

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Akvilė Jarmalavičiūtė

**MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ NERVINĖS
DIFERENCIACIJOS IR NEUROPROTEKCINIŲ SAVYBIŲ
TYRIMAI**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biofizika (02B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2010-2014 m. Vilniaus universitete, Neurobiologijos ir biofizikos katedroje.

Mokslinis vadovas:

Dr. Gytis Svirskis (Vilniaus Universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

Mokslinis konsultantas:

Dr. Augustas Pivoriūnas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
1. ĮVADAS.....	7
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
2.1. Nervinės diferenciacijos modeliai <i>in vitro</i>	12
2.2. Embrioninės kamieninės ląstelės.....	12
2.2.1. EKL kultivavimas.....	12
2.2.2. EKL nervinė diferenciacija.....	14
2.2.3. Indukuojamos pliuripotentinės ląstelės (iPKL).....	16
2.2.4. Indukuojamos nervinės ląstelės (iN). Nervinė transdiferenciacija.....	18
2.2.5. Nervinės kamieninės ląstelės.....	18
2.2.6. Imortalizuota nervinių kamieninių ląstelių linija ReNcell VM kaip modelis Parkinsono ligos tyrimams.....	21
2.3. Mezenchiminės kamieninės ląstelės.....	22
2.3.1. Tradicinis supratimas. Neatsakyti klausimai.....	22
2.3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių sekretomas.....	27
2.3.3. Mezenchiminės kamieninės ląstelės trimatėje (3D) aplinkoje.....	29
2.4. Iš pieninio danties pulpos išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės.....	31
2.4.1. Kamieninių ląstelių nišos danties pulpoje.....	31
2.4.2. Danties pulpos kamieninės ląstelės.....	34
2.4.3. SHED ląstelių nervinė diferenciacija.....	36
3. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	40
3.1. Medžiagos ir ląstelės.....	40
3.1.1. Reagentai ir tirpalai.....	40
3.1.2. Augimo faktoriai ir antikūnai.....	40
3.1.3. Terpės ir priedai.....	40
3.1.4. Auginimo indai.....	40
3.1.5. Ląstelės.....	40
3.2. Metodai.....	41
3.2.1. SHED ląstelių išskyrimas iš pieninių dantų pulpos.....	41
3.2.2. MKL išskyrimas iš žmogaus riebalinio audinio.....	41
3.2.3. SHED ląstelių adaptacija prie aplinkos be serumo.....	42
3.2.4. SHED ląstelių kultivavimas specializuotoje neuronų auginimo terpėje.....	42
3.2.5. SHED ląstelių nervinės diferenciacijos indukcija.....	43
3.2.6. SHED ląstelių sferų formavimas.....	43
3.2.7. SHED kultivavimas bioreaktoriuje.....	43
3.2.8. Žmogaus nervinių kamieninių ląstelių ReNcell VM kultivavimas.....	44
3.2.9. ReNcell VM nervinės diferenciacijos indukcija.....	44
3.2.10. Ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai.....	45
3.2.11. RNR išskyrimas.....	45
3.2.12. Komplementarios DNR sintezė.....	46

3.2.13. Realaus laiko polimerazinė grandininė reakcija.....	46
3.2.14. Genų ekspresijos tyrimai panaudojant komercinius PGR rinkinius.....	47
3.2.15. Konfokalinė mikroskopija.....	48
3.2.16. SHED ląstelių mikroskopavimas panaudojant automatizuotą vizualizavimo ir analizės sistemą.....	49
3.2.17. 6-hidroksidopamino (6-OHDA), egzosomų ir mikrovezikulių poveikis ReNcell ląstelių kultūroms. Apoptozės detekcija.....	49
3.2.18. Vaizdų analizė. Apoptotinių ląstelių kiekio įvertinimas.....	50
3.2.19. Diferencinis centrifugavimas ir egzosomų išskyrimas.....	50
3.2.20. Baltymų ekstraktų išskyrimas iš ląstelių ir mikrovezikulių.....	51
3.2.21. Supernatantų paruošimas elektroforezei. Elektroforezė.....	51
3.2.22. Baltymų pernešimas ant membranos ir imuninė baltymų analizė.....	52
3.2.23. Proteominė supernatantų ir egzosomų analizė.....	53
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	54
4.1. SHED nervinė diferenciacija.....	54
4.1.1. SHED nervinės diferenciacijos indukcija.....	54
4.1.2. Kiekybinis nestino ir β III tubulino genų mRNR ekspresijos įvertinimas SHED ląstelėse.....	62
4.1.3. Imunocitocheminiai nervinėms ląstelėms būdingų žymenų tyrimai.....	63
4.1.4. Genų ekspresijos tyrimai panaudojant komercinius PGR rinkinius.....	69
4.2. SHED kultivavimas bioreaktoriuje.....	74
4.3. Diferencinio centrifugavimo metu gautų frakcijų tyrimai.....	76
4.4. Baltymų identifikavimas egzosomose bei ekstravezikulinėje SHED frakcijose.....	78
4.5. SHED sekretuojamų egzosomų poveikis 6-OHDA sukeltai žmogaus dopaminerginių neuronų apoptozei.....	81
5. IŠVADOS.....	85
6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	86
7. PUBLIKACIJŲ NE DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	87
8. KONFERENCIJOS.....	88
9. Literatūra.....	89
10. Padėka.....	101
11. Priedų sąrašas.....	102

SANTRUMPOS

6-OHDA (angl. *6-hydroxydopamine*) – 6-hidroksidopaminas
APC (angl. *allophycocyanin*) – alofikocianinas
BDNF (angl. *brain-derived neurotrophic factor*) – smegenų neurotrofinis veiksnys
BMP (angl. *bone morphogenetic protein*) – kaulų morfogenetinis baltymas
BrdU (angl. *bromodeoxyuridine*) – bromodeoksiuridinas
Brn3a (angl. *brain-specific homeobox/POU domain protein 3A*) – smegenims specifinis baltymas 3a
BSA (angl. *bovine serum albumin*) – jaučio serumo albuminas
CFU-F (angl. *colony forming unit fibroblast*) – kolonijas formuojantis fibroblastinis vienetas
CNTF (angl. *ciliary neurotrophic factor*) – ciliarinis neurotrofinis augimo faktorius
CPP (angl. *cell penetrating peptide*) – į ląsteles prasiskverbiantis peptidas
DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) – 4'-6- diamidino-2-fenilindolas
dbcAMP (*dibutiryl cyclic adenosine monophosphate*) – dibutiril ciklinis adenozino monofosfatas
DFSC (*dental follicle stem cells*) – dantų folikulo kamieninės ląstelės
DMEM (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – pagal Dulbecco modifikuota Eagle terpė
DMSO (angl. *dimethyl sulfoxide*) – dimetilsulfoksidas
DPSC (angl. *dental pulp stem cells*) – dantų pulpos kamieninės ląstelės
ECL (angl. *enhanced chemiluminescence*) – sustiprinta chemiliuminescencija
EDTA (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetraacto rūgštis
EGF (angl. *epidermal growth factor*) – epidermio augimo faktorius
EK – embrioniniai kūnai
EKL – embrioninės kamieninės ląstelės
FGF (angl. *fibroblast growth factor*) – fibroblastų augimo faktorius
FITC (angl. *fluorescein isothiocyanate*) – fluoresceino izotiocianatas
FVS – fetalinis veršelio serumas
GABA (angl. *gamma-aminobutyric acid*) – gama amino sviesto rūgštis
GDNF (angl. *glial cell-derived neurotrophic factor*) – glijos neurotrofinis faktorius
GEM (angl. *Global Eucaryotic Microcarrier*) – mikronešikliai
GFAP (angl. *glial fibrillary acidic protein*) – skaidulinis rūgštinis glijos baltymas
HKL – hematopoezinės kamieninės ląstelės
HRE (angl. *heregulin*) – heregulinas
IBMX (angl. *3-isobutyl-1-methylxanthine*) – 3-izobutil-1-metilksantinas
iPKL – indukuojamos pluriptencinės ląstelės
ITS (angl. *Insulin-Transferrin-Selenium*) – insulino, transferino ir seleno priedas

LC-MS (angl. *liquid chromatography–mass spectrometry*) – skysčių chromatografija-masių spektrometrija
LIF (angl. *leukemia inhibitory factor*) – inhibuojantis leukemijos veiksnys
MACS (angl. *magnetic-activated cell sorting*) – magnetinis ląstelių rūšiavimas
MBP (angl. *myelin basic protein*) – mielino bazinis baltymas
MFG-E8 (angl. *milk fat globule-EGF factor 8 protein*) – pieno riebalų globulinis-EGF faktoriaus 8 baltymas
NeuN (angl. *neuronal nuclei*) – neuronų branduolių baltymas
NF-H (angl. *neurofilament heavy*) – sunkusis neurofilamento baltymas
NF-L (angl. *neurofilament light*) – lengvasis neurofilamento baltymas
NF-M (angl. *neurofilament medium*) – vidutinis neurofilamento baltymas
NGF (angl. *nerve growth factor*) – nervų augimo faktorius
NGN2 (angl. *neurogenin-2*) – neurogeninas-2
NKL – nervinės kamieninės ląstelės
NT3 (angl. *neurotrophin 3*) – neurotrofinas 3
NT4/5 (angl. *neurotrophin 4/5*) – neurotrofinas 4/5
PBS (angl. *phosphate buffered saline*) – fosfatinis buferinis tirpalas
PDGF-AA (angl. *platelet-derived growth factor-AA*) – trombocitų augimo faktorius AA
PDLSC (angl. *stem cells derived from periodontal ligaments*) – periodonto ligamento kamieninės ląstelės
PE (angl. *phycoerythrin*) – fikoeritinas
PMSF (angl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) – fenilmetilsulfonilo fluoridas
PSA-NCAM (angl. *polysialylated-neural cell adhesion molecule*) – polisialo-nervinių ląstelių adhezijos molekulė
ROCK (angl. *Rho-associated protein kinase*) – su Rho susijusi baltymų kinazė
ROS (angl. *reactive oxygen species*) – aktyvios deguonies formos
RT-PCR (angl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) – atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija
SCAP (angl. *stem cells from apical papilla*) – kamieninės ląstelės, išskirtos iš dantų apikalinės papilos
SDS (angl. *sodium dodecyl sulfate*) – natrio dodecilo sulfatas
SeV (*Sendai virus*) – sendai virusas
SFM (angl. *serum-free medium*) – komercinis serumo pakaitalas
SHED (angl. *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) – iš žmogaus pieninio danties išskirtos kamieninės ląstelės
SHH (angl. *sonic hedgehog*) – tam tikras morfogenas
T3 (angl. *triiodothyronine*) – trijodotironinas
TFA (angl. *trifluoroacetic acid*) – trifluoroacto rūgštis
TH (angl. *tyrosine hydroxylase*) – tirozino hidroksilazė
TGFβ (angl. *transforming growth factor beta*) – transformuojantis augimo faktorius beta
VLM – vidinė ląstelių masė

1. ĮVADAS

Kuriant efektyvias terapijos priemones sunkių neurologinių ligų gydymui būtina gerai suprasti žmogaus nervinių ląstelių funkcionavimo molekulinis mechanizmus (1). Šių uždavinių sprendimui reikia adekvačių eksperimentinių modelių, kurių pagalba *in vitro* sąlygomis būtų galima tirti žmogaus nervinių ląstelių augimą, diferenciaciją ir išgyvenimą reguliuojančius mechanizmus, modeliuoti patologinius procesus, atlikti farmakologines studijas ir kt. Dėl etinių ir technologinių problemų yra neįmanoma išskirti nervinių ląstelių (ir jų pirmtakų) iš žmogaus audinių. Todėl dabartiniu metu šiems tikslams naudojamos įvairių tipų žmogaus kamieninės ląstelės, jas kryptingai diferencijuojant nervine kryptimi *in vitro* sąlygomis. Daugiausiai patirties ir žinių sukaupta naudojant žmogaus embrionines kamienines ląsteles (EKL) (2). Naudojant šį eksperimentinį modelį pavyko sėkmingai generuoti nugaros smegenų motorinius neuronus (3), dopaminerginius neuronus (4), neuroepitelines ląsteles (5), GABAerginius neuronus (6), nervinės kietosios ląstelės (2), astrocitus ir oligodendrocitus (7). Pagrindiniai šio eksperimentinio modelio trūkumai yra susiję su etinėmis problemomis, imunogenišku, taip pat galima nervinių kultūrų kontaminacija nediferencijuotomis ar nevisiškai diferencijuotomis tumorogeniškomis ląstelėmis. Nepaisant to, pabrėžiama, kad EKL technologijos suvaidino lemiamą vaidmenį formuojant šiuolaikišką supratimą apie nervinės diferenciacijos mechanizmus bei neurodegeneracinių ligų vystymąsi (8). Indukuojamų pliuripotentinių kamieninių ląstelių (iPKL) naudojimas yra etiškai priimtinas, tačiau taip pat turi trūkumų (9). Kaip ir EKL atveju, nediferencijuotos, ar nepilnai diferencijuotos iPKL gali inicijuoti teratomas. Kita problema yra susijusi su atsitiktine ektopinių genų integracija į perprogramuojamų ląstelių genomą, tai didina suvėžėjimo pavojų. Pastaraisiais metais mokslininkai išmoko tiesiogiai perprogramuoti somatines ląsteles į įvairių tipų diferencijuotus neuronus (transdiferenciacija). Tam naudojamos įvairios nervinę diferenciaciją indukuojančių transkripcijos faktorių kombinacijos. Ląstelės tiesiogiai „pervedamos“ iš vieno specializuoto tipo

(pvz., fibroblastas) į kitą (pvz., dopaminerginis neuronas), apeinant pliuripotentiškumo būseną. Naudojant šią technologiją pavyko sėkmingai generuoti dopaminerginius neuronus, nervines kamienines ląsteles (10) ir kt. Pagrindiniai šio eksperimentinio modelio trūkumai yra du. Pirmas, kaip ir iPKL atveju, yra susijęs su ektopinių genų integracija į genomą. Antra, apeinant pliuripotentiškumo būseną perprogramuotos ląstelių kultūros greitai sensta, todėl yra sunku generuoti didelius šių ląstelių kiekius. Žmogaus nervinės kamieninės ląstelės (NKL) pasižymi dideliu proliferaciniu potencialu, taip pat jos gali diferencijuoti į visų tipų neuronus ir glijos ląsteles, tačiau dėl etinių ir techninių priežasčių neimortalizuotų žmogaus NKL panaudojimas dabartiniu metu yra praktiškai neįmanomas.

Kitas potencialus nervinių ląstelių šaltinis – kamieninės ląstelės, išskirtos iš suaugusio žmogaus audinių. Daugiausiai tyrimų šitoje srityje buvo atlikta naudojant mezenchimines kamienines ląsteles (MKL). Tačiau daugeliu atvejų buvo gauti prieštaringi ir sunkiai atkartojami rezultatai (11). Mūsų manymu, pagrindinė šių tyrimų nesėkmės priežastis yra susijusi su bandymais paversti mezoderminės kilmės MKL ektoderminėmis (neuronai). Transdiferenciacijos fenomenas (vieno gemalinio lapelio ląstelių virtimas kito gemalinio lapelio ląstelėmis) žmogaus audiniuose iki šiol nebuvo įtikinamai pademonstruotas, o kai kurių *in vitro* tyrimų rezultatai yra kontroversiški.

Mūsų laboratorijoje buvo išskirtos ir charakterizuotos kamieninių ląstelių linijos iš pieninių dantų pulpos (angl. *stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth*, SHED). Mes bei kiti autoriai parodėme, kad šios ląstelės pasižymi savybėmis, kurios yra būdingos MKL, išskirtoms iš kitų audinių (12). Nepaisant šių panašumų, SHED ląstelės yra unikalios, kadangi, skirtingai nuo kitų audinių MKL, SHED kyla iš ektodermos. Embriogenezės metu susiformavusios neuroektoderminės kilmės nervinės keteros (angl. *neural crest*) ląstelės suformuoja didžiąją dalį veidinio skeleto audinių (kaulinis, kremzlinis, raumens, dantys bei dantų pulpa ir kt.), taip pat neuronus, gliją, periferinius nervus, melanocitus bei tam tikrų tipų endokrinines ląsteles. Taigi, nervinės keteros ląstelės duoda pradžią veido audinių mezenchiminėms

ląstelėms bei nerviniams audiniams (13). Todėl, SHED ląstelių transformacija į neuronus *in vitro* sąlygomis vyksta diferenciacijos, o ne transdiferenciacijos būdu, nereikia peržengti ontogenetinio barjero. Atsižvelgę į tai, MKL nervinės diferenciacijos tyrimams, kaip modelį mes pasirinkome SHED ląsteles. Pastaraisiais metais buvo atlikta keletas *in vitro* nervinės diferenciacijos tyrimų panaudojant SHED ląsteles, taip pat dantų (ne pieninių) pulpos kamienines ląsteles (angl. *dental pulp stem cells*, DPSC) (14, 15). Daugeliu atvejų pavykdavo indukuoti būdingus ląstelių morfologinius pokyčius, taip pat kai kurių neuronams būdingų genų bei baltymų ekspresiją, tačiau dažnai šie diferenciacijos požymiai nebuvo pakankami, procesas buvo ilgalaikis ir mažai efektyvus.

Atsižvelgę į tai mes suformulavome pirmąjį disertacinio darbo tikslą:

Sukurti efektyvų nervinės diferenciacijos eksperimentinį modelį *in vitro*, panaudojant žmogaus pieninio danties pulpos kamienines ląsteles.

Tikslo įgyvendinimui išskėlėme šiuos uždavinius:

1. Nustatyti palankiausias kultivavimo sąlygas, tinkamas nervinių pirmtakų ląstelių selekcijai žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių (angl. *stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth*, SHED) kultūrose.
2. Sukurti naują pakopinį SHED ląstelių nervinės diferenciacijos protokolą.
3. Įvertinti diferenciacijos proceso efektyvumą, panaudojant imunocitocheminius ir genų ekspresijos tyrimų metodus.

Antrąją disertacinio darbo dalį mes paskyrėme neuroprotektinių SHED savybių tyrimams. Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad dantų pulpos kamieninės ląstelės gali būti sėkmingai panaudotos įvairių nervų sistemos pažeidimų gydymui (16). Svarbu, kad dantų pulpos MKL tipo ląstelės demonstruoja žymiai geresnį terapinį potencialą, nei MKL, išskirtos iš kitų audinių (16). Tikslūs šių ląstelių terapinio poveikio mechanizmai nėra žinomi, tačiau nustatyta, kad didelę reikšmę turi parakrininiai veiksniai (17). Ląstelės

sekretomas apima jos sekretuojamų organinių ir neorganinių molekulių visumą (18). Taip pat galima išskirti ekstravezikulinę („tirpūs“ komponentai, citokinai, chemokinai, hormonai ir kt.) ir vezikulinę (egzosomos, mikrovezikulės) sekretomo frakcijas. Tačiau iki šiol nebuvo atlikti tyrimai apie galimą vezikulinių SHED sekretomo komponentų neuroprotekcinį poveikį, todėl suformulavome antrą disertacinio darbo tikslą:

Ištirti, kaip žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių sekretuojamos egzomosos ir mikrovezikulės veikia 6-hidroksidopamino indukuotą apoptozę žmogaus dopaminerginiuose neuronuose.

Tikslo įgyvendinimui iškėlėme šiuos uždavinius:

1. Išskirti ir charakterizuoti SHED sekretuojamas egzomosos ir mikrovezikulės.
2. Palyginti standartinių kultivavimo sąlygų bei kultivavimo bioreaktoriuje ant mikronešiklių poveikį SHED ląstelių sekretuojamoms egzomosoms bei jų funkcinėms savybėms.
3. Ištirti, kaip egzomosos ir mikrovezikulės, išskirtos iš skirtingomis sąlygomis kultivuotų SHED ląstelių, veikia 6-hidroksidopamino indukuotą apoptozę žmogaus dopaminerginiuose neuronuose.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Vykdydami disertacinį darbą mes sukūrėme ir išbandėme naują pakopinį SHED ląstelių nervinės diferenciacijos protokolą. Mūsų duomenys rodo, kad panaudojus šį protokolą SHED ląstelės diferencijuoja neuronų ir glijos kryptimis, t.y. formuojasi mišrios ląstelių kultūros, sudarytos iš neuronų ir glijos elementų. Todėl ateityje šis *in vitro* eksperimentinis modelis galės būti taikomas detaliems neuronų ir glijos specializacijos bei sąveikos tyrimams. Be to, nustatėme, kad diferencijuojančiose SHED ląstelėse yra aktyvuojami BMP

ir Notch signaliniai keliai. Tai atveria naujas galimybes tiriant šių signalinių kelių svarbą neuronų ir glijos diferenciacijos procesui.

Vykdydami antrąją disertacinio darbo dalį tyrėme SHED sekretuojamų egzosomų proteomą. Mūsų žiniomis, tokie tyrimai buvo atlikti pirmą kartą. Palyginę įprastomis sąlygomis ir bioreaktoriuje ant mikronešioklių augintų SHED ląstelių produkuojamų egzosomų proteomą, nustatėme ženklus skirtumus tarp abiem būdais kultivuotų ląstelių. Šie duomenys rodo, kad kultivavimas bioreaktoriuje ant mikrosferų veikia SHED produkuojamų egzosomų sudėtį. Mes taip pat nustatėme, kad egzosomos, išskirtos iš SHED ląstelių, augintų bioreaktoriuje ant lamininu dengtų mikronešiklių, slopina 6-OHDA indukuojamą žmogaus dopaminerginių neuronų apoptozę.

Tokiu būdu, pirmą kartą buvo parodyta, kad SHED ląstelių egzosomos pasižymi neuroprotekcinėmis savybėmis. Mūsų rezultatai potencialiai gali būti panaudoti naujų terapinių strategijų, skirtų Parkinsono ligos gydymui, kūrimui.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. SHED ląstelės pasižymi nerviniams pirmtakams būdingomis savybėmis.
2. *In vitro* sąlygomis SHED ląsteles galima diferencijuoti neuronų ir glijos kryptimis.
3. Kultivavimo sąlygos veikia SHED sekretuojamų egzosomų proteomo sudėtį.
4. SHED sekretuojamos egzosomos veikia 6-OHDA indukuotą dopaminerginių neuronų apoptozę.

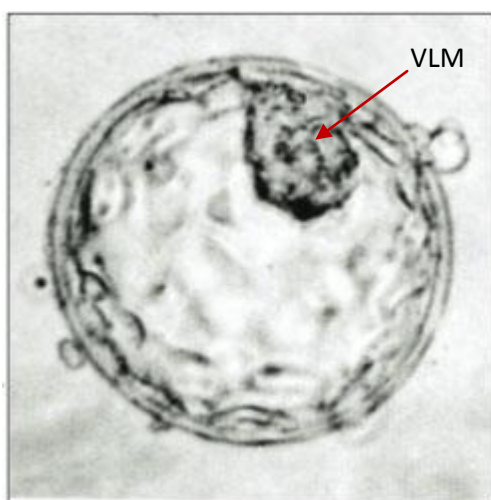
2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Nervinės diferenciacijos modeliai *in vitro*

Kuriant efektyvias terapijos priemones sunkių neurologinių būklių gydymui būtina gerai suprasti žmogaus nervinių ląstelių funkcionavimo molekulinis mechanizmus. Šių uždavinių sprendimui yra reikalingi adekvatūs eksperimentiniai modeliai, kurių pagalba *in vitro* sąlygomis būtų galima tirti žmogaus nervinių ląstelių augimą, diferenciaciją ir išgyvenimą reguliuojančius mechanizmus, modeliuoti patologinius procesus, atlikti farmakologines studijas ir kt. Dėl etinių ir technologinių problemų sudėtinga arba neįmanoma išskirti nervinių ląstelių (ir jų pirmtakų) iš žmogaus audinių. Todėl pastaraisiais metais šiems tikslams naudojamos įvairių tipų žmogaus kamieninės ląstelės, vykdant jų nervinę diferenciaciją *in vitro* sąlygomis (2pav.). Žemiau pateiktoje apžvalgoje aprašytos įvairių tipų žmogaus kamieninės ląstelės bei jų nervinės diferenciacijos ypatumai.

2.2. Embrioninės kamieninės ląstelės

2.2.1. EKL kultivavimas



1 pav. Blastocista. Pagal Mr. J. Conaghan - <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter3.aspx>

Embrioninės kamieninės ląstelės (EKL) pirmą kartą buvo išskirtos 1981 metais iš pelių embrionų blastocistos vidinės ląstelių masės. Blastocista susiformuoja praėjus penkioms dienoms po apvaisinimo, išorinis jos sluoksnis – trofoblastas vėliau formuoja placenta. Blastocistos vidinė ertmė, blastocelė, yra užpildyta skysčiu. Viename blastocelės poliuje telkiasi grupė ląstelių, vadinamų

vidine ląstelių mase (VLM; angl. *inner cell mass*), iš kurios vėliau vystosi gemalas. Iš šių ląstelių ir išskiriamos EKL, kurios gali diferencijuoti į visų gemalinių lapelių ląsteles (1 pav.). EKL ląstelės yra gaunamos iš VLM kultūrų, tačiau tai dar nereiškia, kad EKL yra VLM ląstelių ekvivalentai *in vitro*, ar kad VLM ląstelės yra tiesioginiai EKL ląstelių pirmtakai (19). Manoma, kad auginant kultūrose, VLM ląstelės diferencijuoja į primityvios ektodermos ląsteles, kurios vėliau ir tampa embrioninėmis kamieninėmis ląstelėmis (20).

Žmogaus EKL pirmą kartą buvo sėkmingai išskirtos 1998 metais (21). Šiuo metu yra užregistruota daugiau nei 700 skirtingų žmogaus embrioninių kamieninių ląstelių linijų, kurių didžioji dalis buvo išskirta iš VLM, kitos – iš morulės arba vėlesnės blastocistos stadijos embrionų (22-24). Dalis žmogaus EKL linijų buvo išskirta iš embrionų, turinčių genetinių pokyčių, kurie yra būdingi įvairioms ligoms. Šios linijos naudojamos, kaip *in vitro* modeliai, skirti ligų tyrimams (25).

Yra trys pagrindiniai EKL kultivavimo būdai. Istorškai seniausias ir labiausiai paplitęs yra EKL auginimas ant mitotiškai inaktyvuotų pelių embrioninių fibroblastų (angl. *feeder layer*). Tačiau norint EKL pritaikyti klinikiams tyrimams, svarbu jas auginti kultūrose be gyvulinės kilmės produktų. Tuo tarpu, pvz., ant pelių embrioninių fibroblastų auginamos EKL užsiteršia gyvulinės kilmės sialo rūgštimi, tokias ląsteles transplantavus žmonėms, jos sukeltų imunines reakcijas (26). Todėl, vietoj auginimo ant mitotiškai inaktyvuotų pelės fibroblastų, buvo naudojamos įvairios baltyminės matricos (pvz., lamininas, fibronektinas) (27). Įvairių paviršiaus substratų poveikis EKL yra įvairialypis ir iki šiol menkai ištirtas. Siekiant išvengti gyvulinės kilmės produktų, buvo pradėtas naudoti rekombinantinis žmogaus laminino baltymas (28). Pagrindinis šio metodo trūkumas – didelė kaina. Pastaraisiais metais buvo sukurti efektyvūs EKL kultivavimo metodai kaip auginimo matricą panaudojant vitronektiną ir auginant ląsteles E8 terpėje be serumo. E8 terpė buvo sudaryta atrenkant 8 EKL kultivavimui esminius komponentus: insuliną, seleną, transferiną, L-askorbo rūgštį, FGF2 ir TGFβ DMEM/F12 terpėje (29).

EKL galima auginti ir kaip laisvai terpėje plaukiojančius ląstelių agregatus, kurie yra vadinami embrioniniais kūnais (EK; angl. *embryoid bodies*). Istoriskai tai buvo pirmasis kryptingo EKL diferencijavimo metodas (30). EK – tai ląstelių agregatai, kurių paviršius padengtas endoderma, o mezoderma ir ektoderma supa viduje esančią cistinę ertmę (31). Ląstelės diferencijuoja dėl EK viduje vykstančių ląstelių tarpusavio sąveikų ir tai primena normalaus vystymosi procesą, ypač gastruliacijos stadijos metu. Norint suformuoti EK, EKL iš pradžių kultivuojamos įprastai, dažniausiai ant pelių embrioninių fibroblastų monosluoksniu, kur jos auga formuodamos kolonijas. Kolonijos mechaniškai suardomos į gabaliukus ir išsėjamos terpėje be serumo ant nelipnaus plastiko indų, todėl, negalėdamos prilipti prie substrato, ląstelės asocijuoja į EK (32, 33). Tačiau šiuo metu dažniau yra naudojamas naujesnis ir efektyvesnis metodas, kuomet kolonijos yra disocijuojamos iki pavienių ląstelių suspensijos. Į ląstelių suspensiją dedama ROCK signalinio kelio inhibitoriaus Y-27632, tai žymiai pagerina ląstelių išgyvenamumą ir EK formavimosi procesą (34).

2.2.2. EKL nervinė diferenciacija

Didelė dalis EKL nervinės diferenciacijos protokolų remiasi EK formavimosi procesu: kuri laiką leidžiama EKL ląstelėms formuoti EK (maždaug 4 dienas), po to jos persėjamos į terpę be serumo su augimo faktoriumi FGF-2. Tokiomis sąlygomis auginamos ląstelės formuoja daugiasluoksnes primityvaus nervinio epitelio struktūras, kurios yra vadinamos rozetėmis (33). Manoma, kad tokios rozetės *in vitro* atspindi į nervinį vamzdelį panašias struktūras. Shulz et al. diferencijavo žmogaus EKL neurogenine kryptimi, panaudodami šį protokolą: EKL ląsteles jie auginė ant mitotiškai inaktyvuotų pelių embrioninių fibroblastų, vėliau – terpėje be serumo embrioninių kūnų pavidalu, kurie po 7-10 dienų formavo būdingas rozetes, sudarytas iš nervinių pirmtakų populiacijos. Rozetes persėjus ir auginant jas adhezinėje kultūroje (poliornitinu ir lamininu dengtuose induose) jos sudarė

apskritas ar ovalo formos radialines struktūras, kurių centrinėje dalyje buvo aptinkamos mitotiškai aktyvios nervinės kamieninės ląstelės, o iš kraštų – į rozetes išipynę postmitotinių neuronų tinklai (33). Siekiant rozetėse esančias nervinių pirmtakų ląsteles diferencijuoti į specifinius neuronų tipus, jos buvo fermentų pagalba išardomos ir auginamos neurosferų pavidalu terpėje su FGF-2, paskui diferencijuojamos, dažniausiai į GABAerginius ar glutamaterginius neuronus.

Reubinoff et al. žmogaus EKL nervinei diferenciacijai panaudojo visai kitokią strategiją – augino EKL ląsteles ant pelių embrioninių fibroblastų jų nepersėdami ir leisdami ląstelėms peraugti. Taip auginamos ląstelės spontaniškai diferencijavo į nervinių pirmtakų ląsteles, kurių kolonijos vėliau (po trijų – keturių savaičių) buvo persėjamos ant poli-D-lizinu ir lamininu dengtų indų terpėje be augimo faktorių, kur vėliau (po dviejų – trijų savaičių) diferencioavo į GABAerginius ir glutamaterginius neuronus (35).

Vis dėlto, visi aukščiau minėti nervinės diferenciacijos indukcijos metodai turi trūkumų, kadangi juos taikant, ne visos EKL ląstelės diferencijuoja vienodu greičiu ar vienodai efektyviai. Todėl buvo pasiūlytos naujos žymiai efektyvesnės metodikos. Viena jų – dviguba SMAD signalinio kelio inhibicija. BMP signalo perdavimas inhibuojamas, panaudojant rekombinantinį noggin baltymą arba mažos molekulinės masės BMP signalinio kelio inhibitorius LDN-193189 ar dorzomorfiną (36). TGFβ signalinio kelio inhibicija pasiekama į auginimo terpę įdėjus ALK4 ir ALK5 fosforilavimo inhibitoriaus SB431542. Pritaikius tokį dvigubą SMAD signalinio kelio blokavimo protokolą, galima EKL ląstelių monosluoksnį tiesiogiai paversti neuroektoderminių ląstelių monosluoksniu per maždaug 11 dienų. Pagrindinis metodo privalumas – nereikia EK bei neuroindukcinių auginimo sluoksnių. Šiuo būdu gautas neuroektoderminių pirmtakų ląsteles galima efektyviau ir sinchroniškiau diferencijuoti į specifinius neuronų tipus (37).

2.2.3. Indukuojamos pliuripotentinės ląstelės (iPKL)

1962 metais Gurdon et al. perkėlė suaugusių varlių enterocitų branduolius į neapvaisintus kiaušinėlius (oocitus), iš kurių vėliau išsivystė buožgalviai. 1997 metais Ianas Wilmutas atliko avelės Doli klonavimą – tai buvo pirmasis sėkmingas žinduolių reprodukcinio klonavimo pavyzdys (38). Šie tyrimai parodė, kad suaugusio individo diferencijavusios ląstelės saugo savyje genetinę informaciją, reikalingą viso organizmo išsivystymui. Tuo tarpu oocituose, esama faktorių, kurie padeda perprogramuoti diferencijuotas somatines ląsteles į pliuripotentines. Šių tyrimų rezultatai paskatino tyrėjus identifikuoti konkrečius faktorius, galinčius perprogramuoti somatines ląsteles atgal į jų embrioninę būseną (9).

2006 m. Takahashi ir Yamanaka atkreipė dėmesį į 24 transkripcijos faktorius, svarbius ankstyvųjų embrionų ir embrioninių kamieninių ląstelių pliuripotentiškumui ir palaikymui (39). Panaudoję retrovirusus, jie dirbtinai ekspresavo skirtingas 24 transkripcijos faktorių genų kombinacijas pelės fibroblastuose. Naudojant šią metodiką pavyko atrinkti 4 transkripcijos faktorius (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc), kurių pakako pelės somatinių ląstelių perprogramavimui į pliuripotentines ląsteles (39). 2007 m., panaudoję tuos pačius keturis transkripcijos faktorius jie sėkmingai perprogramavo žmogaus fibroblastus į pliuripotentines ląsteles (40). Takahashi ir Yamanaka tokias perprogramuotas somatines ląsteles pavadino indukuotomis pliuripotentinėmis kamieninėmis ląstelėmis (iPKL; angl. *induced pluripotent stem cells*). iPKL savo morfologija, genų raiškos profiliu, proliferaciniu ir diferenciaciniu potencialu yra labai panašios į EKL ląsteles, todėl jos dažnai literatūroje yra vadinamos vienu bendru terminu – pliuripotentinės kamieninės ląstelės (PKL). iPKL kultivavimui ir diferenciacijai naudojami tokie patys metodai, kaip ir EKL (39-41).

Siekiant iPKL pritaikyti klinikuose tyrimuose yra reikalinga pašalinti virusų ar DNR transfekcijos sukeltus neigiamus poveikius: į genomą besiintegruojantys virusai gali sukelti įterptines mutageneses ir

neprognozuojamas genetines disfunkcijas. Todėl buvo pasiūlytos kelios alternatyvios technologijos, leidžiančios naudoti į genomą nesiintegruojančius vektorius. Nesireplikuojantys adenovirusiniai vektoriai nesiintegruoja į genomą ir jų pagalba galima laikinai ekspresuoti ektopinius genus, tačiau šios metodikos efektyvumas mažesnis nei į genomą besiintegruojančių vektorių (42). Perspektyvi alternatyva retrovirusams yra Sendai virusai (SeV). SeV yra RNR virusas, kuris replikuojasi infekuotų ląstelių citoplazmoje, todėl yra saugus vektorius, negeneruojantis DNR ir nesiintegruojantis į ląstelių genomą. Šis metodas daug efektyvesnis generuojant iPKL ląsteles, o patys SeV vektoriai nesunkiai pašalinami per kelis ląstelių pasaužus (43). Kito tipo į genomą nesiintegruojantys vektoriai, naudojami somatinių ląstelių perprogramavimui yra episominiai vektoriai, tačiau juos naudojant iPKL generavimo efektyvumas yra menkas (44). Alternatyvūs genetinių modifikacijų išvengiantys metodai – į ląsteles tiesiogiai įterpti iRNR arba rekombinantinius baltymus (45). Pvz., perprogramavimo baltymus sujungiant su į ląsteles prasiskverbiančiais peptidais (angl. *cell penetrating peptide*; CPP) (46). Šie metodai yra daug efektyvesni generuojant iPKL, tačiau yra daug komplikuočiau (45).

Kadangi iPKL savo savybėmis yra labai panašios į EKL, jų nervinei diferenciacijai yra naudojami tokie patys protokolai.

Atsižvelgus į praktinius aspektus galima išskirti kelis esminius iPKL technologijos privalumus. Visų pirma, generuojant iPKL yra naudojamos somatinės donorų ląstelės, nesunaikinamas embrionas, todėl ši technologija yra etiškai priimtina. Kitas svarbus privalumas – galima išskirti įvairiomis ligomis sergančių pacientų iPKL ir jas panaudoti patologinių būklių modeliavimui (patofiziologinių mechanizmų tyrimai, vaistinių medžiagų tikrinimas ir kt.). Naudojant šias technologijas jau sukurti ir sėkmingai naudojami įvairių neurodegeneracinių ligų eksperimentiniai *in vitro* modeliai (47).

2.2.4. Indukuojamos nervinės ląstelės (iN). Nervinė transdiferenciacija

Transdiferenciacija – tai procesas, kurio metu brandžios diferencijuotos vieno gemalinio lapelio kilmės ląstelės įgauna požymius, kurie yra būdingi kito gemalinio lapelio kilmės diferencijuotoms ląstelėms. Pavyzdžiui, mezoderminės kilmės odos fibroblastai virsta ektoderminės kilmės dopaminerginiais neuronais. Svarbu, kad šio proceso metu ląstelės negrižta į pliuripotentiškumo stadiją, o tiesiogiai „peršoka“ per ontogenetinį barjerą. Iki šiol nėra aišku, ar transdiferenciacijos procesas gali vykti natūraliomis sąlygomis žmogaus organizme (48).

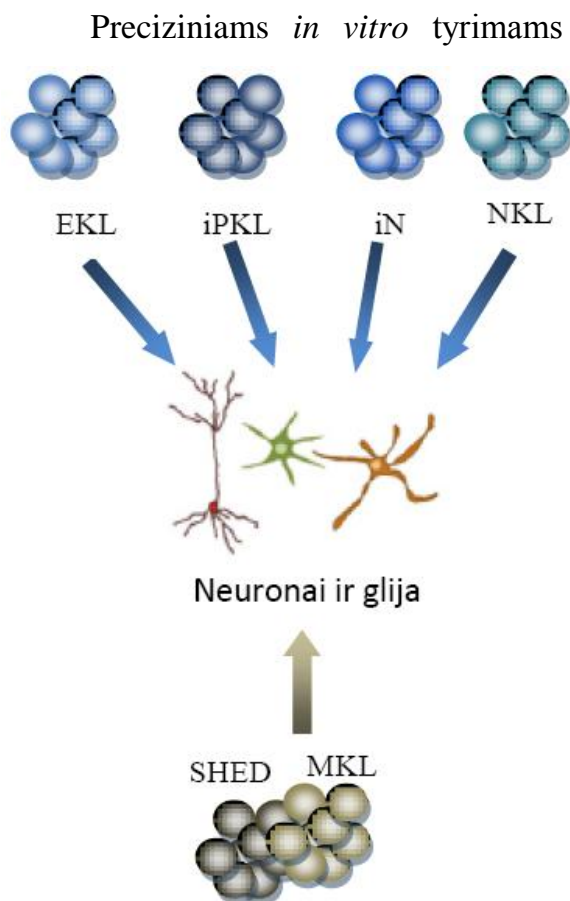
Transdiferenciacija *in vitro* remiasi tuo pačiu principu, kaip ir somatinių ląstelių perprogramavimas – į ląstelę-taikinį įterpiamos tam tikros transkripcijos faktorių kombinacijos, kurios ir nulemia diferenciaciją reikiama kryptimi. Tokiu būdu buvo generuoti funkcionalūs įvairių tipų neuronai, oligodendrocitai. Pavyzdžiui, panaudojus tris transkripcijos faktorius (Ascl1, Brn2 ir Myt1l) galima pelės fibroblastus transdiferencijuoti į funkcionalius neuronus (10). Panaudojus tuos pačius transkripcijos faktorius buvo transdiferencijuoti ir žmogaus embrioniniai bei postnataliniai fibroblastai į funkcionalius neuronus, kurie vėliau buvo diferencijuoti į dopaminerginius neuronus (49). *In vitro* transdiferencijavimo technologija dar yra labai jauna. Pagrindinis jos trūkumas – perprogramuotų ląstelių populiacijų senėjimas. Skirtingai nuo iPKL, perprogramavimo metu iN negrižta į pliuripotentinę būseną, naudojant šią technologiją galima generuoti tik nedidelį skaičių diferencijuotų neuronų.

2.2.5. Nervinės kamieninės ląstelės

Nervinės kamieninės ląstelės (NKL) yra atsinaujinančios multipotentinės ląstelės, gebančios diferencijuoti į skirtingų tipų neuronus, astroцитus ir oligodendrocitus. Pirmą kartą sėkmingai išskirtos ir padaugintos *in vitro* sąlygomis šios ląstelės buvo 1992 metais (50). Ląstelių suspensija buvo

išskirta iš pelių smegenų dryžuotojo kūno (*corpus striatum*). Ląstelės kultivuotos terpėje be serumo su 20 ng/ml EGF, kultivavimo indai buvo be papildomo adhezijos substrato. Pirmomis dienomis žuvo daugiau, kaip 95 % ląstelių, tačiau išlikusios adhezinės ląstelės pradėjo daugintis. Po 3-4 dienų proliferuojantys ląstelių telkiniai pradėjo atkibinėti nuo kultivavimo indu paviršiaus, formavosi neurosferos, kuriose ląstelės dauginosi toliau. Svarbu, kad iš neurosferų išskirtos ląstelės galėjo diferencijuoti glijos ir įvairių neuronų tipų kryptimis (50). Tokiu būdu, introdukavus neurosferų technologiją, mokslininkai išmoko *in vitro* sąlygomis generuoti didelius nervinių ląstelių pirmtakų kiekius, buvo galima pradėti kurti šių ląstelių diferenciacijos *in vitro* protokolus bei tirti šių procesų molekulinis mechanizmus (51).

Neurosferos – tai laisvai plaukiojantys nervinių ląstelių pirmtakų agregatai. Dabartiniu metu neurosferos apibrėžiamos, kaip heterogeniški dariniai, sudaryti iš NKL (2-5%), įvairaus diferenciacijos laipsnio neuronų ir glijos (astrocitų ir oligodendrocitų) ląstelių. Neurosferų testas parodo ar yra NKL neurosferose ir kiek jų yra (52). Pirminės neurosferos yra suardomos iki pavienių ląstelių ir klonuojamos po vieną ląstelę į šulinėlį. Parodyta, kad antrines sferas formuoja labai nedidelis procentas ląstelių (apie 2%). Antrinės sferos turi pasižymėti multipotentiškumu, t.y. diferencijuoti sukūrus atitinkamas sąlygas trimis kryptimis. Pagrindinis šios technologijos trūkumas yra neurosferų heterogeniškumas, t.y. neurosferas sudaro skirtingų diferenciacijos laipsnių ir tipų ląstelės. Pastebėta, kad kultivuojant neurosferas ilgesnį laiką, jose pradeda dominuoti glijos ląstelės (51). Manoma, kad heterogeniškumą lemia nevienodos sąlygos, kuriose yra skirtingų neurosferos sluoksnių ląstelės. Išorinis ląstelių sluoksnis turi geriausią prieigą prie deguonies ir maisto medžiagų, šio sluoksnio ląstelės dalijasi greičiausiai. Giliau esančių sluoksnių ląstelių aprūpinimas blogėja, tuo pačiu kinta ir jų proliferacinis bei diferenciacinis potencialai (53).



2 pav. Nervinės diferenciacijos modeliai *in vitro*.
 EKL – embrioninės kamieninės ląstelės, iPKL – indukuotos pluriipotentinės ląstelės, iN – indukuotos nervinės ląstelės, NKL – nervinės kamieninės ląstelės, MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės, SHED – pieninių dantų pulpos kamieninės ląstelės.

nervinių ląstelių kiekiai, todėl pastaraisiais metais buvo išstobulintos NKL kultivavimo monoslouksniuose technologijos. Ląstelės kultivuojamos terpėse be serumo, su EGF ir FGF2 augimo faktoriais, ant poliornitinu, lamininu ar fibronektinu dengtų indų. Nustatyta, kad naudojant šias sąlygas ląstelės dalijasi simetriškai, išlaiko savo tripotentinės diferenciacijos savybes ir tokiu būdu monoslouksniuose auga kaip beveik visiškai grynos populiacijos su nedidele dalimi diferenciuotų ląstelių (51). Tokias NKL galima kryptingai diferencijuoti norima neurogenine ar glijos ląstelių kryptimis. Goffredo et al.

diferencijavo iš pelės subventrikulinės zonos išskirtas NKL į GABAerginius neuronus panaudodami keturių pakopų protokolą (54). Protokolo esmė – laipsniškai mažinti terpėje FGF2 ir didinti BDNF koncentraciją. Po tris savaites trukusios diferenciacijos kultūrose buvo aptinkami neuronams būdingi žymenys, 70% ląstelių generavo veikimo potencialus (54). Kita tyrėjų grupė sugeneravo funkciškai aktyvius glutamaterginius ir GABAerginius neuronus panaudodami viduląstelinę cAMP koncentraciją didinantį IBMX (55). Neri et al. diferencijavo žmogaus NKL į oligodendrocitus, panaudoję neurotrofiną 3 (NT3), PDGF-AA ir tiroidinį hormoną (T3) (56).

Sutariama, kad žinios, gautos panaudojant NKL technologijas (ypač neurosferų) padėjo vystyti naujas efektyvias EKL ir iPKL *in vitro* nervinės diferenciacijos technologijas.

2.2.6. Imortalizuota nervinių kamieninių ląstelių linija ReNcell VM kaip modelis Parkinsono ligos tyrimams

Natūvių žmogaus NKL ląstelių išteklių yra labai riboti, todėl, norint šias ląsteles panaudoti plataus masto tyrimams, naudojamos imortalizuotos ląstelių linijos (57). Ląstelių imortalizacija – tai procesas, kuomet ląstelės yra genetiškai modifikuojamos, dažniausiai panaudojant įvairius onkogenus. Tokios ląstelės gali dalytis neribotą laiką ir, nors dėl saugumo jos nėra tinkamos klinikinėms transplantacijoms, šios ląstelės puikiai tinka *in vitro* tyrimams (57).

ReNcell VM yra žmogaus nervinių kamieninių ląstelių linija, išskirta iš žmogaus embriono ventralinės mezencefalinės srities ir imortalizuota panaudojus retrovirusinę transdukciją su v-myc onkogenu. Šios ląstelės yra auginamos ant lamininu dengtų indų, Neurobasal terpėje su augimo faktoriais EGF ir FGF. Norint, kad ląstelės diferencijuotų į dopaminerginius neuronus, iš terpės yra pašalinami augimo faktoriai arba užpilama terpė su specifiniais augimo faktoriais. Diferenciacijos procesas įprastai trunka apie dvi savaites (58). Svarbu, kad tokiu būdu gauti dopaminerginiai neuronai yra funkciškai pilnaverčiai, t.y. jie produkuoja dopaminą, taip pat yra elektrofiziologiškai aktyvūs (58).

6-hidroksidopaminas (6-OHDA) yra neurotoksinas, kuris sukelia dopaminerginių neuronų žūtį ir suardo *nigrostriatum* dopaminerginę sistemą, todėl yra naudojamas Parkinsono ligos tyrimams *in vitro* ir *in vivo* eksperimentiniuose modeliuose. Manoma, kad 6-OHDA yra selektyviai transportuojamas į dopaminerginius neuronus ir slopina mitochondrijų kompleksų veiklą (II-tiesiogiai, III bei IV-netiesiogiai) (59), tai sąlygoja aktyvių deguonies formų (ROS; angl. *reactive oxidative species*) pagausėjimą

ir oksidacinį stresą. Tikslus 6-OHDA indukuojamos ReNcell VM dopaminerginių neuronų apoptozės mechanizmas nežinomas. Nustatyta, kad šio proceso iniciacijai yra svarbios kaspazės 2 ir 8 (60).

2.3. Mezenchiminės kamieninės ląstelės

2.3.1. Tradicinis supratimas. Neatsakyti klausimai

Mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) tradiciškai apibrėžiamos kaip kamieninės ląstelės, gebančios *in vitro* diferencijuoti į kaulinį, riebalinį ir kremzlės audinius (61). Pirmą kartą šios ląstelės buvo išskirtos iš kaulų čiulpu 1970 metais. MKL yra adhezinės ląstelės, pasižyminčios fibroblastams būdinga morfologija ir fiziologija. Nustatyta, kad tam tikra MKL populiacijos dalis yra klonogeniška, t.y. individualios ląstelės geba formuoti kolonijas (klonus). Tokie fibroblastai yra vadinami kolonijas formuojančiais vienetais (CFU-F; angl. *colony forming unit fibroblast*) (62).

Pastaraisiais metais ląstelės, pasižyminčios MKL savybėmis, buvo išskirtos iš beveik visų tirtų vaskuliarizuotų audinių: riebalinio audinio, placentos, sinovijos, sausgyslių, dantų pulpos, skeleto raumenų ir kt. (63-66). Šios ląstelės taip pat buvo sėkmingai išskirtos iš virkštelės ir periferinio kraujo (67, 68). MKL, kaip eksperimentinis modelis ir potencialus šaltinis ląstelių terapijai, yra ypač patrauklus dėl trijų praktinių priežasčių.

1. MKL galima santykinai lengvai išskirti iš įvairių audinių, tame tarpe ir „liekamųjų“, tokių, kaip riebalinis po plastinių operacijų, virkštelės audiniai, dantų pulpa ir kt.

2. MKL pasižymi aukštu proliferacijos potencialu *in vitro*, todėl laboratorijos sąlygomis galima generuoti didelius šių ląstelių kiekius (69). Tai svarbu, kadangi šiuolaikinėms ląstelių terapijoms reikia didelių ląstelių kiekių.

3. MKL yra dalinai imunoprivilegiuotos ir pasižymi imunosupresinėmis savybėmis, todėl gali būti naudojamos alogeninei transplantacijai (70).

Šios priežastys nulėmė itin didelį mokslininkų ir klinacistų susidomėjimą, tačiau, nepaisant per pastarąjį dešimtmetį sukauptų duomenų, lieka dar daug neatsakytų esminių klausimų (71).

Pirma, nėra žinoma tiksli MKL kilmė bei jų *in vivo* atitikmuo. Būtina pažymėti, kad didžioji dalis eksperimentinių duomenų apie MKL buvo gauta panaudojus *in vitro* modelius, kurie nebūtinai teisingai atspindi situaciją *in vivo*. Panaudojus linijinius-genetinius (angl. *lineage-tracing*) metodus buvo nustatyta, kad embriogenezės metu dalis MKL populiacijos kyla iš neuroepitelinių ir nervinės keteros ląstelių (72). Taip pat buvo nustatyta, kad kaulų čiulpuose reziduoja nestiną ekspresuojančios MKL (73). Nestino baltymo raiška yra būdinga nervinės keteros ląstelėms bei nerviniams pirmtakams. Įdomu, kad nestiną gausiai ekspresuoja ir MKL tipo dantų pulpos kamieninės ląstelės (74). Šie faktai rodo, kad bent jau dalis suaugusio organizmo MKL populiacijos kyla iš nervinės keteros ląstelių, t.y iš ektodermos. Kita tyrėjų grupė identifikavo bendrus iš mezodermos kilusių mezenchiminių ir endotelinių ląstelių pirmtakus, kuriuos pavadino mezenchimoangioblastais (75). Taigi, suaugusiame organizme dalis MKL atsiranda iš nervinės keteros ląstelių, dalis – iš mezodermos, tačiau kol kas nėra žinoma, ar skirtingos vystymosi kilmės MKL tarpusavyje skiriasi savo biologinėmis savybėmis.

Iki šiol nesutariama, koks yra tikrasis MKL atitikmuo *in vivo*. Pastaruoju metu vis daugėja duomenų, kad natyvinės MKL galėtų būti pericitai. Ši prielaida buvo suformuluota atsižvelgus į tai, kad ląstelės, pasižyminčios MKL būdingomis savybėmis, gali būti išskirtos iš visų vaskuliarizuotų audinių, taip pat tuo, kad MKL ekspresuoja kai kuriuos pericitams būdingus žymenis. Nežiūrint šių panašumų, MKL ir pericitai nėra identiškios ląstelės. Pavyzdžiui, gerai žinoma, kad pericitai, skirtingai nei MKL, pasižymi kontraktiliškumu. Genų raiškos tyrimai taip pat parodė akivaizdžius skirtumus tarp šių ląstelių (76). Todėl manoma, kad nors *in vivo* MKL reziduoja perivaskulinėse nišose, tačiau tai nėra pericitai (71).

Antras svarbus klausimas yra susijęs su MKL heterogeniškumo problema. Nustatyta, kad MKL kultūras sudaro funkciškai skirtingos heterogeniškos subpopuliacijos. Pavyzdžiui, tik dalis iš kaulų čiuplių išskirtų adhezinių ląstelių gebėjo formuoti kolonijas (CFU-F) ir tik kai kurių kolonijų ląstelės gebėjo formuoti kaulines struktūras po transplantacijos *in vivo* (77). Taigi, naudojant tradicinius *in vitro* metodus, neklonuotų, heterogeniškų MKL populiacijų diferenciacijos potencialas gali būti įvertintas tik apytiksliai. Kita vertus, pats klonavimas dar negarantuoja, kad bus gautos homogeniškos ląstelių populiacijos. Labai dažnai individualūs ląstelių klonai, kurie iš pradžių tarpusavyje skiriasi morfologinėmis ir funkcinėmis savybėmis, ilgainiui šiuos skirtumus praranda. Tai galima paaiškinti antrine heterogenizacija, kuri laikui bėgant atsiranda dėl skirtingo ląstelių senėjimo ir (arba) diferenciacijos. Pavyzdžiui, buvo įvertinti skirtumai tarp MKL ląstelių, išskirtų iš individualių kolonijų periferijos ir centro (78). Nustatyta, kad ląstelės iš tankesnių, vidinių kolonijų sričių buvo dalinai diferencijuotos ir skyrėsi nuo ląstelių, buvusių tos pačios kolonijos periferijoje. Šie tyrimai rodo, kad funkciškai homogeniškų MKL populiacijų generavimas yra problematiškas.

Trečia, iki šiol nebuvo identifikuoti unikalūs paviršiaus žymenys, būdingi tik MKL. Todėl, imunofenotipuojant MKL, atsižvelgiama tik į tam tikrų „teigiamų“ ir „neigiamų“ paviršiaus žymenų raišką. Tarptautinė ląstelių terapijos organizacija (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) imunofenotipuojant MKL rekomenduoja (79) atsižvelgti į šiuos paviršiaus žymenis: CD73, CD90, CD105 (teigiami). Neigiami: CD34, CD45, CD14 arba CD11b, CD79 α , CD19 ir HLA-DR. Šis minimalus paviršiaus žymenų rinkinys gali būti naudojamas tik pradiniam heterogeninių MKL-tipo ląstelių populiacijų charakterizavimui. Pastaraisiais metais buvo pasiūlyti keli paviršiaus žymenys, padedantys geriau atskirti MKL subpopuliacijas, pasižyminčias skirtingu funkcinio potencialu.

CD146 yra daugiafunkcinė ląstelių adhezijos molekulė, dalyvaujanti tarpląstelinėse sąveikose, ląstelių migracijos, angiogenezės bei diferenciacijos procesuose (80). CD146 žymenį ekspresuoja adventicinės retikulinės ląstelės

kaulų čiulpuose, taip pat įvairių audinių perivaskulinės ląstelės, kurios, kaip minėta, laikomos MKL atitikmeniu *in vivo*. Svarbu, kad CD146 žymenį ekspresuoja tik kolonijas inicijuojančios, klonogeniškos ląstelės (CFU-F). Taip pat buvo parodyta, kad tik šios CD146+ ląstelės gali formuoti kaulinį audinį ir kurti hemopoezinę nišą po heterotopinės transplantacijos *in vivo* (81). Dantų pulpos audinyje, su perivaskuline niša susijusios ląstelės taip pat ekspresuoja CD146 (82). Mūsų duomenimis, *in vitro* sąlygomis, maždaug pusė SHED ląstelių ekspresuoja CD146, tačiau kokia yra funkcinė CD146-teigiamų ir CD146-neigiamų subpopuliacijų reikšmė iki šiol nėra žinoma (12).

CD271 (p75NTR), dar žinomas kaip mažo afiniškumo nervų augimo faktoriaus receptoriaus, priklauso mažo afiniškumo neurotrofinų receptorių ir vėžio nekrozės faktorių receptorių superšeimai. CD271 ligandai – tai nervų augimo faktorius (NGF; *angl. Nerve growth factor*), BDNF (*angl. Brain-derived neurotrophic factor*) bei kiti neurotrofinai (neurotrofinas 3 (NT3), neurotrofinas 4/5 (NT4/5)) (83). Keleto tyrimų metu CD271 buvo identifikuotas kaip potencialus MKL pirmtakų žymuo kaulų čiulpuose, lipoaspiratuose ir dantų pulpoje, be to, buvo parodyta, kad tik CD271-teigiamos ląstelės, išskirtos iš kaulų čiulpų formavo CFU-F (84). Svarbu, kad CD271, kartu su CD57, buvo sėkmingai panaudoti nervinės keteros pirmtakų išskyrimui iš žmogaus EKL (85). Kadangi dantų pulpos audinys išsivysto iš nervinės keteros ląstelių, CD271-teigiamos ląstelių subpopuliacijos gali atspindėti primityvesnes ir nervinės keteros pirmtakus panašias ląsteles. Keleto tyrimų metu buvo parodyta, kad CD271-teigiamos ląstelės sudaro tik nedidelę ląstelių subpopuliaciją dantų pulpos kamieninių ląstelių kultūrose. Panaudojus tėkmės citometrijos metodą, buvo nustatyta, kad trigubai teigiamų ląstelių (CD44, CD90 ir CD271) kiekis kultūrose siekia tik ~2% (86), o imunocitochemijos metodu CD271-teigiamų ląstelių kiekis kultūroje nustatytas tik ~4% (74). Tačiau šios minorinės subpopuliacijos funkcinis vaidmuo galutinai nėra išaiškintas. Vieno tyrimo metu buvo palygintos CD271-teigiamų (kartu su CD44 ir CD90) ir CD271-neigiamų subpopuliacijų iš pieninio danties pulpos išskirtų kamieninių ląstelių funkcinės savybės. CD271-teigiamos

ląstelės blogiau diferencijavo osteogenine ir adipogenine kryptimis, tačiau jos pasižymėjo geresnėmis klonogeniškumo savybėmis negu CD271-neigiamos ląstelės. Todėl buvo nuspręsta, kad CD271 gali veikti kaip iš dantų pulpos išskirtų MKL nediferencijuotos būsenos palaikymo reguliatorius (86). Tačiau, ilgesnį laiką kultivuojant ląsteles, CD271 raiška laipsniškai mažėjo, o osteogeninės ir adipogeninės diferenciacijos geba atsistatė. Todėl būtų įdomūs tolimesni iš dantų pulpos išskirtų CD271 teigiamų ląstelių diferenciacijos potencialo tyrimai, tam panaudojant *in vivo* tranplantacijos modelius. Dantų pulpoje tokios ląstelės pagrindinai lokalizuotos subodontoblastinėje zonoje ir centrinėje ertmėje, kur CD271 antigeno raiška yra susijusi su nervinėmis struktūromis (74). Ar šios ląstelės dalyvauja pulpos audinių regeneracijoje kol kas nėra žinoma.

Ketvirta, MKL tipo ląstelės, išskirtos iš skirtingų audinių, pasižymi skirtingomis savybėmis. Iki šiol daugelis mano, kad MKL tipo ląstelės su joms būdingomis savybėmis, t.y. morfologija, diferenciaciniu potencialu ir imunofenotipu reziduoja viso organizmo vaskuliarizuotuose audiniuose (87). Tačiau pastaraisiais metais šis požiūris pradėjo keistis.

Pirma, daugeliu atvejų įvairių audinių MKL diferenciacijos potencialas buvo tiriamas naudojant *in vitro* metodus, kurie adekvačiai neatspindi tikrojo ląstelių funkcinio potencialo (88). *In vivo* transplantacijos eksperimentai dažniausiai nepatvirtina *in vitro* diferenciacijos testų. Antra, kaip minėjome, daugėja duomenų, kad MKL ir pericitai nėra tos pačios ląstelės.

Dar viena skirtingų audinių MKL „panašumo“ priežastis galėtų būti susijusi su jų kultivavimo sąlygomis *in vitro*, paprastai jos auginamos tomis pačiomis standartinėmis auginimo sąlygomis, dažniausiai DMEM terpėje, praturtintoje 10% fetaliniu veršio serumu (FVS). FVS yra turtingas citokinių, skatinančių mezenchiminę ląstelių specializaciją šaltinis, tokiu būdu, bėgant laikui vykdoma kryptinga mezenchiminių pirmtakų atranka, skirtingų audinių MKL „panašėja“.

Atsižvelgus į tai buvo pasiūlytas kitoks požiūris – kiekvieno audinio perivaskulinėje nišoje reziduoja šio audinio ląstelių-pirmtakų populiacijos.

Laikantis šio požiūrio, MKL diferenciacinis potencialas priklauso nuo to, iš kokio audinio jos buvo išskirtos (71). Šį požiūrį patvirtina *in vivo* transplantacijos eksperimentai. Pavyzdžiui, transplantavus žmogaus kaulų čiulpų MKL imunodeficitinėms pelėms, formavosi heterotopiškos kaulų ir kaulų čiulpų organų struktūros, tuo tarpu, analogiškomis sąlygomis transplantuotos dantų pulpos MKL formavo dentiną ir pulpos audinį (89).

2.3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių sekretomas

Šiuo metu pasirodo vis daugiau tyrimų, rodančių, kad tam tikrais atvejais kamieninių ląstelių sekretuojami parakrininiai veiksniai turi geresnį terapinį efektą negu pačios ląstelės (90). Todėl, pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio skiriama kamieninių ląstelių sekretomo tyrimams. Galima išskirti ląstelių sekretomo vezikulinę (egzosomos ir mikrovezikulės) ir ekstravezikulinę frakcijas (augimo faktoriai, citokinai, tarpląstelinio užpildo proteazės, hormonai ir lipidai). Visas frakcijas nesunkiai galima atskirti taikant diferencinio ultracentrifugavimo metodą (91).

Dalis ekstravezikulinės frakcijos komponentų persidengia su serumo baltymais, todėl tiriant MKL sekretomą *in vitro*, ląstelės auginamos terpėje be serumo. Pažymima, kad MKL mikroaplinka labai smarkiai veikia jų sekretomo sudėtį, todėl vykdant tyrimus *in vitro*, yra labai svarbu kiek įmanoma geriau atkartoti natyvines sąlygas (įvairūs tarpląstelinio užpildo pakaitalai, trimatės kultivavimo sistemos ir kt.) (92). Egzosomos yra nedidelės endosominės kilmės pūslelės (30-100 nm), tuo tarpu mikrovezikulės yra kiek didesnės (100-1000 nm) pūslelės, atsipumpuruojančios nuo ląstelių plazminės membranos (93). Tiek egzosomose, tiek mikrovezikulėse esama biologiškai aktyvių molekulių: lipidų, baltymų, DNR, iRNR ir mikro-RNR. Pastarųjų metų tyrimai parodė, kad egzosomos ir mikrovezikulės yra labai svarbios tarpląstelinei komunikacijai (91). Bendrai, ekstravezikulėse esančių komponentų sudėtis ir pačių ekstravezikulių funkcijos priklauso nuo to, kokios ląstelės jas sekretuoja (94). Pavyzdžiui, retikulocitų sekretuojamose egzosomose gausu transferino

receptorių. Šiuo atveju, viena iš egzosomų funkcijų yra susijusi su perteklinių baltymų pašalinimu iš retikulocitų (95).

Kamieninių ląstelių sekretuojamos vezikulės gali būti naudojamos terapiniams tikslams. Pagrindinis metodo privalumas – transplantacijai tiesiogiai naudojamos ne ląstelės, o jų sekretuojami produktai. Tokiu būdu išvengiama imunologinio nesuderinamumo, galimos navikinės transformacijos, masinės ląstelių žūties problemų. Be to, vezikulės yra ne tokios sudėtingos sistemos kaip ląstelės, todėl jų klinikinis paruošimas yra paprastesnis.

Pastaraisiais metais MKL sekretuojamos egzosomos buvo sėkmingai panaudotos įvairių ligų gydymui. Pavyzdžiui, viena tyrėjų grupė nustatė, kad virkštelės kraujyje MKL sekretuojamos egzosomos pagreitino žaizdų gijimo procesą *in vivo* (96). Taip pat, egzosomos skatino karščio šoko paveiktų odos ląstelių proliferaciją bei slopino jų apoptozę *in vitro* (96). Kito tyrimo metu buvo parodyta, kad kaulų čiulpų MKL produkuojamos egzosomos, injekavus jas žiurkėms po miokardo infarkto, pagerino kraujotaką ir sumažino infarkto plotą (97). Manoma, kad egzosomų funkcinės savybės gali priklausyti nuo to, kokios ląstelės jas sekretuoja (98).

Pastarųjų metų tyrimai parodė, kad nervinių ląstelių sekretuojamos egzosomos ir mikrovezikulės veikia nervų sistemos fiziologinius ir patofiziologinius procesus. Egzosomos yra svarbios mielino formavimuisi, nervinių ataugų augimui bei neuronų išgyvenamumui (99). Nustatyta, kad kai kurie CNS ligas sukeltantys patogeniniai baltymai (prionai, β -amiloidinis peptidas, superoksido dismutazė ir α -sinukleinas) yra inkorporuojami į egzosomas ir taip gali būti pernešami į sveikas nervinio audinio zonas (100). Šie duomenys rodo, kad nervų sistemoje egzosomos ir mikrovezikulės gali būti svarbus daugelio neurodegeneracinių ligų patogenezės veiksnys (99).

MKL sekretomo komponentai pasižymi neuroprotekcinio poveikiu. Svarbu, kad šie rezultatai buvo gauti naudojant dantų pulpos MKL (DPSC; angl. *Dental Pulp Stem Cells*), kurios pasižymi unikaliomis neurogeninėmis savybėmis. Nustatyta, kad DPSC sekretuojami neurotrofiniai faktoriai sąveikauja su trišakiais neuronais bei apsaugo motoneuronus po stuburo

smegenų pažeidimo (16). Kito tyrimo metu buvo parodyta, kad DPSC sekretuojami parakrininiai faktoriai apsaugo dopaminerginius neuronus nuo 6-hidroksidopamino (6-OHDA) poveikio *in vitro* sąlygomis (101). Tačiau dabartiniu metu nėra žinoma, kokie parakrininiai veiksniai lėmė aprašytus terapinius efektus, taip pat nenustatyta vezikulinių sekretomo komponentų svarba šiuose procesuose.

2.3.3. Mezenchiminės kamieninės ląstelės trimatėje (3D) aplinkoje

Nors istoriškai MKL buvo išskirtos kaip prie plastiko indų kimbanchios kamieninės ląstelės, vėliau buvo pastebėta, kad ilgesnį laiką kultivuojant MKL dvimatėje (2D) aplinkoje pakinta jų fenotipinės savybės. Be to, buvo pastebėta, kad MKL yra linkusios sudaryti ląstelių agregatus, kurie geriau atspindi MKL savybes *in vivo* bei geriau išsaugo MKL fenotipą. Trimačių (3D) MKL ląstelių agregatų formavimasis skatina MKL antiuždegiminių citokinių, proangiogeninių ir chemotaksinių faktorių sekreciją taip pagerindamas MKL regeneracines savybes (102).

Kaip modelinės sistemos tiriant vėžio biologiją ir embrioninį vystymąsi ląsteliniai agregatai naudojami jau gan seniai. Manoma, kad tokios sistemos geriau atspindi fiziologinę aplinką ir ląstelių elgseną *in vivo*. NKL atveju, 3D neurosferų formavimasis grąžina ląstelėms pirmtakų fenotipą, MKL atveju ląstelių agregatų formavimosi procesas taikomas chondrogeninės diferenciacijos tyrimams. Manoma, kad 3D MKL agregaciją sukelia vidiniai ląstelės-ląstelės kontaktų signalų perdavimai bei ląstelių sąveikos su tarpląstelinio užpildo komponentais (102).

Yra įvairių metodų, kuriuos panaudojus galima gauti MKL 3D agregatus: kabančio lašo metodas, mažai lipnaus plastiko indų panaudojimas, auginimo indų paviršiaus modifikavimas, priverstinė ląstelių agregacija, panaudojant jėgą bei įvairūs mikrofabrikavimo metodai (102). Bioreaktorius yra apibūrinamas kaip prietaisas, tinkantis plataus masto ląstelių auginimui ir ląstelių funkcijų ar jų produktų tyrimams, aprūpinantis ląsteles visais

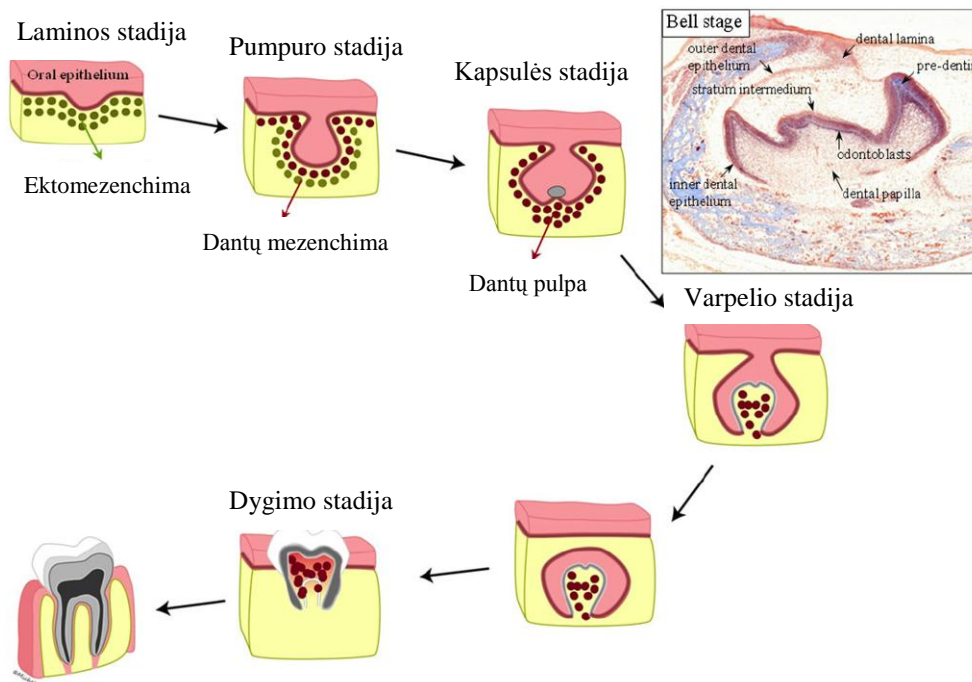
reikalingais fiziologiniais poreikiais (pvz., maisto medžiagomis, augimo faktoriais ir mechanine aplinka). Paprasčiausi bioreaktoriai yra statiški kultivavimo indai (flakonai ir pan.), sudaryti iš vieno nemaišomo skyriaus, kuriame maisto medžiagos difunduoja į ląsteles, o dujų apykaita (deguonies ir anglies dioksido) vyksta terpės ir dujų sąlyčio taške. Tuo tarpu perfuzinės sistemos sukuria mikrocirkuliacinę aplinką, kurioje ląstelės gali būti auginamos audiniams artimu tankumu. Trečio tipo bioreaktoriuose, panaudojant įvairius metodus, terpė yra nuolatos maišoma, taip sumažinant užsistovėjusių ląsteles supantį terpės sluoksnį ir sukuriant homogeniškesnę mikroaplinką (103).

BioLevigator™ yra Hamilton firmos sukurtas inkubatoriaus ir bioreaktoriaus hibridas, kuriame panaudota magnetinių mikronešiklių (GEM; angl. *Global Eucaryotic Microcarrier*) technologija, įgalinanti auginti didelius kiekius ląstelių 3D aplinkoje, panaudojant nedidelius terpės ir augimo faktorių resursus. Šie mikronešikliai, kurių diametras 75-150 μm, yra sudaryti iš alginato hidrogelio šerdies, kurioje gausu mažų magnetinių dalelių, o šerdies paviršius yra padengtas baltyminiu (želatinos, laminino, fibronektino, kelių tipų kolagenų ir kt.) dangalu, prie kurio prisitvirtina ir ant kurio auga 3D kultivuojamos ląstelės. Alginato šerdis yra laidži jonams ir mažoms molekulėms, tokiu būdu ląstelėms sukuriama į tarpląstelinį užpildą panaši aplinka. Ląstelės auginamos specialiuose mėgintuvėliuose, kurie sukasi horizontalioje plokštumoje, tuo pat metu bioreaktoriuje integruoti magnetai juda vertikalioje plokštumoje, tokiu būdu visą kultivavimo laiką yra palaikomas ląstelių suspensijos homogeniškumas. GEM technologija leidžia priartinti ląstelių auginimo sąlygas prie natyvinių (104).

2.4. Iš pieninio danties pulpos išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės

2.4.1. Kamieninių ląstelių nišos danties pulpoje

Pieniniai dantys pradeda formotis šeštą – aštuntą prenatalinio vystymosi savaitę. Šiame procese dalyvauja burnos epitelio ir po juo esančios ektomezenchiminės ląstelės. Iš burnos epitelio susiformuoja ameloblastai – ektoderminės kilmės ląstelės, formuojančios emalį, tačiau jos tampa funkciškai aktyvios tik tuomet, jeigu odontoblastai suformuoja pirmąjį dentino sluoksnį. Odontoblastai – iš nervinės kietos kilusios ląstelės, formuojančios dentiną ir išorinį dantų pulpos sluoksnį. Sąveikaujant epitelio ir mezenchiminėms ląstelėms laipsniškai per keleta stadijų (laminos stadija, pumpuro stadija, kapsulės stadija ir varpelio stadija) susiformuoja dantis (3 pav.) (105).



3 pav. Danties formavimosi stadijos. Pagal Martens et al., 2013.

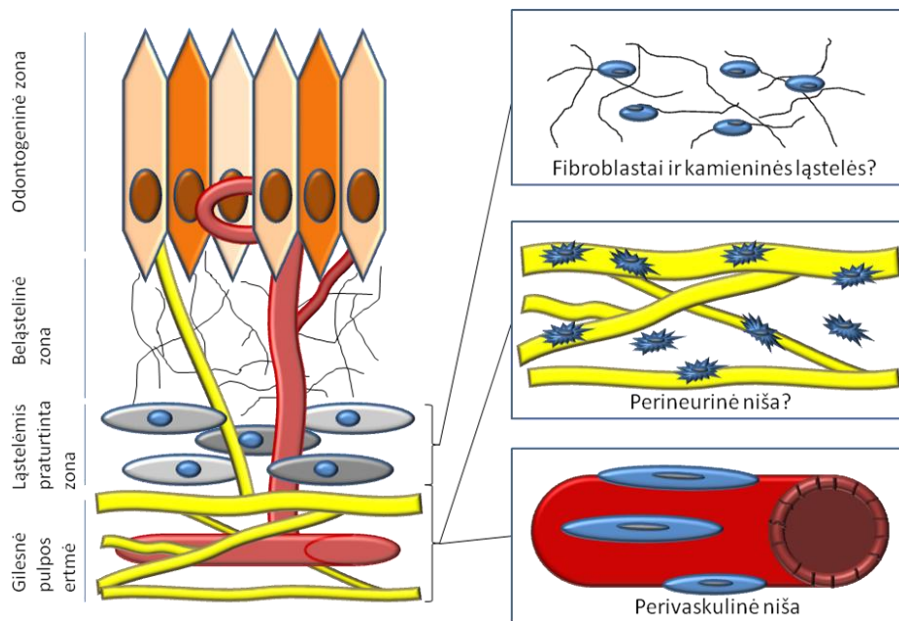
kapsulės stadija ir varpelio stadija) susiformuoja dantis (3 pav.) (105). Pirmoji stadija yra inicijuojama kai ektomezenchiminės ląstelės gauna molekulinis signalus iš epitelio ląstelių. Tai sukelia sudėtingas atsakomųjų molekulinis tarpusavio sąveikų kaskadas, dėl kurių kapsulės stadijos ir, vėliau, varpelio stadijos metu epitelio ląstelės diferencijuoją į emalį sekretuojančius ameloblastus (106). Tuo tarpu, šalia esanti mezenchima diferencijuoją į dentiną

sekretuojančius odontoblastus. Šiuo periodu tankiai susiglaudusios ektomezenchiminės ląstelės yra laikomos dantų papila, iš kurios vėliau susiformuoja dantų pulpa. Dantų folikulas dengia emalio ir dantų papilos išorinį sluoksnį, formuoja cementoblastus, osteoblastus ir fibroblastus, kurie vėliau savo ruožtu formuoja peridontą (107).

Centrinėje susiformavusio danties ertmėje yra danties pulpa – minkštas jungiamasis audinys, kuriame gausu nervinių skaidulų, kraujagyslių, fibroblastų, odontoblastų ir imuninių ląstelių. Pagrindinė danties pulpos funkcija yra formuoti dentiną, šiame procese dalyvauja odontoblastai, tačiau maisto medžiagų aprūpinimo, imuninės apsaugos ir sensorinės funkcijos taip pat svarbios (105).

Didžiąją dalį dantų pulpos ląstelių sudaro fibroblastai. Jie dalyvauja tarpląstelinio užpildo sintezėje ir palaikyme, gamina pagrindinai I ir II tipo kolageną, fibronektiną ir proteoglikanus. Vis dėlto, apie jų funkcinį vaidmenį dantų pulpoje nėra daug žinoma. Neaišku, kiek ši populiacija heterogeniška, taip pat ar joje yra kamieninėmis savybėmis pasižyminčių ląstelių. Šiuo aspektu vienas iš potencialių kandidatų galėtų būti MKL. Šios ląstelės turi daug panašumų su natyviais fibroblastais, tačiau jas sunku atskirti, kadangi trūksta specifinių MKL būdingų žymenų (108).

Dantų pulpa yra gausiai vaskuliarizuota ir būtent perivaskulinė niša yra laikoma ta vieta, kur telkiasi kamieninės ląstelės (4 pav.). Be kita ko, daugelyje kitų audinių perivaskulinė niša yra ta vieta, kur telkiasi kamieninės ląstelės (109). Šiuos duomenis dalinai patvirtina tyrimai, parodę, jog esant pažeidimams *in vivo*, kai kurie pericitai diferencijuoja į odontoblastus (110). Vis dėlto, buvo nustatyta, kad ne visi odontoblastai kyla iš pericitų, identifikuotos naujos su pericitais nesusijusios MKL-tipo ląstelių populiacijos. Kita tyrėjų grupė panaudojo BrdU-imunodažymą ir parodė, kad pažeidimai gali inicijuoti perivaskulinės srities ląstelių proliferaciją ir migraciją į pažaidos vietą (111). Šie duomenys rodo, kad dantų pulpoje esama ląstelių, pasižyminčių regeneracinėmis savybėmis ir kad šios ląstelės dalyvauja audinio reparacijoje *in vivo*.



4 pav. Kamieninių ląstelių nišos dantų pulpoje.

Dantų pulpa taip pat yra gausiai įnervuota autonominiiais ir sensoriniais nervų pluoštais. Simpatinės eferentinės skaidulos reguliuoja kraujotaką, o sensoriniai aferentiniai pluoštai perduoda nociceptinę informaciją trišakiaame ganglijuje esančių sensorinių neuronų ląstelių kūnams. Skirtingai nei perivaskulinė niša, perineuriumas yra daug mažiau ištirtas, kaip galima kamieninių ląstelių niša. Neseniai buvo parodyta, kad sensorinių nervų sekretuojamas faktorius SHH (angl. *sonic hedgehog*) yra svarbus formuojant plaukų folikulų kamieninių ląstelių nišą. Šios ląstelės vėliau geba tapti epidermio kamieninėmis ląstelėmis (112). Šie duomenys yra svarbūs, kadangi anksčiau perineuriumo aplinka nebuvo traktuojama, kaip kamieninių ląstelių niša. Todėl dantų pulpoje perineuriumo niša taip pat galėtų būti svarbi kamieninių ląstelių palaikymui (4 pav.). Dantų pulpoje taip pat esama Švano ląstelių, kurios, esant nervo pažeidimui, gali dediferencijuoti, proliferauoti ir palaikyti aksono regeneraciją. Tikėtina, kad išskiriant kamienines ląsteles iš dantų pulpos audinio Švano ląstelės taip pat patenka į pirmines kultūras. Standartinės kultivavimo sąlygos, įprastai naudojamos dantų pulpos kamieninių ląstelių auginimui (DMEM su 10% FVS), taip pat yra tinkamos Švano ląstelėms (113). Tai galėtų dalinai paaiškinti dantų pulpos kamieninių ląstelių kultūrose esančių CD271 teigiamų ląstelių nedidelių subpopuliacijų

buvimą. Kadangi MKL subpopuliacijos pasižymi geresniu proliferaciniu potencialu, su laiku jos gali pradėti dominuoti kultūroje. Taigi, Švano ląstelių išgryninimui iš periferinių nervų taikomos strategijos galėtų būti taikomos taip pat ir ankstyvųjų pasažų dantų pulpos kamieninių ląstelių kultūroms.

2.4.2. Danties pulpos kamieninės ląstelės

2000 metais iš suaugusio žmogaus pulpos buvo pirmą kartą išskirtos ląstelės, pasižyminčios kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis (DPSC; angl. *Dental Pulp Stem Cells*) (82). Neilgai trukus po to, Miura et al. 2003 m. išskyrė panašiomis savybėmis pasižyminčių ląstelių populiaciją iš pieninio danties – SHED ląsteles (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*) (114). Vėliau iš dantų audinių buvo išskirtos dar kelios mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos, pagal savo vietą audinyje pavadintos atitinkamai periodonto ligamento kamieninėms ląstelėms (PDLSC), dantų folikulo kamieninėms ląstelėms (DFSC) ir kamieninėms ląstelėms, išskirtomis iš dantų apikalinės papilos (SCAP) (115).

Dantų audiniai yra specializuoti audiniai, kuriuose nebevyksta nuolatiniai persitvarkymai, tokie, kokie vyksta kauliniuose ar kituose audiniuose. Tai reiškia, kad iš dantų audinių išskirtos kamieninės ląstelės yra labiau specializuotos, negu, pavyzdžiui, ląstelės išskirtos iš kaulų čiulpų. Be to, dėl savo ankstyvųjų vystymosi stadijos sąveikų su nervinės keteros ląstelėmis, dantų mezenchima yra vadinama ektomezenchima. Taigi, ektomezenchiminės kilmės dantų audinių kamieninės ląstelės gali pasižymėti išskirtinėmis nervinės keteros kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis (115).

Viena išskirtinių DPSC savybių yra jų gebėjimas diferencijuoti į odontoblastus ir generuoti dentiną (115). DPSC *in vitro* lengvai diferencijuoja į odontoblastus su jiems būdinga morfologija: poliarizuotais ląstelių kūnais ir mineralizuotų mazgelių sancaupomis (116). Išsėjus DPSC ant dentino sluoksnio, dalis jų virsta odontoblastinėmis ląstelėmis su į dentino vamzdelius

nutįsusiomis ataugomis (117). Greta savo dentinogeninio potencialo, DPSC ląstelių subpopuliacijos taip pat pasižymi ir adipogeninės, neurogeninės, osteogeninės, chondrogeninės ir miogeninės diferenciacijos savybėmis *in vitro* (118-120).

SHED ląstelės, lyginant su kitomis iš dantų ir ne iš dantų audinių išskirtomis MKL ląstelėmis, išsiskiria savo proliferacinėmis galimybėmis (SHED>DPSC>Kaulų čiulpų MKL). Kuomet auginamos neurogeninėje terpėje, jos formuoja būdingas sferines struktūras. Manoma, kad taip yra dėl jų geros, į NKL panašios, proliferacinės gebos (114). Įprastinėmis sąlygomis auginamos SHED gana gausiai ekspresuoja tam tikrus nervinėms ląstelėms būdingus žymenis, be to, šių ląstelių kultūrose kartais pastebima įvykstanti spontaninė nervinė diferenciacija (121). Nervinės diferenciacijos potencialas buvo tiriamas ir injekavus SHED į imunodeficitinių pelių hipokampo dantytąjį vingį. Tokiu būdu injekuotos SHED ląstelės išgyveno pelių smegenų mikroaplinkoje daugiau nei 10 dienų bei pradėjo ekspresuoti nervinėms ląstelėms būdingus žymenis (114).

Dar vienas išskirtinis SHED ląstelių bruožas yra jų gebėjimas indukuoti pelių recipienčių ląstelių diferenciaciją į kaulus formuojančias ląsteles. Ši savybė nėra būdinga *in vivo* transplantuotoms DPSC ląstelėms. Nors SHED tiesiogiai nediferencijuoja į odontoblastus, jos indukuoja kaulo formavimąsi sukurdamos osteoindukcinę aplinką pritraukdamos pelės natyvias osteogenines ląsteles. Šie tyrimai rodo, kad pieniniai dantys ne tik nubrėžia gaires nuolatinių dantų dygimui, kaip kad buvo manoma, bet ir gali dalyvauti kaulo formavimosi indukcijoje nuolatinių dantų dygimo procese (122). Transplantavus SHED imunodeficitinėms pelėms, taip pat kaip ir DPSC atveju, gaunamos į odontoblastus panašios dentiną produkuojančios struktūros, tačiau, skirtingai nei DPSC, *in vivo* SHED negeneruoja dentino – pulpos komplekso (114).

Nors esama tam tikrų skirtumų tarp SHED ir DPSC ląstelių, buvo parodyta, kad SHED taip pat pasižymi multiliniiniu diferenciaciniu potencialu *in vitro* (osteogeniniu, adipogeniniu, neurogeniniu, miogeniniu ir

chondrogeniniu) (115). Dėl unikalių SHED proliferacinių, diferenciacinių ir neurogeninių savybių jos tapo patraukliu tyrimų modeliu *in vitro*.

2.4.3. SHED ląstelių nervinė diferenciacija

Dantų pulpos kamieninės ląstelės yra unikalios, kadangi, skirtingai nuo MKL, išskirtų iš kitų audinių, jos kyla iš ektodermos. Embriogenezės metu susiformavusios neuroektoderminės kilmės nervinės keteros (angl. *neural crest*) ląstelės suformuoja didžiąją dalį veidinio skeleto audinių (kaulinis, kremzlinis, raumens, dantys bei dantų pulpa ir kt.), taip pat neuronus, gliją, periferinius nervus, melanocitus bei tam tikrų tipų endokrinines ląsteles. Taigi, nervinės keteros ląstelės duoda pradžią veido audinių mezenchiminėms ląstelėms bei nerviniams audiniams (13). Todėl, skirtingai, nei MKL, išskirtų iš kitų audinių, dantų pulpos MKL (SHED, ar DPSC) ląstelių transformacija į neuronus *in vitro* sąlygomis būtų vykdoma diferenciacijos, o ne transdiferenciacijos būdu, nereikėtų peržengti ontogenetinio barjero. Pastarųjų metų tyrimai buvo vykdomi dviem pagrindinėmis kryptimis.

In vivo transplantacijos eksperimentai parodė, kad dantų pulpos ląstelės geba integruotis į nervinį audinį, taip pat jos skatina neuroregeneraciją bei pasižymi neuroprotekcinio veikimu (101). Kita tyrimų kryptis – dantų pulpos kamieninių ląstelių nervinės diferenciacijos tyrimai *in vitro*. Pagrindinis šių tyrimų tikslas – sukurti efektyvius nervinės diferenciacijos protokolus, kuriuos naudojant *in vitro* sąlygomis būtų galima tirti įvairių tipų nervinių ir glijos ląstelių fiziologinių ir patologinių procesų ypatumus. Žemiau apžvelgiami keli per pastaruosius metus pasiūlyti dantų pulpos kamieninių ląstelių nervinės diferenciacijos protokolai.

Arthur et al. kamienines ląsteles, išskirtas iš suaugusio žmogaus danties pulpos, auginė dvejomis skirtingomis sąlygomis: specializuotoje nervinių ląstelių auginimo terpėje Neurobasal su EGF ir FGF auginimo faktoriais bei iš trijų skirtingų etapų sukurtomis auginimo sąlygomis (vieną savaitę minėtoje Neurobasal terpėje su EGF ir FGF, kitą savaitę – ši terpė buvo pakeista

DMEM-F12 terpė, santykiu 50:50, su ITTS priedu ir FGF, o trečiąją savaitę ląstelės augo DMEM-F12 terpėje su ITTS priedu, FGF ir retinoine rūgštimi). Po trijų savaičių ląstelės įgavo sensoriniams ir motoriniams neuronams būdingus morfologinius pokyčius, sumažėjo ląstelių proliferacija, imunocitochemiškai nustatyta ankstyvųjų (nestino, PAS-NCAM), tarpinių (β -III-tubulino) ir vėlyvųjų (NF-M ir NF-H) neuronams būdingų žymenų raiška. Atlikę realaus laiko PGR analizę autoriai nustatė, kad po trijų savaičių nervinės diferenciacijos laikotarpio, nervinių pirmtakų žymens nestino transkriptų kiekis buvo nepakitęs ar šiek tiek sumažėjęs, ankstyvojo/tarpinio nervinių ląstelių žymens β -III-tubulino raiška buvo nežymiai sumažėjusi, tuo tarpu brandžių nervinių ląstelių žymenų (NF-M ir NF-H) genų raiška stipriai padidėjo lyginant su nediferencijuotomis kontrolinėmis sąlygomis auginamomis ląstelėmis. Šie duomenys parodė, jog DPSC ląstelės nustojo dalytis ir diferenciuo į brandžius neuronus. Siekdami šiuos duomenis patvirtinti autoriai atliko elektrofiziologinius tyrimus, kurių metu nustatė, kad ląstelės pradėjo ekspresuoti nuo įtampos priklausomus Na^+ kanalus, kas atsispindėjo užregistruotose teigiamose Na^+ srovėse. Šie duomenys rodo, kad DPSC ląstelės gali diferencijuoti į funkciškai aktyvius neuronus (14).

Govindasamy et al. SHED ir DPSC ląsteles augino Neurobasal terpėje su EGF ir bFGF augimo faktoriais 15 dienų, kur ląstelės augo sudarydamos neurosferas. Tuomet neurosferos buvo suardytos iki pavienių ląstelių suspensijos ir išsėtos ant želatina dengtų auginimo indų su nervinės diferenciacijos terpė, kurią sudarė Neurobasal terpė su lamininu, fibronektinu, bFGF ir EGF. Po 24 valandų ši terpė buvo pakeista nervinės diferenciacijos terpė, kurią sudarė Neurobasal terpė su lamininu, fibronektinu, bFGF, EGF ir neurotrofinu-3. Atlikus realaus laiko PGR ir imunocitocheminius tyrimus nustatyta, kad tiek SHED, tiek DPSC ląstelėse padidėjo nervinėms ląstelėms būdingų žymenų raiška tiek genų (nestino, β -III-tubulino, GFAP, NF), tiek baltymų (β -III-tubulino, GFAP) lygmenyje. Autoriai nustatė, jog tiek SHED, tiek DPSC ląstelės esant neuroindukcinėms sąlygoms yra linkusios

diferencijuoti nervine kryptimi, tačiau DPSC ląstelės tam šiek tiek tinkamesnės (123).

Morszeck et al. lygino SHED ir DFSC ląstelių gebėjimus diferencijuoti nervine kryptimi. Ląstelės jie auginamos keturiose skirtingose terpėse be serumo (1 – Neurobasal, G5 papildas, NSC papildas; 2 – Neurobasal, N2 papildas, EGF, FGF-2; 3 – Neurobasal, B27 papildas, EGF, FGF-2; 4 – Neurobasal ir B27 papildas). Antroje ir ketvirtoje terpėse auginamos SHED ląstelės formavo neurosferas, tuo tarpu DFSC ląstelės šiose terpėse neurosferų neformavo. Genų raiškos tyrimai parodė, kad tiek SHED, tiek DFSC ekspresavo ankstyvuosius nervinėms ląstelėms būdingus žymenis (nestiną, β -III-tubuliną), brandžioms nervinėms ląstelėms būdingus žymenis (NF-M, MAP2), tačiau glijos ląstelėms būdingą žymenį GFAP ekspresavo tik SHED ląstelės, iš ko autoriai padarė išvadą, kad SHED ląstelės gali diferencijuoti tiek į neuronus, tiek į gliją, tuo tarpu DFSC ląstelės diferenciacijai į gliją nėra tinkamos (124).

Kira'ly et al. atliko tyrimą siekdami išsiaiškinti ar suaugusio žmogaus DPSC ląstelės gali diferencijuoti į funkciškai brandžius elektriškai aktyvius neuronus. Tam jie sukūrė trijų pakopų protokolą iš įžanginės, indukcinės ir brandinimo stadijų. Ląstelės auginamos ant polilizino dengtų auginimo indų, pirmos stadijos metu buvo naudojama DMEM/F12 terpė su 2,5% FVS, 5-azacitidinu ir bFGF. Nervinė diferenciacija (antra stadija) buvo vykdoma DMEM/F12 terpėje be serumo su bFGF, NGF, NT-3 augimo faktoriais, 1% ITS priedu bei PKC ir cAMP signalinius kelius stimuliuojančiais veiksniais (IBMX, forskolinu, TPA ir dbcAMP). Trečios stadijos metu ląstelės buvo brandinamos Neurobasal terpėje su dbcAMP, 1% N2, 1% B27 ir NT-3. Taip auginamos ląstelės įgavo neuronams būdingą morfologiją, pradėjo formuoti tinklus. RT-PGR tyrimai atskleidė, kad dar nediferencijavusios ląstelės ekspresavo nerviniams pirmtakams būdingus transkriptus (vimentiną, nestiną, neuroninį N-tubuliną, NSE). Diferencijuotose ląstelėse stipriai padidėjo NF-M raiška, o po brandinimo stadijos išryškėjo glijos ląstelėms būdingas GFAP ir NGN2. Imunocitocheminiai tyrimai patvirtino nervinėms ląstelėms būdingų baltymų ekspresiją (N-tubulino, NF-M, GFAP ir NeuN). Patch clamp tyrimai

atskleidė nuo įtampos priklausomų Na⁺ ir K⁺ kanalų buvimą diferencijuose ląstelėse. Visa tai rodo, kad DPSC ląstelės gali diferencijuoti į funkciškai aktyvius neuronus (15).

Nourbakhsh et al. siekdami diferencijuoti SHED ląsteles nervine kryptimi augino jas ant polilizinu dengtų auginimo indų, penkias dienas Neurobasal terpėje su 1% ITS ir 100 ng/ml bFGF bei dar penkias dienas su 100 ng/ml bFGF, 10 ng/ml FGF8 ir 100 ng/ml SHH. Nudažius diferenciuotąsias ląsteles imunofluorescentiškai ir atlikus tėkmės citometriją, nustatyta, kad ląstelės gana greitai pradėjo ekspresuoti nestiną ir β-III tubuliną, o kiek vėliau ir brandesnėms nervinėms ląstelėms būdingus žymenis (PSA-NCAM, NeuN, Tau, TH ir GFAP). RT-PCR ir Western blot analizė taip pat patvirtino, kad pagal šį protokolą diferencijuotąsias SHED ląsteles pradėjo ekspresuoti nervinėms ląstelėms būdingus žymenis genų ir baltymų lygmenyje (125). Taigi, šie ir kiti su SHED ląstelėmis atlikti nervinės diferenciacijos tyrimai rodo, kad SHED ląstelės gali diferencijuoti į nervines ląsteles ir ateityje būti tinkamos įvairių neurologinių susirgimų ir neurotraumatinų pažeidimų autologinei transplantacijai ar tyrimams.

3. MEDŽIAGOS METODAI

3.1. Medžiagos

3.1.1. Reagentai ir tirpalai

Darbe naudoti reagentai buvo pirkti iš Sigma – Aldrich, išskyrus kur nurodyta kitaip.

3.1.2. Augimo faktoriai ir antikūnai

Darbe naudoti augimo faktoriai ir antikūnai pirkti iš Life Technologies, išskyrus kur nurodyta kitaip.

3.1.3. Terpės ir priedai

Tyrimuose naudotos terpės DMEM (1g/L gliukozės) ir Neurobasal A pirktos atitinkamai iš Biochrom ir Life Technologies.

Terpė be serumo MSC Nutristem XF su serumo pakaitalu pirкта iš Biological Industries. Tyrimuose taip pat naudojome DMEM terpę be serumo su serumo pakaitalu – SFM. StemPro MSC SFM serumo pakaitalas buvo pirktas iš Life technologies.

3.1.4. Auginimo indai

Darbe naudoti auginimo indai ir plastikinės pipetės bei antgaliai pirkti iš Orange Scientific, išskyrus kur nurodyta kitaip.

3.1.4. Ląstelės

Imortalizuota nervinių kamieninių ląstelių linija ReNcell VM pirкта iš Millipore.

3.2. Metodai

3.2.1. SHED ląstelių išskyrimas iš pieninių dantų pulpos

Tyrimai buvo vykdomi gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą (Nr. 6B-08-173). Pieninis dantis buvo tris kartus plaunamas steriliame PBS tirpale su antibiotikais (100 VV/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino ir 2,5 µg/ml amfotericino B, Biochrom). Danties pulpa iš pulpos kameros pašalinta mechaniškai, panaudojant sterilią adatą. Pulpos audinys mechaniškai susmulkintas I tipo kolagenazės tirpale (3 U/ml), (Biochrom) ir 30 min. inkubuotas 37 °C temperatūroje. Suspensija praskiesta PBS tirpale santykiu 1:10 ir centrifuguota 250 g, 5 min. kambario temperatūroje. Ląstelės resuspenduotos DMEM (Biochrom) terpėje, praturtintoje 10 % fetalinio veršiuko serumu (FVS), (Gibco), 2 mM gliutaminu (Biochrom), antibiotikais (100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) ir išsėtos į 12,5 cm² flakoną. Kitą dieną sena terpė buvo pašalinta, ląstelės nuplautos 37 °C DMEM, įvertintos mikroskopiškai ir inkubuotos DMEM terpėje su 10 % FVS, 2 mM gliutamino ir antibiotikais. Terpė buvo keičiama du kartus per savaitę. Ląstelės persėjamos naudojant tripsino/EDTA tirpalą (Biochrom) monosluoksniui pasiekus subkonfluenciją (70-80%). Ląstelės buvo kultivuojamos inkubatoriuje su 5 % CO₂, 37 °C.

3.2.2. MKL išskyrimas iš žmogaus riebalinio audinio

Ląstelių linijas išskyreime iš riebalinio audinio, gauto po plastinių krūtų ar pilvo operacijų. Ląstelės buvo išskirtos gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą (Nr. 56), pagal patvirtintą protokolą. 15 arba 20 g riebalinio audinio buvo plaunama steriliu fosfatiniu buferiu (PBS). Riebalų masė padalinta į dvi lygias dalis ir I tipo kolagenazės (Biochrom) tirpale (0,2% kolagenazės DMEM terpėje su 1 % BSA, 100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) mechaniškai susmulkinta. Homogenatas inkubuotas 45 minutes 37°C temperatūroje purtant. Stambūs audinio fragmentai buvo pašalinti filtruojant

per sterilų nailoninį audinį ir 100 µM filtrą. Centrifuguota 630 g, 10 min. Supernatantas su riebaline mase pašalintas, nuosėdos (stromos-kraujagyslių frakcija) suspenduotos eritrocitų lizės buferyje (160 mM NH₄Cl, 20 min.). Centrifuguota 630 g, 10 min., ląstelės resuspenduotos DMEM (1000 mg/ml gliukozės) terpėje ir suskaičiuotos. Ląstelių suspensija išsėta į terpę su 10 % FVS, 2 mM gliutamino ir antibiotikais.

3.2.3. SHED ląstelių adaptacija prie aplinkos be serumo

Šiam tikslui naudojome dviejų tipų komercinius serumo pakaitalus, pritaikytus MKL kultivavimui (Stempro, MSC, SFM) (Gibco) ir MSC Nutristem XF Medium (Biological Industries). Pirmu atveju DMEM terpė (1000 mg/ml gliukozės) buvo praturtinta 15 % SFM papildu, 2 mM gliutaminu ir antibiotikais. Antru atveju (MSC Nutristem XF Medium) naudojome rinkinyje pateiktą terpę ir papildą (3 ml į 500 ml), taip pat, 2 mM gliutamino ir antibiotikus. Terpė abiem atvejais buvo keičiama du kartus per savaitę.

3.2.4. SHED ląstelių kultivavimas specializuotoje neuronų auginimo terpėje

Ląstelės buvo kultivuojamos indeliuose ant objektinių stikliukų, tinkamų mikroskopavimui, su modifikuotu paviršiumi (15 µg/ml poliornitino (Sigma) ir 5 µg/ml laminino (Invitrogen) arba 24 šulinėlių lėkštutėse, kurių paviršius buvo padengtas poli-D-lizinu ir lamininu (Biocoat, Beckton Dickinson). Į specializuotą neuronų auginimo terpę Neurobasal A (Gibco) dėta (1/50 tūrio) papildu B27 (Gibco), 2 mM gliutamino ir antibiotikų, taip pat po 20 ng/ml FGF2 ir EGF augimo faktorių (abu iš Biological Industries). Terpė buvo keičiama du kartus per savaitę.

3.2.5. SHED ląstelių nervinės diferenciacijos indukcija

Buvo vykdoma panaudojant specializuotą neuronų terpę (žr. aukščiau) be FGF2 ir EGF augimo faktorių, į ją pridėjus 0,5 mM dibutiril-cAMP (Sigma) ir po 10 ng/ml NGF, CNTF ir GDNF augimo faktorių (visi iš Biological Industries). Terpė buvo keičiama du kartus per savaitę, diferenciacija vykdoma 2 savaites.

3.2.6. SHED ląstelių sferų formavimas

Ląstelės buvo išsėtos po 5000, 10 000 ir 20 000/cm² į 12 šulinėlių mažai lipnų plastiką lėkštelę (Greiner bio-one). Naudota specializuota neuronų augimo terpė (žr. aukščiau).

3.2.7. SHED kultivavimas bioreaktoriuje

Ląsteles taip pat kultivavome panaudodami turimą bioreaktorių Biolevitator (Hamilton) bei mikronešiklius (Global Cell Solutions). Bioreaktoriuje yra palaikomos optimalios kultivavimui reikalingos sąlygos: reguliuojama CO₂ koncentracija, temperatūra ir pH. Aprašomuose eksperimentuose mes naudojome lamininiu padengtus mikronešiklius. Kultivavimui naudojome specialius mėgintuvėlius Levitube (Global Cell Solutions). Mikronešiklių suspensijos yra pastoviai maišomos, bioreaktoriuje integruoti magnetai užtikrina, kad mikronešikliai suspensijoje pasiskirstytų tolygiai, nesuliptų į agregatus. MKL ląstelės buvo auginamos panaudojant specialias inokuliacijos, kultivavimo ir nuėmimo (harvesting) programas. Kultivavimo terpė buvo MSC Nutristem XF Medium (Biological Industries). Du kartus per savaitę terpė keičiama, supernatantai buvo renkami ir tiriami, kaip aprašyta žemiau.

3.2.8. Žmogaus nervinių kamieninių ląstelių ReNcell VM kultivavimas

ReNcell VM yra komercinė (EMD Millipore) imortalizuotų žmogaus nervinių pirmtakų ląstelių linija, galinti diferencijuoti į neuronus ir glijos ląsteles. ReNcell VM buvo išskirta iš fetalinio žmogaus smegenų audinio ventralinės vidurio smegenų srities ir imortalizuota retrovirusinės transdukcijos būdu, panaudojant v-myc onkogeną. Ši linija auga sudarydama monosluoksnius ant indų, kurių paviršius dengtas 20 µg/ml lamininu.

Pagal gamintojo nurodymus ląstelės buvo išsėjamos ant iš anksto paruoštų indų (mažiausiai 4 val. inkubuotų 20 µg/ml laminino-Neurobasal tirpale) Neurobasal terpėje su 1/50 B27, 2 mM gliutaminu, antibiotikais, 20 ng/ml FGF-2 ir 20 ng/ml EGF. Terpė buvo keičiama du kartus per savaitę. Ląstelės buvo persėjamos jų atkabinimui nuo plastiko paviršiaus panaudojant akutazės tirpalą (StemPro Accutase, Gibco).

3.2.9. ReNcell VM nervinės diferenciacijos indukcija

Nervinės diferenciacijos tyrimams ląstelės buvo išsėjamos po 30 000 į šulinėlį ant 20 µg/ml lamininu dengtų stikliukų arba po 30 000 ląstelių į 24 šulinėlių lėkšteles, dengtas 20 µg/ml lamininu. Nervinė diferenciacija buvo vykdoma pagal du protokolus. Pirmasis protokolas rėmėsi gamintojo nurodymais – ląstelės buvo kultivuojamos terpėje be mitogenų (be FGF-2 ir be EGF), tokiomis sąlygomis ląstelės buvo brandinamos apie pora savaičių. Antruoju būdu dopaminerginė ReNcell VM diferenciacija buvo indukuojama pakeitus terpę į 0,5 mM dibutiril cAMP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0,2 mM askorbo rūgšties (Sigma), 20 ng/ml GDNF (Biological Industries), 20 ng/ml BDNF (Biological Industries) ir 1 ng/ml TGF-β1 (Biological Industries) Neurobasal A terpėje su 1 x B27, antibiotikais ir 2 mM gliutamino (126). Tokiomis sąlygomis ląstelės buvo auginamos 14-21 dieną, terpę keičiant du kartus per savaitę.

3.2.10. Ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai

Vieno paviršiaus žymens matavimui buvo imama po 0,5 mln. ląstelių. Ląstelės buvo atkabinamos nuo substrato naudojant tripsino/EDTA tirpalą arba 5 mM EDTA PBS tirpalą. Plauta du kartus šaltame PBS tirpale. Į 100 µl ląstelių suspensijos PBS tirpalą dėta 2 µl fluorochromu žymėto antikūno ir 30 min. inkubuota lede. Du kartus buvo plaunama šaltu PBS. Prieš tyrimą centrifuguota 500 g 5 min., supernatantas pašalintas, ląstelės buvo resuspenduotos 500 µl PBS tirpale ir naudotos tėkmės citometrijos tyrimuose. Tyrimams naudojome šiuos antikūnus: CD45–FITC, CD105–APC (Invitrogen, Carlsbad, CA), CD14–PE, CD34–PE (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), CD271–APC (Miltenyi Biotech), CD29–APC, CD44–FITC, CD55–APC, CD73–PE, CD81–APC, CD146–PE, CD151–PE, CD166–PE, Notch1–APC, CD117–APC, HLA-DR–FITC (BD Pharmingen), CD90–FITC (Millipore, Temecula, CA). Nespecifinės fluorescencijos signalų įvertinimui naudojome atitinkamais fluorochromais žymėtą antikūno izotipinę kontrolę. Tėkmės citometrinis tyrimas buvo vykdoma FACS Aria aparatu (BD Biosciences), arba Cyflow aparatu (Partec). Duomenų analizei naudojome BD FACSDiva (BD Biosciences) programinę įrangą arba FloMax 3.0 (Partec) programinę įrangą.

3.2.11. RNR išskyrimas

Ląstelių kultūra buvo auginama iki 80–90% konfluencijos. Nuplovus šiltu PBS buferiu ląstelės lizuotos auginimo inde TRIzol reagentu (Invitrogen) pagal gamintojo rekomendacijas. Lizei naudota 0,3 ml TRIzol reagento/10 cm² indo paviršiaus, kuriame buvo auginamos ląstelės. Lizuoti mėginiai inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje. Pridėta 1/5 tūrio chloroformo. Sandariai uždaryti mėgintuvėliai buvo purtomi 15 s ir 2–3 min. inkubuojami kambario temperatūroje. Mėginiai centrifuguoti 12 000 g, 10 min., 4°C temperatūroje. Vandeninė fazė atskirta ir sumaišyta su izopropanoliu (0.5 ml izopropanolio/1 ml TRIzol reagento). Užpylus izopropanolio, mišinys buvo inkubuojamas

kambario temperatūroje 10 min., centrifuguojamas 12 000 g, 10 min., 4 °C temperatūroje. Išsodinta RNR plauta 75 % etanolio tirpalu (ne mažiau 1 ml etanolio tirpalo 1 ml TRIzol reagento). Išsodinta ir plauta RNR trumpai padžiovinta ir ištirpinta vandenyje be RNAzių. RNR koncentracija įvertinta spektrofotometru 260/280 nm bangos ilgiu.

3.2.12. Komplementarios DNR sintezė

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

3.2.13. Realus laiko polimerazinė grandininė reakcija

Realus laiko polimerazinė grandininė reakcija (qPGR) buvo atliekama su MX3005P® (Stratagene) aparatu. Tiriamų genų (*β3 tubulino*, *nestino*) ekspresija tirta su dvigrande DNR besijungiančiu dažu (SYBR-Green), naudojant Maxima SYBR Green qPCR Master reakcijos mišinį (Thermo Fisher Scientific). Tyrime naudotų tiriamų genų pradmenų sekos pateikiamos 1 lentelėje.

Genas	Pradmens seka (fw) 5'-3'	Pradmens seka (rev) 5'-3'
β-aktinas	TGACGGGGTACCCACACTGTGCC	TAGAAGCATTGCGGTGGACGATG
nestinas	GTCCATCCTCAGTGGGTCAGA	CCGATTGAGCTCCACATCT
β-3- tubulinas	GGGCCAAGTTCTGGGAAGTC	ATCCGCTCCAGCTGCAAGT

1 lentelė. Tyrime naudotų genų pradmenų sekos.

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

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

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

Gauti SYBR Green dažo fluorescencijos duomenys buvo koreguojami pasyviu dažu ROX. Kaip neigiama kontrolė naudotas atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinys be RNR (no-RT) bei reakcija be DNR (*no template control*, NTC). Susintetinta kDNR realaus laiko polimerazinėse grandininėse reakcijose buvo normalizuojama tikrinant stabiliai ekspresuojamą β-aktino geną. Gauti rezultatai analizuoti naudojant MxPro programą (4 versija) (Stratagene) remiantis $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu (127). Kalibracijai naudojome ląsteles, augintas terpėje su FBS. Eksperimentus du kartus pakartojome, rezultatai pateikti su MxPro programos suskaičiuotomis paklaidomis, atspindinčiomis nuokrypius tarp pakartojimų, ir įvertinant normalizatoriaus netikslumus.

3.2.14. Genų ekspresijos tyrimai panaudojant komercinius PGR rinkinius

Kompleksiniams genų ekspresijos tyrimams naudojome komercinį PGR rinkinį, skirtą neurogenezės ir nervinių kamieninių ląstelių tyrimams bei rinkinį, skirtą žmogaus cAMP/Ca²⁺ signalinių kelių tyrimams. Rinkinius

įsigijome iš SABiosciences (QIAGEN). Taip pat naudojome Maxima SYBR Green qPCR Master reakcijos mišinį (Thermo Fisher Scientific).

Realaus laiko polimerazinė grandininė reakcija (qPGR) buvo atliekama su MX3005P® (Stratagene) aparatu. Gauti rezultatai analizuojami panaudojant MxPro (versija 4.00, Stratagene) ir RT² Profiler PCR Array Data Analysis programinę įrangą (versija 3.5, QIAGEN). kDNR kiekio normalizavimui naudojome hipoksantino fosforiboziltransferazės 1, ribosomų baltymo L13a ir gliceraldehid-3-fosfato dehidrogenazės genus.

Kiekvienas eksperimentas buvo pakartotas tris kartus. p-reiškės buvo apskaičiuotos naudojant Stjudento t-testą analizuojant tiriamos ir kontrolinių grupių kiekvieno geno $2^{-\Delta CT}$ duomenų pakartojimus. Skirtumai įvertinti kaip reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3.2.15. Konfokalinė mikroskopija

Ląstelės buvo 2 kartus plaunamos kambario temperatūros PBS buferiu. Fiksuojamos 4% PFA 20 min. kambario temperatūroje ir 3 kartus plaunamos PBS. Ląstelių membranos buvo permeabilizuojamos 0,1% Triton X-100/PBS tirpalu 15 min. kambario temperatūroje ir 3 kartus plaunamos PBS, tuomet blokuojamos 30 min. 1% BSA/PBS tirpale, kambario temperatūroje. Ląstelės buvo plaunamos 3 kartus su PBS ir 1 val. inkubuojamos su vienu iš šių pirminių antikūnių: prieš GFAP, prieš vimentiną, prieš periferiną, prieš mielino baziinį baltymą (MBP) (visi iš Santa Cruz Biotechnologies); prieš nestiną (R&D systems); prieš β III-tubuliną (Sigma), prieš Brn3A ir prieš tirozino hidroksilazę (Millipore). Ląstelės 3 kartus plautos PBS ir inkubuotos su antriniais antikūnais prieš ožkos, pelės arba triušio imunoglobulinus, konjuguotais su Alexa Fluor® 488 arba Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes), skiedimas 1:1000. Inkubuota tamsoje, 1 val., kambario temperatūroje. Plauta 3 kartus su PBS tirpalu, 5 min. tamsoje inkubuota DAPI tirpale (10 μ g/ml), plauta 2 kartus PBS ir stikleliai perkelti ant objektyvinio stiklelio su dengiamąja terpe (DAKO). Paruošti stikleliai laikyti +4°C, tamsoje.

Konfokalinė mikroskopija buvo atliekama su Fluoview FV10i (Olympus) arba Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) mikroskopais.

3.2.16. SHED ląstelių mikroskopavimas panaudojant automatizuotą vizualizavimo ir analizės sistemą

Naudojome aparatą Cell-IQ v.2 Continuous Live Cell Imaging & Analysis System (The Automation Partnership). Ląstelės buvo kultivuojamos su 5 % CO₂, 37 °C. Vykdėme ilgalaikius stebėjimus ir dokumentavimą (iki 26 val.). Naudota programinė įranga Cell-IQ Imagen v. 2.7.1, Chip manTechnologies Ltd., 2006. Vaizdų analizės programa Cell-IQ Analyser Pro Write v. AN 2.3.0, Chip man Technologies Ltd., 2010.

3.2.17. 6-hidroksidopamino (6-OHDA), egzosomų ir mikrovezikulių poveikis ReNcell ląstelių kultūroms. Apoptozės detekcija

6-OHDA (Sigma-Aldrich) buvo ištirpintas dejonizuotame vandenyje su 0,1% askorbo rūgšties. Diferencijavusios ReNcell ląstelės inkubuotos 2 val. su 100 μM 6-OHDA, tada terpė buvo pakeista, į ją įdėta egzosomų arba mikrovezikulių. Tyrimams naudojome egzosomas ir mikrovezikules, surinktas iš įprastomis sąlygomis kultivuojamų SHED ląstelių ir iš bioreaktoriuje BioLevigator ant lamininu dengtų mikronešiklių kultivuojamų SHED ląstelių (žiūr. žemiau). Į kontrolinius šulinėlius buvo dedama PBS. Taip pat į visus šulinėlius buvo dedama apoptozės detekcijos reagento CellEvent™ Caspase-3/7 green (Life technologies). Šis reagentas veikia, kaip aktyvuotų kaspazių 3 ir 7 fluorogeninis substratas generuojantis fluorescencinį signalą, todėl apoptuojančios ląstelės pradeda fluorescuoti. Dažo fluorescencinės emisijos maksimumas – 520 nm. Po 30 min. inkubacijos, gyvų ląstelių vizualizavimas buvo vykdomas panaudojant konfokalinį mikroskopą Leica SP8 (Leica Microsystems). Dokumentavimo trukmė: 20 valandų, kadrus fiksuojant kas 10 minučių.

3.2.18. Vaizdų analizė. Apoptotinių ląstelių kiekio įvertinimas

Fluorescencinio kanalo vaizdai buvo analizuojami naudojant ImageMaster 2D Platinum 7.0 programinę įrangą (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedija). Naudojant ImageMaster algoritmą, kiekviename vaizde fluorescencinės apoptotinės ląstelės buvo skaičiuojamos kaip atskiri taškai. Kiekvienam taškui buvo pritaikyti tie patys taškų atpažinimo parametrai (smooth – 2; saliency – 10; min.area – 5).

3.2.19. Diferencinis centrifugavimas ir egzosomų išskyrimas

SHED sekretomo komponentus rinkome naudodami diferencinį (pakopinį) centrifugavimą (91).

1. Ląstelių kultūrų supernatantai buvo surenkami ir centrifuguojami 300 g, 10 min., 4°C (negyvų ląstelių, ląstelių pašalinimas).
2. Supernatantai surenkami ir centrifuguojami 2000 g, 15 min., 4°C (ląstelių nuolaužų pašalinimas).
3. Supernatantai surenkami ir centrifuguojami 20 000 g, 30 min., 4°C (nuosėdose mikrovezikulių frakcija). Tais atvejais, kai mikrovezikulės buvo renkamos, nuosėdos buvo plaunamos 40 ml PBS, tada dar kartą centrifuguojamas 20 000 g, 30 min., 4°C, gautos nuosėdos (mikrovezikulės) resuspenduojamas 50 µl PBS ir saugomos -70°C.
4. Supernatantai surenkami ir pirmą kartą centrifuguojami 100 000 g, 70 min., 4°C. Dalis supernatanto surenkama analizei, nuosėdos (egzosomos) plaunamos PBS (40 ml).
5. Antrą kartą centrifuguojama 100 000 g, 70 min., 4°C. Dalis supernatanto paimama analizei, kita dalis pilnai pašalinama. Nuosėdos (egzosomos) resuspenduojamos 50 µl PBS ir saugomos -70°C.

Centrifugavimui (20 000 g ir 100 000 g) buvo naudojama ultracentrifuga Sorvall LYNX 6000 (Thermo Fisher Scientific).

Imunoblotingui naudojome supernatantus po Nr. 2. Proteominei analizei supernatantus po Nr.3. Egzosomų imunoblotingo ir proteominei analizei naudojome nuosėdas po Nr.5.

Paraleliai iš dalies supernatantų egzosomos buvo išskiriamos panaudojus komercinį rinkinį (*Total exosome isolation reagent* iš Life Technologies, kat.nr. 4478359). Tyrimus vykdėme pagal gamintojo nurodytą metodiką.

3.2.20. Baltymų ekstraktų išskyrimas iš ląstelių ir mikrovezikulių

Ląstelės plautos šaltu PBS (pH 7,3) tirpalu du kartus ir lizuotos lizės buferyje (1% NP-40, 1% natrio dezoksicholato, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA, 1 X Complete (proteazių inhibitorių kokteilis iš Roche), 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 5 mM NaF) 30 min., 4⁰ C temperatūroje. Pridėta 2,5 VV/ml benzonazės (Merck) ir ląstelių lizatai homogenizuoti per 21 G adatą. Centrifuguota 15 000 g, 30 min., + 4⁰ C. Supernatanto frakcija surinkta, išfasuota ir saugoma -70⁰C temperatūroje.

Mikrovezikulės, surinktos diferencinio centrifugavimo metu (Nr.3), buvo lizuotos lizės buferyje (1% NP-40, 1% natrio dezoksicholato, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA, 1 X Complete, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 5 mM NaF) 30 min., 4⁰ C temperatūroje. Centrifuguota 15 000 g, 30 min., + 4⁰ C. Supernatanto frakcija surinkta, išfasuota ir saugoma -70⁰C temperatūroje.

3.2.21. Supernatantų paruošimas elektroforezei. Elektroforezė

Supernatantų mėginiai SDS-poliakrilamido gelio elektroforezei (SDS/PAGE) buvo paruošti tokiu būdu: į 100 µl supernatanto buvo pilama 12,5 µl 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 30 µl 10 % SDS, 20 µl 0,5 M DTT, 20 µl glicerolio ir 5 µl 0,5 % bromfenolio mėlio, mėginiai virinami 5 min. ir tuoj pat naudojami elektroforezei arba saugomi -70⁰ C. Egzosomų suspensija PBS

buvo maišoma su 6x aukščiau aprašytu buferiu ir virinama 5 min. SDS/PAGE elektroforezei buvo naudojami 10 % SDS-poliakrilamido geliai, elektroforezės buferis (25 mM bazinio Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS) ir elektroforezės aparatas Mini Protean (Biorad); elektroforezės sąlygos: srovės stiprumas 30 mA/geliui, laikas 1,5 val.

3.2.22. Baltymų pernešimas ant membranos ir imuninė baltymų analizė

Po SDS/PAGE elektroforezės baltymai buvo pernešami ant Immobilon PVDF membranos (Biorad) naudojant aparatą Mini Transblot cell (Biorad). Imunoblotingas vykdomas pernešimo buferyje (48 mM bazinio Tris, 40 mM glicino, 20 % metanolio, 0,01 % SDS) 12 valandų, srovės stiprumas 125 mA. Po elektroforezės dalis gelių buvo dažoma su koloidiniu Coomassie Blue dažu (PageBlue, Thermo Fisher Scientific) arba sidabru (PageSilver, Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojų nurodymus.

PVDF membranos buvo blokuojamos tirpale (5 % sauso pieno, ištirpinto PBS tirpale, turinčio 0,18 % Tween-20) 1 val. kambario temperatūroje, po to nuplaunamos su PBS tirpalu, turinčiu 0,18 % Tween-20 (PBS-Tween-20), ir inkubuojamos su pirminiais antikūnais prieš MFG-E8 baltymą (Santa Cruz Biotechnology), skiestais 5 % sauso pieno-PBS tirpale, 1 val. kambario temperatūroje arba per naktį + 4 ° C. Po to membranos buvo plaunamos su PBS-Tween-20 tirpalu tris kartus po 5 min. ir inkubuojamos su antriniais antikūnais prieš pelės imunoglobulinus, konjuguotais su krienų peroksidaze (Pierce), praskiestais su PBS-0,18 % Tween-20 tirpalu santykiu 1:2000, 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos membranos buvo plaunamos penkis kartus po 5 min. su PBS-0,18 % Tween-20 ir analizuojamos naudojant ECL reagentus (Pierce), remiantis gamintojo nurodymais. Naudojant tas pačias membranas analizei su kitais antikūnais jos buvo atplaunamos nuo naudotų antikūnų 2 val. glicino buferyje (0,1 M glicino, pH 2,9) kambario temperatūroje smarkiai kratant, po to plaunamos PBS-0,18 % Tween-20

tirpalu. Taip paruoštų membranų imuninė baltymų analizė buvo atliekama naudojant aukščiau aprašytą protokolą.

3.2.23. Proteominė supernatantų ir egzosomų analizė

MKL buvo auginamos įprastomis sąlygomis arba bioreaktoriuose ant mikronešiklių tokiose pačiose terpėse (MSC Nutristem XF Medium).

Proteominiai tyrimai buvo atlikti Proteomikos departamente, Biotechnologijos institute, Helsinkio universitete, Suomijoje. Baltymai buvo paruošti sekančiai. Redukcija: 0,05M Tris(2-karboksietil)fosfinas 20 min., 37⁰ C. Alkilinimas: 0,15 M jodoacetamidas, 30 min. kambario temperatūroje, tamsoje. Proteolizė atlikta pridėjus 0,75 µg tripsino (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega), 3 val. 37⁰ C ir per naktį 30⁰ C. Po tripsinolizės peptidai buvo išvalyti naudojant C18 kolonėles (Harvard Apparatus) pagal gamintojo protokolą. Skysčių chromatografija kartu su tandem masių spektrometrija (LC-MS/MS) buvo atlikta panaudojant EASY-nLC (Thermo Fisher Scientific) chromatografą, integruotą kartu su Velos Pro-Orbitrap Elite hibridiniu masių spektrometru (Thermo Fisher Scientific), turinčiu nano elektro purškiklio (angl. *nanoelectro spray*) šaltinį (Thermo Fisher Scientific). LC-MS/MS mėginiai buvo atskirti panaudojant dviejų pakopų kolonėlių sistemą sudarytą iš 2 cm C18-A1 kolonėlės-gaudyklės ir 10 cm C18-A2 analitinės kolonėlės (abi iš Thermo Fisher Scientific). Linijinis separacijos gradientas buvo sudarytas iš 5% buferio B 5 min., 35% buferio B 60 min., 80% buferio B 5 min. ir 100% buferio B 10 min. Tėkmės greitis 0,3µl/min. (buferis A: 0,1% TFA 1% acetonitrile; buferis B: 0.1% TFA 98% acetonitrile). Vienai LC-MS/MS analizei buvo injekuota 4 µl mėginio. Pilnas MS skenavimas vykdytas panaudojant 60 000 rezoliuciją orbitrapo analizatoriuje. Duomenys renkami naudojantis LTQ Tune programine įranga. Duomenys buvo analizuojami UniProt baltymų duomenų bazėje panaudojant Thermo Proteome Discoverer programos Sequest paieškos algoritmus.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. SHED nervinė diferenciacija

4.1.1. SHED nervinės diferenciacijos indukcija

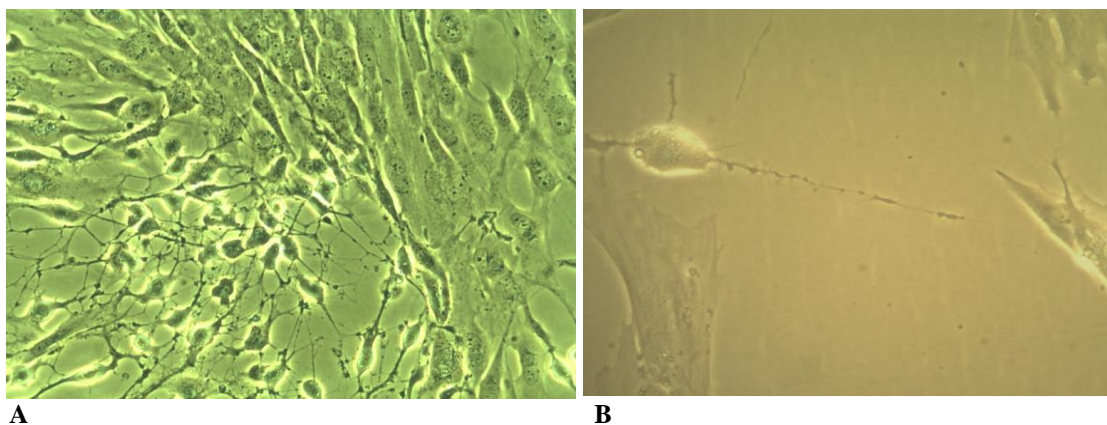
Mūsų laboratorijoje buvo sėkmingai išskirtos ir charakterizuotos kamieninių ląstelių linijos iš pieninių dantų pulpos (SHED). Mes bei kiti autoriai parodėme, kad šios ląstelės pasižymi savybėmis, kurios yra būdingos MKL išskirtoms iš kitų audinių (12). SHED ląstelės yra unikalios, kadangi, skirtingai nuo MKL, išskirtų iš mezoderminių audinių, jos kyla iš ektodermos. Tokiu būdu, transformuojant SHED į neuronus būtų vykdoma jų **diferenciacija**, o ne transdiferenciacija. SHED ląstelės yra rutiniškai kultivuojamos DMEM terpėje, praturtintoje 10% FVS.

	CD	Ekspresija, %
MKL būdingi žymenys	CD29 -APC	99
	CD44 -FITC	99
	CD54-PE	40
	CD55 -APC	99
	CD73 -PE	99
	CD81 -APC	99
	CD90 -FITC	99
	CD105 -APC	99
	CD146 -PE	47,7
	CD151 -PE	99
	CD166 -PE	99
	CD271 -PE	2,8
	Notch 1 -APC	81,6
MKL nebūdingi žymenys	CD14 -PE	0
	CD34 -PE	0
	CD45 -FITC	0
	CD117 -APC	0
	HLA-DR-FITC	0

2 lentelė. SHED paviršiaus žymenų ekspresijos tyrimai. Buvo tiriama paviršiaus žymenų CD14, CD34, CD45, CD117, HLA-DR, CD73, CD105, CD90, CD146, CD29, CD44, CD54, CD55, CD81, CD151, CD166 ir CD271 ekspresija. Kontrolėms naudotos ląstelės veiktos su FITC, PE arba APC žymėtais antriniais antikūniais (plačiau skyriuje Metodai).

Šios kultivavimo sąlygos yra palankios MKL, todėl standartiškai naudojamos jų ekspansijai bei diferencijavimui *in vitro* sąlygomis. Mūsų naudotos ląstelės ekspresavo paviršiaus žymenis, kurie yra būdingi MKL (2 lentelė).

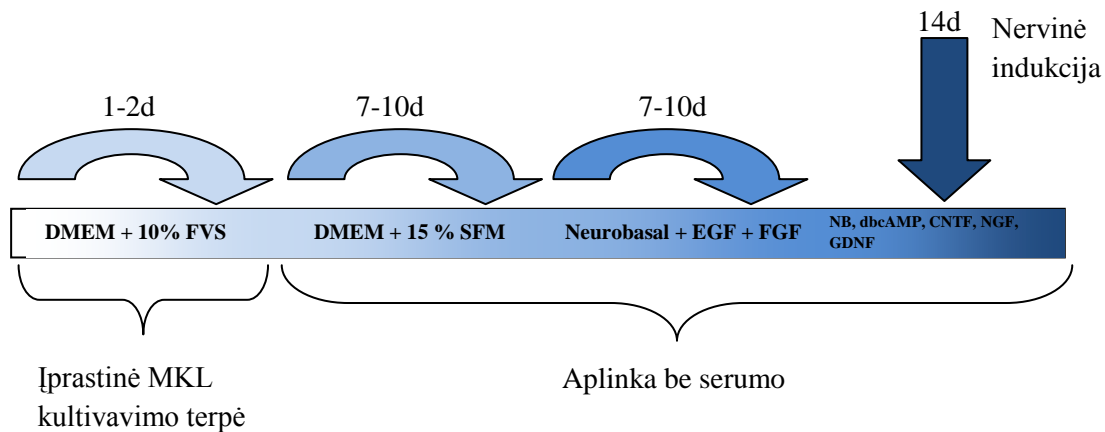
Kita vertus, nervinė diferenciacija bei neuronų kultivavimas yra vykdomi terpėse be serumo. Todėl manome, kad standartinės kultivavimo sąlygos (DMEM su 10% FVS) suteikia pranašumą mezenchiminių pirmtakų subpopuliacijai, vykdoma kryptinga jų atranka. Nepaisant to, visose standartinėmis sąlygomis kultivuotose SHED ląstelių linijose stebėjome negausias subpopuliacijas, pasižyminčias neuronams būdingais morfologiniais požymiais (5 pav.).



5 pav. Neurogeninių ląstelių subpopuliacijos SHED kultūrose. Dviejų skirtingų linijų (A ir B) SHED ląstelės. Fazės kontrastas, originalus padidinimas x200 (A) ir x400 (B).

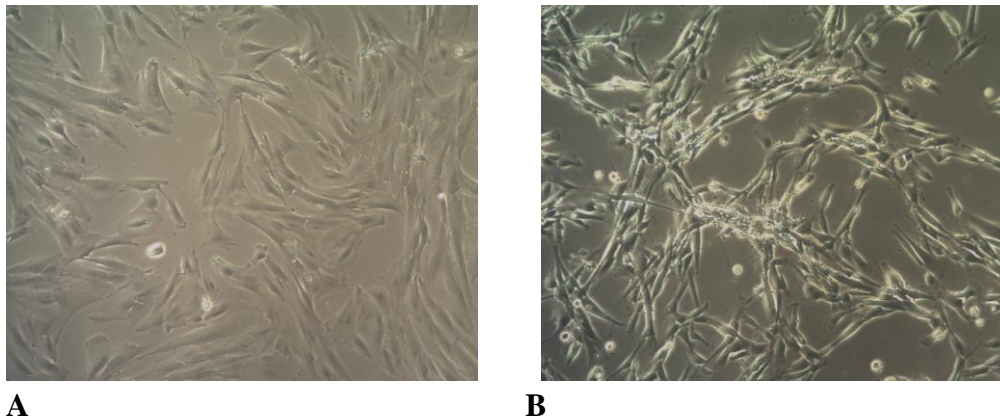
SHED neurogeninė diferenciacija buvo vykdoma pakopiškai (6 pav.). Pirmame tyrimų etape adaptavome ląsteles prie aplinkos be serumo. Ląstelės buvo išsėjamos įprastai (DMEM su 10% FVS), ant mikroskopavimo stikliukų, padengtų poliornitinu ir (arba) lamininu, arba ant komercinių lėkštelių, padengtų polilizinu ir lamininu (plačiau skyriuje Metodai), tada, po 1-2 dienų, pervedamos į aplinką be serumo. Šiam tikslui naudojome komercinį serumo pakaitalą, pritaikytą MKL kultivavimui (Stempro, MSC SFM) (Gibco). DMEM terpė (1000 mg/ml gliukozės) buvo praturtinta 15 % serumo pakaitalu (toliau SFM), 2 mM gliutaminu ir antibiotikais. SHED ląstelės gerai toleravo naujas auginimo sąlygas.

EKSPERIMENTO SCHEMA



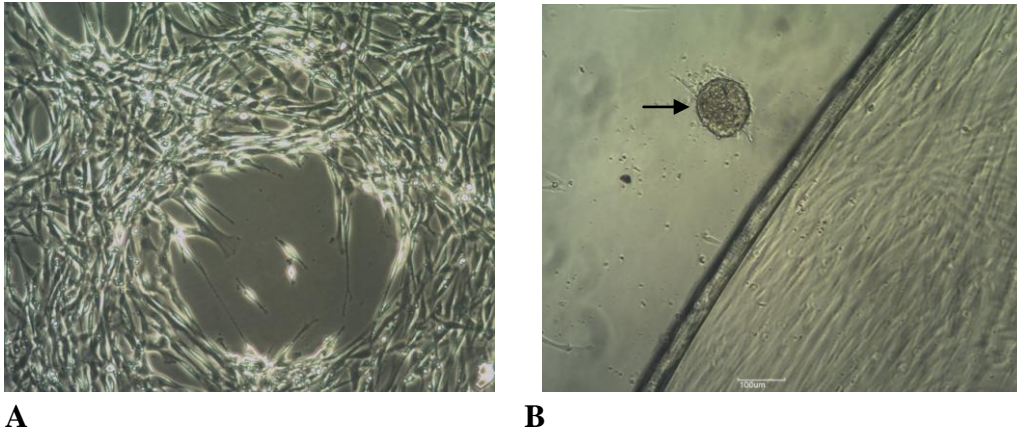
6 pav. SHED ląstelių neurogeninės diferenciacijos eskperimento schema.

Ląstelių proliferacija pagreitėjo, taip pat stebėjome būdingus morfologinius pokyčius. Ląstelės sumažėjo, susiaurėjo, įgavo verpstės formą (7 pav.).



7 pav. SHED ląstelių morfologijos pokyčiai aplinkoje be serumo. SHED ląstelės buvo kultivuojamos įprastinėje terpėje (DMEM su 10% FVS) (A); ir DMEM terpėje, praturtintoje 15% serumo pakaitalu (B). Fazės kontrastas, originalus padidinimas x100.

Tokiomis sąlygomis ląsteles kultivavome 7-12 dienų. Tada pradėjome sekantį eksperimentų etapą – ląstelių kultivavimą specializuotoje neuronų terpėje (Neurobasal A + B27 + 20ng/ml FGF2 + 20ng/ml EGF, plačiau skyriuje Metodai). Terpė buvo keičiama du kartus per savaitę. SHED ląstelės gerai toleravo naujas kultivavimo sąlygas, suaugo į monosluoksnius. Ryškesnių morfologinių pokyčių nepastebėjome. Maždaug po savaitės, kai kuriuose monosluoksniuose susidarė ertmės, prasidėjo sferų formavimosi procesas (8 pav.).



8 pav. Spontaniškas sferų formavimasis SHED ląstelėse, kultivuotose specializuotoje neurogeninėje terpėje. A – ertmių formavimasis monosluoksnyje. B – rodykle pažymėta maždaug 100 μm diametro sfera. Fazės kontrastas, originalus padidinimas x100.

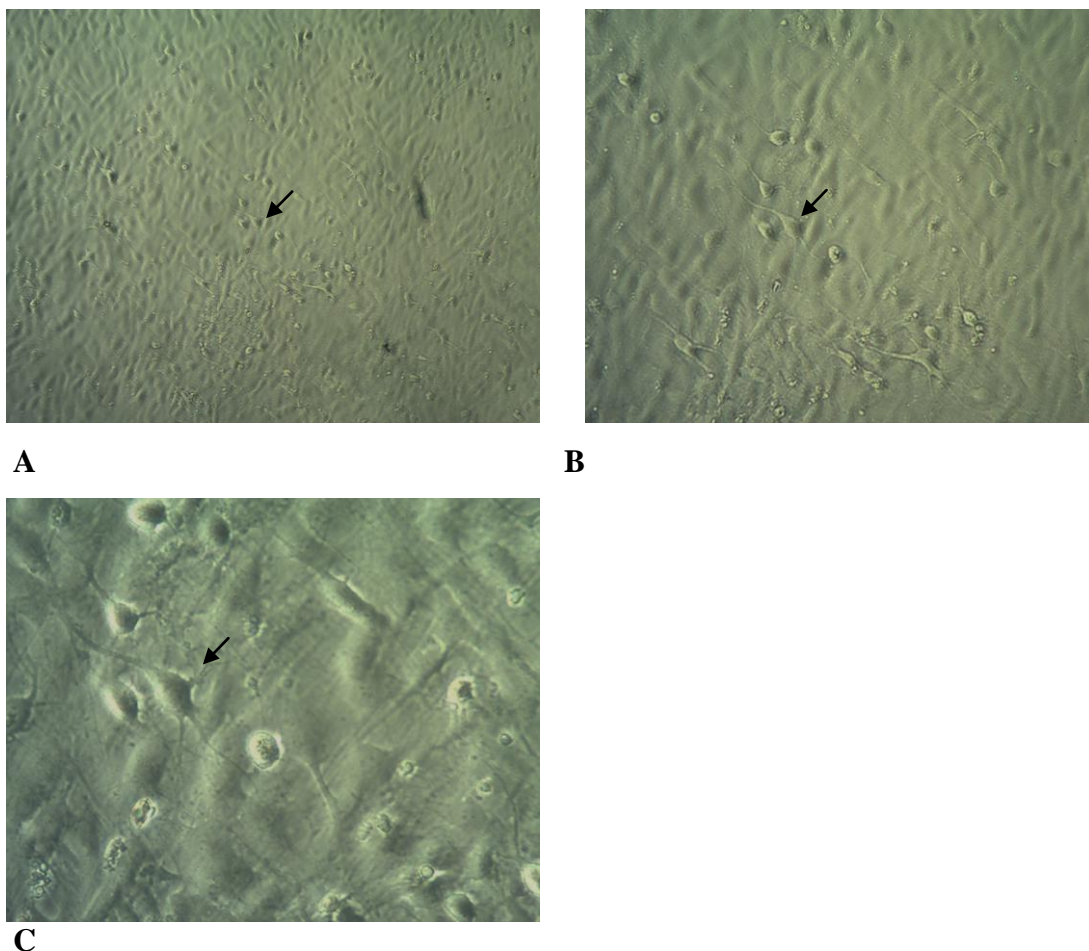
Sutariama, kad sferų formavimas (ląstelių sferogeniškumas) yra būdingas nervinių ląstelių požymis (128). Todėl papildomai ištyrėme, kaip kultivavimas neurogeninėje terpėje veikia SHED ląstelių sferogeninį potencialą. Šiuo tikslu skirtingą ląstelių skaičių išsėjome į mažai lipnaus plastiko lėkšteles (angl. *ultra low adhesion plastic*) (plačiau skyriuje Metodai). Naudojome specializuotą neuronų terpę. Nustatėme, kad SHED pasižymi puikiu sferogeniškumu (9 pav.). Mūsų duomenys rodo, kad efektyviausiai sferos yra formuojamos tada, kai ląstelės išsėjamos 10 000 – 20 000 ląst./ cm^2 koncentracija. Įdomu, kad ląstelės, kurios buvo išsėtos 5000 ląst./ cm^2 koncentracija, sferų neformavo (9 pav., C).



9 pav. SHED ląstelės formuoja sferas specializuotoje neurogeninėje terpėje. Ląstelės buvo išsėtos po 5000 (C), 10 000 (A, B) ir 20 000/ cm^2 į 12 šulinėlių mažai lipnaus plastiko lėkštelę (Greiner bio-one). Naudota specializuota neuronų terpė (Neurobasal A+B27+20ng/ml FGF2+20ng/ml EGF, plačiau skyriuje Metodai). A – sferų formavimasis, 24 val. po išsėjimo; B – „brandi“ sfera (48 val. po išsėjimo). Fazės kontrastas, originalus padidinimas x200 (A, B), x100 (C).

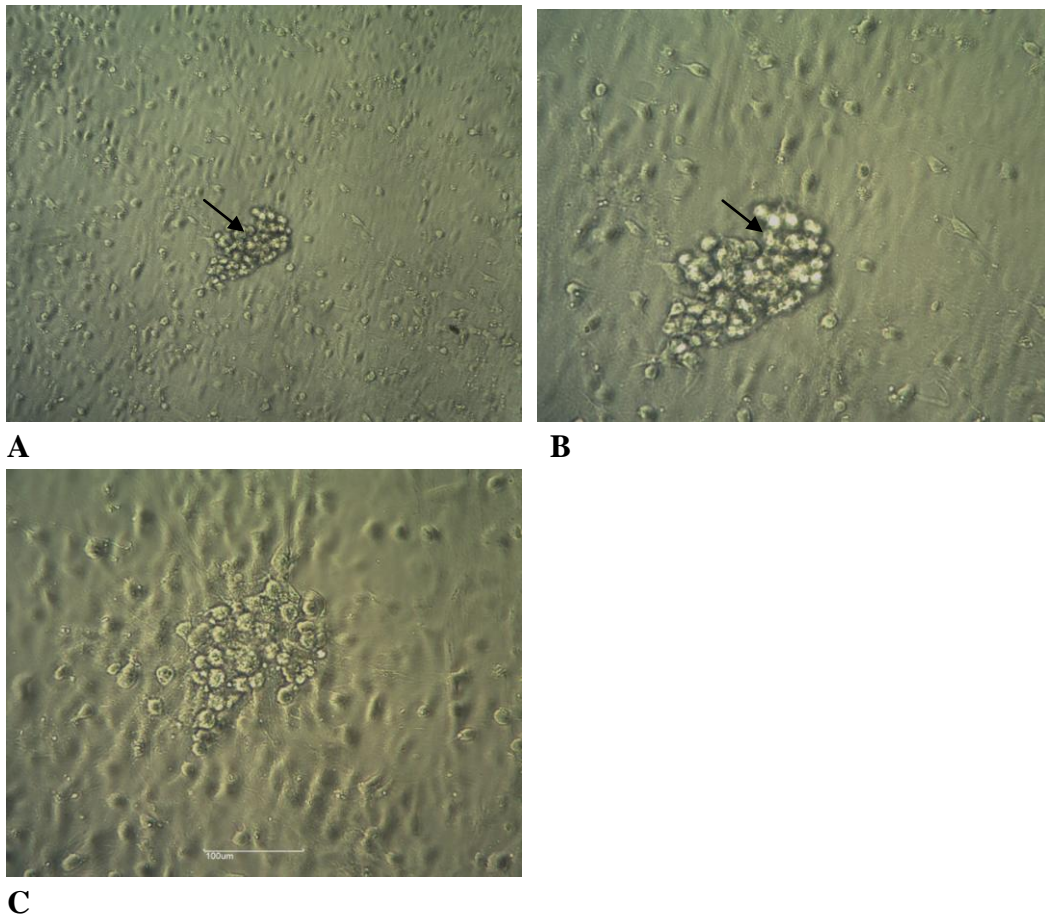
Taip pat nustatėme, kad kultivuojant šiomis sąlygomis (ilgiau, kaip dvi dienas), sferos pradeda tvirtintis prie substrato ir ląstelės pradeda migruoti ant plastiko. Manome, taip atsitinka dėl to, kad sferos ląstelės produkuoja faktorius, padedančius tvirtintis prie nelipnaus substrato. Todėl, siekdami išvengti sferų adhezijos, kas 2 dienas jas perkeldavome į naują šulinėlį su šviežia terpe. Sferos nustoja augti pasiekusios maždaug 200 μm diametrą. Mikroskopuojant „brandžiose“ sferose matomi didesnio tankio dariniai (9 pav., B).

Toliau pradėjome vykdyti sekantį eksperimento etapą – SHED ląstelių nervinę diferenciaciją. Šiuo tikslu ląstelės buvo veikiamos neuroindukcijos terpe (Neurobasal A + B27 + 0,5 mM dibutiril-cAMP + 10 ng/ml NGF + 10 ng/ml GDNF + 10 ng/ml CNTF). Jau kitą dieną pradėjo ryškėti būdingi ląstelių morfologijos pokyčiai (10 pav.).



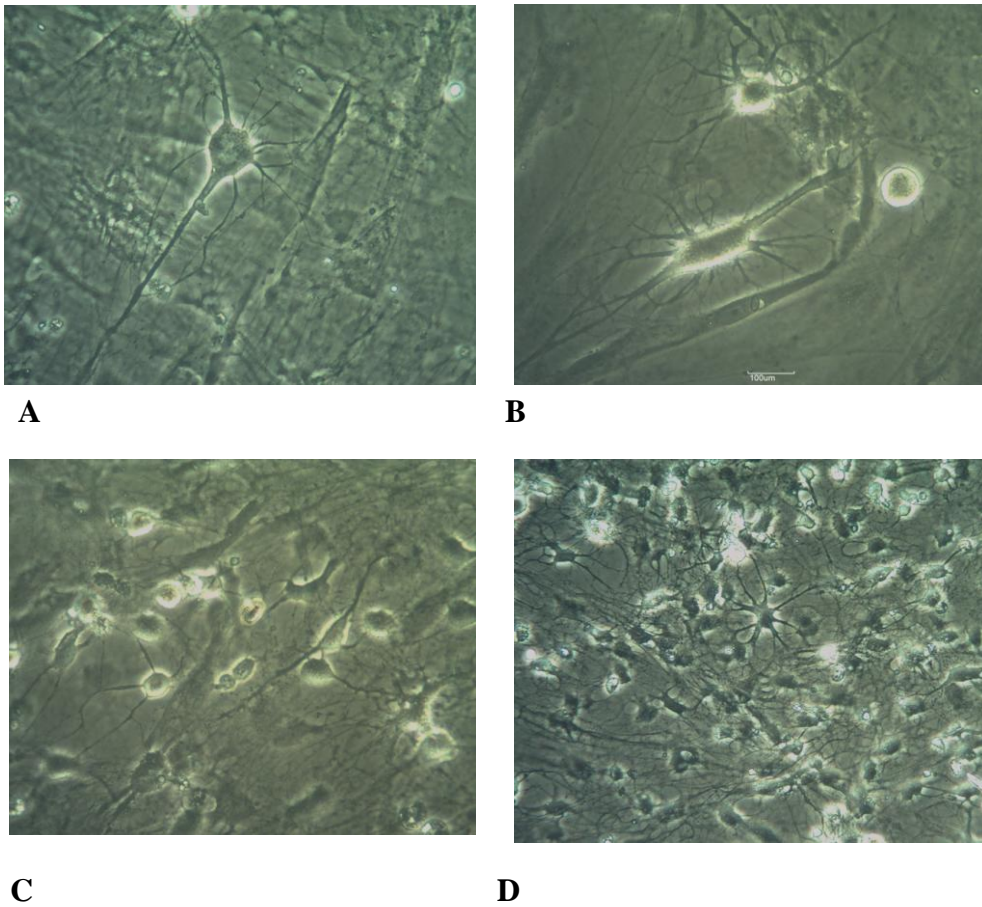
10 pav. SHED ląstelių neurogeninės diferenciacijos morfologiniai požymiai. Pirma diena po neuroindukcijos. Fazės kontrastas. Ta pati zona nufotografuota su x100 (A), x200 (B) ir x400 (C) originaliu padidiniu.

Pirmomis dienomis po neuroindukcijos neuronų tipo ląstelės atsiradavo grupėmis. Vėliau šis procesas stabilizavosi, neuronų tipo ląstelės laipsniškai išplito visame kultūros paviršiuje. Tokiomis sąlygomis ląstelės kultivavome apie 2 savaites. Kultūrose vizualių ląstelių žūties požymių nestebėjome. Įdomu, kad praėjus 5 dienoms po neuroindukcijos pradėjo formuotis lokalizuotos ląstelių sankaupos, primenančios ganglijines struktūras (11 pav.).



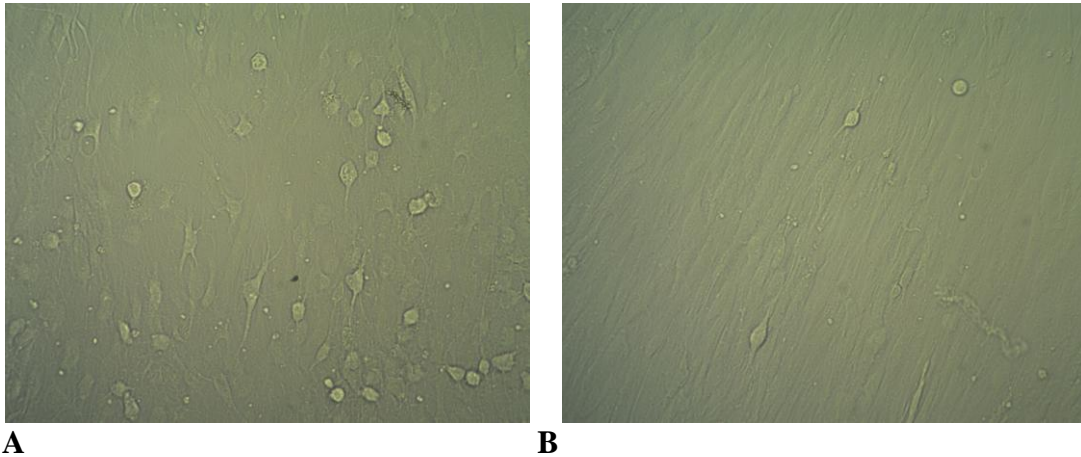
11 pav. SHED ląstelių neurogeninė diferenciacija. Ląstelės buvo kultivuotos 5 (A, B) ir 7 (C) dienas neuroindukcijos terpėje. Ta pati ląstelių sankaupa nufotografuota x100 (A) ir x200 (B) padidininimu. C - x200

Diferenciacijos metu ląstelės įgavo neuronams būdingų morfologijos požymių: ovalo ar trikampio formos išgaubtas kūnas, ilgos, atsišakojančios dendritų ar aksonų tipo ataugos. Ląstelės tarpusavyje formavo ataugų tinklus (12 pav.).



12 pav. SHED ląstelių neurogeninė diferenciacija. Diferencijuojančių ląstelių morfologijos ypatumai. Fazės kontrastas. A, B – x200; C, D – x100.

Taip pat nustatėme, kad mūsų eksperimentiniame protokole naudojamas ląstelių adaptavimas prie aplinkos be serumo, naudojant serumo pakaitalą (žr. 6 pav.), pagreitina nervinės diferenciacijos procesą (13 pav.). Tai rodo, kad adaptavimo prie terpės be serumo metu SHED ląstelės pasidaro labiau „imlios“ nervinę diferenciaciją indukuojantiems signalams. To priežastys, mūsų manymu yra dvi. Pirma, serumas yra turtingas įvairių augimo faktorių šaltinis. Šie augimo faktoriai (visų pirma $TGF\alpha$, $TGF\beta$, IGF) skatina epitelio/mezenchimos perėjimą (angl. *epithelial-to-mesenchymal transition*) ir suteikia pranašumą mezenchiminių pirmtakų subpopuliacijai. Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad serumo komponentai aktyvuoja mezenchiminės diferenciacijos programas nervinės kėteros ląstelėse (2).



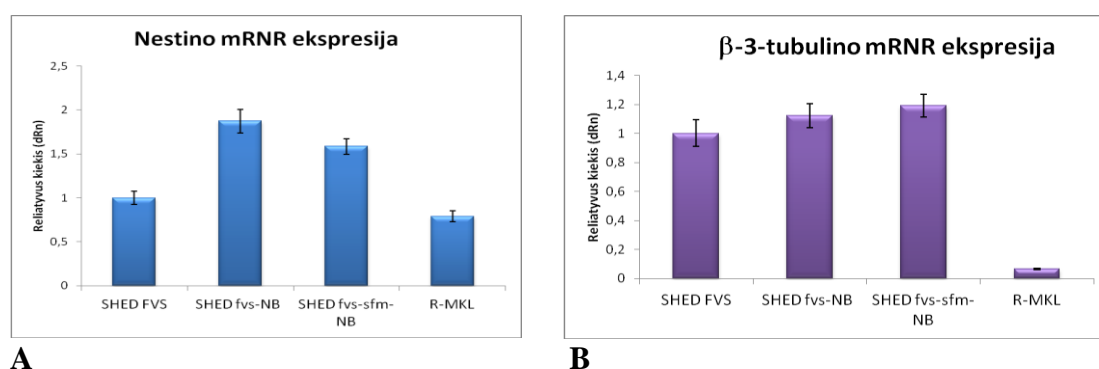
13 pav. SHED ląstelių adaptavimas prie aplinkos be serumo pagreitina neurogeninę diferenciaciją. A – adaptuotų ląstelių nervinė diferenciacija; B – neadaptuotų ląstelių nervinė diferenciacija. Fazės kontrastas. Originalus padidinimas x200.

Todėl, pašalinę iš kultivavimo aplinkos serumo komponentus susilpniname pro-mezenchiminių signalų poveikį SHED ląstelėms. Kita priežastis, galėtų būti susijusi su efektyvesniu liekamųjų serumo komponentų pašalinimu adaptavimo prie aplinkos be serumo metu. Panaudoję automatizuotą ląstelių vizualizavimo ir analizės sistemą Cell-IQ galėjome realiaime laike stebėti ir dokumentuoti individualių ląstelių morfologijos pokyčius diferenciacijos proceso metu. Naudodami šią technologiją galėjome nepertraukiamai stebėti ląsteles laikotarpiu iki 5 dienų. Įdomu, kad diferenciacijos proceso metu morfologiniai pokyčiai SHED populiacijose vyko netolygiai, t.y. vienos ląstelės įgaudavo neuronams būdingus pokyčius anksčiau už kitas (Video priedas Nr. 1). Šis rezultatas rodo, kad tam tikros SHED subpopuliacijos greičiau ir efektyviau reaguoja į nervinės diferenciacijos induktorius. Tai galima aiškinti dvejopai. Pirma, SHED kultūrose yra nervinių ląstelių pirmtakų subpopuliacija, kuri, paveikus neuroinduktoriais diferencijuojasi greičiau ir efektyviau už kitas ląsteles. Antra, SHED kultūrose yra bipotentinių (mezenchiminių ir nervinių) ląstelių pirmtakų, kurie, adaptavimo prie aplinkos be serumo metu bei auginant jas specializuotoje nervinių ląstelių auginimo terpėje, tampa „imlesni“ nervinės diferenciacijos induktoriams ir todėl greičiau įgyja morfologinius pokyčius, būdingus nervinėms ląstelėms. Tuo tarpu, kitos, labiau mezenchimine kryptimi

specifikuotos SHED ląstelės (angl. *mesenchymal fate-restricted cells*) neuronams būdingus požymius įgauna lėčiau. Mes nestebėjome ženklesnės ląstelių proliferacijos diferenciacijos proceso metu, todėl antrasis aiškinimas (bipotentiniai pirmtakai) geriau atspindi gautus rezultatus. Abiem atvejais, mūsų duomenys patvirtina SHED populiacijų heterogeniškumą. Kitas įdomus rezultatas, kurį gavome stebėdami ląsteles realiame laike yra susijęs su grįžtamais kai kurių diferencijuojančių ląstelių morfologiniais pokyčiais (Video priedas Nr. 1). Stebėjome, kaip kai kurios neuronų morfologiją įgavusios ląstelės vėl atgaudavo fibroblastoidinį fenotipą. Kai kuriais atvejais tokios transformacijos įvykdavo keletą kartų. Greičiausiai, tai atspindi citoskeleto persitvarkymus pradinėse diferenciacijos fazėse. Taip pat nustatėme, kad diferencijuojančios ląstelės dažniausiai migruoja ant šalia esančių monosluoksnio ląstelių paviršiaus.

4.1.2. Kiekybinis nestino ir β III tubulino genų mRNR ekspresijos įvertinimas SHED ląstelėse

Mes taip pat kiekybiškai ištyrėme nestino ir β III tubulino genų mRNR ekspresiją. Šiam tikslui naudojome SHED ir iš riebalinio audinio išskirtas MKL ląsteles (R-MKL) (14pav.).

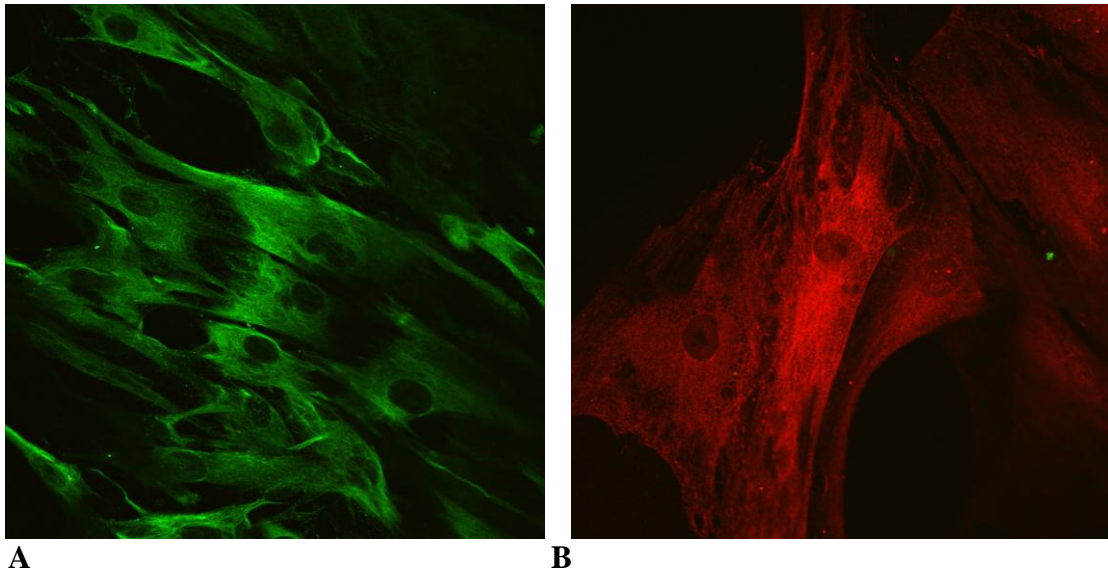


14 pav. Nestino ir β III tubulino mRNR ekspresija SHED ir R-MKL ląstelėse. A – Kiekybiniai tiriamų genų mRNR ekspresijos pokyčiai buvo įvertinti atlikus realaus laiko PGR (plačiau skyriuje Metodai). A – nestino mRNR ekspresija. B – β III tubulino mRNR ekspresija. SHED FVS – ląstelės, kultivuotos standartinėmis sąlygomis; SHED fvs-sfm-NB – ląstelės buvo adaptuotos prie aplinkos be serumo ir kultivuotos specializuotoje nervinių ląstelių auginimo terpėje; SHED fvs-NB – ląstelės kultivuotos specializuotoje nervinių ląstelių auginimo terpėje, prieš tai neadaptavus jų prie aplinkos be serumo.

Įdomu, kad nestino geno transkriptų kiekis R-MKL ląstelėse nedaug skiriasi nuo SHED ląstelių, tuo tarpu imunocitochemiškai baltymo detektuoti nepavyko. Taip pat nustatėme, kad SHED ląstelėse, kultivuotose specializuotoje nervinių ląstelių auginimo terpėje ir adaptuotose prie aplinkos be serumo arba prie jos neadaptuotose (atitinkamai SHED fvs-sfn-NB ir SHED fvs-NB), nestino geno transkriptų gausėja (14 pav., A). β III tubulino mRNA ekspresijos lygis SHED ląstelėse buvo daugiau kaip dešimt kartų aukštesnis negu R-MKL ląstelėse (14 pav., B). Įdomu, kad detektavome didelius šio transkripto kiekius nediferencijuotose, standartinėmis sąlygomis kultivuotose SHED ląstelėse.

4.1.3. Imunocitocheminiai nervinėms ląstelėms būdingų žymenų tyrimai

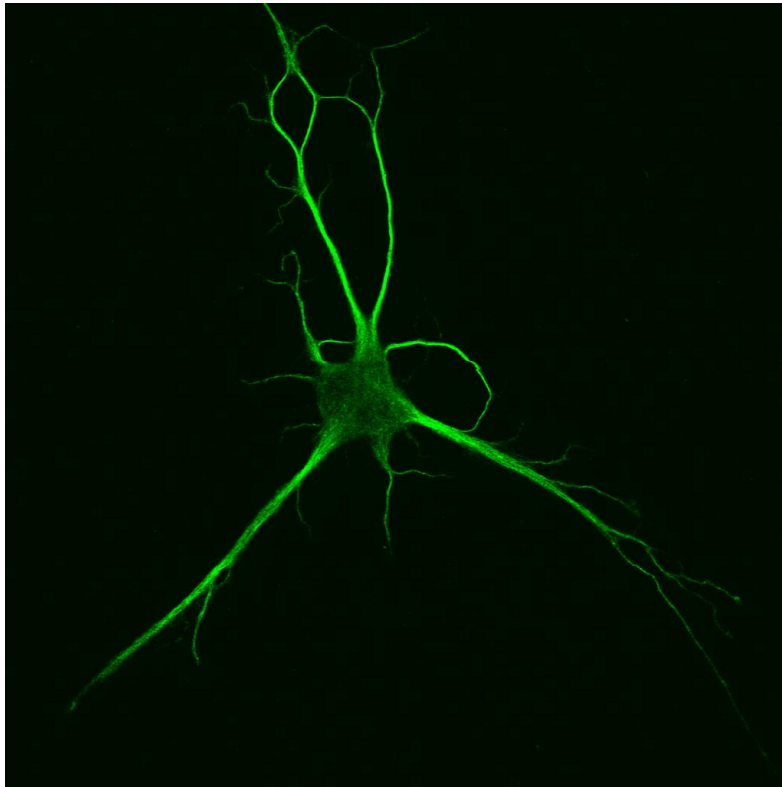
Nervinės diferenciacijos proceso efektyvumą įvertinome imunocitochemiškai, ištyrę, kaip ekspresuojami nervinėms ląstelėms būdingi žymenys. Pradžioje tyrėme nediferencijuotas, standartinėmis sąlygomis (DMEM su 10% FVS) kultivuotas SHED ląsteles. Mus domino, ar įprastinėmis sąlygomis auginamos SHED ląstelės ekspresuoja nerviniams pirmtakams būdingus žymenis. Todėl tyrėme nestino baltymo ekspresiją. Nestino baltymas yra citoskeleto tarpinių filamentų baltymas. Šis baltymas yra gausiai ekspresuojamas neurogenezės metu (ypač embrioninėje vystymosi stadijoje), suaugusiame organizme – neuronų pirmtakuose, CNS nervinėse kamieninėse ląstelėse. Nervinių ląstelių diferenciacijos metu jo ekspresijos lygis mažėja, jis yra pakeičiamas brandiems neuronams būdingais neurofilamentų baltymais (129). Manoma, kad nestino ekspresija yra būdinga ir kitoms multipotentinėms suaugusio organizmo ląstelėms (130).



15 pav. Nervinių ląstelių pirmtakams bei mezenchiminėms ląstelėms būdingų žymenų ekspresija SHED ir riebalinio audinio MKL ląstelėse. A – Konfokalinė mikroskopija. Standartinėmis sąlygomis kultivuotose SHED ląstelėse ekspresuojamas nestinas buvo nustatytas panaudojus monokloninį antikūną prieš nestiną, vizualizuota panaudojus antrinius antikūnus konjuguotus su Alexa Fluor® 488 (plačiau skyriuje Metodai). B – Konfokalinė mikroskopija. Iš riebalinio audinio išskirtose MKL ląstelėse buvo kultivuojamos standartinėmis sąlygomis. Vimentino ekspresija nustatyta panaudojus polikloninį ožkos antikūną ir vizualizuota su antriniais antikūnais konjuguotais su Alexa Fluor® 594 (raudona). Nestino raiška buvo nustatinėjama panaudojus monokloninį antikūną prieš nestino baltymą ir vizualizuojama panaudojus antrinius antikūnus, konjuguotus su Alexa Fluor® 488 (žalia).

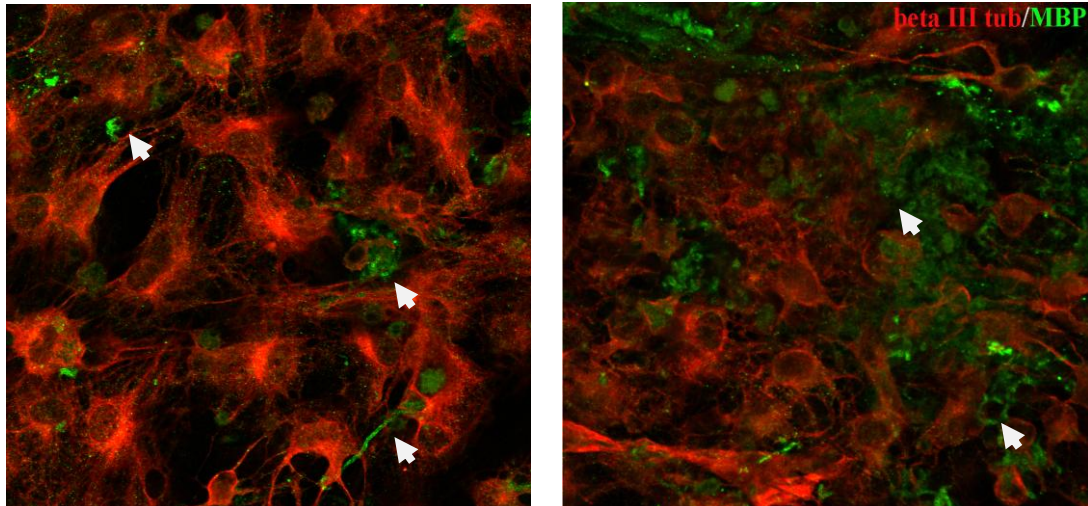
Nustatėme, kad standartinėmis sąlygomis kultivuojamos SHED ląstelės gausiai ekspresuoja nestino baltymus (15 pav., A). Įdomu, kad standartiškai kultivuotose iš riebalinio audinio išskirtose MKL ląstelėse nestinas nebuvo ekspresuojamas visiškai, tuo tarpu, aiškiai matyti mezenchiminio žymens vimentino baltymo ekspresija (15 pav., B). Šie duomenys gerai derinasi su mūsų hipoteze, pagal kurią, ektoderminės kilmės SHED ląstelės yra artimesnės neuronams, nei mezoderminės kilmės ląstelės (šiuo atveju riebalinio audinio MKL).

Toliau tyrėme įvairių žymenų ekspresiją SHED ląstelėse po neuroindukcijos. Nustatėme, kad diferencijuojančios SHED ląstelės, taip pat ekspresuoja vimentiną (16 pav.). Šis rezultatas yra įdomus, kadangi vimentinas yra klasikinis mezenchiminių ląstelių žymuo, tačiau kai kurie autoriai nurodo, kad vimentino ekspresija yra būdinga ir nervinėms kamieninėms ląstelėms (131). Mūsų rezultatai rodo, kad diferencijuojančiose SHED ląstelėse vimentino ekspresija išlieka.



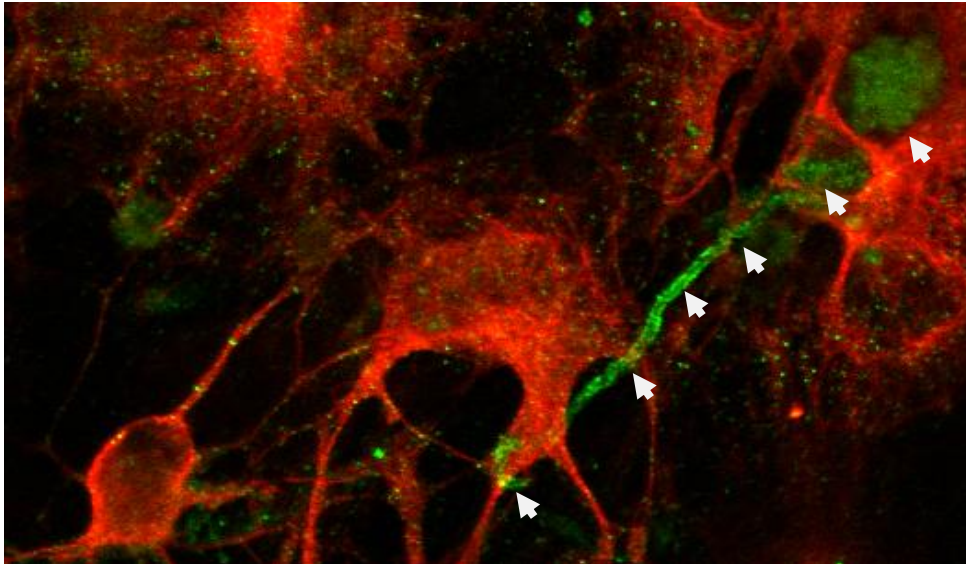
16 pav. Vimentino ekspresija diferencijuojančiose SHED ląstelėse. Konfokalinė mikroskopija. Diferencijuojančiose SHED ląstelėse ekspresuojamas vimentinas buvo nustatytas panaudojus monokloninį antikūną prieš vimentiną, vizualizuota panaudojus antrinius antikūnus konjuguotus su Alexa Fluor® 488 (plačiau skyriuje Metodai).

β III tubulinas yra citoskeleto baltymas, kuris selektyviai ekspresuojamas centrinės ir periferinės nervų sistemos neuronuose. Vienintelės žinomos išimtys – Sertoli ląstelės ir kai kurios vėžinių ląstelių rūšys (132). Mūsų duomenys rodo, kad β III tubulino baltymas yra gausiai ekspresuojamas SHED ląstelėse po neuroindukcijos (17 pav.).



A

B



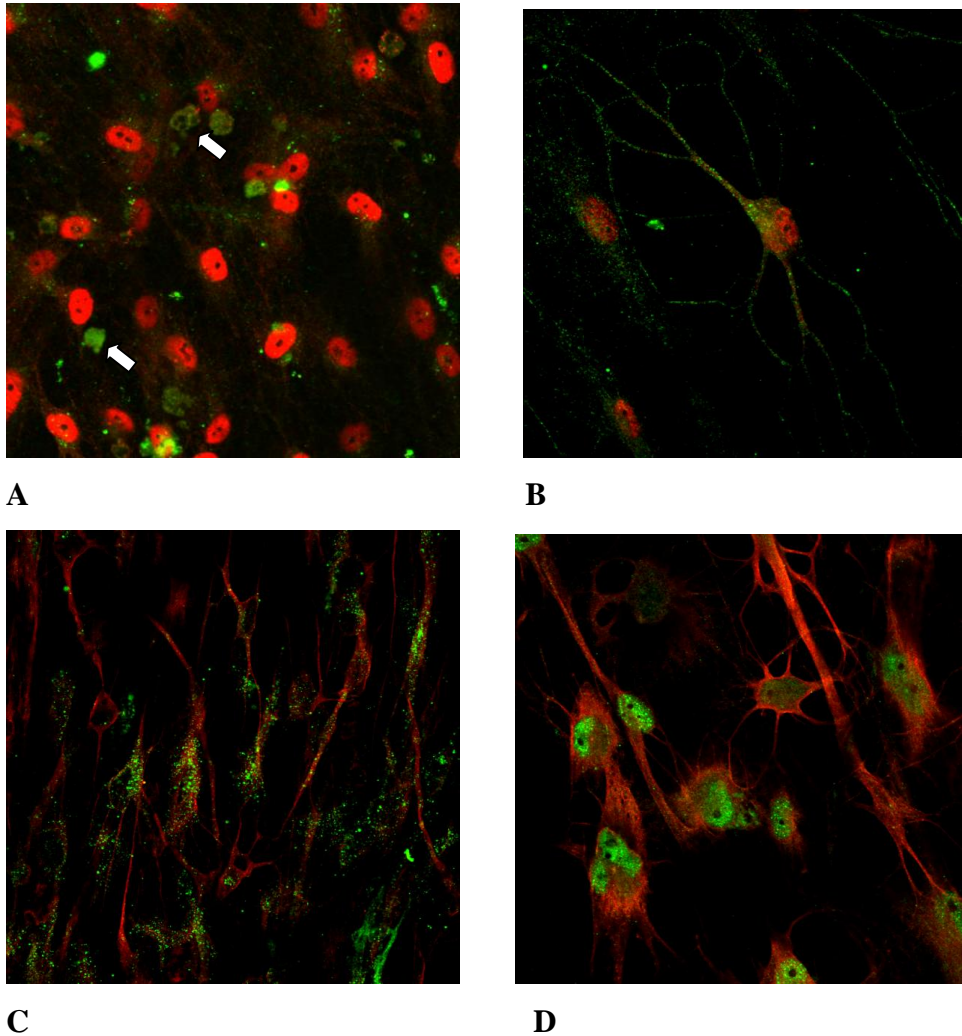
C

17 pav. Nervinių žymenų ekspresija SHED ląstelėse po neuroindukcijos. A, B – Konfokalinė mikroskopija. SHED ląstelėse ekspresuojamas β III tubulinas buvo detektuojamas panaudojus triušio polikloninį antikūną, mielino bazinis baltymas (MBP) buvo detektuojamas panaudojus ožkos polikloninį antikūną. Vizualizuota antrinais antikūniais konjuguotais su Alexa Fluor® 488 (MBP, žalia spalva) ir Alexa Fluor® 594 (β III tubulinas, raudona spalva) (plačiau skyriuje Metodai). Rodyklės rodo MBP depozitus, taip pat galimai Švano ląsteles bei jų ataugas. C – padidintas nuotraukos A fragmentas. Rodyklės rodo MBP depozitus, taip pat galimai Švano ląsteles bei jų ataugas.

Taip pat tyrėme mielino bazinio baltymo (MBP) ekspresiją. MBP yra vienas pagrindinių neuronų mielino apvalkalo komponentų. Periferinėje nervų sistemoje MBP sintezuoja Švano ląstelės (133). 17 pav., A, B ir C matyti, kad MBP baltymai kaupiasi depozituose, ant diferencijuojančių nervinių ląstelių membranų, taip pat tam tikrose ląstelėse (galimai Švano) bei jų ataugose. Svarbu, kad MBP-teigiamos ląstelių ataugos neturi β III tubulino baltymo ir

formuoja glaudžius kontaktus su β III tubulina ekspresuojančiomis ląstelėmis (17 pav., C).

Brn3a baltymas yra transkripcijos faktorius, kuris yra gausiai ekspresuojamas tinklainės ganglijinėse ląstelėse, taip pat galvos ir stuburo smegenų vystymosi metu. Manoma, kad Brn3a yra būtinas sensorinių neuronų vystymuisi (134).



18 pav. Nervinių žymenų ekspresija SHED ląstelėse po neuroindukcijos. A – Konfokalinė mikroskopija. SHED ląstelėse ekspresuojamas transkripcijos faktorius Brn3a buvo detektuojamas panaudojus triušio polikloninį antikūną, GFAP baltymas buvo detektuojamas panaudojus ožkos polikloninį antikūną. Vizualizuota antriniais antikūniais, konjuguotais su Alexa Fluor® 488 (GFAP, žalia spalva) ir Alexa Fluor® 594 (Brn3a, raudona spalva) (plačiau skyriuje Metodai). Rodyklės rodo GFAP-teigiamus, Brn3a-negiamus darinius, galimai ląsteles. B – SHED ląstelėse ekspresuojamas žymuo S100 buvo detektuojamas panaudojus triušio polikloninį antikūną, mielino bazinis baltymas (MBP) panaudojus ožkos polikloninį antikūną. Vizualizuota antriniais antikūniais konjuguotais su Alexa Fluor® 488 (MBP, žalia spalva) ir Alexa Fluor® 594 (S100, raudona spalva). C – Periferinas, pelės monokloninis antikūnas (žalia spalva) ir β III tubulinas, triušio polikloninis antikūnas (raudona spalva). D – sinaptofizinas, ožkos polikloninis antikūnas (žalia spalva) ir β III tubulinas, triušio polikloninis antikūnas (raudona spalva).

Mes nustatėme, kad diferencijuojančios SHED ląstelės gausiai ekspresuoja Brn3a transkripcijos faktorių (18 pav., A). Baltymas lokalizavosi ląstelių branduoliuose. GFAP yra citoskeleto tarpinių filamentų baltymas, gausiai ekspresuojamas CNS astroglijos ląstelių (astrocitai, ependimos ląstelės), taip pat, nežymiai, kai kuriuose kituose audiniuose (inkstų glomeruluose, odos keratinocituose) (135). Mes taip pat identifikavome GFAP-teigiamus darinius (įdomu, kad šie dariniai buvo Brn3a-neigiami) diferencijuojančiose SHED ląstelių kultūrose (18 pav., A). Toliau tyrėme žymenų, būdingų periferinės ir centrinės glijos ląstelėms, ekspresiją diferencijuojančiose SHED. S100 baltymo ekspresija būdinga nervinės keteros kilmės ląstelėms (Švano, melanocitų ir kt.). Nustatėme silpną S100 ekspresiją diferencijuojančiose SHED ląstelėse (18 pav., B), baltymas buvo tolygiai pasiskirstęs ląstelių citoplazmoje ir branduoliuose. Taip pat tyrėme periferino ekspresijos pokyčius diferencijuojančiose ląstelėse (18 pav., C). Periferinas yra III tipo tarpinių gijų baltymas daugiausiai ekspresuojamas periferinės nervų sistemos neuronuose. Mūsų duomenys rodo, kad diferencijuojančios SHED ląstelės periferiną ekspresuoja. Taip pat nustatėme, kad periferino baltymai ląstelėse išsidėsto kaip sankaupos, o ne kaip tarpinės gijos. Šie duomenys patvirtina ankščiau publikuotus rezultatus, kad ankstyvose nervinių ląstelių brandimo stadijose periferino baltymai kaupiasi į agregatus, tačiau neformuoja tarpinių gijų (136). Sinaptofizinas yra sinaptinių pūslelių glikoproteinas, gausiai ekspresuojamas nervinėse ir neuroendokrininėse ląstelėse. Mes nustatėme sinaptofizino ekspresiją diferencijuojančiose SHED ląstelėse (18 pav., D). Įdomu, kad sinaptofizino baltymai buvo lokalizuoti tik branduolio ir perinuklearinėse srityse, struktūrose, panašiose į pūsleles. Tai gali atspindėti nepilną diferencijuojančių SHED ląstelių subrendimą.

4.1.4. Genų ekspresijos tyrimai panaudojant komercinius PGR rinkinius

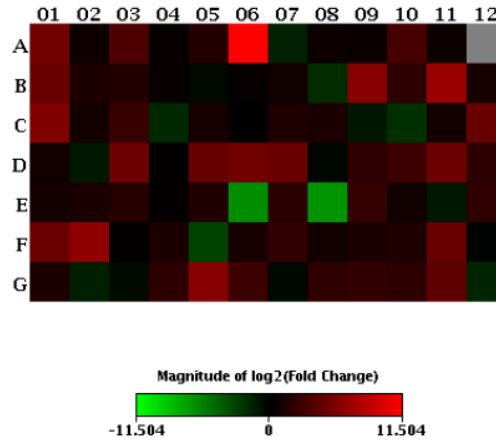
Kompleksiniams genų ekspresijos tyrimams diferencijuojančiose SHED ląstelėse mes panaudojome komercinius PGR rinkinius. Pagrindinis šios technologijos privalumas – galimybė vienu metu įvertinti 84 genų ekspresijos pokyčius. Mes pasirinkome neurogenezės ir nervinių kamieninių ląstelių (*Neurogenesis and Neural Stem Cell array* (PAHS-404A) bei žmogaus cAMP/Ca²⁺ signalinių kelių (*Human cAMP/Ca²⁺ PathwayFinder array* (PAHS 066A) tyrimams skirtus rinkinius.

Genas	Pakitimas	Kartai	Gene	Pakitimas	Kartai
Acetilcholinesterazė	↑	++	JUND	↑	+
Adenozino A2a receptorius	↑	++	MAF	↑	++
Amfiregulinas	↑	+++	Midkinas	↑	++
Apolipoproteinas E	↑	+++	Netrinas 1	↑	++
ATF-3	↑	++	Neuronų pentraksinas 1	↓	+++
BMP2	↑	++	Noggin	↓	++
Nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitorius 2B (p15)	↑	+	Notch 2	↑	+
CREM	↑	+	NR4A2 (Nurr1)	↑	+++
CREB1	↑	+	ODZ1 (teneurinas 1)	↑	++
DLL1	↑	+++	Pleiotrofinas	↑	++
Dopamino receptorius 2	↑	++	Proenkefalinas	↑	++
EGR 1 (Krox24)	↑	++	Prolaktinas	↑	++
EGR 2 (Krox20)	↑	+	Retikulonas 4 (Nogo)	↓	+
Efrinas-B1	↑	+	Sekretograninas 2	↑	++
FOS	↑	+++	Semaforinas-4D	↑	++
FOSB	↑	+++	Somatostatino receptorius 2	↑	++
HEY1	↑	++	Somatostatinas	↑	+++
HEY2	↑	++	STAT3	↑	+
HES1	↑	++	TGF β-3	↑	+++
JUNB	↑	++	Tirozino hidroksilazė	↑	+++

3 lentelė. Genų ekspresijos pokyčiai SHED ląstelių nervinės diferenciacijos metu. Realaus laiko PGR buvo atlikta MX3005P® (Stratagene) aparatu. Naudojome neurogenezės ir nervinių kamieninių ląstelių (*Neurogenesis and Neural Stem Cell array* (PAHS-404A) PGR rinkinį (SABiosciences, A QIAGEN company). Gauti rezultatai analizuojami panaudojant RT² Profiler PCR Array Data Analysis programinę įrangą (versija 3.5, QIAGEN). „+“ atspindi geno ekspresijos padidėjimą diferencijuojančiose SHED ląstelėse lyginant su nediferencijuotomis daugiau, kaip 2 kartus; „+ +“ - >10 kartų; „+ + +“ - > 100 kartų.

Iš viso įvertinome 168 genų ekspresijos pokyčius nediferencijuotose ir diferencijuotose SHED ląstelėse. Nustatėme, kad 110 genų raiška pakito daugiau nei du kartus: 90 buvo padidėjusi, 20 – sumažėjusi. Be to, iš jų, 41 geno raiška padidėjo, o 4 sumažėjo daugiau nei 10 kartų.

Visualization of $\log_2(\text{Fold Change})$ (PAHS-404)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ACHE 32.85 OKAY	ADORA1 1.53 OKAY	ADORA2A 11.04 OKAY	ALK 1.18 OKAY	APBB1 2.90 OKAY	APOE 2905.25 OKAY	ARNT2 -2.71 OKAY	ARTN 1.43 OKAY	ASCL1 1.35 B	BAI1 8.80 A	BDNF 1.48 OKAY	BMP15 1.49 C
B	BMP2 26.44 OKAY	BMP4 2.41 OKAY	BMP8B 2.84 OKAY	CDK5R1 1.28 OKAY	CDK5RAP1 -1.31 OKAY	CDK5RAP2 1.19 OKAY	CDK5RAP3 1.63 OKAY	CHRM2 -4.05 OKAY	CXCL1 71.56 OKAY	DLG4 3.86 OKAY	DLL1 129.29 OKAY	DRD1 1.99 B
C	DRD2 54.99 A	DVL3 1.81 OKAY	EFNB1 5.93 OKAY	EGF -3.42 A	EP300 1.96 OKAY	ERBB2 1.02 OKAY	FEZ1 2.57 OKAY	FGF13 2.20 OKAY	FGF2 -1.93 OKAY	FLNA -4.59 OKAY	GDNF 1.85 OKAY	GNAO1 26.25 A
D	GPI 1.77 OKAY	GRIN1 -2.12 B	HDAC4 28.40 OKAY	HDAC7 1.16 OKAY	HES1 23.61 OKAY	HEY1 33.54 OKAY	HEY2 26.56 A	HEYL -1.20 OKAY	IL3 4.16 B	INHBA 6.69 OKAY	MDK 29.74 OKAY	MEF2C 3.93 OKAY
E	MLL 1.92 OKAY	NCOA6 2.20 OKAY	NDN 2.99 OKAY	NDP 1.15 OKAY	NEUROD1 2.54 B	NOG -82.65 A	NOTCH2 3.74 OKAY	NPTX1 -110.32 OKAY	NRCAM 5.15 OKAY	NRG1 1.68 OKAY	NRP1 -2.08 OKAY	NRP2 4.44 OKAY
F	NTN1 26.68 OKAY	ODZ1 99.12 A	PFAH1B1 1.08 OKAY	PARD3 2.33 OKAY	PARD6B -7.76 OKAY	PAX3 2.02 OKAY	PAX5 4.82 B	PAX6 1.78 OKAY	POU3F3 2.35 B	POU4F1 2.48 B	PTN 26.56 OKAY	RAC1 -1.11 OKAY
G	ROBO1 2.48 OKAY	RTN4 -2.54 OKAY	S100A6 -1.35 OKAY	S100B 4.01 B	SEMA4D 65.55 OKAY	SHH 6.38 B	SLIT2 -1.18 OKAY	SOX8 4.13 A	STAT3 4.83 OKAY	TNR 3.89 B	VEGFA 18.87 OKAY	YWHAH -3.06 OKAY

19 pav. Genų ekspresijos pokyčiai SHED ląstelių nervinės diferenciacijos metu. Realus laiko PGR buvo atlikta MX3005P® (Stratagene) aparatu. Naudojome neurogenezės ir nervinių kamieninių ląstelių (Neurogenesis and Neural Stem Cell array (PAHS-404A) PGR rinkinį (SABiosciences, A QIAGEN company). Gauti rezultatai analizuojami ir genų aktyvumo žemėlapis (*heatmap*) sudarytas panaudojant RT² Profiler PCR Array Data Analysis programinę įrangą (versija 3.5, QIAGEN).

3 lentelėje pateikiame kai kurių genų ekspresijos pokyčius diferencijuojančiose SHED ląstelėse (pilnas genų sąrašas pateikiamas 19 pav. ir 20 pav.).

Diferencijuotose SHED ląstelėse reikšmingai padidėjo genų, reguliuojančių neuromediatorių sintezę ir degradaciją (tirozino hidroksilazės, 792 kartus; acetilcholinesterazės, 33 kartus) raiška. Taip pat nustatėme stiprų ALK tirozino kinazės ligandų, kuriuos sekretuoja proliferuojantys simpatiniai neuronai, genų raiškos padidėjimą (midkino, 30 kartų; pleiotrofino, 27 kartus). Diferencijuotose SHED ląstelėse labai pagausėjo transkriptų, koduojančių neuropeptidus, kurie yra svarbūs neuronų ir neuroendokrinių ląstelių sąveikai (somatostatino, 11792 kartus; somatostatino receptoriaus 2, 17 kartų; proenkefalino, 23 kartus, prolaktino, 33 kartus). Taip pat, žymiai padidėjo sekretogranino 2 raiška (27 kartus).

Transkripcijos faktorių FOS, FOSB, JUNB ir JUND ekspresija diferencijuojančiose SHED ląstelėse taip pat padidėjo (atitinkamai 1450, 998, 29 ir 6 kartus). Šie faktoriai dalyvauja formuojant kompleksą AP-1 ir yra svarbūs ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos reguliatoriai.

Diferencijuojančiose SHED ląstelėse taip pat didėja nuo cAMP priklausomų transkripcijos faktorių ATF-3, CREM ir CREB1 raiška (atitinkamai 41, 5, 3 kartus).

Taip pat nustatėme, kad nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitoriaus 2B (p15) raiška padidėjo 6 kartus. p15 baltymas veikia, kaip pagrindinis efektorius sustabdant ląstelės ciklą po poveikio TGF β (137).

Mūsų duomenys rodo, kad diferencijuojančiose SHED ląstelėse didėja BMP signalinio kelio komponentų raiška (TGF β -3, 113 kartų; BMP2, 26 kartai). Tuo tarpu Noggin, kuris jungiasi su TGF β šeimos ligandais ir veikia kaip BMP signalinio kelio inhibitorius, raiška žymiai sumažėjo (83 kartus).

Tai pat nustatėme, kad diferenciacijos metu didėja Notch signalinio kelio komponentų ekspresija (Notch 2, 4 kartus; DLL1, 129 kartus; HES1, 24 kartus; HEY1, 34 kartus; HEY2, 27 kartus).

Amfiregulino ekspresija padidėja 684 kartus. Šis augimo faktorius skatina astrocitu, Švano ir nervinių kamieninių ląstelių proliferaciją. Adenozino A2a receptoriaus geno raiška diferencijuojančiose ląstelėse padidėjo 11 kartų. Šis receptorius dalyvauja aktyvuojant adenilil ciklazę, padidina viduląstelinio cAMP kiekį ir yra gausiai ekspresuojamas bazaliniuose ganglijuose (138).

Dopamino receptorių 2 koduojančio geno ekspresija padidėjo 55 kartus. NR4A2 geno (taip pat žinomo, kaip Nurr1) ekspresija padidėjo 174 kartus. Nurr1 transkripcijos faktorius yra svarbus dopaminerginių neuronų diferenciacijos reguliatorius (139).

Apolipoproteino E raiška diferencijuojančiose SHED padidėjo net 2905 kartus. Šis baltymas yra susijęs su astrocistine glija centrinėje nervų sistemoje ir nemielinizuojančia glija periferinėje nervų sistemoje. Apolipoproteinas E yra svarbus reguliuojant nervinio audinio atsaką į pažeidimą (140).

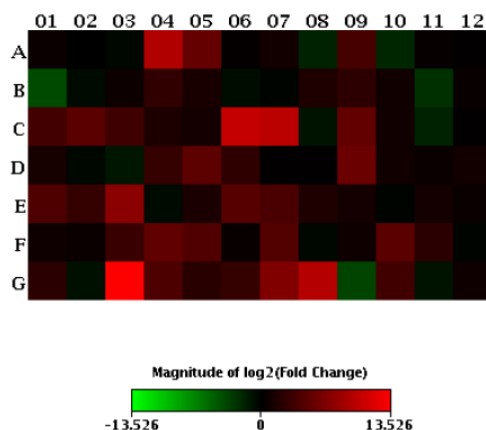
Diferencijuotose SHED ląstelėse sumažėjo neuronų pentraksino 1 (NPTX1) geno ekspresija (110 kartų). Šis genas yra svarbus neuronų mitochondrinio transporto ir apoptozės reguliatorius.

ODZ1 geno (taip pat žinomo, kaip teneurinas 1) raiška stipriai padidėjo (99 kartus). Teneurinai tai transmembraniniai baltymai, kurie yra aksonų augimo koordinavimui, taikinio atpažinimui ir sinaptogenezei svarbūs veiksniai (141). Netrinas 1 yra kitas aksonų augimui bei neuronų migracijai svarbus veiksnys, jo raiška diferencijuojančiose SHED padidėjo 27 kartus.

Taip pat nustatėme, kad padidėjo geno, koduojančio MAF transkripcijos faktorių raiška (51 kartas). Šis transkripcijos faktorius yra svarbus mechanosensorinių neuronų reguliatorius (142).

Mūsų duomenys rodo, kad diferencijuojančiose SHED ląstelėse ženkliai padidėja transkripcijos faktorių Krox24 ir Krox20 raiška (atitinkamai 28 kartai ir 9 kartai). Šie genai yra pagrindiniai mielinizuojančių ir nemielinizuojančių Švano ląstelių diferenciacijos reguliatoriai.

Visualization of log₂(Fold Change) (PAHS-066)



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADRB1 1.42	AHR -1.02	AMD1 -1.27	AREG 684.49	ATF3 40.94	BCL2 1.20	BDNF 1.87	BRCA1 -3.46	CALB1 13.32	CALB2 -3.93	CALM1 1.25	CALR 1.10
	B	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B	OKAY	OKAY	OKAY
B	CCNA1 -15.47	CCND1 -1.40	CDK5 1.56	CDKN2B 5.89	CGA 2.47	CHGA -1.52	CNN1 -1.17	CREB1 3.12	CREM 5.08	CTF1 1.78	CYR61 -5.67	DDIT3 1.32
	A	OKAY	OKAY	OKAY	B	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
C	DUSP1 11.07	EGR1 27.97	EGR2 9.42	ENO2 2.72	FGF6 2.07	FOS 1450.39	FOSB 997.53	GCG -1.90	GEM 37.76	GIPR 1.75	HK2 -3.45	HSPA4 1.08
	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
D	HSPA5 2.31	IL2 -1.27	IL6 -2.21	INHBA 6.61	JUNB 29.09	JUND 5.60	KCNA5 1.08	LDHA 1.12	MAF 50.88	MIF 1.77	NCAM1 1.40	NF1 1.91
	OKAY	B	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY
E	NOS2 18.24	NPY 6.68	NR4A2 173.51	PCK2 -1.47	PCNA 2.63	PENK 23.03	PER1 15.20	PLAT 3.02	PLN 2.11	PMAIP1 -1.12	POU1F1 2.13	POU2AF1 1.49
	OKAY	A	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B	B
F	PPP1R15A 1.65	PPP2CA 1.41	PRKAR1A 7.70	PRL 33.41	PTGS2 18.79	RB1 1.35	S100A12 19.91	S100A6 -1.22	S100G 1.73	SCG2 27.14	SGK1 4.82	SLC18A1 -1.14
	OKAY	OKAY	OKAY	A	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	B
G	SOD2 4.60	SRF -1.85	SST 11792.28	SSTR2 16.86	STAT3 4.41	TACR1 6.68	TGFB3 112.90	TH 791.74	THBS1 -12.14	TNF 10.62	VCL -1.90	VIP 1.70
	OKAY	OKAY	A	OKAY	OKAY	OKAY	OKAY	A	OKAY	OKAY	OKAY	B

20pav. Genų ekspresijos pokyčiai SHED ląstelių nervinės diferenciacijos metu. Realaus laiko PGR buvo atlikta MX3005P® (Stratagene) aparatu. Naudojome žmogaus cAMP/Ca²⁺ signalinių kelių (Human cAMP/Ca²⁺ PathwayFinder array (PAHS-066A) rinkinį (SABiosciences, A QIAGEN company). Gauti rezultatai analizuojami ir genų aktyvumo žemėlapis (*heatmap*) sudarytas panaudojant RT² Profiler PCR Array Data Analysis programinę įrangą (versija 3.5, QIAGEN).

Apibendrinus genų ekspresijos tyrimų duomenis diferencijuojančiose SHED ląstelėse išryškėjo šios pagrindinės tendencijos:

1. Didėja genų, reguliuojančių neuromediatorių sintezę ir degradaciją (tirozino hidroksilazė, acetilcholinesterazė) raiška.
2. Aktyvuojami BMP (TGF β-3 ir BMP2, Noggin raiška slopinama) ir Notch (Notch 2, DLL1, HES1, HEY1, HEY2) signaliniai keliai.

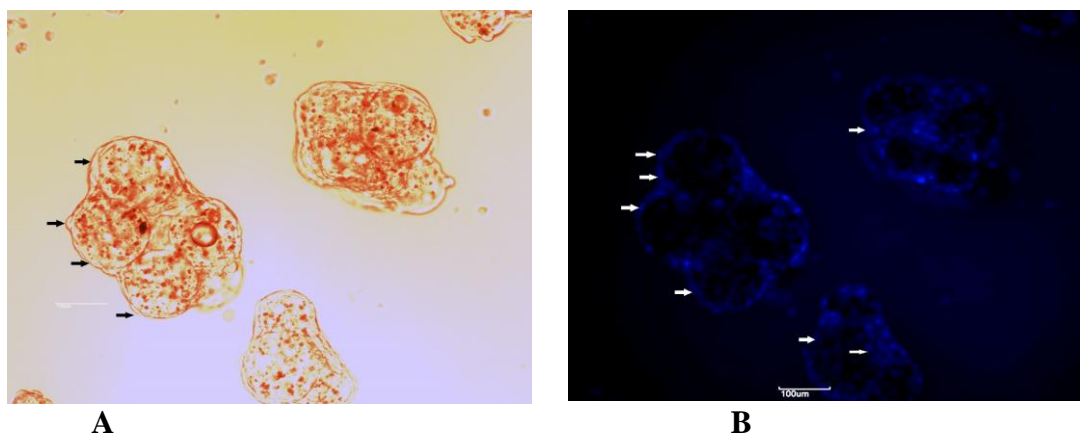
3. Indukuojami genai, kurių aktyvumas yra būdingas dopaminerginiams (Dopamino receptorius 2, Nurr1, tirozino hidroksilazė) bei simpatiniams (midkinas, pleiotrofinas) ir sensoriniams (MAF) neuronams.
4. Indukuojami genai, kurių aktyvumas yra būdingas periferinės nervų sistemos mielinizuojančioms ir nemielinizuojančioms glijos ląstelėms (apolipoproteinas E, Krox24, Krox20).

Taigi, mes sukūrėme ir išbandėme naują pakopinį SHED ląstelių nervinės diferenciacijos protokolą. Mūsų duomenys rodo, kad panaudojus šį protokolą SHED ląstelės diferencijuoja neuronų ir glijos kryptimis, t.y. formuojasi mišrios ląstelių kultūros sudarytos iš neuronų ir glijos elementų. Todėl ateityje šis *in vitro* eksperimentinis modelis galės būti taikomas detaliems neuronų ir glijos specializacijos bei sąveikos tyrimams. Kompleksiniai genų ekspresijos tyrimai taip pat atskleidė naujų ir įdomių dėsningumų. Nustatėme, kad diferencijuojančiose SHED ląstelėse yra aktyvuojami BMP ir Notch signaliniai keliai. Tai atveria naujas galimybes tiriant šių signalinių kelių svarbą neuronų ir glijos diferenciacijos procesui.

4.2. SHED kultivavimas bioreaktoriuje

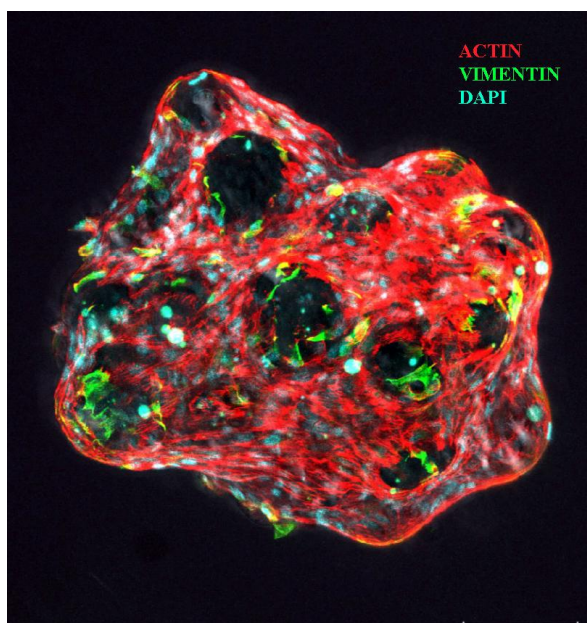
SHED ląsteles kultivavome dvejopai – įprastiniu būdu (kultivavimo induose) ir panaudodami turimą bioreaktorių Biolevitator (Hamilton) bei mikronešiklius. Naudojant pastarąją technologiją labai padidėja paviršiaus, prie kurio gali jungtis adhezinės ląstelės, plotas. Todėl, tame pačiame maitinimo terpės tūryje galima kultivuoti net iki 100 kartų daugiau ląstelių. Tai leidžia surinkti santykinai didesnius ląstelių produkuojamų veikliųjų medžiagų kiekius. Kitas labai svarbus privalumas – ląstelės auginamos trimatėje aplinkoje, kuri geriau imituoja fiziologines sąlygas.

Nustatėme, kad SHED ląstelės pakankamai gerai kimba su laminino sluoksniu padengtais mikronešikliais. Per pirmą kultivavimo bioreaktoriuje savaitę ląstelės intensyviai proliferuoja ir visiškai padengia mikronešiklių paviršių.



21 pav. SHED ląstelių kultivavimas bioreaktoriuje ant mikronešiklių. SHED ląstelės buvo kultivuojamos ant lamininiu dengtų mikronešiklių (Global Cell Solutions), panaudojant bioreaktorių Biolevitator (Hamilton), terpėje be serumo MSC Nutristem XF Medium (Biological Industries). A – šviesinė mikroskopija, fazės kontrastas, originalus padidinimas x400; B – tas pats regėjimo laukas panaudojant fluorescencinę mikroskopiją, ląstelių DNR dažyta Hoechst 33342 (sužadainimas – 350 nm, emisija – 460 nm), originalus padidinimas x400. Rodyklės rodo į kai kurias ląsteles ir jų branduolius.

Tęsiant kultivavimą, mikronešikliai pradeda formuoti ląstelėmis padengtus mikroagregatus (21 pav.). Mūsų skaičiavimais, ant vieno mikronešiklio maksimaliai „telpa“ apie 130 ląstelių. Tokiu būdu, jeigu 50 μ l suspensijos yra 10 mikronešiklių, tai 30 ml ląstelių suspensijos yra apie 8 milijonai ląstelių.



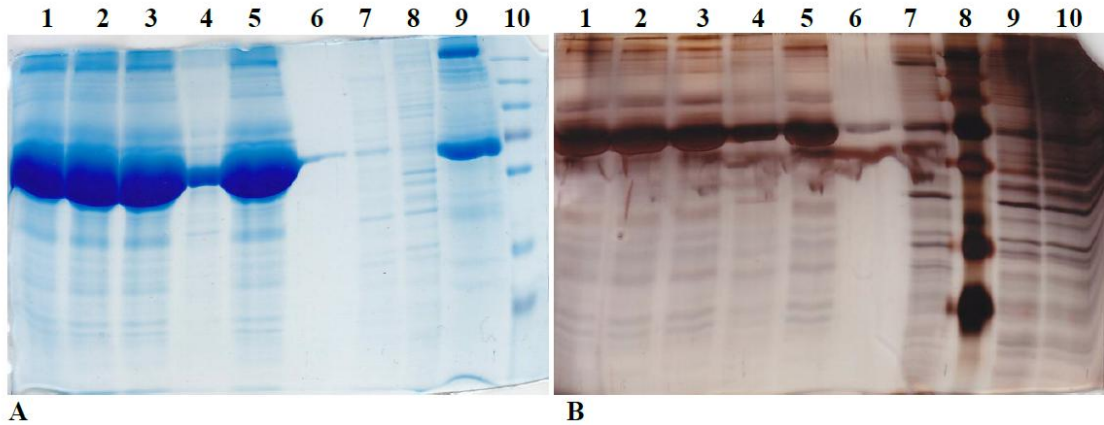
22 pav. SHED ant mikronešiklių. Konfokalinė mikroskopija. Aktinas dažytas faloidinu, konjuguotu su Alexa Fluor® 594 (raudona). Vimentino raiška nustatyta panaudojus monokloninį antikūną prieš vimentino baltymą ir vizualizuota su antriniais antikūnais, konjuguotais su Alexa Fluor® 488 (žalia). Taip pat dažyti ląstelių branduoliai (žydra, dažyta su DAPI).

Įdomu, kad ląstelės ant mikronešiklių agregatų pradėjo formuoti daugybinius sluoksnius (angl. *multilayers*). Taip pat nustatėme vimentino ekspresijos sumažėjimą ant mikronešiklių augintose ląstelėse (22 pav.). Vimentinas yra mezenchiminių ląstelių žymuo, paprastai šis baltymas gausiai ir homogeniškai ekspresuojamas įprastiniu būdu kultivuojamose SHED kultūrose. Todėl manome, kad vimentino ekspresijos sumažėjimas SHED ląstelėse, augintose ant mikrosferų, gali atspindėti ląstelių fiziologijos pasikeitimus. Įdomu, kad, literatūros duomenimis, „mezenchiminio-epitelinio perėjimo“ (angl. *mesenchymal to epithelial transition*) metu vimentino ekspresija mažėja (142).

Mes taip pat tyrėme, kaip kultivavimas ant mikronešiklių įtakoja SHED ląstelių sekretomo sudėtį, šiuo tikslu buvo atlikti proteominiai tyrimai (žr. žemiau).

4.3. Diferencinio centrifugavimo metu gautų frakcijų tyrimai

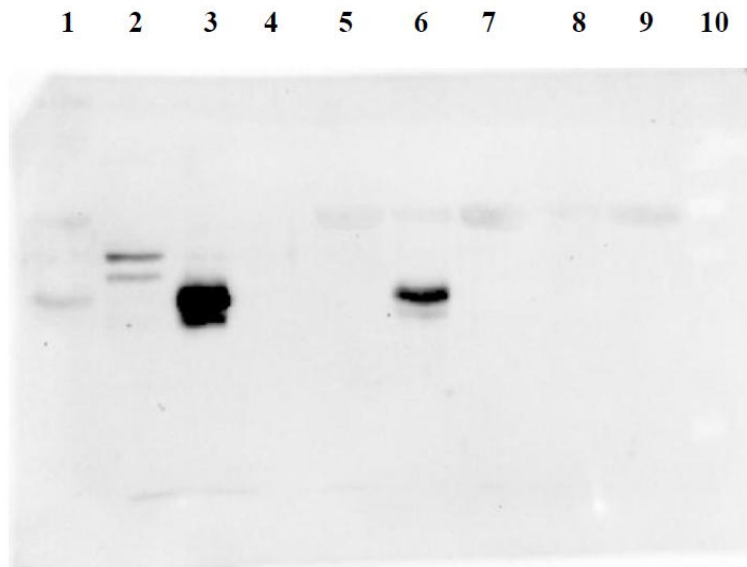
Toliau tyrėme, kaip kinta SHED sekretomo komponentų sudėtis skirtingose frakcijose, gautose panaudojant diferencinį centrifugavimą. Šiuo tikslu palyginome skirtingų frakcijų baltymų sąstatą (23 pav., A, B). Mūsų duomenys rodo, kad yra akivaizdūs skirtumai tarp ekstravezikulinės (supernatantai po 300 g, 2000 g, 20 000 g ir 100 000 g) ir vezikulinės (mikrovezikulių nuosėdos po 20 000 g ir egzosomų nuosėdos po 100 000 g) frakcijų. Paraleliai su supernatantų frakcijomis analizavome ir jas produkavusių ląstelių lizatus. Mūsų rezultatai rodo, kad naudojama diferencinio centrifugavimo metodika padeda efektyviai atskirti ekstravezikulines ir vezikulines supernatanto frakcijas.



23 pav. Baltymų sąstato palyginimas skirtingose frakcijose, gautose panaudojant diferencinį centrifugavimą. Baltymai išskirti iš skirtingų diferencinio centrifugavimo metu gautų supernatanto frakcijų, taip pat iš ląstelių lizatų buvo frakcionuoti elektroforetiškai 10% poliakrilamidiniuose geliuose (SDS/PAGE) ir dažyti su koloidiniu *Coomassie Blue* dažu (*PageBlue*, Thermo Fisher Scientific) (A) arba sidabru (*PageSilver*, Thermo Fisher Scientific) (B) pagal gamintojų nurodymus. Mėginių leidimo tvarka A: Supernatantai po 300 g – 1; 2000 g – 2; 20000 g – 3; pirmo 100 000 g centrifugavimo – 5; antro 100 000 g centrifugavimo – 6; 4 – nuosėdų frakcija po 20 000 g (mikrovezikulės); 7 – nuosėdų frakcija po 100 000 g (egzosomos); 8 – MKL ląstelių lizatas; 9 – egzosomų frakcija, išskirta panaudojus Total exosome isolation reagent iš Life Technologies. 10 – molekulinės masės standartas. B: Supernatantai po 300 g – 1; 2000 g – 2; 20 000 g – 3; pirmo 100 000 g centrifugavimo – 5; antro 100 000 g centrifugavimo – 6; 4 – nuosėdų frakcija po 20 000 g (mikrovezikulės); 7 – nuosėdų frakcija po 100 000 g (egzosomos); 8 – molekulinės masės standartas. 9 ir 10 – MKL ląstelių lizatai.

Savo eksperimentams taip pat naudojome komercinį egzosomų išskyrimo rinkinį. Mūsų rezultatai (23 pav., A, 9 takelis) rodo, kad naudojant šį rinkinį išskirtose egzosomų frakcijose, buvo likę daug supernatanto frakcijai būdingų baltymų (ypač 60 kDa srityje, atitinkančioje serumo albumino molekulinį svorį), todėl toliau eksperimentams naudojome tik diferencinio centrifugavimo metodą.

Siekdami patvirtinti, kad išskyrėme specifiskas egzosomų frakcijas tyrėme egzosomoms būdingų žymenų ekspresiją. Savo tyrimams, kaip žymenį pasirinkome MFG-E8 baltymą, kuris pagal literatūros duomenis specifiskai kaupiasi egzosomose (143).



24 pav. Specifinių egzosomų žymenų identifikavimas skirtingose frakcijose, gautose panaudojant diferencinį centrifugavimą. Baltymai, išskirti iš skirtingų diferencinio centrifugavimo metu gautų supernatanto frakcijų, taip pat iš ląstelių lizatų, buvo frakcionuoti elektroforetiškai 10% poliakrilamidiniuose geliuose (SDS/PAGE) ir pernešti ant PVDF membranos. Monokloninis pelės antikūnas prieš MFG-E8 pirktas iš Santa Cruz Bioethnologies (sc-271574). 1 – egzosomų frakcija, išskirta panaudojus *Total exosome isolation reagent* iš Life Technologies reagentą; 2 – MKL ląstelių lizatas; 3 – egzosomų frakcija; 4 – supernatantas po antro 100 000 g centrifugavimo; 5 – supernatantas po pirmo 100 000 g centrifugavimo; 6 – nuosėdos po 20 000 g (mikrovezikulių frakcija); 7 – supernatantas po 20 000 g centrifugavimo; 8 – supernatantas po 2000 g centrifugavimo; 9 – supernatantas po 300 g centrifugavimo; 10 – molekulinės masės standartas.

Mūsų duomenys rodo, kad MFG-E8 baltymas kaupiasi egzosomų frakcijoje (24 pav.). Įdomu, kad mikrovezikulių frakcijoje taip pat identifikavome nedidelius MFG-E8 baltymo kiekus.

4.4. Baltymų identifikavimas egzosomose bei ekstravezikulinėje SHED frakcijoje

Taip pat vykdėme proteominius egzosomų ir supernatantų ekstravezikulinės frakcijos (diferencinis centrifugavimas nr. 3) tyrimus. Mūsų žiniomis SHED ląstelių egzosomų tyrimai iki šiol nebuvo atlikti. Šiam tikslui panaudojome supernatantus surinktus nuo ląstelių, kurios buvo augintos

standartinėmis sąlygomis ir bioreaktoriuje. Abiem atvejais naudojome tokią pačią terpę be serumo (MSC Nutristem XF Medium, Biological Industries). Tirdami egzosomas, išskirtas iš standartinėmis sąlygomis kultivuotų SHED, iš viso identifikavome 80 baltymų (žr. Priedas Nr. 2). Tuo tarpu, egzosomose, kurios buvo išskirtos iš supernatantų surinktų nuo bioreaktoriuose augintų ląstelių pavyko identifikuoti 60 baltymų (žr. Priedas Nr. 3). Įdomu, kad tik 28 identifikuoti baltymai buvo vienodi abiejose tyrimų grupėse. Šis rezultatas rodo, kad kultivavimas bioreaktoriuje ant mikrosferų gali ženkliai įtakoti SHED produkuojamų egzosomų sudėtį.

MFG-E8 baltymą taip pat identifikavome abiejų tyrimų grupių egzosomose. Šis rezultatas buvo validuotas atlikus imunoblotingo eksperimentus (24 pav.). Mes taip pat nustatėme, kad didžioji dalis mūsų identifikuotų baltymų taip pat yra publikuojami vesiclepedia duomenų bazėje (<http://microvesicles.org/index.html>). Identifikuotus baltymus pagal jų funkciją ląstelėje galima suskirstyti į kelias grupes.

Citoskeleto baltymai. Tai visų pirma aktinas, įvairių tipų keratinai (KRT1, KRT2, KRT5, KRT9, KRT10, KRT14, KRT6A). Žinoma, kad įvairių tipų keratinai dažnai identifikuojami egzosomose ir tai nėra išorinės kontaminacijos padarinys. Mes taip pat identifikavome miristoilintą alaninu praturtintą C kinazės substratą (Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS). Šio baltymo mes neaptikome vesiclepedia duomenų bazėje. Svarbu, kad MARCKS baltymą pavyko identifikuoti abiejose tyrimo grupėse, taip pat, šio baltymo identifikacijos patikimumo lygis buvo aukštas. MARCKS baltymas yra baltymų kinazės C substratas, jis taip pat jungiasi su kalmodulinu, aktinu ir sinapsinu, taip pat suriša polimerizuoto aktino skaidulas (144).

Baltymai, dalyvaujantys signalo perdavime. Aneksinų šeimos baltymai (A1, A2, A5, A6). Tai nuo kalcio priklausomi, fosfolipidus jungiantys baltymai, pasižymi fosfolipazės A2 inhibavimu, priešuždegiminiu veikimu. Aneksinai taip pat yra svarbūs endocitozės ir egzocitozės reguliatoriai (145). Kitas baltymas, kurio identifikacijos patikimumo lygis buvo aukštas abiejose

eksperimentinėse grupėse buvo *Brain acid soluble protein 1* (BASP1). Tai multifunkcinis baltymas asocijuotas su plazminės membranos lipidų salomis (angl. *lipid rafts*), taip pat dalyvauja kalcio/kalmodulino signalo perdavime. Neseniai parodyta, kad šis baltymas taip pat gali veikti kaip kai kurių protoonkogenų korepresorius (146). Su neuroblastų diferenciacija susijusį baltymą (angl. *neuroblast differentiation-associated protein*) identifikavome tik standartinėmis sąlygomis augintų ląstelių egzosomose. Šis baltymas yra svarbus judrumo reguliatorius, taip pat veikia kaip karkasas (angl. *scaffold*) makromolekuliniams kompleksams tarp baltymų kinazės C (PKC), fosfolipazės C ir ERK kinazių. Kalmodulinas – universalus kalcio signalinio kelio reguliatorius, buvo identifiкуotas abiejose eksperimentinėse grupėse. Taip pat identifikavome baltymą dermicidiną, kuris gali būti svarbus toliau tiriant galimą terapinį SHED egzosomų panaudojimą. Dermicidinas yra sekretuojamas baltymas, pasižymintis antibakterinėmis ir neuroprotekcinėmis savybėmis (147). Ateityje ketiname patvirtinti dermicidino buvimą egzosomose panaudoję imunoblotingo metodą.

Baltymai, dalyvaujantys metabolizmo reguliacijoje. Triozofosfatizomerazė, gliceraldehidfosfatdehidrogenazė, piruvato kinazės izoenzimai M1/M2. Įdomu, kad šiuos metabolinius fermentus pavyko identifiкуoti tik standartinėmis sąlygomis augintų ląstelių egzosomose.

Molekuliniai šaperonai. HSPA2 (standartinės sąlygos), HSPA4 (bioreaktorius).

Kiti „įdomūs“ baltymai. LINE-1 transpozazės domeną turintis baltymas-1 (*LINE-1 type transposase domain-containing protein 1*). Tai RNR jungiantis baltymas, kuris siejamas su kamieninių ląstelių pliuripotentiškumo palaikymu (148). Galimybė, kad egzosomos galėtų pernešti šį baltymą į ląsteles-taikinius yra intriguojanti, tačiau prieš pradėdant tyrinėti šį fenomeną plačiau reikia patvirtinti proteominių tyrimų rezultatus kitais metodais (visų pirma imunoblotingas). CD44 aptikome abiejose eksperimentinėse grupėse, tai hialuronano receptorių, kuris gali būti svarbus egzosomų sąveikai su kitomis

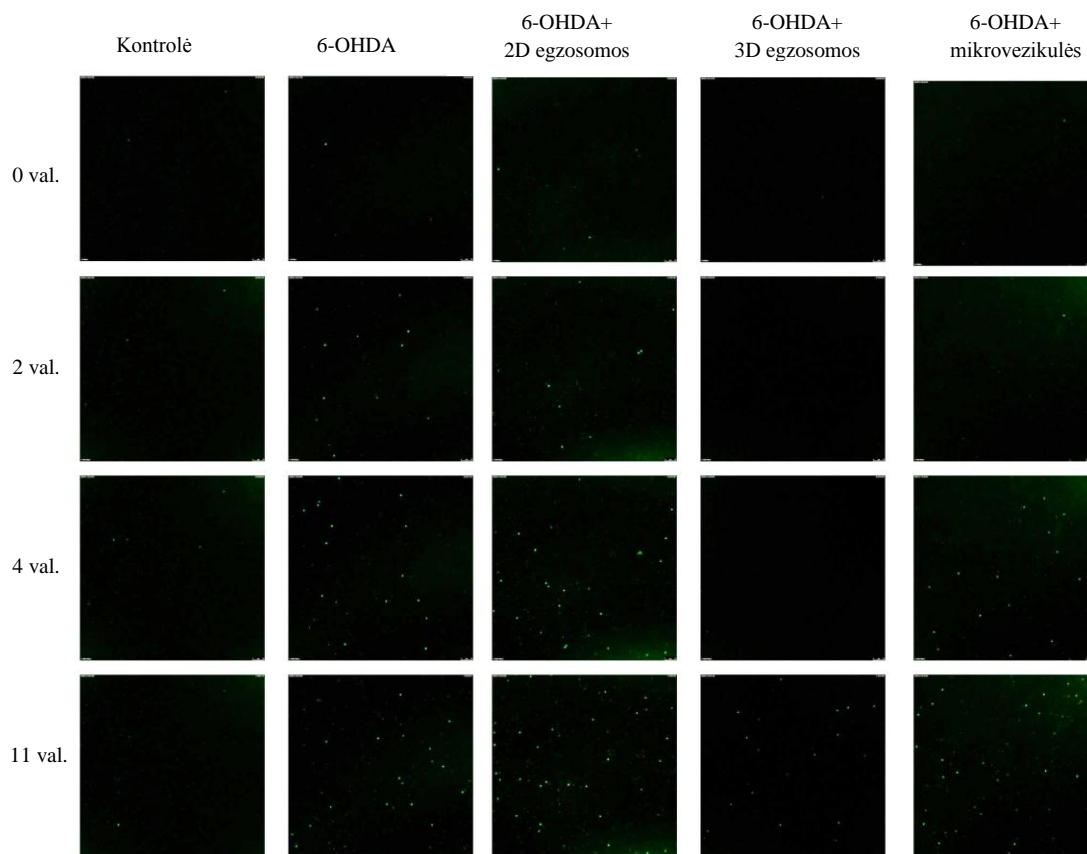
ląstelėmis ar tarpląsteliniu užpildu. CD44 taip pat yra įtrauktas į vesiclepedia duomenų bazę.

Mes taip pat vykdėme abiejų tiriamųjų grupių supernatantų ekstravezikulinės frakcijos (diferencinis centrifugavimas nr.3) tyrimus (žr. Priedai Nr. 4 ir Nr. 5). Standartinėmis sąlygomis kultivuotų ląstelių supernatantuose identifikavome 19 baltymų, iš kurių 8 identifikacijos patikimumo lygis buvo gana aukštas. Bioreaktoriuose kultivuotų ląstelių supernatantuose identifikavome 24 baltymus (5 aukšto patikimumo). Pažymėtina, kad abiejose grupėse tarp su aukštu patikimumu identifikuotų baltymų didžiąją dalį sudarė „standartiniai“ terpės komponentai (serumo albuminas, haptoglobinas, serotransferinas, fibronektinas, transhiretinas). Šie duomenys rodo, kad terpės komponentai galimai „maskuoja“ minorinius MKL sekretomo baltymus.

4.5. SHED sekretuojamų egzosomų poveikis 6-OHDA sukeltai žmogaus dopaminerginių neuronų apoptozei

Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad dantų pulpos MKL pasižymi neuroprotekcinėmis savybėmis. Tačiau dabartiniu metu nėra žinoma, kokie parakrininiai veiksniai lėmė aprašytus terapinius efektus, taip pat nebuvo nustatyta vezikulinių sekretomo komponentų svarba šiuose procesuose. Todėl mes tyrėme, kaip SHED ląstelių egzosomos ir mikrovezikulės įtakoja 6-OHDA indukuotos apoptozės procesą žmogaus dopaminerginiuose neuronuose. SHED ląstelės buvo kultivuojamos dvejopai – įprastiniu būdu (kultivavimo induose) bei panaudojant bioreaktorių Biolevitator (Hamilton) ir mikronešiklius. Abiem atvejais buvo naudojama komercinė terpė be serumo komponentų MSC Nutristem XF Medium (Biological Industries). 6-OHDA indukuojama apoptozė buvo monitoruojama realiaame laike, panaudojant aktyvuotą kaspazių 3 ir 7 fluorogeninį substratą.

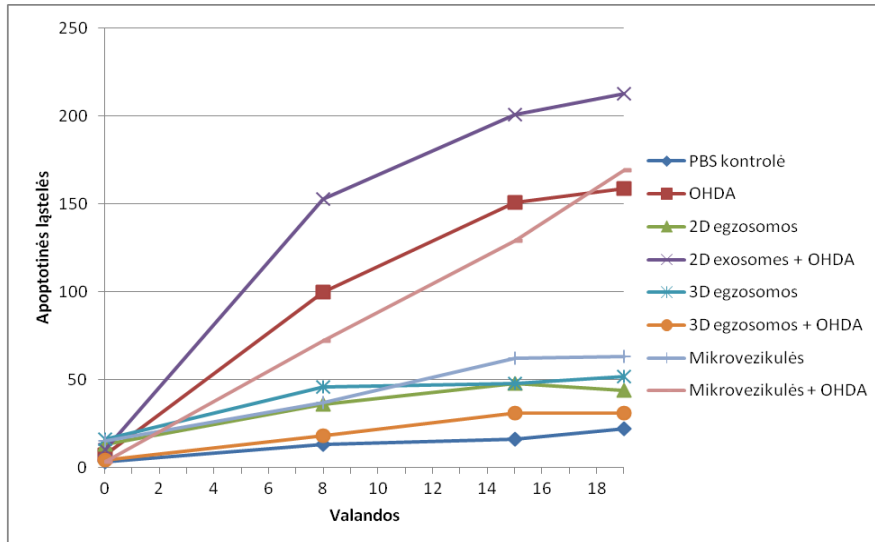
Nustatėme, kad 6-OHDA greitai ir efektyviai indukuoja apoptozę dopaminerginiuose neuronuose (25 pav., video priedas Nr. 6). Apoptuojančių



25. pav. 6-OHDA ir egzosomų bei mikrovezikulių poveikis dopaminerginiams neuronams. Apoptuojančių ląstelių kiekis kultūrose pradėjus dokumentuoti ir praėjus 2, 4 ir 11 val. Ląstelės veiktos: PBS (kontrolė), vien tik 6-OHDA, 6-OHDA kartu su egzosomomis iš standartinėmis sąlygomis auginamų SHED (6-OHDA + 2D egzosomos), egzosomomis iš trimatėje aplinkoje auginamų SHED (6-OHDA + 3D egzosomos) ir mikrovezikulėmis (6-OHDA+mikrovezikulės). Apoptotinės ląstelės šviečia žaliai.

ląstelių skaičius augo per visą stebėjimo laikotarpį (25 pav. ir 26 pav.). Registravome apoptuojančių ląstelių skaičiaus padvigubėjimą kas keturias valandas. Įdomu, kad egzosomos, išskirtos iš SHED ląstelių, kultivuotų tradiciniu būdu, ženkliai paskatino neuronų apoptozę (25 pav., 26 pav., video priedas Nr. 7). Šiomis sąlygomis, apoptuojančių ląstelių skaičius buvo apie 50% didesnis, nei kultūrose, veiktose su vienu 6-OHDA (26 pav.). Nepaisant to, abiem atvejais stebėjome panašią apoptotinio atsako dinamiką. Tuo tarpu, vienos egzosomos (be 6-OHDA) neturėjo ženklesnio poveikio neuronų apoptozei (26 pav). Todėl manome, kad egzosomos, išskirtos iš SHED ląstelių kultivuotų tradiciniu būdu, galėtų veikti kaip savotiški neuronų sensibilizatoriai, padidinantys jų jautrumą 6-OHDA. Mes toliau tyrėme, kaip 6-OHDA indukuojamos apoptozės procesą veikia mikrovezikulės, kurios buvo

išskirtos iš SHED ląstelių augintų bioreaktoriuje, ant lamininu dengtų mikronešiklių (25 pav., 26 pav., video priedas Nr. 8). Nustatėme, kad mikrovezikulės labai nežymiai slopino 6-OHDA indukuotos apoptozės procesą pradinėse stadijose, tačiau vėliau, 17-18 val., apoptuojančių ląstelių skaičius susilygino su vien tik 6-OHDA veiktomis neuronų kultūromis.



26 pav. Skirtingai veiktų dopaminerginių neuronų apoptozė laike. Diferencijavusios ReNcell ląstelės 2 val. buvo veiktos 100 μ M 6-OHDA, tuomet terpė buvo nusiurbta ir užpilta šviežia terpė su PBS (kontrolė), egzosomomis iš įprastomis sąlygomis kultivuotų SHED (2D egzosomos + OHDA), egzosomomis iš ant lamininu dengtų mikronešiklių kultivuotų SHED (3D egzosomos + OHDA) arba mikrovezikulėmis. Atitinkamos mikrovezikulinės frakcijos užpiltos ant 6-OHDA neveiktų ląstelių. Ląstelių apoptozė buvo vizualizuojama panaudojant ląstelių apoptozės detekcijos reagentą CellEvent™ Caspase-3/7 green (plačiau skyrelyje „Metodai“). Apoptotinės ląstelės buvo skaičiuojamos kaip atskiri taškai, panaudojant ImageMaster 2D Platinum 7.0 programinę įrangą. Dokumentavimo trukmė – 20val., kadrus fiksuojant kas 10 min.

Vienos mikrovezikulės neturėjo žymesnės įtakos ląstelių apoptozei. Tuo tarpu egzosomų frakcijos, išskirtos iš tų pačių supernatantų (SHED ląstelės augintos bioreaktoriuje, ant lamininu dengtų mikronešiklių) dramatiškai sumažino apotuojančių ląstelių skaičių 6-OHDA veiktose dopaminerginių neuronų kultūrose (25 pav., 26 pav., video priedas Nr. 9). Apoptuojančių ląstelių skaičius buvo mažesnis apie 80% nei vien tik 6-OHDA veiktų neuronų kultūrose ir buvo maždaug tokiam pat lygyje, kaip kontrolinėse kultūrose (PBS, vien tik egzosomos, ar mikrovezikulės).

Šie duomenys rodo, kad egzosomos, išskirtos iš SHED ląstelių, augintų bioreaktoriuje ant lamininu dengtų mikronešiklių, slopina 6-OHDA indukuojamą žmogaus dopaminerginių neuronų apoptozę.

Mūsų rezultatai turi potencialiai didelę taikomąją reikšmę. SHED sekretuojamų egzosomų panaudojimas galėtų tapti vertinga alternatyva įprastiems transplantacijos metodams. Pagrindinis privalumas yra saugumas, kadangi, naudojant egzosomas, išvengiama su tiesiogine ląstelių transplantacija susijusių problemų (piktybinės transformacijos, vėžį skatinančių poveikių, ląstelių diferenciacijos nepageidaujama kryptimi, gausaus transplantuotų ląstelių praradimo ir kt.). Be to, skirtingai nei ląstelės, egzosomos yra paprastesnės sistemos, todėl jomis lengviau manipuliuoti bei pritaikyti plataus masto klinikiniam panaudojimui. Naujos neurodegeneracinių sutrikimų gydymo strategijos paprastai susiduria su selektyvaus hematoencefalinio barjero praeinamumo problema. Šiuo aspektu, kaip terapinio poveikio priemonė, egzosomos turi didelį privalumą, kadangi jos lengvai pereina hematoencefalinį barjerą (149). Panaudojus genų inžinerijos metodus, galima taip sukonstruoti egzosomas, kad jos patektų tik į neuronus ar net į specifines neuronų populiacijas (149). Šie metodai ateityje padėtų išvengti neurochirurginių intervencijų, leistų panaudoti egzosomas, kaip intraveninius, ar netgi geriamus vaistinius preparatus.

Mes pateikiame naujus duomenis, kurie rodo, kad SHED ląstelių egzosomos pasižymi neuroprotekcinėmis savybėmis. Mūsų rezultatai potencialiai gali būti panaudoti naujų terapinių strategijų skirtų Parkinsono ligos gydymui kūrimui.

5. IŠVADOS

1. Žmogaus pieninio danties pulpos kamieninės ląstelės (SHED) pasižymi nervinių ląstelių pirmtakams būdingomis savybėmis (nestino ir β III tubulino genų bei nestino baltymo ekspresija).
2. Imunocitocheminiai ir genų ekspresijos tyrimai patvirtina, kad naudojant mūsų sukurtą naują pakopinį SHED nervinės diferenciacijos protokolą formuojasi mišrios ląstelių kultūros sudarytos iš neuronų ir glijos elementų.
3. Tirdami egzosomas, išskirtas iš įprastomis sąlygomis kultivuotų SHED, iš viso identifikavome 80 baltymų, tuo tarpu, egzosomose, kurios buvo išskirtos iš supernatantų, surinktų nuo bioreaktoriuose augintų ląstelių, identifikavome 60 baltymų. Abiejose tyrimų grupėse buvo identifikuoti tik 28 vienodi baltymai. Šie duomenys rodo, kad kultivavimo aplinka įtakoja SHED sekretuojamų egzosomų proteomą.
4. Standartiniu būdu augintų SHED sekretuojamos egzosomos didina žmogaus dopaminerginių neuronų jautrumą 6-hidroksidopaminui (6-OHDA).
5. Bioreaktoriuje ant lamininu dengtų mikronešiklių augintų SHED sekretuojamos egzosomos (bet ne mikrovezikulės) slopina 6-OHDA indukuotą žmogaus dopaminerginių neuronų žūtį.

6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

A. Jarmalavičiūtė, V. Tunaitis, E. Strainienė, R. Aldonytė, A. Ramanavičius, A. Venalis, K.E. Magnusson, A. Pivoriūnas. A New Experimental Model for Neuronal and Glial Differentiation Using Stem Cells Derived from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Journal of Molecular Neuroscience* (2013) 51:307–317.

A. Jarmalavičiūtė, V. Tunaitis, U. Pivoraitė, A. Venalis, A. Pivoriūnas. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy*. Priimta spaudai.

7. PUBLIKACIJŲ NE DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

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

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

A. Kaselis, K. Dapšys, **A. Jarmalavičiūtė**, O. Rukšėnas, V. Mačiulis. N400 atsako priklausomybės nuo amžiaus analizė. *Laboratorinė medicina*. 2009, t. 11, nr. 3, p. 129-134.

8. KONFERENCIJOS

A. Pivoriūnas, **A. Jarmalavičiūtė**, V. Tunaitis, M. Turkina, KE Magnusson. „Fetal bovine serum proteins associate with molecular chaperone GRP78 in stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth“. 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine, 2011 June 25-30, Torino, Italy.

A. Pivoriūnas, **A. Jarmalavičiūtė**, V. Tunaitis. „Development of *in vitro* neural differentiation model using adult human stem cells“. Lietuvos Biochemikų Draugijos XII Konferencija „Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų“, 2012 birželio 28-30, Tolieja (Molėtų raj.).

A. Jarmalavičiūtė, V. Tunaitis, A. Pivoriūnas. „Development of *in vitro* neural differentiation model using human dental pulp stem cells“. 1-oji Tarptautinė Kamieninių Ląstelių Konferencija, 2012 rugsėjo 6-11, Chanija, Kreta, Graikija.

A. Pivoriūnas, V. Tunaitis, **A. Jarmalavičiūtė**, A. Venalis. „The influence of hypoxia and heat shock on the cytokine/chemokine secretion profiles in mesenchymal stromal cells derived from human exfoliated deciduous teeth“. International Society for Stem Cell Research meeting, 2013 rugsėjo 15-18, Florencija, Italija.

U. Pivoraitė, **A. Jarmalavičiūtė**, V. Tunaitis, A. Pivoriūnas. „Automated 3D microcarrier cell culture of human mesenchymal stem cells“. Tarptautinė tarpdisciplininė konferencija “Nanotechnology: Research and Development“, 2014 gegužės 15-16, Vilnius, Lietuva.

Literatūra

1. Lindvall, O., and Kokaia, Z. 2006. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441:1094-1096.
2. Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. 2007. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 25:1468-1543.
3. Hu, B.-Y., and Zhang, S.-C. 2009. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nature protocols* 4:1295-1599.
4. Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Thomson, J.A., and Zhang, S.C. 2005. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem cells* 23:781-790.
5. Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., and Thomson, J.A. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19:1129-1133.
6. Goulburn, A.L., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., and Anderson, S.A. 2012. Generating GABAergic cerebral cortical interneurons from mouse and human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 8:416-426.
7. Hu, B.Y., Du, Z.W., Li, X.J., Ayala, M., and Zhang, S.C. 2009. Human oligodendrocytes from embryonic stem cells: conserved SHH signaling networks and divergent FGF effects. *Development* 136:1443-1452.
8. Carrascosa, M.C., Massaguer, O.L., and Mestres, J. 2012. PharmaTrek: A Semantic Web Explorer for Open Innovation in Multitarget Drug Discovery. *Mol Inform* 31:537-541.
9. Yamanaka, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell stem cell* 10:678-684.
10. Pfisterer, U., Wood, J., Nihlberg, K., Hallgren, O., Bjermer, L., Westergren-Thorsson, G., Lindvall, O., and Parmar, M. 2011. Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10:3311-3316.
11. Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A., and Fischer, I. 2004. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 77:192-204.
12. Pivoriuunas, A., Surovas, A., Borutinskaite, V., Matuzevicius, D., Treigyte, G., Savickiene, J., Tunaitis, V., Aldonyte, R., Jarmalaviciuute, A., Suriakaite, K., et al. 2010. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Stem cells and development* 19:1081-1093.

13. Shakhova, O., and Sommer, L. 2010. Neural crest-derived stem cells. *Harvard Stem Cell Institute*.
14. Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S., and Gronthos, S. 2008. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26:1787-1795.
15. Király, M., Porcsalmy, B., Pataki, A., Kádár, K., Jelitai, M., Molnár, B., Hermann, P., Gera, I., Grimm, W.-D., Ganss, B., et al. 2009. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochemistry international* 55:323-332.
16. Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., et al. 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of clinical investigation* 122:80-90.
17. Nosrat, I., Smith, C., Mullally, P., Olson, L., and Nosrat, C. 2004. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *The European journal of neuroscience* 19:2388-2486.
18. Vanharanta, S., Shu, W., Brenet, F., Hakimi, A.A., Heguy, A., Viale, A., Reuter, V.E., Hsieh, J.J., Scandura, J.M., and Massague, J. 2013. Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. *Nat Med* 19:50-56.
19. Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K., and Surani, M. 2010. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell stem cell* 6:468-478.
20. Gardner, R. 1998. The origin and efficient derivation of embryonic stem (ES) cells in the mouse. *Pathologie-biologie* 46:676-677.
21. Thomson, J.A. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282.
22. Stojkovic, M., Lako, M., Stojkovic, P., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Herbert, M., Hyslop, L., Ahmad, S., et al. 2004. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22:790-797.
23. Zhang, X., Stojkovic, P., Przyborski, S., Cooke, M., Armstrong, L., Lako, M., and Stojkovic, M. 2006. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24:2669-2676.
24. Strelchenko, N., and Verlinsky, Y. 2006. Embryonic stem cells from morula. *Methods in enzymology* 418:93-108.

25. Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareno, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. 2005. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reproductive biomedicine online* 10:105-110.
26. Martin, M., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature medicine* 11:228-232.
27. Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biology of reproduction* 70:837-845.
28. Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., and Suemori, H. 2008. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 375:27-32.
29. Chen, G., Gulbranson, D., Hou, Z., Bolin, J., Ruotti, V., Probasco, M., Smuga-Otto, K., Howden, S., Diol, N., Propson, N., et al. 2011. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods* 8:424-429.
30. Keller, G. 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology* 7:862-869.
31. Gökhan, S., and Mehler, M. 2001. Basic and clinical neuroscience applications of embryonic stem cells. *The Anatomical record* 265:142-156.
32. Kurosawa, H. 2007. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 103:389-398.
33. Schulz, T., Palmarini, G., and Noggle, S. 2003. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC ...*
34. Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-i., Muguruma, K., et al. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 25:681-686.
35. Reubinoff, B., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19:1134-1140.
36. Chambers, S., Fasano, C., Papapetrou, E., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* 27:275-280.
37. Studer, L. 2012. Derivation of dopaminergic neurons from pluripotent stem cells. *Progress in brain research* 200:243-263.
38. Park, I.-H. 2010. Five classic articles in somatic cell reprogramming. *The Yale journal of biology and medicine* 83:135-137.

39. Takahashi, K., and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
40. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
41. Chen, K., Mallon, B., McKay, R., and Robey, P. 2014. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell stem cell* 14:13-26.
42. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, N.Y.)* 322:945-949.
43. Noemi, F., Hiroshi, B.A.N., Akiyo, N., Koichi, S., and Mamoru, H. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 85.
44. Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I., and Thomson, J. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, N.Y.)* 324:797-801.
45. Zhou, Y.-y., and Zeng, F. 2013. Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 11:284-287.
46. Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K., Lanza, R., et al. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4:472-476.
47. Jung, Y., Hysolli, E., Kim, K.-Y., Tanaka, Y., and Park, I.-H. 2012. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Current opinion in neurology* 25:125-130.
48. Cristina, E., Nuria, M., Anna, V., and Juan, B. 2013. Dedifferentiation, Transdifferentiation, and Reprogramming: Future Directions in Regenerative Medicine. *Seminars in Reproductive Medicine* 31.
49. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Bjorklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and Parmar, M. 2011. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.
50. Reynolds, B., and Weiss, S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)* 255:1707-1710.
51. Conti, L., and Cattaneo, E. 2010. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature reviews. Neuroscience* 11:176-187.
52. Pevny, L., and Rao, M. 2003. The stem-cell menagerie. *Trends in neurosciences* 26:351-359.

53. Jensen, J., and Parmar, M. 2006. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Molecular neurobiology* 34:153-161.
54. Goffredo, D., Conti, L., Di Febo, F., Biella, G., Tosoni, A., Vago, G., Biunno, I., Moiana, A., Bolognini, D., Toselli, M., et al. 2008. Setting the conditions for efficient, robust and reproducible generation of functionally active neurons from adult subventricular zone-derived neural stem cells. *Cell death and differentiation* 15:1847-1856.
55. Lepski, G., Jannes, C., Nikkhah, G., and Bischofberger, J. 2013. cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:155.
56. Neri, M., Maderna, C., Ferrari, D., Cavazzin, C., Vescovi, A., and Gritti, A. 2010. Robust generation of oligodendrocyte progenitors from human neural stem cells and engraftment in experimental demyelination models in mice. *PloS one* 5.
57. Skalnikova, H., Vodicka, P., Gadher, S., and Kovarova, H. 2008. Proteomics of neural stem cells. *Expert review of proteomics* 5:175-186.
58. Donato, R., Miljan, E., Hines, S., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., Edwards, F., and Sinden, J. 2007. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC neuroscience* 8:36.
59. Mazzi, E., Reams, R., and Soliman, K. 2004. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain research* 1004:29-44.
60. Chaudhry, Z.L., and Ahmed, B.Y. 2013. Caspase-2 and caspase-8 trigger caspase-3 activation following 6-OHDA-induced stress in human dopaminergic neurons differentiated from ReNVM stem cells. *Neurological Research* 35:435-440.
61. Phinney, D., and Prockop, D. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:2896-2902.
62. Fridenshtein, A., Luriia, E., Chaïlakhian, R., Latsinik, N., and Prusevich, T. 1970. [Hematopoietic tissue in organ and monolayer cultures outside the organism]. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR* 25:86-95.
63. Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J., Katz, A., Benhaim, P., Lorenz, H., and Hedrick, M. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7:211-228.
64. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism* 44:1928-1942.
65. Jankowski, R., Deasy, B., and Huard, J. 2002. Muscle-derived stem cells. *Gene therapy* 9:642-647.

66. Campagnoli, C., Roberts, I., Kumar, S., Bennett, P., Bellantuono, I., and Fisk, N. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396-2402.
67. Erices, A., Conget, P., and Minguell, J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology* 109:235-242.
68. Kuznetsov, S., Mankani, M., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey, P. 2001. Circulating skeletal stem cells. *The Journal of cell biology* 153:1133-1140.
69. Fekete, N., Rojewski, M., Fürst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J., and Schrezenmeier, H. 2012. GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PloS one* 7.
70. Liu, H., Kemeny, D.M., Heng, B.C., Ouyang, H.W., Melendez, A.J., and Cao, T. 2006. The Immunogenicity and Immunomodulatory Function of Osteogenic Cells Differentiated from Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology* 176.
71. Bianco, P., Robey, P., and Simmons, P. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell* 2:313-319.
72. Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A., and Nishikawa, S.-I. 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129:1377-1388.
73. Méndez-Ferrer, S., Michurina, T., Ferraro, F., Mazloom, A., Macarthur, B., Lira, S., Scadden, D., Ma'ayan, A., Enikolopov, G., and Frenette, P. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466:829-834.
74. Martens, W., Wolfs, E., Struys, T., Politis, C., Bronckaers, A., and Lambrichts, I. 2012. Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells, tissues, organs* 196:490-500.
75. Vodyanik, M.A., Yu, J., Zhang, X., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. A Mesoderm-Derived Precursor for Mesenchymal Stem and Endothelial Cells. *Cell Stem Cell* 7:718-729.
76. Guijarro-Muñoz, I., Compte, M., Álvarez-Cienfuegos, A., Álvarez-Vallina, L., and Sanz, L. 2014. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-κB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *The Journal of biological chemistry* 289:2457-2468.
77. Kuznetsov, S., Krebsbach, P., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., and Robey, P. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12:1335-1347.
78. Ylöstalo, J., Bazhanov, N., and Prockop, D. 2008. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Experimental hematology* 36:1390-1402.

79. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
80. Zhaoqing, W., and Xiyun, Y. 2013. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Letters* 330.
81. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P., Riminucci, M., et al. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131:324-336.
82. Shi, S., and Gronthos, S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18:696-704.
83. Valyi-Nagy, K., Kormos, B., Ali, M., Shukla, D., and Valyi-Nagy, T. 2012. Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures. *Molecular vision* 18:588-592.
84. Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Deliliers, G. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental hematology* 30:783-791.
85. Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. 2007. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 25:1468-1475.
86. Mikami, Y., Ishii, Y., Watanabe, N., Shirakawa, T., Suzuki, S., Irie, S., Isokawa, K., and Honda, M. 2011. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem cells and development* 20:901-913.
87. Gómez-Gavero, M., Lovell-Badge, R., Fernández-Avilés, F., and Lara-Pezzi, E. 2012. The vascular stem cell niche. *Journal of cardiovascular translational research* 5:618-630.
88. Bianco, P., Cao, X., Frenette, P., Mao, J., Robey, P., Simmons, P., and Wang, C.-Y. 2013. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine* 19:35-42.
89. Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T.W., Fisher, L.W., Gronthos, S., Robey, P.G., and Shi, S. 2003. Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. *Journal of Dental Research* 82.
90. Baraniak, P., and McDevitt, T. 2010. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine* 5:121-143.

91. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]* Chapter 3.
92. Ranganath, S., Levy, O., Inamdar, M., and Karp, J. 2012. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell stem cell* 10:244-258.
93. Raposo, G., and Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology* 200:373-383.
94. Huang, Y.-C., Parolini, O., and Deng, L. 2013. The potential role of microvesicles in mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem cells and development* 22:841-844.
95. Rieu, S., Géminard, C., Rabesandratana, H., Sainte-Marie, J., and Vidal, M. 2000. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *European journal of biochemistry / FEBS* 267:583-590.
96. Zhang, B., Wang, M., Gong, A., Zhang, X., Wu, X., Zhu, Y., Shi, H., Wu, L., Zhu, W., Qian, H., et al. 2014. HucMSC-exosome mediated -Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*.
97. Bian, S., Zhang, L., Duan, L., Wang, X., Min, Y., and Yu, H. 2014. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 92:387-397.
98. van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of biochemistry* 140:13-21.
99. Frühbeis, C., Fröhlich, D., and Krämer-Albers, E.-M. 2012. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Frontiers in physiology* 3:119.
100. Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S., Ntzouni, M., Margaritis, L., Stefanis, L., and Vekrellis, K. 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:6838-6851.
101. Nosrat, I., Smith, C., Mullally, P., Olson, L., and Nosrat, C. 2004. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *The European journal of neuroscience* 19:2388-2398.
102. Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., and Ma, T. 2013. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews*.

103. Pankaj, G., Clive, D.M., and Robert, E.N. 2008. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83.
104. Lin, C.-Y., Huang, C.-H., Wu, Y.-K., Cheng, N.-C., and Yu, J. 2014. Maintenance of human adipose derived stem cell (hASC) differentiation capabilities using a 3D culture. *Biotechnology letters*.
105. Martens, W., Bronckaers, A., Politis, C., Jacobs, R., and Lambrichts, I. 2013. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clinical oral investigations*.
106. Jernvall, J., and Thesleff, I. 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of development* 92:19-29.
107. Rothová, M., Peterková, R., and Tucker, A. 2012. Fate map of the dental mesenchyme: dynamic development of the dental papilla and follicle. *Developmental biology* 366:244-254.
108. Koussoulakou, D., Margaritis, L., and Koussoulakos, S. 2009. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *International journal of biological sciences* 5:226-243.
109. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 3:301-313.
110. Feng, J., Mantesso, A., De Bari, C., Nishiyama, A., and Sharpe, P. 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:6503-6508.
111. Télèès, O., Laurent, P., Zygouritsas, S., Burger, A.-S., Camps, J., Dejou, J., and About, I. 2005. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Archives of oral biology* 50:103-108.
112. Brownell, I., Guevara, E., Bai, C., Loomis, C., and Joyner, A. 2011. Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell stem cell* 8:552-565.
113. Barbour, H., Plant, C., Harvey, A., and Plant, G. 2013. Tissue sparing, behavioral recovery, supraspinal axonal sparing/regeneration following sub-acute glial transplantation in a model of spinal cord contusion. *BMC neuroscience* 14:106.
114. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L., Robey, P., and Shi, S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5807-5812.
115. Huang, G., Gronthos, S., and Shi, S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research* 88:792-806.

116. Tsukamoto, Y., Fukutani, S., Shin-Ike, T., Kubota, T., Sato, S., Suzuki, Y., and Mori, M. 1992. *Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts*. 1045-1055 pp.
117. Huang, G., Shagramanova, K., and Chan, S. 2006. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *Journal of endodontics* 32:1066-1073.
118. Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., and Shi, S. 2002. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of dental research* 81.
119. Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G. 2005. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20:1394-1402.
120. d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., and Papaccio, G. 2007. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell death and differentiation* 14:1162-1171.
121. Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G., Gomes Massironi, S., Pereira, L., Caplan, A., and Cerruti, H. 2006. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells, tissues, organs* 184:105-116.
122. Seo, B., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T., Akiyama, K., Lee, J., and Shi, S. 2008. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral diseases* 14:428-434.
123. Govindasamy, V., Abdullah, A., Ronald, V., Musa, S., Ab Aziz, Z., Zain, R., Totey, S., Bhonde, R., and Abu Kasim, N. 2010. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *Journal of endodontics* 36:1504-1515.
124. Morsczeck, C., Völlner, F., Saugspier, M., Brandl, C., Reichert, T., Driemel, O., and Schmalz, G. 2010. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clinical oral investigations* 14:433-440.
125. Nourbakhsh, N., Soleimani, M., Taghipour, Z., Karbalaie, K., Mousavi, S.-B., Talebi, A., Nadali, F., Tanhaei, S., Kiyani, G.-A., Nematollahi, M., et al. 2011. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *The International journal of developmental biology* 55:189-195.
126. Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y., Wakeman, D., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480:547-551.

127. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
128. Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R.F., Pagano, S.F., and Parati, E.A. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 993:18-29.
129. Gilyarov, A.V. 2008. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38:165-169.
130. Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K., Tarasova, Y., Wersto, R., Boheler, K., and Wobus, A. 2004. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:2510-2532.
131. Marichal, N., Garcia, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenoz, O., and Russo, R.E. 2012. Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord. *Stem Cells* 30:2020-2031.
132. Carre, J.L., Goetz, B.D., O'Connor, L.T., Bremer, Q., and Duncan, I.D. 2002. Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neurosci Lett* 330:17-20.
133. Jessen, K.R., and Mirsky, R. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6:671-682.
134. Eng, S., Dykes, I., Lanier, J., Fedtsova, N., and Turner, E. 2007. POU-domain factor Brn3a regulates both distinct and common programs of gene expression in the spinal and trigeminal sensory ganglia. *Neural development* 2:3.
135. Middeldorp, J., and Hol, E.M. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93:421-443.
136. Helfand, B., Loomis, P., Yoon, M., and Goldman, R. 2003. Rapid transport of neural intermediate filament protein. *Journal of cell science* 116:2345-2404.
137. Henley, S., and Dick, F. 2012. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell division* 7:10.
138. Boison, D., Chen, J.F., and Fredholm, B. 2010. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell death and differentiation* 17:1071-1153.
139. Jankovic, J., Chen, S., and Le, W. 2005. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 77:128-166.
140. Yin, C., Zhou, S., Jiang, L., and Sun, X. 2012. Mechanical injured neurons stimulate astrocytes to express apolipoprotein E through ERK pathway. *Neuroscience letters* 515:77-158.
141. Kenzelmann, D., Chiquet-Ehrismann, R., and Tucker, R. 2007. Teneurins, a transmembrane protein family involved in cell

- communication during neuronal development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64:1452-1458.
142. Baum, B., Settleman, J., and Quinlan, M. 2008. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in cell & developmental biology* 19:294-308.
 143. Véron, P., Segura, E., Sugano, G., Amigorena, S., and Théry, C. 2005. Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood cells, molecules & diseases* 35:81-88.
 144. Rodriguez Peña, M., Castillo Bennett, J., Soler, O., Mayorga, L., and Michaut, M. 2013. MARCKS protein is phosphorylated and regulates calcium mobilization during human acrosomal exocytosis. *PloS one* 8.
 145. Valapala, M., and Vishwanatha, J.K. 2011. Lipid Raft Endocytosis and Exosomal Transport Facilitate Extracellular Trafficking of Annexin A2. *Journal of Biological Chemistry* 286.
 146. Ekaterina, K., Boris, K., and Mark, M. 2013. BASP1 and Its N-end Fragments (BNEMFs) Dynamics in Rat Brain During Development. *Neurochemical Research* 38.
 147. Lim, H., Kang, D., Lim, J., Seong, J., Kang, S., and Bae, Y. 2013. Function of Ahnak protein in aortic smooth muscle cell migration through Rac activation. *Cardiovascular research* 97:302-310.
 148. Wong, R., Ibrahim, A., Fong, H., Thompson, N., Lock, L., and Donovan, P. 2011. L1TD1 is a marker for undifferentiated human embryonic stem cells. *PloS one* 6.
 149. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., and Wood, M.J. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology* 29:341-345.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui dr. Gyčiui Svirskiui. Ypatingai dėkoju darbo moksliniam konsultantui dr. Augustui Pivoriūnui už nuolatinę pagalbą, pamokymus bei suteiktas sąlygas šio disertacinio darbo įgyvendinimui. Už pagalbą atliekant tyrimus dėkoju bendradarbiams, ypač dr. Virginijui Tunaičiui.

Už galimybę pasinaudoti konfokaliniu mikroskopu Olympus Fluoview FV10i dėkoju prof. Arūnui Ramanavičiui.

Už finansinę paramą dėkoju Lietuvos mokslo tarybai.

PRIEDŲ SĄRAŠAS

1. *Diferencijuojančių SHED morfologijos pokyčiai.wmv*

(Video priedas Nr. 1)

2. *2D SHED egzosomų proteominė analizė.xls*

(Priedas Nr. 2)

3. *3D SHED egzosomų proteominė analizė.xls*

(Priedas Nr. 3)

4. *2D SHED supernatantų proteominė analizė.xls*

(Priedas Nr. 4)

5. *3D SHED supernatantų proteominė analizė.xls*

(Video priedas Nr. 5)

6. *OHDA poveikis dopaminerginiams neuronams.wmv*

(Video priedas Nr. 6)

7. *OHDA ir 2D egzosomų poveikis dopaminerginiams neuronams.wmv*

(Video priedas Nr. 7)

8. *OHDA ir mikrovezikulių poveikis dopaminerginiams neuronams.wmv*

(Video priedas Nr. 8)

9. *OHDA ir 3D egzosomų poveikis dopaminerginiams neuronams.wmv*

(Video priedas Nr. 9)