

TURINYS

Santrumpos.....	4
1. Įvadas.....	6
Darbo tikslas ir uždaviniai.....	7
2. Literatūros apžvalga.....	8
2.1. Trumpa kamieninių ląstelių charakteristika.....	8
2.2. Mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL).....	9
2.3. MKL nišos suaugusiame organizme.....	11
2.4. MKL savybės ir jų pritaikymo klinikoje perspektyvos.....	11
2.5. MKL migracinis potencialas.....	13
2.6. MKL migracijos <i>in vitro</i> tyrimas.....	15
2.7. Veiksnių, sąlygojančių MKL tikslinę migraciją, apžvalga.....	17
2.8. MKL ekstravazaciją ir skverbimąsi į tikslinį audinį sąlygojantys veiksniai.....	20
2.9. Neutrofilų struktūriniai ir funkciniai ypatumai.....	22
2.10. Neutrofilų aktyvinimo būdai <i>in vitro</i>	24
2.11. Neutrofilų gaminamos medžiagos.....	25
2.11.1. Neutrofilų pirminių (azurofilinių) granulių turinys.....	26
2.11.2. Neutrofilų antrinių (specifinių) granulių turinys.....	28
2.11.3. Reaktyvūs deguonies metabolitai.....	29
2.11.4. Suaktyvintų neutrofilų sintetinami uždegimo mediatoriai.....	30
2.11.4.1. Arachidono rūgšties (AR) dariniai (eikozanoidai).....	30
2.11.4.2. Neutrofilų gaminami citokinai.....	31
2.11.4.3. Neutrofilų sintetinami chemokinai.....	31
3. Eksperimentinė dalis.....	33
3.1. Reagentai.....	33
3.2. Įranga ir naudojamos priemonės.....	33
3.3. Darbo metodai.....	34
3.3.1. Neutrofilų išskyrimas.....	34
3.3.2. Neutrofilų gyvybingumo vertinimas.....	35
3.3.3. Neutrofilų suspensijos grynumo vertinimas.....	36
3.3.4. Neutrofilų aktyvinimas.....	37
3.3.5. MKL kultivavimo sąlygos.....	38
3.3.6. MKL migracijos tyrimas.....	38

3.3.6.1. MKL paruošimas migracijos tyrimui.....	38
3.3.6.2. Ląstelių migracijos tyrimo įrenginys.....	39
3.3.6.3. Chemotaksio kameros AA 10 paruošimo tyrimui etapai.....	40
3.3.6.4. MKL migracijos pabaiga, chemotaksio kameros išmontavimas.....	41
3.9. Migravusių MKL dažymo būdai.....	41
3.10. Dažymo būdo pasirinkimas.....	42
3.4. Eksperimentų planavimas.....	44
3.5. MKL migracijos aktyvumo vertinimas ir rezultatų apdorojimas.....	50
4. Rezultatai ir jų aptarimas.....	51
4.1. MKL migracija link skirtingai modifikuotų DMEM terpių.....	51
4.2. MKL migracija link suaktyvintų neutrofilų supernatanto.....	53
4.3. FMLP suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemokinezei.....	56
4.4. FMLP suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemotaksiui.....	59
4.5. PMA suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemokinezei.....	61
4.6. PMA suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemotaksiui.....	63
5. Išvados.....	66
6. Tyrimo nauda ir rekomendacijos.....	66
7. Summary.....	67
8. Literatūros sąrašas.....	69

SANTRUMPOS

KL – kamieninė ląstelė

MKL – mezenchiminė kamieninė ląstelė

EKL – embrioninė kamieninė ląstelė

SKL – suaugusio organizmo kamieninė ląstelė

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

HLA – žmogaus leukocitų antigenai (angl. *human leucocyte antigens*)

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

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

HGF – hepatocitų augimo faktorius (angl. *hepatocyte growth factor*)

IGF – į insuliną panašus augimo faktorius (angl. *insulin-like growth factor*)

TGF- β – β transformuojantis augimo faktorius (angl. *transforming growth factor- β*)

SCF – kamieninių ląstelių faktorius (angl. *stem cells factor*)

PDGF – trombocitų kilmės augimo faktorius (angl. *platelet-derived growth factor*)

SDF-1 – stromos kilmės faktorius (angl. *stromal derived factor-1*)

MCP-1 – monocitų chemotaksio baltymas-1 (angl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

EGF – epidermio augimo faktorius (angl. *epidermal growth factor*)

TNF- α – navikų nekrozės faktorius α (angl. *tumor necrosis factor - α*)

MDC – makrofagų kilmės chemokinas (angl. *macrophage derived chemokine*)

BMP - kaulų morfogeninis baltymas (angl. *bone morphogenic protein*)

IL – interleukinas

uPA - urokinazės plazminogeno aktyvatorius

uPAR – urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus

TLR – Toll tipo receptoriaus (angl. *Toll-like receptor*)

FPR – formilintų peptidų receptoriaus

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

ICAM – tarpląstelinės adhezijos molekulė (angl. *intercellular adhesion molecule*)

ALCAM – aktyvuotų leukocitų adhezijos molekulė (angl. *activated leucocyte cell adhesion molecule*)

VLA – labai vėlai atsirandantis antigenas (angl. *very late antigen*)

LFA – su limfocitų funkcija susijęs antigenas (angl. *lymphocyte function-associated antigen*)

MMP – matrikso metaloproteinazė

MT1-MMP – membramos tipo metaloproteinazė
kD - kilodaltonas
SEM – skenuojanti elektroninė mikroskopija
Th – T helperis
HNP - žmogaus neutrofilų baltymas (angl. *human neutrophil protein*)
NADPH – redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas
SOD - superoksido dismutazė
MPO - mieloperoksidazė
AR – arachidono rūgštis
PG – prostaglandinas
LT – leukotrienas
PAF - trombocitus aktyvinantis faktorius (angl. *platelet activating factor*)
INF γ – γ interferonas
GM-KSF - granulocitų ir monocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius
GRO- α - augimą reguliuojantis onkogenas α (angl. *growth regulating oncogene- α*)
MIG – γ interferono indukuotas monokinas (angl. *monokine induced by interferon- γ*)
IP – γ interferono indukuojamas baltymas (angl. *interferon- γ -inducible protein*)
I-TAC – γ interferono indukuojamas T ląstelių α chemoatraktantas (angl. *IFN γ inducible T cell alpha chemoattractant*)
MIP - makrofagų uždegiminis baltymas (angl. *macrophage inflammatory protein*)
fMLP – formil-metionil-leucil-fenilalaninas (formil-Met-Leu-Phe)
PMA – forbol 12-miristat 13-acetatas (angl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*)
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas
KRG – Krebso Ringerio gliukozės buferinis tirpalas
DMEM – modifikuota Dulbeko terpė (angl. *Dulbecco's modified Eagle medium*)
FCS – fetalinis veršiuko serumas (angl. *fetal calf serum*)
ROS – reaktyvūs deguonies metabolitai (angl. *reactive oxygen species*)
EKMI – Eksperimentinės klinikinės medicinos institutas
ISCT - Tarptautinė ląstelių terapijos organizacija (angl. *International Society for Cellular Therapy*)
VUL – Vilniaus universiteto ligoninė
LDC – laboratorinės diagnostikos centras

1. ĮVADAS

Pastaruoju metu stebimas didžiulis pasaulio mokslininkų ir gydytojų susidomėjimas kamieninėmis ląstelėmis (KL). Šį susidomėjimą nulėmė neseni atradimai, leidę pradėti išsamius fundamentinius ir ikiklinikinius embrioninių bei suaugusio žmogaus kamieninių ląstelių tyrimus [1]. KL patraukė tyrėjų dėmesį ne tik tuo, jog teikia naujų žinių apie molekulinis ląstelių diferenciacijos mechanizmus, genų raiškos pokyčius organizmo vystymosi eigoje, ląstelių tarpusavio sąveiką ir kitas fundamentalias biomedicinos mokslų problemas, bet ir todėl, kad leidžia naujai pažvelgti ir į kai kurių ligų mechanizmus. Sukaupos žinios atveria kamieninių ląstelių panaudojimo perspektyvą gydant sunkius įvairios kilmės susirgimus (pvz., insultą, trauminį galvos ir nugaros smegenų pažeidimą, miokardo infarktą, I tipo cukrinį diabetą, taip pat tokias neurodegeneracines ligas kaip Parkinsono, Alzheimerio, Hantingtono ligą) [2,3]. Nors daugelis gydymo metodų panaudojant KL yra kol kas tik hipotetiniai, negalima nepaminėti, kad jau yra ir realiai taikomų tokio gydymo pavyzdžių. Kaulų čiulpų transplantacija kai kurių onkohematologinių susirgimų atveju yra vienas iš šiuo metu plačiai taikomų suaugusio organizmo KL panaudojimo būdų.

KL tyrimai teikia žinių apie mechanizmus, kaip suaugusiame organizme pažeistos ląstelės yra pakeičiamos naujomis sveikomis ląstelėmis. Ši tyrimų sritis vadinama regeneracine medicina [4]. Tikimasi, kad KL gali ne tik pakeisti pažeistas ląsteles, bet ir efektyviai bei tiksliai nukreipti į pažeidimo vietą biologoškai aktyvias medžiagas (pvz., neurotrofinius faktorius, vaistus) arba pakeisti trūkstamus dėl genetinio defekto baltymus. KL sugebėjimas išnešioti metabolizmui ar vystymuisi svarbius fermentus pasitarnautų kovojant su retomis genetinėmis ligomis, pvz., mukopolisacharidoze VII, Tay-Sachs liga ir kt.

Tačiau viso pasaulio mokslininkai ir tyrėjai, dirbantys šioje srityje, pripažįsta, jog turimų duomenų apie KL nepakanka net pradėti pirmos fazės klinikinius tyrimus. Dar labai mažai žinoma apie KL „elgesį“ ir diferenciacijos kryptis gyvame (tuo labiau – svetimame) organizme, apie išsidiferencijavusių naujų ląstelių gyvenimo trukmę, atsparumą žalojantiems veiksniams, funkcinį pajėgumą, fiziologinę reguliaciją. Veiksmai iš mokslinės laboratorijos į kliniką gali būti perkelti tik sukaupus pakankamai patirties, ją sustiprinus kruopščiai atliktais eksperimentais ir patikimais klinikiniais tyrimais [3].

Pastaraisiais metais ypatingai susidomėta suaugusio žmogaus mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis (MKL). Manoma, kad dėl lengvo jų išskyrimo ir didelio diferenciacinio potencialo, jos taps vienu iš daugiausiai žadančių regeneracinės medicinos įrankių ir turės platų klinikinį pritaikymą [5,6]. Tyrimai parodė, jog MKL pasižymi judrumu ir geba migruoti į pažeidimo zoną. Migracija į pataloginį židinį yra pirmas esminis žingsnis, kuriuo prasideda MKL vaidmuo audinio regeneracijos procese [7,8]. Audinių pažeidimą visuomet lydi uždegiminė reakcija. Tai reiškia, kad MKL patenka į uždegiminę mikroaplinką. Neutrofilų infiltracija yra neatsiejamas kiekvienos uždegiminės reakcijos komponentas [9]. Uždegimo židinyje neutrofilai išskiria savo granulių turinį, reaktyvius deguonies metabolitus, citokinus, arachidono rūgšties darinius ir kt. Tačiau literatūroje nėra duomenų apie tai, kaip šios medžiagos veikia MKL migracijos aktyvumą. Todėl atliekant ikiklinikinius fundamentinius MKL funkcionavimo mechanizmų tyrimus svarbu iširti ir šį reiškinį.

Darbo tikslas

Ištirti, kaip suaktyvintų neutrofilų išskiriamos medžiagos veikia mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijos aktyvumą.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti, ar PD 09.04 linijos mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingas chemokinezinis aktyvumas, bei parinkti šių ląstelių chemotaksio induktorių;
2. Nustatyti, ar suaktyvintų neutrofilų išskiriamų medžiagų visuma sukelia mezenchiminių kamieninių ląstelių chemotaksį;
3. Įvertinti neutrofilų degranuliacijos produktų įtaką mezenchiminių kamieninių ląstelių chemokinezės ir chemotaksio aktyvumui, inkubavus jas formil-Met-Leu-Phe (fMLP) suaktyvintų neutrofilų supernatante;
4. Įvertinti suminį neutrofilų degranuliacijos produktų bei reaktyvių deguonies metabolitų poveikį mezenchiminių kamieninių ląstelių chemokinezės ir chemotaksio aktyvumui, inkubavus jas forbol 12-miristat 13-acetatu (PMA) suaktyvintų neutrofilų supernatante.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Trumpa kamieninių ląstelių charakteristika

Kamieninė ląstelė (KL) – tai nespecializuota ląstelė, galinti atsinaujinti bei diferencijuotis į įvairių audinių tipų ląsteles. Kamieninės ląstelės apibrėžimas iš esmės apima tris unikalias, kitoms organizmo ląstelėms nebūdingas, savybes:

- 1) nespecializuotą būseną;
- 2) atsinaujinimą per visą organizmo gyvenimą išliekant nediferencijuotos būsenos;
- 3) didelį diferenciacinį potencialą [1,10,11].

Pagal diferenciacijos galimybes KL klasifikuojamos į totipotentes, pliuripotentes ir multipotentes.

1 lentelė. KL klasifikacija pagal gebėjimą diferencijuotis į įvairaus tipo ląsteles [12]

KL tipas	Diferenciacinis potencialas	Lokalizacija
Totipotentinė KL	geba diferencijuotis į bet kurio tipo ląstelę	1-3 dienų embrionas
Pliuripotentinė KL	geba diferencijuotis į beveik visų (daugiau kaip 200) tipų ląsteles	Blastocistos stadijos embrionas (3-14 dienų)
Multipotentinė KL	diferencijuojasi tik į tam tikro audinio ląsteles	Fetaliniai ir postnataliniai audiniai

Pagal kilmės šaltinį KL yra skirstomos į du tipus:

- 1) embrionines kamienines ląsteles (EKL);
- 2) suaugusio organizmo arba somatines kamienines ląsteles (SKL).

EKL yra išskiriamos iš 3-5 dienų amžiaus embrionų, kurie yra blastocistos vystymosi stadijoje. Šios ląstelės yra vadinamojoje vidinėje ląstelių sandraupoje (angl. *inner cell mass*), iš kurios embriogenezės metu vystosi visi trys gemaliniai lapeliai, taigi ir visų tipų organizmo audiniai [1,12]. EKL patrauklumą lemia tai, kad šios ląstelės, sukūrus atitinkamas sąlygas *in vitro*, geba neribotą laiką daugintis kultūroje ir išlaikyti sugebėjimą diferencijuotis į bet kurio tipo ląsteles [13]. Tačiau dėl reikšmingų etinių problemų žmogaus EKL panaudojimas tiek mokslo, tiek gydymo tikslams nėra įteisintas. Tai lemia didelį mokslininkų susidomėjimą suaugusio žmogaus KL [1]. Suaugusiame organizme egzistuoja ląstelės pirmtakai, iš kurių kyla įvairios specializuotos audinio ląstelės, formuojančios

organus (širdį, kaulus, kepenis ir kt.). Šie pirmtakai laikomi suaugusio žmogaus kamieninėmis ląstelėmis [14].

SKL pavyko išskirti iš beveik visų organizmo audinių, tačiau jų atsinaujinimo ir diferenciacijos galimybės, palyginus su EKL, yra ribotos. Nors SKL sudaro labai nedidelę specializuoto audinio ląstelių populiacijos dalį (įvairių autorių duomenimis 0,1-3 proc.), dabar manoma, kad būtent šios ląstelės lemia audinių atsinaujinimą per visą gyvenimą [1,12].

Svarbi kai kurių KL tipų savybė yra jų migracinis pajėgumas. Jis įgyja ypatingą reikšmę KL klinikinio pritaikymo kontekste, nes šios ląstelės sugeba „pajusti“ patologinio židinio buvimo vietą organizme, į ją nukeliauti ir ten atlikti savo regeneracinę funkciją. Molekuliniai mechanizmai bei veiksniai skatinantys tokią KL elgseną iki šiol dar nėra pakankamai ištirti. Manoma, kad uždegiminis atsakas į pažeidimą yra bendriausias patologinis procesas, kurio metu sekretuojami mediatoriai „atveda“ KL į pažeidimo vietą. Šiuo metu intensyviai vyksta nervinių, mezenchiminių bei kitų SKL migracinio pajėgumo tyrimai tiek *in vivo*, tiek *in vitro* [8,15].

2.2. Mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL)

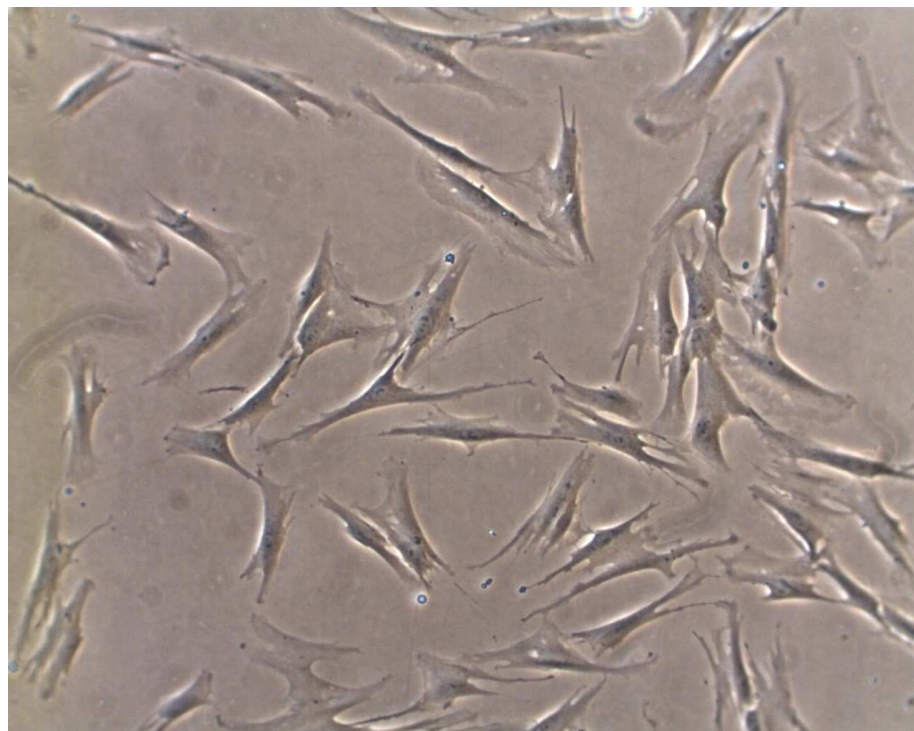
MKL yra mezoderminės kilmės multipotentinės suaugusio žmogaus kamieninės ląstelės, gausiausiai susitelkusios kaulų čiulpų stromoje ir atliekančios esminį vaidmenį hemopoetinių ląstelių palaikyme bei brendime. Pirmasis MKL 1976 m. aprašė A.J. Friedenstein. Jo pateiktame apibrėžime teigiama, kad MKL pasižymi fibroblastoidine morfologija, jos limpa prie plastiko ir formuoja kolonijas. Sukūrus specifines sąlygas *in vitro*, jas galima diferencijuoti chondrogenine, osteogenine ir adipogenine kryptimis [16,17]. Šios ląstelės pasižymi dideliu proliferaciniu pajėgumu (sugebėjimu ilgą laiką daugintis kultūroje *ex vivo*) bei plastiškumu (t.y. daugialiniškos diferenciacijos galimybėmis) [1]. Pastarųjų metų tyrimai parodė, kad MKL gali diferencijuotis ne tik į trijų minėtų ląstelių tipus, bet ir į kitas mezenchiminės bei į nemezenchiminės linijos ląsteles [18]: kaulų čiulpų stromos, nervines, epitelines, skeleto raumenų, insuliną produkujančias ląsteles, kardiomiocitus bei hepatocitus [16,19,20]. Svarbu tai, kad šie rezultatai buvo pademonstruoti tik *in vitro*, t.y. dirbtinėmis sąlygomis, tačiau nėra žinoma ar MKL gali diferencijuoti šiomis kryptimis *in vivo* [21].

Biologijos ir medicinos sričių atstovų susidomėjimas MKL dramatiškai išaugo per pastaruosius du dešimtmečius. Šis susidomėjimas, be abejo, inicijuos virtualią naujų

mokslinių atradimų ir ląstelių terapijos plėtrą. Tačiau sparčiai vystantis šiai sričiai jau dabar atsiranda daug nesutapimų ir dviprasmiškumų; susiduriama su MKL charakterizavimo ir identiteto problema. Įvairios laboratorijos sukūrė skirtingus MKL išskyrimo ir auginimo kultūroje protokolus, o tai dažnai lemia reišmingus tyrimų rezultatų skirtumus. Todėl tam, kad būtų galima lyginti mokslinių tyrimų duomenis, Tarptautinė ląstelių terapijos organizacija (angl. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT) suformulavo minimalų kriterijų sąrašą, kurį turi atitikti *in vitro* kultivuojamos MKL:

1. MKL turi pasižymėti tipiška fibroblastams būdinga morfologija. Jos turi lipti prie plastiko ir formuoti kolonijas.
2. MKL turi ekspresuoti šiuos paviršiaus žymenis: CD73, CD90, CD105. Jos neturi ekspresuoti šių žymenų: CD34, CD45, CD14 arba CD11b, CD79 α , CD19 ir HLA-DR .
3. Sukūrus specifines sąlygas *in vitro* MKL turi diferencijuotis chondrogenine, osteogenine ir adipogenine kryptimis [22].

Dar nėra pasiektas visuotinis sutarimas dėl šių ląstelių pavadinimo. Literatūros šaltiniuose pateikiama įvairių variantų: kaulų čiulpų stromos kamieninės ląstelės, stromos ląstelių pirmtakai, fibroblastų kolonijas formuojantys vienetai, mezenchiminių ląstelių pirmtakai ir kt. [21]. Tarptautinė ląstelių terapijos organizacija rekomenduoja naudoti terminą „multipotentinės mezenchiminės stromos ląstelės“ [22]. Tačiau mokslinėje literatūroje dažniausiai sutinkamas terminas yra tiesiog mezenchiminės kamieninės ląstelės.



1 pav. Mezenchiminės kamieninės ląstelės kultūroje (PD 09.04 MKL linija)

2.3. MKL nišos suaugusiame organizme

Tyrinėjant MKL reikšmę audinių regeneracijos procese, svarbu žinoti, kaip šio tipo ląstelės yra pasiskirsčiusios suaugusiame organizme. Buvo manoma, kad MKL yra tik raudonuosiuose kaulų čiulpuose, tačiau pastaraisiais metais šio tipo ląsteles pavyko išskirti iš virkštelės kraujo, geltonųjų kaulų čiulpų, riebalinio audinio ir placentos [16].

Svarbios informacijos apie MKL pasiskirstymą organizme suteikė vienalaikė daugelio audinių bei organų analizė. Tyrimą atlikusiems mokslininkams MKL pavyko išskirti iš daugelio audinių bei organų: smegenų, blužnies, kepenų, inkstų, skeleto raumenų, užkrūčio, kasos, sinovijos, plaučių, pieninių dantų pulpos [23,24]. Taip pat iš didžiųjų kraujagyslių (aortos, tuščiosios venos) sienelių bei kapiliarų, pvz., inkstų glomerulo. Šie rezultatai paskatino iškelti hipotezę, kad MKL reziduoja visų suaugusio organizmo audinių perivaskulinėje zonoje. Netgi manoma, kad tikslesnis MKL apibūdinantis terminas galėtų būti „perivaskulinės kamieninės ląstelės“. Jos sudaro nediferencijuotų ląstelių rezervuarą, teikiančią medžiagą audinio atnaujinimo ar atstatymo reikmėms, pvz., po pažeidimo.

Vokiečių mokslininkų grupei (Rotter N. ir kt.) MKL pavyko išskirti iš seilių liaukų. Šis MKL šaltinis yra lengvai prieinamas, o išskirtos ląstelės turėjo didelį diferenciacinį potencialą, todėl manoma, kad seilių liaukų MKL ateityje turės reikšmingą vietą regeneracinėje medicinoje [25].

Vienų autorių teigimu, fiziologinėmis sąlygomis MKL nėra periferiniame kraujyje. Jos patenka į vietinę ar sisteminę kraujotaką tik esant audinių pažeidimui [24]. Kitiems gi pavyko išskirti fibroblastoidinės morfologijos, MKL būdingo fenotipo ląsteles iš įvairių organizmo skysčių, taip pat ir iš kraujo [23].

2.4. MKL savybės ir jų pritaikymo klinikoje perspektyvos

MKL yra vienos iš pačių perspektyviausių SKL tipų, inicijuosiančių reikšmingą postūmį regeneracinėje medicinoje bei audinių inžinerijoje [26]. Šias ląsteles yra, palyginti, lengva išskirti ir greitai padauginti kultūroje *ex vivo*. Be to, jos yra genetiškai stabilios, sugeba atsinaujinti bei pasižymi dideliu diferenciaciniu pajėgumu. Dėl šių savybių MKL, greičiausiai, bus vienos iš pirmųjų kamieninių ląstelių, kurios turės klinikinį pritaikymą. [7,19].

Audinių inžinerijos metodai jau leido iš MKL išauginti kaulinio, kremzlinio, raumeninio, riebalinio audinio pavyzdžius. Šiuo būdu gauti audiniai teikia daug vilčių

ateityje kuriant pažeisto audinio atkūrimo ir mezenchiminės kilmės audinių ligų gydymo strategijas [14].

MKL pasižymi dviem unikaliom savybėm: jos geba migruoti į pažeistą audinio vietą ir gaminti visą spektrą biologiškai aktyvių medžiagų: augimo faktorių, citokinių (VEGF, FGF, HGF, IGF, TGF- β , SCF, IL-10, IL-11, IL-15 ir kt). Tai, vadinamoji, trofinė MKL funkcija. MKL sukuria palankią mikroaplinką audinio regeneracijai, slopina pažeidimo išplitimą ir skatina natūralų gyjimo procesą. Šią funkciją atlieka normaliai audinyje esančios MKL, tačiau jų kiekį galima padidinti alogeninėmis MKL. Šiuo metu yra vykdomi tyrimai, siekiant išnaudoti šias MKL savybes miokardo infarkto, kremzlės ir menisko pažeidimų, insulto, nugaros smegenų pažeidimo gydymui [14,20,27,28].

MKL gaminamų biologiškai aktyvių medžiagų svarbą audinių regeneracijai įrodo kai kurie ikiklinikiniai *in vivo* tyrimai. Sukūrus miokardo infarkto ligos modelį, buvo įsitikinta, kad MKL pagreitino miokardo gyjimą ir neovaskuliarizaciją. Paaiškėjo, kad šiuos efektus ląstelės sukelia ne tiesiogiai diferencijuodamosis į kardiomiocitus, bet veikdamos parakriniškai, t.y. sekretuodamos tam tikras medžiagas [29]. Manoma, kad MKL sintetamos bioaktyvios medžiagos slopina randėjimą, apoptozę, skatina endotelio ląstelių migraciją ir proliferaciją, stimuliuoja angiogenezę bei mitotinių vietinių kamieninių ląstelių aktyvumą [14,20].

Nustatyta, kad MKL pasižymi imunosupresiniu veikimu. Jos stipriai slopina T, B limfocitų ir NK ląstelių efektorines funkcijas bei proliferaciją. Tai atveria galimybės MKL pritaikyti transplantologijoje. Manoma, kad MKL yra potencialus įrankis transplantato atmetimo situacijos kontroliavime, transplantatas prieš šeimininką sindromo ir autoimuninių uždegimų, tokių kaip Krono liga, autoimuninis encefalitas, dauginė sklerozė, reumatoidinis artritas) gydyme [30,31,32].

Be to, MKL pasirodė esančios hipoimunogeniškos. Tai palengvina šių ląstelių alogeninę transplantaciją. Iki šiol atliktų ikiklinikinių ir klinikinių tyrimų rezultatai yra padrašinantys. Suleidus alogenines MKL į organizmą nė karto nebuvo užregistruota atmetimo reakcija. Netgi siūloma MKL vadinti „universaliomis ląstelėmis“, galinčiomis sėkmingai funkcionuoti bet kuriame šeimininke. Tikimasi, kad bus įmanoma sistemiškai skirti MKL (sistemine transplantacija) generalizuotų ligų gydymui ir vietinių audinio pažeidimų gydymui (vietinė implantacija) [11,33].

Naujausių tyrimų duomenimis, MKL po stimuliacijos γ interferonu sugeba elgtis kaip antigeną pateikiančios ląstelės. *In vitro* jos gali „praryti“ svetimą baltymą ir, jį „apdorojusios“, gautus peptidus sujungti su II klasės HLA molekulėmis savo membranos

paviršiuje. Taip antigenas pateikiamas T limfocitams (CD4+) ir inicijuojamas specifinis imuninis atsakas. Bandymai su pelėmis parodė, kad naudojant šitaip suaktyvintas MKL sukeliamas pakankamai veiksmingas ląstelinis imuninis atsakas. Tai atveria naują ląstelių vakcinų kūrimo perspektyvą [30].

MKL atranda savo pritaikymą ir genų terapijos srityje. Įvairių vektorių pagalba integravus norimą geną į MKL genomą, jos išlaiko gyvybingumą ir daugialinį diferenciacijos potencialą. Taip genetiškai modifikuotos MKL gali tapti funkcionalaus geno nešėjomis į pažeistą audinį ir kompensuoti defektyvaus geno sąlygotą žalą. Šis metodas buvo sėkmingai pritaikytas *osteogenesis imperfecta* gydymui [23].

Mokslininkai kelia hipotezę, kad MKL, patekusios į pažeidimo zoną, gali diferencijuotis į pažeisto audinio ląsteles ir taip skatinti išgyjimą. Šią hipotezę remia rezultatai, gauti panaudojus MKL insulto ir svingomielinazės deficito gydymui (ikiklinikiniai tyrimai). Eksperimentiniams gyvūnėliams suleidus MKL buvo stebimas jų būklės pagerėjimas; neurologinės simptomatikos sumažėjimas ir gyvenimo trukmės pailgėjimas. Greičiausiai MKL sugeba pereiti hematoencefalinį barjerą ir diferencijuotis į neuronus bei astroцитus. Dabar vykdomi tyrimai, siekiant išsiaiškinti, ar MKL galėtų pagerinti neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Hurler sindromas ir metachrominė leukodistrofija, eigą [34].

Taigi MKL yra labai patraukli suaugusio žmogaus kamieninių ląstelių populiacija, turinti nepaprastai didelį klinikinio panaudojimo potencialą. Tačiau mokslinės visuomenės supratimas apie šių ląstelių biologiją nėra pakankamas. Norint pritaikyti MKL ląstelių terapijos strategijose, būtini tolimesni tiek fundamentiniai, tiek klinikiniai tyrimai, kurie leis suprasti mechanizmus, lemiančius jų terapinį efektą [30,29].

2.5. MKL migracinis potencialas

Terapiniu požiūriu, viena sariausių MKL savybių yra gebėjimas migruoti į audinio pažeidimo zoną [27]. Įvairūs streso signalai skatina šias ląsteles palikti savo nišą ir judėti patologinio židinio link. Suaugusiame organizme nėra vieningos MKL nišos. Šios ląstelės yra išplitusios visuose audiniuose ir pirmiausia dalyvauja vietinių mikropažeidimų atitaisyje [35,36]. Tačiau yra žinoma, kad jos geba patekti į kraujo tėkmę ir nukeliauti didesnius atstumus, kol pasiekia tikslą [37]. Pavyzdžiui, yra duomenų, kad MKL gali būti mobilizuojamos iš kaulų čiulpu ir migruoti į centrinėje nervų sistemoje esantį uždegimo židinį, kur jos diferencijuojasi į ląsteles, ekspresuojančias neuronų ir glijos žymenis [38].

Daugeliu atveju patogiausias MKL taikymo terapiniams tikslams būdas yra jų suleidimas į sisteminę kraujotaką. Šis potencialus gydymo metodas pagrįstas MKL gebėjimu migruoti ir patekti į tikslinį audinį, kuriame yra įvykęs pažeidimas. Šią MKL savybę iliustruoja eksperimentų pavyzdžiai. Žiurkėms, kurioms buvo sukelta ūmi miokardo išemija, į uodegos veną suleidus MKL, jau po trijų dienų specialiais metodais MKL buvo aptiktos infarkto zonoje [39]. Analogiškai rezultatai buvo gauti naudojant išeminio smegenų pažeidimo ir kaulų lūžių eksperimentinius modelius [40,41]. Vadinasi, atkeliavusios į reikiamą vietą, MKL sugeba praeiti endotelio barjerą ir integruotis į audinį. Šiuo metu dar labai mažai žinoma apie tokią tikslią MKL migraciją ir ją reguliuojančius molekulinis mechanizmus [16]. Tačiau kaupiantis eksperimentiniams duomenims, aiškėja faktas, kad MKL pasižymi tropizmu audinio pažeidimo zonoms taip pat ir naviko mikroaplinkai [7]. Audinio ar organo patologinės būklės, sąlygojančios MKL „pritraukimą“ į pažeidimo vietą, yra įvairios: nuo mechaninio pažeidimo (žaidos), infekcijos iki navikinio proceso [36].

MKL migracijos mechanizmo supratimas yra esminis žingsnis ne tik siekiant MKL naudoti regeneraciniams tikslams, bet ir kuriant naujas antinavikinio gydymo strategijas. Dėl savo savybės kryptingai migruoti naviko link, MKL galėtų būti naudojamos kaip antinavikinių agentų nešėjos. Tačiau kokie faktoriai lemia MKL „pritraukimą“ į minėtas patologijos vietas dar nėra iki galo žinoma. Manoma, kad šiam procesui svarbūs patologiniame židinyje sekretuojami uždegimo mediatoriai. Tiek pažeistos audinio ląstelės, tiek pažeidimo zoną infiltravusios imuninės ląstelės sekretuoja chemokinus, augimo faktorius, kurie veikia kaip signalas, inicijuojantis MKL chemotaksinį atsaką. Greičiausiai, kryptingas MKL judėjimas chemotaksinių stimulų link yra panašus į imuninių ląstelių, kurios migruoja į uždegimo židinį. Todėl leukocitų migracijos modelis gali padėti identifikuoti veiksnius, lemiančius ir MKL tikslią migraciją [7]. Manoma, kad pats MKL patekimo į pažeistą audinį procesas panašus į limfocitų perėjimą į audinius, kur jie atlieka savo funkcijas. Yra išskiriamos kelios šio proceso stadijos: a) sąlytis su endoteliocitais ir riedėjimas endotelio paviršiumi, b) aktyvacijos sąlygotas „prilipimas“ prie endotelio (adhezija) c) išėjimas iš kraujagyslės (ekstravazacija) [16].

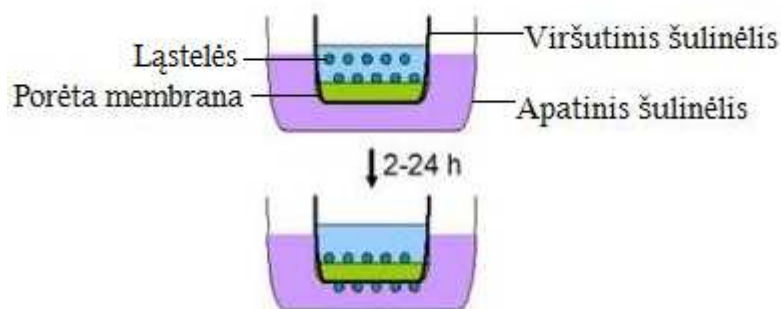
Kryptingas MKL judėjimas, ekstravazacija ir „įsikūrimas“ pažeidimo vietoje angliškoje literatūroje apibūdinamas terminu „homing“ – keliavimu namo. Tai koordinuotas daugiažingsnis procesas, kuriam reikalingos adhezijos molekulės, chemokinai, jų receptoriai ir proteazės [35].

2.6. MKL migracijos *in vitro* tyrimas

Ląstelių migracija atlieka esminį vaidmenį daugelyje biologinių procesų. Pvz., centrinės nervų sistemos formavimasis susijęs su tam tikrų neuronų judėjimu į atitinkamas zonas smegenyse, endotelioцитų migracija yra svarbi angiogenezės procese, leukocitų migracija – esminis uždegiminio atsako elementas. Šių procesų analizei sukurtas specialus tyrimo metodas ir įranga [42]. Mokslinėje praktikoje ji naudojama ir MKL migraciniam potencialui tirti.

MKL migracijos tyrimams naudojamos daugkartinės modifikuotos Boyden'o tipo kameros (*Neuro Probe*, JAV) [43]. Tyrimas pagrįstas chemotaksio reiškiniu - ameboidiniu ląstelių judėjimu tirpių chemotaksinių stimulų koncentracijos didėjimo linkme [44]. Kameros esmę sudaro apatinis ir viršutinis šulinėliai, kuriuos skiria porėta membrana. Apatinis šulinėlis užpildomas skystu reagentu - chemoatraktantu, o į viršutinį šulinėlį pilama ląstelių suspensija. Ląstelės, veikiamos chemoatraktantų, skverbiasi pro membranos poras ir „prilimpa“ kitoje membranos pusėje, nes ji yra padengta specialia medžiaga, užtikrinančia ląstelių adheziją [45]. Taip, prie membranos apatinio paviršiaus prisitvirtinusios, ląstelės yra fiksuojamos ir dažomos. Po šios procedūros membrana guldama ant skaidraus paviršiaus (pvz., į Petri lėkštelę) ir mikroskopuojama šviesiniu mikroskopu. Migravusios ląstelės skaičiuojamos regėjimo laukuose arba naudojant Neubauerio ląstelių skaičiavimo kameros tinklelį [46].

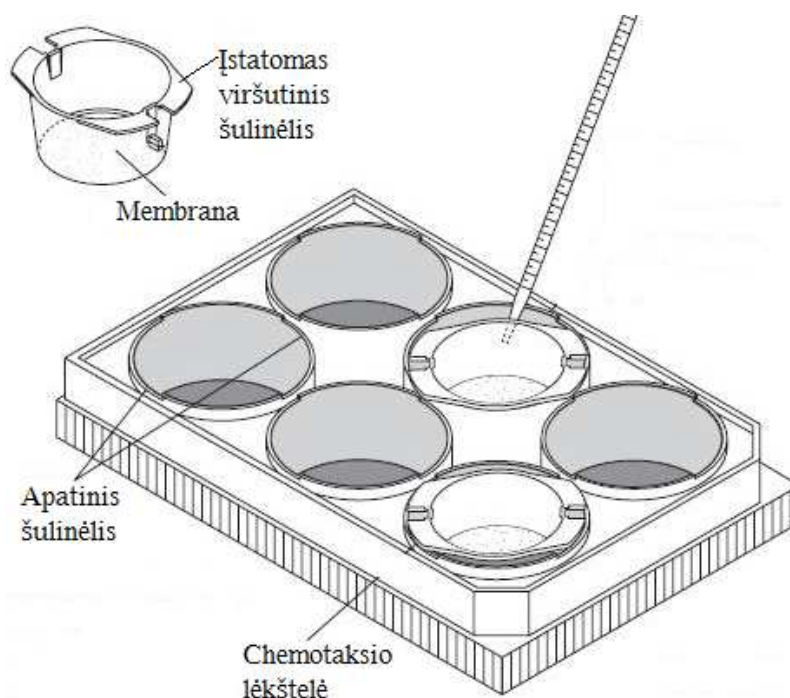
Boyden'o tipo kameroje naudojamos vienkartinės polikarbonatinės membranos, kurios gali turėti įvairaus dydžio poras (2µm, 3µm, 5µm, 8µm, 10µm, 12µm, 14µm). MKL migracijos tyrimuose naudojamos membranos su 8µm dydžio poromis [43]. Jos gali būti padengiamos tam tikromis medžiagomis, pvz., fibronektinu, lamininu, vitronektinu, matrigeliu ir kt., kurių įtaka MKL migracijai yra tiriama [46].



2 pav. Boyden'o kameros schema

Yra sukurtos 5 Boyden'o kameros atmainos (AC48, A3BP48, AA12, AA10, 96 šulinėlių kamera), besiskiriančios šulinėlių skaičiumi, dydžiu bei struktūra [43].

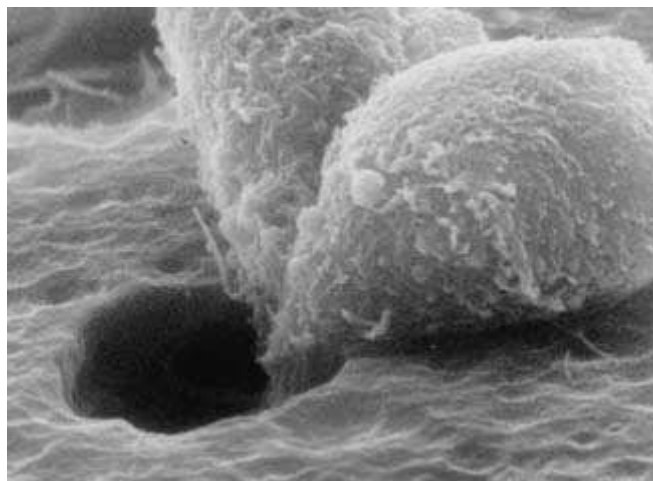
MKL migracijos tyrimams neretai naudojamos vienkartinės chemotaksio lėkštelės su įstatomais viršutiniais šulinėliais.



3 pav. Vienkartinė chemotaksio lėkštelė su įstatomais viršutiniais šulinėliais [42]

Ląstelių suspensija suleidžiama į viršutinį šulinėlį, kurio dugną sudaro porėta membrana. Po inkubacijos ji išpjaujama specialiu skalpeliu. Tuomet migravusios, kitoje jos pusėje prisitvirtinusios, ląstelės yra dažomos ir skaičiuojamos mikroskopuojant.

Šiame tyrime yra galimybė žymėti ląsteles specialiais fluorescenciniais dažais. Tuomet migravusių ląstelių sklaidžiama fluorescencija „nuskaitoma“ specialiu prietaisu. Pagal fluorescencijos signalo intensyvumą nustatomas apytikslis migravusių ląstelių skaičius. Įstatomuose šulinėliuose naudojamos polikarbonatinės, poliesterio arba kolagenu padengtos politetrafluoretileno membranos. Jos gali būti padengiamos tarpląstelinės medžiagos baltymais, imituojančiais natūralią mikroaplinką. Membranos pasirinkimą lemia eksperimento pobūdis [42, 47].



4 pav. Ląstelių migracija per poliesterio membranos poras (SEM nuotrauka) [42]

2.7. Veiksnių, sąlygojančių MKL tikslinę migraciją, apžvalga

Vieni svarbiausių veiksnių, sąlygojančių MKL migraciją į pataloginį židinį yra chemokinais. Tai nedidelių polipeptidų, turinčių 90 – 130 amino rūgščių, šeima, selektyviai kontroliuojanti ląstelių aktyvumą, adheziją ir chemotaksį [48]. Skiriamos keturios chemokinių šeimos priklausomai nuo konservatyvių cisteino liekanų išsidėstymo jų molekulėje. Tai - CC, CXC, CX₃C ir XCL šeimos [48,49]. Formuojantis uždegimui, naviko aplinkoje, taip pat įvairių hipoksinių būklių metu aktyvinama daugelio prouždegiminių faktorių, tarp jų ir chemokinių, sintezė bei sekrecija. Jų svarbą MKL tikslinio judėjimo procese patvirtina tėkmės citometrijos metodu nustatomas platus chemokinių receptorių repertuaras šių ląstelių paviršiuje [7]. Paprastai vienas chemokinas gali sąveikauti su keliais receptoriais. Taip pat ir prie vieno chemokino receptoriaus gali jungtis keli chemokinais [50].

2. lentelė. MKL paviršiuje nustatomi chemokinių receptoriai ir jų ligandai [24]

MKL chemokinių receptoriai	Ligandai
CCR1 CCL23	CCL3, CCL5 (RANTES), CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16,
CCR2 CCR3 CCL26,	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16 CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL24,
CCR4 CCR5	CCL28 CCL17, CCL22 CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14, CCL16

CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, CCL28
CXCR1	CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR3-A/B	CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CX3CR1	CX3CL1
XCR1	XCL1, XCL2

Chemokinių receptorių tyrinėjanti mokslininkų grupė (Chamberlain G. ir kt.) nustatė, kad pelių ir žmonių MKL paviršiuje ypač intensyviai vyksta CCR6, CCR9, CXCR3 ir CXCR6 raiška. Yra žinoma, kad šie receptoriai svarbūs imuninių ląstelių telkimuisi uždegimo židinyje. Tyrimų duomenimis Th17 ląstelės, ekspresuojančios CCR6 intensyviai migruoja į uždegimo vietą sąnaryje reumatoidinio artrito gyvūnų modeliuose. CXCR3 ir CXCR6 taip pat yra svarbūs T limfocitų patekimui į autoimuninio uždegimo apimtą sąnarį. Krono ligos atveju T limfocitų migracijai į žarnos sienelę būtinas CCR9. Remdamiesi minėtų receptorių funkcijų tyrimais, studijos autoriai iškėlė hipotezę, kad jie yra lygiai taip pat svarbūs ir MKL migracijai į uždegimo židinį [51].

Vienas geriausiai iki šiol ištyrinėtų chemokinių, lemiančių MKL migraciją į pažeidimo vietą yra CXCL12 arba SDF-1 (stromos kilmės faktorius 1). SDF-1 ir jo receptoriaus CXCR4 sistema yra svarbi signalinė ašis, atliekanti lemiamą vaidmenį daugelio ląstelių (pvz. osteoblastų, neutrofilų) tikslinio judėjimo procese [52]. Nustatyta, kad SDF-1 gamyba suintensyvėja išemijos pažeistame audinyje (miokardo infarkto, smegenų išemijos zonoje). Be to, hipoksijos sąlygomis padidėja ir CXCR4 raiška MKL paviršiuje. Išmokus kontroliuoti šio receptoriaus ir jo ligando raišką galima būtų padidinti intraveniškai suleistų MKL terapinį efektą (28, 20, 38). *In vitro* tyrimų metu nustatyta, kad MKL jautrumą SDF-1 didina jų stimuliavimas TNF- α [21,40,53].

Tiriant MKL migraciją į krūties piktybinio naviko aplinką, identifikuotas dar vienas veiksnys, turintis reikšmės MKL chemotaksiui. Tai – monocitų chemotaksio baltymas – 1 (MCP-1). Pirmiausia MKL tropizmas navikui buvo įrodytas fluorescuojančiais dažais žymėtas MKL intraveniškai suleidus naviką turinčioms pelėms. Vėliau MKL buvo aptiktos

išpreparuotame navikiniame audinyje. Kultivuojant to paties naviko ląsteles *in vitro*, nustatyta, kad jos gamina MCP-1. Taip pat buvo aptiktas MCP-1 receptorių - CCR2 MKL paviršiuje. *In vitro* migracijos tyrimuose panaudojus MCP-1 surišančius antikūnus, MKL migracijos aktyvumas stipriai sumažėjo. Tai leido padaryti išvadą, kad MCP-1 yra vienas iš veiksnių, sąlygojančių MKL patekimą į naviko aplinką [54].

Pastaraisiais metais, tiriant galimybę išnaudoti MKL migracinį potencialą farmakologinių agentų pernašai į naviko aplinką, įrodyta, kad MKL migracijai turi įtakos urokinazės plazminogeno aktyvatoriaus (uPA) ir jo receptoriaus (uPAR) sistema. Nustatyta, kad solidinių smegenų, plaučių, prostatos ir krūties navikų ląstelės gamina uPA, kuris skatina MKL ir nervinių KL chemotaksį *in vitro*. Padaryta išvada, kad uPA ir uPAR sistema sudaro pagrindą naujo mechanizmo, kuriuo paaiškinamas kamieninių ląstelių tropizmas solidiniams piktybiniais navikams. Be to, MKL „pritraukimui“ turi reikšmės naviko aplinkoje sintetiniai IL-6 bei IL-8 [55].

Pastaraisiais metais atliktų tyrimų duomenimis, MKL migraciją skatina daugelis augimo faktorių. Septynių iš jų (FGF-2, PDGF, HGF, EGF, VEGF, IGF-1, angiopoetino-1) chemoatraktinės savybės buvo įvertintos *in vitro* Boyden'o tipo chemotaksio kameroje. Tyrimo metu MKL migraciją pro dirbtinės membranos poras skatino visi minėti augimo faktoriai išskyrus kraujagyslių endotelio augimo faktorių (VEGF). Pasirodė, kad galingiausi chemoatraktantai yra trombocitų kilmės augimo faktoriaus (PDGF) AB ir BB izoformos ir į insuliną panašus augimo faktorius (IGF-1). MKL membranos paviršiuje nustatyti šiuo augimo faktorių receptoriai (PDGF-R α /R β , IGF1-R, HGF-R/c-met, EGF-R/ErbB, FGF-R2).

Tos pačios studijos autoriai ištyrė daugelio chemokinių (RANTES, MDC, eotaksino, GRO- α ir kt.) įtaką MKL migracijos aktyvumui. MKL chemotaksį indukavo du iš jų: RANTES ir makrofagų kilmės chemokinas (MDC). Pasirodė, jog MDC yra vienas stipriausių chemoatraktantų, prilygstantis epidermio augimo faktoriui (EGF) ir hepatocitų augimo faktoriui (HGF). Be to, MKL migracinį aktyvumą visų minėtų chemotaksinių stimulų link, stipriai padidino MKL stimuliavimas TNF- α ir IL-1. Pirmą kartą buvo nustatyta, kad uždegiminėje aplinkoje (TNF- α poveikyje) MKL ima ekspresuoti Tie-1 receptorių, kurio ligandas yra angiopoetinas-1 [56, 57].

Transmembraninės migracijos tyrimais Boyden'o kameroje buvo įvertintas kaulo morfogeninio baltymo-2 (BMP-2) bei BMP-4 gebėjimas sukelti MKL chemotaksį. Kaulo morfogeniniai baltymai yra β transformuojančio augimo faktoriaus (TGF- β) superšeimos atstovai, svarbūs kaulo formavimuisi ir MKL diferenciacijai chondrogenine linkme. Jų sekrecija suintensyvėja kaulo lūžimo vietoje. Šie baltymai indukuoja MKL chemotaksinį

atsaką *in vitro* ir manoma, kad jie turi reikšmės MKL „pritraukimui“ į kaulo pažeidimo zoną, kur jos dalyvauja kaulo formavime, remodeliavime bei lūžio gyjime [58].

Taigi jau identifikuota nemažai MKL chemotaksi sukeliančių medžiagų, kurių sekrecija suintensyvėja pažeidus vieną ar kitą audinį. Šios medžiagos įdomios ir klinikoje prasme. Neužilgo jų poveikis turėtų būti ištirtas *in vivo* – gyvūnų modeliuose. Viena vertus, jų skyrimas gali palengvinti sistemiskai suleistų MKL patekimą į tikslinį audinį, antra vertus, chemotaksiniai faktoriai gali išprovokuoti endogeninių kamieninių ląstelių mobilizaciją ir taip pagerinti audinio regeneraciją [56].

Be to, nustatyta, kad MKL turi Toll tipo receptorių (Toll-like receptors - TLR). Šie receptoriai yra svarbūs nespecifinio imuninio atsako mediatoriai, kurių pagalba neutrofilai ir monocitai atpažįsta į organizmą patekusio patogeno struktūras. Jų ligandai yra įvairūs mikrobiniai komponentai: lipopolisacharidai, lipoproteinai, peptidoglikanai, virusinė RNR, taip pat endogeninės molekulės (šiluminio šoko baltymai, fibronektinas). Tomchuck S.L. ir bendraautorių atlikti tyrimai leidžia konstatuoti faktą, jog TLR stimuliavimas atitinkamais agonistais didina MKL migracijos aktyvumą [36].

Viswanathan A. su kolegomis nustatė, kad MKL turi N-formilintų peptidų receptorius (FPR). Jie sąveikauja su N-formilintais peptidais, kurie atsipalaiduoja įrant mikroorganizmams bei iš apoptotinių ar nekrozuojančių šeimininko ląstelių. Šie peptidai yra svarbūs uždegiminiai signalai, pritraukiantys leukocitus į audinių irimo ar bakterinės infekcijos židinio vietą. *In vitro* tyrimais nustatyta, kad N-formilinti peptidai yra chemotaksinis stimulus, skatinantis taip pat ir MKL migraciją [59]

Taigi FPR ir TLR sąveika su atitinkamais ligandais gali būti vienas iš mechanizmų, paaiškinančių MKL „pritraukimą“ į septinio uždegimo židinį. Siekiant įvertinti MKL chemotaksinį atsaką į įvairius streso dirgiklius, turi būti gerai ištirtas ir pastarasis mechanizmas, į kurį būtina atsižvelgti, kuriant ląstelių terapijos strategijas.

2.8. MKL ekstravazaciją ir skverbimąsi į tikslinį audinį sąlygojantys veiksniai

Daugelis *in vivo* eksperimentų parodė, kad, pasiekusios patologijos zoną, MKL iš kraujagyslių pereina į audinį. Koks gi yra MKL ekstravazacijos mechanizmas? Naudojant intravitalinį mikroskopą buvo pastebėta, kad į pelės ausies veną suleistos MKL rieda išilgai kraujagyslės sienelės. Šis reiškinys buvo žymiai silpnesnis tą patį eksperimentą atlikus su pelėmis, turėjusiomis genetinį P selektino defektą. Šis ir dar keli panašūs eksperimentai leido daryti išvadą, kad pirmas MKL telkimosi patologiniame židinyje etapas yra riedėjimas

endotelio paviršiumi. O svarbiausią vaidmenį šiame etape atlieka endoteliocitų membranose ekspresuojamas P selektinas. L ir E selektinai reikalingi leukocitų riedėjimui, čia nėra reikšmingi [49].

Kitas svarbus MKL patekimo į pažeidimo vietą etapas yra transendotelinė migracija. Šis procesas apima keletą žingsnių: a) MKL adheziją prie endotelio; b) įsiterpimą į endotelio sluoksnį; c) endotelio barjero perėjimą. Tokią hipotezę patvirtina eksperimentų pavyzdžiai. Ant endoteliocitų kultūros užnešus fluorescuojančiais dažais žymėtų MKL, jos palaipsniui suplokštėjo ir jau po 2 valandų integravosi į endotelio monosluoksnį. Kito eksperimento metu izoliuota pelės širdis buvo perfuzuojama specialiu tirpalu su joje suspenduotomis MKL. Po to histologiniai širdies kapiliarų pjūviai buvo tiriami elektroniniu mikroskopu. Buvo stebimos MKL, sudariusios patvarias jungtis su endotelio ląstelėmis. Vėliau lazeriniu skenuojančiu mikroskopu buvo identifikuotos MKL, jau perėjusios endotelio barjerą [60]. Taigi MKL geba sudaryti patvarų kontaktą su endotelio ląstele ir pradėti tolesnį skverbimąsi į audinį. Šiam procesui svarbios adhezijos molekulės ir integrinai. Jų būtinumą patvirtina eksperimentai, kurių metu buvo naudojami adhezijos molekulės blokuojantys antikūnai. Pastarieji slopino MKL adheziją tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. MKL adhezijos molekulių ekspresiją ir ląstelių prilipimą prie endotelio skatino uždegiminiai mediatoriai TNF α ir IL-1 β [49].

Eksperimentiniai duonemys leidžia teigti, kad MKL migracija per kapiliaro sienelę priklauso nuo endotelio fenotipo ir efektyviausiai vyksta miokarde. Svarbiausios molekulės šiame procese yra VCAM-1 ir VLA-4 [61].

3 lentelė. MKL adhezijos molekulės ir jų ligandai [7]

MKL adhezijos molekulės	Ligandai
VCAM-1	VLA-4 (β 1 integrinas)
ICAM-1/3	LFA-1
ALCAM	CD6
Endoglinas (CD105)	TGF β 1/3

MKL kryptingo judėjimo procese svarbus etapas yra skverbimasis pro ekstraląstelinę matriksą. Čia esminę rolę atlieka didelė receptorių šeima – integrinai. Tai – transmembraniniai glikoproteinai, kurie užtikrina tarpląstelinę sąveiką bei ląstelės ir tarpląstelinės medžiagos (ekstraląstelinio matrikso) sąveiką. Integrinai kontroliuoja signalų perdavimą iš išorės į ląstelės vidų ir atvirkščiai. Toks nuolatinis ląstelės ir jos aplinkos

„dialogas“ apsprendžia jos morfologiją, proliferaciją, diferenciaciją, taip pat ir judrumą. MKL membranoje nustatyta daugelis integrinų: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\alpha 11$ ir kt., kurių ligandai yra įvairūs ekstraląstelinio matrikso baltymai: fibronektinas, lamininas, kolagenas, vitronektinas, osteopontinas, kaulų sialoproteinas ir kt. Integrino – ligando susijungimas inicijuoja fermentų aktyvinimo kaskadą, o tai sukelia atitinkamą ląstelės atsaką; pvz., citoskeleto reorganizaciją, aktino siūlų polimerizaciją ir kryptingą ląstelės slinkimą [37].

In vitro transmembraniniais chemotaksio tyrimais buvo įvertintas, vitronektino, fibronektino ir kolageno I poveikis MKL migracinės aktyvumui. Šie trys ekstraląstelinio matrikso baltymai stipriai skatino MKL judėjimą per dirbtinę membraną Boyden'o tipo kameroje. Gauti rezultatai leido padaryti išvadą, kad jie atlieka tokį pat svarbų vaidmenį MKL sutelkime pažeidimo vietoje kaip ir citokinai [26].

Sėkmingai MKL invazijai į tikslinį audinį reikalinga dar viena faktorių grupė – proteoliziniai fermentai (elastazės, katepsinai, matrikso metaloproteinazės). Pastaruoju metu ypatingu tyrinėjimo objektu tampa matrikso metaloproteinazės (MMP). Tai proteolizinių, substratui specifinių, fermentų šeima, turinti 25 narius ir skirstoma į keletą pošeimų: kolagenazes, stromelizinus, želatinazes, membranos tipo matrikso metaloproteinazes (MT-MMP) ir kt. [62]. Įvairių studijų duomenimis, MKL sintetina MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 ir MT1-MMP. Viena svarbiausių šių fermentų funkcijų yra tarpląstelinės medžiagos ardymas, užtikrinantis MKL skverbimąsi į audinį. Be to, manoma, kad kai kurios MMP (pvz., MMP-2), yra svarbios ne tik MKL migracijai, bet taip pat tarpląsteliniam kontaktams, ląstelės – matrikso sąveikai, MKL proliferacijai bei diferenciacijai adipogenine, chondrogenine bei neurogenine kryptimis [27,35].

Esminis MKL transendotelinės migracijos etapas yra bazinės membranos perėjimas. Bazinė membrana – tai ypatinga tankios tarpląstelinės medžiagos atmaina, skirianti endotelio ląsteles nuo audinio stromos. Želatinazėms priskiriamos MMP-2, MMP-9 bei MT1-MMP, skaldo bazinės membranos komponentus: IV tipo kolageną, lamininą ir kt. MKL gebėjimas prasiskverbti pro bazinę membraną buvo pademonstruotas *in vitro* tyrimuose. Ries Ch. su bendradarbiais atliko MKL chemotaksio tyrimą Boyden'o tipo kameroje, naudodamas membranas, padengtas tarpląstelinės medžiagos komponentais (lamininu, IV tipo kolagenu, proteoglikanais). Bo-Ra Son su kolegomis atliko panašų eksperimentą su matrigeliu padengtomis membranomis. Abiem atvejais MKL įveikė šį dirbtinai sukurtą barjerą. Panaudojus MMP surišančius antikūnus, MKL invazinis pajėgumas žymiai sumažėjo. Tie patys mokslininkai ištyrė uždegimo mediatorių TGF- $\beta 1$,

IL-1 β , TNF- α , taip pat ir SDF-1 įtaką MMP raiškai mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Nustatyta, kad TGF- β 1, IL-1 β ir TNF- α stipriai skatino MMP sintezę. SDF-1 turėjo silpnesnį poveikį. Tačiau abiem atvejais MKL chemotaksinis aktyvumas reikšmingai išaugo. Šie rezultatai leido daryti prielaidą, kad pažeidimo zonoje gaminami uždegiminiai citokinai didina MKL migracinį bei invazinį potencialą taip pat ir *in vivo* [21,27].

2.9. Neutrofilų struktūriniai ir funkciniai ypatumai

Neutrofilai yra didžiausia leukocitų grupė. Jie sudaro 50 – 70 proc. visų kraujyje cirkuliuojančių leukocitų [63]. Suaugusio žmogaus kraujyje jų yra nuo 3000 iki 7 000/mm³ (3-7×10⁹/l) [64]. Manoma, kad kiekvieną dieną kaulų čiulpuose subręsta apie 10¹¹ neutrofilų. Infekcinio proceso metu labai suatyvėja neutrofilų vystymasis ir išmetimas iš kaulų čiulpų, todėl jų skaičius kraujyje gali išaugti iki 20 000/mm³ [65,66]. Patekę į kraują, neutrofilai cirkuliuoja 6 -20 val. Jeigu per tą laiką jų neprireikia, jie žūna apoptozės būdu ir yra praryjami kepenų bei blužnies makrofagų. Yra nuomonių, kad neutrofilai migruoja į audinius ir per 1 - 2 paras juos praryja audinių makrofagai [63]. Neutrofilai yra trumpai gyvenančios ląstelės, todėl tyrimus su jais reikia atlikti per 2 – 4 valandas nuo jų išskyrimo iš kraujo [67].

Kraujo tepinėliuose subrendę neutrofilai yra apskritos formos, jų skersmuo siekia nuo 10 μ m iki 12 μ m. Branduolio forma priklauso nuo neutrofilo amžiaus ir subrendimo [68].

Neutrofilai dar vadinami polimorfonuklearinėmis ląstelėmis, nes jų branduolys sudarytas iš kelių segmentų [66]. Subrendę neutrofilai turi 3 arba 4, ryškiai bazofiliškai nusidažančius, branduolio segmentus, sujungtus plonais chromatinu siūlais. Jų forma, išsidėstymas ir net skaičius gali kisti [69].

Subrendusių neutrofilų citoplazmoje gausu granuliu, kurios skirstomos į pirmines, antrines ir tretines. Pirminės yra stambesnės ir vadinamos azurofilinėmis. Tai lizosomos, kuriose yra fermentų (pvz., rūgščių hidrolazių), baltymų ir peptidų, naikinančių fagocituotus patogenus. Antrinės granulės mažesnės, tačiau daug gausesnės, sudaro daugiau kaip tris ketvirtadalius visų neutrofilų granuliu. Tai - specifinės neutrofilų granulės. Jose susikaupęs laktoferinas, lizocimas, kalogenazė ir kiti fermentai bei baktericidiniai baltymai. Tretinėse neutrofilų granulėse kaupiamas fermentas želatinazė [63,70].

Pagrindinės neutrofilų funkcijos yra fagocitozė bei baktericidinis veikimas [70]. Neutrofilai yra įgimto imuniteto ląstelės. Įgimto imuninio atsako tikslas apriboti, sunaikinti ir visiškai pašalinti sukėlėją. Tai laiduojančių reakcijų visuma vadinama uždegimu (63). Bet

kokios etiologijos (taip pat ir aseptinis) audinių pažeidimas sukelia uždegiminę reakciją. Neutrofilai yra pirmosios ląstelės, atsiduriančios ūminio uždegimo židinyje. Čia jie kaupiasi reaguodami į chemotaksinius veiksnius: chemokinus, kai kuriuos aktyvius komplemento, krešėjimo sistemos komponentus, kitas uždegimo vietoje gaminamas aktyviausias medžiagas [71]. Neutrofilai juda ameboidiškai ir aktyviai fagocituoja į organizmą patekusias bakterijas, bei organizmui svetimas medžiagas. Dėl šios savybės jie vadinami mikrofagais. Fagocitozės metu dalelės praryjamos pseudopodijomis ir ląstelės citoplazmoje uždamos į vakuoles, kurios vadinamos fagosomomis. Joms susiliejus su ląstelių lizosomomis bei specifinėmis granulėmis susidaro fagolizosomos. Šis procesas vadinamas degranuliacija. Fagolizosomose patogenai sunaikinami dviem būdais: nuo deguonies priklausomu ir nuo deguonies nepriklausomu [63,70].

Nuo deguonies priklausomu būdu mikroorganizmus naikina reaktyvūs deguonies metabolitai (ROS): superoksido anijonas, vandenilio peroksidas, hipohalidai, hidroksilo radikalai, singletinis deguonis, kurių susidarymas neutrofiluose ypač suintensyvėja vykstant fagocitozei [72].

Nuo deguonies nepriklausomu būdu mikroorganizmus nužudo fagocitų lizosomose ir specifinėse granulėse esantys baktericidiniai baltymai bei peptidai, o užmuštą patogeną suvirškina lizosomų proteolizinės hidrolazės, kurios patenka į fagosomas formuojantis fagolizosomoms [63].

Neutrofilų chemotaksio, aktyvinimo ir fagocitozės metu susidariusios bei granulėse kaupiamos medžiagos išsiskiria ne tik į fagolizosomas, bet ir į ekstraląstelinį tarpą. Esant ryškioms uždegiminėms reakcijoms, į išorę išsiskyre lizosomų fermentai, reaktyvūs deguonies metabolitai, arachidono rūgšties dariniai žaloja šeiminingo audinius, sukelia skausmą [73].

2.10. Neutrofilų aktyvinimo būdai *in vitro*

Neutrofilų degranuliaciją, reaktyvių deguonies metabolitų gamybos suintensyvėjimą („kvėpavimo sproginimą“) bei citokinų sintezę juose galima sukelti juos aktyvinant *in vitro*. To reikia atliekant funkcinis neutrofilų tyrimus klinikinėje laboratorijoje arba vykdant mokslinius tyrimus. Žinoma nemažai neutrofilų degranuliaciją sukeliančių medžiagų: lipopolisacharidas (LPS), $TNF\alpha$, LTB_4 , anafilatoksinas $C5a$ ir kt. [74,75,76]. Neutrofilus taip pat suaktyvina tokie korpuskuliniai agentai kaip natrio urato mikrokristalai ir kalio pirofosfato dihidrato kristalai [50]. Mokslinėje praktikoje vieni dažniausiai naudojamų

neutrofilų aktyvatorių yra N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP), forbolmiristato acetatas (PMA) ir IL-8.

fMLP (N-formyl-L-metionil-L-leucil-fenilalaninas) yra bakterinės kilmės tripeptidas. Tai - natūralus bakterijų degradacijos produktas, susidarantis uždegiminėje aplinkoje *in vivo* bei yrant mitochondrijų baltymams audinio pažeidimo metu. fMLP veikia per N-formilintų peptidų receptorių neutrofilų membranoje. Receptorinės sąveikos pasekoje aktyvinama fosfolipazė C, kuri skatina dviejų antrinių mediatorių: inozitolio trifosfato ir diacilglicerolio pasigaminimą. Jie aktyvina proteinkinazę C ir mobilizuoja Ca^{2+} iš viduląstelių saugyklų. Šie biocheminiai virsmai sąlygoja neutrofilų chemotaksį, degranuliaciją bei „kvėpavimo sproginimą“ [77,78].

PMA (forbol 12-miristat 13-acetatas) - tai augalinės kilmės forbolio esteris, veikiantis nuo receptorių nepriklausomu būdu. PMA yra diacilglicerolio analogas, tiesiogiai aktyvinantis proteinkinazę C, kuri inicijuoja tam tikrų baltymų fosforilavimo kaskadą ir tokiu būdu sukelia neutrofilų degranuliaciją bei „kvėpavimo sproginimą“ [70,79].

Atliktų tyrimų duomenimis, aktyvinant neutrofilus PMA, pasigamina du kartus daugiau reaktyvių deguonies metabolitų nei aktyvinant fMLP, net jei naudojama 20 kartų mažesnė PMA koncentracija. Manoma, kad PMA yra daug galingesnis NADPH oksidazės aktyvatorius [80]. Dėl šios priežasties jis yra naudojamas siekiant įvertinti neutrofilų oksidacijos produktų gamybą [70].

IL-8 – citokinas, veikiantis per neutrofilų IL-8R1 receptorių. Receptorinės sąveikos pasekoje didėja citozolinio Ca^{2+} koncentracija. Tai sąlygoja neutrofilų chemotaksį, „kvėpavimo sproginimą“ ir degranuliaciją. D [81]. Stipriausias IL-8 sukiamas efektas yra neutrofilų chemotaksis [82].

2.11. Neutrofilų gaminamos medžiagos

Vieni neutrofilų gaminami produktai kaupiami pirminėse ir antrinėse granulėse, kiti yra naujai sintetiniai, paveikus uždegiminiam stimului [71]. Pažeidimo zonoje susitelkę neutrofilai į aplinką išskiria granulių komponentus bei uždegimo mediatorius. Mokslinėje literatūroje dar nėra žinių apie šių produktų poveikį MKL funkciniam, kartu ir migraciniam, pajėgumui. Jų poveikio ypatumai paprastai tiriami ir aprašomi infekcinio proceso kontekste. Yra žinoma, kad kai kurios iš neutrofilų gaminamų ir granulėse kaupiamų medžiagų pasižymi chemotaksiniu poveikiu leukocitams. Remiantis MKL ir leukocitų migracijos

mechanizmo panašumais galima daryti prielaidą, kad jos skatina ir MKL migraciją į tikslinį audinį.

2.11.1. Neutrofilų pirminių (azurofilinių) granulių turinys

Neutrofilų azurofilinėse granulėse yra kaupiami baktericidiniai baltymai ir peptidai (defenzinai, serprocidiniai, katelicidiniai, protegrinai, bakterijų sienelės pralaidumą didinantys baltymai) bei fermentų rinkinys (rūgščios hidrolazės, neutralios proteazės, mieloperoksidazė, lizocimas, endonukleazės, lipazės) [63]. Apžvelgsime svarbiausias iš šių medžiagų, kurių reikšmė ląstelių chemotaksiui jau įrodyta.

Katijoniniai peptidai (defenzinai) – tai smulkūs, 29-43 amino rūgščių turintys cikliniai peptidai, kurie sudaro 30-50 proc. neutrofilų pirminių granulių baltymų. Jiems priklauso žmogaus neutrofilų baltymai-1, -2, -3 ir -4 (HNP1-4), kurie veikia įsiterpdami į savo taikinių membranas. Defenzinai, kaip ir antimikrobiniai peptidai katelicidiniai ir protegrinai, pažeidžia mikrobu sienelių vientisumą, todėl įvyksta mikroorganizmų lizė. Jie gali veikti ir žaizdų gijimą, nes skatina fibroblastų proliferaciją [63,72]. Eksperimentų duomenys leidžia teigti, kad defenzinai neapsiriboja vien tik antimikrobinio poveikiu. Mikromolinės defenzinų koncentracijos veikia baktericidiškai, o nanomolinės chemotaksiškai. Pvz., pelėms į paodį suleidus 1 μg defenzino, injekcijos vietoje gausiai susikaupia neutrofilai ir monocitai. Be to, nustatyta, kad HNP-1 ir HNP-2 skatina $CD4^+$, $CD8^+$ T limfocitų bei dendritinių ląstelių „pritraukimą“ į uždegimo židinį. Tokiu būdu jie tampa jungiamąja grandimi tarp įgimto ir įgyto imuniteto. Yra žinoma, kad chemoatraktiniu poveikiu pasižymi ir neutrofilų pirminėse granulėse kaupiami katelicidiniai. Žmogaus organizme aptiktas tik vienas katelicidinų šeimos atsovas – 18 kD žmogaus katijoninis antimikrobinis peptidas. Po dalinės proteolizės, kurią vykdo proteinazė 3, jis tampa aktyviu chemoatraktantu, sąlygojančiu monocitų, T limfocitų bei neutrofilų pritraukimą į uždegimo židinį. Nustatyta, kad katelicidiniai veikia per N-formilintų peptidų receptorius [50]. Šių receptorių reikšmė įrodyta ir MKL chemotaksiui.

Serprocidiniai (katijoniniai glikoproteinai) arba neutralios proteazės yra elastazė, katepsinas G, kalogenazė, proteinazė 3, azurocidinas. Neutrofilų aktyvacijos ir degranuliacijos pasekoje šie proteoliziniai fermentai išsilaisvina į ekstraląstelinę aplinką, kur skaido tarpląstelinės medžiagos komponentus. Jie atakuoja kolageną, bazinės membranas, fibriną, elastiną ir kremzles, sukeldami pakenkimus, būdingus pūliniam ir alteraciniam uždegiminiam procesui. [72,73].

Elastazė, katepsinas G, proteinazė 3 – trys serino proteazės, yra vienos svarbiausių neutrofilų pirminių granulių turinio komponentų, dalyvaujančių patogeno suardyme nuo deguonies nepriklausomu būdu ląstelėje ir už jos ribų. Pastaraisiais metais nustatyta, kad šios proteazės yra svarbios ir kaip specifiniai uždegiminio proceso reguliatoriai. Šią funkciją jos atlieka vykdydamos dalinę chemokinių proteolizę, moduluodamos citokinių tinklo veiklą, aktyvindamos specifinius ląstelių paviršiaus receptorius [83,84]. Po citokinių sintezės ir sekrecijos esant tam tikroms patofiziologinėms sąlygoms, uždegimo židinyje vyksta tolimesni jų kitimai. Manoma, kad dalinė proteolizė yra esminis mechanizmas, reguliuojantis įvairių citokinių tinklo komponentų aktyvumą. Aiškėja, kad be labai specifinių, citokinus konvertuojančių proteazių (IL-1 β konvertuojančio fermento, TNF konvertuojančio fermento), serino proteazės taip pat dalyvauja keičiant citokinių ir jų receptorių aktyvumą [85]. Pavyzdžiui, uždegiminių citokinių TNF α ir IL-1 β , sintetinamų neaktyvių probaltymų formoje, dalinę proteolizę vykdo bei aktyvių šių citokinių formų susiformavimą lemia ir neutrofilų sintetinama proteinazė 3 [84].

Atliktų studijų duomenimis, neutrofilų esterazės stoką turinčios pelės stokoja ir aktyvių uždegiminių citokinių bei chemokinių. Tyrimais įrodyta, kad neutrofilų serino proteazės vykdo kai kurių chemokinių proteolitinę modifikaciją, taip padidindami jų aktyvumą bei stabilumą. Pavyzdžiui, N terminalinio peptido atskėlimas nuo chemokinių CXCL8 (IL-8) ir CXCL5, kuri vykdo atitinkamai proteinazė 3 ir katepsinas G, sustiprina šių chemokinių gebėjimą sukelti neutrofilų chemotaksį lyginant su jų intaktinėmis formomis. Chemokino CCL15 N galo proteolitinė modifikacija, kurią vykdo katepsinas G, žymiai padidina jo gebėjimą sukelti monocitų chemotaksį. Tačiau yra duonemų ir apie priešingą serino proteazių poveikio rezultatą kai kuriems chemokinams. Pavyzdžiui, katepsinas G atskeldamas N terminalinį peptidą nuo chemokino CCL5 (RANTES), sumažina jo aktyvumą. Taip pat nustatyta, kad chemokinas CXCL12 (kitai vadinamas SDF-1 α) ir jo receptorių, paveiktas katepsinu G ir esteraze, iš viso praranda savo aktyvumą.

Pastebėta, kad katepsino G suleidimas į poodį, sąlygoja gausų monocitų ir neutrofilų susitelkimą injekcijos vietoje. Tai leido daryti išvadą, kad katepsinas G yra galingas chemoatraktantas *in vivo* [86]. Katepsinas G kaip ir katelicidiniai yra N-formilintų peptidų receptorių ligandas.

Dar vienas svarbus neutrofilų pirminių granulių komponentas, pasižymintis ne tik mikrobicidinėmis, bet ir chemoatraktanto savybėmis yra azurocidinas arba 37 kD katijoninis antimikrobinis baltymas. Nanomoliarinės azurocidino koncentracijos chemotaktiškai veikia monocitus, T limfocitus, neutrofilus ir fibroblastus. Eksperimentiškai parodyta, kad

azurocidinas, imobilizuotas ant endotelio ląstelių, skatina monocitų adheziją prie endotelio monosluoksniu. Manoma, kad uždegimo židinyje *in vivo* iš neutrofilų atsipalaiduojantis azurocidinas prisitvirtina prie endotelio paviršiaus, o tai skatina kraujyje cirkuliuojančių monocitų patekimą į uždegimo vietą [50].

2.11.2. Neutrofilų antrinių (specifinių) granulių turinys

Specifinėse neutrofilų granulėse taip pat randama baktericidinių baltymų – katepsino G, lizocimo ir laktoferino, o kai kurių autorių duomenimis – dar ir antimikrobinių peptidų katelicidinių [63]. Be to, jose yra IV tipo kolagenazė, urokinazė, histaminazė, šarminė fosfatazė, fosfolipazė A2, vitaminą B₁₂ sujungiantis baltymas, NADPH oksidazės komponentai ir kt. [72,73].

Vienas iš svarbiausių specifinių neutrofilų granulių komponentų yra laktoferinas. Tai – ne heminę geležį sujungiantis transferinų šeimos glikoproteinas. Uždegiminio proceso metu, įvykus neutrofilų degranuliacijai, jis atsipalaiduoja į infekuotą audinį ir yra vienas iš pirmųjų organizmo gynybinės sistemos veiksmų. Greta antimikrobinių savybių tyrimais įrodytas jo sugebėjimas moduluoti uždegimo procesą bei imuninį atsaką. Laktoferinas pasižymi priešuždegiminiu poveikiu. Uždegimo židinyje jis sujungia susikaupusius Fe²⁺ jonus, kurie dalyvauja hidroksilo radikalo susidaryme. Pastarasis yra stiprus audinius žalojantis veiksnys. Be to, jis slopina prouždegiminių citokinų IL-1β ir TNF-α atsipalaidavimą uždegimo židinyje. Nustatyta, kad laktoferinas *in vitro* skatina T ir B limfocitų proliferaciją ir diferenciaciją bei didina NK ląstelių aktyvumą. [87]. Tačiau jo įtaka ląstelių migracijai dar nėra ištirta.

Nustatyta, kad chemoatraktanto savybėmis pasižymi specifinių granulių komponentas urokinazė. Ji savo efektus sukelia per uPAR receptorius, kuriuos turi ir MKL. Eksperimentinių tyrimų duomenimis, urokinazė skatina monocitų, neutrofilų, bazofilų ir lygiųjų raumenų ląstelių chemotaksį [50].

Neutrofilų granulėse yra susikaupę dideli urokinazės receptoriaus (uPAR) kiekiai. Neutrofilų aktyvacijos pasekoje vyksta šių receptorių translokacija iš viduląstelinų saugyklų į plazminę membraną. Čia neutrofilų serino proteazės vykdo jų proteolizinę modifikaciją. Susiformavęs aktyvus produktas, žinomas kaip D2D3, atpalaiduojamas į ekstraląstelinę aplinką. D2D3 yra formilintų peptidų receptorių (FPR) ligandas. Iki šiol nustatytas jo chemoatraktinis poveikis bazofilams, monocitams bei hemopoetinėms

kamieninėms ląstelėms. Manoma, kad jis gali būti svarbus ir kitų FPR turinčių ląstelių, pritraukimui į uždegimo židinį [88].

2.11.3. Reaktyvūs deguonies metabolitai

Reaktyvūs deguonies metabolitai yra vienos svarbiausių medžiagų, užtikrinančių neutrofilų baktericidinę funkciją. Ramybėje neutrofilai sunaudoja nedaug deguonies. Fagocitozė didina deguonies poreikį, nes suaktyvėja ląstelės medžiagų apykaita, sustiprėja aktyvių deguonies darinių – laisvųjų radikalų, gamyba. Šių pokyčių visuma vadinama „kvėpavimo sprogamu“ [63]. Laisvieji deguonies radikalai – medžiagos, išorinėje orbitalėje turinčios neporinių elektronų. [89]. Jie yra nestabilūs, chemiškai aktyvūs, turintys trumpą gyvavimo trukmę. Jie gali sukelti grandininės reakcijos, užpildydami savo nesuporuoto elektrono orbitalę elektronu, atplėštu nuo kitos molekulės, ir taip pastarąją paversdami laisvuju radikalų [90].

Reaktyvių deguonies atmainų susidarymą skatina greitas NADPH oksidazės suaktyvinimas. Ji oksiduoja NADPH ir šio proceso metu redukuoja molekulinį deguonį į superoksido anijoną ($\cdot\text{O}_2$). [73]. Susidarę du superoksido anijonai susijungia veikiami fermento superoksido dismutazės (SOD), ir susidaro mažiau reaktyvus vandenilio peroksidas (H_2O_2) [91]. Pats H_2O_2 nėra laisvasis radikalas, tačiau tolimesnėse reakcijose panaudojamas jų gamybai [89]. H_2O_2 ir $\cdot\text{O}_2$ vykstant Čaber-Veiso reakcijai redukuojasi į agresyviausią hidroksilo radikalą ($\text{OH}\cdot$). Hidroksilo radikalai taip pat susidaro ir Fentono reakcijoje ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}\cdot$). Be to, kai kuriomis sąlygomis susidaro singletinis deguonis ($\text{O}\cdot^{-2}$) [91].

Neutrofilų fagolizosomose didžiausias mikrobicidinis veikimas pasireiškia, pasigaminus hipohalidams [72]. Azurofilinėse neutrofilų granulėse esantis fermentas mieloperoksidazė (MPO) dalyvaujant Cl^- , paverčia H_2O_2 į hipochloritinę rūgštį HOCl [63]. Nors H_2O_2 ir halogeniniai junginiai nėra tokie aktyvūs kaip laisvieji radikalai ($\text{OH}\cdot$, $\cdot\text{O}_2$), tačiau jie yra stabilesni, gali toliau difunduoti į audinį ir toksiškai veikti ekstraląstelinėje aplinkoje esančius mikroorganizmus [92].

Reaktyvūs deguonies dariniai iš neutrofilų į ekstraląstelinį tarpą gali išsiskirti po kontakto su chemokinais, imuniniais kompleksais bei vykstant fagocitozei. Tai - svarbiausi neutrofilų produktai, kuriais jie naikina mikroorganizmus ir pažeidžia aplinkinį audinį [91]. Reaktyvių deguonies darinių padidėjimas sukelia oksidacinį ląstelės stresą. Jie pažeidžia

beveik visas pagrindines ląstelių makromolekules – lipidus, baltymus ir šiek tiek silpniau nukleorūgštis, todėl yra svarbūs daugelio ligų patogenezėje [90].

2.11.4. Suaktyvintų neutrofilų sintetinami uždegimo mediatoriai

Yra žinoma, kad neutrofilai gali gaminti kai kuriuos citokinus ir yra svarbus leukotrienų (LT) šaltinis. Be to, neutrofilai gamina prostaglandinus (pvz., PGE₂) ir trombocitus aktyvinantį faktorių (PAF) [72].

2.11.4.1. Arachidono rūgšties (AR) dariniai (eikozanoidai)

Kai neutrofilus aktyvina įvairūs dirgikliai, jų membranos lipidai pakinta ir susidaro biologiškai aktyvūs lipidiniai mediatoriai, kurie veikia daugelį biologinių procesų. Jie itin svarbūs uždegimo reaktyvumo reguliavimui ir hemostazei. Vieni iš tokių mediatorių yra arachidono rūgšties (AR) dariniai dar vadinami eikozanoidais. Tai - trumpai egzistuojantieji hormonai, kurie veikia per su baltymu G susijusius receptorių. Jie greitai susidaro, paveikia audinius išsiskyrimo vietoje ir po to suyra spontaniškai arba yra suardomi fermentų. AR metabolitai susidaro veikiant dviejų pagrindinių klasių fermentams: ciklooksigenazėms (susidaro prostaglandinai ir tromboksanai) ir lipoksigenazėms (susidaro leukotrienai ir lipoksinai) [71,73].

Ciklooksigenazinio AR metabolizmo būdu neutrofiluose, taip pat ir kai kuriose kitose uždegimo procese dalyvaujančiose ląstelėse, susidaro prostaglandinai (PG): PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, ir kiti. Uždegimo židinyje jie veikia kraujagyslių lygiuosius raumenis, sukeldami smulkių kraujagyslių išsiplėtimą ir didindami jų sienelės pralaidumą. Prostaglandinai dalyvauja atsirandant skausmui ir karščiavimui uždegimo metu. Kiek mažesnę reikšmę uždegimui turi eikozatrieninė rūgštis ir eikozapentaeninė rūgštis. Tai dar dvi polinesočios, ląstelių membranose aptinkamos, riebalų rūgštys, iš kurių susidaro prostaglandinai PGE₁, PGF_{1α}, PGE₃, PGF_{3α} [89].

Neutrofiluose svarbesnis lipoksigenazinis būdas. Juose 5-lipoksigenazė yra pagrindinis AR metabolizmo fermentas. Lipoksigenaziniu būdu neutrofiluose susidaro leukotrienai (LT). Šie AR metabolitai, kaip ir prostaglandinai pasižymi uždegimą skatinančiu poveikiu. LTB₄ sukelia neutrofilų chemotaksį, lizosominių fermentų atsipalaidavimą bei superoksido anijono sintezės suintensyvėjimą. LTC₄ ir jo tolimesni metabolitai, sukelia bronchų lygiųjų

raumenų spazmą ir didina kraujagyslių pralaidumą. [71]. Be to, žinoma, kad leukotrienai skatina fibroblastų chemotaksį, proliferaciją bei kolageno sintezę [93].

Suaktyvinti neutrofilai gamina trombocitus aktyvinantį faktorių (PAF) [72]. Tai dar vienas fosfolipidų kilmės mediatorius, pasižymintis daugeliu uždegimą skatinančių savybių [73]. PAF taip pat yra ir signalinė molekulė, įjungianti efektorinius mechanizmus įvairių tipų ląstelėse, tarp jų ir įgimto imuniteto bei hemostazės sistemos ląstelėse: neutrofiluose, monocituose, trombocituose [94]. Veikiant PAF, skatinama P selektino translokacija iš endotelio citoplazmos į plazminės membranos paviršių. Žinoma, kad tai sąlygoja net tik leukocitų, bet ir MKL pradinę adhezijos prie endotelio stadiją, jų „riedėjimą“ endotelio ląstelių paviršiumi [71]. Tačiau PAF reikšmė imuninių ląstelių ir MKL chemotaksiui dar nėra ištirta.

2.11.4.2. Neutrofilų gaminami citokinai

Suaktyvinti neutrofilai gamina kai kuriuos citokinus: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ ir kt. [72].

IL-1, IL-6, TNF- α yra prouždegiminiai citokinai, kurie veikia sinergistiškai. Jų poveikis pleotropinis, sąlygojantis daugelį lokalių ir sisteminių pokyčių, stebimų uždegiminio atsako metu [71]. Pagrindinė TNF- α funkcija – stimuliuoti uždegimą, t.y. sutelkti neutrofilus ir monocitus į infekcijos židinį bei juos aktyvinti. IL-1 ir TNF- α didina adhezijos molekulių (ICAM-1 ir VCAM-1) ekspresiją kraujagyslių endotelio ląstelėse [95]. Jos jungiasi su leukocitų integriniais ir sąlygoja jų kaupimąsi uždegimo židinyje. IL-1 ir TNF- α makrofagų ir endotelio ląstelėse skatina chemokinių sintezę, pvz., IL-8. O šis yra stiprus neutrofilų chemoatraktantas, sąlygojantis neutrofilų adheziją ir transendotelinę migraciją [96].

Tyrimų duomenimis, po stimuliacijos IL-12 *in vitro* neutrofilai sintetina INF γ , kuris autokriniškai skatina TNF- α sintezę pačiuose neutrofiluose [97]. INF γ pasižymi nestipriu priešvirusiniu poveikiu, tačiau svarbiausia jis yra imuninio atsako efektorinis citokinas, aktyvinantis specifinio ir nespecifinio imuninio atsako ląsteles [71].

2.11.4.3. Neutrofilų sintetinami chemokinai

IL-8/CXCL8 buvo pirmasis identifikuotas neutrofilų sintetinamas chemokinas. Jo sintezė vyksta tik suaktyvintus neutrofilus įvairiais stimulais, tokiais kaip TNF- α , IL-1 β , IL-15, GM-KSF, fMLP ir kt. Suaktyvinti neutrofilai gamina dar vieną chemokiną – GRO- α

(augimą reguliuojanti onkogeną- α /CXCL1), kurio biologinis poveikis panašus į IL-8. Šių abiejų chemokinių chemoatraktinis efektas pasireiškia neutrofilams, bazofilams, T ir B limfocitams. Manoma, kad šie chemokinai atlieka esminį vaidmenį formuojantis ūminiam uždegimui, sąlygodami daugelio imuninių ląstelių susitelkimą į pažeidimo vietą. Neutrofilai gamina CXC šeimai priklausančius chemokinus MIG (IFN γ indukuojamą monokiną/CXCL9), IP-10 (IFN γ indukuojamą baltymą/CXCL10), I-TAC (IFN γ indukuojamą T ląstelių α chemoatraktantą/CXCL11). Šie yra svarbūs mononuklearinių leukocitų susitelkimui į ūminio uždegimo židinį. Suaktyvinti neutrofilai gamina 5 CC šeimos chemokinus: MCP-1 (monocitų chemotaksio baltymą-1/CCL2) ir MIP (makrofagų uždegiminius baltymus: MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, MIP-3 α /CCL20 ir MIP-3 β /CCL19). MCP-1 yra pagrindinis chemokinas, skatinantis monocitų „pritraukimą“ į uždegimo židinį. Jis taip pat svarbus CD8+ T limfocitų telkimuisi uždegimo židinyje. Makrofagų uždegiminiai baltymai MIP yra galingi chemoatraktantai monocitams, makrofagams, NK ląstelėms bei dendritinėms ląstelėms. Jie silpniau veikia granulocitus. MIP-1 α ir MIP-1 β svarbūs Th1 limfocitų chemotaksiui, o MIP-3 β į uždegimo vietą nukreipia CCR7 receptorių turinčias ląsteles (B limfocitus, T limfocitus) [50].

Literatūroje gausu duomenų apie minėtų uždegimo mediatorių savybes bei funkcijas, tačiau labai mažai ištirta jų įtaka MKL migraciniam pajėgumui. Tyrimais patvirtinta tik kai kurių neutrofilų išskiriamų citokinių, tokių kaip TNF α , IL-1, IL-8, reikšmė MKL „pritraukimui“ į pažeidimo vietą. Tačiau uždegimo židinyje šių mediatorių poveikis nėra izoliuotas. Reikia išsiaiškinti, kaip neutrofilų degranuliacijos produktų bei naujai sintetinamų medžiagų (ROS, arachidono rūgšties darinių, citokinių ir kt.) visuma veikia MKL migracinį aktyvumą. Be to, remiantis leukocitų migracijos mechanizmo samprata bei žiniomis apie daugelio chemokinių receptorių buvimą MKL membranose, galima kurti naujus MKL migracijos eksperimentinius modelius.

3. EKSPERIMENTINĖ DALIS

Darbas atliktas VUL Santariškių klinikų LDC imunologijos laboratorijoje bei VU Eksperimentinės ir klinikinės medicinos instituto kamieninių ląstelių laboratorijoje.

3.1. Reagentai

1. Polimorphprep™ tankio gradientas (*AXIS-SHIELD PoC AS*, Norvegija);
2. N- formil-Met-Leu-Phe (fMLP), 10 mM bazinis tirplis (*Sigma-Aldrich*, Vokietija);
3. Forbol 12-miristat 13-acetatas (PMA), 1,62 mM bazinis tirpalas (*Sigma-Aldrich*, JAV);
4. Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS), pH=7,4 (*Sigma-Aldrich*, JAV);
5. PBS + 3,4% NaCl (pagamintas EKMI Biochemijos laboratorijoje);
6. Krebso Ringerio gliukozės buferinis tirpalas (KRG) (sudėtis: 120mM NaCl, 4,9mM KCl, 1,2mM MgSO₄×7H₂O, 1,7mM KH₂PO₄, 8,3mM Na₂HPO₄×2H₂O, 10mM gliukozės, pH=7,3) (pagamintas EKMI Biochemijos laboratorijoje);
7. Modifikuota Dulbeko terpė (su 3,7g/l NaHCO₃ ir 1g/l D gliukozės) (DMEM) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija);
9. Fetalinis veršiuko serumas (FCS) (*HyClone*, JAV);
10. Tripsinas - EDTA (*Biological industries*, Izraelis);
11. Metanolis, 100% (*Sigma-Aldrich*, Vokietija);
12. Dažymo pagal Pappenheimą rinkinys (May-Grünvald/ Giemsa) (*Merck*, Vokietija);
13. Crystal violet (*Alfa Chem*, JAV);
14. Hemacolor dažymo rinkinys (*Merck*, Vokietija);
15. RAL – 555 dažymo rinkinys (*Reactifs RAL*, Prancūzija);
16. Distiliuotas vanduo (pagamintas EKMI Biochemijos laboratorijoje).

3.2. Įranga ir naudojamos priemonės

AA10 chemotaksio kamera (*Neuro Probe*, JAV);
Polikarbonatinės, 8 μm poras turinčios, membranos (*Neuro Probe*, JAV);
Centrifuga *Sigma 2-16 K* (*DJB labcare*, Jungtinė Karalystė) ;
CO₂ inkubatorius (*Binder*, Vokietija);
Automatinės pipetės (*Eppendorf Research*, Vokietija);

Pipečių antgaliai: iki 20µl, iki 1000µl;
Mėgintuvėliai: 15 ml ir 30 ml talpos;
Kratyklė „Vortex“;
Dažymo vonelės;
Petri lėkštelės;
Pastero pipetės;
Pincetai (*Neuro Probe*, JAV);
Gramzdiklis (*Neuro Probe*, JAV);
Šviesinis mikroskopas *Olimpus CK-2*;
Goriajevo kamera;
Klavišų skaičiavimo mašinėlė.

3.3. Darbo metodai

3.3.1. Neutrofilų išskyrimas

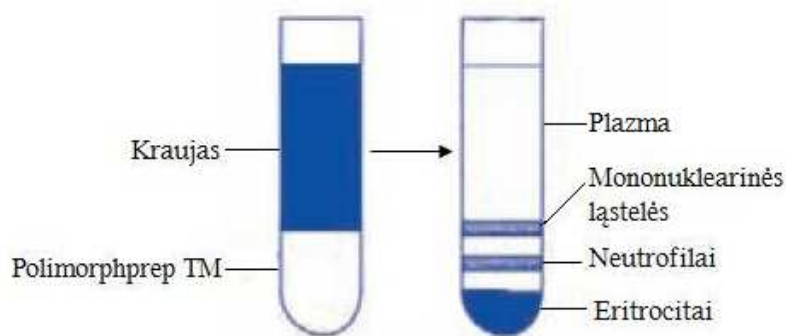
Polimorfonukleariniai granulocitai buvo išskirti iš suaugusių sveikų savanorių kraujo, naudojant reagentą *Polymorphprep*TM.

Eozinofilų ir bazofilų kiekis polimorfonuklearinių ląstelių frakcijoje buvo laikomas nereikšmingu, nes didžiausią šios frakcijos dalį sudaro neutrofilai.

Neutrofilų išskyrimo procedūros etapai

1. Neutrofilų išskyrimui kraujas imamas iš venos į heparinizuotus vakuuminius mėgintuvėlius. Išskyrimo procedūra atliekama praėjus ne daugiau kaip trims valandoms nuo kraujo paėmimo. Kraujo ėminys ir *Polymorphprep*^{MT} reagentas laikomi 18-22°C temperatūroje.
2. Į 15 ml mėgintuvėlį pilama 3,0 ml *Polymorphprep*^{MT} reagento. Virš jo atsargiai sluoksniuojama 3,0 ml nekrešančio, neskiesto kraujo. Sluoksniuojama labai atsargiai, leidžiant kraują mėgintuvėlio sienoje ir stengiantis, kad reagento ir kraujo sluoksniai nesusimaišytų.
3. Mėgintuvėlis dedamas į centrifugą. Centrifuguojama 30-35 min., kambario temperatūroje, kai $g = 500$.

Centrifuguojant susidaro du leukocitų „žiedai“. Viršutiniame, ties kraujo plazmos ir reagento sandūra, susitelkia mononuklearinės ląstelės. Antrąjį žiedą sudaro neutrofilai. Eritrocitai nusėda į mėgintuvėlio dugną. Pastero pipete atsargiai pradūrus mononuklearinių ląstelių žiedą, pasiekiamas neutrofilų žiedas. Ląstelės nusiurbiamos ir supilamos į švarų mėgintuvėlį.



5 pav. Neutrofilų išskyrimas tankio gradientu - *Polymorphprep*^{MT}

4. Atliekamas neutrofilų suspensijos plovimas. Į mėgintuvėlį su ląstelėmis pilama 10 ml KRG, sumaišoma ir centrifuguojama 10 min., kambario temperatūroje, kai $g = 300$. Centrifuguojant neutrofilai nusėda į mėgintuvėlio dugną.

Išskiriant neutrofilus šiuo būdu nepavyksta gauti grynos neutrofilų suspensijos. Stebimas nedidelis užterštumas eritrocitais, todėl tolimesniame etape buvo vykdomas eritrocitų lizavimas.

5. Po centrifugavimo nupylus supernatantą, mėgintuvėlio dugne esančios ląstelės (neutrofilai ir eritrocitai) užpilamos 3 ml 4 °C distiliuoto vandens. Eritrocitai hipotoniniame tirpale lizuoja. Po 30 s. įpilama 1 ml PBS, turinčio 3,4% NaCl, ir 5ml KRG. Centrifuguojama 10 min., 300×g. Po centrifugavimo virš ląstelių esantis tirpalas nupilamas. Ląstelės suspenduojamos 1 ml DMEM terpės.

3.3.2. Neutrofilų gyvybingumo vertinimas

Paimama 10 μl neutrofilų suspensijos ir mėgintuvėlyje sumaišoma su 10 μl dažo – 0,4% Trypan'o mėlio tirpalo.

Gyvybingoms ir negyvoms ląstelėms skaičiuoti naudojama Goriajevo kamera. Trypan'o mėliu paveikta ląstelių suspensija sumaišoma ir vienas jos lašas užlašinamas ant kameros po pritvirtintu dengiamuoju stikleliu. Palaukiama kol turinys pasiskleis po visą tinklelį. Tuomet mikroskopuojama šviesiniu mikroskopu. Gyvybingos ląstelės yra geltonos, blizgančios. Negyvos ląstelės nusidažo melsvai, nes jų pažeista membrana praleidžia Trypan'o mėlio dažą. Naudojantis klavišų skaičiavimo mašinėle, suskaičiuojama 100 ląstelių. Po to apskaičiuojamas gyvybingų ląstelių procentinė dalis.

Aukščiau išdėstytu metodu išskirtų neutrofilų gyvingumas buvo 95%.

3.3.3. Neutrofilų suspensijos grynumo vertinimas

Neutrofilų suspensijos grynumas vertinamas mikroskopuojant dažytą ląstelių suspensijos tepinėlį imersine sistema.

Tepinėlio ruošimas ir dažymas

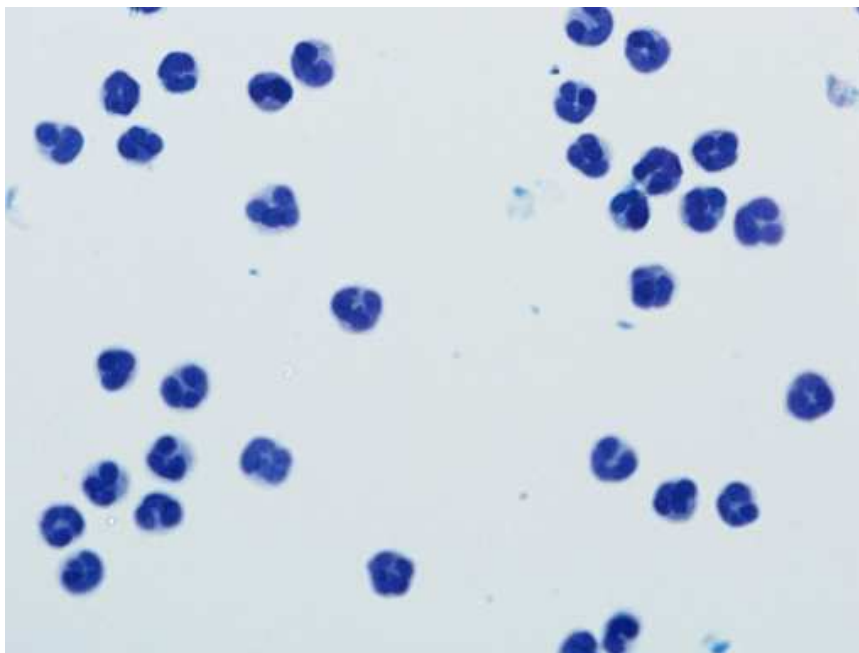
Tepinėlis daromas ant švaraus, sauso objekcinio stiklelio, ant kurio užlašinamas neutrofilų suspensijos lašas. Pipetės antgaliu lašas paskleidžiamas po visą stiklelio plotą. Padarytas tepinėlis džiovinamas kambario temperatūroje. Tepinėlio dažymui naudojami šie dažai:

Hematocolor - 1 (dažymo trukmė – 5 s.)

Hematocolor – 2 (dažymo trukmė – 3 s.)

Hematocolor – 3 (dažymo trukmė – 6 s.)

Po dažymo tepinėlis plaunamas distiliuotu vandeniu, džiovinamas kambario temperatūroje ir mikroskopuojamas šviesiniu mikroskopu su imersija (100× padidėjimu). Klavišų skaičiavimo mašinėle suskaičiuojama 100 ląstelių ir apskaičiuojama neutrofilų procentinė dalis.



6 pav. Neutrofilų tepinėlio nuotrauka (100 × padidinimas)

Po eritrocitų lizavimo neutrofilų frakcijos grynumas buvo 95%. Išliko nedidelis užterštumas mononuklearinėmis ląstelėmis.

3.3.4. Neutrofilų aktyvinimas

Neutrofilų paruošimas aktyvinimui

Suskaičiavus neutrofilus 1 mililitre DMEM terpės (skaičiavimo būdas pateiktas 3.3.6.1. skyrelyje), eksperimentui reikalinga ląstelių dalis (2×10^6) yra perkeliama į švarų mėgintuvėlį ir praskiedžiama DMEM terpe iki 2 ml.

Neutrofilų aktyvinimas naudojant fMLP

Siekiant sukelti degranuliaciją, neutrofilai buvo veikiami formil-Met-Leu-Phe (fMLP). Galutinė fMLP tirpalo koncentracija, naudojama neutrofilų aktyvinimui yra 100nM. Ląstelės fMLP tirpale inkubuojamos 10 min. kambario temperatūroje. Praėjus inkubacijos laikui, suspensija centrifuguojama 10 min., kai $g = 2500$. Neutrofilai nusėda į mėgintuvėlio dugną. Virš jų esantis supernatantas surenkamas į švarų mėgintuvėlį.

Neutrofilų aktyvinimas naudojant PMA

Siekiant sukelti intensyvią reaktyvių deguonies metabolitų sintezę („kvėpavimo sprogimą“), neutrofilai buvo veikiami forbol 12-miristat 13-acetatu (PMA). Aktyvinimui naudojama galutinė PMA tirpalo koncentracija yra 200nM. Neutrofilų inkubacijos laikas

PMA tirpale - 30 min. Centrifugavimo laikas bei g reikšmė tokia pati kaip ir pirmuoju atveju.

3.3.5. MKL kultivavimo sąlygos

MKL išskiriamos ir kultivuojamos Eksperimentinės klinikinės medicinos institute kamieninių ląstelių laboratorijoje. Šios ląstelės auginamos specialiuose plastikiniuose flakonuose, DMEM terpėje, turinčioje 10% FCS bei 1% antibiotikų (streptomicino ir penicilino). MKL yra adehezinės ląstelės. *In vitro* jos dauginasi prisitvirtinusios prie plastikinio paviršiaus. Plastikiniai flakonai su ląstelėmis laikomi CO₂ inkubatoriuje, 37°C temperatūroje, esant 5% CO₂.

Eksperimentams buvo naudojamos PD 09.04 linijos MKL, išskirtos iš pieninio danties pulpos.

3.3.6. MKL migracijos tyrimas

3.3.6.1. MKL paruošimas migracijos tyrimui

Terpė, kurioje auginamos MKL, iš flakono išpilama. Ląstelės skalaujamos, keletą kartų jas užpilant PBS. Po to į flakoną įpilama 1 ml tripsino-EDTA tam, kad ląstelės atšoktų nuo plastikinio flakono paviršiaus. Flakonas dedamas į inkubatorių, kuriame laikomas 5 - 10 min. 37 °C temperatūroje, kol ląstelės atšoka. Tuomet į flakoną įpilama 8 ml DMEM terpės, turinčios 10% FCS. FCS sustabdo tripsino veikimą. Ląstelių suspensija iš flakono perkeliama į 15 ml mėgintuvėlį, kuris statomas į centrifugą. Centrifuguojama 5 min., g = 300. Baigus centrifuguoti, virš ląstelių esantis supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 1 ml DMEM terpės ir suskaičiuojamos.

Ląstelių skaičiavimui naudojama Goriajevo kamera. Ląstelių skaičius viename mililitre apskaičiuojamas pagal formulę:

$$N = (a \cdot n \cdot 1000) / 0,9$$

N – ląstelių skaičius viename mililitre

a - ląstelių skaičius Goriajevo kameroje

n – praskiedimų skaičius (jei suspensija skiedžiama)

0,9 – Goriajevo kameros tūris (mm³)

Suskaičiavus ląsteles, paimama jų dalis, reikalinga eksperimentui. Paprastai vienam eksperimentui sunaudojama apie 400 000 – ląstelių. Kadangi buvo atliekami keli skirtingi ekperimentai, tolesnis MKL paruošimas kiekvieno eksperimento metu skyrėsi ir yra aprašomas 3.4 skyrelyje.

3.3.6.2. Ląstelių migracijos tyrimo įrenginys

MKL migracijos tyrimas atliekamas dešimties šulinėlių chemotaksio kameroje AA 10.



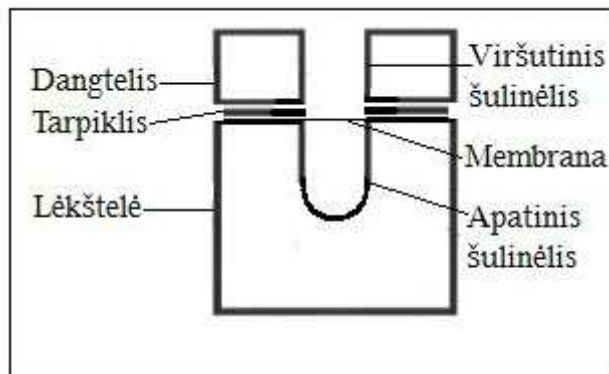
7 pav. Chemotaksio kamera AA 10

Chemotaksio kamera AA 10 pagaminta iš akrilo ir susideda iš trijų dalių:

- apatinės lėkštelės, turinčios 10 duobučių (apatinių šulinėlių);
- silikoninio tarpiklio;
- viršutinės dalies – dangtelio, kuriame yra 10 atvarų (viršutinių šulinėlių), atitinkančių lėkštelės šulinėlius.

Tarp apatinės lėkštelės ir silikoninio tarpiklio dedama poras turinti membrama, pro kurią vyksta ląstelių migracija iš viršutinių šulinėlių į apatinius.

Sistema susukama šešiais metaliniais varžtais.



8 pav. AA 10 chemotaksio kameros schema

3.3.6.3. Chemotaksio kameros AA 10 paruošimo tyrimui etapai

1. Chemotaksio kamera orientuojama taip, kad gamintojo žymė būtų dešinėje pusėje. Į kiekvieną apatinį šulinėlį suleidžiama po 413 μ l skysto užpildo, kurio poveikis ląstelių migracijai yra tiriamas. Užpildžius šulinėlius, jų paviršiuje turi susiformuoti iškilus skysčio meniskas tam, kad uždėjus membraną nesusidarytų oro burbulų. Šulinėliai užpildomi ne daugiau kaip per 5 min. Taip išvengiama, skysčio nugaravimo.
2. MKL migracijos tyrimui naudojamos polikarbonatinės membranos, turinčios 8 μ m skersmens poras. Viena membranos pusė yra matinė, kita blizganti. Prieš uždėdant membraną ant apatinių šulinėlių vienas jos kamputis nukerpamas ir membrana orientuojama taip, kad jis atsidurtų kameros dešiniajame kampe, ties gamintojo žyme. Membrana iš abiejų pusių suimama specialiais pincetais ir leidžiama ant šulinėlių matine puse į apačią. Pirmiausia su šulinėliais turi kontaktuoti vidurinioji membranos dalis. Šiame etape jos padėtį dar galima pakoreguoti, tačiau atsargiai, kad nesusimaišytų skirtingų šulinėlių turinys. Įsitikinus, kad membrana dedama tiesiai, jos galai nuleidžiami.
3. Ant membranos uždėdamas silikoninis tarpiklis, o ant jo gerai prispaudžiamas dangtelis. Dangtelio ir apatinės lėkštelės gamintojo žymės turi sutapti.
4. Tvirtai prisukami varžtai.
5. Į kiekvieną viršutinės lėkštelės atvarą – viršutinį šulinėlį – pilama po 285 μ l ląstelių suspensijos. Šiame suspensijos tūryje turi būti 20 000 ląstelių. Viršutinio šulinėlio dugno, kurį sudaro membranos paviršius, plotas yra 50 mm², todėl kiekvienam kvadratiniam šio ploto milimetrui tenka po 400 ląstelių.

6. Chemotaksio kamera dedama į CO₂ inkubatorių ir laikoma 37 °C temperatūroje, esant 5% CO₂. Inkubacijos laikas - 24 valandos.

Kiekvienam eksperimentui buvo naudojamos dvi AA 10 chemotaksio kameros.

3.3.6.4. MKL migracijos pabaiga, chemotaksio kameros išmontavimas

Po 24 valandų viršutinių šulinėlių turinys keliais staigiais judesiais iškratomas į kriauklę. Varžtai atsukami, kameros dangtelis nuimamas. Nuo lėkštelės atsargiai atkeliamas tarpiklis, prie kurio apatinio paviršiaus yra prilipusi membrana. Ji nuimama pincetu. Tuomet abu jos galai suimami specialiais gnybtais. Membrana orientuojama taip, kad migravusios ląstelės būtų viršuje. Tada apatinė membranos dalis, ant kurios yra prilipusių nemigravusių ląstelių, suvilgoma PBS ir švelniais judesiais braukiama per gramzdiklio guminę briauną. Gramzdiklis yra įtvirtintas stovelyje. Šis veiksmas kartojamas keletą kartų. Taip nuvalomos nemigravusios ląstelės. Tuomet membrana guldoma į Petri lėkštę ir išdžiovinama.

Po išmontavimo kameros komponentai pamerkiami į distiliuotą vandenį.

3.3.7. Migravusių MKL dažymo būdai

Migravusių MKL išryškinimui ant membranos buvo išbandyti keli dažymo būdai.

A būdas

Ląstelės fiksuojamos membraną pamerkus į - 20 °C temperatūroje atšaldytą metanolį (100 %). Laikoma 10 min. Po to membrana išdžiovinama kambario temperatūroje.

Dažymas

1. Giemsa - 20 min. (Darbinio tirpalo paruošimas: Giemsa dažai gerai sumaišomi su buferiniu tirpalu (pH=7,2) saktykiu 1:10);
2. Plaunama distiliuotu vandeniu;
3. Crystal violet - 20 min. (Darbinio tirpalo paruošimas: 50 mg crystal violet miltelių ištirpinama 50 ml 10% etanolio);
4. Plaunama distiliuotu vandeniu.

B būdas

Dažymas pagal Pappenheimą

1. May Grünwald – 3 min.;
2. Membrana plaunama buferiniu tirpalu (pH=7,2);

3. Giemsa – 20 min. (Darbinis tirpalas ruošiamas taip pat kaip ir A atveju);
4. Membrana plaunama distiliuotu vandeniu.

C būdas

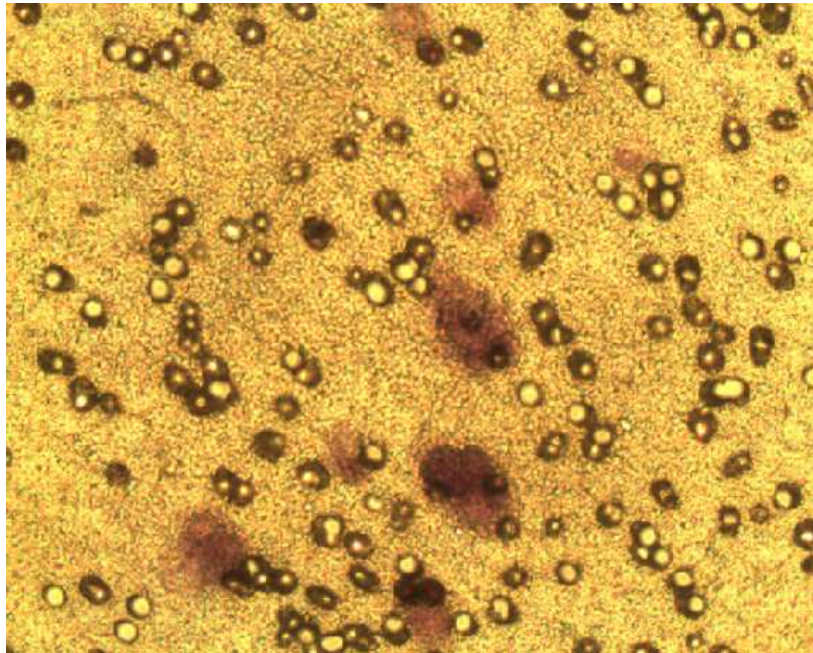
Dažymas

1. FIX-RAL 555 – 1 s.
2. EOSIN-RAL 555 – 15 min.
3. BLUE-RAL 555 – 15 min.
4. Membrana plaunama distiliuotu vandeniu.

Kiekvienu atveju, iškart po plovimo distiliuotu vandeniu membrana guldoma į Petri lėkštelę ir mikroskopuojama $20\times$ padidiniu.

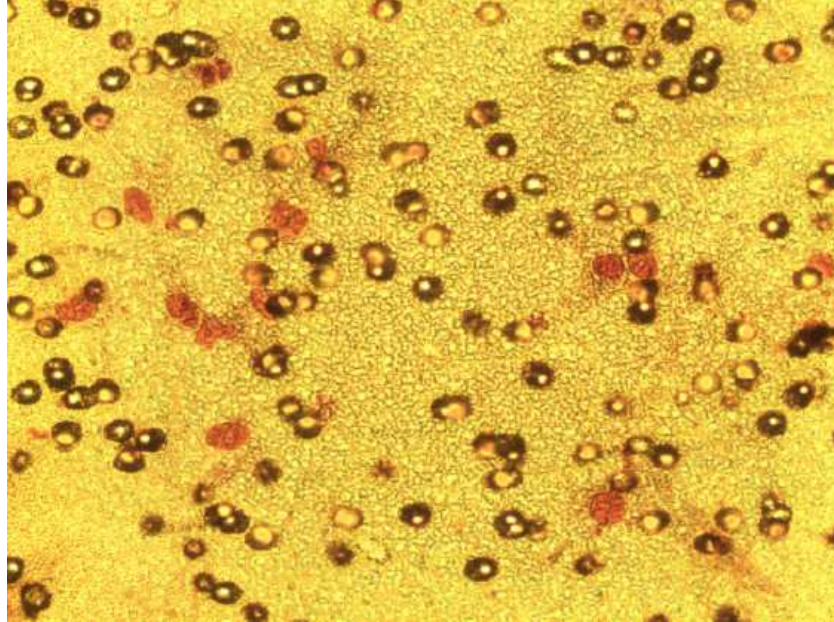
3.3.8. Dažymo būdo pasirinkimas

A būdu dažytos MKL (9 pav.) buvo blyškiai violetinės spalvos „debesėlių“ pavidalo. Citoplazmos kontūrai neišryškėjo. Dėl to kai kurios ląstelės atrodė „susiliejusios“ ir neatskiriamos viena nuo kitos.



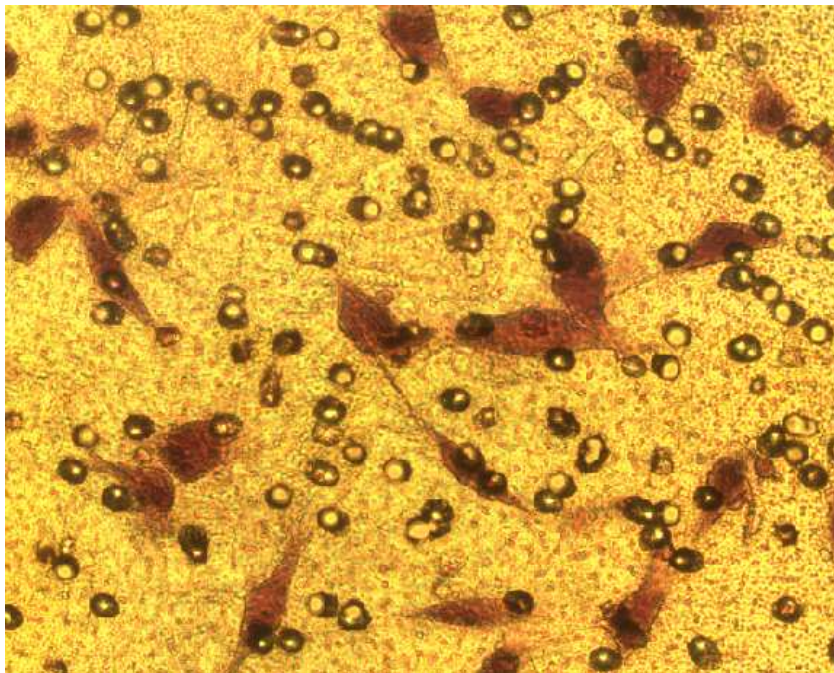
9 pav. A būdu dažytos MKL ant polikarbonatinės membranos

Nudažius MKL B būdu (10 pav.), geriausiai išryškėjo ląstelių branduoliai, tačiau citoplazma buvo beveik nematoma. Be to, ant membranos susidarydavo dažų dėmės (artefaktai), kurios apsunkindavo ląstelių matomumą bei skaičiavimą.



10 pav. B būdu nudažytos MKL

C būdu nudažytos MKL matomos gerai. Lengva išskirti individualias ląsteles. Kai kuriose iš jų galima įžiūrėti branduolius.



11 pav. C būdu nudažytos MKL

Ląsteles ant membranos geriausiai išryškino C dažymo būdas. Jį naudojant ant membranos nelikdavo dažų dėmių, nes dažų perteklius gerai nusiplaudavo distiliuotu vandeniu. Be to, prieš dažant RAL-555 dažų nereikia specialiai ruošti. Dėl šių priežasčių tolesniam darbui buvo pasirinktas C dažymo būdas.

3.4. Eksperimentų planavimas

MKL migracijos tyrimą sudarė keturios eksperimentų grupės. Kiekvienu atveju, chemotaksio kameros užpildymo tvarka bei MKL paruošimas skyrėsi.

Eksperimentas nr. 1

Šis eksperimentas skirtas MKL bazinės migracijos – chemokinezės – aktyvumo nustatymui bei įvertinimui. Taip pat siekta nustatyti, ar MKL auginimo terpė (DMEM su 10% FCS) ir DMEM, turinti 1% žmogaus kraujo plazmos, sukelia MKL chemotaksį, ir jei taip, tai kuris šių tirpalų yra geresnis chemotaksio induktorius. Tai – svarbus etapas planuojant tolimesnius eksperimentus.

Žmogaus kraujo plazma gaunama centrifuguojant kraujo bandinius 10 min., kai $g=2500$.

Apatiniai chemotaksio kameros šulinėliai paeiliui užpildomi DMEM, DMEM, turinčia 10% FBS ir DMEM, turinčia 1% žmogaus kraujo plazmos. Devyni viršutiniai šulinėliai užpildomi MKL suspensija. Į kiekvieną chemotaksio kameros viršutinį šulinėlį turi būti suleidžiama 20 000 ląstelių, todėl viename mililitre suspenduotos MKL (400 000 ląstelių) atskiedžiamos DMEM terpe taip, kad paėmus 285 μ l suspensijos, joje būtų 20 000 ląstelių. Taigi suspensija papildoma iki 5,7 ml. Paskutinis, dešimtas, šulinėlis – teigiama kontrolė. Čia pilama vėžinių (Hela) ląstelių suspensija (taip pat 20 000 ląstelių). Jos pasižymi dideliu migracijos aktyvumu ir leidžia įsitikinti, kad esamomis sąlygomis ląstelių migracija tikrai vyksta. Gavus gerai atsikartojančius rezultatus, kituose eksperimentuose teigiamos kontrolės buvo atsisakyta.

Dirbama su dviem chemotaksio kamerom tam, kad vieno eksperimento metu būtų gauta daugiau duomenų. Taigi vieno eksperimento metu skirtingos migracijos sąlygos (su kiekviena iš DMEM terpių) buvo sudaromos šešiuose šulinėliuose. Po vieną kiekvienos kameros šulinėlį buvo skirta vėžinių ląstelių migracijai.

4 lentelė. Eksperimento nr. 1 chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM	DMEM+10% FCS	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM	DMEM+10% FCS
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM	DMEM+10% FCS	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+10% FCS
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	Vėžinės (Hela) ląstelės

Eksperimentas nr. 2

Šio eksperimento tikslas - ištirti, ar suaktyvintų neutrofilų supernatantas pasižymi chemoatraktanto savybėmis, t.y., ar skatina kryptingą MKL migraciją pro polikarbonatinės membranos poras.

Šio ir tolimesnių eksperimentų metu taip pat buvo dirbama su dviem chemotaksio kamerom. Vienoje iš jų buvo tiriama neutrofilų aktyvacijos produktų įtaka MKL migracijos aktyvumui, kitoje buvo atliekamas kontrolinis tyrimas.

Pirmosios kameros 5 pirmieji apatiniai šulinėliai užpildomi neutrofilų supernatantu, kuris buvo gautas aktyvinant 2×10^6 neutrofilų, likusieji 5 – kontroliniai – DMEM terpe su fMLP, kurio galutinė koncentracija tirpale tokia pat, kaip ir neutrofilų supernatante (100 mM). Į visus viršutinius šulinėlius pilama po 20 000 MKL.

5 lentelė. Eksperimento nr. 2 pirmosios chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	Neutrofilų supernatantas	Neutrofilų supernatantas	Neutrofilų supernatantas	Neutrofilų supernatantas	Neutrofilų supernatantas
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL

Naudojant antrą chemotaksio kamerą siekta iširti, ar esamos koncentracijos neutrofilų aktyvatorius fMLP veikia kaip MKL chemoatraktantas. Šis tyrimas yra būtinas, nes po neutrofilų aktyvinimo, fMLP lieka supernatante. O tai yra medžiaga, veikianti per N-formilintų peptidų receptorių, todėl ji gali turėti įtakos MKL migracijos aktyvumui ir iškreipti tiriamųjų šulinėlių rezultatus. Taigi kontrolinio eksperimento metu antrosios chemotaksio kameros 5 pirmieji apatiniai šulinėliai buvo užpildyti DMEM su fMLP, o likę 5 – tiesiog DMEM.

6 lentelė. Kontrolinio eksperimento nr. 2 antrosios chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP	DMEM+fMLP
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL

Eksperimentas nr. 3a

Šio eksperimento tikslas - iširti, kaip neutrofilų degranuliacijos produktai veikia MKL chemokinezės (t.y. spontaninio, įvairiakrypčio ląstelių judėjimo) aktyvumą.

MKL paruošimas eksperimentui ir šulinėlių užpildymas

Ekperimentui naudojama apie 400 000 MKL. Šis jų skaičius skeliamas į tris dalis. Tolesnis kiekvienos ląstelių porcijos paruošimas skiriasi.

Pirmoji porcija (apie 150 000 ląstelių) supilama į švarų 15 ml mėgintuvėlį ir centrifuguojama 10 min., kai $g = 300$. Po to virš ląstelių esanti terpė nupilama, o ląstelės užpilamos dviem mililitrais neutrofilų supernatanto. Kaip minėta, neutrofilų supernatante lieka ir aktyvatoriaus fMLP. Svarbu įvertinti jo poveikį MKL chemokinezės aktyvumui, todėl kitos dvi MKL porcijos yra naudojamos kontrolei.

Antroji MKL porcija (apie 250 000 ląstelių) suspenduojama 3,56 ml DMEM terpės ir veikiama fMLP. Naudojama tokia pati šio aktyvatoriaus galutinė koncentracija tirpale, kaip ir aktyvinant neutrofilus (100mM).

Trečioji MKL porcija (apie 150 000 ląstelių) neveikiama jokia medžiaga, tik praskiedžiama iki 2,2 ml.

Šio eksperimento metu visi apatiniai šulinėliai užpildomi DMEM, t.y. tirpalu, neturinčiu chemoatraktantų. Į pirmosios chemotaksio kameros 5 pirmuosius viršutinius šulinėlius yra pilamos MKL, suspenduotos neutrofilų supernatante. Taigi per visą migracijos laiką - 24 val. jos išlieka neutrofilų degranuliacijos produktų poveikyje. Į kitus 5 – kontrolinius – šulinėlius pilamos MKL, paveiktos fMLP.

7 lentelė. Eksperimento nr. 3a pirmosios chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Viršutinis šulinėlis	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Viršutinis šulinėlis	MKL+fMLP	MKL+ fMLP	MKL+ fMLP	MKL+ fMLP	MKL+fMLP

Naudojant antrą chemotaksio kamerą buvo iširta fMLP įtaka MKL chemokinezei (kontrolinis eksperimentas). Visi apatiniai kameros šulinėliai taip pat buvo užpildyti DMEM,

5 pirmieji viršutiniai šulinėliai - MKL suspensija, paveikta fMLP, o likusieji niekuo neveiktomis MKL.

8 lentelė. Kontrolinio eksperimento nr. 3a antrosios chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Viršutinis šulinėlis	MKL+fMLP	MKL+fMLP	MKL+fMLP	MKL+fMLP	MKL+fMLP
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL

Eksperimentas nr. 3b

Šio eksperimento tikslas - ištirti neutrofilų degranuliacijos produktų įtaką MKL chemotaksiui – kryptingam ląstelių judėjimui chemotaktinių medžiagų koncentracijos didėjimo linkme.

Šiuo atveju apatiniai šulinėliai užpildomi DMEM, turinčia 1% žmogaus kraujo plazmos. MKL paruošimas toks pat, kaip ir 3a eksperimente. Pirmieji 5 viršutiniai šulinėliai užpildomi MKL, suspenduotomis neutrofilų supernatante, likę 5 – kontroliniai šulinėliai - MKL, paveiktomis fMLP.

9 lentelė. Eksperimento nr. 3b pirmosios chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma
Viršutinis šulinėlis	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas	MKL+ neutrofilų supernatantas
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma
Viršutinis šulinėlis	MKL+fMLP	MKL+fMLP	MKL+fMLP	MKL+fMLP	MKL+fMLP

Atrojoje chemotaksio kameroje atliekamas kontrolinis tyrimas. Šiuo atveju siekiama išsiaiškinti, ar naudojamos koncentracijos fMLP turi poveikį MKL chemotaksio aktyvumui. Taigi 5 viršutiniai šulinėliai užpildomi MKL suspensija, paveikta fMLP, o į likusius penkis suleidžiamos jokiomis medžiagomis nepaveiktos MKL.

10 lentelė. Kontrolinio eksperimento nr.3b antrosios chemotaksio kameros užpildymo tvarka

Šulinėlio eilės numeris	1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma
Viršutinis šulinėlis	MKL+ fMLP	MKL+ fMLP	MKL+ fMLP	MKL+ fMLP	MKL+ fMLP
Šulinėlio eilės numeris	6 šulinėlis	7 šulinėlis	8 šulinėlis	9 šulinėlis	10 šulinėlis
Apatinis šulinėlis	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma	DMEM+1% žmogaus kraujo plazma
Viršutinis šulinėlis	MKL	MKL	MKL	MKL	MKL

Eksperimentų grupė, kuomet neutrofilų aktyvinimui buvo naudojamas PMA

Atlikome dar du eksperimentus analogiškus eksperimentams nr. 3a ir nr. 3b. Tik šiuo atveju neutrofilų aktyvinimui buvo naudojamas PMA, kuris greita neutrofilų degranuliacijos sukelia ir galingą „kvėpavimo sprogimą“. Taigi šių eksperimentų metu buvo tiriama neutrofilų išskiriamų degranuliacijos produktų bei reaktyvių deguonies metabolitų (ROS) įtaka MKL migracijos aktyvumui.

Eksperimento nr. 4a tikslas - iširti minėtų neutrofilų aktyvacijos produktų įtaką MKL chemokinezei. Eksperimento nr. 4b tikslas - iširti šių produktų įtaką MKL chemotaksiui. Abiem atvejais tiriamoji MKL porcija buvo suspenduota PMA suaktyvintų neutrofilų supernatante. Kontrolinė MKL porcija buvo veikiamą vien tik PMA (tirpalo galutinė koncentracija 200nM). Siekiant išsiaiškinti, ar naudojamos koncentracijos PMA įtakoja MKL migracijos aktyvumą, atliktas kontrolinis eksperimentas. Antroje chemotaksio kameroje į penkis pirmuosius viršutinius šulinėlius buvo suleistos PMA paveiktos MKL, o į kitus penkis - niekuo neveiktos MKL. Chemotaksio kameros šulinėliai buvo užpildomi tokia pat tvarka, kaip ir 3a, 3b eksperimentuose.

3.5. MKL migracijos aktyvumo vertinimas ir rezultatų apdorojimas

Po dažymo išdžiovintos membranos buvo mikroskopuojamos šviesiniu mikroskopu, 20× padidiniu. Kiekviename šulinėlyje MKL migracijos aktyvumas buvo vertinamas penkiuose atsitiktiniuose regėjimo laukuose suskaičius migravusias ląsteles ir išvedus vidurkį. Kiekvieno eksperimento metu vienodomis sąlygomis migracija vyko penkiuose šulinėliuose (išskyrus eksperimentą nr.1). Atlikome migravusių MKL skaičiaus vidurkių palyginimą tiriamuosiuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Ląstelių fotografavimui naudojome ImagePlus programą.

Tyrimų rezultatai statistiškai apdoroti naudojant SPSS 13 programą. Duomenys pateikiami apskaičius aritmetinį vidurkį ir standartinį nuokrypį. Skirtumas tarp grupių įvertintas panaudojus student'o testą ir ANOVA. Rezultatai buvo laikomi reikšmingi, kai $p < 0,05$. Duomenų grafinis pavaizdavimas atliktas OriginPro7 programa.. Pateikiami eksperimentų duomenys, kurie atsikartojo bent tris kartus.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo atlikti eksperimentai, kurių metu nustatyta, kaip kinta MKL migracijos aktyvumas, jas paveikus neutrofilų degranuliacijos produktais bei reaktyviais deguonies metabolitais. Taip pat buvo iširta, ar suaktyvintų neutrofilų supernatantas yra MKL chemotaksio induktorius.

Tyrimas rėmėsi dviem reiškiniiais: chemokineze ir chemotaksium. MKL yra judrios adhezinės ląstelės. Chemotaksio kameros šulinėlyje net nepaveiktos chemotaksiniu stimulu jos juda atsitiktinėmis kryptimis ir geba migruoti pro eksperimentuose naudojamos polikarbonatinės membranos poras. Tai – bazinė MKL migracija, kurią įvardijame kaip chemokinezę. Be to, pavyko sukelti MKL chemotaksi – kryptingą MKL migraciją, apatinius šulinėlius užpildžius chemotaksiniais agentais. Taigi vienu eksperimentu tikslas buvo iširti neutrofilų aktyvacijos produktų įtaką MKL chemokinezei, kitų – chemotaksiui.

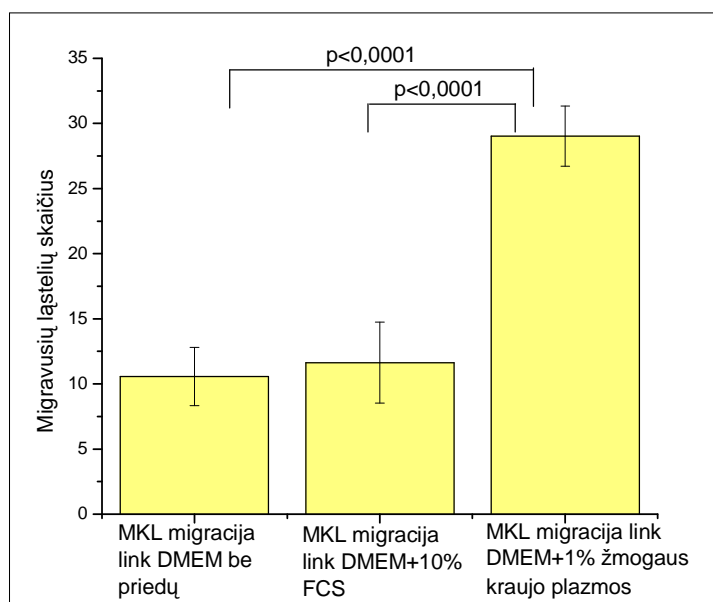
Šiame darbe naudojamas terminas, neutrofilų aktyvacijos produktai, apima dvi skirtingas medžiagų grupes: neutrofilų granulėse kaupiamas medžiagas, atsipalaiduojančias degranuliacijos metu ir ROS (reaktyvius deguonies metabolitus). Neutrofilų aktyvatorius fMLP sukelia degranuliaciją ir silpną ROS sintezę, todėl neutrofilų aktyvinimui buvo naudojamas siekiant iširti degranuliacijos produktų įtaką MKL migracijos aktyvumui. PMA taip pat sukelia neutrofilų degranuliaciją, tačiau ryškiausias jo sukiamas efektas yra „kvėpavimo sproginimas“, kurio metu išsiskiria gausus ROS kiekis. Todėl PMA neutrofilų aktyvinimui buvo naudojamas tiriant suminę degranuliacijos produktų ir ROS įtaką MKL migracijos aktyvumui. Taip pat, neatmetama galimybė, kad abiem būdais suaktyvinti neutrofilai gamino lipidinius uždegimo mediatorius bei citokinus.

4.1. MKL migracija link skirtingai modifikuotų DMEM terpių

Eksperimento nr. 1 metu buvo tiriamos dviejų skirtingais būdais modifikuotų DMEM terpių (DMEM, turinčios 10% FCS, ir DMEM, turinčios 1% žmogaus kraujo plazmos) galimybės sukelti MKL chemotaksi. Taip pat buvo iširtas MKL chemokinezės aktyvumas, kuomet ląstelės, neveikiamos jokių chemotaksinių stimulų, spontaniškai migravo link DMEM be priedų. Dėl chemokinezės pro membraną migravusių ląstelių skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose buvo $10,56 \pm 2,24$, migravusių link DMEM su 10% FCS - $11,63 \pm 3,10$, o link DMEM su 1% žmogaus kraujo plazmos - $29,03 \pm 2,29$.

11 lentelė. Link skirtingai modifikuotų DMEM terpių migravusių MKL skaičiaus vidurkiai.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (šešių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis
MKL, migravusios link DMEM be priedų	6 (pirma šulinėlių grupė)	10,56	2,24
MKL, migravusios link DMEM su 10% FCS	6 (antra šulinėlių grupė)	11,63	3,10
MKL, migravusios link DMEM su 1% žmogaus kraujo plazmos	6 (trečia šulinėlių grupė)	29,03	2,29



12 pav. MKL migracija link skirtingai modifikuotų DMEM terpių

Apskaičiavus ANOVA buvo palyginti šių trijų šulinėlių grupių vidurkiai. Statistiškai reikšmingi skirtumai rasti tarp pirmos ir trečios, taip pat tarp antros ir trečios šulinėlių grupių ($p < 0,0001$). Pirmos ir antros grupių vidurkiai panašūs ir skiriasi nereikšmingai. Taigi ląstelių auginimo terpė – DMEM, turinti 10% FCS, nesukelia MKL chemotaksio. Greičiausiai fetaliniame veršiuko serume nėra chemokinių bei kitų chemoatraktantų arba jų kiekiai nežymūs. Pasirodė, kad 1% žmogaus kraujo plazma stipriai skatina MKL migraciją. Jos sukiamas MKL migracijos aktyvumas lyginant su chemokineziniu aktyvumu yra 2,6 karto didesnis. Taigi ji yra efektyvus chemotaksio induktorius. Žinoma, kad žmogaus

kraujo plazmoje yra ląstelių chemotaksį indukuojančių medžiagų, tokių kaip chemokinai, komplemento komponentai, augimo faktoriai ir kt., todėl panaudojus ją kaip stimulą apatiniuose šulinėliuose ji sukėlė ir MKL migracinį atsaką. Šie rezultatai leido pasirinkti kraujo plazmą tolimesniems chemotaksio tyrimams. Be to, jie patvirtina kitų tyrėjų gautus rezultatus. Mokslininkų grupė (Rüster B. ir kt.) nustatė, kad žmogaus kraujo plazma (gauta centrifuguojant kraujo bandinius) yra efektyvus chemotaksio induktorius, kuomet jos koncentracija DMEM terpėje yra nuo 0,1% iki 40%. Optimali koncentracija nuo 0,3% iki 3%. Tolimesniems migracijos tyrimams mokslininkai apatiniuose šulinėliuose naudojo 1% kraujo plazmos užpildą [46]. Šiame darbe taip pat buvo pasirinkta ši plazmos koncentracija.

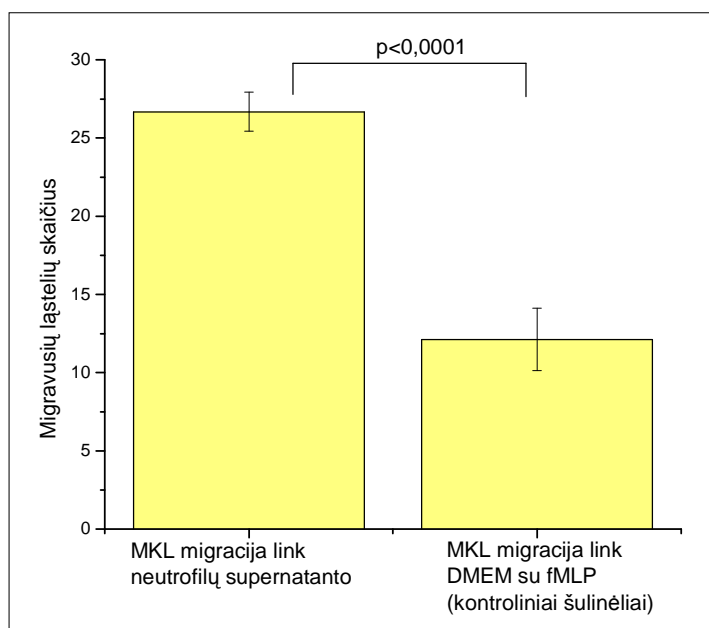
4.2. MKL migracija link suaktyvintų neutrofilų supernatanto

Eksperimente nr. 2 tiriamųjų apatinių šulinėlių užpildas buvo fMLP suaktyvintų neutrofilų supernatantas. Aktyvacijos metu į jį išsiskyrė neutrofilų granulių turinys. Kontrolinės sąlygos sudarytos kitus 5 kameros šulinėlius užpildžius DMEM su fMLP.

Link neutrofilų supernatanto migravusių ląstelių skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose buvo $26 \pm 1,25$, kontroliniuose šulinėliuose - $12,12 \pm 1,98$. Tarp šių šulinėlių grupių buvo statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,0001$). Taigi MKL migracinis aktyvumas apatinius šulinėlius užpildžius neutrofilų supernatantu išaugo 2,2 karto lyginant su kontroline šulinėlių grupe.

12 lentelė. MKL, migravusių link neutrofilų supernatanto ir kontrolinio užpildo, skaičiaus palyginimas

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, migravusios link neutrofilų supernatanto	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	26,28	1,25	p<0,0001
MKL, migravusios link DMEM terpės su fMLP	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	12,12	1,98	



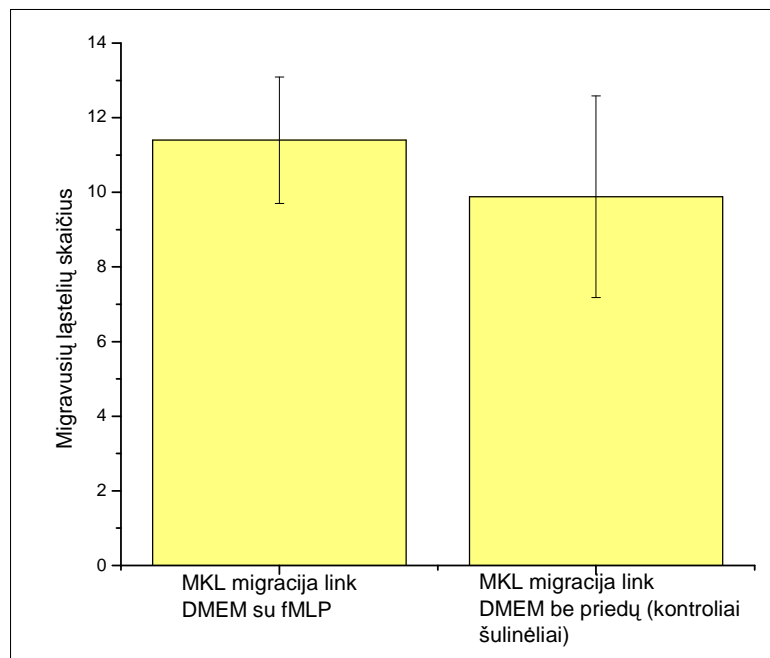
13 pav. MKL migracija link neutrofilų supernatanto ir kontrolinio užpildo

Viswanathan A. su bendraautoriais nustatė, jog kai kurios MKL subpopuliacijos turi formilintų peptidų receptorius (FPR), per kuriuos veikdami N-formilinti peptidai, tokie kaip fMLP, sukelia teigiamą MKL chemotaksi. Be to, nustatyta, jog stipriausią chemotaksinį efektą sukelia 50 – 100nM koncentracijos fMLP tirpalai [59]. Šiame darbe neutrofilų aktyvinimui naudota 100nM fMLP koncentracija. Panaši ji išlikdavo ir neutrofilų supernatante, kuriuo buvo užpildomi apatiniai tiriamieji šulinėliai šio eksperimento metu arba veikiamos pačios MKL 3a bei 3b eksperimentų metu. Siekiant išvengti klaidingos rezultatų interpretacijos, pirmosios kameros kontroliniai šulinėliai buvo užpildyti DMEM, turinčia 100nM fMLP. O antrojoje kameroje buvo atliktas kontrolinis tyrimas, kurio tikslas – nustatyti ar naudojamos koncentracijos fMLP sukelia MKL teigiamą chemotaksi.

Antroje chemotaksio kameroje, link DMEM terpės su fMLP migravusių ląstelių skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose $11,40 \pm 1,69$, o migravusių link DMEM be priedų - $9,88 \pm 2,70$. Skirtumas tarp šių dviejų šulinėlių grupių - statistiškai nereikšmingas ($p = 0,318$). Nors stebima nežymi migracijos aktyvumo didėjimo tendencija tiriamojoje šulinėlių grupėje, tačiau šiuo atveju ji greičiausiai yra atsitiktinė, nes kartojant eksperimentus vidurkiai nežymiai svyravo. Be to, migravusių MKL skaičius varijuoja ir tarp šulinėlių (žr. standartinį nuoktypi).

13 lentelė. Kontrolinis eksperimentas. MKL, migravusių link DMEM su fMLP ir DMEM be priedų, skaičiaus palyginimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, migravusios link DMEM terpės su fMLP	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	11,40	1,69	p = 0,318
MKL, migravusios link DMEM	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	9,88	2,70	



14 pav. MKL migracija link DMEM su fMLP ir kontrolinio užpildo

Mūsų atlikto kontrolinio eksperimento rezultatai leidžia teigti, kad 100nM fMLP tirpalas reikšmingai neįtakojo PD 09.04 linijos MKL migracijos aktyvumo ir nesukėlė teigiamo chemotaksio. Tokie rezultatai patvirtina kitų tyrėjų išvadą, kad skirtingoms MKL linijoms būdingas FPR polimorfizmas ir funkcinis heterogeniškumas, o gaunami rezultatai priklauso nuo skirtingumo tarp donorų, iš kurių audinių MKL yra išskiriamos [59]. Todėl fMLP nebūtinai sukelia MKL teigiamą chemotaksį. Tai rodo ir mūsų atlikto tyrimo rezultatai.

Įvertinus abiejų chemotaksio kamerų rezultatus, galime teigti, kad MKL chemotaksi sukėlė suaktyvintų neutrofilų supernatantas, o fMLP jam įtakos neturėjo. Tikėtina, kad *in vivo* uždegiminėje aplinkoje išsiskiriantys neutrofilų degranuliacijos produktai turi teigiamą chemotaksinį poveikį MKL ir skatina jų migraciją į uždegimo židinį.

Šio tyrimo rezultatai leidžia spręsti tik apie neutrofilų išskiriamų medžiagų visumos poveikį. Tyrimą reiktų pratęsti, norint nustatyti, kurios konkrečiai neutrofilų išskiriamos medžiagos sukelia MKL chemotaksi.

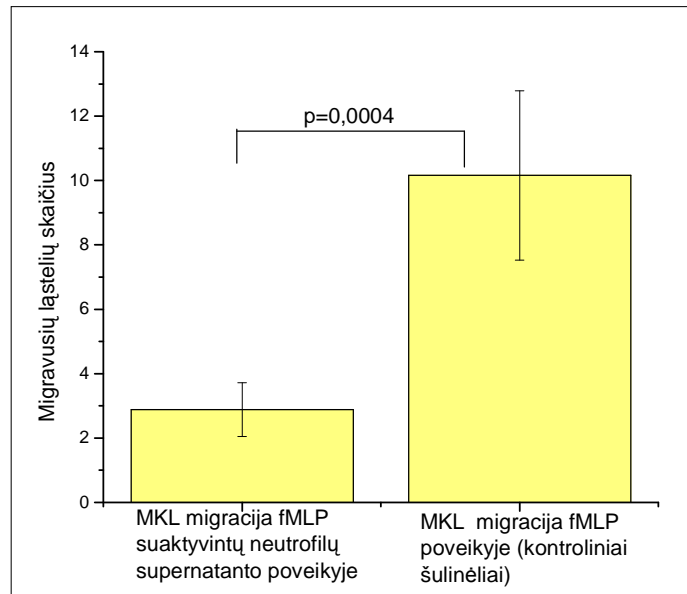
4.3. FMLP suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemokinezei

Eksperimento nr. 2b metu sąlygos chemokinezei buvo sukurtos apatinius šulinėlius užpildžius DMEM terpe be priedų. Šiuo atveju tiriama MKL porcija buvo suspenduota neutrofilų supernatante, gautame neutrofilus suaktyvintus fMLP.

Migravusių MKL, veikiamų neutrofilų supernatantu, skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose $2,88 \pm 0,83$, kontroliniuose šulinėliuose $-10,16 \pm 2,63$. Skirtumas tarp šių šulinėlių grupių vidurkių yra statistiškai reikšmingas ($p = 0,0004$).

14 lentelė. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas neutrofilų degranuliacijos produktais paveiktuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, neutrofilų degranuliacijos produktų poveikyje	5 (tiriama šulinėlių grupė)	2,88	0,83	p = 0,0004
MKL, fMLP poveikyje (kontrolė)	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	10,16	2,63	

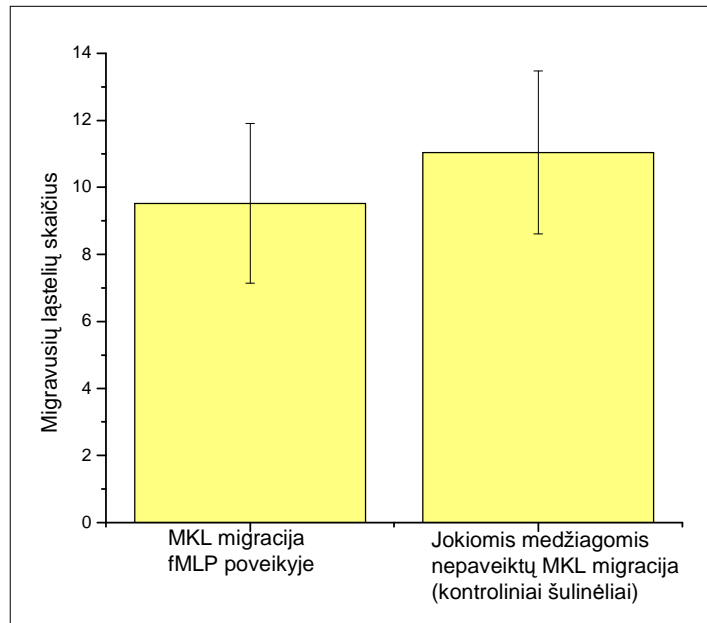


15 pav. MKL migracija neutrofilų degranuliacijos produktais paveikuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

Kontrolinio eksperimento metu antroje chemotaksio kameroje gauti rezultatai parodė, kad fMLP paveiktose ir jokiomis medžiagomis nepaveiktose šulinėlių grupėse migravusių MKL skaičiaus vidurkiai panašūs ir reikšmingai nesiskiria (13 lent). Galima daryti išvadą, kad fMLP neturėjo įtakos MKL chemokinezei.

15 lentelė. Kontrolinis eksperimentas. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas fMLP paveikuose ir jokiomis medžiagomis neveikuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, fMLP poveikyje	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	9,52	2,39	p = 0,348
Jokiomis medžiagomis neveiktos MKL	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	11,04	2,43	



16 pav. MKL migracija fMLP paveiktuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

Išanalizavus abiejų chemotaksio kamerų rezultatus, apskaičiuota, kad MKL, veikiamų neutrofilų supernatantu, migracijos aktyvumas yra 3,5 kato mažesnis nei kontroliniuose šulinėliuose. Šis eksperimentas yra atvirkštinis ekperimentui nr. 2 ir patvirtina jo metu gautus rezultatus. Suaktyvintų neutrofilų išskiriamos medžiagos, pasižyminčios chemoatraktantų savybėmis, efektyviai sulaiko MKL viršutiniuose šulinėliuose ir slopina jų migraciją pro polikarbonatinės membranos poras. Tikėtina, kad *in vivo* neutrofilų degranuliacijos produktai bei sintetiniai chemokinai yra vieni iš faktorių sąlygojančių ne tik MKL „pritraukimą“ į uždegimo vietą, bet ir jų sulaikymą jame.

Degranuliacijos metu į neutrofilų supernatantą atsipalaiduoja ir fermentų rinkinys (rūgščios hidrolazės, neutralios proteazės, endonukleazės, lipazės ir kt.). Tai agresyvios medžiagos, uždegimo metu pažeidžiančios šeimnininko audinius [73]. Negalima atmesti tikimybės, kad jos tyrimo metu pažeidžia ir MKL struktūras ir taip sumažina jų migracinį pajėgumą. Tai galėtų būti dar viena priežastis, dėl kurios tiriamuosiuose šulinėliuose sumažėjo MKL migracijos aktyvumas.

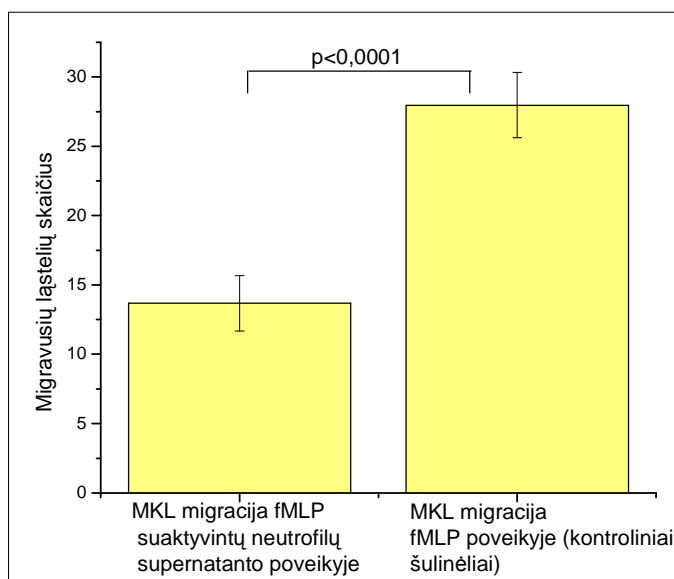
4.4. FMLP suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemotaksiui

Eksperimento nr. 1 metu nustatyta, kad 1% žmogaus kraujo plazmos užpildas sukelia teigiamą MKL chemotaksį, todėl 3b ekperimente jis buvo panaudotas kaip chemotaktinis stimulus apatiniuose šulinėliuose.

Pirmojoje kameroje migravusių MKL, veikiamų neutrofilų supernatantu, skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose buvo $13,68 \pm 2,00$, kontroliniuose šulinėliuose - $27,96 \pm 2,36$. Šių dviejų šulinėlių grupių vidurkiai statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,0001$).

16 lentelė. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas neutrofilų degranuliacijos produktais paveikuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, neutrofilų degranuliacijos produktų poveikyje	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	13,68	2,00	$p < 0,0001$
MKL, fMLP poveikyje (kontrolė)	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	27,96	2,36	

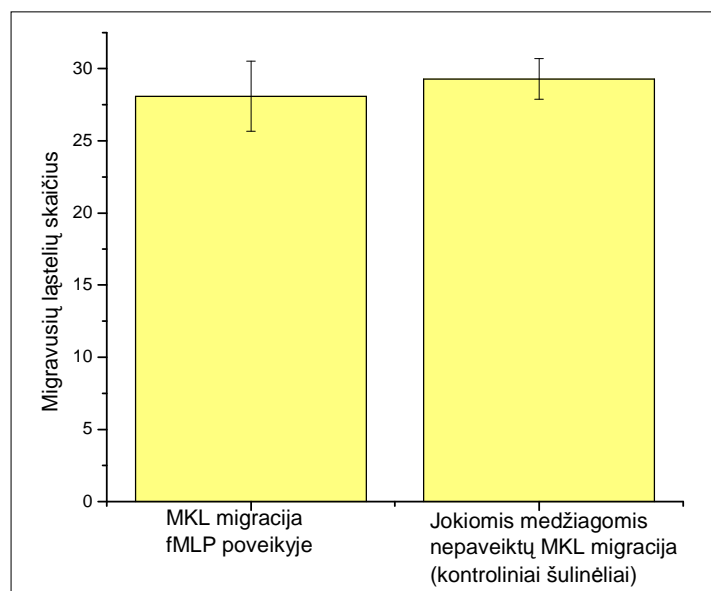


17 pav. MKL migracija neutrofilų degranuliacijos produktais paveikuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

Kontrolinio tyrimo rezultatai (15 lent.) liudija, kad fMLP neturėjo įtakos MKL chemotaksiui, t.y. tiriamosios ir kontrolinės šulinėlių grupių vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,367$).

17 lentelė. Kontrolinis eksperimentas. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas fMLP paveiktuose ir jokiais medžiagomis neveiktuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Vidurkis (5-iuose šulinėliuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, fMLP poveikyje	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	28,08	2,43	$p = 0,367$
Jokiomis medžiagomis neveiktos MKL (kontrolė)	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	29,28	1,41	



18 pav. MKL migracija fMLP paveiktuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

Įvertinus abiejų chemotaksio kamerų rezultatus, nustatyta, kad neutrofilų supernatantas, kuriame buvo suspenduotos MKL, sumažino jų chemotaksio aktyvumą 2 kartus.

Šiuo atveju buvo sudarytos sudėtingos MKL migracijos sąlygos, nes tiek žmogaus kraujo plazma (apatiniuose šulinėliuose), tiek neutrofilų supernatantas, kuriame buvo suspenduotos MKL (viršutiniuose šulinėliuose) yra MKL chemotaksio stimulas. Tokiu atveju ląstelės migruoja chemotaksinių faktorių koncentracijos didėjimo linkme. Šio eksperimento sąlygos nėra standartizuotos, t.y. nei plazmoje, nei neutrofilų supernatante

esančių chemoatraktantų kiekis bei pobūdis nėra žinomas. Be to, plazmoje esančios chemotaksį sukeliančios medžiagos skiriasi nuo esančių neutrofilų supernatante. Šio eksperimento metu siekėme nustatyti tik šių medžiagų visumos poveikio tendenciją. Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad neutrofilų degranuliacijos produktai įtakoja MKL migracinį pajėgumą ir „konkuruoja“ su plazmos chemotaksiniais veiksniais dėl MKL migracijos krypties. Tyrimą reiktų pratęsti, apatiniuose šulinėliuose naudojant vieną, žinomos koncentracijos, chemoatraktantą.

Kaip ir 3a ekperimento metu negalime atmesti galimybės, kad MKL migracijos aktyvumo sumažėjimą bent iš dalies galėjo nulemti žalojantis neutrofilų lizosominių fermentų poveikis.

4.5. PMA suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemokinezei

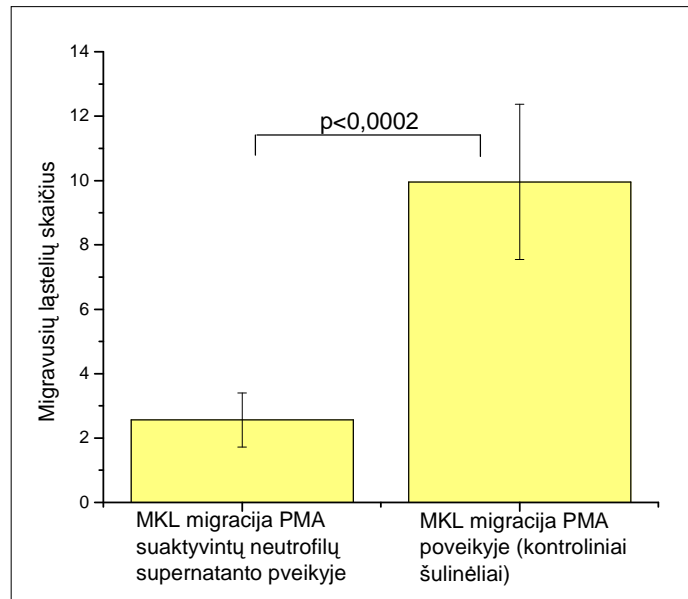
Aktyvinant neutrofilus PMA, į jų supernatantą išsiskiria ne tik degranuliacijos produktai, bet ir gausus ROS kiekis. Ketvirtoji eksperimentų grupė buvo skirta suminio šių medžiagų poveikio MKL migracijos aktyvumui tyrimams.

Pirmiausia buvo ištirtas minėtų medžiagų poveikis MKL chemokinezei.

Migravusių MKL, veikiamų neutrofilų supernatantu, skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose yra $2,88 \pm 0,83$, kontroliniuose šulinėliuose $-10,16 \pm 2,63$. Tarp grupių yra statistiškai reikšmingas skirtumas ($p = 0,0002$).

18 lentelė. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas neutrofilų aktyvacijos produktais paveiktuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL neutrofilų aktyvacijos poveikyje	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	2,56	0,84	p=0,0002
MKL, paveiktos PMA (kontrolė)	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	9,96	2,40	

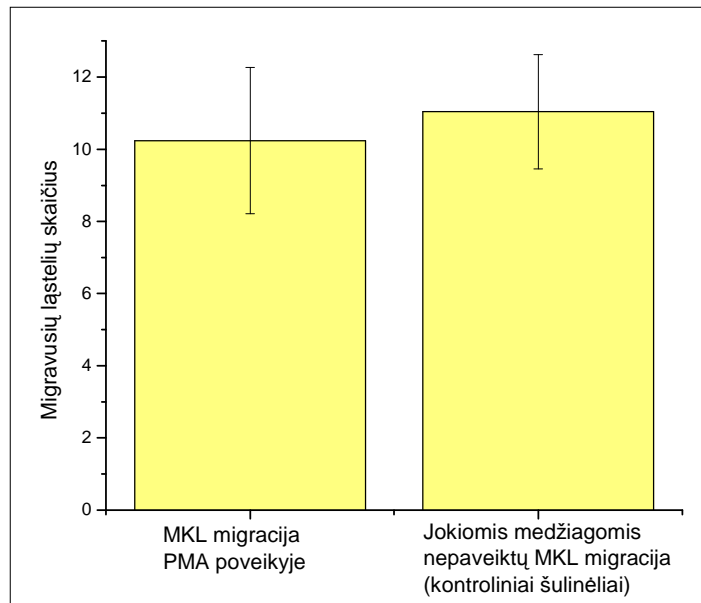


19 pav. MKL migracija neutrofilų aktyvacijos produktais paveiktuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

Žinoma, kad neutrofilų aktyvinimui naudotas PMA sukelia galingą „kvėpavimo sproginimą“, degranuliaciją, lipidinių uždegimo mediatorių sintezę, tačiau literatūroje nėra duomenų apie PMA poveikį eukariotinių ląstelių judrumui. Siekiant užtikrinti eksperimento rezultatų tikslumą, buvo atliktas kontrolinis tyrimas. Jo metu buvo tiriama PMA įtaka MKL chemokinezei. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad PMA neturėjo įtakos šiam procesui. Tiriamosios ir kontrolinės šulinėlių grupių vidurkiai buvo panašūs ir statistiškai nesiskyrė ($p = 0,506$) (17 lent.).

19 lentelė. Kontrolinis eksperimentas. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas PMA paveiktuose ir jokiais medžiagomis neveiktuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, paveiktos PMA	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	10,2400	2,02	$p = 0,506$
Jokiomis medžiagomis neveiktos MKL,	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	11,0400	1,58	



20 pav. MKL migracija aktyvacijos produktais paveiktuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemokinezės tyrimas.

Įvertinus šių dviejų eksperimentų rezultatus, nustatyta, kad neutrofilų supernatantas, į kurį aktyvinimo metu išsiskyrė neutrofilų granulių turinys ir ROS, sąlygojo 3,9 karto mažesnę MKL migracijos aktyvumą lyginant su migracijos aktyvumu kontroliniuose šulinėliuose. Šio eksperimento sąlygų esminis skirtumas nuo prieš tai atliktų yra ROS išsiskyrimas.

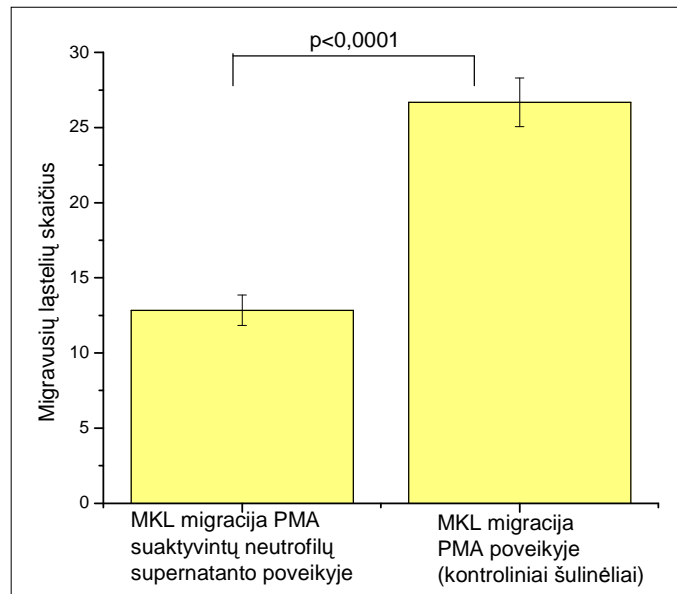
ROS yra trumpą gyvavimo trukmę turinčios, nestabilios medžiagos. Cheminių reakcijų metu jos galėjo būti neutralizuotos dar supernatanto paruošimo etape, prieš pastarojo užpylimą ant MKL. Tačiau negalima paneigti, kad tam tikra jų dalis išliko supernatante ir prisidėjo prie gauto chemokinezės rezultato. ROS yra agresyvios medžiagos, uždegimo metu žalojančios šeiminių audinių. Tyrimo metu jos galėjo pažeisti ir tam tikras MKL struktūras (receptorius, membranas) taip sumažindami jų funkcinį pajėgumą, bei judrumą.

4.6. PMA suaktyvintų neutrofilų supernatanto poveikis MKL chemotaksiui

Migravusių MKL, veikiamų neutrofilų supernatantu, skaičiaus vidurkis penkiuose regėjimo laukuose yra $12,84 \pm 1,01$, kontroliniuose šulinėliuose - $26,68 \pm 1,62$. Tarp tiriamosios ir kontrolinės šulinėlių grupių yra statistiškai patikimas skirtumas ($p < 0,0001$).

20 lentelė. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas neutrofilų aktyvacijos produktais paveikuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL neutrofilų aktyvacijos poveikyje	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	12,84	1,01	p<0,0001
MKL paveiktos PMA (kontrolė)	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	26,68	1,62	



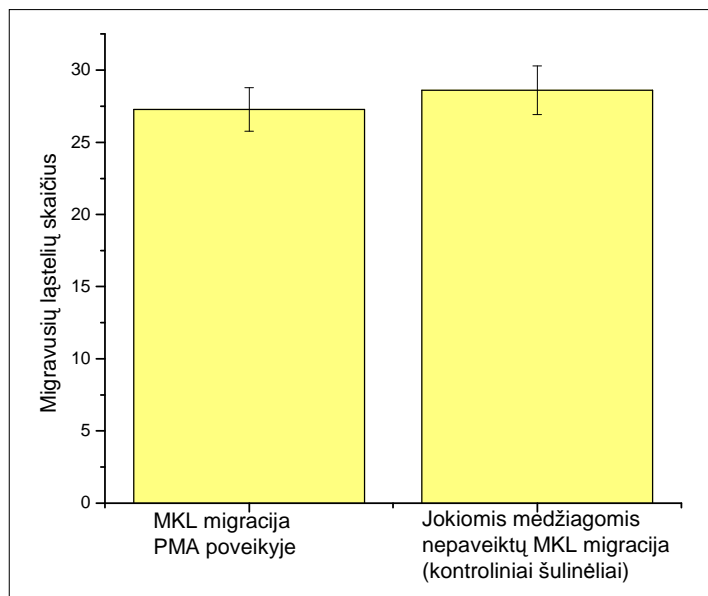
21 pav. MKL migracija neutrofilų aktyvacijos produktais paveikuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

Siekiant nustatyti, ar PMA poveikis neiškreipia pirmosios kameros rezultatų, antrojoje (kontrolinėje) chemotaksio kameroje buvo tiriama PMA įtaka MKL chemotaksiui.

Pasirodė, kad tiriamųjų ir kontrolinių šulinėlių vidurkiai panašūs ir statistiškai reikšmingo skirtumo tarp jų nėra (19 lent.), todėl galima teigti, kad PMA neturi įtakos MKL chemotaksiui.

21 lentelė. Kontrolinis eksperimentas. Migravusių MKL skaičiaus palyginimas PMA paveikuose ir jokiomis medžiagomis neveikuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

	Šulinėlių skaičius	Migravusių MKL skaičiaus vidurkis (penkių šulinėlių penkiuose regėjimo laukuose)	Standartinis nuokrypis	Vidurkių skirtumo reikšmingumas
MKL, paveiktos PMA	5 (tiriamoji šulinėlių grupė)	27,28	1,52	p = 0,231
Jokiomis medžiagomis neveiktos MKL,	5 (kontrolinė šulinėlių grupė)	28,60	1,69	



22 pav. MKL migracija PMA paveikuose ir kontroliniuose šulinėliuose. Chemotaksio tyrimas.

Gauti rezultatai rodo, jog neutrofilų supernatantas sąlygojo 2 kartus mažesnę MKL chemotaksio aktyvumą lyginant su chemotaksio aktyvumu kontroliniuose šulinėliuose. MKL sulaikymą viršutiniuose šulinėliuose galėjo sąlygoti neutrofilų išsikriamos chemoatrankinės medžiagos bei lizosominiai fermentai, tačiau negalime ekskliuduoti ir ROS poveikio. Tikėtina, kad tam tikras jų kiekis išlieka supernatante po jo paruošimo ir veikia MKL jų migracijos metu. O tai galėjo sąlygoti MKL paviršiaus struktūrų pažeidimą bei jų chemotaksio slopinimą.

5. IŠVADOS

1. PD 09.04 linijos MKL būdingas chemokinezinis aktyvumas, o 1% žmogaus kraujo plazmos užpildas yra efektyvus jų chemotaksio induktorius, sąlygojantis statistiškai reikšmingą šių ląstelių migracijos aktyvumo padidėjimą lyginant su jų chemokinezinu aktyvumu.
2. Suaktyvintų neutrofilų išskiriamų medžiagų visuma sukelia MKL chemotaksį ir sąlygoja statistiškai reikšmingą MKL migracijos aktyvumo padidėjimą lyginant su jų chemokinezinu aktyvumu.
3. FMLP suaktyvintų neutrofilų išskiriami degranuliacijos produktai iš dalies sulaiko MKL viršutiniuose šulinėliuose ir statistiškai reikšmingai sumažina jų chemokinezės bei chemotaksio aktyvumą lyginant su jų aktyvumu kontroliniuose šulinėliuose.
4. PMA suaktyvintų neutrofilų išskiriami degranuliacijos produktai bei reaktivūs deguonies metabolitai taip pat sulaiko MKL viršutiniuose šulinėliuose ir statistiškai reikšmingai sumažina jų chemokinezės bei chemotaksio aktyvumą.

6. TYRIMO NAUDA IR REKOMANDACIJOS

Šio darbo metu identifikuota dar viena grupė veiksnių, skatinančių MKL migraciją bei sąlygojančių jos aktyvumo kitimus *in vitro*. Neutrofilų sintetinės medžiagos yra uždegiminėje aplinkoje išskiriamų biologiškai aktyvių faktorių visumos dalis, kurios įnašą į MKL tikslinės migracijos procesą reiktų plačiau ištirti tolimesniais tyrimais. Reiktų nustatyti, kurios konkrečiai neutrofilų išskiriamos medžiagos sąlygoja MKL chemotaksį ir per kokius receptorius jos veikia arba kokie yra kiti jų poveikio MKL migracijai mechanizmai, kokia yra šių medžiagų svarba kitų MKL chemoatraktantų kontekste, ar jų chemoatraktinis efektas pasireiškia taip pat ir *in vivo*.

Įvairių neutrofilų išskiriamų medžiagų poveikio mechanizmų supratimas leistų kryptingai įtakoti MKL migracijos į patologinį židinį procesą. Pvz., tai įgalintų naudoti tas MKL subpopuliacijas, kurios turi receptorių svarbiausiems chemotaksiniam ligandams arba, skatinant atitinkamų receptorių raišką, galima būtų optimalizuoti MKL migracijos į patologijos vietą sąlygas. Neatmetame galimybės, kad kai kurie neutrofilų degranuliacijos produktai, pvz., neutraliosios proteazės, MKL migraciją skatina ne receptorinės sąveikos būdu, bet ir vykdydami daugelio chemokinių bei jų receptorių dalinę proteolizę ir taip

reguliuodami jų aktyvumą. Tai dar viena neutrofilų aktyvacijos produktų poveikio grandis, kurią reikia iširti.

7. SUMMARY

The Influence of the Substances Produced by Activated Neutrophils on the Migratory Activity of Mesenchymal Stem Cells

Adult mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells which have the ability to differentiate into cells of multiple organs and systems such as bone, fat, cartilage, muscle, neurons, hepatocytes and insulin-producing cells. That is why they have generated a great deal of interest for their potential use in regenerative medicine and tissue engineering. MSCs are thought to be crucial for tissue regeneration, acting via migration into the site of injury, proliferating and differentiating into functional cells. The lesion of a tissue is always followed by the inflammatory reaction. It means that the MSCs migrate and access to the inflammatory environment. Neutrophil infiltration is a common pathological feature in acute inflammatory disorders. In the pathology sites they release oxygen species and their internal constituents, which are stored in different granules.

The goal of this research work was to estimate the influence of the substances produced and released by activated neutrophils on the migratory activity of MSCs. The research work consisted of four groups of experiments. First of all we have determined the level of the chemokinetic MSCs' migration and we have measured the chemotactic response to two different stimulus: DMEM supplemented with 10% FCS and 1% human plasma. That was an important stage for planning the further experiments. Secondly, we assessed whether the activated neutrophils' supernatant was able to act as a chemoattractant for the MSCs. We also suspended MSCs in the supernatant of neutrophils activated in two different manners (by fMLP and PMA) and we estimated the influence of substances released during neutrophils' degranulation and the influence of the reactive oxygen species to the MSCs chemotaxis and chemokinesis.

Chemotactic and chemokinetic responses were measured by a modified Boyden chamber assay using a 10-well chemotaxis chamber AA10 with polycarbonate filters with 8 mm pores.

Evaluation of completed transmigration was performed on the stained filters under a light microscope at 20× magnification. The number of migrated cells in control and stimulated

wells was counted for 5 random fields per well and the average of the transmigrated cells in each well was calculated.

Results: we have determined that the supernatant of activated neutrophils was an effective inducer for chemotaxis of MSCs.

The products of neutrophils degranulation released after their activation by fMLP partly arrested MSCs in the upper wells and significantly reduced their chemokinetic and chemotactic activity.

Neutrophils' degranulation products and reactive oxygen species released after the activation of neutrophils by PMA also caused statistically significant reduction in MSCs chemokinetic and chemotactic activity.

Conclusions: the substances produced by activated neutrophils are the chemotactic stimulus for the MSCs and they are able to modulate their migratory activity. These factors are released under inflammatory conditions and may contribute to the homing of MSCs as well as to their arresting in the pathology site where they accomplish their regenerative function.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Pivoriūnas A. Kamieninės ląstelės: situacija pasaulyje ir Lietuvoje. Mokslo Lietuva, 2005 m. spalio 20 - lapkričio 9 d. Nr 18.
2. James F. Battey, Jr., MD, Laura K. Cole, and Charles A. Goldthwaite, Jr. Alternate Methods for preparing pluripotent Stem Cells. *Regenerative Medicine*, 2008 June; 77-88.
3. Jatužis D. Kamieninės ląstelės: mitai ar naujos perspektyvos neurologijoje? Neurologijos seminarai 2004; 1(19): 9–16.
4. Čiapaitė J, Saulis G. Naujausių mokslinių pasiekimų ir tyrimo metodų biotechnologijos srityje taikymo medicinoje mokslinė studija; "Biotechnologija medicinoje", Kauno Vytauto Didžiojo universitetas, 2007.
5. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004 Nov;95(5):209-14.
6. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004 Nov;95(5):209-14.
7. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008 May;15(10):730-8. Epub 2008 Apr 10.
8. Jaime Imitola, Khadir Raddassi et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway. *PNAS*, December 28, 2004 , vol. 101 , no. 52 ,18117–18122.
9. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1317-27.
10. www.biology-online.org/dictionary/Stem_cells
11. C. Kruse¹ S. Danner¹ D. H. Rapoport¹. Current Stem Cell Technology: Limitations and Realistic Expectations. *Eng. Life Sci*. 2008, 8, No. 1, 13–18.

-
12. Despoina M. Choumerianou, Helen Dimitriou, Maria Kalmanti. Stem Cells: Promises Versus Limitations. *Tissue engineering: Part B; Volume 14, Number 1*, 2008.
 13. Johnson B.V, Shindo N., Rathjen P.D., Rathjen J., Keough R.A. Understanding pluripotency—how embryonic stem cells keep their options open. *Mol Hum Reprod.* 2008 Sep;14(9):513-20. Epub 2008 Aug 20.
 14. Caplan AI., Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):341-7.).
 15. Tsvee Lapidot, Ayelet Dar, and Orit Kollet. How do stem cells find their way home? *Blood*, 15 September 2005, Vol. 106, No. 6, pp. 1901-1910.
 16. Ann De Becker, Paul Van Hummelen, Marleen Bakkus, Isabelle Vande Broek, Joke De Wever, Marc De Waele, Ivan Van Riet. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica.* 2007 Apr;92(4):440-9.
 17. Sylwia Bobis, Danuta Jarocho and Marcin Majka. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia histochemica et cytobiologica.* Vol. 44, No. 4, 2006, pp. 215-230.
 18. Paniushin OV, Domaratskaia EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2006 Jan-Feb;(1):6-25.
 19. Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006 Sep;1(3):365-9.
 20. Irina A. Potapova, Glenn R. Gaudette et al. Mesenchymal Stem Cells Support Migration, Extracellular Matrix Invasion, Proliferation, and Survival of Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells* 2007; 25; 1761-1768. Originally published online Mar 29, 2007.
 21. Bo-Ra Son, Leah A Marquez-Curtis et al. Migration of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal Stem Cells In Vitro Is Regulated by Stromal-Derived Factor-1- CXCR4 and

Hepatocyte Growth Factor-c-met Axes and Involves Matrix Metalloproteinases. *Stem Cells* Vol.24 No. 5 May 2006, pp. 1254-1264.

22. M Dominici¹, K Le Blanc², I Mueller³, I Slaper-Cortenbach⁴, FC Marini⁵, DS Krause⁶, RJ Deans⁷, A Keating⁸, DJ Prockop⁹ and EM Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, No. 4, 315 - 317.
23. D. Baksh L. Song, R. S. Tuan. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 8, No 3, 2004 pp. 301-316
24. Lindolfo da Silva Meirelles, Pedro Cesar Chagastelles and Nance Beyer Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 2006; 119, 2204-2213.
25. Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, Lang S. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* 2008 Jun;17(3):509-18.
26. Thibault MM, Hoemann CD, Buschmann MD. Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay. *Stem Cells Dev.* 2007 Jun;16(3):489-502.
27. Christian Ries,¹ Virginia Egea,¹ Marisa Karow,¹ Helmut Kolb,¹ Marianne Jochum,¹ and Peter Neth¹. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. 2007 109: 4055-4063. *Blood*.
28. Wilson A. Silva et al. The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells* 2003;21:661-669.
29. Peter J. Psaltis, Andrew C.W. Zannettino, Stephen G. Worthley, Stan Gronthos. Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair. *Stem Cells* Vol. 26 No. 9 September 2008, pp. 2201 -2210.

-
30. Pommey S., Galipeau J. L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses en oncologie et thérapie cellulaire. *Bulletin du Cancer*. Volume 93, Numéro 9, 901-7, Septembre 2006, Synthèse
31. Katarina Le Blanc and Olle Ringdén. Immunobiology of Human Mesenchymal Stem Cells and Future Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, Volume 11, Issue 5, May 2005, Pages 321-334.
32. Giselle Chamberlain, James Fox, Brian Ashton, Jim Middleton. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* Vol. 25 No. 11 November 2007, pp. 2739 -2749
33. AI Caplan. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; 217: 318–324
34. Antonio Giordano, Umberto Galderi, Ignazio R. Marino. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. *J. Cell. Physiol.* 211: 27-35, 2007.
35. Ferdinando Mannello. Multipotent Mesenchymal Stromal Stem Cell Recruitment, Migration and differentiation: What Have Matrix Metalloproteinases Got to Do with It? *Stem Cells* 2006; 24:1904-1907.
36. Suzanne L. Tomchuck, Kevin J. Zwezdaryk, Seth B. Coffelt, Ruth S. Waterman, Elizabeth S. Danka, Aline B. Scandurro .Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells* Vol. 26 No. 1 January 2008, pp. 99 -107.
37. Denitsa Docheva *, Cvetan Popov, Wolf Mutschler, Matthias Schieker. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 11, No 1, 2007 pp. 21-38.
38. Slavin S, Kurkalli BG, Karussis D. The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008 Nov;110(9):943-6. Epub 2008 Mar 6.).

-
39. Wenhui Jiang, Aiqun Ma, Tingzhong Wang, Ke Han, Yu Liu, Yanmin Zhang, Anping Dong, Yuan Du, Xin Huang, Jun Wang, Xinjun Lei, Xiaopu Zheng. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2006) 453:43–52 .
40. Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. *Brain Res. SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model.* 2008 Feb 21;1195:104-12. Epub 2007 Dec 14.
41. Michael J. Devine, Cay M. Mierisch, Euichan Jang, Peggy C. Anderson, Gary Balian. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *Journal of Orthopaedic Research.* Volume 20 Issue 6, Pages 1232 – 1239. Published Online: 1 Jan 2006.
42. www.bdbiosciences.com/cgi-bin/literature/view?part_num=B04G044 - 20k –
43. www.NeuroProbe.com
44. Tian Jin, Dale Hereld. Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *European Journal of Cell Biology* 85 (2006) 905–913.
45. Chen HC. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:15-22.
46. Ruster B., Grace B., Seitz O., Seifried E. Induction and Detection of Human Mesenchymal Stem Cell Migration in the 48-Well Reusable Transwell Assay. *Stem cells and development* 14:231–235 (2005).
47. www.corning.com/lifesciences
48. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne. *Kuby Immunology.* 6-th edition, 2007.
49. Giselle Chamberlain, James Fox, Brian Ashton, Jim Middleton. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* Vol. 25 No. 11 November 2007, pp. 2739 -2749

-
50. Pliyev B. K.. Chemotactically Active Proteins of Neutrophils. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, Vol. 73, No. 9, pp. 970_984.
51. Chamberlain G, Wright K, Rot A, Ashton B, Middleton J. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS ONE*. 2008 Aug 13;3(8):e2934.
52. Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*. 2006 Aug;34(8):967-75.
53. Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006 Jan-Mar;7(1):19-24.
54. R.M. Dwyer, S.M. Potter-Beirne, K.A. Harrington, A.J. Lowery, E. Hennessy, J.M. Murphy, F.P. Barry, T. O'Brien, M.J. Kerin. Monocyte Chemotactic Protein-1 Secreted by Primary Breast Tumors Stimulates Migration of Mesenchymal Stem Cells. *Clinical Cancer Research* 13, 5020-5027, September 1, 2007.
55. Gutova M, Najbauer J, Frank RT, Kendall SE, Gevorgyan A, Metz MZ, Guevorkian M, Edmiston M, Zhao D, Glackin CA, Kim SU, Aboody KS. uPA and uPAR Mediate Human Stem Cell Tropism to Malignant Solid Tumors. *Stem Cells*. 2008 Apr 10.
56. Adriana López Ponte, Emeline Marais, Nathalie Gallay, Alain Langonné, Bruno Delorme, Olivier Héroult, Pierre Charbord, Jorge Domenech. The In Vitro Migration Capacity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Chemokine and Growth Factor Chemotactic Activities. *Stem Cells* Vol. 25 No. 7 July 2007, pp. 1737 -1745.
57. Yasunori Mishima, Martin Lotz. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. Volume 26 Issue 10, Pages 1407 – 1412. Published Online: 7 May 2008.

-
58. Jorg Fiedler, Gotz Roderer, Klaus-Peter Gunther, and Rolf E. Brenner. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb Stimulate Chemotactic Migration of Primary Human Mesenchymal Progenitor Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 87:305–312 (2002).
59. Viswanathan A., Painter R. G, Lanson N. A., Wang Jr., Guoshun. Functional Expression of N-Formyl Peptide Receptors in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* Vol. 25 No. 5 May 2007, pp. 1263 -1269.
60. Annette Schmidta,_, Dennis Ladageb, Caroline Steingena, Klara Brixiusa, Timo SchinkoØ thec, Franz-Josef Klinzld, Robert H.G. Schwingerb, Uwe Mehlhorne, Wilhelm Bloch. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *European Journal of Cell Biology* 85 (2006) 1179–1188.
61. Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jun;44(6):1072-84. Epub 2008 Mar 19.
62. Grit Kasper, Juliane D. Glaeser, Sven Geissler, Andrea Ode, Jens Tuischer, Georg Matziolis, Carsten Perka, Georg N. Duda .Matrix Metalloprotease Activity Is an Essential Link Between Mechanical Stimulus and Mesenchymal Stem Cell Behavior. *Stem Cells* Vol. 25 No. 8 August 2007, pp. 1985 -1994.
63. Janulevičiūtė N. M. Įgimtas imunitetas. Vilniaus universiteto leidykla, 2007.
64. Fischbach F. A Manual of Laboratory Diagnostic Tests. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
65. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System. W.B. Saunders,2001.
66. Nairn R., Helbert M. Immunology for medical students. Mosby, 2005.
67. Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp.* 2008 Jul 23;(17). pii: 745. doi: 10.3791/745.

-
68. Padaiga A., Vitkus A. Bendroji histologija. Kaunas, Lietuvos veterinarijos akademijos Naujasis lankas, 2002.
69. Michael H. Ross, Lynn J. Romrell. Histology. A Text and Atlas. -5th ed. Williams&Wilkins, 2006.
70. McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed., 2006 W. B. Saunders Company.
71. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas, Šviesa, 2001.
72. Tod I., Spickelt G. Immunology. 5th ed. Blackwell Publishing, 2005.
73. Cotran M.D. Stanley L., Kumar V. Robbins pathologic basis of disease. 7th ed. Elsevier Saunders, 2005.
74. J Richter, J Ng-Sikorski, I Olsson, and T Andersson. Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca²⁺. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 December; 87(23): 9472–9476.
75. L Shen, J M Smith, Z Shen, M Eriksson, C Sentman, C R Wira. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-β1. Clin Exp Immunol. 2007 July; 149(1): 155–161
76. Stephen Meddows-Taylor, Louise Kuhn, Tammy M. Meyers, Gayle Sherman, and Caroline T. Tiemessen: Defective Neutrophil Degranulation Induced by Interleukin-8 and Complement 5a and Down-Regulation of Associated Receptors in Children Vertically Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, January 2001, p. 21-30, Vol. 8, No. 1.
77. Sigrid Wittmann, Dieter Fröhlich, Stephen Daniels. Characterization of the human fMLP receptor in neutrophils and in *Xenopus* oocytes. British Journal of Pharmacology (2002) **135**, 1375–1382.

-
78. www.copewithcytokines.de/cope.cgi?=-fMLP
79. Renu Deswal-Gopal K. Chowdhary, Sudhir K. Sopory. Purification and characterization of a PMA-stimulated kinase and identification of PMA-induced phosphorylation of a polypeptide that is dephosphorylated by low temperature in *Brassica juncea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 322, Issue 2, 17 September 2004, Pages 420-42.
80. Arun K. Thukkani, Fong-Fu Hsu, Jan R. Crowley, Robert B. Wysolmerski, Carolyn J. Albert, David A. Ford. Reactive Chlorinating Species Produced during Neutrophil Activation Target Tissue Plasmalogen. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 6, 3842-3849, February 8, 2002.
81. S A Jones, M Wolf, S Qin, C R Mackay, M Baggiolini. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp. 6682-6686, June 1996, *Immunology*.
82. Starckx S, Van den Steen PE, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. *Leuk Lymphoma*. 2002 Feb;43(2):233-41.
83. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*. 2008 Feb;90(2):227-42.
84. Wiedow O, Meyer-Hoffert U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signaling during inflammation. *J Intern Med*. 2005 Apr; 257(4):319-28.
85. Bank U, Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol*. 2001 Feb;69(2):197-206.
86. Callewaert L, Aertsen A, Deckers D, Vanoirbeek KG, Vanderkelen L, Van Herreweghe JM, Masschalck B, Nakimbugwe D, Robben J, Michiels CW. A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog*. 2008 Mar 7;4(3):e1000019.

-
87. Legrand D, Ellass E, Pierce A, Mazurier J. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*. 2004 Jun;17(3):225-9.
88. Pliyev BK. Activated human neutrophils rapidly release the chemotactically active D2D3 form of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR/CD87). *Mol Cell Biochem*. 2009 Jan;321(1-2):111-22.
89. Thomas M. Devlin. *Biochemistry with clinical correlations*. 5th ed. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2002.
90. Kadziauskas J. *Biochemijos pagrindai*. Vilniaus universiteto leidykla, 2008.
91. Kazakevičius R.V. *Hipoksija. Oksidacinis stresas. Apoptozė*. Vilniaus universiteto leidykla, 2007.
92. Kindt J. et al. *Kuby Immunology*. New York, W.H.Freeman, 2007.
93. Wan KS, Wu WF. Eicosanoids in asthma. *Acta Paediatr Taiwan*. 2007 Nov-Dec;48(6):299-304.
94. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med*. 2002 May;30(5 Suppl):S294-301.
95. Wellen KE., Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest*. 2005; 115:1111-19.
96. Johanna Westra, Joanna M. Kułdo, Martin H. van Rijswijk, Grietje Molema and Pieter C. Limburg. Chemokine production and E-selectin expression in activated endothelial cells are inhibited by p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) inhibitor RWJ 67657. *International Immunopharmacology*. Volume 5, Issues 7-8, July 2005, Pages 1259-1269.
97. Ethuin F, Gérard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest*. 2004 Oct;84(10):1363-71.