelių pirmtakių proliferaciją ir

diferenciaciją, išskirti augimo veiksnius, dalyvauti gyjančio audinio remodeliacijoje, veikti imuninio atsako reakcijas (McArdle ir kt., 2013). Keletas tyrimų, kuriuose MKL buvo transplantuojamos skirtingais metodais, parodė spartesnę pažeisto odos audinio atsistatymą ūminiuose bei sutrikusio gijimo žaizdų modeliuose *in vivo*. Wu su grupe atliko tyrimus, kuriuose, panaudoję visų odos sluoksnių pažeidimo modelį sveikose ir diabetu sergančiose pelėse, palygino kaulų čiulpų MKL ir dermos fibroblastų įtaką audinio regeneracijai. Šių autoriai nustatė, kad kamieninės ląstelės reikšmingai skatina tiek ūminių, tiek lėtinių žaizdų ploto sumažėjimą lyginant su diferencijuotomis ląstelėmis. Tyrimas parodė, kad transplantuotos MKL įgyja epitelinių ląstelių fenotipą bei tiesioginės diferenciacijos būdu dalyvauja plauko folikulo, prakaito ir riebalų liaukų struktūrų formavime, tačiau angionezės procesą skatina parakrininiu keliu, išskirdamos tokius veiksnius kaip VEGF ar ANG1, bet ne diferenciacijos į kraujagyslių endotelio ląsteles būdu (Wu ir kt., 2007). Priešingus rezultatus paskelbė Sasaki su grupe, kurie tyrė kaulų čiulpų MKL transdiferenciaciją pažeisto odos audinio atsistatymo metu. Šių autorių eksperimentuose pelių modeliuose *in vivo* patvirtinta transplantuotų ląstelių diferenciacija ne tik į keratinocitų fenotipu pasižyminčias ląsteles, bet ir reikšmingas kraujagyslių endotelio ląstelių padidėjimas. Šioje populiacijoje iki 13% kraujagysles formuojančių ląstelių buvo kilusios iš transplantuotų MKL (Sasaki ir kt., 2008). Literatūroje yra duomenų apie kaulų čiulpų MKL savybes skirtinguose odos žaizdų gijimo etapuose atlikti specifinį vaidmenį. Skirtingi tyrėjai *in vivo* modeliuose parodė šių ląstelių gebėjimą pažeidimo židinyje slopinti uždegiminių ląstelių infiltraciją bei skatinti granulino audinio formavimąsi (Shumakov ir kt., 2003), teigiamai veikti reepitelizacijos procesą (Nakagawa ir kt., 2005), nulemti pažeisto audinio atsistatymą be rando formavimosi (Mansilla ir kt., 2005), skatinti plaukų folikulų atsinaujinimą bei padėti formotis funkcionuojančiam audiniui (Deng ir kt., 2005). Kaulų čiulpų MKL vaidmuo odos žaizdų gijime taip pat parodytas keletyje klinikinių tyrimų. Badiavas ir Falanga atliko mažos apimties klinikinį tyrimą, kuriame trims pacientams, turintiems lėtines, ilgiau kaip metus negyjančias ir į jokių gydymo metodus

nereaguojančias žaizdas, buvo lokaliai transplantuojamos kaulų čiulpų MKL. Šiame tyrime nustatyta, kad transplantuotos MKL lemia žaizdos ploto sumažėjimą, skatina skirtinga morfologija pasižyminčių primityvių ląstelių infiltraciją pažeidimo židinyje, naujų kraujagyslių atsiradimą bei sumažėjusį randėjimą (Badiavas ir Falanga, 2003). Sunkių nudegimų ir diabeto nulemtų lėtinių žaizdų ploto sumažėjimas bei aktyvi angiogenezė pažeidimo židinyje buvo nustatyti ir vėlesniuose klinikiniuose tyrimuose, kuriuose kaulų čiulpų MKL buvo injekuojamos tiesiogiai į žaizdas (Rasulov ir kt., 2005; Lu ir kt., 2011), lokaliai transplantuojamos kartu su fibrinu (Falanga ir kt., 2007; Ravari ir kt., 2011) arba biodegraduojančia kolageno matrica (Vojtassák ir kt., 2006; Yoshikawa ir kt., 2008).

Nors kaulų čiulpuose esančių nediferencijuotų ląstelių efektyvumas, parodytas naudojant gyvūnų modelius ir klinikiniuose tyrimuose, yra daug žadantis, iki šiol šios ląstelės nenaudojamos kasdienėje praktikoje dėl keleto priežasčių. Sėkmingam pažeidimų atstatymui reikalingas pakankamas terapiškai aktyvių ląstelių kiekis. MKL padauginimas *in vitro* sąlygomis yra nesudėtingas, kai susiduriama su mažo ploto žaizdomis. Esant didelio paviršiaus ploto pažeidimams, reikiamo ląstelių kiekio gavimas tampa problema, kadangi tokio tipo žaizdos sėkmingai gyja tik po kelių pakartotinių transplantacijų (Vojtassák ir kt., 2006; Falanga ir kt., 2007). Sėkmingam pritaikymui klinikinėje praktikoje, kamieninių ląstelių šaltinis, iš kurio išskirtos ląstelės nereikalauja sudėtingų frakcionavimo etapų ir padauginimo kultūroje, yra patrauklesnis bei pranašesnis tinkamos populiacijos gavimui laiko sąnaudų atžvilgiu bei dėl galimybės išvengti užkrėtimo manipuliacijų metu (Charruyer ir Ghadially, 2009; Lu ir kt., 2009). Heterogeniška kaulų čiulpų Lin⁻ ląstelių populiacija be primityviausių MKL ir HKL taip pat turi mažo diferenciacijos laipsnio ląstelių pirmtakių, pasižyminčių terapinėmis savybėmis. Šioje populiacijoje esančios ląstelės, sąveikaudamos tarpusavyje bei su mikroaplinkoje esančiomis molekulėmis, atlieka svarbų vaidmenį audinio regeneracijoje (Jopling ir kt., 2011; Huang ir Burd, 2012). Teigiami rezultatai kaulų čiulpų MKL ir HKL kotransplantacijos tyrimuose parodyti hematologinių sutrikimų *in vivo* modeliuose. Nustatyta, kad

šių ląstelių populiacijų sąveikos stimuliuoja proliferaciją, padidina išlikimo tikimybę po transplantacijos ir ilgalaikį aktyvumą recipiento organizme (Angelopoulou ir kt., 2003; Li ir Wu, 2011). Skirtingų ląstelių populiacijų sąveikų privalumai patrauklūs ir pažeisto odos audinio regeneracijos skatinime, tačiau literatūroje trūksta duomenų apie heterogeniškos kaulų čiulpų populiacijos įtaką pažeidimų atstatymui *in vivo*. Tikintis sėkmingo rezultato, papildomi tyrimai reikalingi pasirenkant medžiagas ląstelių transplantacijai. Tinkamos tarpląstelinės medžiagos molekulės ne tik padėtų ląstelėms įsitvirtinti bei išgyventi pažeidimo židinyje, bet ir užtikrintų ilgalaikį regeneracinių funkcijų palaikymą (Wu ir kt., 2010).

Regeneracinės medicinos tikslas yra į vieningą visumą sujungti ląstelių ir tarpląstelinės medžiagos komponentų veikimo principus, kad būtų užtikrintas audinio struktūros bei funkcijų atstatymas. Šiame darbe atlikti palyginamieji kaulų čiulpų Lin⁻ ląstelių regeneracinių savybių tyrimai *in vitro* ir *in vivo* prisideda prie literatūroje keliamų klausimų sprendimo bei gali būti naudingi vystant ląstelių terapijos panaudojimo odos pažeidimų regeneracijai metodus.

3. METODAI

3.1. Laboratoriniai gyvūnai

Bandymai su gyvūnais buvo atlikti Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centre. Leidimas darbui su laboratoriniais gyvūnais buvo gautas iš Laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos komisijos (Nr. 0208, 2011 m.). Eksperimentams buvo naudojamos BALB/c linijos, 8-10 savaičių amžiaus pelės. Gyvūnai buvo laikomi specialiuose narvuose, pastovioje temperatūroje ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), santykinė drėgmė 55%. Pelės buvo maitinamos įprastu pašaru ir girdomos vandeniu *ad libitum*.

3.2. Pelių kaulų čiulpų ląstelių išskyrimas

Pelių kaulų čiulpų ląstelės buvo išskiriamos pagal Juopperi ir kt. (2007), taikant modifikacijas. Pelei atliekama cervikalinė dislokacija. Ji dezinfekuojama 70% etanolio tirpalu. Steriliais įrankiais preparuojami šlaunikauliai ir blauzdikauliai. Jie dedami į sterilią Petri lėkštelę ir plaunami 3 kartus 5 ml fosfatinio buferinio tirpalo PBS (angl. phosphate buffered saline), kurio pH 7.2. Kaulų galai nukerpami ir ląstelės išskiriamos perfuzijos būdu. Ląstelių suspensija skiedžiama iki 10 ml ir centrifuguojama 10 min. $300 \times g$ greičiu. Supernatantas nupilamas. Nuosėdos plaunamos 3 kartus 5 ml minėto buferio, centrifuguojant po 5 min. $300 \times g$ greičiu. Po plovimo nuosėdos suspenduojamos 2 ml to paties buferio. Skaičiuojama ląstelių koncentracija, naudojant hemocitometrą su Neubauerio tinkleliu.

3.3. Lin^{-} populiacijos ląstelių atskyrimas

Pelių kaulų čiulpų ląstelės buvo gryninamos naudojant „BD™ Imag Cell Separation System“ (BD Biosciences, JAV) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas. Lin^{-} ląstelės buvo atskirtos neigiamos selekcijos būdu,

panaudojant magnetinį ląstelių atskyrimo MACS (angl. magnetic-activated cell sorting) metodą. Diferencijuotų ląstelių pašalinimui buvo naudojamos magnetinės nanodalelės, padengtos antikūnais prieš limfoidinės (CD3ε, CD11b, CD45R/B220), mieloidinės (Ly-6G ir Ly-6C/Gr1) ir eritroidinės (TER199) linijų ląstelių paviršiaus žymenis.

Paruošiami sterilūs buferiniai tirpalai: 1) PBS, turintis 3% veršelių serumo FBS (angl. fetal bovine serum, Biological Industries, Izraelis); 2) 1X BD IMag™ buferinis tirpalas. Paruošti tirpalai laikomi ant ledo.

Paruošiama kaulų čiulpų ląstelių suspensija, kurios koncentracija 2×10^7 ląst./ml. Pridedama $0.25 \mu\text{g}/10^6$ ląst. Mouse BD Fc Block™ antikūnų prieš pelių CD16/CD32 paviršiaus molekules. Inkubuojama ant ledo 15 min. Po inkubacijos pridedama $5 \mu\text{l}/10^6$ ląst. biotinilintų antikūnų prieš pelių kaulų čiulpų ląstelių linijinius žymenis. Inkubuojama 15 min. ant ledo. Po inkubacijos pažymėtų ląstelių suspensija skiedžiama 10 kartų šaltu 1X BD IMag™ buferiniu tirpalu. Centrifuguojama 7 min. $300 \times g$ greičiu. Supernatantas pašalinamas. Pridedama $5 \mu\text{l}/10^6$ ląst. streptavidinu žymėtų magnetinių dalelių. Atsargiai sumaišoma. Inkubuojama 30 min. 6°C temperatūroje. Po to ląstelės suspenduojamos buferiniame tirpale (koncentracija 8×10^7 ląst./ml). Ląstelių suspensija perkeliama į mėgintuvėlį ir patalpinama BD IMagnet™ prietaise. Inkubuojama 8 min. Po inkubacijos mėgintuvėlio neišimant iš magneto nusiurbiamas supernatantas su neigiama frakcija ir perkeliamas į sterilų mėgintuvėlį. Teigiama frakcija suspenduojama buferiniame tirpale ir inkubuojama dar 8 min. BD IMagnet™ prietaise. Po inkubacijos supernatantas perkeliamas į mėgintuvėlį su neigiama frakcija. Mėgintuvėlis patalpinamas BD IMagnet™ prietaise papildomoms 8 min. Po inkubacijos supernatantas, kuriame yra Lin^- ląstelės, perkeliamas į sterilų mėgintuvėlį.

3.4. Lin^- ląstelių fenotipinė analizė

Paruošiama MACS metodu išgrynintų Lin^- ląstelių suspensija, kurios koncentracija 5×10^5 ląst./ml. Ląstelių identifikavimui naudojami antikūnai prieš

peliių paviršiaus molekules, žymėti fikoeritrinu (PE), fluoresceino izotiocianatu (FITC) arba alofikocianinu (APC). Trijų spalvų tĕkmĕs citometrinei analizei į vieną mėginį pridedamas reikiamas kiekis anti-CD29-APC (Miltenyi Biotec, JAV), anti-Sca-1-FITC (Molecular Probes, JAV) ir anti-CD34-PE (Molecular Probes, JAV) antikūnų, į kitą mėginį – anti-CD117-APC (Molecular Probes, JAV), anti-CD133-FITC (Santa Cruz Biotechnology, JAV) ir anti-CD90.1-PE (BD Pharmingen, JAV) antikūnų. Izotipinei kontrolei naudojami žiurkių IgG2b-APC (BioLegend, JAV), IgG2a-FITC (BD Pharmingen, JAV), IgG2a-PE (Chemicon, JAV), ožkos IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, JAV) ir žiurkĕno IgG-APC (BioLegend, JAV) antikūnai. Ląstelių suspensija su antikūnais inkubuojama tamsoje 30 min. 4°C temperatūroje. Po inkubacijos suspensija centrifuguojama 7 min. 300 × g greičiu. Supernatantas pašalinamas ir nuosĕdos plaunamos du kartus centrifuguojant po 5 min. 300 × g greičiu PBS tirpale. Po paskutinio plovimo ląstelĕs suspenduojamos 500 μl PBS tirpalo ir analizuojamos tĕkmĕs citometru FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, JAV).

3.5. Lin⁻ ląstelių proliferacijos vertinimas *in vitro*

Ląstelių proliferacija *in vitro* buvo vertinama naudojant „Cell Counting Kit-8“ (Dojindo Laboratories, Japonija) rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas.

Skirtingoms mikroaplinkoms formuoti *in vitro* sąlygomis naudojami I tipo kolagenas (Gibco, JAV) arba pamatinĕs membranos komponentų gelis Geltrex™ (Gibco, JAV). Tyrimai atliekami 96 šulinĕlių plokštelĕje. Kiekvienas šulinĕlis padengiamas 35 μl kolageno, kurio koncentracija 1 mg/ml, arba Geltrex, kurio koncentracija 15 mg/ml. Inkubuojama vieną valandą 37°C temperatūroje. Lin⁻ ląstelių suspensija paruošiama DMEM terpĕje (Biochrom, Vokietija), turinčioje 10% FBS, 1% penicilino/streptomicino mišinio (Lonza, Belgija) ir 2% kolageno arba Geltrex. Ląstelĕs išsĕjamos po 5000 ląst./šulinĕliui 100 μl terpĕs į atitinkama medžiaga padengtas plokšteles ir laikomos

inkubatoriuje, kurio atmosferoje yra 5% CO₂, esant 37°C temperatūrai. Kontrolei ląstelės kultivuojamos šulinėliuose auginimo terpėje be kolageno ar Geltrex. Po 24, 48, 72 ir 96 valandų į šulinėlius pridedama po 15 µl rinkinyje esančio reagento WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolis], mononatrio druska] ir inkubuojama 4 valandas. Ląstelių dehidrogenazės tetrazolio druską redukuoja iki tirpaus, spalvą turinčio formazano, kurio kiekis proporcingas gyvų ląstelių skaičiui. Po inkubacijos matuojamas optinis tankis 450 nm bangos ilgio srityje naudojant mikroplokštelių skaitytuvą Sunrise (Tecan, Austrija).

3.6. Lin⁻ ląstelių migracijos vertinimas *in vitro*

Ląstelių migracijos tyrimas *in vitro* buvo atliekamas pagal Liang ir kt., (2007), taikant modifikacijas. Prieš ląstelių kultivavimą, 24 šulinėlių plokštelės padengiamos 50 µg/ml koncentracijos kolageno arba 0.5 mg/ml koncentracijos Geltrex tirpalais ir inkubuojamos 60 min 37°C temperatūroje. Auginimo terpėje paruošiama Lin⁻ ląstelių suspensija, kurios koncentracija 1×10⁶ ląst./ml, perkeliama į padengtas plokšteles ir laikoma inkubatoriuje su 5% CO₂ 37°C temperatūroje. Susiformavusiame monosluoksnyje automatinės pipetės antgaliu brėžiama tiesi linija. Pažeistas monosluoksnis plaunamas 1 ml sterilaus PBS tirpalo ir pridedama šviežios auginimo terpės. Pažeisto monosluoksniu pasidengimas migruojančiomis ląstelėmis vertinamas pasirinktais laiko momentais fotografuojant ląstelių kultūras ir matuojant ląstelėmis nepasidengusį paviršių keliuose skirtinguose regėjimo laukuose. Pažeidimo dydis vertinamas pagal formulę $((D_0 - D_n)/D_0) \times 100\%$. D₀ – pradinis pažeidimo dydis (µm); D_n – pažeidimo dydis pasirinktu laiko momentu (µm).

3.7. Lin⁻ ląstelių žymėjimas fluorescuojančiu PKH26 dažu

Išgrynintos ląstelės buvo dažomos naudojant fluorescuojantį dažą PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich, JAV), pagal gamintojo rekomendacijas.

Paruošiama ląstelių suspensija, kurios koncentracija 2×10^7 ląst./ml. Centrifuguojama 5 min. $300 \times g$ greičiu. Supernatantas pašalinamas taip, kad ant nuosėdų neliktų skysčio. Nuosėdos suspenduojamos 1 ml rinkinyje esančio Diluent C. Prieš pat dažymą paruošiamas dažas į 1 ml Diluent C pridedant 4 μ l PKH26 dažo. Ląstelių suspensija nedelsiant sumaišoma su paruoštu dažu. Inkubuojama 5 min. nuolat pamaišant. Po inkubacijos reakcija stabdoma pridedant 2 ml FBS. Inkubuojama 1 min. Suspensija centrifuguojama 10 min. $400 \times g$ greičiu. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos suspenduojamos 10 ml PBS ir perkeliamos į švarų mėgintuvėlį. Centrifuguojama 5 min. $300 \times g$ greičiu. Paruoštos ląstelės suspenduojamos reikiamoje terpėje tolesniems darbams.

3.8. Visų odos sluoksnių pažeidimo modelis *in vivo*

Visų odos sluoksnių pažeidimas buvo sukeliamas pagal Wong ir kt., (2011), taikant modifikacijas. Nuo pelės nugaros paviršiaus pašalinami plaukai ir oda dezinfekuojama 70% etanolio tirpalu. Nuskausminimui naudojamas 0.5% bupivacaini hydrochloricum tirpalas (Polfa Warszawa S.A.), prieš operaciją į poodį injekuojant 15 μ l/pelei. Žaizdos kraštui apibrėžti naudojama 6 mm skersmens sterili biopsijos adata. Oda iškerpama chirurginėmis žirkklėmis, apimant ir raumenį *panniculus carnosus*. Žaizda plaunama steriliu fiziologiniu tirpalu ir paliekama nesutvarstyta.

3.9. Lin⁻ ląstelių transplantacija *in vivo*

In vivo eksperimentuose pelės suskirstomos į 3 tiriamąsias grupes po 8 individus. Kiekvienai pelei į žaizdą injekuojama 1×10^6 fluorescuojančiu dažu PKH26 pažymėtų Lin⁻ ląstelių, esančių 100 μ l reikiamo tirpalo. Pirmajai tiriamajai grupei transplantuojamos ląstelės, suspenduotos PBS tirpale, antrajai – kolageno gelyje (koncentracija 1.5 mg/ml), trečiajai – Geltrex gelyje (koncentracija 10 mg/ml). Kontrolinėms grupėms injekuojama tiek pat atitinkamo tirpalo arba gelio be ląstelių. Pasirinktais laiko momentais pelei atliekama cervikalinė dislokacija ir imama pažeisto audinio biopsija, apimant 2 mm aplink esančio sveiko audinio. Biopsijos šaldomiesiems pjūviams panardinamos šaltame PBS tirpale, nusauginamos ir nedelsiant užšaldomos. Iki pjaustymo kriotomu, užšaldyti mėginiai laikomi -76°C temperatūroje. Histocheminiams dažymams hematoksilinu/eozinu bei Masson trichromo metodu, biopsijos fiksuojamos 10% formalino tirpale. Preparatai paruošti VšĮ Valstybiniame patologijos centre.

3.10. Gyjančio odos audinio analizė

Makroskopinei analizei, žaizdos fotografuojamos ir kiekvieną dieną po sukėlimo matuojamas jų skersmuo. Žaizdos dydis apskaičiuojamas pagal formulę $(D_n/D_0) \times 100\%$. D_n – žaizdos skersmuo pasirinktu laiko momentu (mm); D_0 – žaizdos skersmuo pirmąją eksperimento dieną (mm).

Fluorescencinės mikroskopijos analizei kriotomu atpjauti 5 μ m storio pjūviai dažomi 1 μ g/ml koncentracijos DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) dažu (Molecular Probes, JAV). Preparatai analizuojami Nikon Eclipse TE-2000-U mikroskopu su fluorescensiniu priedu (Nikon Corporation, Japonija).

Šviesinės mikroskopijos analizei 5 μ m storio parafininiai pjūviai dažomi hematoksilinu/eozinu (H&E) arba Masson trichromo metodu. Preparatai analizuojami šviesiniu mikroskopu Nikon Eclipse 50i (Nikon Corporation, Japonija). Histologiniuose pavyzdžiuose buvo vertinama ląstelių infiltracija

pažeistame audinyje, reepitelizacijos laipsnis, granulinio audinio formavimasis, tarpląstelinės medžiagos kolageno atsistatymas.

3.11. RNR išskyrimas

Ribonukleino rūgštis (RNR) buvo išskiriama iš skirtingais žaizdos gijimo laiko momentais paimtų odos biopsijų. Vienai reakcijai buvo naudojama 25 mg audinio. Audinys lizuojamas 200 μ l lizės tirpalo (Roche Molecular Systems, JAV). Į mėgintuvėlį su 150 μ l lizato pridedama 40 μ l proteazių ir 80 μ l magnetinių dalelių (MGP) (abu iš Roche Molecular Systems, JAV). Mėgintuvėlis uždengiamas ir gerai sumaišoma. Inkubuojama 10 min. 56°C temperatūroje. Po inkubacijos pavyzdys atvėsinaamas ir centrifuguojamas 30 s 16150 \times g greičiu. Supernatantas pašalinamas naudojant magnetą. Ant nuosėdų pridedama 500 μ l plovimo buferinio tirpalo AW1 (Qiagen, Vokietija). Gerai sumaišoma ir centrifuguojama 30 s 16150 \times g greičiu. Supernatantas pašalinamas naudojant magnetą. Ant nuosėdų pridedama 500 μ l plovimo buferinio tirpalo AW2 (Qiagen, Vokietija). Gerai sumaišoma ir centrifuguojama 30 s 16150 \times g greičiu. Supernatantas pašalinamas naudojant magnetą. Nuosėdos džiovinamos 30 min. kambario temperatūroje. Pridedama 30 μ l eliacijos tirpalo, kurį sudaro 23.75 μ l H₂O, 3 μ l 10 \times eliacijos tirpalo, 3 μ l DNazės I ir 0.25 μ l RNAzių inhibitoriaus (visi reagentai iš UAB „Fermentas“, Lietuva). Gerai šumaišoma ir mišinys perkeliamas į naują sterilų mėgintuvėlį. Inkubuojama 30 min. 37°C temperatūroje. Pridedama 3 μ l 50 mM EDTA tirpalo (Carl Roth GmbH, Vokietija). Gerai sumaišoma ir inkubuojama 12 min. 65°C temperatūroje. Po inkubacijos pavyzdys atvėsinaamas. Pridedama 67 μ l TE buferinio tirpalo (Carl Roth GmbH, Vokietija) ir 100 μ l 4 M LiCl tirpalo. Gerai sumaišoma ir inkubuojama 20 min. -20°C temperatūroje. Po inkubacijos centrifuguojama 20 min. 2°C temperatūroje 16150 \times g greičiu. 100 μ l supernatanto pašalinama naudojant magnetą. Pridedama 100 μ l 2 M LiCl tirpalo. Gerai sumaišoma ir centrifuguojama 5 min. 2°C temperatūroje 16150 \times g greičiu. 100 μ l supernatanto pašalinama naudojant magnetą. Pridedama 200 μ l

ledo šaltumo 70% etanolio. Gerai sumaišoma ir centrifuguojama 5 min. 2°C temperatūroje 16150 × g greičiu. Supernatantas pašalinamas naudojant magnetą ir dar kartą centrifuguojama 30 s 16150 × g greičiu. Supernatantas pašalinamas ir nuosėdos džiovinamos 30 min. kambario temperatūroje. Pridedama 20 µl H₂O ir inkubuojama 2 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos gerai sumaišoma ir eliuatas perkeliamas į naują sterilų mėgintuvėlį naudojant magnetą.

3.12. Atvirkštinės transkripcijos reakcija

Atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcija buvo atliekama naudojant „High Capacity cDNA Reverse Transcription kit with RNase Inhibitor“ (Applied Biosystems, JAV) rinkinį, vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

Paruošiamas 2X AT reakcijos mišinys (viena reakcija atliekama 20 µl tūryje): mėgintuvėlyje sumaišoma 2 µl 10X AT buferinio tirpalo, 0.8 µl 25X dNTP mišinio, 2 µl 10X atsitiktinių pradmenų, 1 µl atvirkštinės transkriptazės, 1 µl RNAzių inhibitoriaus ir 3.2 µl dH₂O. Sumaišoma 10 µl 2X AT mišinio ir 10 µl išskirtos RNR pavyzdžio. Mėgintuvėlis patalpinamas termocikleryje FlexCycler (Analytic Jena AG, Vokietija) ir paleidžiama AT reakcijos programa (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. AT reakcijos programos parametrai.

	1 etapas	2 etapas	3 etapas	4 etapas
Temperatūra, °C	25	37	85	4
Trukmė, min.	10	120	5	∞

3.13. Polimerazinė grandininė reakcija

Kopijinės DNR (kDNR) amplifikacija polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu buvo atliekama naudojant „AmpliTaq Gold[®] Fast PCR Master Mix, UP (2X)“ (Applied Biosystems, JAV) rinkinį. Viena reakcija atliekama 15 µl tūryje: mėgintuvėlyje sumaišoma 7.5 µl 2X pagrindinio PGR

mišinio, 0.3 µl tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (galinė kiekvieno pradmens koncentracija 0.2 µM) (3.2 lentelė), 4 µl kDNR ir 3.2 µl fluorescuojančio dažo SYTO 9 (Molecular Probes, JAV). Mėgintuvėlis patalpinamas termocikleryje Rotor-Gene (Qiagen, Vokietija) ir paleidžiama PGR programa (3.3 lentelė). Tiriamojo geno raiška normalizuojama pagal β-aktino raišką kiekviename mėginyje ir kiekybiškai įvertinama pagal vidutinę C_t (slenkstinis ciklas) vertę. Gautų PGR produktų dydis patvirtintas elektroforezės metodu 1.2% agarozės gelyje, dažytame fluorescenciniu dažu GelRed.

3.2 lentelė. PGR naudoti pradmenys.

	Pradmuo	Seka	Produkto dydis, bp	Šaltinis
β-actin	tiesioginis	5'ACGGCCAGGTCATCACTATTG3'	103	Bing ir kt., 2006
	atvirkštinis	5'CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA3'		
TGF-β	tiesioginis	5'CACCTGCAAGACCATCGACA3'	241	Szpaderska ir kt., 2003
	atvirkštinis	5'CACGCGGGTGACCTCTTTAG3'		
VEGF	tiesioginis	5'TGAACTTTCTGCTCTCTTGG3'	457	Mori ir kt., 2002
	atvirkštinis	5'AACAAATGCTTTCTCCGCTC3'		
TNF-α	tiesioginis	5'CAGCCTCTTCTCATTCCCTGCTTGTG3'	511	Mori ir kt., 2002
	atvirkštinis	5'CTGGAAGACTCCTCCCAGGTATAT3'		
IL-10	tiesioginis	5'CTGCTCTTACTGACTGGCATGAG3'	534	Ohshima ir Sato, 1998
	atvirkštinis	5'GACTCAATACACACTGCAGGTGT3'		

3.3 lentelė. PGR programos parametrai.

Etapas	Fermento aktyvinimas	PGR			Galutinis etapas	
		35 ciklai				
		DNR denatūracija	Pradmenų prisikabinimas	DNR sintezė		
Temperatūra, °C	95	95	58.6-60*	68	72	4
Trukmė, min.	10	0.17	1	0.5	0.17	∞

* priklausomai nuo pradmenų poros

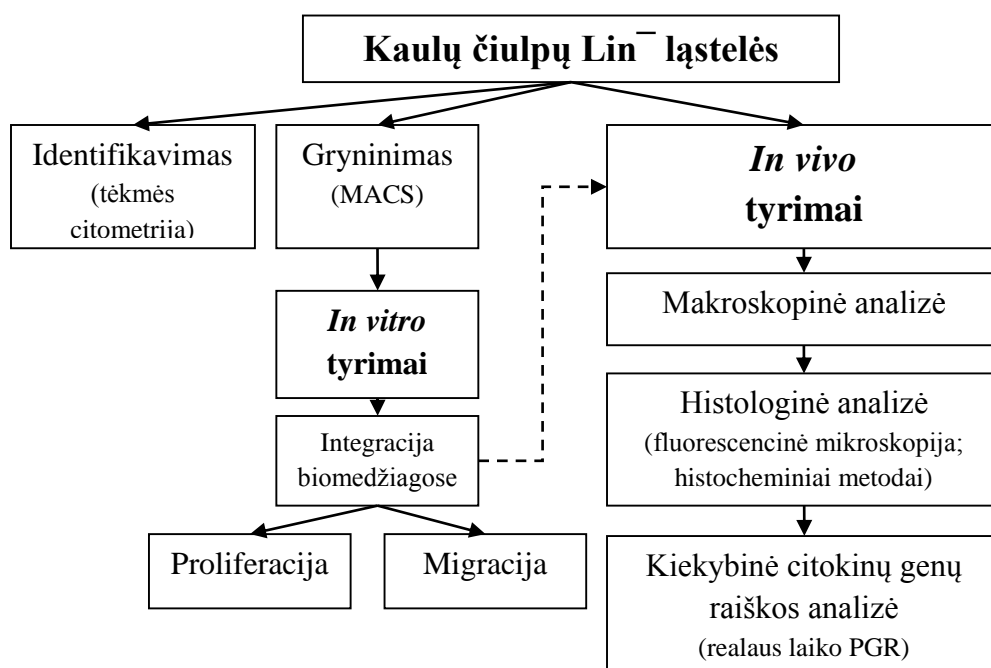
3.14. Statistinė duomenų analizė

Šiame darbe atlikti eksperimentai buvo pakartoti ne mažiau kaip tris kartus. Kiekybiniai duomenys pateikti kaip aritmetiniai vidurkiai ± standartinė paklaida. Rezultatų skirtumų tarp grupių patikimumas buvo tikrinamas naudojant Student'o t-testą. Rezultatai statistiškai patikimi kai $p < 0.05$.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Sutrikus regeneraciją užtikrinančių reakcijų vystymuisi, pažeisto audinio atsistatymas baigiasi randinio audinio susiformavimu, kuris nepasižymi natyviu audiniui būdingomis struktūrinėmis ir funkcinėmis savybėmis (Guo ir DiPietro, 2010). Šiuo metu klinikinėje praktikoje lėtinių žaizdų gydymui naudojami metodai padeda atstatyti tik iš dalies funkcionuojantį audinį (Wong ir Gurtner, 2012). Negyjančių žaizdų problemą bandoma spręsti panaudojant kamienines ląsteles.

Kamieninių ląstelių tyrimuose vis dar yra daug neatsakytų klausimų, kurie riboja jų naudojimą kasdienėje praktikoje. Nėra patikimų duomenų, įrodančių, ar po kamieninių ląstelių panaudojimo atsinaujinęs odos audinys yra visiškai funkcionalus. Nėra vieningos nuomonės, koks transplantacijos būdas yra tinkamiausias sėkmingam kamieninių ląstelių įsitvirtinimui bei funkcijų palaikymui pažeidimo židinyje. Mūsų darbo tikslas buvo įvertinti nediferencijuotų kaulų čiulpų ląstelių įtaką audinio atsistatymui *in vivo*, taikant BALB/c linijos pelių visų odos sluoksnių pažeidimo modelį. Bendra tyrimų schema pateikta 4.1 pav.



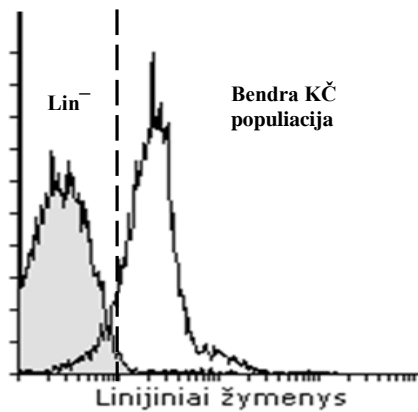
4.1 pav. Darbe atliktų Lin^{-} ląstelių tyrimų schema.

Eksperimentams buvo naudojamos BALB/c linijos pelių kaulų čiulpų Lin⁻ ląstelės. Prieš transplantaciją į visų odos sluoksnių pažeidimą *in vivo*, buvo atlikta ląstelių fenotipinė analizė bei įvertintos jų proliferacinės ir migracinės savybės *in vitro*. *In vivo* sąlygomis buvo įvertinta Lin⁻ ląstelių integracija pažeidimo židinyje bei poveikis specifiniams audinio gijimo metu vykstantiems procesams. Atliktų tyrimų rezultatai svarbūs vystant uždelsto gijimo odos žaizdų gydymo metodus.

4.1. Kaulų čiulpų ląstelių fenotipinė analizė

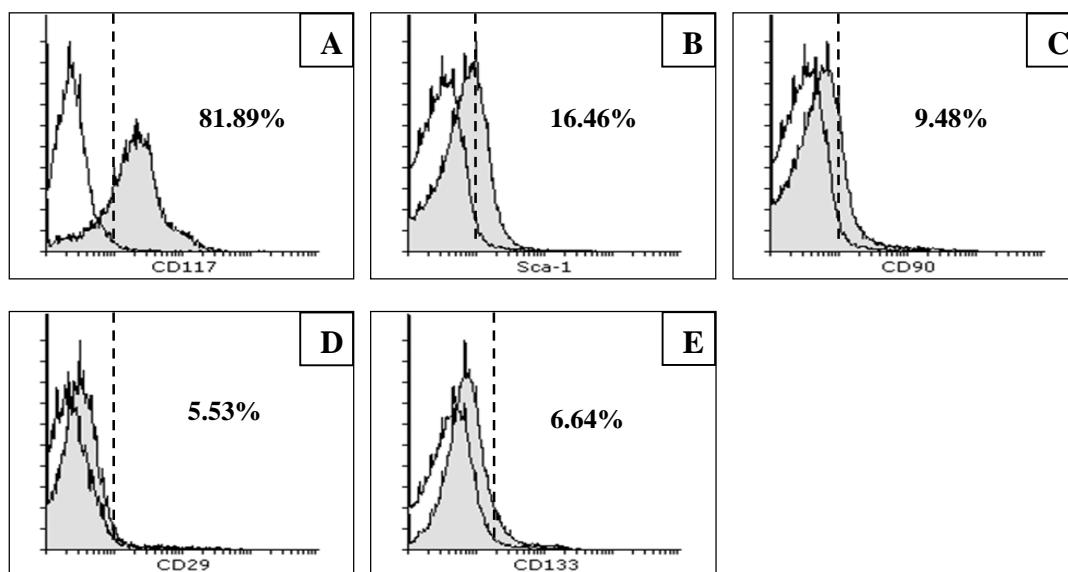
Primityvių ląstelių identifikavimas ir selekcija analizuojamame audinyje ar organe remiasi paviršiaus žymenų raiška. Kaulų čiulpų ląstelių populiacija yra heterogeniška, sudaryta iš įvairaus diferenciacijos laipsnio ląstelių (Dawn ir Bolli, 2005). Regeneracinėmis savybėmis pasižyminčių ląstelių gryninimas ir identifikavimas yra svarbus etapas ruošiant ląsteles transplantacijai į audinių bei organų pažeidimus. Šiam tikslui pasirenkami keletas paviršiaus molekulių deriniai ir skirtingais parametrais pasižymintys metodai (Wognum ir kt., 2003).

Kaulų čiulpuose primityviausios ląstelės sudaro mažą bendros populiacijos dalį. Sveikame organizme HKL kaulų čiulpuose sudaro maždaug 0.05% negrynintos populiacijos, MKL yra dar retesnės ir sudaro nuo 0.001% iki 0.01% vienbranduolių ląstelių populiacijos (Howell ir kt., 2003). Nediferencijuotos ląstelės kaulų čiulpuose sudaro heterogenišką populiaciją, kuri bendrai apibūdinama kaip Lin⁻ (angl. lineage negative). Nustatėme, kad po bendros kaulų čiulpų ląstelių populiacijos gryninimo, neigiamoje frakcijoje lieka 3.5±0.9% ląstelių. Populiacijos gryniumui patvirtinti, atskirta Lin⁻ ląstelių suspensija buvo žymima antikūnais prieš gryninimui naudotus linijinius žymenis ir analizuojama tėkmės citometrijos metodu. Išgrynintoje Lin⁻ ląstelių populiacijoje linijinių žymenų raiška buvo mažesnė nei 2±0.8% (4.2 pav.).



4.2 pav. Diferencijuotų ląstelių paviršiaus žymenų raiška bendroje kaulų čiulpų (KČ) ir Lin^{-} ląstelių populiacijose. X ašyje nurodytas fluorochromu žymėtų antikūnų prieš ląstelių paviršiaus žymenis fluorescencijos intensyvumas, Y ašyje – ląstelių kiekis.

Nediferencijuotų ląstelių, esančių išgrynintoje Lin^{-} ląstelių populiacijoje, identifikavimui pasirinkome penkis žymenis – CD117, Sca-1, CD90.1, CD29 ir CD133. Šie žymenys yra būdingi HKL, MKL bei kitoms ląstelėms pirmtakėms. Hemopoetinių ląstelių paviršiuje ekspresuojamas transmembraninis baltymas CD117 (c-kit) atlieka esminį vaidmenį ramybės būsenos palaikymo, išgyvenimo, proliferacijos ir diferenciacijos procesuose. Kitų autorių tyrimuose, kuriuose buvo naudojamos pelės, turinčios c-kit geno mutaciją, gauti rezultatai parodė, kad CD117 žymenį ekspresuojančių ląstelių trūkumas lemia anemiją, sumažėjusį putliųjų ląstelių kiekį bei defektus B ir T ląstelių populiacijų palaikyme (Waskow ir kt., 2002). Transplantacijos tyrimuose taip pat parodyta, kad c-kit receptoriaus funkcijos blokavimas nedaro įtakos transplantuotų ląstelių migracijai į kaulų čiulpus, tačiau stabdo jų įsitvirtinimą nišoje (Driessen ir kt., 2003). Mūsų eksperimentuose Lin^{-} populiacijoje CD117 raiška buvo didžiausia lyginant su kitais naudotais žymenimis. Išgrynintoje populiacijoje šį žymenį ekspresavo iki $81.89 \pm 2.92\%$ ląstelių (4.3A pav.). Literatūros duomenimis, kaulų čiulpų Lin^{-} ląstelių fenotipinei analizei kartu su paviršiaus molekule CD117 naudojamas Sca-1 žymuo. Šios molekulės raiška būdinga ne tik pelių kaulų čiulpų HKL, bet ir MKL bei jų pirmtakams, todėl lyginant skirtingų autorių eksperimentų duomenis aptinkama nemažai prieštaringų nuomonių, kokią populiaciją apibūdina Sca-1 žymuo (Holmes ir Stanford, 2007). Vykstant kraujodaros procesui, ši molekulė



4.3 pav. Nediferencijuotų ląstelių paviršiaus žymenų raiška kaulų čiulpų Lin^- populiacijoje. X ašyje nurodytas fluorochromu žymėto antikūno prieš ląstelių paviršiaus žymenį fluorescencijos intensyvumas, Y ašyje – ląstelių kiekis. Balta histograma – izotipinė kontrolė. Procentai nurodo tiriamojo žymens raiška pasižyminčių ląstelių kiekį.

vaidina svarbų vaidmenį HKL nuolatinio atsinaujinimo ir diferenciacijos procesuose. Ito ir bendraautorių (2003) tyrimų rezultatai parodė, kad Sca-1 žymenį turinčios ląstelės formuoja specifines leukocitų populiacijas, tačiau beveik neturi įtakos eritroidinės linijos pirmtakų brendimui. Kitų autorių duomenimis, HKL, ekspresuojančios Sca-1 molekulę, dalyvauja ilgalaikės kraujodaros atstatyme. Priešingai nei paviršiaus baltymo CD117, receptoriaus Sca-1 sąveika su mikroaplinkos komponentais užtikrina migruojančių ląstelių įsitvirtinimą nišoje (Bradfute ir kt., 2005). Mes nustatėme, kad kaulų čiulpų Lin^- populiacijoje, Sca-1 molekulė ekspresuojama $16.46 \pm 3.51\%$ ląstelių paviršiuje (4.3B pav.). Šiame darbe pelių kaulų čiulpų MKL fenotipinei analizei buvo naudojami CD29 ir CD90 žymenys. Integrinų šeimai priklausanti molekulė CD29 (integrinas $\beta 1$) susijusi su ląstelių adhezija įvairių tarpląstelinės medžiagos komponentų (pvz., kolageno, fibronektino, laminino) paviršiuje. Šios molekulės raiška vaidina svarbų vaidmenį migracijos procese, o jos sąveikos su kitų ląstelių paviršiaus receptoriais tarpininkauja proliferacijos ir diferenciacijos procesų indukavime (Lin ir kt., 2013). Kiti autoriai atliko eksperimentus, kuriuose buvo tiriama žymens CD29 raiškos MKL paviršiuje ir jų migracijos

priklausomybė. Šių tyrėjų gauti rezultatai parodė, kad integrino $\beta 1$ blokavimas lemia ląstelių migracijos sumažėjimą (Ode ir kt., 2011). Analizuojant MKL fenotipą, CD90 paviršiaus molekulė apibūdina ląstelių diferenciacijos laipsnį. Tyrimai rodo, kad šio žymens raiška reikšmingai silpnėja MKL įgaunant diferencijuotą būseną, todėl jo panaudojimas žymenų deriniuose naudingas primityviausių ląstelių populiacijos stebėjimui (Nadri ir kt., 2007; Fukada ir kt., 2008). Kaulų čiulpų ląstelių populiacijoje CD29 ir CD90 žymenų raiška proporcingai didėja *in vitro* sąlygomis ilgalaikėse kultūrose. Tokiu būdu pašalinamos suspensijoje esančios hemopoetinės kilmės ląstelės, o adhezinėmis savybėmis pasižyminčių MKL monosluoksniai persėjami pasiekus maždaug 80% konfluenciją. Literatūros duomenimis, ypač aukšta CD90 ir CD29 žymenų raiška stebima jau po pirmųjų persėjimų (Sun ir kt., 2003; Chen ir kt., 2008). Mūsų eksperimentuose tirtoje išgrynintoje ir nekultivuotoje populiacijoje pagal MKL žymenis CD90 ir CD29 teigiamų ląstelių buvo reikšmingai mažiau lyginant su hemopoetinės kilmės primityvių ląstelių kiekiu. Nustatėme, kad paviršiaus molekulę CD90 Lin^{-} populiacijoje ekspresuoja $9.48 \pm 2.93\%$ ląstelių (4.3C pav.). Šiame darbe išgrynintų ląstelių paviršiuje CD29 molekulės raiška buvo silpniausia lyginant su visais tirtais žymenimis. Pagal šį žymenį teigiamų ląstelių Lin^{-} populiacijoje identifikavome iki $5.53 \pm 1.8\%$ (4.3D pav.). Mūsų eksperimentuose išgrynintoje Lin^{-} populiacijoje esančių ląstelių pirmtakių identifikavimui buvo naudojama paviršiaus molekulė CD133. Pagal šį žymenį teigiamų ląstelių regeneracinės savybės buvo parodytos gyvūnų modeliuose bei klinikiniuose tyrimuose (Urbich ir Dimmeler, 2004; Li, 2013). Šios ląstelės priskiriamos ELP ir gali būti išskiriamos iš keleto šaltinių. Skiriami du ELP tipai – ankstyvosios ir vėlyvosios ląstelės pirmtakės. Kitų autorių duomenimis, kaulų čiulpų ląstelių populiacijoje CD133 raiška apibūdina ankstyvasias EPL, pasižyminčias intensyvia proliferacija *in vitro* ir angiogenezės skatinimu *in vivo*. Parodyta, kad šioms ląstelėms diferencijuojantis, CD133 žymuo palaiptai prarandamas (Zhang ir kt., 2012). Šiame darbe išskirtoje pelių kaulų čiulpų Lin^{-} populiacijoje CD133 raiška buvo nustatyta $6.64 \pm 0.93\%$ ląstelių paviršiuje (4.3E pav.).

Tirtoje pelių kaulų čiulpų Lin⁻ populiacijoje nediferencijuotų ląstelių žymenų raiška buvo nuo 2.5 iki 13 kartų didesnė nei negrynintoje populiacijoje. Terapiškai aktyvių ląstelių gryninimo ir identifikavimo etapai lemia transplantacijos efektyvumą. Iš bendros kaulų čiulpų populiacijos pašalinus linijinius žymenis ekspresuojančias diferencijuotas ląsteles, gaunama frakcija, kurioje lieka ląstelės, pasižyminčios regeneraciją skatinančiomis savybėmis bei sąveikaudamos tarpusavyje užtikrina funkcijų palaikymą (Anam ir kt., 2010). Atliekant tyrimus didžiausias skirtumas tarp bendros kaulų čiulpų ir išgrynintos Lin⁻ ląstelių populiacijų buvo nustatytas identifikuojant Sca-1 paviršiaus molekulę. Šį žymenį ekspresuojančių ląstelių kiekis nuo 1.29±0.05% negrynintoje populiacijoje padidėjo iki 16.46±3.51% Lin⁻ populiacijoje. Panašūs skirtumai po gryninimo išryškėjo identifikuojant pagal CD117, CD29 ir CD133 žymenis teigiamas ląsteles. Jų kiekis Lin⁻ populiacijoje atitinkamai padidėjo 8.9, 8.7 ir 9.7 karto. Mažiausias teigiamų ląstelių kiekio padidėjimas nustatytas tiriant CD90 paviršiaus molekulės raišką. Šį žymenį turinčių ląstelių kiekis nuo 3.83±0.21% bendroje populiacijoje padidėjo iki 9.48±2.93% Lin⁻ populiacijoje (4.1 lentelė).

4.1 lentelė. Paviršiaus žymenų raiška bendroje kaulų čiulpų (KČ) ir išgrynintoje Lin⁻ ląstelių populiacijose.

Paviršiaus žymuo	Bendra KČ populiacija, %	Lin ⁻ populiacija, %
CD117	9.11±2.76	81.89±2.92
Sca-1	1.29±0.05	16.46±3.51
CD90	3.83±0.21	9.48±2.93
CD29	0.63±0.11	5.53±1.8
CD133	0.68±0.08	6.64±0.93

Patvirtinome, kad išgrynintos pelių kaulų čiulpų Lin⁻ ląstelės neekspresuoja subrendusioms ląstelėms būdingų žymenų ir pasižymi intensyvia nediferencijuotoms ląstelėms būdingų paviršiaus molekulių raiška. Tokios ląstelės gali diferencijuotis ir į joms nebūdingų audinių ląstelių tipus. Kaulų čiulpų Lin⁻ populiacijoje esančių primityvių ląstelių regeneracinės savybės

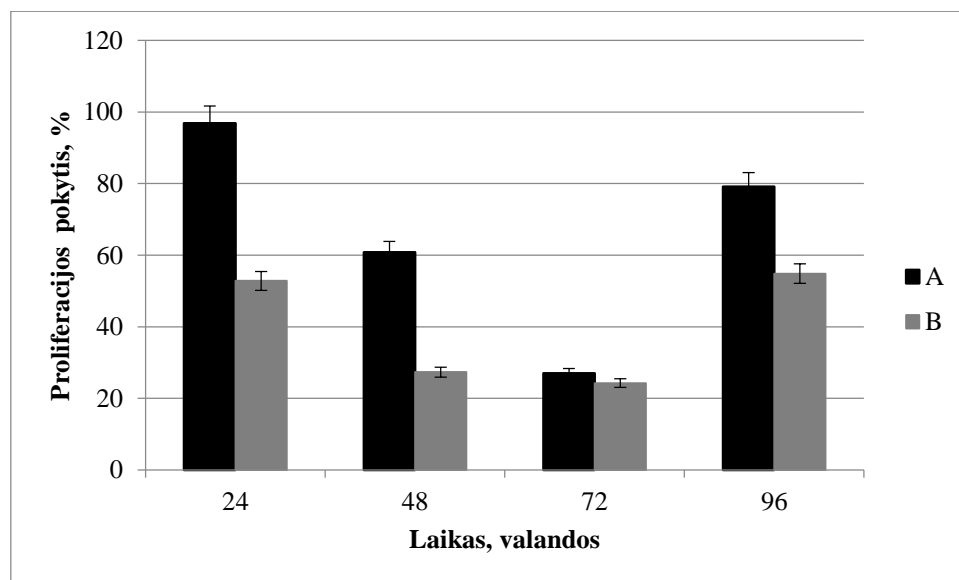
priklauso nuo jas supančios mikroaplinkos. Odos audinio tarpląstelinė medžiaga sudaryta iš komplekso skirtingos kilmės komponentų, kurie turi įtakos ląstelių fenotipinėms, proliferacinėms ir migracinėms savybėms, nuo kurių priklauso jų integracija bei funkcijos pažeidimo židinyje. Prieš transplantaciją, išskirtų ir išgrynintų Lin⁻ ląstelių ir odos audinio tarpląstelinės medžiagos komponentų sąveikos tyrimai buvo atlikti *in vitro* sąlygomis.

4.2. Lin⁻ ląstelių proliferacijos ir migracijos įvertinimas *in vitro*

Uždelstas žaizdų gijimas susijęs su ląstelių, dalyvaujančių audinio regeneracijoje, proliferacijos ir migracijos sutrikimais. Šiuos procesus organizme tiesiogiai veikia ląsteles supanti mikroaplinka (Watt ir Fujiwara, 2011). Atskirai proliferacijos ir migracijos procesus tirti *in vivo* sąlygomis yra sudėtinga dėl vienu metu vykstančių daugybės persidengiančių reakcijų (Amadeu ir kt., 2003). Šių procesų modeliavimas *in vitro* suteikia vertingų žinių ruošiant ląsteles transplantacijai *in vivo* (Liang ir kt., 2007). Šiame darbe pelių kaulų čiulpų Lin⁻ populiacijos ląstelių proliferacinės ir migracinės savybės buvo tiriamos *in vitro* sąlygomis, mikroaplinką formuojant odos audinio tarpląstelinės medžiagos komponentų pagrindu. Tyrimams buvo pasirinkti I tipo kolagenas ir pamatinės membranos komponentų (baltymų laminino, IV tipo kolageno ir entaktino bei proteoglikano heparino sulfato) mišinys.

Aukštas proliferacinis ląstelių aktyvumas reikalingas norint gauti reikiamą jų kiekį *in vitro* sąlygomis, taip pat ši savybė lemia, ar transplantuotos ląstelės sėkmingai prigis pažeidimo židinyje bei galės dalyvauti gijimo procesuose (Hodgkinson ir kt., 2009). Mūsų tyrime Lin⁻ populiacijos ląstelių proliferacinis aktyvumas buvo stebimas ląsteles kultivuojant standartinėmis sąlygomis plastiko paviršiuje bei formuojant mikroaplinką skirtingų tarpląstelinės medžiagos komponentų pagrindu. Literatūroje yra duomenų apie įvairių ląstelių tipų proliferacinio aktyvumo pokyčius, priklausančius nuo *in vitro* formuojamos aplinkos. Kiti autoriai nustatė, kad fibroblastų proliferacinis aktyvumas tuo pačiu stebėjimo metu kinta priklausomai nuo mikroaplinkos. Šie

tyrimai parodė, kad 2D mikroaplinkoje ląstelės nuosekliai proliferuoja visą stebėjimo laiką, o 3D mikroaplinkoje ląstelės proliferuoti pradeda po 48 val trunkančios uždelsimo fazės. Tačiau galiniame eksperimento taške nustatytas reikšmingas fibroblastų, kultivuotų 3D sąlygomis, kiekio padidėjimas lyginant su kontroline grupe (Norman ir kt., 2008). Tsai su grupe, atlikę eksperimentus su žmogaus MKL, kuriuose buvo tiriama skirtingų tarpląstelinės medžiagos baltymų įtaka ląstelių proliferacinėms savybėms *in vitro*, nustatė, kad I tipo kolagenas lemia vėlyvesnį augimo padidėjimą. Šios grupės tyrimuose žMKL, augintos plastiko paviršiuje bei fibronektino, laminino arba poli-L-lizino turinčiose mikroaplinkose, intensyviai proliferavo pirmąsias 96 val, vėliau buvo stebimas augimo sumažėjimas, tuo tarpu I tipo kolagenas skatino augimą iki septintos stebėjimo paros (Tsai ir kt., 2010). Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad Lin^- ląstelių proliferacijos intensyvumas reikšmingai padidėja tarpląstelinės medžiagos komponentų turinčioje mikroaplinkoje visą stebėjimo laiką (4.4 pav.).

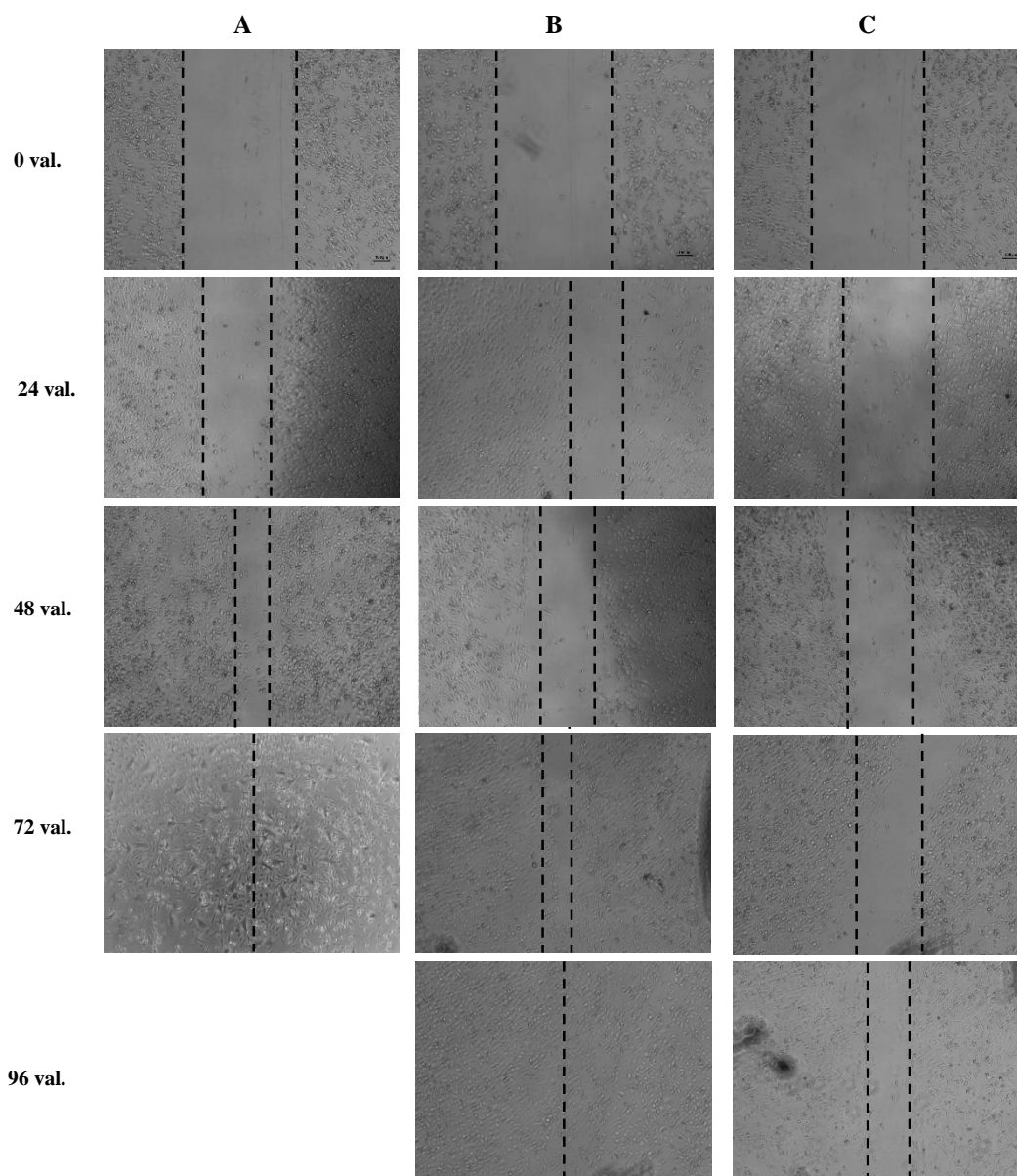


4.4 pav. Kaulų čiulpų Lin^- ląstelių proliferacija *in vitro*. Ląstelės buvo kultivuojamos pamatinės membranos komponentų gelyje (A) arba I tipo kolageno gelyje (B). Grafike pateikti penkių nepriklausomų tyrimų rezultatų vidurkiai \pm SN; $p < 0.05$ lyginant skirtingomis sąlygomis kultivuotų ląstelių proliferacijos intensyvumą.

Ląsteles kultivuojant I tipo kolageno gelyje, proliferacijos aktyvumas lyginant su kontrole buvo didesnis nuo 1.2 iki 1.6 kartų. Pamatinės membranos

komponentų gelyje ląstelių proliferacija buvo didesnė nuo 1.3 iki 2 kartų. Lyginant su pradiniu tašku (24 val.), reikšmingas proliferacijos padidėjimas tarpląstelinės medžiagos komponentų turinčiose mikroaplinkose nustatytas po skirtingo kultivavimo periodo. Iki 1.5 kartų didesnė proliferacija I tipo kolageno gelyje ir pamatinės membranos komponentų gelyje nustatyta atitinkamai po 72 val. ir po 96 val. Kontrolinėje grupėje ląstelės proliferavo iki 72 val. Literatūroje yra duomenų, kad skirtingi tarpląstelinės medžiagos baltymai *in vitro* sąlygomis veikia kitų tipų ląstelių, kurios yra svarbios odos audinio pažeidimų atstatymui, proliferacinį aktyvumą, įskaitant fibroblastų (Bott ir kt., 2010), keratinocitų (Visser ir Pollitt, 2010) bei atskirų kamieninių ląstelių populiacijų (Penolazzi ir kt., 2012). Segal ir bendraautoriai (2008) nustatė, kad optimaliausiai keratinocitų proliferacijai yra būtini pamatinės membranos baltymai. Šių tyrėjų eksperimentuose ląstelės, kultivuotos I tipo kolageno turinčioje mikroaplinkoje, pasižymėjo iki 14% žemesniu proliferaciniu aktyvumu nei kultivuotos pamatinės membranos komponentų turinčioje mikroaplinkoje. Literatūroje yra duomenų, kad žMKL, kultivuotos naudojant atskirus pamatinės membranos komponentus arba jų mišinį, pastarosiomis sąlygomis pasižymi ne tik ilgesniu gyvavimu *in vitro* sąlygomis, bet ir didesniu proliferaciniu aktyvumu (Matsubara ir kt., 2004). Mūsų eksperimentuose visą stebėjimo laiką Lin⁻ populiacijos ląstelių proliferacija aktyviausiai vyko mikroaplinkoje, suformuotoje pamatinės membranos komponentų pagrindu. Šioje grupėje, lyginant su I tipo kolageno gelyje kultivuotomis ląstelėmis, didžiausias Lin⁻ populiacijos proliferacijos skirtumas (iki 1.5 karto) buvo nustatytas po 48 val. ir po 96 val. (4.4 pav.).

Ląstelių migracija yra kitas esminis procesas, užtikrinantis audinio vystymosi ir homeostazės palaikymą bei lemiantis žaizdų gijimo sėkmę (Thampatty ir Wang, 2007). Migracijos tyrimams *in vitro* pasirinkome standartizuotą ląstelių monosluoksnio mechaninį pažeidimą (4.5 pav.), kuris yra tinkamas įvertinti tarpląstelinės medžiagos komponentų įtaką ląstelių migracinėms savybėms (Liang ir kt., 2007).



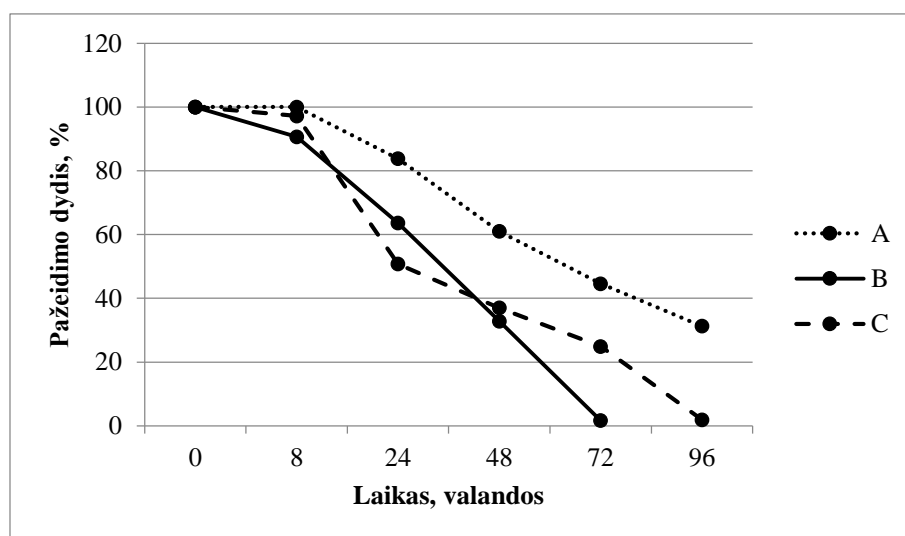
4.5 pav. Kaulų čiulpų Lin⁻ ląstelių migracija *in vitro*. (A) Grupė, kurioje ląstelės buvo kultivuojamos I tipo kolagenu padengtame paviršiuje. (B) Grupė, kurioje ląstelės buvo kultivuojamos pamatinės membranos komponentais padengtame paviršiuje. (C) Kontrolinė grupė, kurioje ląstelės buvo kultivuojamos plastiko paviršiuje. Didinimas $\times 40$.

Mūsų eksperimentuose Lin⁻ populiacijos ląstelių migracija buvo stebima odos audinio tarpląstelinei medžiagai būdingų komponentų paviršiuje. Dėl neginčijamai svarbaus vaidmens palaikant audinio struktūrinės bei ląstelių funkcines savybes tiek normaliuose vystymosi procesuose, tiek patologinėmis sąlygomis, I tipo kolagenas ir pamatinės membranos matrica yra vienos dažniausiai pasirenkamų medžiagų tokio pobūdžio tyrimams (Lee ir kt., 2001; LeBleu ir kt., 2007; Hakkinen ir kt., 2011). Gauti rezultatai parodė, kad

sparčiausiai reepitelizacijos procesas vyksta ląsteles kultivuojant I tipo kolageno paviršiuje (4.5A pav.). Šioje grupėje visiškai pažeidimo pasidengimas migruojančiomis Lin⁻ ląstelėmis nustatytas po 72 val. Pamatinės membranos matricos paviršiuje reepitelizacijos procesas baigtas po 96 val (4.5B pav.). Šiais laiko momentais kontrolinėje grupėje plastiko paviršiuje kultivuotų ląstelių monosluoksnių pažeidimai nebuvo padengti migruojančiomis ląstelėmis (4.5C pav.).

Mūsų tyrimuose taip pat buvo vertinama Lin⁻ ląstelių migracijos *in vitro* kinetika, pasirinktais laiko momentais matuojant ląstelėmis nepadengto pažeidimo paviršiaus plotį skirtinguose matymo laukuose. Remiantis literatūros duomenimis, keratinocitų, nuo kurių migracinių savybių tiesiogiai priklauso žaizdos reepitelizacijos sėkmė organizme, migraciją *in vitro* sąlygomis patikimai skatina ne tik I tipo, bet ir IV tipo kolagenas, kuris yra vienas iš pamatinės membranos komponentų. Tuo tarpu kai kurių tipų lamininai (pvz., I ar 5 tipai), taip pat įeinantys į pamatinės membranos sudėtį, šių ląstelių migraciją inhibuoja (O'Toole, 2001). Boleman ir bendraautoriai (2012), lygindami dermos fibroblastų ir danties pulpos kamieninių ląstelių ir pirmtakų migracines savybes *in vitro*, nustatė, kad, kultūrų neveikiant augimo veiksniais, abiejų tipų ląstelės sparčiausiai pažeidimo plotą padengia migruodamos pamatinės membranos komponentų mišiniu padengtu paviršiumi, skirtingai nuo atskirais jos baltymais (lamininu ar fibronektinu) padengtų paviršių. Intensyvūs *in vitro* migracijos tyrimai atliekami su dermos fibroblastais, kurie atlieka ypač svarbų vaidmenį visą žaizdos gijimo laikotarpį. Literatūroje yra duomenų, kad *in vitro* sąlygomis I tipo kolagenas skatina fibroblastų migraciją papildomai nenaudojant augimo veiksnių (Li ir kt., 2004). Hakkinen ir bendraautoriai (2011) tuo pačiu metu stebėję žmogaus fibroblastų migraciją kolageno ir pamatinės membranos matricos paviršiuje *in vitro* nustatė, kad pastarosiomis sąlygomis ląstelių migracija vyksta iki dviejų kartų greičiau. Mūsų darbe atliktų Lin⁻ ląstelių migracijos kinetikos *in vitro* tyrimų rezultatai pateikti 4.6 pav. Eksperimentuose pirmosios migruojančios ląstelės buvo stebimos I tipo kolageno turinčioje mikroaplinkoje jau po 8 val, tačiau pažeidimo dydžio skirtumas lyginant su

kitomis grupėmis nebuvo patikimas. Po 24 val žaizdos padengimas didesnis buvo pamatinės membranos matricos paviršiuje nei I tipo kolageno paviršiuje kultivuotų ląstelių monosluoksnyje. Pažeidimai šiose grupėse sumažėjo atitinkamai iki 50.78% ir 63.62%. Lyginant su kontroline grupe, tiriamosiose grupėse ląstelėmis nepadengtų paviršių dydis šiuo laiko momentu sumažėjo iki 1.6 karto. Mažiausią pažeidimo dydžių skirtumą tiriamosiose grupėse nustatėme po 48 val. Po 72 val I tipo kolageno paviršiuje pasibaigus reepitelizacijos procesui, pamatinės membranos komponentų matricos paviršiuje pažeidimas siekė 24.89%. Pastarojoje grupėje visiškai pažeidimo padengimas migruojančiomis Lin^- ląstelėmis nustatytas po 96 val. Kontrolinėje grupėje po 72 val ir 96 val reepitelizacijos procesas nebuvo baigtas, šiais laiko momentais migruojančiomis ląstelėmis nebuvo padengta atitinkamai 44.56% ir 31.29% pažeisto paviršiaus.



4.6 pav. Kaulų čiulpų Lin^- ląstelių migracijos *in vitro* kinetika. Ląstelės buvo kultivuojamos plastiko paviršiuje (A), I tipo kolagenu padengtame paviršiuje (B) arba pamatinės membranos komponentais padengtame paviršiuje (C). Grafike pateikti keturių nepriklausomų tyrimų rezultatų vidurkiai \pm SN; $p < 0.05$ lyginant išgrynintų ląstelių migraciją skirtinguose paviršiuose.

Šiame darbe atliktų kaulų čiulpų Lin^- populiacijos ląstelių proliferacijos ir migracijos tyrimų *in vitro* rezultatai parodė, kad odos audinio tarpląstelinei medžiagai būdingi komponentai reikšmingai veikia abu procesus. Pamatinės membranos komponentų mišinys lemia aktyvesnę ląstelių

prolifraciją, tačiau I tipo kolagenas geriau veikia migraciją. Abi medžiagos buvo panaudotos Lin⁻ ląstelių transplantacijai į BALB/c linijos pelių visų odos sluoksnių pažeidimus.

4.3. Lin⁻ ląstelių įtakos odos audinio regeneracijai įvertinimas *in vivo*

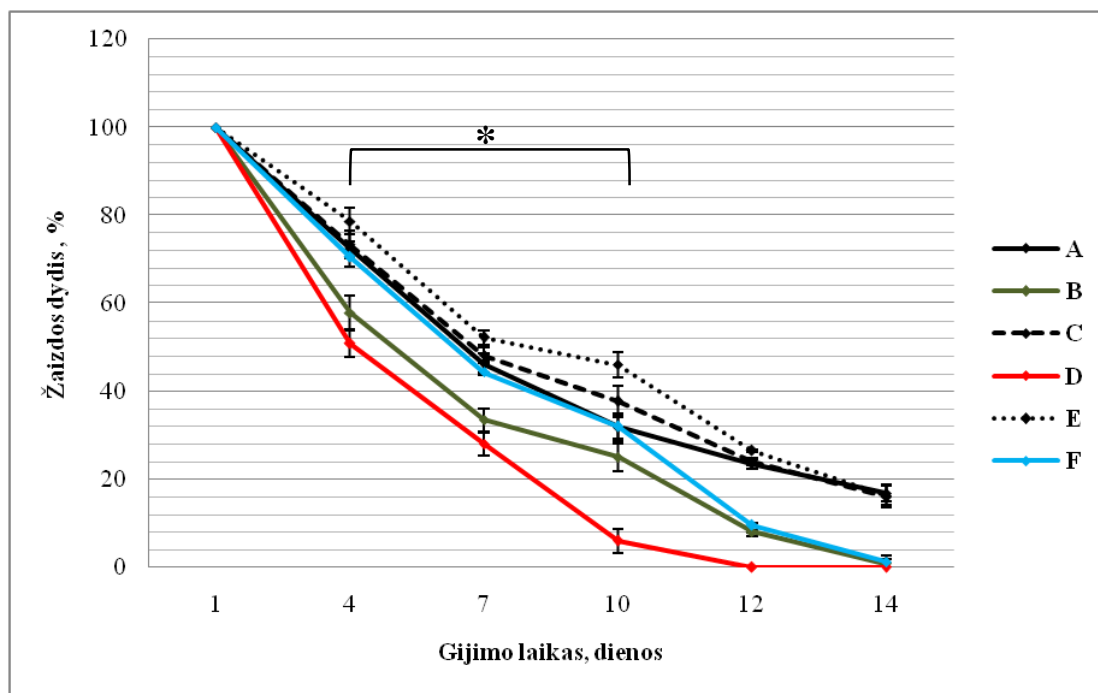
Odos žaizdų gijimas yra nenutrūkstamas procesas, tačiau jo apibūdinimui išskiriamos trys pagrindinės, persidengiančios ir viena kitą palaipsniui pakeičiančios stadijos – uždegimo, proliferacijos ir remodeliacijos (Broughton ir kt., 2006). Kiekvienoje gijimo stadijoje vyksta specifinės reakcijos, kuriose dalyvauja skirtingų tipų ląstelės, atsakingos už uždegimo kontrolę, epiderminio barjero atstatymą, granulinio audinio formavimą, tarpląstelinės medžiagos komponentų sintezę ir lemia atsinaujinusio audinio struktūrinės bei funkcinės savybes (Reinke ir Sorg, 2012). Kaulų čiulpų nediferencijuotų ląstelių vaidmuo skirtingų žaizdos gijimo stadijų metu gali būti tiesioginis arba netiesioginis (Wu ir kt., 2010). Audinio regeneracijos efektyvumas priklauso nuo transplantuotų ląstelių sugebėjimo įsitvirtinti pažeidimo židinyje ir atlikti reikiamas funkcijas, kurias lemia transplantacijos būdo pasirinkimas bei ląstelių sąveikos su mikroaplinka (Lam ir kt., 2013).

Eksperimentuose pelės buvo suskirstytos į tris tiriamąsias grupes ir tris kontrolines grupes. Tiriamosiose grupėse į pelių odos pažeidimus buvo transplantuotos Lin⁻ ląstelės, suspenduotos PBS tirpale, I tipo kolageno gelyje arba pamatinės membranos komponentų gelyje. Kontrolinėse grupėse į pelių žaizdas buvo injekuojama atitinkamo tirpalo be ląstelių.

4.3.1. Pažeisto odos audinio atsistatymo makroskopinė analizė

Išorinių veiksnių įtakai pažeistos odos regeneracijai objektyviai įvertinti reikalingas tinkamas eksperimentinis modelis. Mūsų darbe pasirinktas mechaninis visų odos sluoksnių pažeidimas apima tris pagrindines gijimo stadijas ir yra tinkamas audinio atsistatymo metu vykstantiems morfologiniams pokyčiams stebėti tiek mikroskopiniu lygiu, tiek makroskopiškai. Atvirkščiai nei

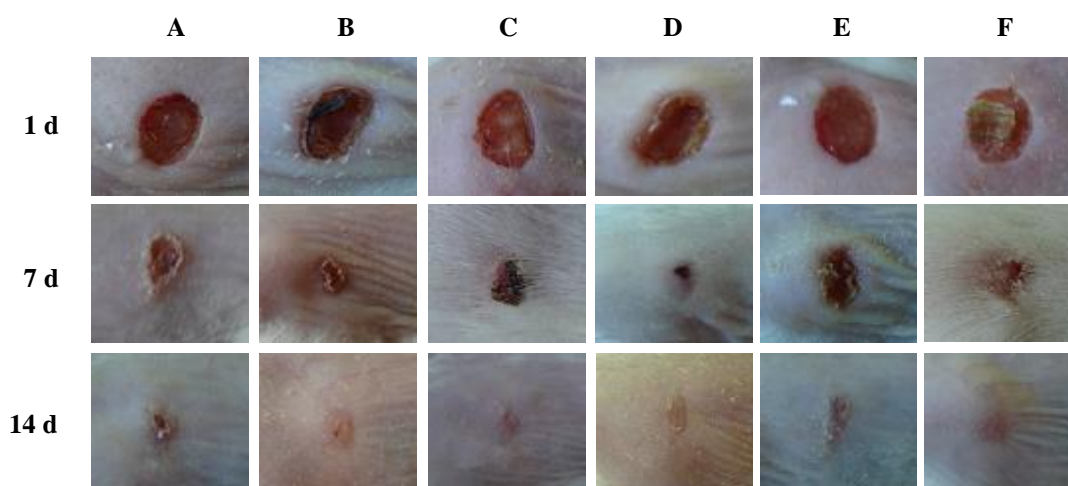
nudegimo modeliai, kuriuose pirmosiomis gijimo dienomis dėl audinių nekrozės pažeidimas plinta už pradinių žaizdų kraštų, mechaniniu būdu sukeltas pažeidimas turi apibrėžtą, fiksuotą kraštą, todėl modelis tinkamas žaizdos uždarymo kinetinėms ypatybėms įvertinti (Gal ir kt., 2008). Šio darbo metu žaizdos kiekvieną dieną po sukėlimo buvo vertinamos vizualiai ir matuojamos. Pažeidimo dydis procentais buvo apskaičiuojamas lyginant su pradiniu pažeidimu pirmąją eksperimento dieną. Gauti rezultatai parodė, kad Lin^- ląstelės reikšmingai skatina odos pažeidimo gijimą visose tiriamosiose grupėse lyginant su kontrolinėmis grupėmis (4.7 ir 4.8 pav.). Literatūroje dominuoja atskirų kaulų čiulpų kamieninių ląstelių populiacijų įtakos odos audinio regeneracijai tyrimų duomenys. Kaulų čiulpų MKL poveikis pažeisto audinio ploto sumažėjimui parodytas ūminių ir lėtinių žaizdų atvejais atliekant klinikinius tyrimus. Diabeto nulemtų pėdų opų gydymas derinant tiesioginį MKL užnešimą ir injekcijas į žaizdų kraštus parodė sėkmingą prieš tai negyusių žaizdų paviršiaus ploto sumažėjimą (Vojtassák ir kt., 2006). Kitų tyrėjų klinikėse studijose kaulų čiulpų MKL kartu su fibrino geliu buvo panaudotos ūminių chirurginių ir lėtinių trauminių žaizdų gydymui. Abiem atvejais nustatytas reikšmingas žaizdų sumažėjimas, priklausantis nuo ląstelių kiekio (Falanga ir kt., 2007). Vėlesnėse studijose diabetinių žaizdų gijimui skatinti kaulų čiulpų vienbranduolių ląstelių frakcija buvo lokaliai transplantuota fibrino ir kolageno geliuose. Šiuose eksperimentuose 37% tiriamųjų žaizdos galutinai užsitraukė, likusiuose nustatytas reikšmingas žaizdų ploto sumažėjimas (Ravari ir kt., 2011). Mūsų gauti žaizdų gijimo pokyčių kinetikos rezultatai pateikiami 4.7 pav. Tarp tiriamųjų ir kontrolinių grupių statistiškai patikimi skirtumai nustatyti nuo pirmųjų gijimo dienų. Nuo 4-osios gijimo dienos, didžiausi reikšmingi skirtumai nustatyti tarp žaizdų, į kurias buvo transplantuojamos Lin^- ląstelės I tipo kolageno gelyje ir visų kontrolinių grupių. Iki 10-osios paros žaizdų dydžių skirtumai šiose grupėse pakito nuo 1.5 iki 7.6 karto. Mažiausi skirtumų pokyčiai nustatyti tarp kontrolinių grupių ir tiriamosios grupės, kurioje



4.7 pav. Odos žaizdų gijimo *in vivo* kinetika. Į visų odos sluoksnių pažeidimą buvo injekuojama PBS tirpalo (A), Lin^- ląstelių PBS tirpale (B), I tipo kolageno gelio (C), Lin^- ląstelių I tipo kolageno gelyje (D), pamatinės membranos komponentų gelio (E) arba Lin^- ląstelių pamatinės membranos komponentų gelyje (F). Grafike pateikti trijų nepriklausomų tyrimų rezultatų vidurkiai \pm SN; $p < 0.05$ lyginant su kontrole; * $p < 0.05$ lyginant žaizdas, į kurias buvo transplantuojamos ląstelės skirtingose medžiagose.

į žaizdas buvo injekuojamos Lin^- ląstelės, suspenduotomis pamatinės membranos gelyje. Tarp šių grupių skirtumai pakito nuo 1.1 iki 2.9 karto. Tarp grupių, kuriose į pažeidimus buvo transplantuojamos Lin^- ląstelės skirtingose medžiagose, iki 3-iosios paros reikšmingo žaizdų dydžių skirtumo nenustatėme. Kiti autoriai, palyginę lokaliai transplantuotų MKL įtaką žaizdos ploto sumažėjimui, nustatė, kad be pagalbinės medžiagos injekuotos ląstelės patikimai skatina gijimą tik ankstyvosiose gijimo sadijose, o transplantacijai panaudojus kolageno gelį reikšmingi skirtumai išlieka visą stebėjimo laiką (Rustad ir kt., 2012). Mūsų tyrimuose patikimi skirtumai nustatyti nuo 4-osios tyrimo paros po ląstelių transplantacijos iki eksperimento pabaigos tarp grupių, kuriose pelėms buvo transplantuojamos Lin^- ląstelės skirtingose medžiagose. Didžiausią reikšmingą skirtumą tarp tiriamųjų grupių nustatėme 10-ąją dieną. Grupėje, kurioje Lin^- ląstelės buvo injekuojamos kartu su I tipo kolageno geliu, žaizdos dydis buvo 4.2 kartais mažesnis nei ląsteles injekuojant PBS tirpale ir 5.3 kartais

mažesnis, nei po Lin^- ląstelių transplantacijos pamatinės membranos komponentų gelyje (4.7 pav.). Kitų autorių tyrimai rodo pažeisto odos audinio atsistatymo skirtumus žaizdas veikiant skirtingomis biomedžiagomis, panaudojant jas vienas arba derinant su kamieninėmis ląstelėmis. Shokrgozar ir bendraautoriai (2012) nustatė, kad žaizdos ploto sumažėjimas reikšmingai skatinamas tik panaudojant biomedžiagą su integruotomis MKL, bet ne be ląstelių (Shokrgozar ir kt., 2012). Kiti autoriai nustatė, kad I tipo kolageno gelyje integruotos ląstelės patikimai lemia iki dviejų kartų greitesnį visišką žaizdos sugijimą lyginant su pažeidimais, į kurias buvo injekuojamas gelis be ląstelių (Lin ir kt., 2008). Mūsų tyrime, žaizdos sugijimas anksčiausiai buvo nustatytas 12-ąją dieną po Lin^- ląstelių transplantacijos I tipo kolageno gelyje. Grupėse, kuriose į žaizdas buvo injekuojamos Lin^- populiacijos ląstelės, suspenduotos PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje, šiuo laiko momentu žaizdų dydžiai siekė atitinkamai $8.08 \pm 0.26\%$ ir $9.58 \pm 0.57\%$ (4.7 pav.). Šiose grupėse žaizdų nebebuvo 14-ąją dieną (4.8B ir F pav.).



4.8 pav. Odos žaizdų gijimas *in vivo*. Į visų odos sluoksnių pažeidimą buvo injekuojama PBS tirpalo (A), Lin^- ląstelių PBS tirpale (B), I tipo kolageno gelio (C), Lin^- ląstelių I tipo kolageno gelyje (D), pamatinės membranos komponentų gelio (E) arba Lin^- ląstelių pamatinės membranos komponentų gelyje (F).

Žaizdoms sugijus visose grupėse, kuriose pelėms buvo transplantuojamos Lin^- ląstelės, kontrolinėse grupėse tuo pačiu metu pažeidimo dydis beveik nesiskyrė ir siekė iki $16.83 \pm 1.99\%$ (4.8A, C ir E pav.). Kontrolinių

grupių pelių žaizdų matavimai parodė, kad skirtingos medžiagos neturi įtakos makroskopiniams vertinimo parametrams, todėl galima teigti, kad PBS tirpalas, I tipo kolagenas arba pamatinės membranos komponentų mišinys nepasižymi gijimą skatinančiomis savybėmis (4.8A, C ir E pav.). Tačiau nustatyti skirtumai tarp grupių, kuriose pelėms buvo transplantuojamos Lin^- ląstelės, leidžia manyti, kad šios medžiagos veikia transplantuojamų ląstelių aktyvumą pažeistame audinyje.

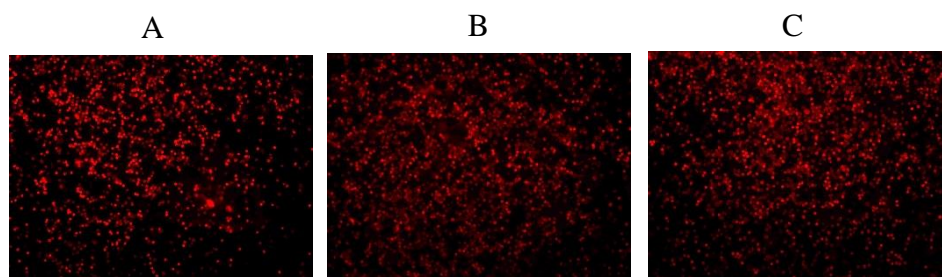
Atsižvelgiant į teigiamus rezultatus, gautus atlikus kliniškes studijas ir tyrimus su gyvūnais, kamieninių ląstelių panaudojimas pažeistos odos regeneracijai yra daug žadantis. Nepaisant to, iki šiol nėra aišku, koks transplantacijos būdas yra efektyviausias, užtikrinantis ląstelių įsitvirtinimą bei funkcijų palaikymą pažeistame audinyje. Reikalingi išsamūs tyrimai, kurie parodytų ilgalaikį ląstelių terapijos poveikį ir leistų išaiškinti, kokiuose specifiniuose procesuose pažeisto audinio mikroaplinkoje gali dalyvauti transplantuotos ląstelės (Dabiri ir kt., 2013). Šių klausimų išaiškinimui atliekami intensyvūs tyrimai, tačiau literatūroje trūksta palyginamųjų studijų, įvertinančių kaulų čiulpų daugiafunkcinių ląstelių populiacijos poveikio odos žaizdų gijimui efektyvumą, priklausantį nuo transplantacijai pasirinktų biomedžiagų.

Įvertinę makroskopinius odos pažeidimo gijimo parametrus ir nustatę reikšmingus skirtumus tarp tiriamųjų ir kontrolinių grupių, atlikome histologinę gyjančio audinio analizę. Šiam tikslui skirtingais laiko momentais paėmėme gyjančio audinio pavydžius ir paruošėme histologinius preparatus. Fluorescencinės mikroskopijos metodu įvertinome žymėtų ląstelių integraciją pažeistame audinyje. Morfologiniams audinio pokyčiams gijimo metu nustatyti histologiniai pavyzdžiai buvo dažomi naudojant skirtingus histocheminius metodus.

4.3.2. Lin^- ląstelių integracijos pažeidimo židinyje įvertinimas

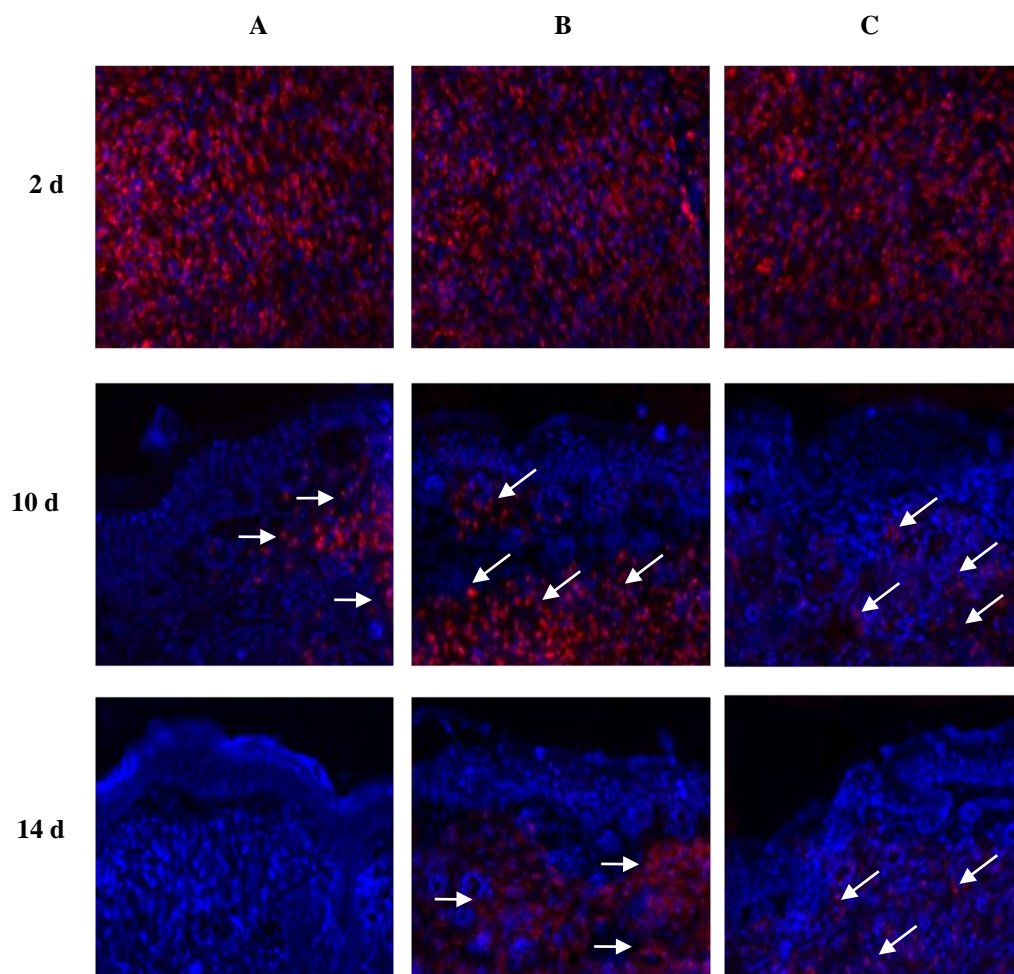
Transplantuotų ląstelių integracija pažeidimo židinyje lemia gijimo efektyvumą. Dažna problema ląstelių terapijoje yra silpnas transplantuotų ląstelių įsitvirtinimas pažeistame audinyje, dėl to jos apoptuoja arba migruoja iš

pažeidimo židinio ir nedalyvauja audinio regeneracijoje (Wong ir kt., 2013). Problemos sprendimo būdams surasti, kritinis žingsnis yra ne tik ląstelių šaltinio pasirinkimas, bet ir pagalbinių medžiagų, kurios būtų tinkamos ląstelių transplantacijai bei užtikrintų efektyvią audinio regeneraciją, tyrimai (Yeum ir kt., 2012). Mūsų eksperimentuose, prieš transplantaciją Lin^- ląstelės buvo žymimos membraniniu fluorescuojančiu dažu PKH26, kuris tinkamas ilgalaikiam gyvų ląstelių sekimui *in vivo* sąlygomis. Pažymėtos Lin^- ląstelės, suspenduotos PBS tirpale, I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų geliuose, sudarė vienalytes suspensijas, kurios buvo injekuojamos į visų odos sluoksnių pažeidimus (4.9 pav.).



4.9 pav. Kaulų čiulpų Lin^- ląstelių pasiskirstymas transplantacijai naudojamoje medžiagoje. Fluorescuojančiu membraniniu dažu PKH26 pažymėtos Lin^- ląstelės, pasiskirsčiusios PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) ir pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Didinimas $\times 100$.

Fluorescencinės mikroskopijos metodu nustatėme, kad Lin^- ląstelės pradinėse gijimo stadijose įsitvirtina pažeistame audinyje, nepriklausomai nuo to, kokioje medžiagoje suspenduojamos prieš transplantaciją (4.10 pav.). Stebėdami ląstelių integraciją pažeidimo židinyje visą gijimo laiką, nustatėme, kad skirtingos medžiagos, panaudotos Lin^- ląstelių injekcijai, lemia nevienodą šių ląstelių išlikimo trukmę ir pasiskirstymą gyjančiame audinyje. Histologiniuose pavyzdžiuose žymėtų ląstelių aptikome iki 10 paros visose tiriamosiose grupėse. Vėlesniais laiko momentais gyjančio audinio biopsijose Lin^- ląstelių nebeaptikome žaizdose, į kurias ląstelės buvo injekuojamos PBS tirpale. Grupėse, kuriose pelėms Lin^- populiacijos ląstelės į pažeidimus buvo suleidžiamos su I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų geliais,



4.10 pav. Transplantuotų Lin^- ląstelių integracija pažeistame audinyje. Išgrynintos ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Preparatai dažyti DAPI (mėlyna spalva), transplantuotos ląstelės žymėtos PKH26 dažu (nurodytos rodyklėmis; raudona spalva) kaip nurodyta skyriuje Metodai. Didinimas $\times 100$.

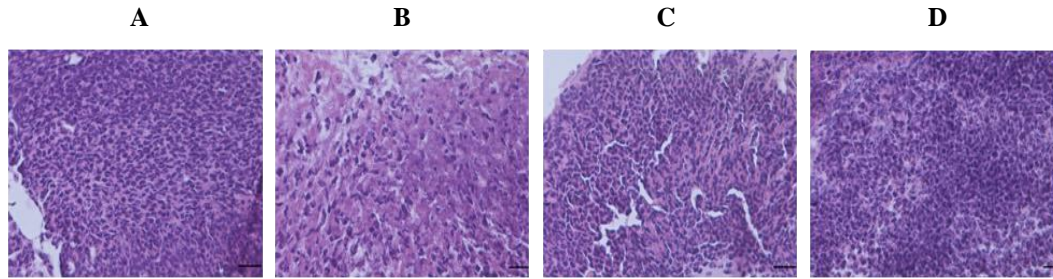
žymėtų ląstelių gyjančiuose audiniuose buvo iki paskutiniosios eksperimento dienos (4.10B ir C pav.). Literatūroje yra prieštaringų duomenų apie kamieninių ląstelių integraciją pažeidimo židinyje. Kiti autoriai, atlikę palyginamuosius tyrimus, kuriuose kaulų čiulpų MKL buvo injekuojamos į skirtingų tipų pažeidimus, nustatė, kad teigiamas efektas išlieka ir po to, kai pažeidimo židinyje transplantuotų ląstelių nebeaptinkama. Šie autoriai nustatė, kad injekuotos ląstelės pažeidimo židinyje sukuria mikroaplinką, į kurią pritraukiamos paties organizmo MKL ir pirmtakai, todėl pažeistame audinyje nebelikus transplantuotų ląstelių ir toliau vyksta audinio regeneracija (Shin ir Peterson, 2013). Priešingus rezultatus gavo kita tyrėjų grupė, kurios

eksperimentuose riebalinio audinio MKL į pelių odos pažeidimus buvo transplantuojamos PBS tirpale arba su kolagenine atramine medžiaga. Pastaruoju būdu transplantuotos ląstelės pasižymėjo aktyvesne proliferacija ir ilgalaikiu įsitvirtinimu pažeidimo židinyje. Tuo pačiu metu transplantuotos kamieninės ląstelės be atraminės medžiagos pažeistame audinyje neįsitvirtindavo (Lam ir kt., 2013). Kiti tyrėjai nustatė, kad su kolageno geliu transplantuotos kaulų čiulpų ląstelės gyjančiame audinyje keičia savo buvimo vietą. Ankstyvaisiais gijimo etapais Lin^{-} ląstelės buvo aptinkamos arti žaizdos paviršiaus, o vėlesniais – giliuosiuose pažeisto audinio sluoksniuose (Lin ir kt., 2008). Mūsų tyrime iki 7-osios stebėjimo paros visose grupėse žymėtos kaulų čiulpų Lin^{-} ląstelės buvo tolygiai pasiskirsčiusios pažeistame audinyje. Grupėje, kurioje į žaizdas Lin^{-} ląstelės buvo injekuojamos PBS tirpale, 10-ąją parą didžioji dalis ląstelių buvo lokalizuotos žaizdos periferinėje dalyje (4.10A pav.). 14-ąją tyrimo dieną, grupėse, kuriose Lin^{-} ląstelės buvo transplantuojamos skirtinguose geliuose, žymėtos ląstelės atsinaujinusioje dermoje buvo išsidėsčiusios pavienėmis grupelėmis (4.10B ir C pav.).

Nustatėme, kad Lin^{-} ląstelių įsitvirtinimas ir pasiskirstymas pažeidimo židinyje priklauso nuo transplantacijai naudojamos medžiagos. Morfologinius pokyčius po Lin^{-} ląstelių transplantacijos gyjančiame audinyje įvertinome panaudoję skirtingus histocheminius metodus.

4.3.3. Lin^{-} ląstelių įtakos pažeisto odos audinio atsistatymui įvertinimas

Pažeidus audinį, nedelsiant aktyvinamas uždegiminis atsakas, kurio metu iš žaizdos mikroaplinkos pašalinami svetimkūniai, užkertamas kelias infekcijoms ir nulemiamos vėlesnės gijimo reakcijos. Užsitęsęs uždegimas gali lemti lėtinių žaizdų atsiradimą bei intensyvų randėjimą (Eming ir kt., 2007; Li ir kt., 2007). Mūsų gauti rezultatai parodė, kad, praėjus parai po žaizdos sukėlimo, visų grupių pelių pažeistame audinyje vyksta uždegimas. Vertinant uždegiminių ląstelių infiltraciją pažeistame audinyje nustatėme, kad, priklausomai nuo ląstelių transplantacijai pasirinktos medžiagos, uždegimas žaizdoje skirtingai išreikštas (4.11 pav.).

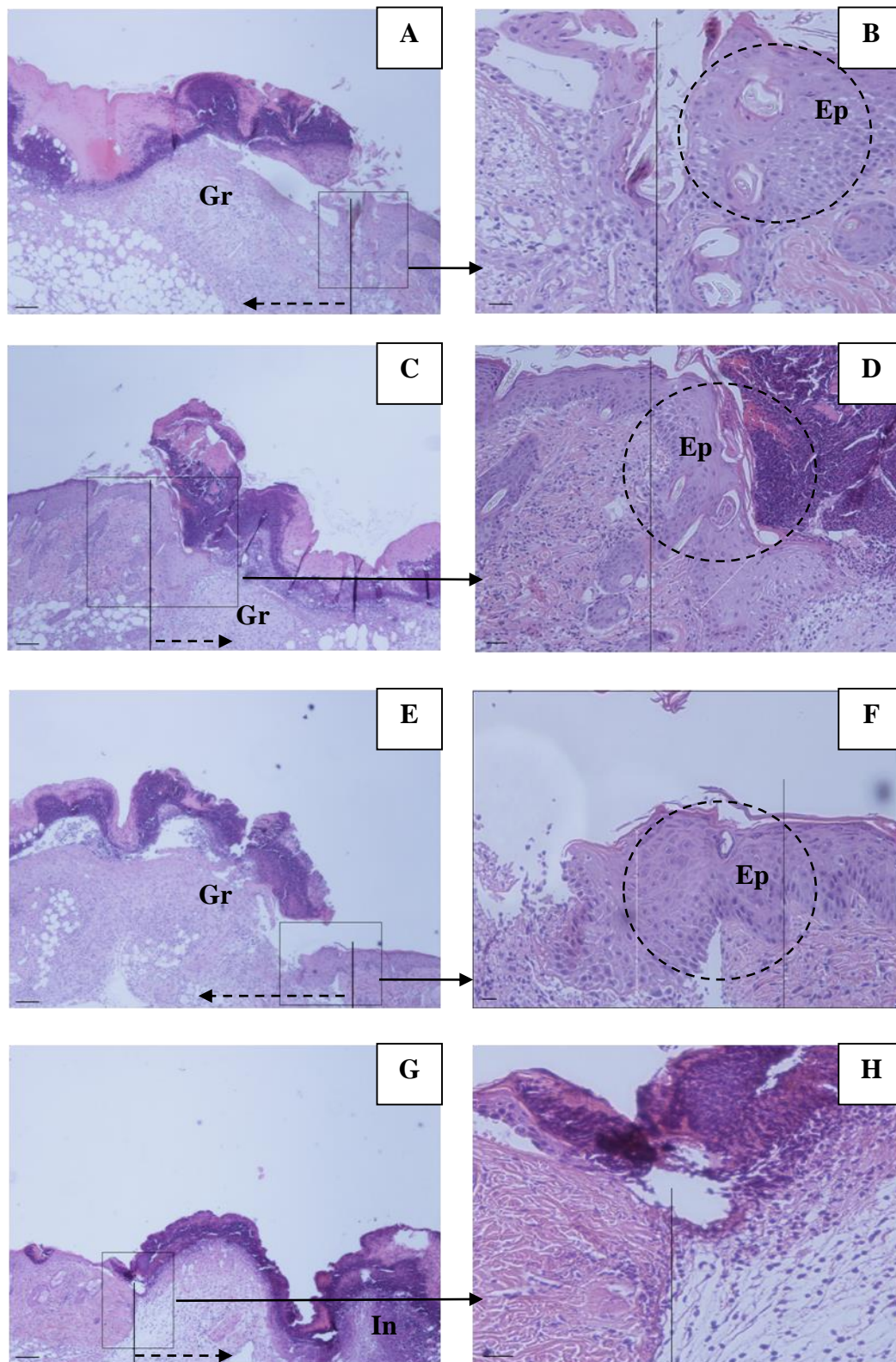


4.11 pav. Uždegiminių ląstelių infiltracija pažeidimo židinyje po 1 dienos. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). (D) Kontrolinė grupė. Dažymas H&E. Didinimas $\times 400$.

Silpniausiai išreikštas uždegimas nustatytas žaizdose, į kurias Lin⁻ ląstelės buvo transplantuojamos I tipo kolageno gelyje (4.11B pav.). Grupėse, kuriose pelėms buvo injekuojamos ląstelės, suspenduotos PBS tirpale (4.11A pav.) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (4.11C pav.), pažeisti audiniai buvo gausiai infiltruoti uždegiminėmis ląstelėmis ir nesiskyrė nuo kontrolinės grupės (4.11D pav.). Literatūros duomenimis, vienas iš kamieninių ląstelių teigiamą poveikį pažeidimų atsistatyme lemiančių veiksnių yra jų priešuždegiminės savybės (Biziulevičienė ir kt., 2007). Kaulų čiulpų kamieninių ląstelių priešuždegiminis poveikis intensyviai tiriamas taikant skirtingus uždegimo modelius. Hemopoetinės linijos nediferencijuotų ląstelių vaidmuo uždegimo metu visų pirma svarbus tuo, kad iš šių ląstelių išsivysto subrendusios imunokompetentinės ląstelės (Oguro ir Iwama, 2007). Literatūroje yra duomenų, kad HKL gebėjimas dalyvauti uždegimo reakcijose yra trumpalaikis, o lėtinis uždegimas šioms ląstelėms gali būti pražūtingas (Schuettpelz ir Link, 2013). Skirtinguose uždegimo modeliuose parodytas priešuždegiminis MKL veikimas. Nustatyta, kad šios ląstelės ankstyvosiose uždegimo reakcijose reikšmingai mažina uždegiminių citokinų IL-1, IL-6 ir TNF- α kiekius, kurie indukuoja ląstelių apoptozę ir stabdo gijimo reakcijas (Zhang ir kt., 2013). Kiti autoriai parodė, kad MKL pasižymi savybe uždegimo reakcijose slopinti limfocitų populiacijų proliferaciją ir aktyvinimą, taip sumažindamos atmetimo reakcijų riziką ir prailgindamos transplantato išgyvenimą (Bartholomew ir kt., 2002). Specifinės nediferencijuotų ląstelių funkcijos ankstyvosiose odos

pažeidimų gijimo reakcijose nėra išaiškintos (Chen ir kt., 2009). Mūsų tyrimuose vertinant uždegiminių ląstelių infiltraciją pažeidimo židinyje skirtumai tarp gyjančių žaizdų, į kurias Lin^- ląstelės buvo injekuojamos I tipo kolageno gelyje ir kitų tiriamųjų grupių buvo nustatyti tik ankstyvosiose gijimo stadijose. Praėjus 3 paroms po ląstelių transplantacijos, visose tiriamosiose grupėse, atvirkščiai nei kontrolinėse, pažeistuose audiniuose pastebimos uždegiminių ląstelių infiltracijos nebenustatyta. Ankstyva uždegimo stadijos baigtis leidžia progresuoti vėlesnėms gijimo stadijoms, sumažėjusi uždegiminių ląstelių infiltracija pažeidimo židinyje gali lemti audinio regeneraciją be rando formavimosi.

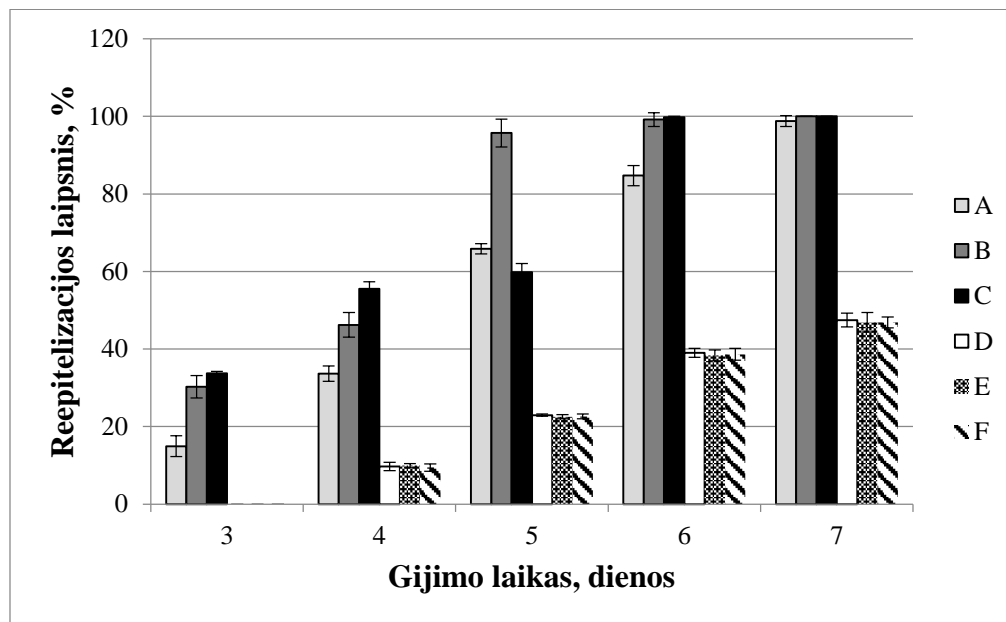
Trečiąją parą po Lin^- ląstelių transplantacijos pažeistame audinyje buvo prasidėjusi proliferacijos stadija (4.12 pav.). Šios gijimo stadijos metu formuojasi granulinis audinys, vyksta angiogenezė bei reepitelizacijos procesas, kurio metu atstatomas apsauginis epiderminis barjeras tarp organizmo ir išorinės aplinkos (Braiman-Wiksmann ir kt., 2007). Pažeistuose audiniuose po ląstelių transplantacijos PBS tirpale (4.12A pav.), I tipo kolageno gelyje (4.12C) bei pamatinės membranos komponentų gelyje (4.12E pav.) buvo nustatytas ankstyvas granulinis audinys, kuriame dominuojančios ląstelės buvo makrofagai ir maža dalis limfocitų, tačiau neturintis pastebimai išreikšto besiformuojančių kraujagyslių tinklo. Mūsų eksperimentuose, 3-iąją parą po pažeidimo sukėlimo, visose tiriamosiose grupėse nustatyta reepitelizacijos proceso pradžia (4.12B, D ir F pav.). Žaizdų, į kurias Lin^- populiacijos ląstelės buvo transplantuojamos kartu su pamatinės membranos komponentų geliu arba PBS tirpalu, kraštuose matomas hiperplastinis epidermis, apibūdinantis padidėjusią reepitelizacijos procese dalyvaujančių ląstelių proliferaciją (4.12D ir F pav.). Grupėje, kurioje į pelių odos pažeidimus Lin^- ląstelės buvo transplantuojamos I tipo kolageno gelyje, besiformuojantis epidermis tolygiai pasiskirstęs padengtoje žaizdos paviršiaus dalyje ir yra nulemtas intensyvesnės ląstelių migracijos (4.12B pav.). Žaizdose, į kurias nebuvo injekuojamos ląstelės, 3-iąją gijimo parą nustatytas uždegimas buvo stipriai išreikštas centrinėje žaizdos dalyje ir silpniau periferinėje (4.12G), o reepitelizacijos procesas nebuvo prasidėjęs (4.12H pav.).



4.12 pav. Odos audinio gijimas po 3 dienų. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A, B), I tipo kolageno gelyje (C, D) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (E, F). (G, H) Kontrolinė grupė. Dažymas H&E. Didinimas $\times 40$ (kairėje) ir $\times 100$ (dešinėje). Santrumpos: Ep – epidermis; Gr – granuliniis audinys; In – uždegiminių ląstelių infiltracija. Punktyrinė rodyklė nurodo žaizdos sritį. Punktyrinis apskritimas pažymi žaizdos kraštuose prasidėjusį epitelizacijos procesą.

Mūsų tyrimuose taip pat buvo vertinama reepitelizacijos proceso *in vivo* kinetika, nuo 3-iosios paros hematoksilinu ir eozinu nudažytuose histologiniuose pavyzdžiuose matuojant besiformuojantį epidermį žaizdos paviršiuje. Eitelizacijos laipsnis buvo apskaičiuojamas pagal pradiniu matavimo momentu gautą rezultatą ir išreiškiamas procentais. Literatūros duomenimis, kaulų čiulpų kamieninės ląstelės reepitelizacijos procesą skatina ūminėse ir lėtinėse žaizdose. Kitų autorių eksperimentuose nustatyta, kad lokaliai transplantuotos MKL lemia iki dviejų kartų greitesnį žaizdos pasidengimą nauju epidermiu nei kontrolinėse grupėse (Mishra ir kt., 2012). Tyrėjų grupė, kurios eksperimentuose į pelių odos žaizdas buvo transplantuojamos riebalinio audinio kamieninės ląstelės, integruotos sudėtinėje kolageno ir silikono membranoje, nustatė uždelstą reepitelizacijos procesą. Lyginant su kontrolinėmis žaizdomis, iki 1.5 karto didesnis reepitelizacijos laipsnis po ląstelių transplantacijos buvo nustatytas tik vėlesniuose gijimo etapuose laipsnis (Nambu ir kt., 2009). Priešingus rezultatus gavo tyrėjai, eksperimentuose panaudoję fibrino ir kolageno mišinį kaulų čiulpų MKL bei amnioninio skysčio kamieninėms ląstelėms transplantuoti. Jie nustatė, kad reepitelizacijos laipsnis po ląstelių transplantacijos yra iki 2 kartų didesnis nuo ankstyvųjų gijimo stadijų ir išlieka visą stebėjimo laiką (Skardal ir kt., 2012). Mūsų eksperimentuose žaizdų paviršius nauju epidermiu greičiausiai pasidengė po Lin^{-} ląstelių transplantacijos I tipo kolageno gelyje. Šioje grupėje reepitelizacijos procesas buvo baigtas 5-ąją parą po pažeidimo. Tuo pačiu metu grupėse, kuriose Lin^{-} ląstelės buvo transplantuojamos PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje, naujas epidermis dengė atitinkamai $65.85 \pm 1.29\%$ ir $59.83 \pm 2.22\%$ žaizdų paviršiaus. Šiose grupėse reepitelizacija buvo pasibaigusi 7-ąją gijimo dieną. Lyginant su kontrolinėmis grupėmis, audiniuose po Lin^{-} ląstelių transplantacijos reikšmingas skirtumas nustatytas visais matavimo momentais. Reepitelizacijos greitis skirtingomis dienomis tiriamosiose grupėse buvo nuo 2.1 iki 5.7 karto didesnis nei kontrolinėse žaizdose. Kontrolinėse grupėse pažeidimai nauju epidermiu pasidengė iki 11-osios eksperimento dienos. Tarp žaizdų, į kurias buvo injekuojama PBS tirpalo,

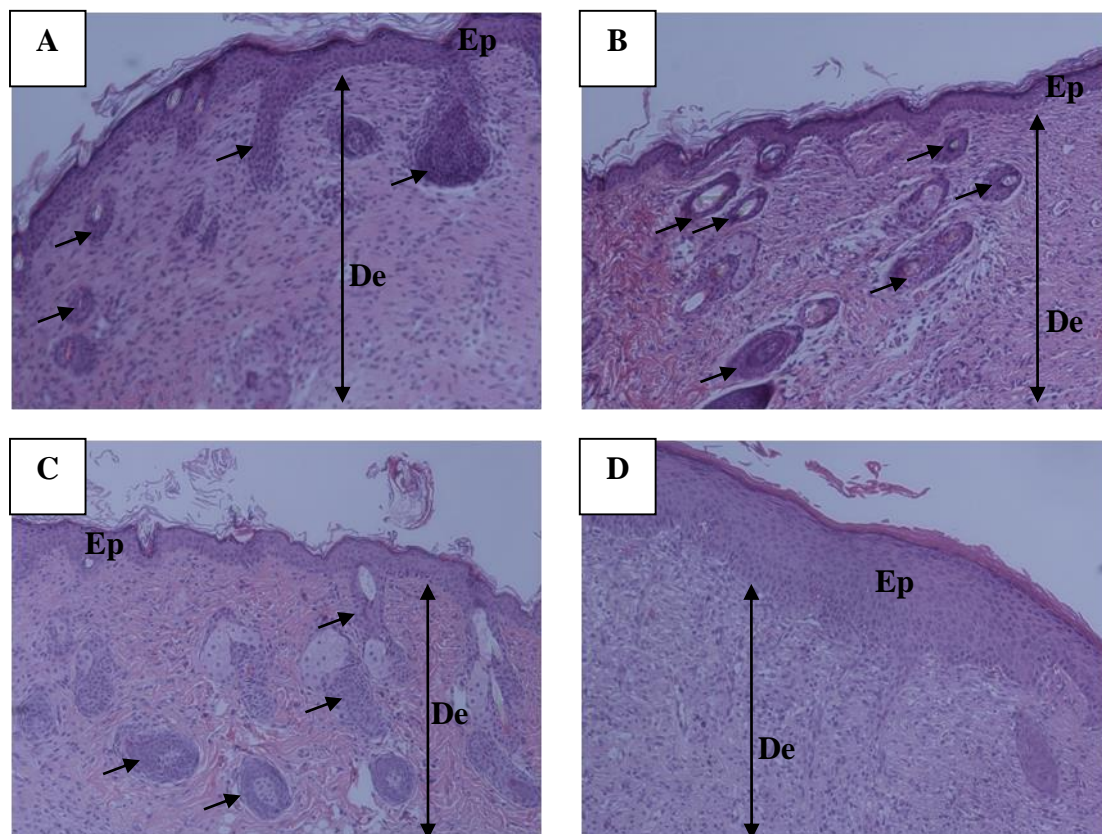
I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų gelių be Lin⁻ ląstelių, visą stebėjimo laiką reikšmingų skirtumų nenustatyta (4.13 pav.).



4.13 pav. Naujo epidermio formavimasis žaizdos paviršiuje. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Kontrolinėse grupėse į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo (D), I tipo kolageno gelio (E) arba pamatinės membranos komponentų gelio (F). Grafike pateikti trijų nepriklausomų tyrimų rezultatų vidurkiai \pm SN; $p < 0.05$ lyginant skirtingų grupių pelių žaizdas.

Odos pažeidimų, kurių metu prarandami visi audinio sluoksniai, gijimas dažnai pasibaigia nepilnos audinio struktūros ir dalinių funkcijų atsistatymu (Reinke ir Song, 2012). Literatūros duomenimis, skirtingų tipų kamieninės ląstelės skatina ne tik ankstyvuosius žaizdų gijimo etapus, reikalingus pirminiam apsauginiam barjerui atkurti, bet ir gali prisidėti prie odos audinio papildomų struktūrų, reikalingų pilnavertėms funkcijoms, susiformavimo (Prabhakaran ir kt., 2012). Sėkmingas regeneracijos procesas priklauso ne tik nuo naudojamų ląstelių, bet ir medžiagų pasirinkimo jų lokalizavimui pažeidimo židinyje. Kiti tyrėjai nustatė, kad ląstelės, žaizdos paviršiuje lokalizuotos kartu su dermos tarpląstelinės medžiagos komponentų pagrindu sukurta matrica, atsinaujinančiame audinyje reikšmingai skatina kraujagyslių tinklo formavimąsi. Žaizdos, į kurias buvo transplantuojamos riebalinio audinio ląstelės su silikono membrana, pasižymėjo uždelstu

reepitelizacijos procesu, sutrikusiu granulinio audinio ir kraujagyslių tinklo formavimusi (Huang ir kt., 2012). Mūsų eksperimentuose, 12-ąją dieną po Lin⁻ ląstelių transplanatacijos, atsinaujinusio audinio dermoje buvo susiformavusios pagalbinės odos struktūros (4.14 pav).



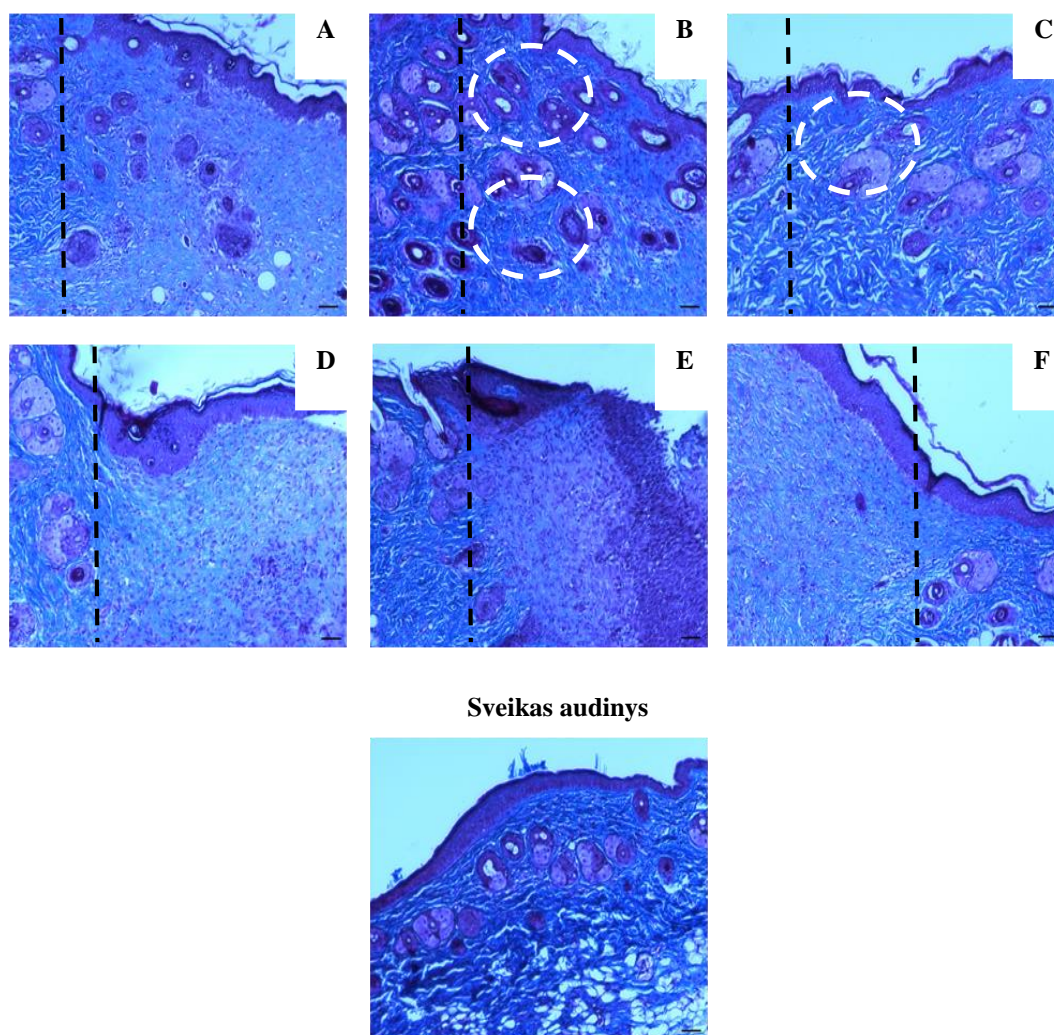
4.14 pav. Odos audinio gijimas po 12 dienų. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). (D) Kontrolinė grupė. Dažymas H&E. Didinimas $\times 100$. Santrumpos: De – derma; Ep – epidermis. Rodyklės nurodo pagalbinės audinio struktūras.

Nustatėme, kad atsinaujinusioje dermoje pagalbinių struktūrų išsidėstymas priklauso nuo to, kokioje medžiagoje ląstelės buvo transplantuojamos. Grupėje, kurioje pelėms buvo injekuojamos Lin⁻ ląstelės PBS tirpale, pavienės struktūros išsidėsčiusios periferinėje atsinaujinusio audinio dalyje ir arčiau epidermio (4.14A pav.). Visame dermos plote besiformuojantys odos priedai pasiskirstę grupėse, kuriose į žaizdas buvo transplantuojamos ląstelės I tipo kolageno gelyje (4.14B pav.) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (4.14C pav.). Tačiau pastarojoje grupėje tankesnis atsinaujinusių struktūrų išsidėstymas

lyginant su centrine žaizdų dalimi nustatytas taip pat periferinėje dalyje. Odos priedų pasiskirstymas dermoje susijęs su skirtingu Lin^- ląstelių įsitvirtinimu pažeidimo židinyje po transplantacijos. Visose grupėse, kuriose pelėms buvo injekuojamos ląstelės, 12-ąją parą susiformavęs sveikam audiniui prilygstantis diferencijuoto epidermio sluoksnis. Šiuo metu kontrolinėse grupėse pažeidimo židinyje esantis granulinis audinys ir platus nediferencijuoto epidermio sluoksnis apibūdina dar nepasibaigusią proliferacijos stadiją (4.14D pav.).

Dermos tarpląstelinės medžiagos atsinaujinimas gyjant visų odos sluoksnių pažeidimams lemia galutines audinio struktūrinės ir funkcinės savybes (Diegelmann ir Evans, 2004). Mūsų tyrime buvo vertinamas pagrindinio dermos tarpląstelinės medžiagos komponento kolageno formavimasis (4.15 pav.). Kaulų čiulpų ląstelių vaidmuo pažeisto audinio tarpląstelinės medžiagos formavimuisi vertinamas prieštaringai. Mori su grupe pelių odos pažeidimo modelyje parodė, kad atsinaujinant dermai didžioji dalis (iki 62%) ląstelių, atsakingų už tarpląstelinės medžiagos komponentų sekreciją pažeidimo židinyje, yra kilusios iš kaulų čiulpų nediferencijuotų ląstelių (Mori ir kt., 2005). Priešingus rezultatus gavo Higashiyama su grupe. Šie autoriai parodė, kad pagrindinis tarpląstelinės medžiagos komponentų šaltinis gyjant odos žaizdoms yra dermoje reziduojančios ląstelės, o kaulų čiulpų ląstelių vaidmuo kolageno produkavime nebuvo patvirtintas (Higashiyama ir kt., 2011). Mūsų eksperimentuose, kolageno skaidulos atsinaujinusio audinio dermoje nustatytos 14-ąją dieną po ląstelių transplantacijos skirtingose medžiagose. Grupėje, kurioje Lin^- ląstelės buvo transplantuotos PBS tirpale, tarpląstelinėje medžiagoje visame dermos plote pastebimos plonos, horizontaliai išsidėsčiusios kolageno skaidulos (4.15A pav.). Lyginant su sveiko audinio tarpląstelinės medžiagos išsidėstymu, šioje grupėje matoma nebaigta kolageno brendimo stadija. Po ląstelių transplantacijos I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų gelyje, dermoje susiformavusios tvirtos, intensyviai nusidažiusios kolageno skaidulos (4.15B ir C pav.), rodančios brandesnę tarpląstelinę kolageną. Tačiau grupėje, kurioje Lin^- ląstelės buvo transplantuojamos su pamatinės membranos komponentų geliu, centrinėje atsinaujinusios dermos dalyje, kolageno skaidulos linkusios formuoti

tinklines struktūras, kurios būdingos randiniam audiniui (4.15B pav.). Literatūroje yra duomenų apie kamieninių ląstelių įtaką dermos kolageno atsinaujinimui, tačiau neaišku, koku keliu transplantuotos ląstelės veikia šį procesą. Keletas skirtingų tyrėjų eksperimentų parodė, kad į visų odos sluoksnių pažeidimus transplantuotos MKL skatina kolageno produkciją stimuliuodamos endogeninių fibroblastų proliferaciją ir migraciją pažeidimo židinyje parakrininiu keliu, o ne veikdamos tiesiogiai. Parodyta, kad šios ląstelės, transplantuotos panaudojant dermos komponentų pagrindu suformuotas biomedžiagas, reikšmingai skatina kolageno atsinaujinimą vėlyvuosiuose gijimo etapuose lyginant su žaizdomis, į kurias ląstelės transplantuojamos be pagalbinės medžiagos (Nie ir kt., 2009; Meruane ir kt., 2012). Kiti autoriai nustatė, kad transplantuotos kaulų čiulpų kamieninės ląstelės pasižymi ilgalaikiu poveikiu žaizdos mikroaplinkoje ir atsinaujinančioje dermoje teigiamai veikia kolageno depoziciją. Lyginant su audinio endogeninėmis ląstelėmis, kurios atsakingos už tarpląstelinės medžiagos formavimąsi, po kaulų čiulpų ląstelių transplantacijos pasiekiamas natyviame audiniui artimas kolageno išsidėstymas ir slopinamas randėjimo procesas (Fathke ir kt., 2004). Mūsų tyrime atsinaujinančioje dermoje 14-ąją parą po Lin^{-} ląstelių transplantacijos skirtingose biomedžiagose nustatytas tarpląstelinės medžiagos kolageno formavimasis (4.15A, B ir C pav.). Tuo pačiu metu grupėse, kuriose pelėms į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo, I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų gelių be ląstelių, matomas susiformavęs granulinis audinys, kuriame natyviame audiniui būdingų kolageno skaidulų nenustatėme (4.15D, E ir F pav.). Gauti rezultatai parodo, kad panaudotos medžiagos neskatina žaizdos mikroaplinkoje esančių endogeninių ląstelių poveikio tarpląstelinės medžiagos atsistatymui, tačiau turi įtakos transplantuojamų kaulų čiulpų ląstelių aktyvumui atsinaujinant pažeistos odos dermai.

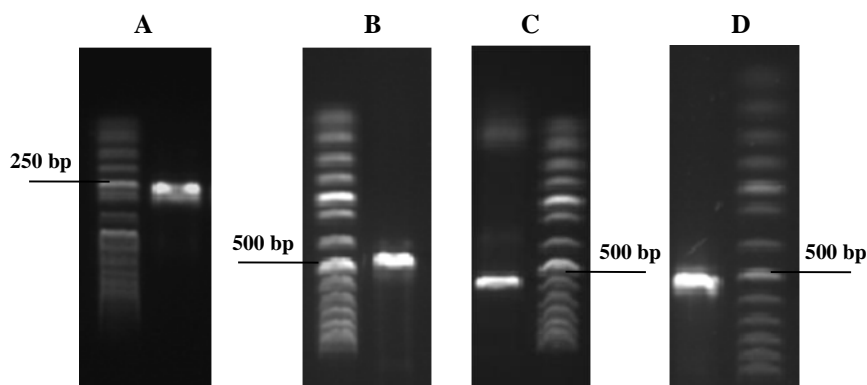


4.15 pav. Tarpląstelinės medžiagos išsidėstymas atsinaujinusiame odos audinyje. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Kontrolinėse grupėse į pažeidimus buvo injekuojama po 100 μ l PBS tirpalo (D), I tipo kolageno gelio (E) arba pamatinės membranos komponentų gelio (F). Dažymas Masson trichromo histocheminiu metodu. Didinimas $\times 100$. Punktyrinė linija nurodo ribą tarp sveiko audinio ir žaizdos. Apskritimas pažymi sritis, kuriose kolagenas formuoja natyviame audiniui būdingas skaidulas.

Gyjančio audinio histologinės analizės metu nustatyti pokyčiai galėjo būti nulemti mikroaplinkoje esančių citokinų, kurių raiškai įtakos galėjo turėti transplantuotos ląstelės. Tam įvertinti pasirinkome kiekybinį realaus laiko PGR metodą. Skirtingais odos gijimo momentais paimtuose audinio pavyzdžiuose buvo vertinami citokinų, svarbių regeneracijos procesui, genų raiškos pokyčiai.

4.3.4. Lin^{-} ląstelių poveikis citokinų genų raiškai

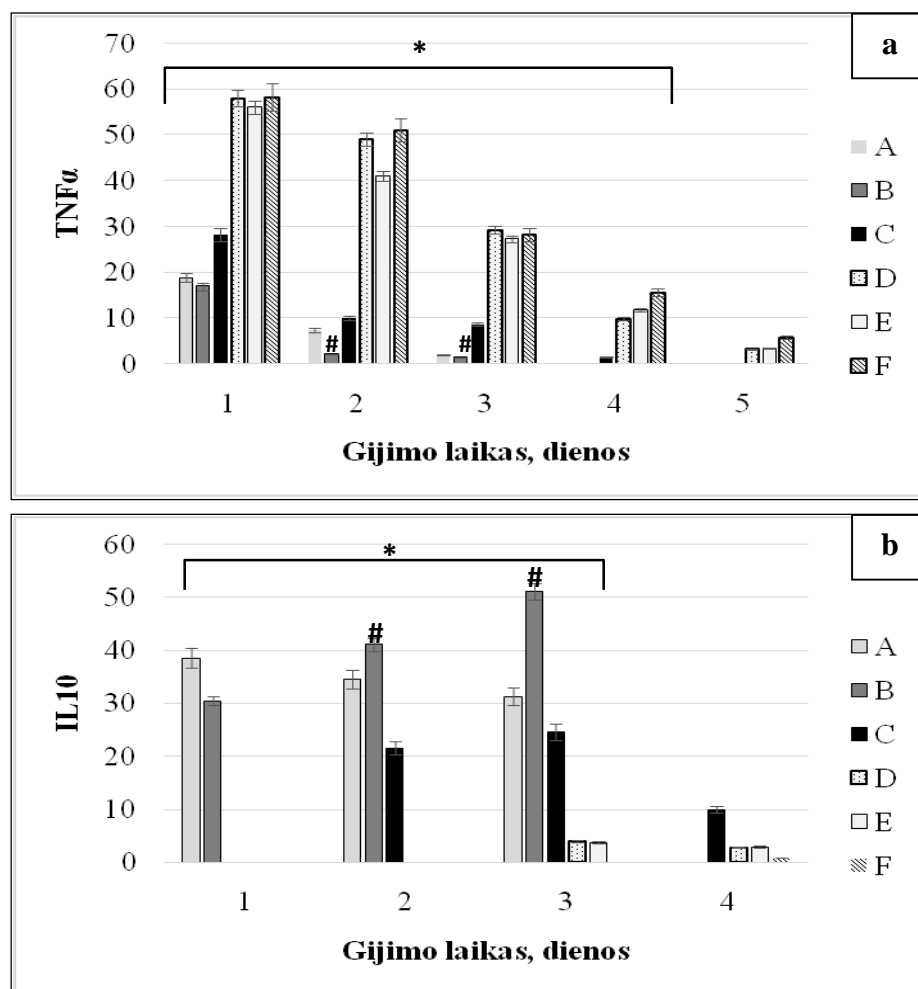
Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas kamieninių ląstelių autokrininiam bei parakrininiam veikimui. Manoma, kad šios ląstelės gali sekretuoti veiksnius, kurie pažeidimo židinyje kontroliuoja mikroaplinkos molekulių ir audinio ląstelių sąveikas, veikia jų proliferaciją, migraciją, dalyvauja uždegimo reakcijose ir tarpląstelinės medžiagos organizavime, pasižymi angiogenezės proceso skatinimu (Gnecchi ir kt., 2008; Baraniak ir McDavid, 2010). Mūsų darbe buvo tiriami citokinų TGF- β , VEGF, IL-10 ir TNF- α genų raiškos pokyčiai gyjančiame audinyje. Taikant realaus laiko PGR metodą, citokinų genų raiškos pokyčiai gyjančiame audinyje buvo vertinami pagal jų raišką sveikame audinyje. Amplifikuoto produkto dydis patvirtintas po elektroforezės 1.2% agarozės gelyje (4.16 pav.).



4.16 pav. Tiriamųjų genų produktų elektroforetinė analizė. Gauti TGF- β (A), VEGF (B), TNF- α (C) ir IL-10 (D) genų produktų dydžiai atitinka teoriškai išskaičiuotus 241 bp, 457 bp, 511 bp ir 534 bp atitinkamai.

Pradinėse žaizdų gijimo stadijose svarbus pusiausvyros palaikymas tarp uždegiminių ir priešuždegiminių citokinų, užtikrinantis laiku prasidedančias ir pasibaigiančias proceso reakcijas, lemia nuoseklų ir sėkmingą naujo audinio formavimąsi (Behm ir kt., 2012). Mūsų tyrimuose buvo vertinama uždegiminio citokino TNF- α ir priešuždegiminio citokino IL-10 genų raiška gyjančiame audinyje (4.17 pav.). Kiti autoriai atliko tyrimus, kuriuose į pelių odos pažeidimus buvo transplantuojamos fibrino gelyje inkapsuluotos HKL. Gyjančio audinio mėginiuose buvo tiriama citokinų, dalyvaujančių uždegimo

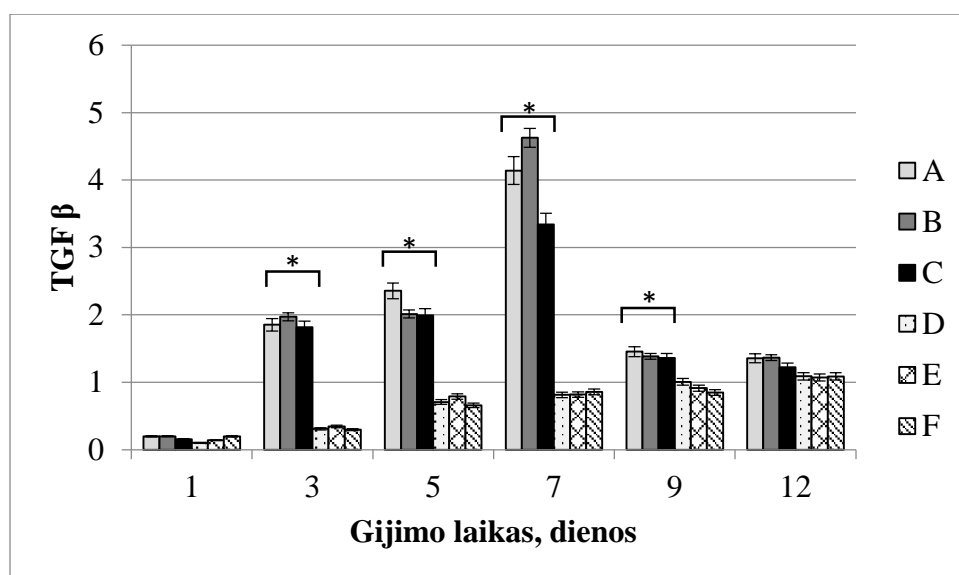
reakcijose, raiška. Nustatyta, kad ankstyvosiose gijimo stadijose transplantuotos ląstelės, lyginant su kontrolinėmis grupėmis, reikšmingiausiai slopina uždegiminio TNF- α sekreciją, tačiau patikimai neskatina priešuždegiminio IL-10 kiekio pažeidimo židinyje (Pedroso ir kt., 2011). Mes nustatėme, kad po Lin⁻ ląstelių transplantacijos pradinėse gijimo stadijose reikšmingai kinta abiejų citokinų, IL-10 ir TNF- α , genų raiška (4.17).



4.17 pav. Uždegime dalyvaujančių citokinų genų raiškos pokyčiai gyjančiame audinyje. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Kontrolinėse grupėse į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo (D), I tipo kolageno gelio (E) arba pamatinės membranos komponentų gelio (F). Citokinų TNF- α (a) ir IL-10 (b) mRNR kiekybinis vertinimas atliktas realaus laiko PGR metodu. Tiriamojo geno raiškos lygis normalizuotas pagal β -aktino raišką ir kiekybiškai įvertintas pagal vidutinę C_t (slenkstinis ciklas) vertę. Rezultatai išreikšti kaip mRNR raiškos žaizdose ir sveikame audinyje santykis. * $p < 0.05$ lyginant su kontrole; # $p < 0.05$ lyginant su žaizdomis, į kurias buvo transplantuojamos ląstelės PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje.

Uždegiminio citokino TNF- α raiška, lyginant su kontrolinėmis grupėmis, po 1-osios dienos buvo sumažėjusi nuo 2 kartų grupėje, kurioje ląstelės transplantuotos pamatinės membranos komponentų gelyje, iki 3.5 kartų po ląstelių transplantacijos kolageno gelyje. Didžiausias skirtumas nustatytas 2-ąją dieną po Lin⁻ ląstelių transplantacijos kolageno gelyje. Šioje grupėje TNF- α raiška audinyje buvo 22 kartus mažesnė nei į žaizdas netransplantuojant ląstelių ir iki 5 kartų mažesnė nei po transplantacijos kitose medžiagose suspenduotomis ląstelėmis. Reikšmingai sumažėjusi raiška gyjančiame audinyje po Lin⁻ ląstelių transplantacijos išliko iki 4-osios tyrimo dienos (4.17a pav.). Kitų autorių parodytas kaulų čiulpų kamieninių ląstelių vaidmuo slopinant TNF- α produkciją pažeidimo židinyje lemia šių ląstelių tyrimus, norint jas panaudoti lėtinėms žaizdoms, kurių uždelstas gijimas tiesiogiai susijęs su padidėjusia ilgalaikė šio uždegiminio citokino raiška (Aggarwal ir Pittenger, 2005). Kanji su grupe tyrimuose *in vitro* ir *in vivo* parodė, kad virkštelės kraujo HKL priešūždegiminės savybės susijusios su padidėjusia IL-10 sekrecija. Šie autoriai *in vitro* sąlygomis parodė, kad HKL stimuliuojant uždegiminiu citokinu TNF- α , priešūždegiminio IL-10 raiška per 24 valandas padidėja iki 3.5 kartų. Tas pačias ląsteles transplantavus į pelių odos pažeidimus, ilgalaikio stebėjimo metu buvo nustatytas reikšmingas IL-10 raiškos padidėjimas skirtingose gijimo stadijose (Kanji ir kt., 2014). Mūsų tyrimuose IL-10 anksčiausiai nustatytas praėjus parai po Lin⁻ ląstelių transplantacijos PBS tirpale arba kolageno gelyje, bet ne pamatinės membranos komponentų gelyje ir kontrolinėse grupėse. Šiuo laiko momentu tarp abiejų grupių reikšmingų skirtumų nebuvo. Antrąją tyrimo dieną po ląstelių transplantacijos kolageno gelyje IL-10 raiška žaizdose buvo 1.1 ir 2 kartus didesnė nei grupėse, kuriose ląstelės buvo transplantuojamos PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje, atitinkamai. Reikšmingai padidėjusi IL-10 raiška pažeistame audinyje, lyginant su kontrolinėmis grupėmis, po Lin⁻ populiacijos ląstelių transplantacijos išliko iki 4-osios dienos (4.17b pav.).

Literatūros duomenimis, gyjant odos žaizdoms, TGF- β pasižymi plačiausiu veikimo spektru. Šis augimo veiksnys užtikrina skirtingų tipų ląstelių proliferaciją ir migraciją visose žaizdų gijimo stadijose, taip pat dalyvauja tarpląstelinės medžiagos depozicijoje rando brendimo metu (Beanes ir kt., 2003). Mūsų tyrimuose padidėjusi TGF- β raiška gyjančiame audinyje nustatyta visą stebėjimo laiką po Lin⁻ ląstelių transplantacijos, nepriklausomai nuo transplantacijai panaudotos medžiagos (4.18 pav.).

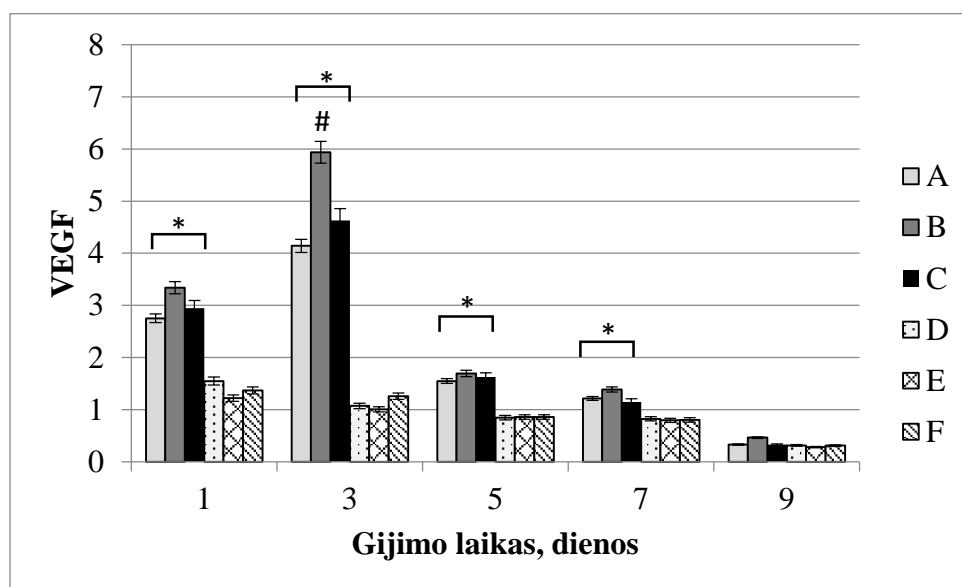


4.18 pav. TGF- β genų raiškos pokyčiai gyjančiame audinyje. Lin⁻ ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Kontrolinėse grupėse į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo (D), I tipo kolageno gelio (E) arba pamatinės membranos komponentų gelio (F). Citokinių mRNR kiekybinis vertinimas atliktas realaus laiko PGR metodu. Tiriamojo geno raiškos lygis normalizuotas pagal β -aktino raišką ir kiekybiškai įvertintas pagal vidutinę C_t (slenkstinis ciklas) vertę. Rezultatai išreikšti kaip mRNR raiškos žaizdose ir sveikame audinyje santykis. * $p < 0.05$ lyginant su kontrole.

Lyginant su kontrolinėmis grupėmis, kuriose į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo, kolageno arba pamatinės membranos komponentų gelių be ląstelių, patikimi skirtumai po ląstelių transplantacijos nustatyti nuo 3-iosios iki 10-osios tyrimo parų (4.18 pav.). Šiose grupėse santykinė TGF- β raiška buvo nuo 1.5 iki 5.9 kartų didesnė (atitinkamai 9-ąją ir 3-iąją dienomis). Kitų autorių tyrimuose *in vitro* sąlygomis parodyta kamieninių ląstelių savybė produkuoti keletą žaizdų gijimui svarbių citokinių, tarp jų ir TGF- β , tačiau *in vivo*

modeliuose gauti rezultatai prieštaringi. Shen ir bendraautoriai, tyrę citokinų raišką *in vitro* sąlygomis iš PLGA/chitozano atraminės medžiagos ir riebalinio audinio MKL suformuotame dermos sluoksnyje, nustatė, kad sąlyginai didelė TGF- β raiška išlaikoma ilgą laiką. Šiuos dirbtinius dermos sluoksnius perkėlus į pelių odos pažeidimus parodytas reikšmingas žaizdos ploto sumažėjimas ir organizuotos tarpląstelinės medžiagos atsistatymas, tačiau nepatvirtintas TGF- β raiškos pokytis *in vivo* sąlygomis (Shen ir kt., 2013). Kitų autorių tyrimuose nustatyta, kad nors TGF- β raiška pažeistame audinyje, lyginant su kitais augimo veiksniais (VEGF, PDGF, EGF), yra silpnesnė, tačiau patikimai kinta visose gijimo stadijose (Kwon ir kt., 2008). Mūsų eksperimentuose Lin⁻ ląstelių transplantacijai į odos žaizdas panaudotos medžiagos TGF- β raiškai įtakos neturėjo. Tarp grupių, kuriose ląstelės į pažeidimus buvo transplantuojamos PBS tirpale arba I tipo kolageno gelyje ir grupės, kurioje ląstelės transplantuotos pamatinės membranos komponentų gelyje, skirtumas nustatytas tik 7-ąją stebėjimo parą, tačiau jis nebuvo patikimas. Tarp grupių, kuriose į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalas, kolageno arba pamatinės membranos komponentų geliai be Lin⁻ ląstelių, skirtumų visą stebėjimo laiką nenustatyta (4.18 pav.). Literatūros duomenimis, TGF- β žaizdų gijimo metu skatina kitų angiogeninių citokinų sintezę ir aktyvina efektorinių hemopoetinių ląstelių, stimuliuojančių naujų kraujagyslių formavimąsi, pritraukimą į pažeidimo židinį (Wong ir Crawford, 2013). Angiogenozės reguliavime dalyvauja keletas augimo veiksnių, tačiau didžiausiu poveikiu pasižymi VEGF (Bao ir kt., 2009). Mūsų tyrimuose nustatyta, kad VEGF raiška po Lin⁻ ląstelių transplantacijos reikšmingai kinta iki 8-osios gijimo paros. Visose grupėse, kuriose į žaizdas buvo transplantuojamos ląstelės, pažeistame audinyje padidėjusi VEGF raiška, atvirkščiai nei TGF- β , patikimai skyrėsi nuo kontrolinių grupių nuo pirmosios dienos po transplantacijos (4.19 pav.). Wu su grupe, tyrę kaulų čiulpų MKL įtaką angiogenozės procesui atsinaujinančiame odos audinyje, nustatė, kad po ląstelių transplantacijos lėtinėse žaizdose reikšmingai padidėja kapiliarų tinklo tankumas, tačiau transplantuotų ląstelių neaptiko diferencijuotose kraujagyslių struktūrose. Šie autoriai patvirtino parakrininį MKL veikimą, nustatę

padidėjusią VEGF raišką odos žaizdose po ląstelių transplantacijos visose gijimo stadijose (Wu ir kt., 2007). Kiti autoriai, tyrę kaulų čiulpų MKL ir ELP įtaką uždelsto gijimo žaizdoms pelių modeliuose, parodė, kad kraujagyslių tinklas pažeistame audinyje reikšmingiausiai padidėja transplantuojant ne atskiras šių ląstelių populiacijas, bet pasirinkus jų derinį. Šie autoriai nustatė, kad po ląstelių transplantacijos, VEGF kiekis gyjančiame audinyje reikšmingai padidėja visose grupėse vystantis proliferacijos stadijai, tačiau neskatinama ankstyvosiose gijimo stadijose ir prasidėjus remodeliacijos stadijai (Sukpat ir kt., 2013). Mūsų eksperimentuose didžiausias VEGF raiškos skirtumas pažeistame audinyje po Lin^- ląstelių transplantacijos lyginant su kontrolinėmis grupėmis nustatytas vykstant uždegimo stadijai (iki 4-osios stebėjimo dienos) (4.19 pav.).



4.19 pav. VEGF genų raiškos pokyčiai gyjančiame audinyje. Lin^- ląstelės (1×10^6 ląst./pelei) buvo transplantuojamos PBS tirpale (A), I tipo kolageno gelyje (B) arba pamatinės membranos komponentų gelyje (C). Kontrolinėse grupėse į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo (D), I tipo kolageno gelio (E) arba pamatinės membranos komponentų gelio (F). Citokinų mRNR kiekybinis vertinimas atliktas realaus laiko PGR metodu. Tiriamojo geno raiškos lygis normalizuotas pagal β -aktino raišką ir kiekybiškai įvertintas pagal vidutinę C_t (slenkstinis ciklas) vertę. Rezultatai išreikšti kaip mRNR raiškos žaizdose ir sveikame audinyje santykis. * $p < 0.05$ lyginant su kontrole; # $p < 0.05$ lyginant su žaizdomis, į kurias buvo transplantuojamos ląstelės PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje.

Nepriklausomai nuo transplantacijai pasirinktos medžiagos, skirtumas siekė nuo 2.7 iki 5.9 kartų (atitinkamai 1-ąją ir 3-iąją stebėjimo dienomis). Vystantis proliferacijos stadijai, VEGF raiška buvo sumažėjusi, tačiau išliko didesnė nei kontrolinėse grupėse. Santykinė šio citokino raiška po ląstelių transplantacijos buvo nuo 2 kartų 5-ąją iki 1.7 kartų 7-ąją tyrimo dieną didesnė nei kontrolinėse grupėse. Nuo 9-osios dienos patikimų skirtumų nenustatyta (4.19 pav.). Kiti autoriai, taikydami pelių odos pažeidimo modelį, parodė, kad VEGF raiška reikšmingai padidėja po lokaliaus kaulų čiulpų MKL transplantacijos kolageno gelyje, tačiau nekinta po šių ląstelių injekcijos PBS tirpale (Rustad ir kt., 2012). Mūsų eksperimentuose, lyginant su kontrolinėmis grupėmis, VEGF raiška padidėjo visose grupėse, kuriose į žaizdas buvo injekuojamos Lin^- populiacijos ląstelės. Po Lin^- ląstelių transplanatcijos PBS tirpale, kolageno arba pamatinės membranos komponentų geliuose, pažeistame audinyje VEGF raiškos skirtumai nustatyti ankstyvosiose gijimo stadijose, tačiau patikimas skirtumas buvo tik 3-iąją dieną. Žaizdose, į kurias ląstelės transplantuotos kolageno gelyje, nustatyta iki 1.7 kartų didesnė VEGF raiška nei žaizdose, į kurias Lin^- ląstelės buvo injekuojamos PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje. Kontrolinėse grupėse, kuriose į pažeidimus buvo injekuojamos skirtingos medžiagos be ląstelių, nei viename stebėjimo taške skirtumų nenustatyta (4.19 pav.).

Citokinių genų raiškos tyrimai pažeistame odos audinyje parodė, kad skirtingose gijimo stadijose Lin^- populiacija lemia TGF- β , VEGF ir IL-10 raiškos padidėjimą bei TNF- α raiškos sumažėjimą. Transplantacijai panaudoti I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų geliai neturi įtakos TGF- β ir VEGF raiškai, tačiau skirtingai veikia ankstyvą TNF- α raiškos slopinimą ir IL-10 kiekio padidėjimą. Po lokaliaus Lin^- ląstelių transplantacijos kolageno gelyje, uždegiminio ir priešuždegiminio citokinių genų raiška reikšmingai skyrėsi ne tik nuo kontrolinių grupių, bet ir nuo grupių, kuriose ląstelės buvo transplantuojamos PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje. Manome, kad tai susiję su ankstyviausia transplantuotų ląstelių adaptacija svetimoje žaizdos mikroaplinkoje.

4.4. Rezultatų apibendrinimas

Kamieninių ląstelių panaudojimas sutrikusio gijimo odos žaizdoms regeneruoti yra perspektyvus dėl unikalių šių ląstelių savybių nuolat atsinaujinti ir diferencijuotis į keletą tipų subrendusias ląsteles (Prentice, 2006). Kaulų čiulpai yra vienintelis suaugusio organizmo organas, kuriame be primityviausių HKL ir MKL taip pat yra ląstelių pirmtakių, pasižyminčių panašiomis regeneracinėmis savybėmis. Visos nediferencijuotos kaulų čiulpų ląstelės aptinkamos Lin^- populiacijoje ir sąveikaudamos tarpusavyje bei su mikroaplinkos molekulėmis išlaiko savo funkcines savybes (Wu ir kt., 2010). Šiame darbe Lin^- ląstelės buvo panaudotos pažeisto audinio regeneracijai skatinti BALB/c linijos pelių visų odos sluoksnių pažeidimo modelyje *in vivo*.

Darbo metu, magnetiniu ląstelių atskyrimo metodu iš bendros pelių kaulų čiulpų populiacijos buvo išgrynintos Lin^- ląstelės. Fenotipinė analizė parodė, kad šioje populiacijoje $81.89 \pm 2.92\%$ ląstelių ekspresuoja CD117 paviršiaus žymenį, $16.46 \pm 3.51\%$ – Sca-1, $9.48 \pm 2.93\%$ – CD90, $5.53 \pm 1.8\%$ – CD29, $6.64 \pm 0.93\%$ – CD113. Visi šie žymenys būdingi primityvių ląstelių populiacijoms. Lyginant su bendra kaulų čiulpų populiacija, Lin^- populiacijoje nustatėme iki 13 kartų didesnę nediferencijuotų ląstelių žymenų raišką.

Kamieninių ląstelių ir pirmtakių proliferacija bei migracija priklauso nuo sąveikų su tarpląstelinės medžiagos komponentais ir yra svarbūs procesai, kurie lemia audinio regeneracijos sėkmę. Atskirai proliferacijos ir migracijos procesus tirti *in vivo* sąlygomis yra sudėtinga dėl vienu metu vykstančių daugybės persidengiančių reakcijų (Amadeu ir kt., 2003). Ląstelių proliferacijos ir migracijos modeliavimas *in vitro* suteikia vertingų žinių ruošiant ląsteles transplantacijai *in vivo* (Liang ir kt., 2007). Šiame darbe įvertinome, kaip Lin^- ląstelių proliferacija ir migracija priklauso nuo odos audinio tarpląstelinei medžiagai būdingų komponentų *in vitro*. Tyrimams pasirinkome I tipo kolageną ir pamatinės membranos komponentų (laminino, IV tipo kolageno, entaktino bei heparino sulfato) mišinį. Nustatėme, kad pamatinės membranos komponentų mišinys lemia iki 1.5 karto didesnę ląstelių proliferacijos aktyvumą, o I tipo

kolagenas patikimai skatina ląstelių migracines savybes. Abi medžiagos buvo panaudotos Lin^- ląstelių transplantacijai į žaizdų modelį *in vivo*.

Odos žaizdų gijimas yra nenutrūkstamas procesas, tačiau jo apibūdinimui išskiriamos trys pagrindinės, persidengiančios ir viena kitą palaipsniui pakeičiančios stadijos – uždegimo, proliferacijos ir remodeliacijos (Broughton ir kt., 2006). Kiekvienoje gijimo stadijoje vyksta specifinės reakcijos, kuriose dalyvauja skirtingų tipų ląstelės, atsakingos už uždegimo kontrolę, epiderminio barjero atstatymą, granulinio audinio formavimą, tarpląstelinės medžiagos komponentų sintezę ir lemia atsinaujinusio audinio struktūrinės bei funkcines savybes (Reinke ir Sorg, 2012). Mūsų tyrime buvo atliekama lokali Lin^- ląstelių, suspenduotų PBS tirpale, I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų geliuose, transplanacija į visų odos sluoksnių pažeidimą, sukeltą BALB/c linijos pelėse. Nustatėme, kad ląstelės, transplantuotos I tipo kolageno gelyje, lemia ankstyviausią žaizdos sugijimą. Makroskopinė analizė parodė, kad po pastarosios transplantacijos, žaizdos sugyja iki 12-osios dienos. Grupėse, kuriose pelėms į žaizdas buvo injekuojama Lin^- ląstelių, suspenduotų PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje, visų pažeidimų atsistatymas nustatytas iki 14-osios paros. Šiuo metu kontrolinėse grupėse, kuriose pelėms į žaizdas buvo injekuojama PBS tirpalo, I tipo kolageno gelio arba pamatinės membranos komponentų gelio be ląstelių, pažeidimų dydžiai siekė iki $16.83 \pm 1.99\%$ pradinio dydžio.

Odos žaizdų gijimo efektyvumą lemia transplantuotų ląstelių integracija pažeidimo židinyje. Dažna problema ląstelių terapijoje yra silpnas transplantuotų ląstelių įsitvirtinimas pažeistame audinyje, todėl ląstelės miršta arba migruoja iš pažeidimo židinio ir nedalyvauja audinio regeneracijoje (Wong ir kt., 2013). Mūsų darbe buvo vertinama Lin^- ląstelių integracija gyjančiame odos audinyje. Nustatėme, kad PBS tirpale transplantuotos ląstelės, pažeidimo židinyje išlieka iki 10-osios paros. Transplantacijai panaudoję I tipo kolageno arba pamatinės membranos komponentų gelius, Lin^- ląstelių pažeidimo židinyje aptikome visą stebėjimo laiką.

Pasirinktais laiko momentais paėmę gyjančio audinio biopsijas, įvertinome, kaip transplantuotos Lin⁻ ląstelės veikia specifinius skirtingose gijimo stadijose vykstančius procesus. Buvo atlikta histologinė ir realaus laiko PGR analizė. Literatūros duomenimis, kamieninės ląstelės regeneraciją gali veikti tiesioginės diferenciacijos į reikiamus subrendusių ląstelių tipus būdu arba, išskirdamos citokinus bei augimo veiksnius, netiesiogiai kontroliuoti mikroaplinkoje esančių ir gijime dalyvaujančių ląstelių aktyvumą (Chen ir kt., 2009). Nustatėme, kad po Lin⁻ ląstelių transplantacijos I tipo kolageno gelyje, pažeistame audinyje uždegiminių ląstelių infiltracija sumažėja jau po 1-osios paros. Iki 3-iosios paros sumažėjęs uždegimas nustatytas po Lin⁻ ląstelių transplantacijos PBS tirpale bei pamatinės membranos komponentų gelyje. Kontrolinių grupių pelių žaizdose, uždegiminių ląstelių aptikome iki 7-osios stebėjimo paros. Atlikę reepitelizacijos proceso kinetinę analizę, nustatėme, kad po ląstelių transplantacijos, žaizdos nauju epidermiu pasidengia iki 7-osios paros. Didžiausias reikšmingas skirtumas tarp grupių, kuriose pelėms buvo transplantuojama Lin⁻ ląstelių skirtingose medžiagose, nustatytas iki 5-osios stebėjimo paros. Grupėje, kurioje pelėms į žaizdas buvo injekuojama ląstelių I tipo kolageno gelyje, 5-ąją dieną reepitelizacijos procesas buvo baigtas. Šiuo metu naujas epidermis po Lin⁻ ląstelių transplantacijos pamatinės membranos komponentų gelyje arba PBS tirpale dengė atitinkamai 59.83±2.22% ir 65.85±1.29% žaizdų paviršiaus. Kontrolinėse grupėse žaizdos nauju epidermiu pasidengė iki 11-osios stebėjimo paros. Po Lin⁻ ląstelių transplantacijos atsinaujinusio audinio dermoje 12-ąją parą nustatytos susiformavusios pagalbinės struktūros, kurių išsidėstymas priklausė nuo transplantacijai pasirinktos medžiagos. Lyginant su sveiku audiniu, panašus pagalbinių struktūrų išsidėstymas visame dermos sluoksnyje nustatytas po ląstelių transplantacijos I tipo kolageno gelyje. Po Lin⁻ ląstelių transplantacijos PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje, didžioji dalis atsinaujinusių struktūrų išsidėstę periferinėje susiformavusios dermos dalyje ir po epidermiu. Kontrolinėse grupėse 12-ąją stebėjimo parą pažeidimo židinyje nustatyta nepasibaigusi proliferacijos stadija, susiformavęs granulinis audinys bei

hiperproliferacinis nediferencijuoto epidermio sluoksnis. Kiekybinė analizė parodė, kad po Lin^- ląstelių transplantacijos gyjančiame odos audinyje reikšmingai pakinta citokinų TGF- β , VEGF, IL-10 ir TNF- α genų raiška. Lyginant su kontrolinėmis grupėmis, gyjančiame audinyje po ląstelių transplantacijos nustatyta iki 6 kartų didesnė TGF- β ir VEGF genų raiška 3-iają tyrimo dieną. Tarp grupių, kuriose Lin^- ląstelės buvo transplantuojamos skirtingose medžiagose, patikimų TGF- β mRNR raiškos skirtumų nenustatyta. Po ląstelių transplantacijos kolageno gelyje VEGF mRNR raiška patikimai skyrėsi (1.7 kartais) 3-iają dieną, lyginant su grupėmis, kuriose pelėms buvo transplantuojamos Lin^- ląstelės PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje. Citokinų TNF- α ir IL-10 genų raiška patikimai skyrėsi visose grupėse atitinkamai iki 5-osios ir 4-osios dienų. Po ląstelių transplantacijos kolageno gelyje 2-ąją dieną TNF- α mRNR raiška gyjančiame audinyje buvo iki 22 kartų mažesnė nei kontrolinėse grupėse ir iki 5 kartų mažesnė nei žaizdose, į kurias buvo injekuojama ląstelių PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje. Iki 4-osios dienos, IL-10 mRNR raiška pažeistame audinyje po Lin^- ląstelių transplantacijos kolageno gelyje buvo iki 2 kartų didesnė nei ląsteles transplantuojant PBS tirpale arba pamatinės membranos komponentų gelyje ir iki 13 kartų didesnė nei kontrolinėse grupėse.

Mūsų eksperimentų rezultatai parodė, kad kaulų čiulpų Lin^- ląstelės skatina pažeisto odos audinio regeneraciją. Atlikę palyginamuosius tyrimus, nustatėme, kad šių ląstelių poveikis priklauso nuo lokaliai transplantacijai pasirinktų medžiagų. Gauti rezultatai svarbūs vystant metodus, kurie reikalingi sutrikusio gijimo žaizdų gydymui.

5. IŠVADOS

1. Fenotipinė analizė parodė, kad pelių kaulų čiulpų Lin⁻ populiacijos ląstelės pasižymi paviršiaus žymenų CD117, Sca-1, CD90, CD29, ir CD113 raiška. Tai rodo, kad Lin⁻ ląstelių populiacija yra heterogeniška, sudaryta iš skirtingų tipų nediferencijuotų ląstelių.
2. Odos tarpląstelinės medžiagos komponentai skatina Lin⁻ ląstelių regeneracines savybes *in vitro*. Paminės membranos komponentai lemia iki 1.5 karto aktyvesnę proliferaciją, o I tipo kolagenas skatina ląstelių migraciją.
3. Ilgalaikiam Lin⁻ ląstelių įsitvirtinimui pažeidimo židinyje *in vivo* reikalingi tiek paminės membranos komponentų mišinys, tiek I tipo kolagenas.
4. Kokybinė analizė parodė, kad intensyviausia visų odos sluoksnių pažeidimo regeneracija *in vivo* vyksta po Lin⁻ ląstelių transplantacijos I tipo kolageno gelyje. Šiuo atveju anksčiausiai prasideda uždegimo slopinimas ir baigiamas reepitelizacijos procesas.
5. Kiekybinė analizė parodė, kad Lin⁻ ląstelės veikia uždegime dalyvaujančių citokinų genų raišką priklausomai nuo to, kokioje medžiagoje transplantuojamos. Po ląstelių transplantacijos I tipo kolageno gelyje uždegiminio TNF- α mRNR raiška sumažėja iki 5 kartų, o prieš uždegiminio IL-10 – padidėja iki 2 kartų. Ankstyvas uždegimo slopinimas užtikrina laiku prasidedančias vėlesnes gijimo stadijas ir audinio regeneraciją.
6. Transplantuotos Lin⁻ ląstelės skatina regeneraciją, veikdamos augimo veiksnių TGF- β ir VEGF genų raišką skirtingose žaizdos gijimo stadijose. Nustatyta, kad VEGF mRNR lygis padidėja uždegimo stadijoje, o TGF- β – baigiantis uždegimo stadijai ir išlieka iki remodeliacijos stadijos pradžios.

6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Ramanauskaitė G., Kašėta V., Vaitkuvienė A., Biziulevičienė G. Skin regeneration with bone marrow-derived cell populations. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10:1548-1551.

Biziulevičienė G., Kašėta V., **Ramanauskaitė G.**, Vaitkuvienė A. Investigation of unmatured hematopoietic cell migration in a mouse model. *Cent Eur J Biol.* 2010; 5:585-589.

Ramanauskaitė G., Žalalytė D., Kašėta V., Vaitkuvienė A., Kalėdienė L., Biziulevičienė G. Skin extracellular matrix components accelerate regenerative potential of Lin⁻ cells. *Cent Eur J Biol.* 2014; 9:367-373.

7. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

Ramanauskaitė G., Kašėta V., Vaitkuvienė A., Biziulevičienė G. Skin regeneration with bone marrow-derived cell populations. 40th Annual Meeting of German Society for Immunology, Leipzig, Vokietija. 2010, rugsėjis 22-25d.

Ramanauskaitė G., Vaitkuvienė A., Kašėta V., Biziulevičienė G. Integration of stem cell populations into biomaterials and their application for skin tissue regeneration. *Reg Med. Conference Abstract: World Conference on Regenerative Medicine*. 2011; 6(6s2):S232.

Ramanauskaitė G., Žalalytė D., Vaitkuvienė A., Kašėta V., Biziulevičienė G. Investigation of mouse bone marrow Lin⁻ cells regenerative properties *in vitro* and *in vivo*. *Front Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00264.

Ramanauskaitė G., Vaitkuvienė A., Kašėta V., Žalalytė D., Kalėdienė L., Biziulevičienė G. Wound healing effect of bone marrow-derived stem/progenitor cell *in vivo*. *Reg Med. Conference Abstract: World Conference on Regenerative Medicine*. 2013; 8(6s):S381.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdi R., Fiorina P., Adra C. N., Atkinson H., Sayegh H. H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Diabetes*. 2008; 57:1759-1767.
2. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105:1815-1822.
3. Akinshina A., Jambon-Puillet E., Warren P.B., Noro M.G. Self-consistent field theory for the interactions between keratin intermediate filaments. *BMP Biophysics*. 2013; 6:12.
4. Alonso L., Fuchs E. The hair cycle. *J Cell Sci*. 2006; 119:391-393.
5. Amadeu T.P., Coulomb B., Desmouliere A., Costa, A.M.A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds*. 2003; 2:60-68.
6. Amoh Y., Li L., Katsuoka K., Hoffman R.M. Multipotent nestin-expressing hair follicle stem cells. *J Dermatol*. 2009; 36:1-9.
7. Anam K., Amare M.F., Zins S.R., Davis T.A. Infusion of Lin⁻ bone marrow cells results in multilineage macrochimerism and skin allograft tolerance in minimally conditioned recipient mice. *Transplant Immunol*. 2010. 24:69-75.
8. Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E., Rinder H.M., Civin C., Cheng L., *et al*. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2003; 31:413-420.
9. Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., *et al*. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow. *Cell*. 2004; 118:149-161.
10. Aszódi A., Legate K.R., Nakchbandi I., Fässler R. What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Ann Rev Cell Develop Biol*. 2006; 22:591-621.

11. Badiavas E.V., Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol.* 2003; 139:510-516.
12. Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M.S., Ehrlich H.P., Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res.* 2009; 153:347-358.
13. Baraniak P.R., McDavid T.C. Stem cell paracrine action and tissue regeneration. *Regen Med.* 2010; 5:121-143.
14. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16:585-601.
15. Bartholomew A., Sturgeon S., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol.* 2002; 30:42-48.
16. Beanes S.R., Dang C., Soo C., Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Exp Rev Mol Med.* 2003; 5:1-22.
17. Behm B., Babilas P., Landthaler M., Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *JEADV.* 2012; 26:812-820.
18. Ben-David U., Kopper O., Benvenisty N. Expanding the boundaries of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012; 10:666-677.
19. Bi H., Jin Y. Current progress of skin tissue engineering: seed cells, bioscaffolds, and construction strategies. *Burns & Trauma.* 2013; 1:63-72.
20. Bing C., Russel S., Becket E., Pope M., Tisdale M.J., Trayhurn P., *et al.* Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer.* 2006; 95:1028-1037.
21. Biziulevičienė G., Puidokaitė G., Šiaurys A., Mauricas M. An anti-inflammatory effect of murine fetal liver cells in BALB/c mouse contact hypersensitivity model. *Int Immunopharmacol.* 2007; 7:744-749.
22. Blainpain C., Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Ann Rev Cell Develop Biol.* 2006; 22:339-373.

23. Blanco P., Robey P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001; 414:118-121.
24. Boleman A.I., Tănasie G., Gălușcan A., Cristea M.I., Bojin F.M., Panaitescu C., *et al.* Studies regarding the *in vitro* wound healing potential of mouse dental pulp stem-like progenitor cells. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 2012; 26:2781-2785.
25. Bott K., Upton Z., Schoback K., Ehrbar M., Hubbel J.A., Lutolf M.P., *et al.* The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. *Biomaterials*. 2010; 31:8454-8464.
26. Bradfute S.B., Graubert T.A., Goodell M.A. Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function. *Exp Hematol*. 2005; 33:836-843.
27. Braiman-Wiksmann L., Solomonik I., Spira R., Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Patol*. 2007; 35:767-779.
28. Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117:1e-S.
29. Celso C.L., Scadden D.T. The hematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci*. 2011; 124:3529-3535.
30. Cen L., Liu W., Cui L., Zhang W., Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*. 2008; 63:492-496.
31. Chamberlain G., Wright K., Rot A., Ashton B., Middleton B. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS ONE*. 2008; 3:2934-2940.
32. Charruyer A., Ghadially R. Stem cells and tissue-engineered skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009; 22:55-62.
33. Chen G., Ushida T., Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2002; 2:67-77.

34. Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y.G., Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*. 2008; 3:e1886.
35. Chen M., Chopra M., Bhowmick S. The use of electrospun polycaprolactone as a dermal scaffold for skin tissue engineering. *MRS Proceedings*. 2009; 1235-RR05-04 doi:10.1557/PROC-1235-RR05-04.
36. Chen M., Przyborowski M., Berthiaume F. Stem cells for skin tissue engineering. *Crit Rev Biomed Eng*. 2009; 37:399-421.
37. Chunlin Y., Hillas P.J., Buez J.A., Nokelainen M., Balan J., Tang J., *et al.* The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs*. 2004; 18:103-119.
38. Colognato H., Yurchenko P.D. Form and function: the laminin family of heterodimers. *Develop Dyn*. 2000; 2:213-234.
39. Costin G.E., Hearing V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007; 21:976-994.
40. Dabiri G., Heiner D., Falanga V. The emerging use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of human chronic wounds. *Exp Opin*. 2013; 18:405-419.
41. Davidson J.M. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res*. 1998; 290:S1-11.
42. Davidson J.M. Experimental animal wound models. *Wounds*. 2001; 13:9-23.
43. Dawn B., Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol*. 2005; 100:494-503.
44. Deng W., Han Q., Liao L., Li C., Ge W., Zhao Z., *et al.* Engrafted bone marrow-derived Flk-1+ mesenchymal stem cells regenerate skin tissue. *Tissue Eng*. 2005; 11:110-119.
45. Diegelmann R.F., Evans M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004; 9:283-289.
46. Dominici M., Rasini V., Bussolari R., Chen X., Hofmann T.J., Spano C., *et al.* Restoration and reversible expansion of the osteoblastic

- hematopoietic stem cell niche marrow radioablation. *Blood*. 2009; 114:2333-2343.
47. Driessen R.L., Johnston H.M., Nilsson S.K. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgement of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol*. 2003; 31:1284-1291.
 48. Ehninger A., Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*. 2011; 208:421-428.
 49. Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanism. *J Inv Dermatol*. 2007; 127:514-525.
 50. Falanga V., Iwamoto S., Chartier M., Yufit T., Butmarc J., Kouttab N., *et al*. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007; 13:1299-312.
 51. Faler B.J., Macsata R.A., Plummer D., Mishra L., Sidawy A.N. Transforming growth factor- β and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2006; 18:55-62.
 52. Fathke C., Wilson L., Hutter J., Kapoor V., Smith A., Hocking A., *et al*. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells*. 2004; 22:812-822.
 53. Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010; 123:4195-4200.
 54. Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol*. 2008; 180:273-284.
 55. Fukada S., Yamamoto Y., Segawa M., Sakamoto K., Nakajima M., Sato M., *et al*. CD-90 positive cells, an additional cell population, produce laminin alpha2 upon transplantation to dy(3k)/dy(3k) mice. *Exp Cell Res*. 2008; 314:193-203.
 56. Gal P., Kilik R., Mokry M., Vidinsky B., Vasilenko T., Mozes S., *et al*. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated

- and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessment. *Vet Med.* 2008; 12:652-659.
57. Galiano R.D., Michaels J., Dobryansky M., Levine J.P., Gurtner G.C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 2004; 12:485-492.
 58. Geckil H., Xu F., Zhang X., Moon S., Demirci U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine.* 2010; 5:469-484.
 59. Gennero L., Mortimer Ph., Speber K., Carloni G., Ponzetto A. stem cells: an alternative to organ transplantation in chronic degenerative and infectious diseases? *New Microbiol.* 2006; 26:151-167.
 60. Giraud E., Primo L., Audero E., Gerber H.P., Koolwijk P., Soker S., *et al.* Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998; 273:22128-22135.
 61. Gnecci M., Zhang Z., Ni A., Dzau V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103:1204-1219.
 62. Gottrup F. Experimental wound healing: the use of models. *EWMA Journal.* 2001; 1:5-8.
 63. Gottrup F., Ågren M.S., Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on *in vitro* and *in vivo* adult soft tissue. *Wound Repair Regen.* 2000; 8:83-96.
 64. Greaves N.S., Iqbal S.A., Baguneid M., Bayat A. The role of skin substitutes in the management of chronic cutaneous wounds. *Wound Rep Reg.* 2013; 21:194-210.
 65. Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., Shi S., Graves S.E., Kortessidis A., *et al.* Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003; 116:1827-1835.
 66. Groppe J., Hinck C.S., Samavarchi-Tehrani P., Zubieta C., Schuermann J.P., Taylor A.B., *et al.* Cooperative assembly of TGF- β superfamily

- signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell*. 2008; 29:157-168.
67. Guerrouahen B.S., Al-Hijji I., Tabrizi A.R. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int*. 2011; doi:10.4061/2011/375857.
 68. Gunatillake P.A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cells Mater*. 2003; 5:1-16.
 69. Guo S., DiPietro L.A. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89:219-222.
 70. Gurtner G.C., Callaghan M.J., Longaker M.T. Progress and potential for regenerative medicine. *Ann Rev Med*. 2007; 58:299-312.
 71. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453:314-321.
 72. Haihong L., Fu X., Ouyang Y., Cai C., Wang J., Sun T. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell Tiss Res*. 2006; 326:725-736.
 73. Hart J. Inflammation. 1: its role in the healing of acute wound. *J Wound Care*. 2002; 11:205-209.
 74. Hakkinen K.M., Harunaga J.S., Doyle A.D., Yamada K.M. Direct comparison of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17:713-724.
 75. Häkkinen L., Larjava H., Koivisto L. Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontic Topics*. 2012; 24:94-129.
 76. Higashiyama R., Nakao S., Shibusawa Y., Ishikawa O., Moro T., Mikami K., *et al*. Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *J Invest Dermatol*. 2011; 131:529-536.
 77. Hodgkinson T., Yuan X.F., Bayat A. Adult stem cells in tissue engineering. *Exp Rev Med Dev*. 2009; 6:621-640.

78. Holmes C., Stanford W.L. Stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cell*. 2007; 25:1339-1347.
79. Howell J.C., Lee W.H., Morrison P., Zhong J., Yoder M.C., Srouf E.F. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 996:158-173.
80. Huang L., Burd A. An update review of stem cell applications in burns and wound care. *Indian J Plast Surg*. 2012; 45:229-236.
81. Huang S.P., Hsu C.C., Chang S.C., Wang C.H., Deng S.C., Dai N.T., *et al*. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. *Ann Plast Surg*. 2012; 69:656-662.
82. Ito C.Y., Li C.Y.J., Bernstein A., Dick J.E., Stanford W.L. Hematopoietic stem cell and progenitor in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood*. 2003; 101:517-523.
83. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J.A., Moore K.A., Lemischka I.R. A stem cell molecular signature. *Science*. 2002; 298:601-604.
84. Yang J., Ii M., Kamei N., Alev C., Kwon S.M., Kawamoto A., *et al*. CD34+ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow. *PloS ONE*. 2011; 6:e20219.
85. Yeum C.E., Park E.Y., Lee S.B., Chun H.J., Chae G.T. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; doi: 10.1002/term.521.
86. Yoshikawa T., Mitsuno H., Nonaka I., Sen Y., Kawanishi K., Inada Y., *et al*. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121:860-877.
87. Jones S.G., Edwards R., Thomas D.W. Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immuno-regulation of wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2004; 3:201-208.

88. Jopling C., Boue S., Izpisua Belmonte J.C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12:79-89.
89. Juarez J., Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol.* 2004; 19:299-309.
90. Juopperi T.A., Schuler W., Yuan X., Collector M.I., Dang C.V., Sharkis S.J. Isolation of bone marrow-derived stem cells using density-gradient separation. *Exp Hematol.* 2007; 35:335-341.
91. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002; 12:390-401.
92. Kanji S., Das M., Aggarwal R., Lu J., Joseph M., Basu S., *et al.* Nanofiber-expanded human umbilical cord blood-derived CD34+ cell therapy accelerates murine cutaneous wound closure by attenuating pro-inflammatory factors and secreting IL-10. *Stem Cell Res.* 2014; 12:275-288.
93. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005; 19:1129-1155.
94. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Art Res Ther.* 2007; 9:204.
95. Kopp H.G., Avecilla S.T., Hooper A.T., Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology.* 2005; 20:349-359.
96. Kwon D.S., Gao X., Bo Liu Y., Dulchavsky D.S., Danyluk A.L., Bansal M., *et al.* Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int Wound J.* 2008; 5:453-463.
97. Lam M.T., Nauta A., Meyer N.P., Wu J.C., Longaker M.T. Effective delivery of stem cells using an extracellular matrix patch results in increased cell survival and proliferation and reduced scarring in skin wound healing. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19:738-747.

98. Lauer G., Sollberg S., Cole M., Flamme I., Sturzebecher J., Mann K., *et al.* Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol.* 2000; 115:12-18.
99. LeBleu V.S., MacDonald B., Kalluri L. Structure and functions of basement membranes. *Exp Biol Med.* 2007; 232:1121-1129.
100. Lee C.H., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001; 221:1-22.
101. Li J., Zhen G., Shin-Yi T., Jia X. Epidermal stem cells in orthopaedic regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:11626-11642.
102. Li Y., Zheng L., Xu X., Song L., Li Y., Li W., *et al.* Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 gene promote wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4:113-123.
103. Li J., Chen J., Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25:9-18.
104. Li T., Wu Y. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Res.* 2011; doi:10.1155/2011/353878.
105. Li W., Fan J., Chen M., Guan S., Sawcer D., Bokoch G.M., *et al.* Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. *Mol Biol Cell.* 2004; 15:294-309.
106. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol.* 2013; 2:17-25.
107. Liang C.C., Park A.Y., Guan J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc.* 2007; 2:329-333.
108. Lin C.D., Allori C.D., Macklin J.E., Sailon A.M., Tanaka R., Levine J.P., *et al.* Topical lineage-negative progenitor-cell therapy for diabetic wounds. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 122:1341-1351.
109. Lin G.L., Cohen D.M., Desai R.A., Breckenridge M.T., Gao L., Humphries M.J., *et al.* Activation of beta 1 but not beta 3 integrin increases cell traction forces. *FEBS Letters.* 2013; 587:763-769.

110. Lin Y.K., Liu D.C. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chem.* 2006; 99:244-251.
111. Lin S., Talbot P. Methods for culturing mouse and human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011; 690:31-56.
112. Litjens S.H.M., de Pereda J.M., Sonnenberg A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *TRENDS Cell Biol.* 2006; 16:376-383.
113. Lu D., Chen B., Liang Z., Deng W., Jiang Y., Li S., *et al.* Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 92:26-36.
114. Lu W., Zhang Y.J., Jin Y. Potential of stem cells for skin regeneration following burns. *Exp Rev Dermatol.* 2009; 4:97-99.
115. MacDougall S., Dallon J., Sherratt J., Maini P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Phil Trans R Soc A.* 2006; 364:1385-1405.
116. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Biomaterials Today.* 2008; 11:26-35.
117. Mansilla E., Marin G.H., Sturla F., Drago H.E., Gil M.A., Salas E., *et al.* Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc.* 2005; 37:292-294.
118. Marks R. The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr.* 2004; 134:2017S-2021S.
119. Matsubara T., Tsutsumi S., Pan H., Hiraoka H., Oda R., Nishimura M., *et al.* A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313:503-508.
120. McArdle A., Paik K.J., Chung M.T., Hu M.S., Walmsley G., Zimmermann A., *et al.* Manipulation of stem cells and their microenvironment for tissue engineering. *Surgery Curr Res.* 2013; 3:134.

121. Meruane M.A., Rojas M., Marcelain K. The use of adipose tissue-derived stem cells within a dermal substitute improves skin regeneration by increasing neoangiogenesis and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg.* 2012; 130:53-63.
122. Metcalfe A.D., Ferguson M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R S Interface.* 2007; 4:413-437.
123. Miranda Coelho N., Gonzales-Garcia C., Planell J.A., Salmeron-Sanchez M., Altankov G. Different assembly of type IV collagen on hydrophilic and hydrophobic substrata alters endothelial cells interactions. *Eur Cells Mater.* 2010; 19:262-272.
124. Mishra P.J., Mishra P.J., Banerjee D. Cell-free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. *World J Stem Cells.* 2012; 4:35-43.
125. Monaco J.L., Lawrence W.T. Acute wound healing. *Clin Plast Surg.* 2003; 30:1-12.
126. Mori L., Bellini A., Stacey M.A., Schmidt M., Mattoli S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res.* 2005; 1:81-90.
127. Mori R., Kondo T., Ohshima T., Ishida Y., Mukaida N. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J.* 2002; 16:963-974.
128. Muscari C., Giordano E., Bonafé F., Govoni M., Pasini A., Guarnieri C. Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for application in regenerative medicine. *J Biomed Sci.* 2013; 20:63.
129. Nadri S., Soleimani M., Hosseni R.H., Massumi M., Atashi A., Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* 2007; 51:723-729.
130. Nakagawa H., Akita S., Fukui M., Fujii M., Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol.* 2005; 153:29-36.

131. Nambu M., Kishimoto S., Nakamura S., Mizuno H., Yanagibayashi S., Yamamoto N., *et al.* Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg.* 2009; 62:317-321.
132. Nardi N.B. All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. *Medical Hypotheses.* 2005; 64:811-817.
133. Nauta A.J., Fibbe W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007; 110:3499-3506.
134. Nie C., Yang D., Morris S.F. Local delivery of adipose-derived stem cells via acellular matrix as a scaffold: a new promising strategy to accelerate wound healing. *Med Hypotheses.* 2009; 72:679-682.
135. Norlén L., Al-Amoudi A., Dubochet J. A cryotransmission electron microscopy study of skin barrier formation. *J Invest Dermatol.* 2003; 120:555-560.
136. Norman J.J., Collins J.M., Sharma S., Russel B., Desai T.A. Microstructures in 3D biological gels affect cell proliferation. *Tissue Eng Part A.* 2008; 14:379-390.
137. O'Brien F. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* 2011; 14:
138. O'Toole E.A. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26:525-530.
139. Ode A., Kopf J., Kurtz A., Schmidt-Bleek K., Schrade P., Kolar P., *et al.* CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater.* 2011; 22:26-42.
140. Oguro H., Iwama A. Life and death in hematopoietic stem cells. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19:503-509.
141. Oh J.H., Kim Y.K., Jung J.Y., Shin J., Chung J.H. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin *in vivo.* *Exp Dermatol.* 2011; 20:445-456.

142. Ohshima T., Sato Y. Tiem-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) mRNA during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality. *Int J Legal Med.* 1998; 111:251-255.
143. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering. *Materials.* 2010; 3:1863-1887.
144. Pedroso D.C.S., Tellechea A., Moura L., Fidalgo-Carvalho I., Duarte J., Carvalho E., *et al.* Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS ONE.* 2011; 6:e16114.
145. Penn J.W., Grobbelaar A.O., Rolfe K.J. The role of TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma.* 2012; 2:18-28.
146. Penolazzi L., Mazzitelli S., Vecchiatini R., Torreggiani E., Lambertini E., Johnson S., *et al.* Human mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix-scaffold: viability and osteogenic potential. *J Cell Physiol.* 2012; 227:857-866.
147. Polak J.M., Bishop A.E. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068:352-366.
148. Prabhakaran M.P., Venugopal J., Ghasemi-Mobarakeh L., Kai D., Jin G., Ramakrishna S. Stem cells and nanostructures for advanced tissue regeneration. *Adv Polym Sci.* 2012; 246:21-62.
149. Prentice D.A. Current science of regenerative medicine with stem cells. *J Invest Med.* 2006; 54:33-37.
150. Radoja N., Gazel A., Banno T., Yano S., Blumenberg M. Transcriptional profiling of epidermal differentiation. *Physiol Gen.* 2006; 27:65-78.
151. Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Kravchenko V.I., Gorshenin T.L., *et al.* First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 139:141-144.
152. Ravari H., Hamidi-Almadari D., Salimifar M., Bonakdaran S., Parizadeh M.R., Koliakos G. Treatment of non-healing wounds with autologous bone

- marrow cells, platelets, fibrin glue and collagen matrix. *Cytotherapy*. 2011; 13:705-11.
153. Rea S., Giles N.L., Webb S., Adcroft K.F., Evill L.M., Strickland D.H., *et al.* Bone marrow-derived cells in the healing burn wound – more than just inflammation. *Burns*. 2009; 35:356-364.
154. Reinke J.M., Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49:35-43.
155. Rodero M.P., Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010; 3:643-653.
156. Rustad K.C., Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P., Major R., Rajadas J., *et al.* Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*. 2012; 33:80-90.
157. Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008; 180:2581-2587.
158. Schuettpelz L.G., Link D.C. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Front Immunol*. 2013; 4:1-9.
159. Shumakov V.I., Onishchenko N.A., Rasulov M.F., Krasheninnikov M.E., Zaidenov V.A. Mesenchymal bone marrow stem cells more effectively stimulate regeneration of deep burn wounds than embryonic fibroblasts. *Bull Exp Biol Med*. 2003; 136:192-195.
160. Segal N., Andriani F., Pfeiffer L., Kamath P., Lin N., Satyamurthy K., *et al.* The basement membrane microenvironment directs the normalization and survival of bioengineered human skin equivalents. *Matrix Biol*. 2008; 27:163-170.
161. Shen T., Pan Z., Zhou X., Hong C. Accelerated healing of diabetic wound using artificial dermis constructed with adipose stem cells and poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold. *Chin Med J*. 2013; 126:1498-1503.

162. Shin L., Peterson D.A. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Trans Med.* 2013; 2:000-000.
163. Shokrgozar M.A., Fattahi M., Bonakdar S., Kashani I.R., Majidi M., Haghhighipour N., *et al.* Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. *Iran Biomed J.* 2012; 16:68-76.
164. Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen structure and stability. *Ann Rev Biochem.* 2009; 78:929-958.
165. Simpson C.L., Patel D.M., Green K.J. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12:565-580.
166. Skardal A., Mack D., Kapetanovic E., Atala A., Jackson J.D., Yoo J., *et al.* Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1:792-802.
167. Song E., Yeon Kim S., Chun T., Byun H.J., Lee Y.M. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials.* 2006; 27:2951-2961.
168. Sorrell J.M., Caplan A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci.* 2004; 117:667-675.
169. Sukpat S., Isarasena N., Wongphoom J., Patumraj S. Vasculoprotective effects of combined endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells in diabetic wound care: their potential role in decreasing wound-oxidative stress. *BioMed Res Int.* 2013; doi.org/10.1155/2013/459196.
170. Sun S., Guo Z., Xiao X., Liu B., Liu X., Tang P.H., *et al.* Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells.* 2003; 21:527-535.
171. Suter M.M., Schulze K., Bergman W., Welle M., Roosje P., Müller E.J. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol.* 2009; 20:515-532.

172. Sriwiriyanont P., Lynch K.A., Maier E.A., Hahn J.M., Supp D.M., Boyce S.T. Morphogenesis of chimeric hair follicles in engineered skin substitutes with human keratinocytes and murine dermal papilla cells. *Exp Dermatol.* 2012; 21:783-785.
173. Szpaderska A.M., Zuckerman J.D., DiPietro L.A. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res.* 2003; 82:621-626.
174. Ševeljević-Jaran D. Wound healing: methods and protocols. *Inflammation Res.* 2003; 52:441-442.
175. Tan H., Marra K.G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials.* 2010; 3:1746-1767.
176. Thampatty B.P., Wang J.H.C. A new approach to study fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskel.* 2007; 64:1-5.
177. Tyndall A., Walker U.A., Cope A., Dazzi F., De Bari C., Fibbe W., *et al.* Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Art Res Ther.* 2007; 9:301.
178. Tsai, K.-S., Kao, S.-Y., Wang, C.-Y., Wang, Y.-J., Wang, J.-P., Hung, S.-C. Type I collagen promotes proliferation and osteogenesis of human mesenchymal stem cells via activation of ERK and Akt pathways. *J Biomed Mater Res.* 2010; 94A:673-682.
179. Tse J.Y., Hoang M.P. A review and update of skin appendage neoplasms and associated genetic syndromes. *Exp Rev Dermatol.* 2012; 7:235-245.
180. Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004; 95:343-353.
181. Vacanti C.A. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng.* 2006; 12:1137-1142.
182. Vazin T., Freed W.J. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neur Neurosci.* 2010; 28:589-603.
183. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009; 37:1528-1542.

184. Visser M.B., Pollitt C.C. Characterization of extracellular matrix macromolecules in primary cultures of equine keratinocytes. *BMC Vet Res.* 2010; 6:16-24.
185. Vojtassák J., Danisovic L., Kubes M., Bakos D., Jarábek L., Ulicná M. *et al.* Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006; 27 Suppl 2:134-7.
186. Waller J.M., Maibach H.I. Age and skin structure and function a quantitative approach: protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res Tech.* 2006; 12:145-154.
187. Wang H., Zhang P., Liu L., Zou L. Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche. *Crit Rev Onc Hematol.* 2013; 85:1-8.
188. Waskow C., Paul S., Haller C., Gassmann M., Rodewald H. Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity.* 2002; 17:277-288.
189. Watt F.M. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11:410-417.
190. Watt F.M. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci.* 2002; 28:173-180.
191. Watt S.M., Athanassopoulos A., Harris A.L., Tsaknakis G. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. *J R Soc Interface.* 2010; 7:S731-S751.
192. Watt F.M., Fujiwara H., Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3:a005124.
193. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83:835-870.
194. Wickett R.R., Visscher M.O. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control.* 2006; 34:S98-S110.
195. Wilson A., Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:93-106.

196. Wognum A.W., Eaves A.C., Thomas T.E. Identification and isolation of hematopoietic stem cell. *Arch Med Res.* 2003; 34:461-475.
197. Wong V.W., Crawford J.D. Vasculogenic cytokines in wound healing. *BioMed Res Int.* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/190486>.
198. Wong T., McGraft J.A., Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Brit J Dermatol.* 2007; 156:1149-1155.
199. Wong V.W., Gurtner G.C. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. *Exp Dermatol.* 2012; 21:729-734.
200. Wong V.W., Gurtner G.C., Longaker M.T. Wound healing: a paradigm for regeneration. *Mayo Clin Proc.* 2013; 88:1022-1031.
201. Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P., Longaker M.T., Gurtner G.C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol.* 2011; doi:10.1155/2011/969618.
202. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007; 25:2648-2659.
203. Wu Y., Zhao R.C.H., Tredget E.E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells.* 2010; 28:905-915.
204. Xie Y., Yin T., Wiegraebe W., He X.C., Miller D., Stark D., *et al.* Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature.* 2009; 475:97-101.
205. Zahn O., Wortman F.J., Hoecker H. Considerations on the occurrence of loricrin and involucrin in the cell envelope of wool cuticle cells. *Int J Sheep Wool Sci.* 2005; 53:1-13.
206. Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Livingston A.G., Flake A.W., Ogawa M. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol.* 1998; 26:353-360.

207. Zhang R., Liu Y., Yan K., Chen L., Chen X.R., Li P., *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflamm.* 2013; 10:106.
208. Zhang S.H., Xiang P., Wang H.Y., Lu Y.Y., Luo Y.L., Jiang H. The characteristics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and their effect on glioma. *Cancer Cell Int.* 2012; 12:32-41.
209. Zhou J., He W., Luo G., Wu J. Fundamental immunology of skin transplantation and key strategies for tolerance induction. *Arch Immunol Ther Exp.* 2013; 61:397-405.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei prof. dr. Genei Biziulevičienei. Ačiū Jums, kad suradote ir užauginote manyje pasislėpusią mokslininkę. Ačiū už suteiktą galimybę įgyvendinti idėjas, už patarimus, už supratimą, už pasitikėjimą, už gyvenimiškas pamokas.

Be galo didelę padėką skiriu artimiausiems kolegoms. Dėkoju dr. Aidai Vaitkuvienei ir dr. Vytautui Kašėtai už svarbų indėlį ruošiant šią disertaciją. Ačiū Jums už galimybę bet kuriuo metu prašyti pagalbos ir gauti atsakymus į visus klausimus. Už papildomas rankas eksperimentų metu dėkoju Dovilei Žalalytei. Ačiū tau už galimybę atlikti dvigubai daugiau nei suplanuota.

Ačiū daugybei kitų, vienu ar kitu metu atsiradusių mano moksliniame kelyje, tačiau kurių vardų nepaminėsiu. Dėkoju už pagalbą ieškant atsakymų ir sprendimų susidūrus su problemomis eksperimentų metu. Dėkoju už reikšmingas pastabas ir pasiūlymus galutiniuose šios disertacijos ruošimo etapuose.

Nepamatuojamai didelę padėką skiriu savo šeimai. Ačiū už kantrybę, už suteiktą galimybę siekti savo tikslų, už besąlygišką palaikymą ir begalinį supratimą. Be jūsų ši disertacija nebūtų išvydusi dienos šviesos.