



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Ignas Lebedis

**Žmogaus mezenchiminių stromos ląstelių chondrogeninė diferen-
ciacija ląstelių lakštuose fizioksinijos sąlygomis kremzlės audinio
regeneracijai**

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Ilona Uzielienė

Darbas atliktas

Valstybinio mokslinių tyrimų instituto
Inovatyvios medicinos centro Regeneracinės me-
dicinos skyriuje

Turinys

Santrumpos	4
Įvadas	5
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. Kamieninės ląstelės ir jų taikymas regeneracinėje medicinoje.....	7
1.2. Kremzlinis audinys, jo komponentai ir mechanizmai.....	9
1.3. Osteoartritas ir kremzlės regeneracijos būdai	11
1.4. Ląstelių lakštų modelis kremzlės regeneracijai	13
1.5. Kremzlės fizioksinija ir hipoksijos indukuojami veiksniai.....	15
1.6. HIF-1 α slopiklis LW6 ir jo veikimo charakteristika	17
2. Medžiagos ir metodai	19
2.1. Medžiagos.....	19
2.2. Metodai.....	19
2.2.1. Ląstelių išskyrimas ir kultivavimas	19
2.2.2. Ląstelių proliferacijos tyrimas.....	21
2.2.3. Tėkmės citometrija ląstelių viduląstelinio kalcio jonų tyrimui	21
2.2.4. Holografinė mikroskopija ląstelių migracijos ir judrumo nustatymui.....	22
2.2.5. Ląstelių metabolizmo ir ląstelinio kvėpavimo tyrimai.....	22
2.2.6. Imunofermentinis tyrimas ELISA baltymui HIF-1 α	23
2.2.7. Imunofermentinis tyrimas ELISA baltymui VHL.....	23
2.2.8. Fermento MDH2 ląstelėse aktyvumo tyrimas	24
2.2.9. Ląstelių chondrogeninės diferenciacijos indukcija ląstelių lakštuose	24
2.2.10. Ląstelių lakštų RNR išskyrimas.....	24
2.2.11. RNR kopijinės DNR sintezė.....	24
2.2.12. Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR ir genų raiškos analizė	25
2.2.13. Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR ir genų raiškos analizė	25
3. Rezultatai	26
3.1. Ląstelių proliferacija.....	26
3.2. Viduląstelinio kalcio jonų koncentracijos pokytis su LW6	26
3.3. Ląstelių migracija, judrumas ir judrumo greitis	27
3.4. Ląstelių metabolizmas: mitochondrinis ir glikolitinis aktyvumas	28
3.5. HIF-1 α kiekis.....	30
3.6. VHL kiekis	30
3.7. MDH2 aktyvumas	31
3.8. Chondrogeninė diferenciacija ląstelių lakštuose	32
3.9. Chondrogenine kryptimi diferencijuotų ląstelių lakštų genų raiška	32
4. Rezultatų aptarimas	34
4.1. Fizioksinija skatina ląstelių proliferaciją.....	34
4.2. Viduląstelinio kalcio jonų lygis ląstelėse sumažėja po pirmų 3 dienų fizioksijos sąlygomis 34	
4.3. LW6 sumažina KČMKL ir chondrocitų ląstelių migraciją bei judrumą.....	35
4.4. Fizioksinija ir LW6 sukelia pokyčius KČMKL ir chondrocitų mitochondriniam ir glikolitiniam metabolizmui.....	35
4.5. KČMKL ir chondrocitų HIF-1 α baltymo kiekis ryškiai nekinta 5 % fizioksijoje, tačiau LW6 pasižymi VHL aktyvinamu poveikiu po 7 dienų.....	36

4.6. Fizioksija sumažina MDH2 aktyvumą chondrocituose po 7 dienų	37
4.7. Fizioksija skatina SOX9, COL2A1 ir ACAN genų raišką, HIF-1 slopiklis LW6 turi neigiamą poveikį šiems genams.....	37
Išvados	39
Santrauka	39
Autoriaus asmeninis indėlis	40
Rezultatų sklaida	41
Padėka	42
Santrauka	43
Abstract	44
Literatūros sąrašas	45

Santrumpos

EKL – Embrioninės kamieninės ląstelės

IPKL – Indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės

MKL – Mezenchiminės kamieninės ląstelės

KČMKL – Kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės

OA – Osteoartritas

GAG – Gliukozaminoglikanai (angl. *Glycosaminoglycans*)

PIPAAm – Termoreaktyvus polimeras poli(N-izopropilakrilamidas)

HIF-1 – Hipoksijos indukuojamas veiksnys 1 (angl. *Hypoxia-inducible Factor 1*)

HIF-1 α – Hipoksijos indukuojamo veiksnio 1 alfa subvienetas (angl. *Hypoxia-inducible Factor 1- α*)

PHD – Prolino hidroksilazė (angl. *Prolyl Hydroxylase*)

VHL – Von Hippel-Lindau baltymas

LW6 – HIF-1 α inhibitorius (cheminė formulė 3-(2-(4-adamantan-1-il-fenoksi)-acetilamino)-4-hidroksibenzoinės rūgšties metil esteris)

MDH2 – Malato dehidrogenazė 2 (angl. *Malate Dehydrogenase 2*)

OCR – Deguonies suvartojimo greitis (angl. *Oxygen Consumption Rate*)

ECAR – Užląstelinio rūgštėjimo greitis (angl. *Extracellular Acidification Rate*)

RT-qPCR – Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (angl. *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

PBS - fosfatinio buferio tirpalas (angl. *Phosphate Buffered Saline*)

Įvadas

Augant vidutinei žmonių gyvenimo trukmei, su senėjimu susijusios ligos yra neišvengiamos. Iki 2050 metų, mokslininkai spėja jog osteoartrito (OA) sergamumas padidės 74 % lyginant su 2020 metų duomenimis. (GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators, 2023). Sąnario kremzlės audinys turi ribotą gebėjimą regeneruoti po fizinių traumų, senėjimo sukeltų procesų ir degeneracinių ligų kaip osteoartrito. Šiuo metu nėra nė vieno plačiai taikomo, prieinamo vaisto ar gydymo, kuris sustabdo kremzlės audinio degeneraciją arba atstato pažeistą jos struktūrą. Tyrinėjami įvairūs inovatyvūs gydymo būdai – tarp jų ir kamieninių ląstelių terapija, siekiant efektyviai indukuoti jų *in vitro* chondrogeninę diferenciaciją į kremzlėje esančiu chondrocitus, skatinti kremzlinio audinio gamybą, prilygstančią natūraliam sąnario audiniui ir potencialiai gydyti kremzlės pažaidas bei degeneraciją transplantavus naujai sukurtas kremzlės struktūras pacientuose. Nepaisant nuolat tobulėjančios regeneracinės medicinos ir audinių inžinerijos sričių, dabartiniai chondrogeninės diferenciacijos metodai ir modeliai susiduria su problemomis ir kliūtimis, kurios riboja sukurto kremzlinio audinio terapinį potencialą, nes jis dažnai neprilygsta natūraliai organizme esančiai kremzlei. Norint pakankamai efektyviai atkartoti visus veiksnius, kurie daro įtaką kremzlės formavimuisi, svarbu tobulinti diferenciacijos metodus ir technologijas, kurios leistų lengviau kurti produktus tinkamus klinikiniais tyrimams.

Audinių inžinerijos technologija, sulaukusi daug dėmesio per pastaruosius kelis dešimtmečius – ląstelių lakštų technologija (angl. *cell sheet technology*). Šis metodas paremtas ląstelių kultivacija ant paviršiaus padengto temperatūrai jautriu polimeru PIPAAm (poli(N-izopropilakrilamidu). Keičiant ląstelių inkubavimo temperatūrą žemiau arba aukščiau 32°C, polimero savybės keičiasi – jis tampa hidrofobiškas arba hidrofilus, kas lemia ląstelių sluoksnio nukibimą kaip savitą struktūrą su tarpląstelinėmis jungtimis, paviršiaus molekulėmis ir užląstelinio užpildu – komponentais, kurie itin svarbūs biointegracijai paciento audinyje. Ląstelių lakštai, sukurti iš chondrogeniškai diferencijuotų mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) gali būti tiesiogiai taikomi paviršinėms sąnario kremzlės pažaidoms arba vietoms, kur ji pradėjusi degeneruoti. Tai yra modelis, kuriam nereikalingi ląstelių karkasai – kurie dažnai būna brangūs, reikalauja daug darbo efektyviame jų kūrime, gali sukelti netikėtas sąveikas arba imunogeniškumą paciento organizme po transplantacijos. Ląstelių lakštų technologijos efektyvumas yra pagrįstas įvairiais gyvūnų modelių tyrimais ir pacientų klinikiniais tyrimais skirtingų audinių regeneracijos tikslams. Ši technologija gali būti tobulinama kaip modernus ląstelių terapijos produktas kremzlės regeneracijai, tačiau tam reikia užtikrinti ir nagrinėti, kaip jame vyksta chondrogeninė diferenciacija, ir kaip galima ją patobulinti.

Fiziologinė hipoksija – tai yra vadinama natūraliai organizme esanti deguonies koncentracija, kuri skiriasi tarp skirtingų audinių ir organų. Kadangi kremzlė neturi kraujagyslių, o jame esantis ląstelių tankis yra palyginamai retas, šiame audinyje vyrauja 1 % - 5 % O₂ gradientas nuo kaulo iki

kremzlės paviršiaus. Vienas iš pagrindinių būdų, kaip ląstelės auga ir prisitaiko fizioksinės sąlygomis yra hipoksijos indukuojami veiksniai HIF (angl. *Hypoxia-Inducible factors*). Tai yra transkripcijos veiksniai, aktyvuojami esant ribotam deguonies kiekiui ląstelės aplinkoje. Iki šiol aprašyta daug mechanizmų, kuriais jie sukelia genų raiškos pokyčius, susijusius su prisitaikymu, metabolizmu ir homeostazės palaikymu. Kremzlėje šie veiksniai yra svarbūs chondrogenezės procesuose, tad jų mechanizmų nagrinėjimas gali būti taikomas kuriant patobulintus chondrogeninės diferenciacijos metodus ir kultivuojant MKL kilmės kremzlinį audinį. Šio darbo metu buvo tiriamas 5 % O₂ fizioksinės sąlygų poveikis kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms (KČMKL) ir sąnario chondrocitams, nagrinėjama ir su laboratorine normoksija (5 % O₂) lyginama deguonies sąlygų įtaka ląstelių augimui, metabolizmui ir chondrogeninei diferenciacijai ląstelių lakštuose. Papildomai buvo tiriamas HIF-1α slopiklio LW6 poveikis ir jo mechanizmai, norint ištirti HIF-1 veiksnio svarbą ląstelių biologiniams procesams, kurie susiję su fizioksija. Darbo metu ištirta ląstelių proliferacija, migracija, viduląstelinio kalcio jonų kiekis, buvo tiriamas ląstelių metabolizmas ir energijos apsirūpinimas, tiesiogiai tiriami su hipoksija susijusių baltymų HIF-1α ir VHL kiekiai ląstelėse, nagrinėjamas LW6 slopinimo mechanizmas bei analizuojama chondrogeniškai diferencijuotų ląstelių lakštų genų *SOX9*, *COL2A1* ir *ACAN* raiška, susijusi su diferenciacijos ir chondrogenezės efektyvumu.

Darbo tikslas:

Įvertinti 5 % O₂ fizioksinės ir HIF-1α slopiklio LW6 poveikį žmogaus kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, jų augimui, metabolizmui bei chondrogeninei diferenciacijai ląstelių lakštų modelyje palyginus su žmogaus sąnario chondrocitais

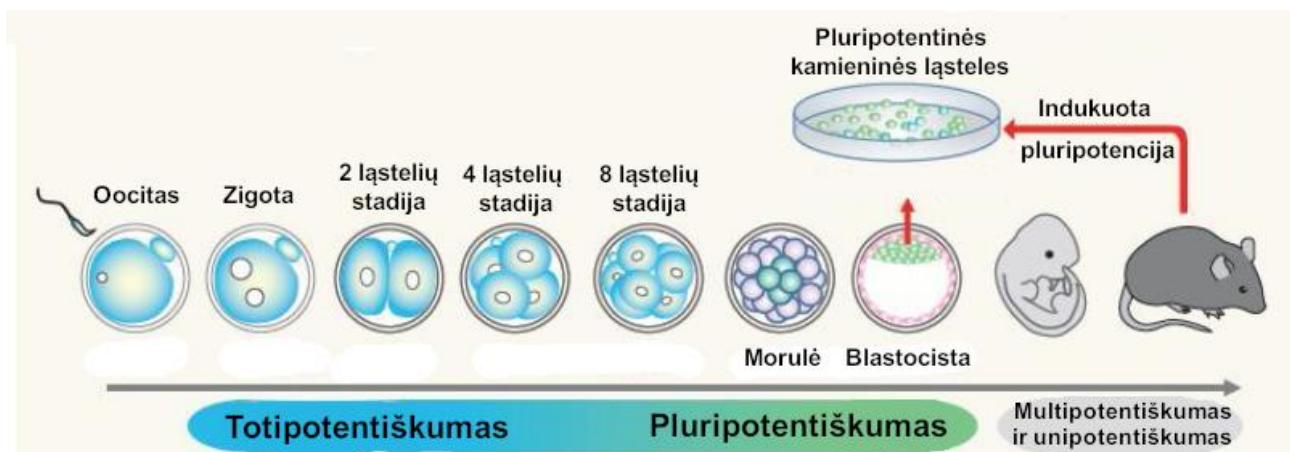
Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti fizioksinės ir LW6 poveikį KČMKL bei chondrocitų augimui, proliferacijai ir viduląstelinio kalcio jonų kiekiui.
2. Įvertinti slopiklio LW6 poveikį KČMKL ir chondrocitų migracijai ir judrumui.
3. Nustatyti ir palyginti mitochondrinį bei glikolitinį metabolizmą KČMKL ir chondrocituose tarp skirtingų deguonies sąlygų ir su LW6.
4. Palyginti HIF-1α ir VHL baltymų kiekį KČMKL ir chondrocituose skirtingomis deguonies sąlygomis ir su slopikliu LW6.
5. Įvertinti fermento MDH2 aktyvumo pokyčius KČMKL ir chondrocituose fizioksijoje ir su slopikliu LW6.
6. Palyginti chondrogenezės genų *SOX9*, *COL2A1* ir *ACAN* raišką chondrogeniškai diferencijuotuose ląstelių lakštuose skirtingomis deguonies sąlygomis bei slopinant transkripcijos veiksnį HIF-1α.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Kamieninės ląstelės ir jų taikymas regeneracinėje medicinoje

Kamieninės ląstelės - tai ląstelės, aptinkamos daugialąsčiuose eukariotiniuose organizmuose, kurios neturi specializuotos funkcijos, gali neribotai dalytis į dukterines ląsteles ir veikiamos tam tikrų signalinių molekulių, augimo faktorių ar papildomų stimulų diferencijuoti į skirtingus specializuotus ląstelių tipus. Kamieninės ląstelės organizmo vystymosi metu atlieka svarbią funkciją audinių, organų susiformavime, o vėliau likusi smulki jų populiacija atlieka audinio apykaitos, homeostazės ir regeneracijos pažaidų metu funkcijas savo nišoje. (Bindu ir Srilatha 2011). Kamieninės ląstelės skirstomos į totipotentines, pluripotentines ir multipotentines, pagal jų diferenciacijos potencialą. Jų gebėjimas diferencijuoti organizme įprastai priklauso nuo vystymosi stadijos – kuo anksčiau vystymosi stadijoje yra organizmas, tuo didesnis potentiškumas aptinkamas jo ląstelėse, o bręstant organizmui kamieninės ląstelės su laiku praranda gebėjimą diferencijuoti į didesnę įvairovę skirtingo tipo ląstelių. (1.1. pav.).



1.1. pav. Organizmo vystymosi stadijos ir kamieninių ląstelių potenciškumo pokytis brandos eigoje. Pavaizduoti du dažnai naudojami pluripotentinių kamieninių ląstelių gavimo būdai – išskyrimas iš blastocistos vidinės ląstelių masės arba somatinių ląstelių perprogramavimas į pluripotentines *in vitro* (Adaptuota pagal Lu ir Zhang 2015)

Totipotiškumas yra ląstelės gebėjimas diferencijuoti į visas organizmo embrionines ir užembrionines ląsteles (t.y. iš jų gali išsivystyti pilnas organizmas). Vienintelės natūralios organizmo totipotentinės ląstelės – po lytinių ląstelių susiliejimo susiformavusi zigota ir ankstyvos jos dalijimosi stadijos iki 8 ląstelių stadijos (Bindu ir Srilatha 2011; Lu ir Zhang 2015). Pluripotiškumas yra embrioninėms kamieninėms ląstelėms (EKL) ir indukuotoms pluripotentinėms kamieninėms ląstelėms (IPKL) būdinga savybė – pluripotentinės ląstelės gali diferencijuoti į bet kurias mezodermos, endodermos ir ektodermos kilmės tipo organizmo ląsteles. (Eguizabal et al. 2019). Multipotentinės kamieninės ląstelės gali diferencijuoti į kelių skirtingų tipų ląsteles, tačiau tai apribota audinio nišos ir priklauso nuo ląstelių kilmės organizme. Pavyzdžiui, kaulų čiulpuose yra dviejų atskirų tipų

multipotentinių kamieninių ląstelių – hematopoetinių kamieninių ląstelių, iš kurių susidaro kraujo ląstelės, ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių arba kaulų čiulpų stromos ląstelių (KČMKL), kurios geba diferencijuoti į riebalines, kremzlės ir kaulų ląsteles.

Regeneracinė medicina apibrėžiama kaip moderni medicinos mokslų kryptis, kurios pagalba siekiama gydyti, atkurti ląsteles, organus ir audinius, naudojant smulkių molekulių pagrindo vaistus, audinių inžinerijos modelius, ląstelių terapiją ar genų modifikaciją (Cossu et al. 2018). Kamieninės ląstelės yra vienas iš plačiausiai tyrinėjamų objektų šioje srityje.

Embrioninės kamieninės ląstelės yra vienas iš anksčiausiai naudojamų regeneracinės medicinos technologijų. Jos įprastai išskiriamos iš blastocistų vidinės ląstelių masės arba kitų embrioninių dalių, pasižymi pluripotentiskumu, gebėjimu diferencijuoti į visus suaugusių ląstelių tipus. EKL modelis susiduria su iššūkiais. Kadangi EKL yra alogeninės (t.y. ne iš pačio paciento), transplantacija gali sukelti imuninę reakciją. Nepakankamai efektyvūs diferenciacijos būdai taip pat negali pilnai garantuoti, jog visos transplantuotos ląstelės bus pilnai diferencijuotos. Atsiranda atvejai, kai paciento organizme gali likti maža dalis nediferencijuotų EKL, kurios toliau proliferuoja audinyje ir sukelia navikus vadinamus teratomomis. (Cossu et al. 2018; Hermeren 2021; Harris et al. 2022). Regeneracinė medicina taip pat susiduria su etinėmis problemomis ir apribojimais, susijusiais su embrioninėmis ląstelėmis. Skirtingos valstybės turi labai skirtingus leidimus ir požiūrį įstatymų kontekste į EKL tyrinėjimą ir taikymą. Tai apsunkina gebėjimą sėkmingus ikiklinikinius tyrimus perkelti į klinikinį kontekstą, terapinį panaudojimą, galimybę gauti finansavimą ar leidimą terapiją naudoti plačiu mastu skirtingose pasaulio valstybėse (Hermeren 2021).

2006 metais mokslininkai Kazutoshi Takahashi ir Shinya Yamanaka parodė, kad pelių somatinės ląstelės gali būti perprogramuojamos į embrionines ląsteles su specifiniais genais ir jų indukcija (Takahashi ir Yamanaka 2006), o 2007 metais šis metodas sėkmingai buvo pritaikytas ir žmogaus fibroblastų ląstelėms (Takahashi et al. 2007). Šios ląstelės buvo pavadintos indukuotomis pluripotentinėmis kamieninėmis ląstelėmis (IPKL, angl. *Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs), už jų atradimą 2012 metais buvo apdovanota Nobelio premija (Larouche ir Aguilar 2019; Hermeren 2021). IPKL atlieka tokias pat funkcijas ir turi tokį pat diferenciacinį potencialą kaip EKL, tačiau jos pranašios tuo, jog gali būti perprogramuojamos pačio paciento alogeninės ląstelės (taip išvengiant imuninės reakcijos ir atmetimo), tuo pačiu neturi etinių ir teisinių problemų, susijusių su EKL, jų išskyrimu ir kultivavimu (Cossu et al. 2018; Moradi et al. 2019). Nepaisant to, kad IPKL yra inovatyvi alternatyva EKL ląstelėms ir jų terapijai, kaip ir su kiekvienais naujais atradimais regeneracinėje medicinoje, jie nebūna visiškai tobuli ir iškyla savitos kliūtys, norint panaudoti šias ląsteles audinių inžinerijai *in vivo*. Dažniausios problemos yra tai, kad IPKL po kiek laiko kultūroje pasižymi genetiniu nestabilumu, galimomis variacijomis tarp teoriškai kloninių ląstelių iš to paties donoro, todėl sunku sukurti

standartizuotus klinikinio lygio kriterijus, bei teratomų formavimu – panašia problema, su kuria susiduria ir EKL tyrėjai. (Doss ir Sachinidis 2019; Loo et al. 2021). Dėl šių veiksnių gali būti ieškomos kitos alternatyvos audinių inžinerijai, kurių taikymas efektyvesnis ir labiau praktiškas laiko, ekonomine ir darbo jėgos prasme norint sukurti sėkmingą ląstelių terapiją ar iš jų sukurtą gydymą.

Mezenchiminės kamieninės ląstelės yra multipotentinė kamieninių ląstelių rūšis. Pagal Tarptautinę ląstelių terapijos draugiją (angl. *International Society for Cell Therapy*, ISCT) ir jos nuorodas, MKL turi turėti kelis kriterijus: gebėjimą prisitvirtinti prie plastiko paviršiaus *in vitro*, tam tikrų paviršiaus žymenų raišką (CD105, CD73, CD90), hematopoetinėms ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų trūkumą (CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19, II tipo MHC) ir multipotenciją – gebėjimą indukuoti jas diferencijuoti į chondrocitus, adipocitus ir osteoblastus (Dominici et al. 2006). MKL gali būti išskiriamos iš įvairių audinių – plačiausiai tyrinėjamos kaulų čiulpų kilmės MKL, tačiau yra aprašytos ir naudojamos MKL kultūros iš įvairių šaltinių – riebalinio audinio, sinovinio skysčio, placentos, raumenų, dantų pulpos, virkštelės, endometriumo, menstruacinio kraujo, kepenų ir kitų (Bindu ir Srilatha 2011; Ullah et al. 2015; Ding et al. 2015; Sharpe 2016; Rodrigues et al. 2016; Mushahary et al. 2019; Loo et al. 2021).

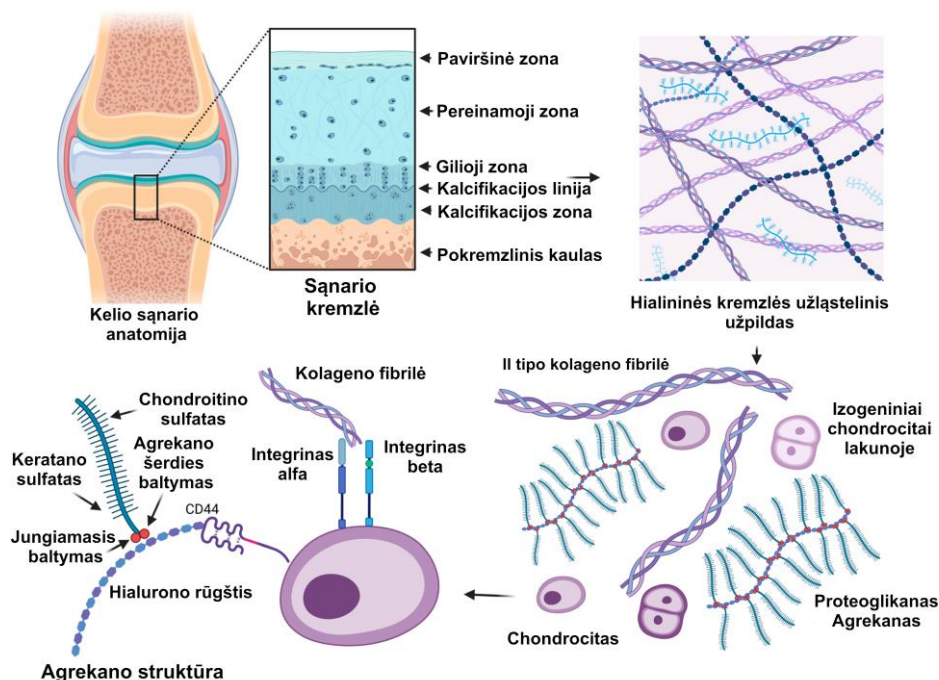
MKL turi pranašumą audinių inžinerijoje ir ląstelių terapijoje dėl įvairių veiksnių – jas palyginamai lengva išskirti iš įvairių audinių ir kultivuoti *in vitro*, dėl diferenciacijos potencialo tinkamos naudoti skirtingų audinių ar organų tyrimams, dėl proliferacijos limito ir gerų senėjimo kontrolės mechanizmų neturi navikų formavimo rizikos kaip EKL ir IPKL. Organizme jos natūraliai dalyvauja regeneracijos procesuose, skatina žaizdų gijimą, pasižymi imunomoduliacinėmis savybėmis (gebamigruoti link pažaidų pagal įvairius molekulinis signalus, išskirti priešuždegiminius citokinus, dėl to taip pat pasižymi žemu imunogeniškumu net ir alogeninių transplantų atvejais) (Rodriguez-Menocal et al. 2015; Mishra et al. 2020; Loo et al. 2021)

1.2. Kremzlinis audinys, jo komponentai ir mechanizmai

Kremzlinis audinys yra mezodermos kilmės specializuotas jungiamasis audinys, sudarytas iš dviejų komponentų – užląstelinio užpildo ir chondrocitų. Kremzlė neturi kraujagyslių, limfagyslių ir nervų, tad medžiagų pasisavinimas vyksta difuzijos būdu iš aplinkinių audinių ir skysčių. Pagal funkcines ir struktūrines savybes kremzlinis audinys skirstomas į tris skirtingus tipus – elastinę kremzlę, hialininę kremzlę ir skaidulinę kremzlę (Fox et al. 2009; Armiento et al. 2019). Elastinė kremzlė – itin lanksti, suteikia elastingą struktūrą audiniams ir organams kurie iš jos sudaryti, tarp jų ausies kaušelis, antgerklis ir gerklos. Skaidulinė kremzlė yra stangriausias kremzlės tipas, tankiai užpildytas kolageno skaidulų ir turintis mažesnę kiekį chondrocitų. Šis kremzlės tipas dažnas tarp kaulų ir raumenų jungčių aplink sausgysles ir raiščius. Hialininė kremzlė – plačiausiai organizme paplitęs

kremzlės tipas. Ji atlieka laikiną struktūrinę griaučių funkciją embriono vystymosi metu, kol ji pakeičiama kaulinio audinio, o suaugusiame organizme randama sąnariuose, jungtyse tarp šonkaulių ir krūtinkaulio, kvėpavimo takuose ir trachėjoje (Fox et al. 2009). Hialininė kremzlė yra lygi, blizgi ir išsiskiria savo biomechaninėmis savybėmis, ypač aktualiomis sąnarių funkcijai. Kadangi sąnariai nuolat patiria mechaninį stresą, fizinį krūvį ir trintį, ši kremzlė pritaikyta atlaikyti šiuos veiksnius be žalos audiniui ir jo ląstelėms (Bačenkova et al. 2023).

Pagrindinis kremzlės komponentas, sudarantis iki 80% audinio svorio yra užląstelinis užpildas, išskiriamas chondrocitų (Fox et al. 2009). Jis sudarytas iš didelio kiekio vandens, kolageno, proteoglikanų, glikozaminoglikanų (GAG) ir kitų molekulių (**1.2. pav.**). II tipo kolagenas sudaro apie 90 % kolageno molekulių sąnario kremzlėje (Fox et al. 2009), jis sudaro fibriles ir skaidulas, kurios sąveikauja su proteoglikanais ir palaiko kremzlės struktūrą, biomechanines savybes ir osmotinį skysčių balansą. Proteoglikanai – glikozilinti hidrofiliniai baltymai, turintys baltyminę šerdį su kovalentiškai prisijungusiomis GAG grandinėmis. Dažniausi proteoglikanai kremzlės užląsteliniam užpilde yra agrekanas, dekorinas, fibromodulinas (Fox et al. 2009; Raikov et al. 2024). Dar vienas svarbus kremzlės komponentas – kremzlės oligomerinis užpildo baltymas (angl. *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*, COMP), kuris sąveikauja su užląstelinio užpildu, jame esančiu kolagenu ir chondrocitais per paviršiaus integrino receptorius. Jis gali tiesiogiai jungtis su TGF- β augimo veiksniais, skatinti jų signalinį kelią tarp ląstelių. Padidėjęs šio baltymo kiekis sinoviniame skystyje arba serume taip pat gali būti naudojamas kaip žymuo diagnozuoti kremzlės degeneraciją, ankstyvo OA progresavimą (Armiento et al. 2019; Cui ir Zhang 2022).

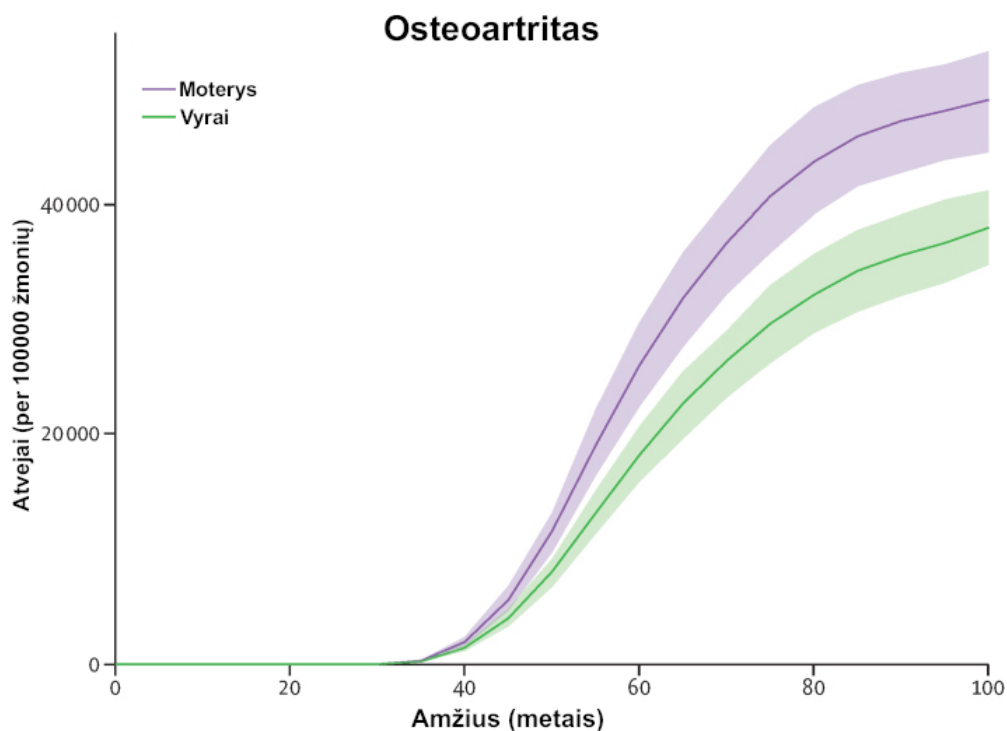


1.2. pav. Sąnario kremzlės struktūros schema, vaizduojanti kelio sąnario anatomiją, kremzlės zonas, užląstelinio užpildo išsidėstymą, jame esančius komponentus, proteoglikano agrekano struktūrą bei jo ir kolageno sąveikas su chondrocitais (Adaptuota pagal Bačenkova et al. 2023).

Chondrocitai yra KČMKL kilmės pilnai diferencijuotos ląstelės, kurių pagrindinė funkcija yra sintetinti kremzlės užląstelinį užpildą ir taip palaikyti stabilią audinio homeostazę (Chen et al. 2021). Jų tankis ir kiekis audinyje skiriasi pagal sluoksnius ir kremzlės gylį. Subrendę chondrocitai išsidėsto imobilizuotose struktūrose vadinamose chondronais, kurių daugiausia vidurinėje kremzlės zonoje. Giliausioje zonoje artėjant kaulo chondrocitai padidėja – tampa hipertrofiniais, nustoja dalintis ir vietoje I ar II tipo kolageno pradeda sintetinti trumpesnių grandinių X tipo kolageną, kuris būdingas kremzlės mineralizacijai ir kaulėjimo procesui (Fox et al. 2009; Armiento et al. 2019). Chondrocitų homeostazės, kremzlės anabolizmo ir katabolizmo pusiausvyrą yra gana jautri išoriniams veiksniams. Disbalansas tarp abiejų procesų gali sukelti kremzlės defektus arba degeneraciją. Už kremzlės katabolizmą pagrįnde atsakingi endogeniniai fermentai matrikso metaloproteinazės (angl. *Matrix Metalloproteinases* MMPs) tokios kaip kolagenazė ir gelatinazė (Fox et al. 2009). Jas stimuliuoja prouždegiminiai citokinai kaip interleukinas 1 (IL-1) ir navikų nekrozės faktorius α (angl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*, TNF- α) (Mehana et al. 2019). Kremzlės pažaidų metu, chondrocitai ir sinoviocitai išskiria šiuos citokinus, kurie sukelia uždegiminę kaskadą, aktyvuoja MMP ir dar labiau skatina kremzlės katabolizmą ir suirimą (Rose ir Kooyman 2016).

1.3. Osteoartritas ir kremzlės regeneracijos būdai

Osteoartritas (OA) yra dažniausiai paplitusi lėtinė kremzlės ir sąnarių degeneracinė liga. 2020 metų duomenimis, 595 milijonai arba 7,6 % žmonių populiacijos pasaulyje sirgo osteoartritu – tai yra 132 % didesnis sergamumas palyginus su 1990 m. duomenimis (256 milijonai žmonių) (GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators, 2023). Dažniausia OA priežastis yra fiziniai pažeidimai arba senėjimas, dėl kurių pradeda degeneruoti sąnario kremzlės paviršius, judėjimo metu kaulai pradeda trintis vienas į kitą, formuoja ataugas vadinamas osteofitais. Kelio sąnario osteoartritas yra dažniausiai pasitaikanti OA forma. (March et al. 2014; Turkiewicz et al. 2014; GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators, 2023). Sergantieji patiria sunkumus fizinės veiklos ir judėjimo metu, jaučia chronišką skausmą ir priklausomai nuo ligos stadijos gali tapti neįgaliais (Armiento et al. 2019). Rizikos faktoriai OA vystymuisi yra amžius (**1.3. pav.**), genetinis polinkis, lytis (moterys dažniau serga osteoartritu), fizinio aktyvumo trūkumas – arba atvirkščiai, itin dideliu fiziniu aktyvumu pasižyminti veikla, kuri gali sukelti fizinę traumą. Su OA sergamumu ir gyvenimo kokybės sumažėjimu taip pat siejamos kitos dažnos gretutinės ligos/sutrikimai kaip nutukimas, kraujagyslių ligos ar diabetas (Prieto-Alhambra et al. 2014; Hunter ir Bierma-Zeinstra 2019; Kamps et al. 2023).



1.3. pav. Osteoartrito (OA) sergamumo atvejai per 100 tūkst. žmonių pagal amžių ir lytį. (Adaptuota pagal GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators, 2023).

Šiuo metu OA gydymas yra dažnai paliatyvus (skirtas palengvinti ligos simptomus ir diskomfortą), negeba pilnai sustabdyti sąnario degeneracijos. Vaistai įprastai naudojami skausmo palengvinimui ir uždegimo sumažinimui, tačiau negydo pačios ligos progresijos. Daugeliui pacientų galiausiai reikalinga pilna sąnario keitimo operacija – artroplastija. (Kwon et al. 2019; Bačenková et al. 2023)

Iki šiol nėra patvirtintų ligą modifikuojančių vaistų nuo OA (Armiento et al. 2019), o taikomos chirurginės intervencijos ar terapijos turi savitų trūkumų arba nepakankamo efektyvumo pacientams ilgalaikėje perspektyvoje. Gydymo metodų tobulinimas dažnai ribojamas dideliu kiekiu rizikos faktorių ir nuo individualių pacientų priklausoma skirtinga ligos progresija, taip pat nepakankamu sėkmingumu bandant tyrimus perkelti iš *in vitro*, gyvūnų modelių į klinikinius bandymus ir taikymą pacientams. Kremzlinio audinio ypatumai taip pat sukelia problemų, kadangi kremzlė natūraliai turi menką gebėjimą regeneruoti – medžiagų apykaita lėta dėl kraujagyslių, limfagyslių nebuvimo, audinys turi mažą kiekį ląstelių, kurios imobilizuotos užląsteliniam užpilde, o MKL, esančios kaulų čiulpuose, priklausomai nuo pažaidos dydžio dažnai irgi negeba pakankamu pajėgumu sustabdyti uždegimo ar degeneracijos procesus (Mobasher et al. 2014)

Dabartiniai metodai kremzlės defektų gydymui dažnai reikalauja chirurginės intervencijos, tačiau nuolat nagrinėjami ir tobulinami mažiau invaziniai būdai, ląstelių terapija ir audinių inžinerijos panaudojimas gydymui. (Kwon et al. 2019). Autologiniai kremzlės transplantai vienas iš klasikinių būdų, kai dalis sveikos kremzlės išoperuojama iš vietos kuri nepatiria didelio mechaninio streso ir

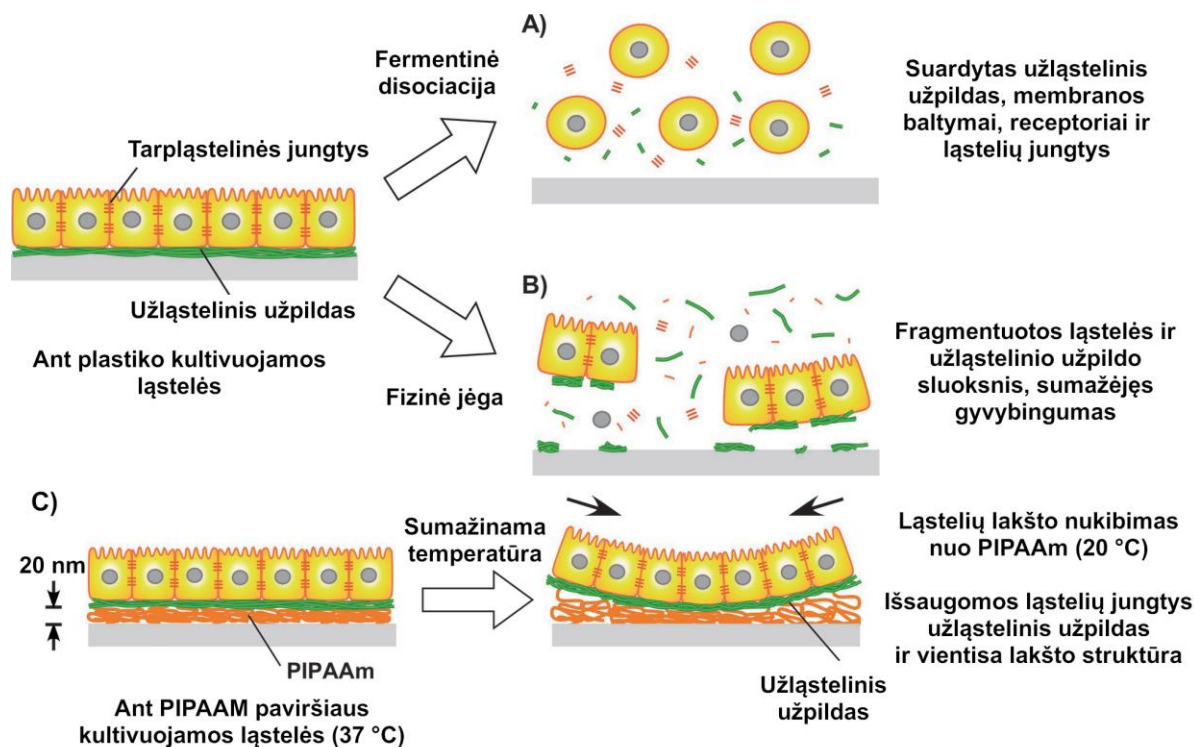
transplantuojama į pažeistą kremzlę. Šie osteochondriniai transplantai gali atlaikyti didesnę mechaninę apkrovą ankstyvajame pooperaciniame laikotarpyje palyginus su kitomis sukurtomis kremzlės atstatymo strategijomis, reabilitacija vyksta greičiau, tačiau dėl mažo ląstelių kiekio ir transplantuojamos kremzlės prieinamumo organizme, jis naudojamas mažiems defektams ir šiais laikais taikomas rečiau. (Kwon et al. 2019). Kitas būdas, kurio metu į pažeistą kremzlę tiesiogiai suleidžiami chondrocitai vadinamas autologine chondrocitų implantacija (ACI). Šiam metodui reikalingos dvi operacijos – pirmosios operacijos metu surenkami sveikos kremzlės chondrocitai, *in vitro* vykdomas ląstelių auginimas ir pagausinimas, vėliau antros operacijos metu jie suleidžiami į pažeistą sąnario vietą. (Mobasheri et al. 2014; Kwon et al. 2019). Šis metodas vėliau buvo patobulintas karkasų pagalba, pavadintas matrikso indukuota autologinių chondrocitų implantacija (MACI, angl. Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation). Jis pasižymi didesne biointegracija su kremzle, pooperacine reabilitacine sėkme ir geresne kremzlės funkcija (Jones ir Cash 2019). Kaulų čiulpų stimuliacija, dar kitaip vadinama mikrolūžių metodu, yra taip pat vienas iš dažniau naudojamų metodų, kai sukuriamos mažos skylutės pokremzlinėje kaulo dalyje. Tai skatina kaulų čiulpų ląstelių migraciją, gijimą ir kresėjimą, tačiau po chirurginės intervencijos natūraliai sugijusi kremzlė dažnai pasižymi skaidulinės kremzlės savybėmis, kurios nėra pritaikytos sąnario funkcijoms ir mechaniniam stresui – tai gali sukelti papildomus nepatogumus pacientui, turi tolesnės degeneracijos riziką po tam tikro laiko (Kwon et al. 2019; Armiento et al. 2019; Bačenková et al. 2023). Norint pasiekti efektyvesnių rezultatų, kuriomis būtų atkurta sveika hialininė kremzlė, svarbu ieškoti papildomų alternatyvų.

1.4. Ląstelių lakštų modelis kremzlės regeneracijai

Ląstelių lakštų technologija yra pastaruosius kelis dešimtmečius sparčiai populiarėjantis metodas audinių inžinerijos srityje. Šis metodas buvo sukurtas Japonijoje, kai 1990 metais mokslininkai pradėjo tyrinėti termoreaktyvų polimerą poli(N-izopropilakrilamidą) (PIPAAm) ir jo savybių potencialų panaudojimą ląstelių kultivavime (Yamada et al. 1990), o 1999 metais sėkmingai sugebėjo atkabinti endotelio ląstelių monosluoksnį nuo kieto paviršiaus, padengto šiuo polimeru be įprastų proteolitinių fermentų kaip tripsino pagalbos – tiesiog sumažinant inkubacijos temperatūrą (Kushida et al. 1999).

PIPAAm yra temperatūrai jautrus polimeras, kuris pasižymi hidrofobinėmis savybėmis aukštesnėje 32 °C temperatūroje (puikiai tinka *in vitro* žmogaus ląstelių kultivavime, kadangi jos augina mos ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje), prie jo paviršiaus geba prisitvirtinti ir augti adhezinės ląstelės, o sumažinus temperatūrą žemiau 25 °C polimeras įgauna hidrofilines savybes – ląstelės ir jų monosluoksnis pradeda atsiskirti nuo paviršiaus (Kushida et al. 1999; Yamato ir Okano 2004; Matsuda et al. 2007; Kobayashi et al. 2019) (**1.4. pav.**). Ląstelių lakštų metodas paremtas tuo, jog užauginti ir nukabinti lakštai išlaiko visą natūralią struktūrą – ląstelių mikroaplinką, ląsteles jų paviršiaus

baltymais, receptoriais ir tarpląstelinėmis jungtimis, taip pat susiformavusiu užląstelinio užpildu, kas pagerina ląstelių diferenciaciją kultivavimo metu dėl tarpląstelinio signalų, sumažina mirtingumą po transplantacijos, padidina ląstelių proliferacinį gebėjimą ir padeda joms geriau integruotis į recipiento audinį (Yamato ir Okano 2004; Zurina et al. 2023).



1.4. pav. Ląstelių lakštų technologija palyginus su įprastais ląstelių nukabinimo metodais: A) Fermentinės disociacijos metu suardomos tarpląstelinės jungtys, paviršiaus receptoriai ir baltymai, nelieta užląstelinio užpildo. B) Fizinio nukabinimo metu miršta dalis ląstelių, suskaldomas užląstelinis užpildas ir ląstelių jungtys. C) Ląstelės auginamos ant PIPAAm polimero, kuris 37 °C temperatūroje hidrofobiškas ir veikia kaip kietas paviršius ląstelėms prisitvirtinti ir augti; Sumažinus temperatūrą iki 20 °C PIPAAm tampa hidrofiliškas, ląstelių sluoksnis nuo jo atsikabina kaip vientisa struktūra su pilnu užląstelinio užpildu, tarpląstelinėmis jungtimis ir komponentais (Adaptuota pagal Kobayashi et al. 2019)

Tai yra audinių inžinerijos metodas, nereikalaujantis karkasų ar papildomų sintetinių struktūrų konstravimo (apart PIPAAm padengto paviršiaus kultivacijos metu), taip išvengiantis problemų susijusių su ląstelių-karkasų modeliais ir jų taikymu. Dažni apribojimai ir kliūtys su karkasų modeliais būna prastos mechaninės savybės ir biodegradabilumas paciento organizme, karkaso imunogeniškumas, pakitusios ląstelių funkcijos ir signaliniai keliai sąveikaujant su bioveikliais komponentais, natūralaus užląstelinio užpildo trūkumas (Ge et al. 2015; Chan et al. 2020; Shahin-Shamsabadi ir Capuccitti 2023).

Ląstelių lakštai yra struktūros, kurios turi platų pritaikymą regeneracinėje medicinoje. Jie tiriama *in vitro* ir *in vivo* eksperimentuose įvairių organų ir audinių taikymui – odos epidermio, kaulų, raumenų, kremzlės, širdies ir kraujagyslių, akies ragenos ir kitų (Matsuda et al. 2007; Moschouris et al. 2016; Yamamoto et al. 2017; Zurina et al. 2023). Žinomi vykdyti sėkmingi gyvūnų eksperimentai

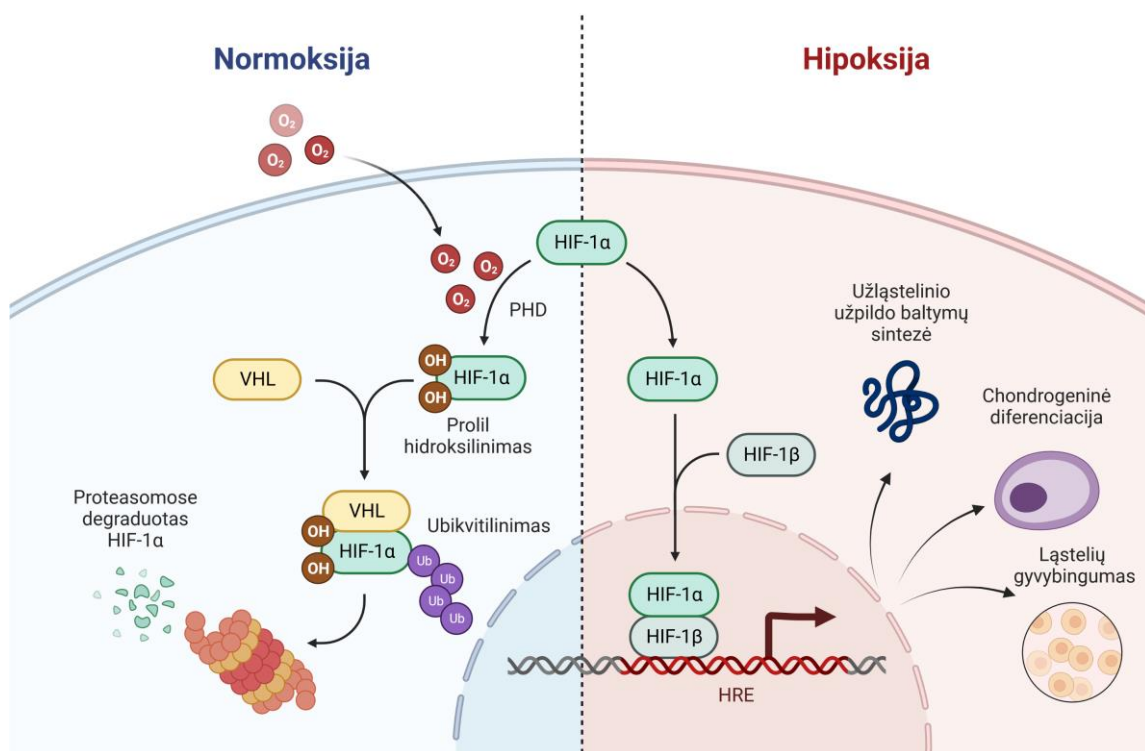
ir klinikiniai tyrimai su žmonėmis, ląstelių lakštais regeneruojant širdies raumenį, rageną, stemplę, plaučius, sąnarius, vidinės ausies struktūras (Ge et al. 2015; Kameishi et al. 2015; Firoozi ir Kang 2016; Kobayashi et al. 2019; De Pieri et al. 2021). Dar 2002 m., vos pradėjus vystyti šią technologiją, atliktas klinikinis bandymas su akies ragenos regeneracija autologinių diferencijuotų ląstelių lakštais parodė sėkmingus rezultatus pacientuose be papildomų komplikacijų po transplantacijos praėjus 14 mėnesiams (Nishida et al. 2002). Priklausomai nuo pažaidos storio ir audinio savybių, ląstelių lakštai dažnai yra sluoksniuojami – aprašyti sėkmingai atlikti tyrimai kuriant keletą lakštų struktūras, tai padidina transplantato dydį, ląstelių skaičių ir tankį, įrodyta jog sluoksniuojami lakštai gali geriau skatinti audinių regeneraciją (Yang et al. 2005; aneshiro et al. 2006; De Pieri et al. 2021; Zurina et al. 2023).

Kalbant apie ląstelių lakštų naudojimą kremzlės regeneracijai – žinoma, jog monosluoksnių kultūrose kultivuojami chondrocitai linkę dediferencijuoti – vietoje apvalios, ovalo formos morfologija ir fenotipas keičiasi panašesnė į fibroblastų, vietoje II tipo kolageno, didėja I ir III tipo kolageno sintezė (Lafont 2010). Gali pasireikšti ir chondrocitų hipertrofija, X tipo kolageno sintezė, kuri nepalanki chondrogenizei ir ląstelių taikymui regeneracijai siekiant užauginti hialininės kremzlės savybių turintį transplantatą (Otero et al. 2012; Fox et al. 2009). Ląstelių lakštų technologija ir užląstelinio užpildo išlaikymas pagerina chondrogenezę – įrodyta, jog ląstelių lakštų modelyje užauginti chondrocitai palyginus su monosluoksniais išlaiko geresnį kremzlinį fenotipą, turi didesnę kremzlės komponentų raišką (SOX9, II tipo kolageno, agrekano, fibronektino) (Mitani et al. 2009; Sato et al. 2014; Thorp et al. 2020). Aprašytas ir tyrimas, kurio metu ląstelių lakštai buvo naudojami kartu su įprastomis chirurginėmis procedūromis kremzlės regeneracijai, su sėkmingais rezultatais 36 mėnesių po operacijos (Sato et al. 2019). Ląstelių lakštai itin aktualūs paviršinėms sąnario hialininės kremzlės pažaidoms, kadangi lakšto forma ir savybės gali veikti tarsi pleistras ant degeneruojančios kremzlės paviršiaus (Thorp et al. 2020).

1.5. Kremzlės fizioksija ir hipoksijos indukuojami veiksniai

Visuose žmogaus audiniuose ir organuose vyrauja mažesnė nei atmosferos deguonies koncentracija (21 % O₂) – tai vadinama fiziologine hipoksija arba kitaip fizioksija (Scete 2005). Tai reiškia jog įprastos atmosferinio deguonies ląstelių kultivavimo sąlygos, dažnai tyrimuose vadinamos normoksija, iš tiesų yra hiperoksinės, kas gali turėti skirtingą arba tam tikrais atvejais net žalingą poveikį ląstelių homeostazei palyginant su natūralia jų *in vivo* aplinka (Mirchandani et al. 2024). Molekuliame lygmenyje deguonies pokyčiai ir ląstelių atsakas į juos yra kontroliuojamas hipoksijos indukuojamų veiksnių HIF (angl. Hypoxia-Inducible Factors). Tai yra transkripcijos veiksniai, jautrūs deguonies koncentracijai, gebantys indukuoti pokyčius specifinių genų transkripcijoje, signaliniuose keliuose, sukelti potransliacines modifikacijas – jie dažniausiai susiję su ląstelių prisitaikymu riboto

deguonies kiekio aplinkoje ir įvairiais metabolizmo pokyčiais (Scete 2005; Mirchandani, Sanchez-Garia ir Walmsley 2024). Labiausiai tyrinėjamas ir plačiausiai aprašytas HIF šeimos veiksnys yra HIF-1. Normoksijos sąlygomis, kai ląstelių užląstelinėje aplinkoje ir citoplazmoje yra didelis kiekis deguonies, HIF-1 α subvienetas yra hidroksilinamas O₂ aktyvinamų fermentų prolinio hidroksilazių (PHD). Šias modifikacijas atpažįsta Von Hippel-Lindau baltymas (VHL), kuris ubikvitilina hidroksilintą HIF-1 α subvienetą ir jis galiausiai suskaidomas proteasomose. Hipoksinėje aplinkoje (< 5 % O₂), kai PHD veikla slopinama dėl deguonies trūkumo, HIF-1 α lieka stabilus, iš citoplazmos sėkmingai translokuojamas į branduolį ir suformuoja kompleksą su HIF-1 β . Susiformavęs HIF-1 dimeras prisijungia prie DNR hipoksijos atsako elementų (HRE, angl. Hypoxia Response Elements), kuriais gali modifikuoti specifinių genų raišką (**1.5. pav.**) (Jiang et al. 1996; Lafont 2010; Semenza 2012; Shang, et al. 2014; Pattappa et al. 2019; Arai et al. 2024).



1.5. pav. Hipoksijos indukuojamo veiksnio HIF-1 mechanizmas priklausomai nuo deguonies sąlygų. Normoksijoje – HIF-1 α subvienetas yra hidroksilinamas prolinio hidroksilazės PHD, ubikvitilinas VHL baltymo ir nukreipiamas į proteasomą degradacijai. Hipoksijoje – HIF-1 α subvienetas lieka stabilus dėl PHD neveiklumo esant deguonies trūkumui, translokuojamas į branduolį ir su HIF-1 β subvienetu sudaro HIF-1 dimerą. HIF-1 vykdo genų transkripciją per HRE (hipoksijos atsako elementų) sekas. (Sukurta Biorender.com).

Kadangi kremzlinis audinys neturi kraujagyslių, natūraliai kremzlėje vyrauja apie 1 – 5 % O₂ gradientas, su stiprėjančia hipoksija nuo paviršinės ties gilesnėmis zonomis (Pattappa et al. 2019; Pattappa et al. 2020). Žinoma, jog fizioksija yra biocheminis signalas, kuris itin svarbus užląsteliniam užpildui ir jo sintezei, homeostazei bei chondrogeninei ląstelių diferenciacijai. Chondrogeninė diferenciacija ląstelėse įprastai įvertinama tiriant chondrogeninių genų ir transkripcijos veiksmų raišką,

užląstelinio užpildo sintezę ir jos komponentus – visi aspektai, kurie yra modifikuojami fizioksisijos ir HIF veiksmų (Duval et al 2012; Shang, Liu ir Zhou 2014). Sumažinta deguonies koncentracija gali paskatinti stabilų chondrocitų fenotipą, todėl fizioksisijos svarba ir jos mechanizmų nagrinėjimas kremzliniame audinyje gali padėti patobulinti dabartinius ląstelių kultivavimo, diferenciacijos ir audinių inžinerijos metodus norint juos pritaikyti regeneracinės medicinos tikslams (Pattappa et al. 2019; Loo et al. 2021).

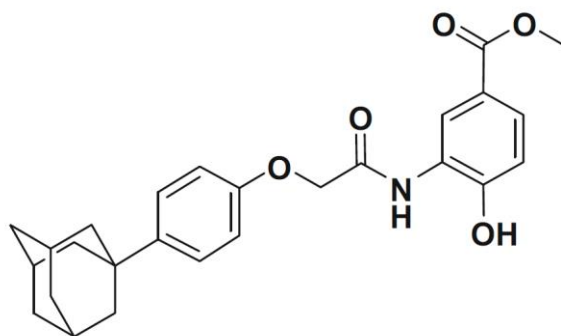
Fizioksisijos taikymas chondrogeninei diferenciacijai nėra visiškai naujas dalykas, bet dėl didelio skaičiaus tarpusavyje susijusių veiksmų, papildomų sąlygų ir ląstelių modelių, kuriems galima taikyti fizioksisiją, iki šiol nėra gerai išnagrinėti visi su hipoksija ir HIF susiję mechanizmai. Iki šiol vykdomi tyrimai rodo daugiausiai teigiamą 1 – 5 % O₂ fizioksisijos efektą ir KČMKL ir pirminių chondrocitų augimui, kultivacijai, (re)diferenciacijai bei chondrogenezės procesui (Basciano et al 2011; Sheehy, Buckley ir Kelly 2012; Markway, Cho ir Johnstone 2013). *In vitro* kultūrose, kultivuotose fizioksisijos sąlygomis, MKL parodė didesnę polinkį chondrogenezės genų (*SOX9*, *COL2A1*, *ACAN*) raiškai, II tipo kolageno ir GAG sintezei (Krinner et al 2009; Duval et al 2012; Shang, Liu ir Zhou 2014; Dennis et al. 2020; Pattappa et al 2020). Hipoksinės sąlygos lemia HIF-1 stabilizaciją ląstelėse – tai aktyvuoja Notch ir Wnt signalinius kelius, kurie svarbūs ir skatina ląstelių diferenciaciją. Yra aprašyta, kad HIF-1 α baltymas geba tiesiogiai prisijungti ir moduluoti chondrogeninės diferenciacijos veiksmus Sox (Samal et al. 2021). Chondrocitai kultivuoti fizioksisijos sąlygomis pasižymėjo žymiai padidėjusia chondrogeninių genų raiška (*COL2A1*, *COL11A2*, *COL9A1*, *ACAN*, *SOX9*, *PRG4*), sumažėjusiu X tipo kolageno kiekiu užląsteliniam užpilde, didesne proteoglikanų sinteze, nuslopinta MMP kolagenazių ir agrekanazių bei uždegiminių citokinų IL-1, TNF- α veikla (Bentovim, Amarilio ir Zelzer 2012; Shang, Liu ir Zhou 2014; Kokubo et al. 2016; Anderson et al. 2018; Pattappa et al. 2019). MKL reoksigenacija (deguonies kiekio padidėjimas iki normoksijos) po chondrogeninės diferenciacijos fizioksisijos sąlygomis parodė efektą, panašų į ankstyvo OA vystymąsi. *In vitro* eksperimentai parodė, kad deguonies koncentracijos šuolis ir oksidacinis stresas po ilgo laiko fizioksisijos sukėlė užląstelinio užpildo GAG katabolizmą, MMP raiškos padidėjimą (Pattappa et al. 2019). Šis faktas parodo fizioksisijos svarbą ne tik pačios diferenciacijos metu, bet ir susiformavusios kremzlės tolesnėje homeostazėje.

1.6. HIF-1 α slopiklis LW6 ir jo veikimo charakteristika

Hipoksijos indukuojamų veiksmų atradimas ir jų sukeltos genų raiškos modifikacijos taip pat sukėlė susidomėjimą šiais veiksniais kaip vaistų taikiniams. Kadangi HIF-1 atlieka svarbų vaidmenį ląstelių prisitaikyme prie hipoksijos, tai reiškia jog priklausomai nuo konteksto – pavyzdžiui vėžiniame navike, kuriame vyrauja stipri hipoksija, HIF aktyvacija nėra palanki ir apsunkina vėžio

gydymą. Kuriamos ir ieškomos įvairios molekulės, kurios veikia kaip HIF slopikliai, skirti onkologinių ligų terapijai siekiant sulėtinti vėžio progresiją, angiogenezę, nuslopinti vėžinių ląstelių metaboles funkcijas arba sukelti jų apoptozę navikų mikroaplinkoje. (Naik, Han ir Lee 2015; Ikeda ir Kakeya 2021)

Vienas iš šių slopiklių yra sintetinė molekulė 3-(2-(4-adamantan-1-ilfenoksi)-acetilamino)-4 hidroksibenzoinės rūgšties metil esteris, vadinamas trumpiniu LW6 (**1.6. pav.**). Iki šiol LW6 nėra pilnai išnagrinėtas HIF-1 slopiklis, bet ankstesniais tyrimais žinoma, jog jis turi bent kelis taikinius, kurių dėka vykdo slopiklio funkciją. LW6 slopina HIF-1 α susikaupimą ląstelėse ir skatina jo degradaciją proteasomose per VHL raiškos aktyvinimą (Lee et al. 2010), tiesiogiai prisijungia prie fermento malato dehidrogenazės 2 (MDH2), kuris dalyvauja grįžtamoje malato/oksaloacetato sintezės reakcijoje svarbioje Krebso cikle. MDH2 slopinimas stabdo Krebso ciklą ir sutrikdo mitochondrinę ląstelių kvėpavimą, deguonies suvartojimą. Tai padidina deguonies kiekį ląstelėse ir HIF-1 α degraduojamas PHD ir VHL mechanizmų (Lee et al 2013; Naik et al. 2014; Eleftheriadis et al 2015; Ban et al. 2016). Viename tyrime taip pat aprašyta jog LW6 galimai sumažina mitochondrijų membranos potencialą, skatina padidėjusį ROS susidarymą ląstelėse ir oksidacinį stresą, tačiau galutinis efektas irgi trikdo mitochondrijų veiklą, oksidacinį fosforilinimą ir deguonies susikaupimą ląstelėse, kas skatina HIF-1 α degradaciją (Sato et al. 2015). Iki šiol visi minėti tyrimai vykdyti pagrinde su vėžinėmis arba imuninėmis ląstelėmis su LW6 kaip potencialiu priešvėžiniu vaistu, tad LW6 ir jo slopinimo mechanizmai nėra gerai ištyrinėti kituose ląstelių tipuose.



1.6. pav. HIF-1 α slopiklio LW6 cheminė struktūra (cheminė formulė 3-(2-(4-adamantan-1-ilfenoksi)-acetilamino)-4 hidroksibenzoinės rūgšties metil esteris) (Pagal Naik, Han ir Lee 2015).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

Pilna ląstelių augimo terpė buvo paruošta naudojant 1 g/L gliukozės koncentracijos DMEM terpę (angl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Capricorn Scientific), papildytą 1 % antibiotikais penicilinu ir streptomycinu (PS, 10,000 U/mL) (Gibco) bei 10 % fetalinio jaučio serumu (FBS, angl. *Fetal bovine serum*) (Gibco).

Ląstelių chondrogeninę diferenciaciją skatinanti terpė buvo paruošta naudojant 4,5 g/L gliukozės koncentracijos DMEM terpę (Capricorn Scientific), papildytą 1 % insulino, transferino, selenio, etanolamino tirpalo (ITS-X, 100x) (Gibco), 1 μ M deksametazono (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL L-askorbo rūgšties 2-fosfato (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL prolino (Sigma-Aldrich), 1 % penicilino ir streptomicino (PS, 10,000 U/mL) (Gibco) ir 10 ng/mL augimo veiksnio TGF- β 3 (Invitrogen).

HIF-1 α slopiklis LW6 pirktas iš Santa Cruz Biotechnology ir naudojimui ištirpintas DMSO (Sigma-Aldrich).

KČMKL ir chondrocitai tyrimams, kuriems buvo reikalingos fizioksinės sąlygos, buvo kultivuojami uždaroje erdvės hipoksijos kameroje BioSpherix Xvivo System Model X3 (BioSpherix) ir joje esančiame inkubatoriuje su pastovia 37 °C temperatūra, 5 % O₂ ir 5 % CO₂ koncentracija.

Mėginių sugerties matavimams eksperimentų metu buvo naudotas plokštelių skaitytuvas SpectraMax i3 Microplate Reader (Molecular Devices).

Visiems eksperimentams ir tyrimams su žmonių audiniais ir jų kilmės ląstelėmis yra gautas bioetikos komiteto patvirtinimas, leidimas ir pacientų pasirašytos sutikimo formos (leidimo numeris 158200-14-741-257).

2.2. Metodai

2.2.1. Ląstelių išskyrimas ir kultivavimas

KČMKL ir chondrocitai išskiriami ir kultivuojami pagal anksčiau apibūdintus laboratorijoje naudojamus metodus (Uzieliene 2019; Uzieliene 2021). Po chirurginės intervencijos kaulų čiulpai ir kremzlės mėginiai buvo gauti iš Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos po chirurginių operacijų. KČMKL buvo išskirtos iš 28 - 32 amžiaus moterų (n = 5), o chondrocitai buvo išskirti iš 40 - 82 amžiaus moterų (n = 5).

Chondrocitų išskyrimas iš kremzlės:

Kremzlės fragmentai perkeliama į Petri lėkštelę ir plaunami fosfatinio buferio tirpalu (PBS) su 2 % antibiotikų mišiniu – penicilinu/streptomycinu (PS). Naudojant sterilų skalpelį, kremzlė supjaustoma gabalėliais, perkeliama juos į kitą sterilią Petri lėkštelę ir susmulkinama į mažus 1–3 mm gabalėlius, kurie yra sveriami. Pasvėrus kremzlės gabaliukus, jie inkubuojami per naktį 1 g/L gliukozės

koncentracijos DMEM terpėje inkubatoriuje su 37 °C temperatūra ir 5 % CO₂. Kitą dieną kremzlės gabalėliai plaunami PBS ir valandą inkubuojami pronazės tirpale (26,5 U/mL) 37 °C temperatūroje ir 5 % CO₂. Kremzlės gabalėliai du kartus praplaunami PBS, susmulkinami į dar mažesnius gabalėlius ir perkeliama į 50 mL mėgintuvėlį, kuriame chondrocitai išskiriami apdorojant kremzlę II tipo kolagenaze. 1 g kremzlės paruošiama 10 mL II tipo kolagenazės tirpalo (545 U/mL). Kremzlės gabaliukai inkubuojami 37 °C temperatūroje ir 5 % CO₂ apie 3-4 valandas su nuolatiniu purtymu. Po inkubacijos tirpalas filtruojamas pro 100 µm ir 70 µm ląstelių filtrus. Fermentinis kolagenazės aktyvumas sustabdomas pridėdant dvigubą tūrį pilnos DMEM augimo terpės. Ląstelių filtratas centrifuguojamas 5 minutes 400 × g, pašalinamas supernatantas o ląstelių peletas suspenduojamas pilnoje DMEM terpėje. Surinkti chondrocitai skaičiuojami hemocitometro pagalba ir išsėjami į kultivavimo flakonus (75 cm²) po 400 ląstelių, toliau inkubuojami ir auginami inkubatoriuje su 37 °C temperatūra ir 5 % CO₂.

KČMKL išskyrimas iš kaulų fragmentų:

Gauti kaulų mėginiai yra perkeliama į sterilias Petrį lėkšteles ir plaunami PBS tirpalu. Kaulų čiulpai atskiriami nuo kaulo steriliu skalpeliu. Į kaulų čiulpus pridedama 1 g/L gliukozės DMEM terpė, jie susmulkinami ir filtruojami pro 100 µm ląstelių filtrus. Ląstelių lizatas centrifuguojamas 10 min × 350 g, supernatantas pašalinamas ir ląstelių peletas suspenduojamas MKL terpėje – mezenchiminėje kamieninių ląstelių bazinėje terpėje (MSCBM), papildytoje 10 % FBS, 1 % PS ir 1 ng/mL fibroblastų augimo veiksnio 2 (FGF-2, angl. *Fibroblast Growth Factor 2*). Surinktos KČMKL suskaičiuojamos naudojant hemocitometrą ir išsėjamos į kultivavimo flakonus (75 cm²) po 400 ląstelių į flakoną su MKL terpe, toliau inkubuojamos ir auginamos inkubatoriuje su 37 °C temperatūra ir 5 % CO₂.

KČMKL ir chondrocitams pasiekus tinkamą konfluenciją (padengus apie 80-90 % indo paviršiaus), ląstelės yra nukabinamos, užšaldomos arba panaudojamos tyrimams. Terpės flakonuose keičiamos du kartus per savaitę, plokštelėse 3 kartus per savaitę, ląstelės persėjamos arba naudojamos eksperimentams pasiekus ≥ 80 % konfluenciją. Visuose eksperimentuose buvo naudojami ląstelių pasažai iki p = 5.

Ląstelių nukabinimas, skaičiavimas, užšaldymas:

Ląstelėms pasiekus ~ 80 % konfluenciją, jos nukabinamos – pašalinama pilna terpė, ląstelės praplaunamos PBS tirpalu ir pridedamas 0,25 % tripsino-EDTA tirpalas (Gibco) (50 µL/cm²). Ląstelės su tripsino tirpalu inkubuojamos ne daugiau 5 minučių 37 °C inkubatoriuje su 5 % CO₂, tripsino poveikis ląstelėms nuslopinamas pridėdant pilnos DMEM terpės 1:1 santykiu. Nukabintos ląstelės perkeliama į 15 mL mėgintuvėlį, kuris centrifuguojamas 5 min 500 × g. Pašalinamas supernatantas, likęs ląstelių peletas resuspenduojamas pilnoje DMEM terpėje ir ląstelės suskaičiuojamos naudojant hemocitometrą.

Norint užšaldyti ląsteles, pirma pagal reikiamą tūri paruošiama šaldymo terpė – 30% 1 g/L gliukozės DMEM, 50 % FBS (Gibco) ir 20% DMSO (Sigma-Aldrich). Nukabintos ląstelės perkeliomos į šaldymo (Cryo) mėgintuvėlius (1 mln. ląstelių 1 mėgintuvėlyje) ir suspenduojamos su 1:1 santykiu pilnos DMEM augimo terpės ir šaldymo terpės. Mėgintuvėlis(-iai) dedami į šaldymo stovą, kuris perkeliamas į –70 °C temperatūrą, praėjus parai vėl perkeliamas į –150 °C šaldiklį ilgalaikiam saugojimui. Ląstelės atšildomos ir resuspenduojamos į užšaldytas ląsteles pridedant šiltos pilnos DMEM terpės, centrifuguojamos 5 min 500 × g, pašalinus supernatantą išsėjamos į auginimo indus pagal specifinių eksperimentų reikalavimus.

2.2.2. Ląstelių proliferacijos tyrimas

Ląstelių proliferacijos tyrimui KČMKL ir chondrocitai išsėjami į 12 šulinėlių plokšteles (20 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir auginami pilnoje terpėje papildytoje 10 μM slopiklio LW6 normoksijos (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) ir fizioksijos (37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂) sąlygomis 7 dienas. Kontrolės mėginiai – tomis pačiomis sąlygomis be LW6. Po 3-os ir 7-os dienų ląstelės praplaunamos PBS tirpalu ir naujai pakeista terpė papildoma 4 % WST-8 reagentu iš Cell Counting Kit 8 (CCK-8) rinkinio (Dojindo Laboratories). Ląstelės inkubuojamos 3 valandas atitinkamuose normoksijos ir fizioksijos inkubatoriuose, po to surenkama jų terpė ir išmatuojama jos sugertis ties 480 nm spektrofotometrijos būdu. Statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programoje GraphPad Prism 9.

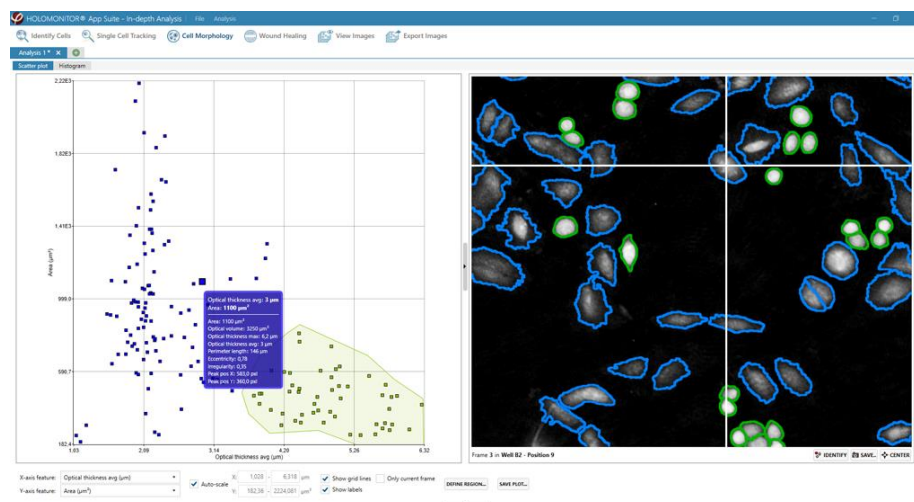
2.2.3. Tėkmės citometrija ląstelių viduląstelinio kalcio jonų tyrimui

Viduląstelinio kalcio jonų tyrimui KČMKL ir chondrocitai išsėjami 6 šulinėlių plokštelėse (200 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir auginami pilnoje terpėje papildytoje 10 μM slopiklio LW6 normoksijos (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) ir fizioksijos (37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂) sąlygomis 7 dienas. Kontrolės mėginiai – tomis pačiomis sąlygomis be LW6. Prieš atliekant tyrimą, ląstelės nukabinamos nuo paviršiaus 0,25 % tripsino-EDTA tirpalu (Gibco), suskaičiuojamos ir perkeliomos į naujus 1,5 mL mėgintuvėlius po 100 tūkst. ląstelių. Šios ląstelės nudažomos 1 μM Cal-520 dažu (Interchim), inkubuojamos kambario temperatūroje 30 minučių ir du kartus nuplaunamos PBS tirpalu prieš matuojant mėginių fluorescenciją tėkmės citometru Luminex Guava easyCyte (Cytex). Cal-520 yra sužadinaamas ties 488 nm, o emisija matuojama ties 520 nm. Matuojant ląsteles, pažymima gyvybingų ląstelių populiacija pagal dydį ir grūdėtumą, vertinant priekinę šviesos sklaidą FSC (angl. *forward scatter*) ir šoninę šviesos sklaidą SSC (angl. *side scatter*), atskiriant ląstelių nuolaužas ir kitas daleles. Atskiriami ląstelių dubletai (susijungusios ląstelės), įvertinama nežymėtų ląstelių autofluorescencija ir pažymimos jos ribos. Tada matuojamos Cal-520 pažymėtos ląstelės. Rezultatų apdorojimas vykdomas programinėje įrangoje FlowJo, vertinant kiekvieno mėginio vidutinį fluorescencijos intensyvumą MFI

(angl. *median fluorescence intensity*) atimant ląstelių autofluorescenciją. Statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programoje GraphPad Prism 9

2.2.4. Holografinė mikroskopija ląstelių migracijos ir judrumo nustatymui

Migracijos ir judrumo tyrimui KČMKL ir chondrocitai išsėjami į 6 šulinėlių plokšteles (30 tūkst. ląstelių šulinėlyje) pilnoje terpėje, terpę papildant 10 μ M slopiklio LW6. Kitą dieną, ląstelės uždengiamos specializuotais stikliniais dangteliais (HoloLids) ir patalpinamos į inkubatorių (37 °C, 21 % O₂ ir 5 % CO₂) gyvų ląstelių vaizdinimo sistemoje HoloMonitor (Phiab). Pasirenkami sistemos programos parametrai pavienių ląstelių sekimui (Single cell tracking), pažymimi visi plokštelėje esantys ląstelių pilni šulinėliai ir konfigūruojamos ląstelių pozicijos pagal bent 8 ląsteles. Buvo pasirinktas 24 val. laikotarpis su ląstelių pozicijos sekimu fotografuojant jas kas 2 valandas. Ląstelių judėjimas sistemoje matuojamas pagal holografinius ląstelių vaizdus, sukurtus lazerinių jutiklių, kuriuos programa atpažįsta ir fiksuoja. Gauti rezultatai yra analizuojami ir apdorojami Phiab programos, atrenkant ląsteles, patekusias į holonuotruokas tyrimo metu. Taip įvertinama ląstelių migracija, judrumas ir judrumo greitis. Papildoma duomenų, statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programose Hstudio ir GraphPad Prism 9.



2.1. pav.. Ląstelių vaizdinimo ir stebėjimo Phiab HoloMonitor sistemoje principas (Vaizdas paimtas iš <https://phiab.com/holomonitor/cell-imaging-software>).

2.2.5. Ląstelių metabolizmo ir ląstelinio kvėpavimo tyrimai

KČMKL ir chondrocitų metabolizmas – ląstelinis kvėpavimas (deguonies suvartojimo greitis, angl. *Oxygen Consumption Rate* (OCR)) ir glikolizės aktyvumas (užląstelinio rūgštėjimo greitis, angl. *Extracellular Acidification Rate* (ECAR)) analizuojami naudojant Seahorse XFp Mito Stress Test ir Seahorse XFp Glycolysis Stress Test rinkinius ir papildomus jų reagentus (Seahorse XF kalibracijos skystį, DMEM terpę, 1 M gliukozės tirpalą, 100 mM piruvato tirpalą ir 200 mM glutamino tirpalą) (Agilent). Ląstelės išsėjamos į 8 šulinėlių Seahorse XFp FluxPak plokšteles (Agilent) (5 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir auginamos normoksijos (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) bei fizioksisijos

(37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂) sąlygomis 3 dienas pilnoje terpėje, su ir be 10 μM slopiklio LW6. Po 3 dienų, plokštelės, reikiamos terpės ir jų sensorinės kasetės buvo paruoštos pagal gamintojo pateiktus protokolus ir įstatytos į Seahorse XF HS Mini metabolizmo analizatorių (Agilent). Matavimai buvo vykdomi pagal gamintojo pateiktus protokolų nustatymus prietaiso sistemoje (Mito Stress Test ir Glycolysis Stress Test). Papildoma duomenų analizė, statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programoje GraphPad Prism 9.

2.2.6. Imunofermentinis tyrimas ELISA baltymui HIF-1α

KČMKL ir chondrocitai išsėjami į 6 šulinėlių plokšteles (50 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir ląstelės auginamos normoksijos (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) bei fizioksijos (37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂) sąlygomis 3 ir 7 dienas pilnoje terpėje, su ir be 10 μM slopiklio LW6. Hipoksijos indukuojamo transkripcijos veiksnio HIF-1 baltymo HIF-1α analizei buvo naudojamas PathScan® Total HIF-1α Sandwich ELISA rinkinys (Cell Signaling Technology). Ląstelės praplaunamos PBS tirpalu, inkubuojamos ant ledo 5 minutes su 1x praskiestu lizės buferiu (Cell Lysis Buffer 10X, Cell Signaling Technology) ir 1x praskiestu proteazių/fosfatazių slopiklių kokteiliu (Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X, Cell Signaling Technology), tada nugremžiamos nuo paviršiaus ir surenkamos į mėgintuvėlį. Lizatas centrifuguojamas 14000 × rpm, 4 °C temperatūroje 10 minučių ir surenkamas jo supernatantas. Imunofermentinis tyrimas buvo vykdomas pagal gamintojo nurodytą protokolą ir jame esančius žingsnius, naudojant neskiestus lizatų mėginius ir su jais inkubuojant plokštelę 2 valandas 37 °C temperatūroje. Pridėjus STOP Solution tirpalo, kuo skubiau spektrofotometrijos būdu išmatuota mėginių sugertis ties 450 nm. Statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programoje GraphPad Prism 9.

2.2.7. Imunofermentinis tyrimas ELISA baltymui VHL

KČMKL ir chondrocitai išsėjami į 6 šulinėlių plokšteles (50 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir ląstelės auginamos normoksijos (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) bei fizioksijos (37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂) sąlygomis 3 ir 7 dienas pilnoje terpėje, su ir be 10 μM slopiklio LW6. Baltymo VHL analizei buvo naudojamas Human Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor (VHL) ELISA rinkinys (Abbexa). Ląstelės surenkamos jas praplaunant 3 kartus PBS tirpalu, nukabinant nuo paviršiaus 0,25 % tripsino-EDTA tirpalu (Gibco) ir nupilant supernatantą po centrifugavimo. Nukabintos ląstelės buvo resuspenduojamos PBS, 3 kartus pakartotinai atšildomos ir užšaldomos -20 °C temperatūroje ir centrifuguojamos 1500 × g, 4 °C temperatūroje 10 minučių, surenkant supernatantą. Reagentų skiedimas, standartų paruošimas ir protokolo žingsniai buvo vykdomi pagal gamintojo pateiktą protokolą, inkubuojant mėginius su TMB substratu 30 minučių prieš pilant Stop Solution tirpalą ir matuojant mėginių sugertį ties 450 nm. Statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programoje GraphPad Prism 9.

2.2.8. Fermento MDH2 ląstelėse aktyvumo tyrimas

KČMKL ir chondrocitai išsėjami į 6 šulinėlių plokšteles (50 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir ląstelės auginamos normoksijos (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) bei fizioksijos (37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂) sąlygomis 3 ir 7 dienas pilnoje terpėje, su ir be 10 μM slopiklio LW6. Fermento MDH2 aktyvumo analizei buvo naudojamas Mitochondrial Malate Dehydrogenase (MDH2) Activity Assay rinkinys (Abcam). Ląstelės praplaunamos PBS tirpalu 2 kartus ir nugremžiamos nuo paviršiaus, tada užpildomos rinkinyje esančiu lizės buferiu Extraction Buffer, papildytu 1x praskiestu proteazių/fosfatazių slopiklių kokteiliu (Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X, Cell Signaling Technology). Reikiami reagentai, tyrimas ir jo žingsniai buvo atlikti pagal gamintojo pateiktą protokolą, matuojant mėginių sugertį po 30 min. kaip galutinio taško (angl. *endpoint*) matavimą vietoje kinetinio matavimo. Statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti programoje GraphPad Prism 9.

2.2.9. Ląstelių chondrogeninės diferenciacijos indukcija ląstelių lakštuose

KČMKL ir chondrocitai išsėjami temperatūrai-reaktyviose PIPAAm polimeru padengtose Nunc™ UpCell™ Surface plokštelėse (Thermo Scientific) (12 šulinėlių plokštelės – 200 tūkst. ląstelių šulinėlyje, 24 šulinėlių plokštelės – 100 tūkst. ląstelių šulinėlyje) ir ląstelės auginamos normoksijos sąlygomis (37 °C su 21 % O₂, 5 % CO₂) pilnoje terpėje iki pilnos konfluencijos. Ląstelėms pasiekus konfluenciją, pilna terpė pakeičiama chondrogeninės diferenciacijos terpe (su ir be 10 μM slopiklio LW6 priklausomai nuo kontrolės ar poveikio mėginio), ir dalis plokštelių perkelta į hipoksijos kamerą su fizioksijos sąlygomis (37 °C su 5 % O₂, 5 % CO₂). Chondrogeninė diferenciacija indukuojama 21 dienas, keičiant terpę 3 kartus per savaitę, o po 21 dienų ląstelių lakštai atkabinami nuo paviršiaus plokšteles laikant kambario temperatūroje (≤ 25 °C) ir lengvai pipetuojant ląstelių lakšto kraštus kol jie pilnai atsikabina.

2.2.10. Ląstelių lakštų RNR išskyrimas

Po 21 dienų chondrogeninės diferenciacijos, ląstelių lakštai praplaunami 2 kartus PBS, surenkami į mėgintuvėlius lizės buferyje RLT su 10% merkaptoetanolio (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) ir laikomi -70 °C temperatūroje iki panaudojimo. RNR buvo išskirta ir išgryninta RNeasy Mini Kit rinkinio ir jame esančių Mini Spin gryninimo kolonų pagalba, sekant gamintojo nurodytas instrukcijas, nemodifikuojant protokolo. RNR koncentracija ir grynumas buvo išmatuoti spektrofotometrijos būdu, toliau RNR mėginiai laikomi -20 °C temperatūroje panaudojimui kopijinės DNR sintezei.

2.2.11. RNR kopijinės DNR sintezė

Išskyrus ir išgryninus ląstelių lakštų RNR mėginius, buvo atliekama kopijinės DNR sintezė rinkinio Maxima First Strand cDNA Synthesis (with dsDNase) pagalba. Kopijinės DNR sintezė ir mėginių paruošimas buvo vykdomi pagal gamintojo pateiktą protokolą, pirmame žingsnyje mėginius

paveikiant dsDNaze, su papildomais kontrolės mėginiais RT- (be fermentų mišinio) ir NTC (be RNR). Reakcijos buvo vykdomos Mastercycler personal (Eppendorf) termocikleryje.

2.2.12. Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR ir genų raiškos analizė

Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR (angl. *Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR*, RT-qPCR) atliekama paruošiant mėginius 3 techniniais replikatais su Maxima Probe qPCR Master Mix (2X) ir TaqMan Real-Time Gene Expression Assay reagentais (Thermo Scientific) pagal jų naudojimo gidą, galutinį vieno mėginio tūrį sumažinant iki 12 µL. PGR reakcijos žingsniai vykdomi QuantStudio 1 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) instrumento pagalba. Reakcijų sąlygos – pradinė denatūracija 95 °C 10 minučių ir 40 ciklų su denatūracija 95 °C 15 sekundžių, prilydymu ir prailginimu 60 °C 60 sekundžių. Eksperimento metu kartu su ląstelių lakštų mėginiais buvo naudojami anksčiau aprašyti kontrolės mėginiai RT- ir NTC, pašalinės DNR užkrato ir reagentų kokybės patikrinimui.

RT-qPCR metu naudojami atskaitos („Housekeeping“) genų *RPS9*, *B2M* pradmenys bei tiriamų genų *SOX9*, *COL2A1* ir *ACAN* pradmenys (Thermo Fisher Scientific, lentelė 2.1). Genų raiškos duomenų analizė buvo atlikta pagal $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodą, statistinė analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atliktas programoje GraphPad Prism 9.

2.1. lentelė. Atvirkštinės transkripcijos kiekybinės PGR metu naudoti genų pradmenys ir jų Assay ID kodai (pradmenys pirkti iš Thermo Fisher Scientific).

Genas	Assay ID
<i>B2M</i> (Beta-2 microglobulin)	Hs00984230_m1
<i>RPS9</i> (Ribosomal Protein S9)	Hs02339424_g1
<i>SOX9</i> (SRY-Box Transcription Factor 9)	Hs00165814_m1
<i>COL2A1</i> (Collagen Type II Alpha 1 Chain)	Hs01060345_m1
<i>ACAN</i> (Aggrecan)	Hs00153936_m1

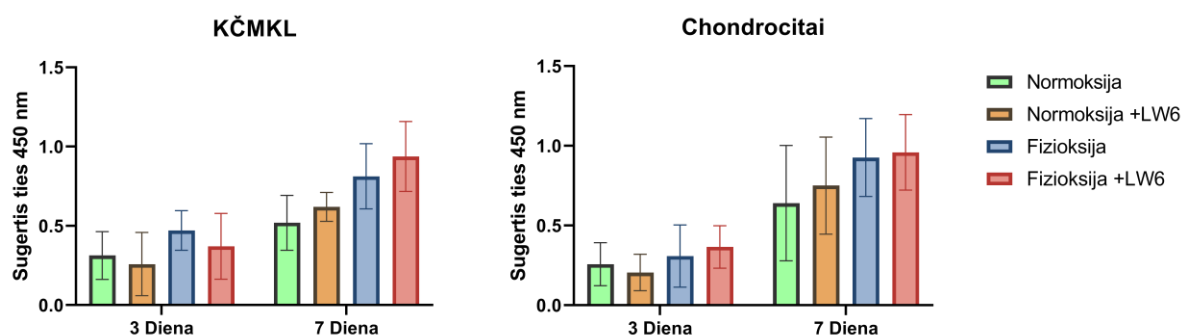
2.2.13. Atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR ir genų raiškos analizė

Statistinė analizė buvo atliekama visoms normalizuotoms imtims, pagal grupes vertinant duomenų statistinį reikšmingumą dvipuse ANOVA (su Tukey post hoc analize). Skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais su p reikšme $\leq 0,05$. Statistinei analizei naudojama programa GraphPad Prism versija 9.

3. Rezultatai

3.1. Ląstelių proliferacija

KČMKL ir chondrocitai buvo auginami normoksijos ir fizioksijos sąlygomis 7 dienas su ir be LW6, tiriant jų proliferaciją ir metabolinį aktyvumą po 3-os ir 7-os dienos. Rezultatai (**pav. 3.1.**) rodo po 3 dienų vidutiniškai padidėjusią proliferaciją/metabolinį aktyvumą KČMKL ir chondrocituose fizioksijoje. Po 7 dienų ir KČMKL ir chondrocituose taip pat buvo stebima padidėjusi proliferacija fizioksinėmis sąlygomis. Slopikliu LW6 paveiktos KČMKL ir chondrocitai pasižymėjo vidutiniškai didesne ląstelių proliferacija po 7 dienų nepaisant deguonies sąlygų.



Ląstelių proliferacija

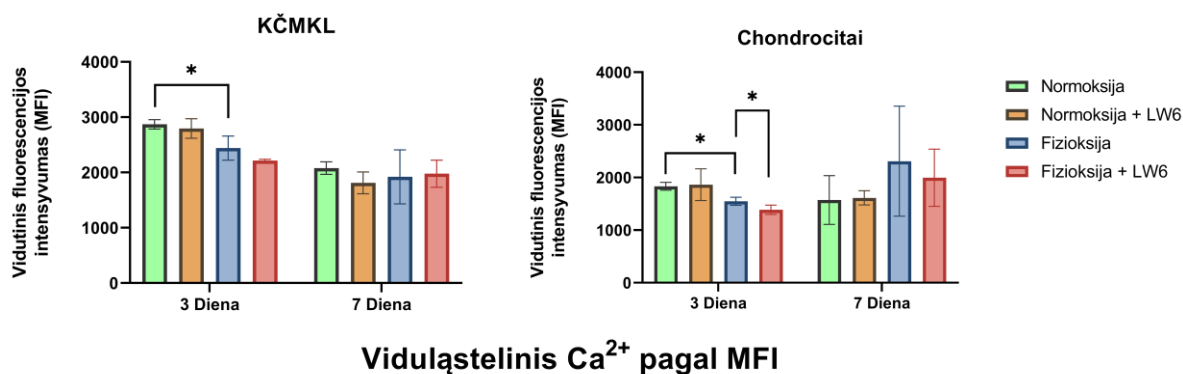
3.1. pav. KČMKL ir chondrocitų proliferacija (CCK-8) po 3 ir 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6. Išmatuota sugertis ties 450 nm (n = 4).

3.2. Viduląstelinio kalcio jonų koncentracijos pokytis su LW6

Atlikus viduląstelinio kalcio jonų (Ca²⁺) tyrimą tėkmės citometrijos būdu su KČMKL ir chondrocitais, 21 dieną juos auginant normoksijos ir fizioksijos sąlygomis su slopikliu LW6, pavaizduoti duomenų rezultatai (**pav. 3.2.**).

Po 3 dienų pastebimas statistiškai reikšmingas Ca²⁺ sumažėjimas KČMKL ir chondrocituose fizioksijos sąlygomis. LW6 turėjo statistiškai reikšmingą poveikį chondrocituose fizioksijos sąlygomis.

Po 7 dienų viduląstelinio Ca²⁺ kiekis neturėjo pastebimo skirtumo KČMKL, tačiau chondrocituose Ca²⁺ kiekis nežymiai didesnis fizioksijoje.

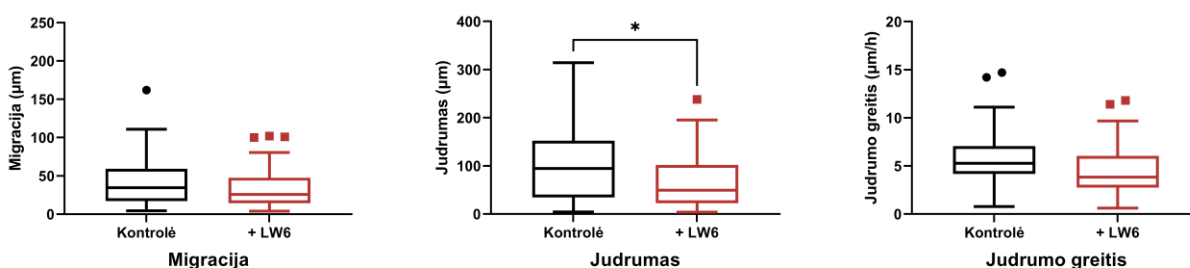


3.2. pav. KČMKL ir chondrocitų viduląstelinio kalcio jonų kiekis (pagal Cal-520 vidutinį fluorescencijos intensyvumą MFI) po 3 ir 7 dienų augimo normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6 (n = 3, * = $p \leq 0,05$).

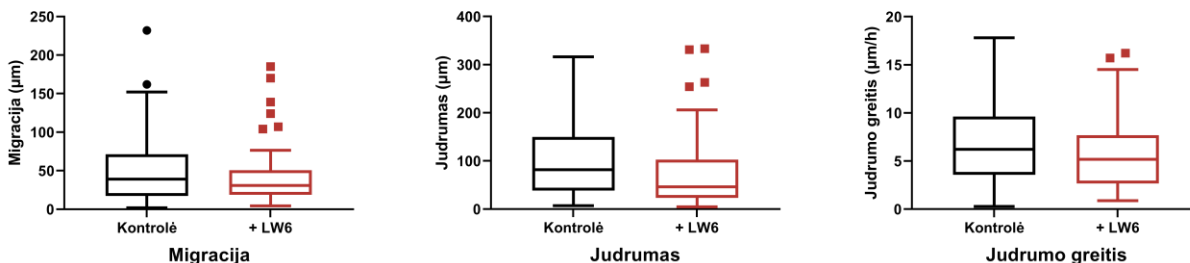
3.3. Ląstelių migracija, judrumas ir judrumo greitis

Atliktas KČMKL ir chondrocitų ląstelių migracijos ir judrumo stebėjimas 24 valandas su HIF-1 α slopikliu LW6 (**3.3. pav.**). Duomenys rodo vidutiniškai, bet ne reikšmingai sumažėjusią ląstelių migraciją, judrumą ir judrumo greitį KČMKL ir chondrocituose su slopikliu LW6, pastebimas statistiškai mažesnis judrumas KČMKL + LW6, lyginant su kontrole.

KČMKL



Chondrocytai



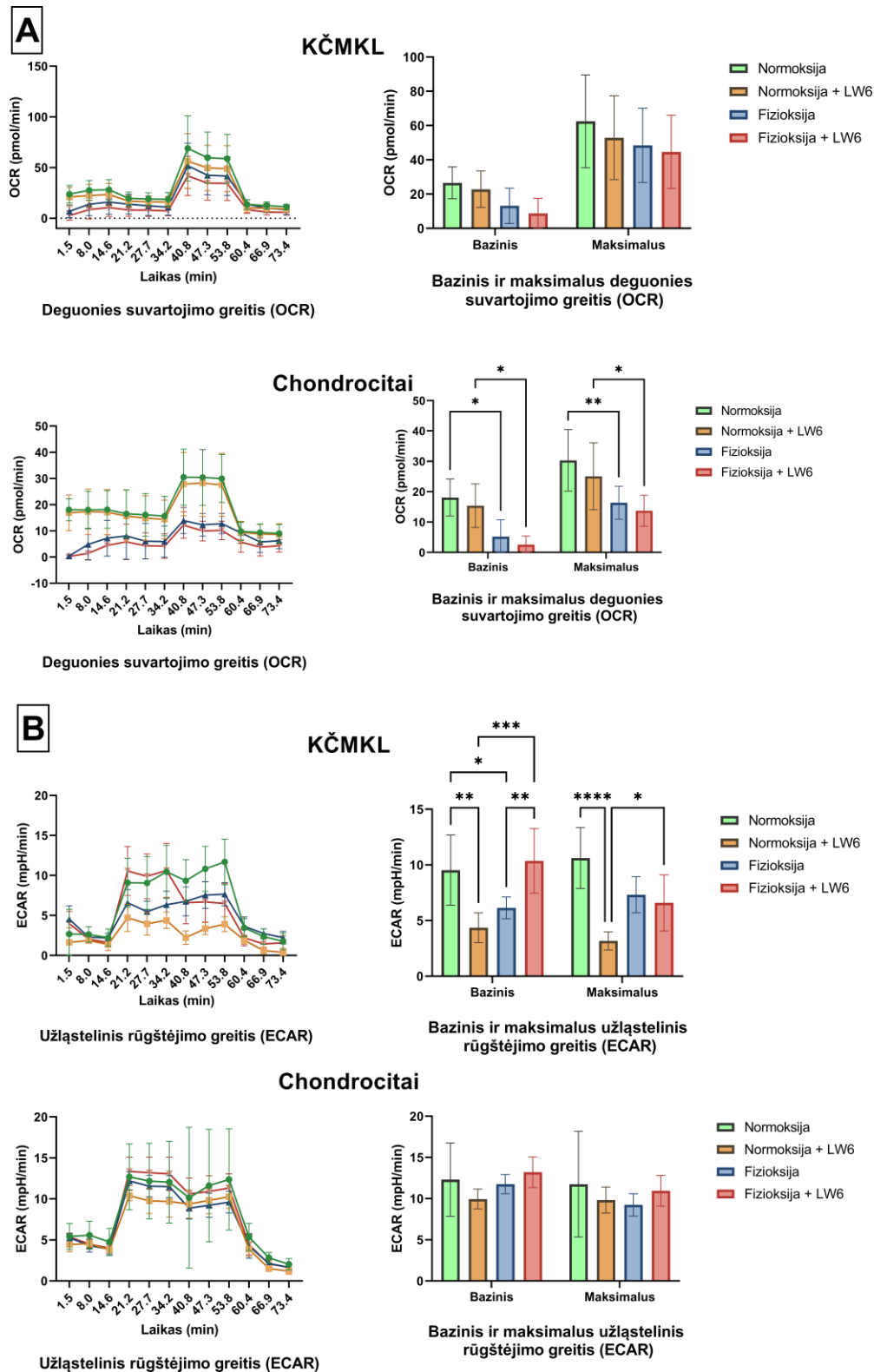
3.3. pav. KČMKL ir chondrocitų migracija, judrumas ir judrumo greitis normoksijos sąlygomis (21 % O₂) per 24 valandas (matavimai kas 2 val.) su HIF-1 α slopikliu LW6 (n = 3, * = $p \leq 0,05$).

3.4. Ląstelių metabolizmas: mitochondrinis ir glikolitinis aktyvumas

Buvo tiriamas KČMKL ir chondrocitų ląstelių metabolizmas po 3 dienų normoksijos ir fizioksisijos sąlygomis su slopikliu LW6 – išanalizuotas bazinis ir maksimalus deguonies suvartojimo greitis (OCR, angl. *Oxygen Consumption Rate*) (3.4. pav. A), bazinis ir maksimalus užląstelinio rūgštėjimo greitis (ECAR, angl. *Extracellular Acidification Rate*) (3.4. pav. B).

Žiūrint į deguonies suvartojimo greitį OCR, po 3 dienų KČMKL pastebimas tendencingas, o chondrocituose statistiškai reikšmingas bazinio ir maksimalaus OCR sumažėjimas tarp normoksijos/fizioksisijos. LW6 slopinamos KČMKL ir chondrocitų ląstelės turėjo ne žymų, bet vidutiniškai sumažėjusį bazinį ir maksimalų OCR, lyginant su kontrole.

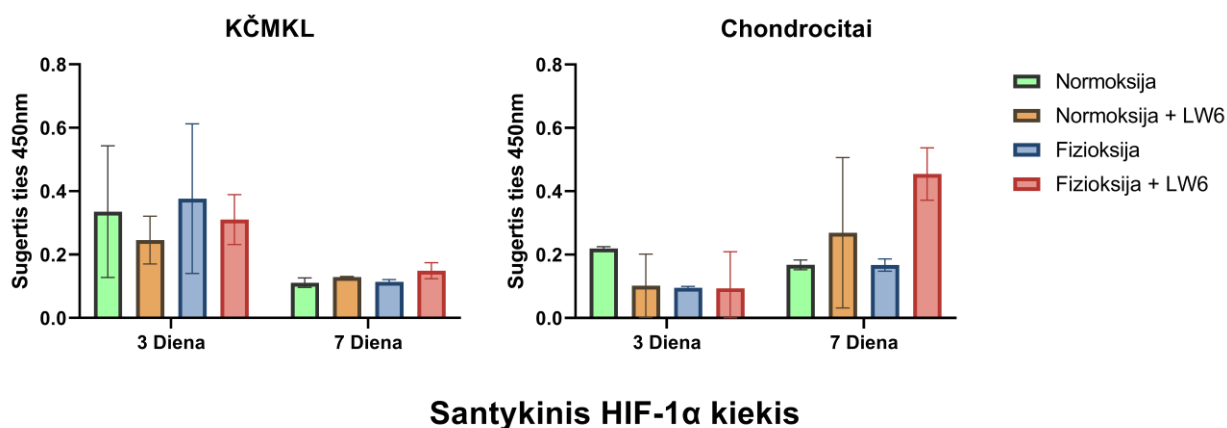
ECAR rezultatai parodo, jog fizioksija reikšmingai sumažina bazinį ECAR KČMKL. Slopiklis LW6 sukelia reikšmingą bazinio ir maksimalaus ECAR sumažėjimą KČMKL normoksijos sąlygomis, tačiau turi priešingą efektą fizioksijoje – bazinis ir maksimalus ECAR nuo slopiklio padidėja. LW6 taip pat padidina bazinį ECAR fizioksijoje, lyginant su kontrole.



3.4. pav. KČMKL ir chondrocitų metabolizmas po 3 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6. **A** – Ląstelių aerobinis kvėpavimas išreikštas deguonies suvartojimo greičiu (OCR), išskirti ląstelių bazinio ir maksimalaus OCR duomenų grafikai. **B** – Ląstelių glikolizės aktyvumas išreikštas kaip užląstelinio rūgštėjimo greitis (ECAR), išskirti ląstelių bazinio ir maksimalaus ECAR duomenų grafikai. (n = 3, * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$).

3.5. HIF-1 α kiekis

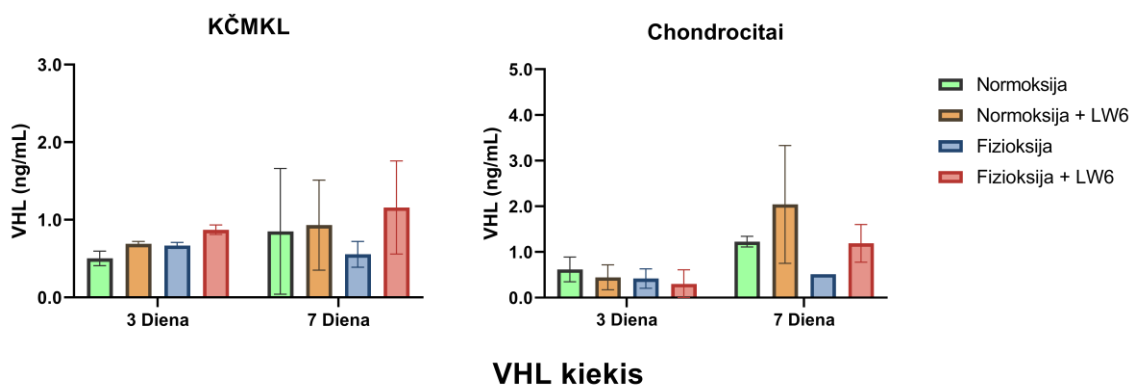
Analizuotas santykinis baltymo HIF-1 α kiekis KČMKL ir chondrocituose po 3 ir po 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis, paveikiant HIF-1 α slopikliu LW6 (**pav. 3.5**). KČMKL po 3 dienų matomas nežymus HIF-1 α kiekio sumažėjimas, sąlygojamas slopiklio LW6 normoksijoje ir fizioksijoje. Po 7 dienų HIF-1 α kiekis KČMKL beveik neturi skirtumų tarp skirtingų eksperimento grupių. Chondrocitų HIF-1 α kiekis nesiskiria tarp grupių po 3 dienų, ir 7 dienų tik kontrolės mėginiuose, tačiau po 7 dienų HIF-1 α kiekis padidėja nuo slopiklio LW6 chondrocituose.



3.5. pav. Imunofermentinis tyrimas vaizduojantis santykinį baltymo HIF-1 α kiekį (pagal sugertį ties 450 nm) KČMKL ir chondrocituose, po 3 ir 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6 (n = 3).

3.6. VHL kiekis

Analizuotas baltymo Von Hippel-Lindau (VHL) kiekis KČMKL ir chondrocituose po 3 ir po 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis, paveikiant ląsteles HIF-1 α slopikliu LW6 (**pav. 3.6**). Rezultatai nerodo žymaus skirtumo tarp VHL kiekio KČMKL po 3 ir 7 dienų tarp skirtingų deguonies koncentracijos sąlygų. LW6 poveikis taip pat neturėjo poveikio KČMKL nei po 3, nei po 7 dienų. Chondrocituose VHL kiekis nesiskyrė tarp grupių po 3 dienų, tačiau po 7 dienų pastebėta, jog LW6 vidutiniškai padidino VHL kiekį chondrocituose ir normoksijos ir fizioksijos sąlygomis.

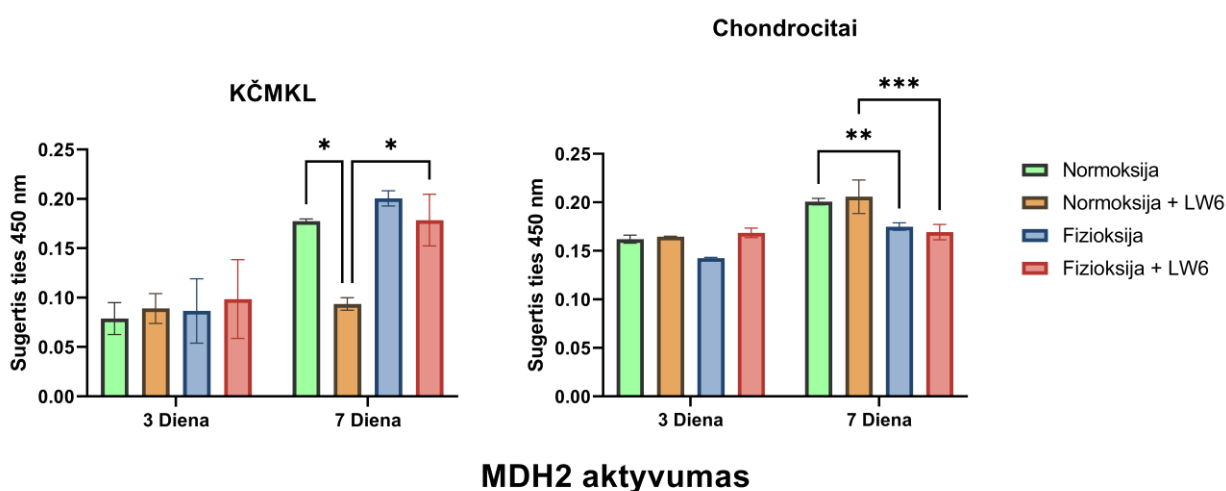


3.6. pav. Baltymo VHL kiekis (ng/mL) KČMKL ir chondrocituose, po 3 ir 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6 (n = 3).

3.7. MDH2 aktyvumas

Atlikta fermento malato dehidrogenazės 2 (MDH2) aktyvumo tyrimas KČMKL ir chondrocituose, po 3 ir 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis su slopikliu LW6 (**pav. 3.7.**)

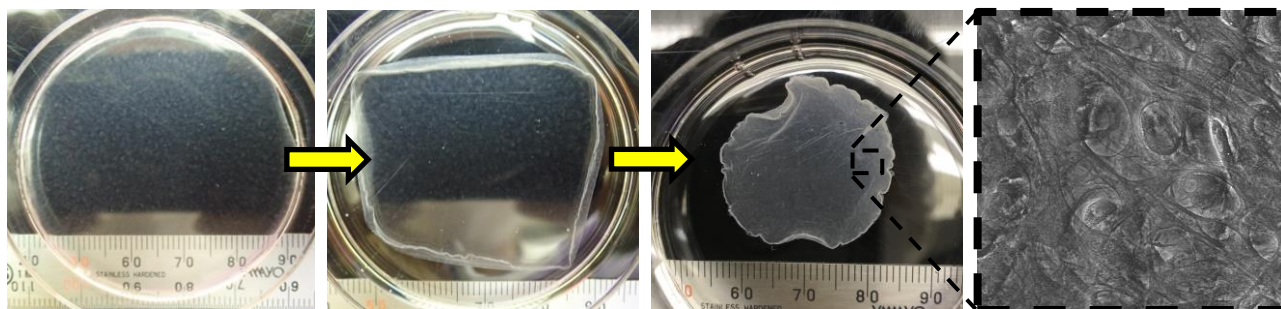
MDH2 aktyvumas nepakito nei nuo sumažėjusios deguonies koncentracijos nei nuo slopiklio LW6 po 3 dienų kultūroje. Po 7 dienų pastebimi pokyčiai – KČMKL MDH2 aktyvumas reikšmingai sumažėja normoksijos sąlygomis nuo LW6, ir tarp slopinamų ląstelių turi didesnę aktyvumą fizioksijoje. Chondrocituose po 7 dienų matomas reikšmingas pokytis tarp normoksijos ir fizioksijos – MDH2 aktyvumas mažesnis fizioksijoje ir tarp kontrolės ir tarp LW6 paveiktų mėginių, tačiau pats slopiklis nesukėlė pokyčių chondrocitams lyginant su kontrole.



3.7. pav. Fermento MDH2 aktyvumas (pagal sugertį ties 450 nm) KČMKL ir chondrocituose, po 3 ir 7 dienų normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6 (n = 3, * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

3.8. Chondrogeninė diferenciacija ląstelių lakštuose

KČMKL ir chondrocitai buvo skatinami diferencijuoti chondrogenine kryptimi 21 d. ląstelių lakštuose normoksijos ir fizioksijos sąlygomis su ir be slopiklio LW6. Susidarę lakštai buvo ploni, apvalios formos, maždaug 1/3 šulinėlio dugno dydžio (**3.8. pav.**). Mikroskopu buvo stebimas tankus tarpląstelinis užpildas susidaręs chondrogeninės diferenciacijos metu, kuris surišo ląsteles ir palaikė lakštų formą.

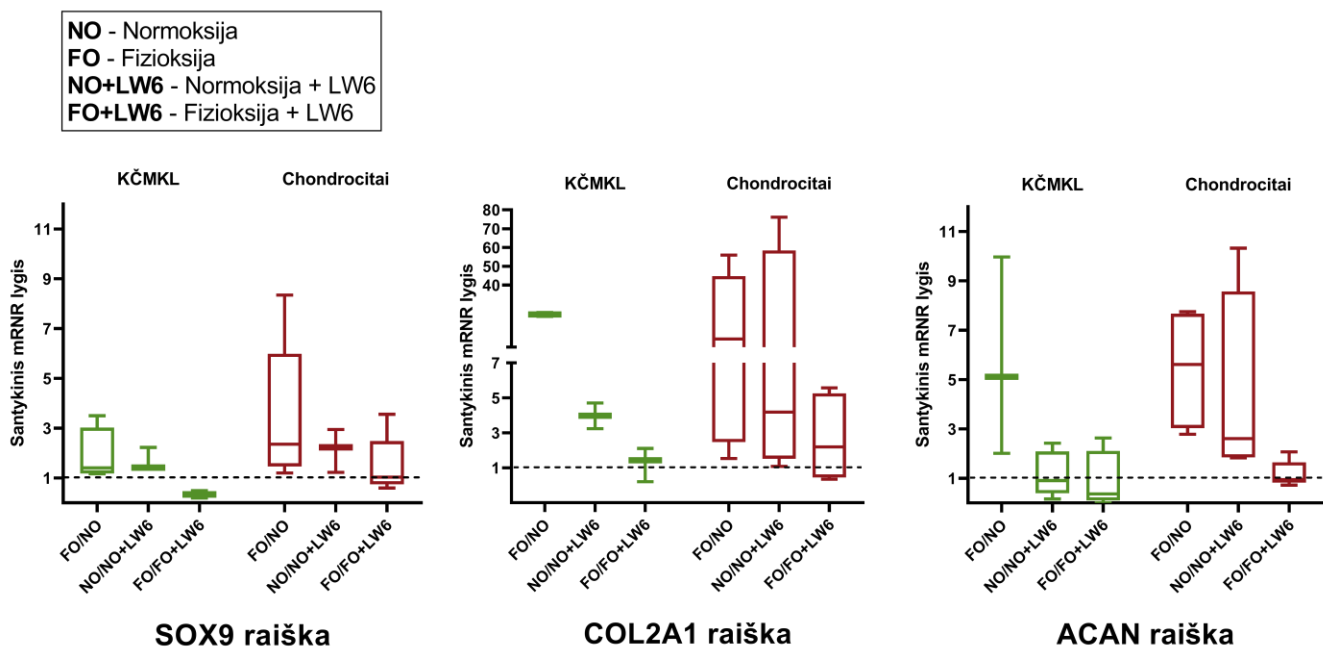


3.8. pav. *In vitro* chondrogeninės diferenciacijos metu susiformavęs ląstelių lakštas, palaipsniui atsikabinantis nuo šulinėlio dugno. Mikroskopu nufotografuotas ir pavaizduotas jo užląstelinis užpildas (400x padidinimas).

3.9. Chondrogenine kryptimi diferencijuotų ląstelių lakštų genų raiška

Kremzliniam audiniui būdingų genų (*SOX9*, *COL2A1*, *ACAN*) raiška buvo išmatuota visiems ląstelių lakštams, lyginant skirtingas deguonies koncentracijos sąlygas ir LW6 poveikį. Rezultatuose (**3.9. pav.**) pateikti santykiai tarp fizioksijos ir normoksijos, normoksijos ir normoksijos su LW6, fizioksijos ir fizioksijos su LW6.

Pastebėta, jog fizioksinės sąlygos žymiai padidino II tipo kolageno, agrekano ir *SOX9* genų raišką tiek KČMKL, tiek chondrocitų ląstelių lakštuose, o LW6 sumažino visų genų raišką chondrocituose skirtingose sąlygose, tačiau fizioksijoje nežymiai didino *SOX9* ir *ACAN* genų raišką KČMKL.



3.9. pav. KČMKL ir chondrocitų ląstelių lakštų genų raiška pagal santykinę mRNR lygį po 21 dienų chondrogeninės diferenciacijos normoksijos ir fizioksijos sąlygomis (normoksija – 21 % O₂, fizioksija – 5 % O₂) su HIF-1 α slopikliu LW6. Tiriami genai SOX9, COL2A1 ir ACAN.

4. Rezultatų aptarimas

Šiame darbe buvo lyginamos skirtingos fiziologinės sąlygos – 20 % O₂ normoksija ir 5 % O₂ fizioksija – ši deguonies koncentracija vyrauja paviršiniame hialininės kremzlės sluoksnyje, kuris pirmiausiai patiria OA-veikiamą kremzlės degradaciją. Koncentracija pasirinkta dėl darbe panaudoto inovatyvaus bekarkasio audinių inžinerijos modelio – ląstelių lakštų, kurie pažaidos atveju yra panaudojami ir dedami būtent ant kremzlės paviršiaus. Fizioksinės deguonies koncentracijos ir galimų vaistų, turinčių įtaką fizioksinėms sąlygoms, tyrimai yra svarbūs tokių audinių kaip kremzlės ir jos regeneracijos procesų kontrolei.

4.1. Fizioksija skatina ląstelių proliferaciją

Pagal atliktus KČMKL ir chondrocitų proliferacijos tyrimus ir gautus rezultatus (3.1.) pastebima, jog 5 % O₂ fizioksija skatina ląstelių proliferaciją iki 7 dienų. Fizioksinės nauda ir proliferacijos aktyvinimas MKL jau plačiai žinomas ankstesnėje literatūroje – kadangi kaulų čiulpuose vyrauja tarp 1 – 7 % O₂ deguonies koncentracija, hipoksija iki 1 % O₂ padidina ląstelių gyvybingumą, skatina MKL proliferaciją, padeda išlaikyti jų kamieniškumą ir multipotentines savybes per tam tikrų kamieniškumo veiksmų (kaip Oct-4, Sox2, Nanog) genų raišką ir lėtina ROS sukeltą ląstelių senėjimą (Krinner et al 2009; Pattappa et al 2020; Samal et al. 2021; Loo et al. 2021; Arai et al. 2024). Chondrocitų proliferacija 5 % fizioksinės sąlygomis taip pat vidutiniškai padidėjo – tai paaiškinama anksčiau aprašytų natūralių kremzlės fiziologinės hipoksijos sąlygų (1.5.), kurios palankios chondrocitų proliferacijai, augimui, metabolizmui ir chondrogeninio fenotipo išlaikymui (Basciano et al 2011; Sheehy et al. 2012; Markway et al. 2013).

Slopiklis LW6 taip pat turėjo tendenciją ne stipriai padidinti vidutinę KČMKL ir chondrocitų proliferaciją nepaisant deguonies koncentracijos. Kadangi efektas pastebimas ir normoksijos sąlygomis, kai HIF-1 nesusidaro ląstelėse, tai galimai pačio LW6 veikimo mechanizmo pasekmė, susijusi su metabolinių kelių modifikacijomis (Naik et al. 2015).

4.2. Viduląstelinio kalcio jonų lygis ląstelėse sumažėja po pirmų 3 dienų fizioksinės sąlygomis

Viduląstelinio kalcio tyrimo rezultatai (3.2.) rodo, jog fizioksija KČMKL ir chondrocituose reikšmingai sumažina viduląstelinio Ca²⁺ lygį po 3 dienų, tačiau po 7 dienų Ca²⁺ lygis sumažėja tiek kontrolėje, tiek po poveikio, normalizuojasi ir nėra pastebimo ryškaus skirtumo ląstelėse. Slopiklis LW6 turi panašų poveikį – jis reikšmingai sumažina viduląstelinio kalcio jonų kiekį KČMKL ir chondrocituose po 3 dienų, bet praėjus 7 dienoms abiejuose ląstelių tipuose nėra pastebimo pokyčio sukkelto LW6.

Viduląstelinio Ca^{2+} signalai kontroliuoja įvairius ląstelių biologinius procesus – ląstelių adheziją, metabolizmą, proliferaciją ir apoptozę (Mengxi et al. 2018), taip pat diferenciaciją kamieninėse ląstelėse (Tonelli et al. 2012). Chondrocituose viduląstelinio kalcio signaliniai keliai aktyvuojami tokių stimulų kaip mechaninio ar osmotinio streso ar hidrostatinio slėgio (Zhou et al. 2019). Ca^{2+} ląstelėse kaupiamas įvairiose organelėse, tarp jų Goldžio komplekse, mitochondrijose, branduolyje, lizosomose ir endoplazminiame tinkle, priklausomai nuo jų funkcijų ir mechanizmų (Ahamad ir Singh 2021). Žinoma, kad hipoksinės sąlygos įprastai sukelia Ca^{2+} padidėjimą ląstelėse (Salnikow et al. 2002; Seta et al. 2004), nors 3 dienų rezultatai rodo priešingą efektą. Pagal gautus duomenis matoma jog šis Ca^{2+} jonų lygio sumažėjimas ląstelėse yra trumpalaikis – iki 7 dienos ląstelėse jis normalizuojasi iki lygio, kai beveik nesiskiria tarp fiziologinių sąlygų. Tai gali reikšti ląstelinius mechanizmus, susijusius su ląstelių stresu ir prisitaikymo prie fizioksinės procesų, trumpalaikius metabolinius pokyčius – ir dėl fizioksinės, ir dėl LW6, kurio mechanizmai trikdo aerobinį kvėpavimą ir mitochondrijų funkciją (Sato et al. 2015). Norint geriau suprasti šį trumpalaikį pokytį reikėtų papildomų tyrimų kuriais būtų išnagrinėta, dėl kokių priežasčių trumpalaikė hipoksija slopina viduląstelinio kalcio lygį, po kiek laiko ir kaip jis sumažėja.

4.3. LW6 sumažina KČMKL ir chondrocitų ląstelių migraciją bei judrumą

Holografinės mikroskopijos būdu atliktas ląstelių migracijos, judrumo ir judrumo greičio tyrimas su HIF-1 α slopikliu LW6 parodo vieną ryškų pokytį rezultatuose (3.3) – LW6 ir KČMKL ir chondrocituose vidutiniškai sumažina ląstelių migraciją, judrumą ir judrumo greitį. Kadangi tyrimas vykdytas normoksijos sąlygomis (20 % O_2), tai reiškia jog šis poveikis sukeltas mechanizmų, nesusijusių su LW6 veikimu HIF-1 α slopinime. Iš aprašytų ir žinomų LW6 mechanizmų ir vėliau gautų metabolizmo rezultatų (4.4.) žinoma, kad LW6 slopina ląstelių deguonies suvartojimą ir anaerobinį metabolizmą per Krebso cikle dalyvaujančią MDH2 (tiesioginį LW6 taikinį) ir mitochondrijų membranos depoliarizaciją (Naik et al. 2014; Sato et al. 2015). Dėl metabolizmo pokyčių ir mažesnio deguonies suvartojimo, galimai buvo sulėtinta ląstelių migracija, judrumas ir jo greitis.

4.4. Fizioksija ir LW6 sukelia pokyčius KČMKL ir chondrocitų mitochondriniam ir glikolitiniam metabolizmui

KČMKL ir chondrocitų metabolizmas buvo analizuojamas atliekant deguonies suvartojimo tyrimą kuris parodo aerobinio ląstelių kvėpavimo aktyvumą, ir užląstelinio rūgštelėjimo tyrimą, kuris parodo glikolizės aktyvumą ląstelėse (3.4.). Kaip tikėtasi, 5 % O_2 fizioksija sumažina KČMKL ir chondrocitų bazinį ir maksimalų deguonies suvartojimo greitį, dėl deguonies trūkumo ląstelių aplinkoje lyginant su 20 % O_2 normoksijos sąlygomis. LW6 taip pat turėjo neigiamą efektą aerobiniam kvėpavimui – nuo jo sumažėjo bazinis ir maksimalus OCR abiejuose ląstelių tipuose. LW6 sukeltas

OCR sumažėjimas gali būti paaiškinamas jo veikimu kaip MDH2 slopikliu – ankstesni tyrimai su LW6 slopinimo mechanizmais parodė panašius rezultatus, kurių metu LW6 sumažino ląstelių deguonies suvartojimo greitį (Ban et al. 2016). Taip pat pastebimas didelis skirtumas tarp KČMKL ir chondrocitų OCR lygio grafikų skalėje – KČMKL kaip nediferencijuotos, kamieniškumą turinčios ląstelės, turi daug aktyvesnį aerobinį metabolizmą, lyginant su kremzlės chondrocitais, kurių pagrindinis energijos sintezės būdas yra glikolizė dėl kraujagyslių nebuvimo ir mažo deguonies aprūpinimo kremzliniame audinyje (Henrotin ir Aigner 2005; Fox et al. 2009; Arai et al. 2024).

Lyginant glikolizės rezultatus ir užląstelinio rūgštėjimo greitį (ECAR), KČMKL ir chondrocitai skirtingai reagavo į fizioksinės sąlygas ir slopiklį LW6. KČMKL bazinis ir maksimalus ECAR lygis sumažėjo fizioksinės sąlygomis, nors pagal žinomus teorinius ir eksperimentinius duomenis jis turėtų nepakisti arba padidėti, priklausomai nuo tai kokio lygio hipoksijos sąlygomis ląstelės auga. Normoksijos (atmosferinio deguonies) sąlygomis, MKL turi padidintą deguonies suvartojimą ir ATP sintezę vykdo oksidacinio fosforilinimo būdu. Fizioksinėmis sąlygomis, MKL deguonies suvartojimas sumažėja, jų metabolizmas kinta į pagrindinę glikolizės būdą gaminamą ATP (Pattappa et al. 2019; Arai et al. 2024). LW6 reikšmingai sumažino bazinį ir maksimalų ECAR normoksijos sąlygomis, tačiau fizioksinės sąlygomis bazinis ECAR reikšmingai padidėjo. Chondrocituose glikolizės aktyvumas išliko panašus visose tyrimų grupėse.

LW6 kaip HIF-1 α slopiklis pagal teorines žinias turėtų sumažinti glikolitinį aktyvumą ląstelėse, kadangi HIF-1 mechanizmai hipoksijoje skatina glikolizę ląstelėse ir kremzlėje palengvina gliukozės transportą (Semenza 2012; Arai et al. 2024).

4.5. KČMKL ir chondrocitų HIF-1 α baltymo kiekis ryškiai nekinta 5 % fizioksijoje, tačiau LW6 pasižymi VHL aktyvinamu poveikiu po 7 dienų

Atlikti imunofermentiniai tyrimai ELISA norint nustatyti ir palyginti baltymų HIF-1 α bei VHL kiekį ląstelėse skirtingomis deguonies sąlygomis, ir paveikus HIF-1 α slopikliu LW6, kurio vienas iš taikinių yra VHL raiška (3.5. ir 3.6.).

Nebuvo pastebėtas HIF-1 α kiekio pokytis lyginant normoksijos ir fizioksinės sąlygas KČMKL ir chondrocituose. Tai gali būti priskiriama silpnai hipoksijai (kadangi HIF-1 ląstelėse stabilizuojamas greičiau, kuo mažesnė deguonies koncentracija) ir trumpam (tik 3 ir 7 dienų) laiko tarpui – HIF-1 yra itin jautrus baltymas su kelių minučių pusiniu baltymo degradavimo laiku (angl. *half-life*) kai ląstelinėje aplinkoje yra deguonies (Moroz et al. 2009), tad jo susikaupimui ląstelėse gali turėti įtakos net tokie veiksniai kaip papildomas deguonis iš auginimo terpės keitimo metu. Tikslesnis eksperimento kartojimas galėtų įtraukti ilgesnį kultivavimo laiką fizioksinės sąlygomis. LW6 turėjo ne statistiškai

reikšmingą, bet vidutinį HIF-1 α kiekio sumažėjimą KČMKL po 3 dienų, bet kadangi rezultatai neat-sikartoja KČMKL po 7 dienų ir chondrocituose, negalima daryti prielaidų ar tai sukelta dėl HIF-1 α slopinimo.

VHL kiekio rezultatai neparodė ryškių skirtumų chondrocituose po 3 dienų, tačiau KČMKL ir chondrocituose po 7 dienų pastebima tendencija – VHL kiekis padidėja normoksijos sąlygomis, lygi-nant su fizioksija, o LW6 taip pat rodo vidutiniškai didesnį VHL kiekį lyginant su kontrole. Nors duomenys nėra statistiškai reikšmingi, ši tendencija atkartoja efektą kurio būtų tikimasi – normoksijos sąlygomis, VHL raiška ir aktyvumas padidėja tam kad būtų vykdomas HIF-1 α ubikvitilimas ir deg-radacija (Semenza 2007), o vienas iš LW6 kaip HIF-1 slopiklio mechanizmų yra VHL raiškos padi-dinimas, kas taip pat skatina HIF-1 α degradaciją (Lee et al. 2010).

4.6. Fizioksija sumažina MDH2 aktyvumą chondrocituose po 7 dienų

Atliktas normoksijoje ir fizioksijoje 3, 7 dienas augintų KČMKL ir chondrocitų malato dehid-rogenazės 2 (MDH2) fermento aktyvumo tyrimas. Rezultatai (3.7.) nerodo žymių MDH2 aktyvumo skirtumų tarp KČMKL ir chondrocitų po 3 dienų skirtingose sąlygose ir su slopikliu LW6. Po 7 dienų, LW6 reikšmingai sumažino MDH2 aktyvumą KČMKL normoksijos sąlygomis, ir turėjo ne statistiškai reikšmingą, bet panašų poveikį fizioksijos sąlygomis. Rezultatai chondrocituose po 7 dienų rodo reikšmingą MDH2 aktyvumo sumažėjimą fizioksijos sąlygomis it tarp kontrolės, ir tarp LW6 slopi-namų grupių. LW6 yra aprašytas ir žinomas kaip tiesioginis MDH2 slopiklis, kuris trikdo jo veiklą Krebso cikle, todėl pagal rezultatus galima buvo tikėtis didesnio poveikio ląstelėms (Naik et al. 2014; Sato et al. 2015). MDH2 aktyvumo sumažėjimas fizioksijos sąlygomis chondrocituose po 7 dienų gali būti paaiškinamas jo svarba Krebso cikle ir aerobiniame kvėpavime – kai fizioksinėmis sąlygo-mis trūksta deguonies aplinkoje, ląstelės „persijungia“ į labiau joms palankesnę glikolitinę energijos metabolizmą (Pattappa et al. 2019; Arai et al. 2024)

4.7. Fizioksija skatina SOX9, COL2A1 ir ACAN genų raišką, HIF-1 slo-piklis LW6 turi neigiamą poveikį šiems genams

Įvykdyta genų raiškos analizė su KČMKL ir chondrocitų ląstelių lakštuose, kuriuose 21 dienas buvo indukuojama chondrogeninė diferenciacija normoksijos ir fizioksijos sąlygomis, su ir be HIF-1 α slopikliu LW6. Rezultatai (3.9.) parodė pokyčius, susijusius su chondrogenezės genais *SOX9*, *COL2A1* ir *ACAN*. Pastebėta, jog fizioksinės sąlygos turi teigiamą poveikį *SOX9*, ir taip pat stiprų teigiamą poveikį *COL2A1*, *ACAN* genų raiškai KČMKL ir chondrocitų lakštuose. *SOX9* yra transk-ripcijos veiksnys, aktyvus chondrogenezės metu ir svarbus chondrocitų fenotipui. Jis turi reguliacines funkcijas pačiai *COL2A1* raiškai – tai reiškia jog didesnė *SOX9* raiška siejama su didesne *COL2A1*

raiška. COL2A1 genas koduoja II tipo kolageno baltymo alfa grandinę, kuri yra svarbus II tipo kolageno fibrilių komponentas, būdingas hialininei kremzlei, o ACAN koduoja agrekaną – dažniausiai aptinkamą proteoglikaną sveikos kremzlės užląsteliniam užpilde (Chen et al. 2021; Bačenková et al. 2023). Šių genų raiška parodo ne tik sėkmingą chondrogeninę diferenciaciją ląstelių lakštų modelyje, bet taip pat ir patvirtina žinomą teigiamą fizioksinijos svarbą šiems genams ir jų raiškai (Krinner et al. 2009; Duval et al. 2012). Slopiklis LW6 sumažino šių genų raišką chondrociuose, kas gali lemti HIF-1 slopinimo poveikį, kadangi HIF-1 transkripcijos veiksnys skatina chondrogeninę diferenciaciją, jos genų raišką ir pačio SOX9 aktyvaciją ir su tai susijusius diferenciacijai palankius mechanizmus (Arai et al. 2024).

Išvados

1. Fizioksija paskatino KČMKL ir chondrocitų proliferaciją per 7 dienas, tačiau sumažino viduląstelinio kalcio kiekį po 3 dienų. LW6 neturėjo reikšmingos įtakos tiek proliferacijai tiek viduląstelinio kalcio jonų koncentracijai KČMKL, bet sumažino kalcio jonų kiekį po 3 dienų chondrocituose.
2. LW6 sumažino KČMKL ir chondrocitų migraciją, judrumą ir judrumo greitį po 24 valandų poveikio.
3. Fizioksija ir LW6 sumažina KČMKL ir chondrocitų mitochondrinį kvėpavimą. Chondrocitų glikolizės lygis fizioksijoje išlieka panašus, o KČMKL yra slopinamas normoksijoje su LW6.
4. Baltymų HIF-1 α ir VHL kiekis ryškiai nepakito tarp KČMKL ir chondrocitų tarp fizioksijos ir normoksijos, tačiau LW6 padidino VHL kiekį chondrocituose po 7 dienų.
5. MDH2 aktyvumas priklausomai nuo fizioksijos sumažėjo chondrocituose po 7 dienų, tačiau LW6 turėjo reikšmingą poveikį fermentui tik KČMKL normoksijos sąlygomis.
6. Fizioksija padidino genų *SOX9*, *COL2A1* ir *ACAN* raišką chondrogeniškai diferencijuotuose KČMKL ir chondrocitų lakštuose, o LW6 slopino šių genų raišką chondrocituose.

Apibendrinant, šie tyrimai rodo fizioksijos svarbą visiems in vitro tyrimams su sąnario kremzle ir chondrocitais, norint sukurti ar įvertinti kamieninių ląstelių terapiją ar kremzlių audinių inžinerijos strategijas. Papildomai, vaistai kaip LW6, taikomi vėžio ir kitų ligų terapijoje, taip pat turi įtakos ir kitoms nuo fizioksijos priklausomoms ląstelių funkcijoms.

Autoriaus asmeninis indėlis

Ignas Lebedis dalyvavo darbo tyrimų ir eksperimentų planavime kartu su darbo vadove dr. Ilona Uzielienė, kultivavo ir augino KČMKL, chondrocitus visiems vykdytiems eksperimentams, vykdė ląstelių proliferacijos, ląstelių kvėpavimo ir metabolizmo, HIF-1 α bei VHL ELISA, MDH2 aktyvumo tyrimus, atliko chondrogeninę diferenciaciją ir ląstelių lakštų paruošimą, taip pat atliko RT-qPCR ir su ja susijusius metodus (ląstelių lizavimą, RNR išskyrimą, kopijinės DNR sintezę); Atliko gautų duomenų ir statistikos analizę, genų raiškos analizę, visų pateiktų rezultatų grafinį vaizdavimą.

Su darbo vadovės pagalba vykdė tėkmės citometriją ir su ja susijusią duomenų/statistinę analizę; migracijos ir judrumo tyrimą holografine mikroskopija ir su ja susijusią duomenų/statistinę analizę.

Rezultatų sklaida

2024 m. balandžio 18-21 dd.

Darbo rezultatai buvo pristatyti stendiniame pranešime, tarptautinėje konferencijoje “OARSI” Vienoje, Austrijoje. Pavadinimas: “ Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells in Cell Sheets Under Physioxia for Cartilage Tissue Regeneration”.

Autoriai: Ignas Lebedis, Eiva Bernotiene, Jolita Pachaleva, Raminta Vaiciuleviciute, Giedrius Kvederas, Ilona Uzieliene

2024 m. balandžio 23-26 dd.

Darbo rezultatai buvo pristatyti stendiniame pranešime, tarptautinėje konferencijoje “OpenReadings2024” Vilniuje. Pavadinimas: “Morphological and Metabolic Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induced by Hif-1 Alpha Inhibitor LW6”.

Autoriai: Ignas Lebedis, Jolita Pachaleva, Eiva Bernotiene, Giedrius Kvederas, Ilona Uzieliene

2024 m. lapkričio 10-13 dd.

Darbo rezultatai buvo pristatyti žodiniame pranešime tarptautinėje biofabrikacijos konferencijoje ISBF2024, Fukuokoje, Japonijoje. Pavadinimas: “The Significant Role of Physioxia in Enhancing Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cell Sheets for Cartilage Regeneration During Osteoarthritis”.

Autoriai: Ilona Uzielienė, Ignas Lebedis, Jolita Pachaleva, Raminta Vaičiulevičiūtė, Giedrius Kvederas, Eiva Bernotienė.

Šiuo metu ruošama publikacija su šio darbo rezultatais.

Padėka

Nuoširdi padėka darbo vadovei dr. Ilonai Uzielienei, Inovatyvios medicinos centro Regeneracinės medicinos komandai ir kolektyvui už patarimus, metodinę pagalbą, palaikymą ir sukurta šaunią mokslinę atmosferą, kurioje visada norisi augti ir tobulėti.

Darbas buvo dalinai finansuotas pagal LMT projektą “Studentų tyrimai semestrų metu” šaukimą Nr. P-ST-23-167, pavadinimas “Chondrogeninės diferenciacijos skatinimas hipoksijos sąlygomis, vertinant hipoksijos indukuojamo veiksnio įtaką diferenciacijos pajėgumui” (2023-10-01 – 2024-04-30).

**Žmogaus mezenchiminių stromos ląstelių chondrogeninė diferenciacija ląstelių lakštuose
fizioksinijos sąlygomis kremzlės audinio regeneracijai**

SANTRAUKA

Augant vidutinei žmonių gyvenimo trukmei, auga ir su senėjimu susijusių ligų sergamumas. Sąnario kremzlės audinys turi ribotą gebėjimą regeneruoti po fizinių traumų, senėjimo sukeltų procesų ir degeneracinių ligų kaip osteoartrito (OA). Šiuo metu nėra plačiai taikomo ir prieinamo vaisto, kuris stabdo kremzlės audinio degeneraciją, gydo pažeistą jos struktūrą. Tyrinėjami įvairūs gydymo būdai, kaip kamieninių ląstelių terapija, siekiant iš diferencijuotų ląstelių sukurti sveiką kremzlinį audinį, gebamą transplantuoti ant pažeidimų. Dabartiniais metodais sukurta kremzlė dažnai nepri-lygsta kremzlei, esančiai natūraliai organizme, tad svarbu tobulinti technologijas, kurios palengvintų kremzlės audinių inžineriją gydymo tikslams.

Ląstelių lakštų technologija – metodas, paremtas ląstelių kultivacija ant termoreaktyvaus poli-mero PIPAAm, leidžiančio temperatūros pokyčiais nukabinti ląstelių lakštus kaip struktūras su visais audinio biointegracijai po transplantavimo reikiama komponentais. Chondrogeniškai diferencijuotų kamieninių ląstelių lakštai gali būti tiesiogiai taikomi paviršinėms sąnario kremzlės pažaidoms arba degeneracijai. Fiziologinė hipoksija – natūraliai organizme esanti deguonies koncentracija, kuri ski-riasi skirtinguose audiniuose ir organuose. Vienas iš pagrindinių būdų, kaip ląstelės auga ir prisitaiko fizioksinijos sąlygomis yra hipoksijos indukuojami veiksniai HIF – transkripcijos veiksniai, aktyvuo-jami esant ribotam deguonies kiekiui. Jie sukelia genų raiškos pokyčius, susijusius su ląstelių prisi-taikymu, metabolismu ir homeostazės palaikymu. Kremzlėje jie yra itin svarbus chondrogenezės pro-cesuose, tad jų tyrinėjimas gali būti taikomas kuriant diferencijuotų MKL kilmės kremzlinį audinį.

Šio darbo metu buvo tiriamas 5 % O₂ fizioksinijos sąlygų poveikis kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms (KČMKL) ir sąnario chondrocitams, lyginamas su laboratorine normoksija (20 % O₂), pridedant HIF-1α slopiklį LW6. Darbo metu sėkmingai užauginti chondrogeniškai diferencijuoti ląstelių lakštai, parodyta fizioksinijos nauda ląstelių proliferacijai ir su chondrogeneze susijusių genų raiškai, aprašyti ląstelių aerobinio ir anaerobinio metabolismo, viduląstelinio kalcio jonų ir migracijos pokyčiai, taip pat arčiau nagrinėti pačio LW6 slopinimo mechanizmai ir taikiniai, tiriant ląstelių baltymus HIF-1α, VHL ir fermento MDH2 aktyvumą fizioksinijos sąlygomis su LW6.

Abstract

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Ignas Lebedis

Master's thesis

Master's Thesis Title Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells in Cell Sheets Under Physioxia for Cartilage Tissue Regeneration

ABSTRACT

As life expectancy rises, so does the incidence of age-related diseases. Cartilage tissue of joints has a limited capacity to regenerate after physical trauma, ageing processes and degenerative diseases such as osteoarthritis (OA). Currently, there is no widely used and available drug that stops the degeneration of cartilage and heals its damaged structure. Different methods, such as stem cell therapy, are being explored to create healthy cartilage tissue from differentiated cells that can be transplanted onto lesions. Cartilage created by current techniques often does not have the same characteristics as cartilage found naturally in the body, so it is important to develop technologies that improve the engineering of cartilage tissue for therapeutic purposes. Cell sheet technology is a technique based on culturing cells on a thermosensitive polymer, PIPAAm, which allows temperature changes to be used to detach cell sheets as structures containing all the components necessary for tissue biointegration after transplantation. Chondrogenically differentiated stem cell sheets can be directly applied to surface articular cartilage lesions or degeneration.

Physiological hypoxia is the concentration of oxygen naturally present in the body, which varies between different tissues and organs. One of the main ways in which cells continue to grow and adapt under physioxic conditions is through hypoxia-inducible factors (HIFs) – transcription factors that are activated in the presence of a limited amount of oxygen. They induce changes in gene expression related to cellular adaptation, metabolism and maintenance of homeostasis. In cartilage, this tissue is crucial for chondrogenesis, and studying their mechanisms can be applied to the development of differentiated cartilage tissue of MSC origin. In this paper, the effect of 5 % O₂ physioxia conditions on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and articular chondrocytes was investigated in comparison to laboratory normoxia (20 % O₂) with the addition of the HIF-1 α inhibitor LW6.

In this paper, successful chondrogenically differentiated cell sheets were grown, we demonstrated the benefits of physioxia on cell proliferation and chondrogenesis-related gene expression, described changes in aerobic and anaerobic metabolism, intracellular calcium ions, cell migration and investigated the mechanisms and targets of inhibition of LW6 itself by examining the intracellular proteins HIF-1 α , VHL, and the activity of the enzyme MDH2 in conditions of physioxia with LW6.

Literatūros sąrašas

Zhang, Z., McCaffery, J. M., Spencer, R. G., & Francomano, C. A. (2004). Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *Journal of anatomy*, 205(3), 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00327.x>

GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators (2023). Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet. Rheumatology*, 5(9), e508–e522. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00163-7)

Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *Lancet (London, England)*, 393(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)

Armiento, A. R., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2019). Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?. *Advanced drug delivery reviews*, 146, 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015>

Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, 1(6), 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>

March, L., Smith, E. U., Hoy, D. G., Cross, M. J., Sanchez-Riera, L., Blyth, F., Buchbinder, R., Vos, T., & Woolf, A. D. (2014). Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 28(3), 353–366. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2014.08.002>

Turkiewicz, A., Petersson, I. F., Björk, J., Hawker, G., Dahlberg, L. E., Lohmander, L. S., & Englund, M. (2014). Current and future impact of osteoarthritis on health care: a population-based study with projections to year 2032. *Osteoarthritis and cartilage*, 22(11), 1826–1832. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.07.015>

Prieto-Alhambra, D., Judge, A., Javaid, M. K., Cooper, C., Diez-Perez, A., & Arden, N. K. (2014). Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(9), 1659–1664. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203355>

Kamps, A., Runhaar, J., de Ridder, M. A. J., de Wilde, M., van der Lei, J., Zhang, W., Prieto-Alhambra, D., Englund, M., de Schepper, E. I. T., & Bierma-Zeinstra, S. M. A. (2023). Comorbidity in incident osteoarthritis cases and matched controls using electronic health record data. *Arthritis research & therapy*, 25(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13075-023-03086-8>

Raikov, B., Lipina, M., Azarkin, K. *et al.* Methods for determining the molecular composition of knee joint structures in osteoarthritis: collagen, proteoglycans and water content: a systematic review. *Collagen & Leather* 6, 30 (2024). <https://doi.org/10.1186/s42825-024-00173-7>

-
- Bačenková, D., Trebuňová, M., Demeterová, J., & Živčák, J. (2023). Human Chondrocytes, Metabolism of Articular Cartilage, and Strategies for Application to Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences*, 24(23), 17096. <https://doi.org/10.3390/ijms242317096>
- Cui, J., & Zhang, J. (2022). Cartilage Oligomeric Matrix Protein, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 9253. <https://doi.org/10.3390/ijms23169253>
- Chen, H., Tan, X. N., Hu, S., Liu, R. Q., Peng, L. H., Li, Y. M., & Wu, P. (2021). Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 664168. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664168>
- Mehana, E. E., Khafaga, A. F., & El-Blehi, S. S. (2019). The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life sciences*, 234, 116786. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116786>
- Rose, B. J., & Kooyman, D. L. (2016). A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteinases in Cartilage Biology. *Disease markers*, 2016, 4895050. <https://doi.org/10.1155/2016/4895050>
- Chan, W. W., Yeo, D. C. L., Tan, V., Singh, S., Choudhury, D., & Naing, M. W. (2020). Additive Biomanufacturing with Collagen Inks. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 7(3), 66. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030066>
- Otero, M., Favero, M., Dragomir, C., Hachem, K. E., Hashimoto, K., Plumb, D. A., & Goldring, M. B. (2012). Human chondrocyte cultures as models of cartilage-specific gene regulation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 806, 301–336. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_21
- Kwon, H., Brown, W. E., Lee, C. A., Wang, D., Paschos, N., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2019). Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nature reviews. Rheumatology*, 15(9), 550–570. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0255-1>
- Otero, M., Favero, M., Dragomir, C., Hachem, K. E., Hashimoto, K., Plumb, D. A., & Goldring, M. B. (2012). Human chondrocyte cultures as models of cartilage-specific gene regulation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 806, 301–336. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_21
- Jones, K. J., & Cash, B. M. (2019). Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation With Autologous Bone Grafting for Osteochondral Lesions of the Femoral Trochlea. *Arthroscopy techniques*, 8(3), e259–e266. <https://doi.org/10.1016/j.eats.2018.10.022>
- Jones, K. J., & Cash, B. M. (2019). Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation With Autologous Bone Grafting for Osteochondral Lesions of the Femoral Trochlea. *Arthroscopy techniques*, 8(3), e259–e266. <https://doi.org/10.1016/j.eats.2018.10.022>
- Yamato, M., & Okano, T. (2004). Cell sheet engineering. *Materials Today*, 7(5), 42–47. [doi:10.1016/s1369-7021\(04\)00234-2](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(04)00234-2)

Kobayashi, J., Kikuchi, A., Aoyagi, T., & Okano, T. (2019). Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 107(5), 955–967. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36627>

Kameishi, S., Sugiyama, H., Yamato, M., Sado, Y., Namiki, H., Kato, T., & Okano, T. (2015). Remodeling of epithelial cells and basement membranes in a corneal deficiency model with long-term follow-up. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 95(2), 168–179. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.146>

Moschouris, K., Firoozi, N., & Kang, Y. (2016). The application of cell sheet engineering in the vascularization of tissue regeneration. *Regenerative medicine*, 11(6), 559–570. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0059>

Hu, D., Li, X., Li, J., Tong, P., Li, Z., Lin, G., Sun, Y., & Wang, J. (2023). The preclinical and clinical progress of cell sheet engineering in regenerative medicine. *Stem cell research & therapy*, 14(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03340-5>

Yamamoto, K., Yamato, M., Morino, T., Sugiyama, H., Takagi, R., Yaguchi, Y., Okano, T., & Kojima, H. (2017). Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheet transplantation. *NPJ Regenerative medicine*, 2, 6. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0010-7>

De Pieri, A., Rochev, Y., & Zeugolis, D. I. (2021). Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast. *NPJ Regenerative medicine*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00133-3>

Thorp, H., Kim, K., Kondo, M., Grainger, D. W., & Okano, T. (2020). Fabrication of hyaline-like cartilage constructs using mesenchymal stem cell sheets. *Scientific reports*, 10(1), 20869. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77842-0>

Sato, M., Yamato, M., Hamahashi, K., Okano, T., & Mochida, J. (2014). Articular cartilage regeneration using cell sheet technology. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 297(1), 36–43. <https://doi.org/10.1002/ar.22829>

Yang, J., Yamato, M., Kohno, C., Nishimoto, A., Sekine, H., Fukai, F., & Okano, T. (2005). Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 26(33), 6415–6422. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.061>

Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., & Sakurai, Y. (1990). Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Macromolecular Rapid Communications*, 11(11), 571–576. doi:10.1002/marc.1990.030111109

Sato, M., Yamato, M., Mitani, G. *et al.* Combined surgery and chondrocyte cell-sheet transplantation improves clinical and structural outcomes in knee osteoarthritis. *npj Regen Med* 4, 4 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0069-4>

-
- Ge, Y., Gong, Y. Y., Xu, Z., Lu, Y., & Fu, W. (2016). The Application of Sheet Technology in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 22(2), 114–124. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2015.0189>
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., & Tano, Y. (2004). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England journal of medicine*, 351(12), 1187–1196. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040455>
- Mitani, G., Sato, M., Lee, J. I., Kaneshiro, N., Ishihara, M., Ota, N., Kokubo, M., Sakai, H., Kikuchi, T., & Mochida, J. (2009). The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC biotechnology*, 9, 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-17>
- Kaneshiro, N., Sato, M., Ishihara, M., Mitani, G., Sakai, H., & Mochida, J. (2006). Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochemical and biophysical research communications*, 349(2), 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.096>
- Matsuda, N., Shimizu, T., Yamato, M., & Okano, T. (2007). Tissue engineering based on cell sheet technology. *Advanced Materials*, 19(20), 3089–3099. <https://doi.org/10.1002/adma.200701978>
- Shahin-Shamsabadi, A., & Cappuccitti, J. (2023). Anchored Cell Sheet Engineering: A Novel Scaffold-Free Platform for in vitro Modeling. *Advanced Functional Materials*, 34(13). <https://doi.org/10.1002/adfm.202308552>
- Zurina, I. M., Presniakova, V. S., Butnaru, D. V., Timashev, P. S., Rochev, Y. A., & Liang, X. (2022). Towards clinical translation of the cell sheet engineering: Technological aspects. *Smart Materials in Medicine*, 4, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2022.09.002>
- Jones, K. J., & Cash, B. M. (2019). Matrix-Induced autologous chondrocyte implantation with autologous bone grafting for osteochondral lesions of the femoral trochlea. *Arthroscopy Techniques*, 8(3), e259–e266. <https://doi.org/10.1016/j.eats.2018.10.022>
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*, 271(30), 17771–17778. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>
- Semenza G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Lee, H. J., Jung, Y. H., Choi, G. E., Kim, J. S., Chae, C. W., & Han, H. J. (2019). Role of HIF1 α Regulatory Factors in Stem Cells. *International journal of stem cells*, 12(1), 8–20. <https://doi.org/10.15283/ijsc18109>
- Schipani E. (2005). Hypoxia and HIF-1 alpha in chondrogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 16(4-5), 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.03.003>

Ikeda, H., & Kakeya, H. (2021). Targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling with natural products toward cancer chemotherapy. *The Journal of antibiotics*, 74(10), 687–695. <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00451-0>

Naik, R., Won, M., Ban, H. S., Bhattarai, D., Xu, X., Eo, Y., Hong, Y. S., Singh, S., Choi, Y., Ahn, H. C., & Lee, K. (2014). Synthesis and structure-activity relationship study of chemical probes as hypoxia induced factor-1 α /malate dehydrogenase 2 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 57(22), 9522–9538. <https://doi.org/10.1021/jm501241g>

Ahmadi, F., Engel, M., & Baradarani, M. M. (2021). Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of indeno [1, 2-c] pyrazol derivatives as inhibitors of mitochondrial malate dehydrogenase 2 (MDH2). *Bioorganic chemistry*, 110, 104779. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104779>

Eleftheriadis, T., Pissas, G., Antoniadi, G., Liakopoulos, V., & Stefanidis, I. (2015). Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 10(5), 1959–1966. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2763>

Sato, M., Hirose, K., Kashiwakura, I., Aoki, M., Kawaguchi, H., Hatayama, Y., Akimoto, H., Narita, Y., & Takai, Y. (2015). LW6, a hypoxia-inducible factor 1 inhibitor, selectively induces apoptosis in hypoxic cells through depolarization of mitochondria in A549 human lung cancer cells. *Molecular medicine reports*, 12(3), 3462–3468. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3862>

Lee, K., Kang, J. E., Park, S. K., Jin, Y., Chung, K. S., Kim, H. M., Lee, K., Kang, M. R., Lee, M. K., Song, K. B., Yang, E. G., Lee, J. J., & Won, M. (2010). LW6, a novel HIF-1 inhibitor, promotes proteasomal degradation of HIF-1 α via upregulation of VHL in a colon cancer cell line. *Biochemical pharmacology*, 80(7), 982–989. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.018>

Lee, K., Ban, H. S., Naik, R., Hong, Y. S., Son, S., Kim, B. K., Xia, Y., Song, K. B., Lee, H. S., & Won, M. (2013). Identification of malate dehydrogenase 2 as a target protein of the HIF-1 inhibitor LW6 using chemical probes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(39), 10286–10289. <https://doi.org/10.1002/anie.201304987>

Kim, B. S., Lee, K., Jung, H. J., Bhattarai, D., & Kwon, H. J. (2015). HIF-1 α suppressing small molecule, LW6, inhibits cancer cell growth by binding to calcineurin b homologous protein 1. *Biochemical and biophysical research communications*, 458(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.031>

Naik, R., Han, S., & Lee, K. (2015). Chemical biology approach for the development of hypoxia inducible factor (HIF) inhibitor LW6 as a potential anticancer agent. *Archives of pharmacal research*, 38(9), 1563–1574. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0632-5>

-
- Ban, H. S., Xu, X., Jang, K., Kim, I., Kim, B. K., Lee, K., & Won, M. (2016). A Novel Malate Dehydrogenase 2 Inhibitor Suppresses Hypoxia-Inducible Factor-1 by Regulating Mitochondrial Respiration. *PLoS one*, *11*(9), e0162568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162568>
- Duval, E., Baugé, C., Andriamanalijaona, R., Bénateau, H., Leclercq, S., Dutoit, S., Poulain, L., Galéra, P., & Boumédiène, K. (2012). Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, *33*(26), 6042–6051. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.061>
- Basciano, L., Nemos, C., Foliguet, B., de Isla, N., de Carvalho, M., Tran, N., & Dalloul, A. (2011). Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC cell biology*, *12*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-12>
- Lafont J. E. (2010). Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *International journal of experimental pathology*, *91*(2), 99–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00707.x>
- Markway, B. D., Cho, H., & Johnstone, B. (2013). Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis research & therapy*, *15*(4), R92. <https://doi.org/10.1186/ar4272>
- Bentovim, L., Amarilio, R., & Zelzer, E. (2012). HIF1 α is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. *Development (Cambridge, England)*, *139*(23), 4473–4483. <https://doi.org/10.1242/dev.083881>
- Kokubo, M., Sato, M., Yamato, M., Mitani, G., Uchiyama, Y., Mochida, J., & Okano, T. (2017). Characterization of layered chondrocyte sheets created in a co-culture system with synoviocytes in a hypoxic environment. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *11*(10), 2885–2894. <https://doi.org/10.1002/term.2192>
- Sheehy, E. J., Buckley, C. T., & Kelly, D. J. (2012). Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *417*(1), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.105>
- Mirchandani, A. S., Sanchez-Garcia, M. A., & Walmsley, S. R. (2024). How oxygenation shapes immune responses: emerging roles for physioxia and pathological hypoxia. *Nature reviews. Immunology*, 10.1038/s41577-024-01087-5. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01087-5>
- Anderson, D. E., Markway, B. D., Bond, D., McCarthy, H. E., & Johnstone, B. (2016). Responses to altered oxygen tension are distinct between human stem cells of high and low chondrogenic capacity. *Stem cell research & therapy*, *7*(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0419-8>

-
- Pattappa, G., Schewior, R., Hofmeister, I., Seja, J., Zellner, J., Johnstone, B., Docheva, D., & Angele, P. (2019). Physioxia Has a Beneficial Effect on Cartilage Matrix Production in Interleukin-1 Beta-Inhibited Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Cells*, 8(8), 936. <https://doi.org/10.3390/cells8080936>
- Krinner, A., Zscharnack, M., Bader, A., Drasdo, D., & Galle, J. (2009). Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation. *Cell proliferation*, 42(4), 471–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00621.x>
- Arai, Y., Cha, R., Nakagawa, S., Inoue, A., Nakamura, K., & Takahashi, K. (2024). Cartilage Homeostasis under Physioxia. *International journal of molecular sciences*, 25(17), 9398. <https://doi.org/10.3390/ijms25179398>
- Pattappa, G., Johnstone, B., Zellner, J., Docheva, D., & Angele, P. (2019). The Importance of Physioxia in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis and the Mechanisms Controlling Its Response. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 484. <https://doi.org/10.3390/ijms20030484>
- Dennis, J. E., Whitney, G. A., Rai, J., Fernandes, R. J., & Kean, T. J. (2020). Physioxia Stimulates Extracellular Matrix Deposition and Increases Mechanical Properties of Human Chondrocyte-Derived Tissue-Engineered Cartilage. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 590743. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590743>
- Shang, J., Liu, H., Li, J., & Zhou, Y. (2014). Roles of hypoxia during the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Current stem cell research & therapy*, 9(2), 141–147. <https://doi.org/10.2174/1574888x09666131230142459>
- Samal, J. R. K., Rangasami, V. K., Samanta, S., Varghese, O. P., & Oommen, O. P. (2021). Discrepancies on the Role of Oxygen Gradient and Culture Condition on Mesenchymal Stem Cell Fate. *Advanced healthcare materials*, 10(6), e2002058. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002058>
- Csete M. (2005). Oxygen in the cultivation of stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049, 1–8. <https://doi.org/10.1196/annals.1334.001>
- Pattappa, G., Krueckel, J., Schewior, R., Franke, D., Mench, A., Koch, M., Weber, J., Lang, S., Pfeifer, C. G., Johnstone, B., Docheva, D., Alt, V., Angele, P., & Zellner, J. (2020). Physioxia Expanded Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Have Improved Cartilage Repair in an Early Osteoarthritic Focal Defect Model. *Biology*, 9(8), 230. <https://doi.org/10.3390/biology9080230>
- Anderson, D. E., Markway, B. D., Weekes, K. J., McCarthy, H. E., & Johnstone, B. (2018). Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue. *Tissue engineering. Part A*, 24(3-4), 264–274. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0510>
- Hermerén G. (2021). The ethics of regenerative medicine. *Biologia futura*, 72(2), 113–118. <https://doi.org/10.1007/s42977-021-00075-3>

-
- Edgar, L., Pu, T., Porter, B., Aziz, J. M., La Pointe, C., Asthana, A., & Orlando, G. (2020). Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *The British journal of surgery*, 107(7), 793–800. <https://doi.org/10.1002/bjs.11686>
- Cossu, G., Birchall, M., Brown, T., De Coppi, P., Culme-Seymour, E., Gibbon, S., Hitchcock, J., Mason, C., Montgomery, J., Morris, S., Muntoni, F., Napier, D., Owji, N., Prasad, A., Round, J., Saprai, P., Stilgoe, J., Thrasher, A., & Wilson, J. (2018). Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. *Lancet (London, England)*, 391(10123), 883–910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31366-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31366-1)
- Doss, M. X., & Sachinidis, A. (2019). Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*, 8(5), 403. <https://doi.org/10.3390/cells8050403>
- Harris, A.R., Walker, M.J. & Gilbert, F. Ethical and regulatory issues of stem cell-derived 3-dimensional organoid and tissue therapy for personalised regenerative medicine. *BMC Med* 20, 499 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02710-9>
- Lu, F., & Zhang, Y. (2015). Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. *National science review*, 2(2), 217–225. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwv009>
- Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shahsavarani, H., Greber, B., & Moore, J. B., 4th (2019). Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
- Ding, D. C., Chang, Y. H., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell transplantation*, 24(3), 339–347. <https://doi.org/10.3727/096368915X686841>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.j, & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Eguizabal, C., Aran, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Geens, M., Heindryckx, B., Panula, S., Popovic, M., Vassena, R., & Veiga, A. (2019). Two decades of embryonic stem cells: a historical overview. *Human reproduction open*, 2019(1), hoy024. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy024>
- Loo, S. J. Q., & Wong, N. K. (2021). Advantages and challenges of stem cell therapy for osteoarthritis (Review). *Biomedical reports*, 15(2), 67. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1443>
- Mishra, V. K., Shih, H. H., Parveen, F., Lenzen, D., Ito, E., Chan, T. F., & Ke, L. Y. (2020). Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 9(5), 1145. <https://doi.org/10.3390/cells9051145>

-
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 35(2), e00191. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
- Rodrigues, M. C., Lippert, T., Nguyen, H., Kaelber, S., Sanberg, P. R., & Borlongan, C. V. (2016). Menstrual Blood-Derived Stem Cells: In Vitro and In Vivo Characterization of Functional Effects. *Advances in experimental medicine and biology*, 951, 111–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_9
- Rodriguez-Menocal, L., Shareef, S., Salgado, M., Shabbir, A., & Van Badiavas, E. (2015). Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. *Stem cell research & therapy*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0001-9>
- Sharpe P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 143(13), 2273–2280. <https://doi.org/10.1242/dev.134189>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Uzieliene, I., Bagdonas, E., Hoshi, K., Sakamoto, T., Hikita, A., Tachtamisevaite, Z., Rakauskiene, G., Kvederas, G., Mobasheri, A., & Bernotiene, E. (2021). Different phenotypes and chondrogenic responses of human menstrual blood and bone marrow mesenchymal stem cells to activin A and TGF- β 3. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02286-w>
- Uzieliene, I., Bernotiene, E., Rakauskiene, G., Denkovskij, J., Bagdonas, E., Mackiewicz, Z., Porvaneckas, N., Kvederas, G., & Mobasheri, A. (2019). The Antihypertensive Drug Nifedipine Modulates the Metabolism of Chondrocytes and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in endocrinology*, 10, 756. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00756>
- Larouche, J., & Aguilar, C. A. (2018). New technologies to enhance in vivo reprogramming for regenerative medicine. *Trends in Biotechnology*, 37(6), 604–617. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.003>
- A, H. B., & B, S. (2011b). Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 01(03). <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000115>

Zhou, Y., Lv, M., Li, T., Zhang, T., Duncan, R., Wang, L., & Lu, X. L. (2019). Spontaneous calcium signaling of cartilage cells: from spatiotemporal features to biophysical modeling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(4), 4675–4687. <https://doi.org/10.1096/fj.201801460R>

Lv, M., Zhou, Y., Chen, X., Han, L., Wang, L., & Lu, X. L. (2018). Calcium signaling of in situ chondrocytes in articular cartilage under compressive loading: Roles of calcium sources and cell membrane ion channels. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 36(2), 730–738. <https://doi.org/10.1002/jor.23768>

Ban, H. S., Xu, X., Jang, K., Kim, I., Kim, B. K., Lee, K., & Won, M. (2016). A Novel Malate Dehydrogenase 2 Inhibitor Suppresses Hypoxia-Inducible Factor-1 by Regulating Mitochondrial Respiration. *PloS one*, 11(9), e0162568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162568>

Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H. T., Blasberg, R., & Serganova, I. (2009). Real-time imaging of HIF-1 α stabilization and degradation. *PloS one*, 4(4), e5077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005077>

Semenza G. L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2007(407), cm8. <https://doi.org/10.1126/stke.4072007cm8>