

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Sandra

BARONAITĖ

VAISIAUS VANDENŲ IR IŠ JŲ IŠSKIRTŲ KAMIENINIŲ  
LĄSTELIŲ TYRIMAI

DAKTARO DISERTACIJA

Fiziniai mokslai,  
Biochemija 04P

---

VILNIUS 2018

Disertacija rengta 2011 - 2017 m. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute (iki 2016 m. Vilniaus universiteto Biochemijos institutas).

Moksliniai tyrimai finansuoti Lietuvos mokslo tarybos remiant projektus:

Epigenetinių veiksnių ir mikro RNR vaidmuo vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių funkcionavime. MIP-57/2015; Vaisiaus vandenų citologiniai, molekuliniai ir epigenetiniai tyrimai. MIP-033/2013.

**Mokslinė vadovė:**

Prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P)

**Mokslinė konsultantė:**

Doc. dr. Audronė Arlauskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

## TURINYS

TURINYS.....	3
SANTRUMPOS .....	6
<b>1. ĮVADAS.....</b>	<b>8</b>
<b>2. LITERATŪROS APŽVALGA.....</b>	<b>9</b>
2.1. Žmogaus vaisiaus vystymasis.....	9
2.2. Vaisiaus vandenys .....	12
2.3. Vaisiaus vandenų ląstelės ir jų charakteristikos .....	13
2.4. VVKL ir regeneracinė medicina.....	16
2.5. Vaisiaus vandenų baltymai, galimai susiję su nėštumo patologija.....	17
2.6. Epigenetinis reguliavimas kamieninėse ląstelėse .....	19
<b>3. MEDŽIAGOS IR METODAI .....</b>	<b>23</b>
3.1. Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių (VVKL) išskyrimas ir kultivavimas.....	23
3.2. VVKL išskyrimas dviejų pakopų metodu .....	23
3.3. Ląstelės paviršiaus žymenų nustatymas tėkmės citometrijos būdu.....	23
3.4. Genų raiškos įvertinimas kiekybiniu realaus laiko (RL)-kPGR metodu .....	23
3.5. Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių diferenciacija.....	24
3.5.1. Adipogeninė diferenciacija.....	25
3.5.2. Osteogeninė diferenciacija .....	25
3.5.3. Neurogeninė diferenciacija.....	25
3.5.4. Miogeninė diferenciacija .....	25
3.5.5. Chondrogeninė diferenciacija.....	25
3.6. Baltymų išskyrimas iš vaisiaus vandenų ir kamieninių ląstelių .....	26
3.7. Baltymų paruošimas ir skirstymas SDS/PAGE ir dvikryptės (2-DE) elektroforezės sistemose	26
3.8. Baltymų paruošimas masių spektrometrijai .....	26
3.9. VVKL imunofluorescencinė analizė .....	26
3.10. VVKL mikroRNR analizė .....	27
3.11. Statistinė duomenų analizė.....	27
<b>4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>28</b>
4.1. Antro ir trečio trimestro VVKL charakterizavimas.....	28
4.1.1. Ląstelių morfologija .....	28
4.1.2. VV-MKL imunofenotipinės savybės.....	29
4.1.3. VV-MKL kamieniškumo žymenų charakteristika.....	31
4.2. Normalaus ir vaisiaus patologinio nėštumo VVKL savybių palyginimas.....	31
4.3. VVKL senėjimo molekuliniai mechanizmai .....	33

4.4.	VV-MKL diferenciacijos potencialas.....	38
4.5.	Epigenetiniai pokyčiai VV-MKL kultūrose normalaus ir patulinio nštumo atvejais .....	40
4.6.	Adipogenine, osteogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis diferencijuotų VVKL proteominė analizė.....	44
4.7.	Baltymai, būdingi normos, preeklampsijos ir polihidramniono nštumo vaisiaus vandenims	49
4.7.1.	Baltymų, išskirtų iš vaisiaus vandenų normalaus ir patulinio nštumo atvejais, palyginamoji analizė.....	49
4.7.2.	Specifinės baltymų funkcijos siejamos su normaliu ir patuliniu nštumu.....	57
4.7.3.	Vaisiaus vandenų proteominė charakteristika normalaus nštumo ir polihidramniono atvejais .....	57
4.8.	Rezultatų aptarimas .....	70
<b>5.</b>	<b>IŠVADOS</b> .....	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>REZULTATŲ VIEŠINIMAS</b> .....	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATŪROS SARAŠAS</b> .....	<b>79</b>
	<b>PADĖKA</b> .....	<b>89</b>
	<i>Curriculum Vitae</i> .....	<b>90</b>

**Šioje disertacijoje pateikta medžiaga yra publikuota žemiau nurodytuose  
šaltiniuose:**

1. Savickiene J, Treigyte G, **Baronaite S**, Valiuliene G, Kaupinis A, Valius M, Arlauskiene A, Navakauskiene R. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature, and Proteome Analysis. *Stem Cells International*. 2015, 2015:319238.
2. Navakauskiene R, **Baronaite S**, Matuzevicius D, Zaikova I, Arlauskiene A, Navakauskas D, Treigyte G. Identification and Characterization of Amniotic Fluid Proteins Incident to Normal, Preeclampsia and Polyhydramnios Pregnancies. *Current Proteomics*. 2016, 13 (3):206-217.
3. Savickienė J, **Baronaitė S**, Zentelytė A, Treigyte G, Navakauskienė R. Senescence-Associated Molecular and Epigenetic Alterations in Mesenchymal Stem Cell Cultures From Amniotic Fluid of Normal and Fetus-Affected Pregnancy. *Stem Cells International*. 2016, 2016:2019498.
4. Savickienė J, Matuzevičius D, **Baronaitė S**, Treigyte G, Krasovskaja N, Zaikova I, Navakauskas D, Utkus A, Navakauskienė R. Histone Modifications Pattern Associated With a State of Mesenchymal Stem Cell Cultures Derived From Amniotic Fluid of Normal and Fetus-Affected Gestations. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017, 118(11):3744-3755.
5. **Baronaite S**, Matuzevicius D, Treigyte G, Arlauskiene A, Serackis A, Navakauskas D, Navakauskiene R. Proteomic characterization of amniotic fluid in polyhydramnios pregnancies – a direct computational analysis tool for prenatal medicine. *Proteomics Clinical Applications*. 2018.

## SANTRUMPOS

AL – amniotinės ląstelės  
ALP – šarminė fosfatazė (angl. *alkaline phosphatase*)  
ATM – serino/tryptofano kinazė, aktyvuojama esant DNR pažaidoms (angl. *Ataxia telangiectasia mutated*)  
BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumine*)  
CD – diferenciacijos antigenas (angl. *cluster of differentiation*)  
DMEM – Dulbecco's modifikuota Eagle terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
DNMT – DNR metiltransferazė (angl. *DNA methyltransferase*)  
DS – Dauno sindromas  
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis  
EED – antrojo polikombinio represinio komplekso subvienetas (angl. *embryonic ectoderm development*)  
EKL – embrioninės kamieninės ląstelės  
EZH2 – antrojo polikombinio represinio komplekso subvienetas (angl. *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*)  
FBS – fetalinis jaučio serumas (angl. *fetal bovine serum*)  
FITC – fluoresceino izotiocianatas (angl. *fluorescein isothiocyanate*)  
H2A, H3, H4 – histonai  
HDAC – histonų deacetilazė (angl. *histone deacetylase*)  
HLA – žmogaus leukocitų antigenas (angl. *human leukocyte antigen*)  
IF – imunofluorescencija  
IFI – integruotas fluorescencijos intensyvumas  
K – lizinas  
KČKL – kaulų čiulpų kamieninės ląstelės  
KL – kamieninės ląstelės  
KT – kambario temperatūra  
MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės  
OCT4 - oktamerus surišantis transkripcijos veiksnys 4 (angl. *octamer-binding transcription factor 4*)  
PBS –fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *phosphate-buffered saline*)  
PE – fikoeritinas (angl. *phycoerythrin*)  
PGR – polimerazės grandininė reakcija  
PKL – pluripotentinės kamieninės ląstelės  
RA – retinoinė rūgštis (angl. *retinoic acid*)  
RL-kPGR – realaus laiko kiekybinė PGR (angl. *real time quantitative polymerase chain reaction*)  
PRC1, PRC2 – Polikombo slopinantis kompleksas 1 ir 2 (angl. *Polycomb repressive complex*)  
REX1 – ZFP-42 cinko pirštų baltymas 42 (angl. *zinc finger protein 42*)  
SOX2 – lytį lemėnčios srities Y-dėžutė 2 (angl. *sex determining region Y-box 2*)

SUZ12 – antrojo polikombinio represinio komplekso subvienetas (angl. *suppressor of zeste 12 protein*)

TC – tĕkmĕs citometrija

VV – vaisiaus vandenys

VVKL – vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės

VV-MKL – vaisiaus vandenų mezenchiminės kamieninės ląstelės (angl. *amniotic fluid mesenchymal stem cells*)

VVN – vaisiaus vandenys esant normaliam nėštumui

VVP – vaisiaus vandenys esant patologiniam nėštumui

## 1. ĮVADAS

Sparčiai plėtojantis biotechnologijų galimybės, naudojant audinių inžinerijos, genų ir ląstelių terapijas susiduriama su konkrečiomis medicininėmis užduotimis paciento ligoms gydyti. Todėl jau kelis dešimtmečius didelis dėmesys sutelktas kamieninių ląstelių tyrinėjimams: jų gavimo būdams, išskyrimui, pritaikymui.

Žmogaus kamieninės ląstelės turi unikalias savybes: savaiminį gebėjimą atsinaujinti ir diferencijuoti į skirtingo tipo audinių ląsteles, todėl jos yra plačiausiai taikomos ir naudojamos moksliniuose, klinikiuose tyrimuose ar taikant jų panaudojimą gydymui: imuninės sistemos, audinių regeneracijos, vežio, genetiškai paveldimų ligų ir pan. Periferinio kraujo kamieninės ląstelės jau kurį laiką sėkmingai taikomos terapijoje ir tuo pačiu toliau tyrinėjamos (Ivanovs ir kt., 2014). Žinoma, kad kamienines ląsteles sėkmingai galima išskirti iš riebalinio audinio, kaulų čiulpu, pieninio danties pulpos bei vaisiaus vandens, tad mokslininkų tyrėjų ir klinikistų tikslas – aptikti kuo lengviau prieinamus ląstelių išskyrimui šaltinius, kad būtų tinkamos terapijoms (Mohamed-Ahmed ir kt., 2018), t.y. kuo „jaunesnes“, nes ląstelių kokybė priklauso nuo individo ir jo amžiaus toliau jas taikant medicininiais tikslais (Stolzing ir kt., 2008).

Vaisiaus vandenys (VV) daugelį metų buvo naudojamos tik prenatalinei genetinei diagnostikai norint įvertinti vaisiaus būklę, tačiau pastebėtos platesnės vaisiaus vandens galimybės ir nauda, ypač dėl VV kamieninių ląstelių, kurios yra embrioninio tipo ir turi pranašumų, nes gaunamos ne iš embrionų, yra genetiškai stabilios ir be somatinių mutacijų, išlaiko multipotentines diferenciacijos savybes, lemiančias jų panaudojimą regeneraciniame medicinoje nesukeliant etikos ir moralės problemų (Prusa ir kt., 2003; Antonucci ir kt., 2011; Klemmt ir kt., 2011). VV ląstelių charakteristikos gana plačiai yra ištirtos ir aprašytos (Kim ir kt., 2007; Hamid ir kt., 2017). Viena iš svarbiausių savybių - jų gebėjimas diferencijuoti į visų trijų gemalinių lapelių kilmės audinius, be to jos neturi polinkio spontanei diferencijuoti, neformuoja teratomų (De Coppi ir kt., 2007) ir atitinka visišką multipotentinių kamieninių ląstelių profilį. Klinikiniais tyrimais įrodyta, kad naudojant kamienines ląsteles, išskirtas iš vaisiaus vandens, Alporto sindromui gydyti, kuris pasireiškia progresuojančiu inkstų veiklos ir klausos sutrikimu, ženkliai sumažina inkstų fibrozę, organų būklę gerėja. (S. Sedrakyan ir kt. 2017). Pasaulyje atliekama daugiau nei 400 klinikinių studijų tyrinėjant kamieninių ląstelių panaudojimą ir naudą sergant įvairiomis ligomis, o pasaulio mastu jau yra 600 kompanijų, dirbančių šia kryptimi. (BioInformant).

**Darbo tikslas** – atlikti vaisiaus vandens proteominius tyrimus ir kamieninių ląstelių charakterizavimą, esant normaliai vaisiaus vystymosi raidai ir/ar chromosominiams bei struktūriniais vaisiaus pakitimams, bei įvertinti galimą tyrimų panaudojimą klinikoje.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti normalaus ir patologinio nėštumo vaisiaus vandens kamieninių ląstelių charakteristikas, ląstelių proliferacijos, senėjimo ir diferenciacijos galimybes.
2. Nustatyti senstančioms kultūroms būdingus morfologinius, epigenetinius ir molekulinis pokyčius.
3. Įvertinti normalaus ir vaisiaus patologijos nėštumo kamieninių ląstelių epigenetinių modifikacijų profilį, priklausomai nuo ląstelių fenotipinių ir augimo savybių.
4. Detalios proteominės analizės būdu identifikuoti specifinius baltymus ir jų pokyčius kamieninėse ląstelėse, diferencijuotose adipogenine, osteogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis.
5. Atlikti vaisiaus vandens proteominę analizę normalaus ir patologinio nėštumo atvejais ir nustatyti jų baltymų sudėtį bei skirtumus.

### **Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė**

Vaisiaus vandens kamieninių ląstelių potencialas yra aiškus, tačiau dar nedaug detalių yra žinoma ir reikalingi platesni moksliniai tyrimai, analizuojant VV-MKL esant patologiniams nėštumams. Bendradarbiavimas su gydytojais ginekologais ir genetikais suteikė galimybę gauti



tiriamosios biologinės medžiagos esant įvairioms nėštumo būklėms ir atlikti vaisiaus vandenų proteominę analizę, nustatyti išskirtų kamieninių ląstelių charakteristikas bei tobulinti ląstelių išskyrimo protokolą dirbant su labai mažais tiriamosios medžiagos tūriais ir išgaunant maksimalų ląstelių kiekį.

Darbe yra įvertintos kamieninių ląstelių proliferacijos ypatybės ir diferenciacijos galimybės, nustatytas įvairiomis kryptimis diferencijuotų ląstelių proteominis profilis, palyginti kamieninių ląstelių ir vaisiaus vandenų baltymai esant skirtingoms vaisiaus būklėms, nustatyti baltymų, esančių vaisiaus vandenyse, sudėtis ir skirtumai bei įvertintas galimas jų, kaip galimų biologinių biožymenų, panaudojimas prenatalinėje diagnostikoje. Tai yra pirmasis Lietuvoje atliktas mokslinis darbas, tyrinėjantis vaisiaus vandenų kamienines ląsteles.

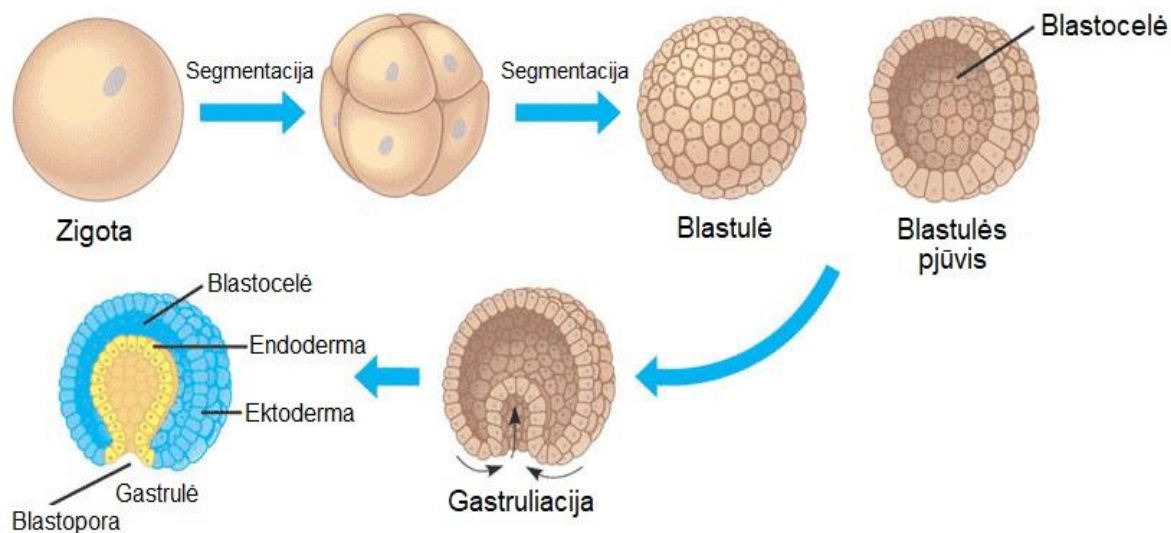
### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių imunofenotipinės, kamieniškumo ir proliferacijos savybės priklauso nuo individo, nėštumo laiko bei vaisiaus patologijos ypatumų.
2. Senstančioms VV-MKL kultūroms būdingi morfologiniai ir epigenetiniai pokyčiai, o su senėjimu susijusių baltymų-žymenų (p16, p21, p53, ATM) ir mikroRNR (miR-17, miR-21) raiška priklauso nuo senėjimo proceso intensyvumo.
3. Normalaus ir patologijos nėštumo VV-MKL pasižymi chromatiną aktyvuojančių ir represyvių histonų modifikacijų specifiniu profiliu, priklausomai nuo jų fenotipinių ir augimo savybių.
4. Vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės gali diferencijuoti miogenine, neurogenine, adipogenine, chondrogenine ir osteogenine kryptimis su charakteringais baltymų pokyčiais.
5. Vaisiaus vandenų proteomo sudėtis priklauso nuo nėštumo būklės (norma vs. patologija).

## **2. LITERATŪROS APŽVALGA**

### **2.1. Žmogaus vaisiaus vystymasis**

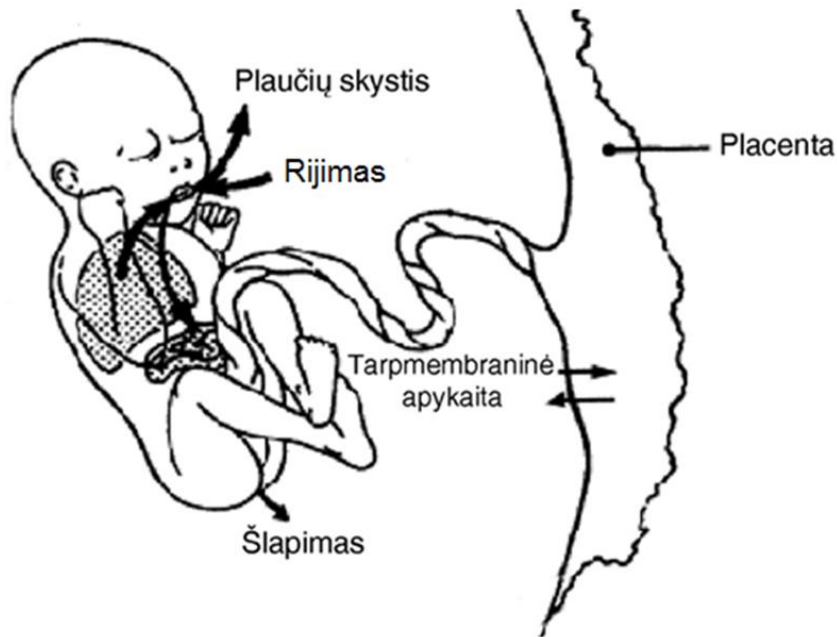
Dinaminis organizmo vystymosi procesas yra vienas unikaliausių procesų gamtoje, kai iš dviejų lytinių ląstelių joms susijungus formuojasi žmogaus organizmas. Šio proceso supratimas atveria plačias duris genetikos, embriologijos, medicinos, molekulinės biologijos moksliniams tyrimams. Moteriškos lytinės ląstelės (kiaušialąstės) susiformavimas (oogenezė) prasideda iš diploidinių lytinių ląstelių, kurios dauginasi mitozės būdu, vėliau formuojantis folikulams pradeda dalintis pirmosios mejozės metu, kai vyksta genų, RNR sintezė bei baltymų kaupimas, kol kiaušinėliai subręsta (Sánchez ir Smitz, 2012). Pirmą savaitę po apvaisinimo vyksta apvaisintos kiaušialąstės – zigotos, segmentacija: zigotai dalijantis susidaro blastomerai, iš 12 – 16 blastomerų formuojasi morulė, toliau dalijantis susidaro blastocista su išorinių ląstelių sluoksniu – trofoblastu ir vidinių ląstelių mase – embrioblastu. Iš embrioblasto formuojasi gemalas, amnionas ir trynio maišas, o iš trofoblasto – chorionas ir placenta, atliekantys embriono apsauginę ir mitybinę funkciją. Blastocista susidaro apie 5 – 6 dieną po apvaisinimo, o maždaug 6 dieną prasideda vienas svarbiausių embrioninio vystymosi procesų – gastruliacija (2.1.1 pav.). Jos metu iš embrioblasto viršutinio lapelio – epioblasto, formuojasi trys gemaliniai lapeliai (ektoderma, mezoderma ir endoderma), iš kurių formuojasi visos embriono audinių ląstelės (Gardner ir kt., 1988; Loebel ir kt., 2003). 7 – 10 dieną blastocista implantuojasi gimdos gleivinėje (endometriume); šiame procese dalyvauja trofoblasto bei endometriumo stromos ląstelių išskiriamos, gimdos gleivinės paviršių ardančios matriksinio metalo proteinazės, o susidarę irstančios gleivinės produktai sunaudojami kaip gemalo maistinės medžiagos (Espino Y Sosa ir kt., 2017).



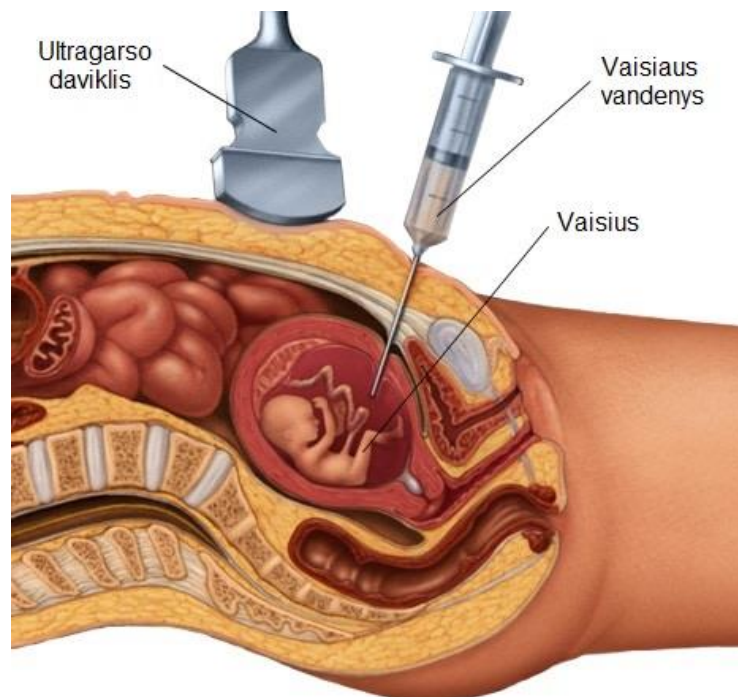
**2.1.1 pav.** Žmogaus vaisiaus ankstyvojo vystymosi procesas. Po apvaisinimo iš zigotos formuojasi blastocista bei išorinis ląstelių sluoksnis. Po gastruliacijos formuojasi gemaliniai lapeliai: ektoderma, mezoderma, endoderma, iš kurių formuojasi embriono audinių ir organų ląstelės (pagal Campbell Biology, 5-as leidimas, 1999).

Trynio maišas atlieka įvairias funkcijas, tačiau viena pagrindinių jo funkcijų yra maisto medžiagų tiekimas vaisiui bei aprūpinimas krauju, nes trynio maišo sienelės mezodermoje formuojasi kraujo ląstelės ir kraujagyslės, vėliau kraujodaros funkciją perima ir toliau vykdo kepenys. Tolesnio vystymosi metu trynio maišas sunyksta ir prisitvirtina prie placentos. Amniono maišas sudarytas iš dviejų plonų, bet tvirtų membranų: vidinė membrana - amnionas, sudarytas iš ektodermos ir mezodermos, ir išorinė membrana - chorionas, kuris yra ir placentos dalis (Robinson ir kt., 2002). Amnionui didėjant, jis prisipildo vaisiaus vandenimis, supančiais besivystantį gemalą ir apsaugančiais vaisių nuo mechaninių pažeidimų, suspaudimo ir skysčių balansą (Murphy ir kt., 2013). Iš pradžių vaisiaus vandenis formuojasi iš motinos kraujo plazmos, vėliau – iš vaisiaus šlapimo ir kitų išskyrų. Esant pilnai cirkuliacijai per placentą, visos maistinės medžiagos, deguonis, vitaminai ir vanduo motinos kraujotakoje praeina pro placentą ir virkštele patenka į embrioną (vėliau vaisiui); tuo tarpu anglies dioksidas ir kitos atliekos cirkuliuoja tik į motiną pusę (Cunningham ir kt., 2009). Placenta taip pat gamina hormonus ir palaiko vaisiaus temperatūrą, kuri yra aukštesnė už motinos 10°C, ir siekia 38,2 – 39,2 °C (O’Rahilly ir Müller ir kt., 2010).

Besivystant vaisiui ir toliau vyksta ląstelių diferenciacija, formuojasi įvairios gemalo struktūros bei ašiniai organai (chorionas ir nervinis vamzdelis). 4 – 8 savaitę po apvaisinimo vyksta gemalo audinių ir organų formavimasis trijų gemalinių lapelių ląstelėms migruojant į reikiamą vietą. 17 savaitę vaisiaus oda pasidengia varškine mase (verniksiu), kuris išskiriamas iš odos liaukų. Apie 16 – 20 nėštumo savaitę pradeda funkcionuoti vaisiaus virškinamasis traktas, atsiranda rijimo refleksas, o nurytas amniotinis skystis per virškinamąjį traktą patenka į kraujotaką taip pašalinant per placentą su kitomis įvairias medžiagomis, kurios patenka ir į motinos kraujotaką. (2.1.2 pav.).



**2.1.2 pav.** Skysčių apykaita tarp vaisiaus vandenų, gemalo ir motinos organizmo (per placentą). Vaisius ryja amniotinį skystį, kurį pašalina šlapinimosi metu. 17 savaitę kraujo apytaka jau pilnai išsivysčiusi, bambagyslė stipri ir stora todėl visiškai patenkina visus kūdikio mitybinius poreikius (pagal Beall ir kt., 2007).



**2.1.3 pav.** Amniocentezės procedūra. Prenatalinis diagnostinis tyrimas, atliekamas nuo 12 – 18-tos nėštumo savaitės. Jo metu iš vaisių gaubiančio maišo yra paimamas nedidelis vaisiaus vandenų kiekis (2 – 5 ml). Vaisiaus vandenys imami plona adata per nėščiosios pilvo sieną, procesą kontroliuojant ultragarsu (pagal MAYO klinikos redakcinės komandos amniocentezės paveikslą).

Nuo 12 – 18 nėštumo savaitės galima atlikti amniocentezės procedūrą, kurios metu vaisiaus vandenys paimami klinikiniais ir diagnostiniais tyrimams (kariotipo, lyties, kraujo grupės ir rezus faktoriaus, taip pat tam tikrų ligų nustatymui). Amniocentezė taikoma kasdienėje praktikoje nuo 1970-ųjų metų (2.1.3 pav.). Didelės rizikos nėštumo atvejais vaisiaus vandenų mėginiai paimami 15 – 20

nėštumo savaitėmis (Izetbegovic ir kt., 2013), nustatomi galimos genetinės ar chromosominės vaisiaus ligos, atliekami citogenetiniai, molekuliniai ir biocheminiai tyrimai. Procedūra yra invazinė, gauti rezultatai yra itin tikslūs (apie 99%). Vaisiaus vandenyse apstu komponentų, kurie gali būti naudojami diagnostikai: vaisiaus ir amniono ląstelės, egzosomos, laisvai plaukiojantys baltymai (įvairūs citokinai, chemokinai, matrikso metaloproteinazės) ir kita (Geer ir kt., 2015).

## 2.2. Vaisiaus vandenys

Vaisiaus vandenys (VV) arba amniotinis skystis (*lot. Liqour amnii*) yra skaidrus gelsvos spalvos skystis, supantis amniono maiše besivystantį vaisių. Vaisiaus vandenys apsaugo vaisių nuo išorinių veiksnių, traumų, infekcijų ar toksinių agentų poveikio (Calvin ir kt., 2007), taip pat saugo virkštelę nuo suspaudimo ir galimo medžiagų apykaitos sutrikdymo (Harman ir kt., 2008), palaiko stabilų slėgį ir temperatūrą, sudaro palankią aplinką vaisiui vystytis, užtikrina simetrišką vaisiaus struktūrą, leidžia jam laisvai judėti (tai svarbu skeleto raumenų vystymuisi ir kraujotakai) (Baschat ir kt., 2004). Vaisiaus vandenys padeda vaisiui kvėpuoti, užtikrina normalų kvėpavimo takų ir plaučių vystymąsi, o vaisiui ryjant vandenis, sveikai vystosi virškinamasis traktas ir vaisiaus vandenų komponentai per virkštelę patenka į motinos kraujo sistemą (Murphy ir kt., 2013). Amniotinis skystis taip pat yra įgimto imuniteto dalis, o jame aptinkamos imuninės sistemos ląstelės (neutrofilai ir makrofagai) yra atsakingos už fagocitozę bei priešuždegiminių mediatorių sekreciją (Underwood ir kt., 2005). Vaisiaus vandenys yra izotoninis tirpalas, kurio pH yra silnai šarminis (pH 7,2), pagrindiniai komponentai – vanduo, elektrolitai, cheminės medžiagos (lipidai, fosfolipidai, baltymai bei peptidai, angliavandeniai, hormonai, laktatai, piruvatai), plaukiojančios medžiagos (verniksas, lanugo plaukai, mekoniumas) bei ląstelės (Cananzi ir kt., 2009; Murphy ir kt., 2013).

Moters nėštumo laikotarpis yra skirstomas į tris trimestrus. Pirmasis trimestras tęsiasi nuo 1 iki 13 nėštumo savaitės, antrasis – nuo 14 iki 27 savaitės, trečiasis trimestras – nuo 28 savaitės iki gimdymo, kuris įprastai įvyksta 38 – 42 savaitę (Guerrero ir kt., 1969). Vaisiaus vandenys pradeda formuotis 12 dieną po apvaisinimo, nėštumo metu jų tūris ir sudėtis nuolat keičiasi prisitaikant prie fiziologinių besivystančio vaisiaus pokyčių (Delo ir kt., 2006). Embriogenezės pradžioje pagrindinis susidarantių vaisiaus vandenų šaltinis yra motinos kraujo plazma, vanduo į vaisiaus ertmę plūsta osmotiškai per amniono membranas ir placentos membraną (Underwood ir kt., 2005). Šiuo laikotarpiu vaisiaus vandenų tūris didėja greičiau nei besivystančiame embrione, tačiau 8 nėštumo savaitę vaisiaus vandenų gamybą pradeda besiformuojantys vaisiaus šlaplė ir inkstai, kurie visiškai perima šią funkciją antrojo trimestro metu ir sparčiai didina vaisiaus vandenų tūrį (Da Sacco ir kt., 2010). 10 nėštumo savaitę vaisiaus vandenų tūris yra maždaug 10 – 20 ml. Antrojo trimestro metu vaisiaus vandenų cirkuliacija yra sumažėjusi, kadangi vaisius sparčiau išskiria šlapimą į amniono ertmę ir pradeda ryti vaisiaus vandenį; tada įvairios maistingosios medžiagos ir vaisiaus vandenų molekuliniai komponentai patenka į vaisiaus organizmą ir dalyvauja virškinamojo trakto (žarnyno epitelio ir gleivinės) ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos procesuose (Da Sacco ir kt., 2011). Skysčių mainai per odą vyksta iki 20 – 24 savaitės, kuomet prasideda vaisiaus keratinizacija (Noronha ir kt., 2011). Vaisiaus vandenų tūris padidėja nuo 200 – 300 ml iki 800 ml apie 27 savaitę, ir kelis kartus viršija vaisiaus užimamą tūrį (Brace ir kt., 1997). Trečiojo trimestro metu pagrindiniai vaisiaus vandenų šaltiniai yra vaisiaus šlapimas ir vaisiaus plaučiai; mažesnis kiekis išskiriamas iš vaisiaus burnos ertmių. Šiuo metu sumažėja ir santykis tarp paties vaisiaus bei vaisiaus vandenų užimamo tūrio. Amniotinio skysčio tūris išlieka pastovus iki 39 savaitės, o prieš gimdymą pradeda po truputį mažėti ir 41 savaitę gali siekti tik apie 400 ml (Beall ir kt., 2007). Žinoma, kad vaisiaus vandenų tūrio dinamikai įtakos gali turėti motinos fiziologiniai procesai (hidratacija, aktyvumas/poilsis, stovėseną ir kt.) (Kilpatrick ir kt., 1993; Ulker ir kt., 2013). Priklausomai nuo motinos gyvenamos ir dienos režimo, vaisiaus vandenų tūris gali kisti dienos metu; tam turi įtakos tarpmembraninė vandens ir ištirpusių medžiagų kaita (Lim ir kt., 2017). Skysčių apykaitos dinamika vėlyvo nėštumo metu pateikta 2.2.1 lentelėje.

**2.2.1 lentelė.** Skysčių apykaita vėlyvo nėštumo metu (pagal Hamid ir kt., 2017).

Vaisiaus vandenų skysčio kilmė	Vaisiaus vandenų tūris
Vaisiaus šlapimo produkcija	800 – 1200 ml/per dieną
Vaisiaus vandenų rijimas	500 – 1000 ml/per dieną
Intramembraninis srautas	200 – 400 ml/per dieną
Vaisiaus plaučių sekretuojami skysčiai	170 ml/per dieną
Burnos ir nosies ertmių išskyros	25 ml/per dieną
Tarpmembraninis srautas	10 ml/per dieną

Šiuo metu nedaug žinoma apie vaisiaus vandenyse esančių medžiagų koncentracijas ir jų reikšmę besivystančiam vaisiui, todėl papildomi duomenys apie vaisiaus vandenų tūrį, komponentų sudėtį, būtinų ar toksiškų medžiagų koncentracijas bei jų pokyčius galėtų padėti identifikuoti tam tikrų nėštumo komplikacijų riziką. Pavyzdžiui, magnio trūkumas vaisiaus vandenyse siejamas su preeklampsija ir diabetu (Markiewicz ir kt., 2017), IL-6 ir MMP-9 raiškos pokyčiai – su priešlaikiniu gimdymu (Romero ir kt., 1995; Gervasi ir kt., 2012).

### 2.3. Vaisiaus vandenų ląstelės ir jų charakteristikos

Kadangi besivystantis vaisius ir vaisiaus vandenys nuolatos kontaktuoja per odą, cirkuliuoja per šlapimo organų sistemą, plaučius bei virškinamąjį traktą, tai ląstelės, atsiskiriančios nuo vaisiaus organų bei audinių, sudaro heterogenišką populiaciją vaisiaus vandenyse. Fetalinę vaisiaus vandenų ląstelių prigimtį mokslininkai patvirtino kariatipuojant berniuko besilaukiančios motinos ląsteles, nustačius Y chromosomą (De Coppi ir kt., 2007), ar ištyrus SRY geno, esančio tik Y chromosomoje, raišką (Roubelakis ir kt., 2007). Ląstelių kiekis ir gyvybingumas vaisiaus vandenyse priklauso nuo nėštumo laikotarpio ir individualaus nėštumo; antrojo trimestro metu jis gali svyruoti nuo 10 iki 1000 ląstelių/ml (Prusa ir kt., 2002). Taip pat pastebėta priklausomybė nuo galimų nėštumo ar vaisiaus vystymosi sutrikimų; pavyzdžiui, ląstelių kiekis labai sumažėja gimdyvės mirties, vaisiaus urogenitalinės atrezijos atvejais ir padidėja esant sprando vaiskumai (Gosden ir kt., 1978; Loukogeorgakis ir kt., 2016). Vaisiaus vandenų ląstelės pasižymi skirtinga morfologija, dydžiu, branduolio/citoplazmos santykiu, citoplazmos savybėmis, biocheminėmis bei augimo charakteristikomis. Vaisiaus vandenyse aptinkamos trys adhezinių ląstelių subpopuliacijos: epiteloidinės (E-tipo), fibroblastinės (F-tipo) ir vaisiaus vandenų (AF-tipo) (Hoehn ir kt., 1982; Gosden ir kt., 1983; Prusa ir kt., 2002). Šių ląstelių subpopuliacijų sudėtis keičiasi viso nėštumo laikotarpiu, tačiau labiausiai dominuoja VV-tipo ląstelės (60 – 70%), 20 – 30% sudaro E-tipo ir <10% – F-tipo ląstelės (Hoehn ir kt., 1974; Gosden ir kt., 1978). Vis dėlto, žinoma atvejų, kuomet vaisiaus vandenyse aptinkama daugiau E-tipo ląstelių, o F-tipo ląstelės aptinkamos tik kartais (Bossolasco ir kt., 2006). VV ląstelių charakteristikos apžvelgiamos 2.3.1 lentelėje.

**2.3.1 lentelė.** Vaisiaus vandenu ląstelių charakteristikos (pagal Kim ir kt., 2007; Hamid ir kt., 2017).

VV ląstelių charakteristikos	E-tipo ląstelės	AF-tipo ląstelės	F-tipo ląstelės
Kultivavimo metu	Aptinkamos anksti, bet greitai pastebimas sumažėjimas	Aptinkamos anksti ir išlieka kultivavimo metu	Aptinkamos vėlai
Hipotetinė kilmė	Vaisiaus oda ir šlapimas	Vaisiaus membranos ir (placentos) trofoblastai	Mezenchiminės kilmės, jungiamasis audinys ir odos fibroblastai
Hormonų produkcija	–	Estrogenai, chorioninis gonadotropinas ir progesteronas	Neprodukuoja
Biocheminių žymenų raiška	–	HLA I klasės (HLA-ABC) antigenai, bet ne HLA II klasės (HLA-DR)	HLA I klasės (HLA-ABC) antigenai, bet ne HLA II klasės (HLA-DR)

Kelios mokslininkų grupės 2003 m. aprašė kamienines ląsteles, išskirtas iš antrojo nėštumo trimestro žmogaus vaisiaus vandenu. Vieni identifiko mažą ląstelių frakcijos dalį (0,5 – 1,5%), pasižymintį transkripcijos veiksnio Oct-4, palaikančio daugiagališkumo ir savęs atsinaujinimo programą, raiška tiek transkriptomo, tiek baltymų lygyje (Prusa ir kt., 2003). Kita tyrėjų grupė įvertino įvairių paviršiaus žymenų raišką bei ląstelių gebėjimą diferencijuotis adipogenine ir osteogenine kryptimis ir įvardijo jas kaip mezenchiminės kamieninės ląsteles (MKL) (In't Anker ir kt., 2003). Trečia grupė, remdamasi MKL būdingų paviršiaus žymenų tyrimais avių modeliuose, išskyrė ir apibūdino MKL subpopuliacijas iš žmogaus vaisiaus vandenu (Kaviani ir kt., 2003). Vėliau De Coppi ir kt. (2007) išskyrė c-kit (CD117) žymeniu pasižymintį ląstelių subpopuliaciją, sudarančią apie 1% nuo visų VV randamų ląstelių. CD117 (kamieninių veiksmų receptorių) yra paviršiaus žymuo, kuriuo pasižymi embrioninės KL, pluripotentinės hematopoetinės pirmtakų ląstelės ir kai kurios somatinės kamieninės ląstelės. Naudojant c-kit (CD117) antikūnus, buvo išskirta daugiagalių ląstelių subpopuliacija (Trounson ir kt., 2007) ir tėkmės citometrijos analize nustatyta, kad 0,8 – 1,4% VV ląstelių pasižymi c-kit paviršiaus žymeniu. Svarbus faktorius yra tai, kad CD117<sup>+</sup> KL ląstelės neformuoja teratomų *in vivo* (De Coppi ir kt., 2007).

Pirmąją savaitę po ląstelių išskyrimo iš VV ir auginant jas specialiai neparuoštuose induose (angl. *non-treated culture dishes*) progenitorinės ląstelės yra apvalios ir pasižymi žemu proliferaciniu pajėgumu. Vėliau ląstelės pradeda prikibti prie auginimo indų paviršiaus, jų morfologija pakinta, jos tampa pailgesnės. Šioms ląstelėms būdingas aukštas proliferacinis potencialas (daugiau nei 300 populiacijos padvigubėjimų, jų padvigubėjimo laikas – 36 val., kuris nežymiai gali kisti pasažavimo metu (De Coppi ir kt., 2007). Skirtingai nuo embrioninių KL, VVKL auginimui nereikalingas ląstelių maitintojų sluoksnis. Apie 90% VVKL pasižymi kamieniškumo žymenų, tokių kaip SSEA4 ir Oct-4 (žinomas kaip embrioninės karcinomos ląstelių, embrioninių lytinių ląstelių ir embrioninių kamieninių ląstelių žymuo), raiška. Tėkmės citometrijos, imunofluorescencijos ir PGR būdais nustatyta, kad Oct-4 lygis išlieka pakankamai pastovus VVKL kultivavimo metu iki 30 pasažų (Roubelakis ir kt., 2007). VVKL taip pat pasižymi vimentino, REX-1, SCF, GATA-4, CK18, HLA ABC ir FGF-5 genų raiška net ir auginant ląsteles kultūroje ilgą laiką (Antonucci ir kt., 2011). VVKL būdingi mezenchiminių KL paviršiaus žymenys, tokie kaip CD90, CD105, CD73, CD166, jos nepasižymi SSEA1, SSEA3, CD4,

CD8, CD133, C-MET, ABCG2, NCAM, BMP4, TRA1-60, TRA1-81 raiška (De Coppi ir kt., 2007) ir neturi hematopoetinių ląstelių žymenų (CD45, CD34 ir CD14) (Antonucci ir kt., 2011). Nustatyta, kad transkripcijos veiksnio Nanog (pluripotentiškumo žymuo, atsakingas už embrioninių kamieninių ląstelių (EKL) diferenciaciją) ir SSEA4 (specifinis žmogaus EKL žymuo) raiška VVKL yra kur kas didesnė nei kaulų čiulpų kamieninėse ląstelėse (KČKL) (Roubelakis ir kt., 2007), ir tai leidžia teigti, jog šių ląstelių fenotipas yra primityvus (specializacijos atžvilgiu) ir atskleidžia šių ląstelių kamieniškumo potencialą (plastiškumą). Tiek VVKL, tiek KČKL yra būdinga vimentino raiška (tarpinių gijų/filamentų grupei priklausantis baltymas, būdingas MKL), kuris atlieka keletą kritinių funkcijų, susijusių su baltymų, dalyvaujančių ląstelės adhezijos, migracijos ir signalo perdavimo procesuose, organizacija (Roubelakis ir kt., 2007). Be to, VVKL aptikti 137 baltymai, dalyvaujantys ląstelių augimo, palaikymo, energetiniuose keliuose, baltymų metabolizme, apoptozėje, signalo perdavime, transkripcijoje ir transporte, kurie neaptinkami KČKL. Tokie rezultatai pagrindžia geresnes VVKL charakteristikas palyginus su KČKL (Roubelakis ir kt., 2007).

VVKL kaip ir EKL pasižymi aktyvia telomerase, apsaugančia nuo laipsniško chromosomų telomerų galų trumpėjimo, taigi, nuo ląstelinio senėjimo. Kultivuojant VVKL iki 250 populiacijos padvigubėjimų, jos išsaugo telomerų ilgį, taip pat ir telomerazinį aktyvumą. Parodyta, kad ir vėlyvo pasąžo ląstelių kariotipas yra stabilus, o G1 ir G2 ląstelės ciklo patikros taškai nepakitę. VVKL telomerai žymiai ilgesni nei KČKL (Baxter ir kt., 2004; Sessarego ir kt., 2008), todėl VVKL pasižymi geresniu proliferaciniu potencialu *in vitro* nei bet kurios kitos suaugusio žmogaus kamieninės ląstelės; kultivavimo metu jos nepatiria neoplazinės transformacijos, taip pat neformuoja teratomų *in vivo* imunodeficitinėse pelėse (Sessarego ir kt., 2008). VVKL pasižymi mažu imunogeniškumu, ląstelėse neaptikta MHC II klasės ir kostimuliacinių molekulių CD40, CD80, CD86 raiškos (Moorefield ir kt., 2011).

VVKL kultūros gali būti gaunamos keliais būdais: vienos pakopos, dvipakopės kultūros būdais arba išskirstomos pagal paviršiaus žymenis (pvz., CD117). Vienos pakopos kultūros protokolas yra labai nesudėtingas, vaisiaus vandens ląstelės tiesiog kultivuojamos standartinėje mitybinėje terpėje (Chang, DMEM ar  $\alpha$ DMEM), su serumu (veršelio arba jaučio), papildomais priedais (nepakeičiamos aminorūgštys, glutaminas, vitaminai, papildomi augimo veiksniai) ir antibiotikais inkubatoriuje, palaikančiame +37 °C bei 5% CO<sub>2</sub> (Hamid ir kt., 2017). Taikant dvipakopį kultūros protokolą, pirminės vaisiaus vandens ląstelės iš pradžių auginamos kultivavimo terpėje iki adhezinių kolonijų susidarymo, o neprikibusios ląstelės, vadinamos pirminiais amniocitais, atskiriamos ir toliau kultivuojamos (Tsai ir kt., 2004). Trečiasis metodas taikomas norint gauti pakankamai homogenišką ląstelių populiaciją, kai ląstelės yra atrenkamos pagal specifinius paviršiaus žymenis (pvz., c-kit) naudojant magnetinį (angl. *magnetic-associated cell sorting* (MACS)) arba fluorescencinį (angl. *fluorescent-activated cell sorting* (FACS)) atskyrimo metodus (De Coppi ir kt., 2007).

VVKL yra daugiagalės ir geba diferencijuoti adipogenine, osteogenine, miogenine, neurogenine, hepatogenine ir endotelio kryptimis (Hipp ir kt., 2008). Atitinkamose diferenciacijos terpėse VVKL gali diferencijuoti į funkcionalias audinių ląsteles. Pavyzdžiui, VVKL diferencijavo į nestinę produkuojančias neuronines kamienines ląsteles, ir paskui – į dopaminerginius ir glutamatinį jautrius neuronus, osteogeninėje terpėje – į funkcionalius, mineralizuotą kalcį produkuojančius, osteoblastus. Iš VVKL diferencijuoti hepatocitai dideliais kiekiais gebėjo sekretuoti šlapalą ir kepenims būdingus baltymus, tokius kaip albuminas, alfa-fetobaltymas, bei hepatocitų augimo veiksnius (Hipp ir kt., 2008).

Pluripotentišioms ląstelėms būdingi bruožai: (i) gebėjimas neribotai proliferuoti ir išlaikyti diploidinę struktūrą bei nepakitusį kariotipą; (ii) formuoti klonines ląstelių linijas; (iii) diferencijuoti trijų gemalinių lapelių visomis kryptimis *in vitro*; (iv) formuoti teratomas *in vivo*; (v) injekavus į blastocistą diferencijuoti visomis trijų gemalinių lapelių kryptimis. VVKL nėra būdingi paskutiniai du bruožai, todėl jas siūloma apibūdinti kaip platų multipotentinį potencialą turinčias ląsteles. Kadangi VVKL yra kilusios iš vaisiaus, jas galima panaudoti kaip autologinį šaltinį prenatalinei ir perinatalinei terapijai (Loukogeorgakis ir kt., 2016). Remiantis nustatytais kriterijais, numanoma, kad VVKL daugiagališkumo potencialas yra artimas EKL ir indukuotoms pluripotentišioms kamieninėms

ląstelėms (iPKL). Be to, MKL keliamus reikalavimus atitinkančios ląstelės yra išskirtos ir iš amniono membranos (Alviano ir kt., 2007), choriono (Bailo ir kt., 2004) bei placentos (Steigman ir kt., 2007).

## 2.4. VVKL ir regeneracinė medicina

Šiuo metu vienas iš pagrindinių regeneracinės medicinos uždavinių – aptikti ir įvertinti efektyvų kamieninių ląstelių šaltinį, kuris būtų lengvai prieinamas, o ląstelės pasižymėtų sparčia proliferacija bei plačiu diferenciacijos potencialu; taip pat svarbu, kad šaltinis nesukeltų jokių etinių problemų. Vaisiaus vandenys ir jų kamieninės ląstelės atitinka visus šiuos kriterijus (Antonucci ir kt., 2016) ir gali būti panaudojami perinatalinėje medicinoje ląstelių terapijai ir audinių inžinerijai. Nustatyta, kad VVKL gali būti saugiai surinktos, išskirtos ir paruoštos ilgalaikiam saugojimui, o vėliau panaudotos klinikoje (Murphy ir kt., 2010). Paprastai diagnostiniams tyrimams paimama 3 – 5 ml vaisiaus vandens, o klinikiniam pritaikymui reikėtų daugiau nei 5 ml, priklausomai nuo reikalingo ląstelių kiekio padauginimui ir transplantacijai. Iš heterogeninės VV kultūros išskiriami ląstelių klonai, pasižymintys skirtinga paviršiaus žymenų raiška, gali turėti skirtingas savybes, todėl svarbu nustatyti kamieninių žymenų kombinacijas, kurios padėtų identifikuoti ląstelių klonus, labiausiai tinkančius klinikinėje praktikoje, su geriausiai išreikštu proliferacijos ir diferenciacijos potencialu. Be to, skirtingų VV mėginių ląstelių kamieniškumo savybės gali skirtis, priklausomai nuo donoro (Maraldi ir kt., 2015), nėštumo laikotarpio (Di Trapani ir kt., 2015) bei kultūros pasažų skaičiaus (Chen ir kt., 2009).

Klinikiniam pritaikymui kamieninių ląstelių pasirinkimas priklauso nuo jų gebėjimo efektyviai transformuotis į reikiamo fenotipo ląsteles ir intergruotis į pažeistą audinio ar organo sritį (Choumerianou ir kt., 2008). Kadangi VVKL pasižymi minimaliu imunogeniniu profiliu (silpna HLA-ABC raiška ir jokios HLA-DR raiškos) (Dziadosz ir kt., 2016), sumažėja transplantuotų ląstelių atmetimo rizika bei transplantanto prieš šeimininką ligos tikimybė. Vienok, iki šiol dar nežinomas injekcijai reikalingas pakankamas ląstelių kiekis bei injekcijų skaičius, užtikrinantis stabilų funkcinį organo būklės pagerėjimą. Ląstelių migracijos į pažeistą vietą mechanizmai taipogi nevisiškai išaiškinti. Dar labai svarbu įvertinti neoplazmų formavimosi riziką dėl patekusių nediferencijuotų, nevisiškos diferenciacijos ar į EKL panašių ląstelių transplantante (Bajek ir kt., 2014).

Platus amniono kamieninių ląstelių panaudojimo spektras įvairių ligų gydymui pateiktas 2.4.1 lentelėje. Amniono audiniai kliniškai naudojami jau daugiau nei 100 metų. Pirmieji pritaikymai buvo skirti nudegimų ir odos opų gydymui. Amniono membrana vis dar plačiai naudojama oftalmologijoje, pvz., ragenos opos gydymui, taip pat jo panaudojimas vis plačiau pritaikomas ortopedijoje srityje. Hanselman ir kt. (2015) atliko tyrimus, kurių metu lygino kriokonservuotos žmogaus amniotinės membranos ir kortikosteroidų injekcijų naudojimą plantariniam fascitui gydyti. Zelen ir kt. (2013) tyrė mikronizuotų dehidratuotų žmogaus amniotinės ir choriono membranos injekcijų efektyvumą chroniško plantarinio fascito gydymui.

**2.4.1 lentelė.** Amniono ląstelių pritaikymas ląstelių terapijoje (pagal Antonucci ir kt., 2011).

Ligų grupė	Šaltinis
Priešgimdyvinė diagnozė	Cananzi ir kt., 2009
Periferinių nervų regeneracija	Pan ir kt., 2006; Cheng ir kt., 2010
Miokardo infarktas ir išemija	Chiavegato ir kt., 2007; Delo ir kt., 2011
Augliai ir genetiniai sutrikimai	De Coppi ir kt., 2007; Yen ir kt., 2005
Tikslinė organų regeneracija	De Sacco ir kt., 2011



Audinių inžinerija, ląstelių transplantacija	Fauza, 2004
Pieno liaukų regeneracija	Klemmt ir kt., 2010
Raumenų ligos	Mauro ir kt., 2010
Parkinsono, Alzheimerio, širdies ligos, diabetas, insultas, stuburo smegenų pažeidimai, nudegimai	Tsai ir kt., 2006; Yang ir kt., 2009

Žmogaus VVKL ir amniotinės membranos buvo panaudotos chirurginėje intervencijoje gydant šokikaulio disekuojančio osteochondrito pažeidimus (Anderson ir kt., 2014; Werber ir kt., 2015) panaudojant kriokonservuotų žmogaus amniotinių membranų ir VV produktus pacientams, kenčiantiems osteoporozės skausmus, kurių nenumalšina kiti žinomi gydymo būdai, bei taikant iš amniono paruoštus produktus klinikiniam atvejams, esant paskutinės stadijos osteoartritui (Vines ir kt., 2016). Visų tyrimų metu pastebėtas pagerėjimas taikant preparatus, paruoštus naudojant amniono audinių komponentus.

## 2.5. Vaisiaus vandenų baltymai, galimai susiję su nėštumo patologija

Vaisiaus vandenys – tai itin dinamiška aplinka, kurios baltymų ir metabolitų sudėtis nuolat keičiasi besivystant vaisiui. Šioje dinamikoje labai svarbų vaidmenį atlieka tarpląsteliniai ir viduląsteliniai signalai (hormonai, adhezijos molekulės, augimo veiksniai, imunomodulatoriai), aplinkos veiksniai ir kt. (Pellicier ir kt., 1999; Graca ir kt., 2010). Vaisiaus vystymosi sutrikimų bei nėštumo komplikacijų atvejais šių veiksnių pusiausvyra gali būti sutrikdyta. Liberatori ir kt. (1997) pirmieji atliko 17 savaitės vaisiaus vandenų proteominę analizę ir jau tuomet pasiūlė, kad ne tik VV ląstelės, bet ir pats amniotinis skystis gali būti naudojami prenatalinei diagnostikai. Šiuo metu prenatalinei stebėsenai ir diagnostikai daugiausiai pasitelkiama VV ląstelių arba choriono gaurelių ląstelių analizė. Be to, baltyminiai žymenys, esantys vaisiaus vandenyse, taip pat gali būti naudojami įvairių nėštumo patologijų identifikavimui.

Vaisiaus vandenyse aptinkamas palyginti nedidelis baltymų kiekis šalia vyraujančių angliavandenių ir lipidų. Didžioji dalis aptinkamų baltymų yra glikozilinti taip apsaugant nuo tarpląstelinio užpildo proteolitinio proteazių poveikio. Proteomo sudėtis ir baltymų koncentracija keičiasi nėštumo metu, šią kaitą reguliuoja ne tik vaisiaus, placentos ar motinos audinių ląstelėse atliekama jų sintezė ir degradacija, bet ir baltymų mainai tarp vaisiaus ir motinos, vykstantys per placentą (Tsangaris ir kt., 2011). Proteominė analizė remiasi baltyminių žemėlapių lygiagrečiu palyginimu, kuomet palyginama sveikų ir vaisiaus patologinių mėginių baltymų visuma ir nustatomi baltymų kiekio pokyčiai ar tam tikrų baltymų atsiradimas ar išnykimas (Lee ir kt., 2010). Specifinių biožymenų aptikimui ir vaisiaus sutrikimų patofiziologijos supratimui svarbu identifikuoti konkrečius baltymus ir jų kiekį tam tikru nėštumo periodu. Ištyrus skirtingų nėštumo trimestrų vaisiaus vandenų pavyzdžius, buvo nustatyta, jog proteominė sudėtis kinta nėštumo metu, ypač tarp pirmojo ir antrojo trimestro (Michaels ir kt., 2007; Queloz ir kt., 2007), todėl manoma, kad baltymų kiekio pakitimų nustatymas galėtų padėti įvairių vystymosi sutrikimų įvertinimui.

Tsanagris ir kt. (2005) dvikryptės elektroforezės (2-DE) ir MALDI-TOF masių spektrometrijos metodais išanalizavo žmogaus normalaus nėštumo VV ląstelių baltymus ir sudarė jų duomenų bazę, susidedančią iš 432 skirtingų genų produktų, vėliau paskelbė 136 genų baltyminių profilių (Tsanagris ir kt., 2006a). Išsamiausią normalaus nėštumo antrojo trimestro vaisiaus vandenų baltymų analizę atliko Cho ir kt. (2007) identifikavus 1026 genų produktus.

Dauno sindromas (DS, 21-os chromosomos trisomija) yra viena dažniausių chromosominių ligų (pasireiškia 1 iš 700 naujagimių), tad šio įgimto susirgimo diagnostikai ypač svarbi biožymenų

paieška. Pirmieji darbai VV ląstelėse atlikti tyrinėjant jų metabolinius pakitimus DS atvejais ir nustatyta pakitęs angiavandenių ir aminorūgščių metabolizmas (Oh ir kt., 2004). Potencialių DS biožymenų paieškoje (Tsangaris ir kt., 2006) buvo nustatyti 7 baltymai, kurių raiška skyrėsi nuo normalaus nėštumų mėginių. DS mėginiuose alfa-1-mikroglobulino (AMBP), I tipo kolageno alfa1 grandinės (CO1A1), III tipo kolageno alfa1 grandinės (CO3A1), V tipo kolageno alfa1 grandinės (CO5A1) ir pamatinei membranai specifinio heparansulfato proteoglikano šerdinio baltymo (PGBM) kiekis buvo padidėjęs, tuo tarpu į insuliną panašaus augimo veiksnius jungiančio baltymo (IBP-1) kiekis – sumažėjęs, o splaisingo veiksnys - argininu/serinu praturtintas baltymas (SFRS4), buvo aptiktas tik DS mėginiuose. Taip pat patvirtinta, jog DS atvejais prealbumino (TTR), transferino (TF) ir antitripsino (SERPINA3) baltymų kiekis buvo padidėjęs, o apolipoproteino A1 (APOA1) kiekis – sumažėjęs (Wang ir kt., 2009); šie baltymai siejami su sutrikusiu lipidų/cholesterolio, ATP metabolizmu, metalo jonų ir energetiniu baltymų transporto procesais. Tiriant sveikų ir DS atvejų vaisiaus vandenį, identifikuoti baltymai, kurių raiška šiuose mėginiuose skyrėsi ir kurie potencialiai galėtų būti naudojami kaip biožymenys DS diagnostikoje (Cho ir kt., 2010). Nustatyta, kad DS mėginiuose 60 baltymų kiekis skiriasi bent 2 kartus (jų veikla siejama su organų morfologija, reprodukcinės sistemos vystymusi ir funkcionavimu, taip pat lipidų metabolizmu); svarbiausi tarp jų – komplemento C1r į subkomponentą panašus baltymas (C1RL), karboksilesterio lipazės prekursorius (CEL), glutamato karboksipeptidazės 2 izoforma PSMA-1 (FOLH1), į insuliną panašaus augimo veiksnius jungiantis baltymas 5 (IGFBP5), plazmos serino proteazės inhibitorius (SERPINA5) (Cho ir kt., 2010). Park ir kt. (2010) nustatė 6 baltymus, būdingus tik DS turinčius vandenims, 11 baltymų, unikalių tik normalaus nėštumo vaisiaus vandenims, 27 baltymus, kurių kiekis tarp mėginių skyrėsi įvairiomis proporcijomis. Alfa-fetoproteinas (AFP) ir chorioninis gonadotropinas beta (CGB) buvo įvardinti tarp potencialiausių DS biožymenų, atlikus VV proteominę analizę, o ištyrus 54 VV mėginius, buvo pasiūlyti dar 6 baltymai (CEL, CPA1, MUC13, CLCA1, MUC5AC ir HAPLN1), kurie galėtų būti naudojami diagnostiniais tikslais (Martínez-Morillo ir kt., 2012).

18-os chromosomos trisomija, dar žinoma kaip Edvardso sindromas, nustatoma maždaug 1 iš 5000 gimusių vaikų. Wang ir kt. (2009) tyrinėjo vaisiaus vandenų mėginius diagnozavus šį sindromą ir nustatė, jog apolipoproteino A4 ir antitripsino kiekis žymiai sumažėjęs ligos atveju, o placentos baltymo 14 kiekis yra padidėjęs. Vėlesni tyrimai parodė, jog Edvardso sindromui būdingų vaisiaus vandenų baltymai yra susiję su imuniniais procesais, odos pigmentacijos disfunkcija, trombocitų veiklos sutrikimais, tuo tarpu Dauno sindromo vaisiaus vandenų baltymai siejami su sutrikusiu lipidų, cholesterolio ir ATP metabolizmu, metalų jonų transportu, aktyviu baltymų transportu. Svarbu paminėti, kad genai, koduojantys šiuos baltymus, yra randami atitinkamai 18 ar 21 chromosomose (Kolialexi ir kt., 2014).

Turnerio sindromas pasireiškia, kuomet dalinai ar visiškai neaptinkama viena X chromosoma žmogaus kariotipe, šis sindromas diagnozuojamas 1 iš 2500 naujagimių mergaičių. Vaisiaus vandenų mėginiuose nustatyti ir pasiūlyti 7 potencialūs Turnerio sindromo biožymenys: serotransferinas (TRFE), lumikanas (LUM), plazmos retinolį surišantis baltymas (RETBP) ir apolipoproteinas A1 (APOA1), kurių kiekis padidėjęs Turnerio sindromo atvejais, o kininogeno (KNG1), protrombino (THBR) ir apolipoproteino A4 (APOA4) kiekis sumažėjęs (Mavrou ir kt., 2008).

Preeklampsija – tai nėštumui specifinis gimdyvės hipertenzijos ir proteinurijos atsiradimas po 20 nėštumo savaitės (ACOG komitetas, 2002). Vascotto ir kt. (2007) nustatė, kad transtiretinis aptinkamas tiek sveikų nėščiujų, tiek sergančių preeklampsija, vaisiaus vandenyse kaip dimerų ir potransliacinių modifikacijų turinčių monomerų mišinys, bet preeklampsijos atvejais monomerinių baltymų kiekis buvo žymiai didesnis. Manoma, kad proalipoproteino A-1 ir funkciškai neištirto peptido SBBI42 tyrimai gali padėti atskirti preeklampsiją nuo pacientės lėtinės hipertenzijos nėštumo metu (Park ir kt., 2008). F2-izoprostanas buvo įvardintas potencialiu biožymeniu dėl žymaus padidėjimo vaisiaus vandenyse 2 mėnesiais anksčiau nei kad išsivystė hipertenzija, taip pat nustatytas padidėjęs leptino, endotelino 1, sEndoglinto, sFLT1 baltymų kiekis vaisiaus vandenų mėginiuose, kai vėliau išsivystė preeklampsija (Wang ir kt., 2010; Wang ir kt., 2011).

Chorioamnionitas dažniausiai siejamas su priešlaikiniu gimdymu, kuris gali neigiamai paveikti tiek gimdyvę, tiek vaisių. Buhimschi ir kt. (2008) išnagrinėjo 104 vaisiaus vandenų mėginius ir nustatė keturis baltymus, įskaitant neutrofilų defensiną-1 ir -2, kalgranuliną C ir kalgranuliną A kaip galimus chorioamniotito žymenis. Tuo tarpu Gravett ir kt. (2004) nustatė, jog šios infekcijos atvejais itin padidėja polipeptidų, kurių dydis varijuoja tarp 10 ir 12 kDa, kiekis, taip pat kalgranulinas B, azurocidinas bei IGFBP-1 (į insuliną panašaus augimo veiksnius jungiančio baltymo (IBP-1)) proteolitiniai fragmentai pasiūlyti kaip potencialūs chorioamniotito žymenys. Ištyrus vaisiaus vandenų mėginius, nustatyta, jog 77 baltymų kiekis yra padidėjęs, o 6 baltymų kiekis – sumažėjęs, visi šie baltymai siejami su priešlaikiniu gimdymu dėl išsivysčiusių infekcijų (Romero ir kt., 2010).

Baltyminių biožymenų paieška vaisiaus vandenyse taip pat vykdoma esant kitoms nėštumo patologijoms, tokioms kaip Turnerio, Edvardso sindromai ir kt. (Mavrou ir kt., 2007; Kobayashi ir kt., 2011; Hui ir kt., 2012).

## 2.6. Epigenetinis reguliavimas kamieninėse ląstelėse

Eukariotinėse ląstelėse genų raiškos reguliacija chromatino lygyje yra apibrėžiamas kaip epigenetika – paveldimi genų raiškos ir aktyvumo pakitimai nekintant DNR nukleotidų sekai. Tokie pakitimai išlieka ląstelėms dalijantis mitozės ir mejozės metu ar net per daugelį generacijų. Epigenetinių faktorių vaidmuo yra labai svarbus embriogenezėje ir apsprendžiant kamieninių ląstelių „likimą“ ir diferenciaciją. Genų raiškos kitimą ir jų reguliaciją lemia epigenetinės chromatino modifikacijos ir veiksniai (Jaenisch ir kt., 2003) įtakodami atitinkamų genų prieinamumą transkripcijos kompleksams (Bibikova ir kt., 2006; Vincent ir kt., 2009). Epigenetinio mechanizmo pagrindiniai veiksniai – DNR metilinimas, histonų modifikacijos, chromatina modifikuojanys baltymai, mikroRNR savo ruožtu keičia (palengvina arba trukdo) kitų chromatina modifikuojančių fermentų ar transkripcijos reguliatorių prieinamumą prie DNR (Qiu ir kt., 2006), reguliuoja genų raišką ir kitas genomines funkcijas kintant branduolio architektūrai ir chromatino struktūrai (Huang ir kt., 2015): atvira chromatino struktūra (euchromatinas) palengvina genų transkripciją, o kondensuota struktūra (heterochromatinas) genų raišką blokuoja. Transkripcijai aktyvus euchromatinas yra praturtintas chromatina aktyvuojančiom histonų modifikacijom: lizino (K) 4 padėtyje acetilintu histonu H3 (H3K4ac), atitinkamai H3K9ac ar H4K16ac; transkripcijai neaktyviame heterochromatine vyrauja histonų H3K9, H3K20, H3K27, H3K36 metilintos modifikacijos (Huang ir kt., 2015). Pluripotentiųjų ląstelių chromatinas yra mažiau kompaktizuotas nei diferencijuotų ląstelių, jose dominuoja pagrindinių transkripcijos faktorių genai, atsakingi už kamieniškumo palaikymą, o genai, reikalingi vėlesniame vystymosi etape, yra nutildyti atitinkamomis histonų modifikacijomis, kurios lemia trumpalaikį genų raiškos slopinimą. Priešingai, DNR metilinimas įtakoja ilgalaikį su kamieniškumu susijusių genų nutildymą, kurie gali būti vėl aktyvinami demetilinant DNR (Huang ir kt., 2015).

Mezenchiminių kamieninių ląstelių, išskirtų iš skirtingų šaltinių (riebalinio, raumeninio audinio, kaulų čiulpu), DNR metilinimo profilių analizė parodė, jog nepaisant skirtingų šaltinių, ląstelių DNR metilinimo tendencijos yra labai panašios, o daugelio genų, susijusių su specifinėmis ląstelių linijomis, promotorinės sekos yra hipometilintos (Pérez-Campo ir kt., 2015). Nustatyta, jog prie šių hipometilintų regionų galima aptikti ir tokias epigenetines modifikacijas kaip metilintus H3K4 bei H3K27. Tuo tarpu genų, susijusių su ankstyvu vystymusi, promotorinės sekos yra hipermetilintos ir gali turėti H3K27me3 žymę. Tokia epigenetinių reguliatorių kombinacija atspindi platų MKL diferenciacijos potencialą (Hakelien ir kt., 2014).

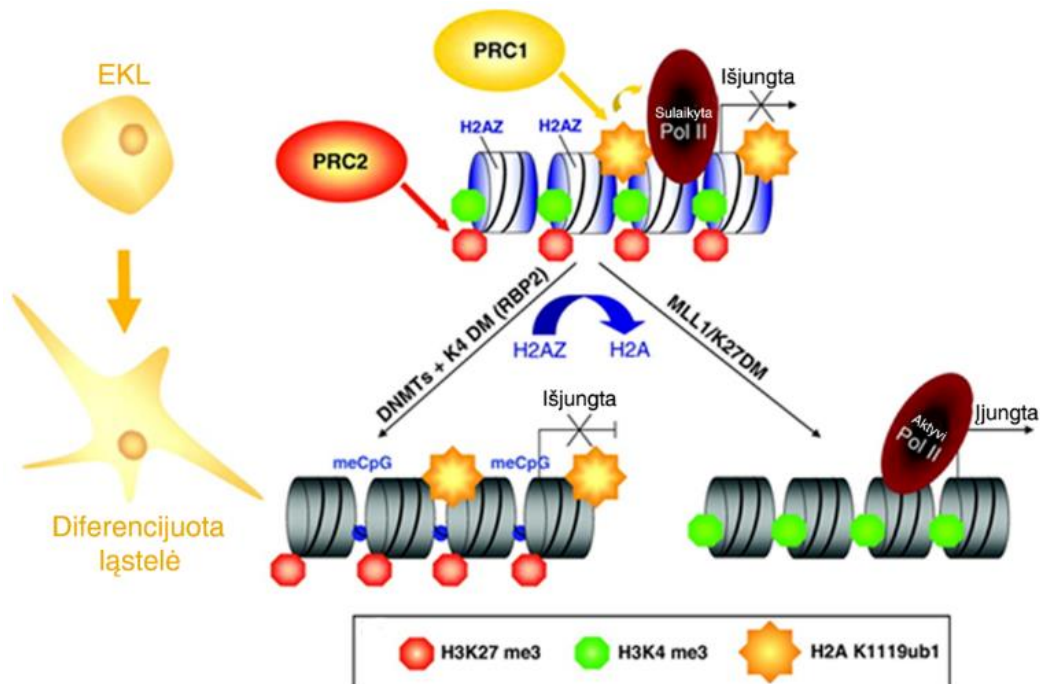
Embrioninės kamieninės ląstelės turi skirtingą chromatino organizaciją ir epigenetinį profilį, nulemiančius jų gebėjimą atsinaujinti ir diferencijuoti į įvairius audinius (Bernstein ir kt., 2006). EKL chromatine nustatyti „bivalentiniai“ domenai (juos sudaro represyvos H3K27me3 modifikacijos ir aktyvuojančios H3K4me3 modifikacijos), kurie susikaupia genų, koduojančių vystymuisi svarbių transkripcijos faktorių, promotoriuose (Collas ir kt., 2008). Šios „bivalentės“ modifikacijos siejamos su vystymosi genų represija (dėl H3K27me3) ir jų „nulemtu“ transkripciniu aktyvavimu (dėl H3K4me3) atsakant į diferenciacijos stimulus. Chromatino „bivalentinių“ domenų funkcionavime

svarbų vaidmenį atlieka polikombo grupės (PcG) baltymai, palaikantys vystymosi genų epigenetinę represiją (Schuettengruber ir kt., 2009). Polikombo grupės baltymų kompleksai dinamiškai reguliuoja pagrindinius vystymosi veiksmų genus. PcG baltymai gali suformuoti skirtingus baltymų kompleksus, iš kurių polikombo represyvinis kompleksas 1 ir 2 (PRC1 ir PRC2) yra charakterizuojami ir apibūdinti plačiausiai. PRC2 inicijuoja transkripcijos represiją, o PRC1 palaiko represyvią būseną (Van Kruijsbergen ir kt., 2015). Abu šie komponentai yra histonų modifikatoriai (Margueron ir kt., 2009). PRC2 katalizuoja histono H3K27 mono-, di- ir trimetilimą polikombo kompleksu reguliuojamuose genuose (Nekrasov ir kt., 2007). PRC2 pagrindiniai komponentai yra EZH2 (angl. *enhancer of zeste-2*), SUZ12 (angl. *suppressor of zeste 12*), Eed (angl. *embryonic ectoderm development*). EZH2 yra PRC2 pagrindinis subvienetas, kuris paprastai susijungia su Eed ir SUZ12. SUZ12 ir Eed reikalingi komplekso stabilumui ir EZH2 metiltransferaziniui aktyvumui (Pasini ir kt., 2004).

Dinaminis genų reguliavimas PcG baltymais labiau pastebimas žinduolių ES ląstelėse. Pelės ir žmogaus EK ląstelių genomo baltymų žemėlapis rodo, kad PcG kompleksai daugiausia jungiasi prie genų, koduojančių svarbiausius vystymosi reguliacinius baltymus, tokius kaip transkripcijos faktorius, kurie reguliuoja įvairius vystymosi kelius (Boyer ir kt., 2006). Daugelis šių reguliacinių genų yra užslopinti ES ląstelėse. Ląstelėms diferencijuojant, atskiri genų rinkiniai tampa aktyvūs; tai apibrėžia PcG baltymų svarbą, dinaminę reguliacinį vaidmenį, lemiantį ląstelių likimą ir identitetą. PcG baltymai ne tik užslopina specifinius genus, bet taip pat dalyvauja indukuojant ir reguliuoti diferenciacijos procesą atsakant į tinkamus signalus. EK ląstelės su netinkama ar sutrikusia PcG funkcija nesugeba efektyviai slopinti kamieniškumo genų diferenciacijos metu (Pasini ir kt., 2007). SUZ12 deficitas ES ląstelėse nulemia diferenciacijos defektus (Pasini ir kt., 2007).

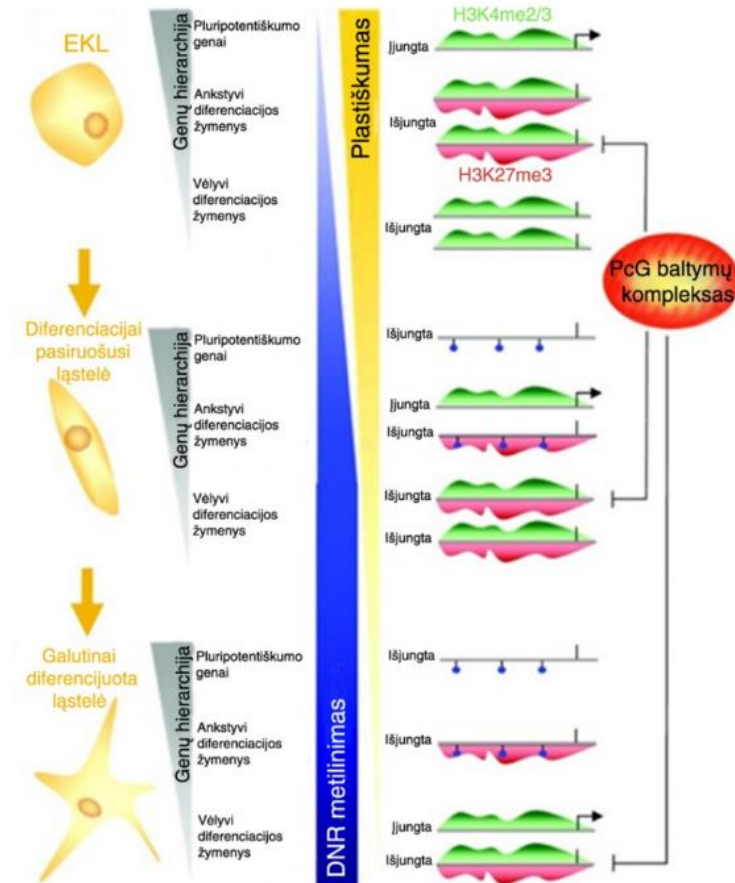
PcG baltymai gali dalyvauti ir genų aktyvime, ir jų nutildyme galutiniuose diferenciacijos etapuose. „Bivalentinės“ chromatinio būklės reguliavimo hipotezę EK ląstelėse pasiūlė Schuettengruber ir kt., (2009), kuri yra pateikta 2.6.1 pav. ir jo apraše.

Taigi, PcG baltymai yra labai svarbūs tiek EK ląstelių daugiapotentinės būsenos palaikymui, tiek ir jų diferenciacijos etapuose. EK ląstelėse daugiapotentiniai genai yra stabiliai nutildyti DNR metilimu, tuo tarpu PcG baltymų komplekso įtakotas nutildymo mechanizmas dinamiškai represuoja genus diferenciacijos metu (Schuettengruber ir kt., 2009) (2.6.2 pav.).



**2.6.1 pav.** „Bivalentės“ chromatinio būklės pokyčiai EK ląstelių diferenciacijoje (pagal Schuettengruber ir kt., 2009).

Pagrindiniai vystymosi reguliatorių genai yra pažymėti „bivalentinėm“ histonų modifikacijom – H3K27me3 ir H3K4me3. Daugelis šių bivalentiškai pažymėtų genų yra surišti su neaktyvia RNR polimeraze II, kurią tokioje būsenoje palaiko PRC1, atliekantis histono H2A lizino 119 ubikvitilimą. Papildoma histono modifikacija H2AZ žymi daugelį nutildytų pagrindinių vystymosi reguliatorių ir gali apsaugoti šiuos genus nuo DNR metilinimo ir ilgalaikio nutildymo. Po diferenciacijos aktyvuojami „bivalentiniai“ genai netenka represyvaus H3K27me3 žymens, o H2AZ persiskirsto į kitas genų grupes, kurios yra labai aktyvios. Histono H3K4 metiltransferazė MLL1 suskaido specifinius bivalentinius domenų, galimai pritraukiant H3K27 specifines demetilazes (K27DM). Priešingai, „bivalentiniai“ genai, kurie išlieka neaktyvūs diferencijuotose ląstelėse, praranda aktyvų H3K4me3 žymenį dėl histono H3K4-specifinių demetilazių (K4DM), tokių kaip RBP2, veiklos. H2AZ modifikacijos pakeitimas į H2A gali įtakoti CpG salelių metilinimą (meCpG), vedantį į stabilų genų nutildymą.

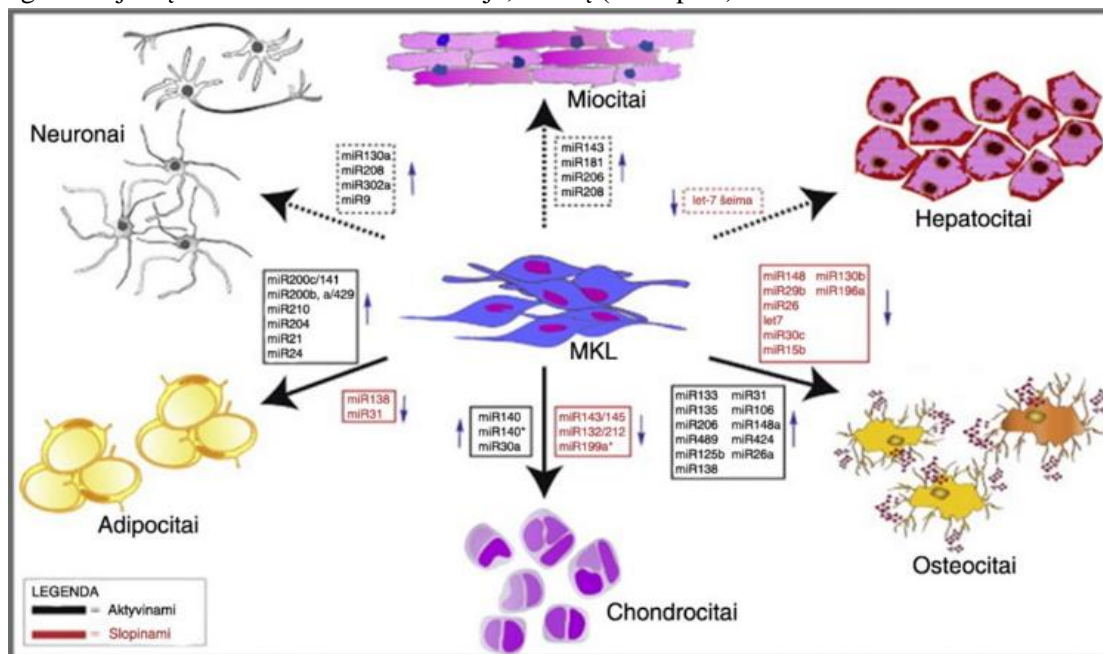


**2.6.2 pav.** PcG baltymų kompleksas dinamiškai reguliuoja genų hierarchiją apsprendžiant ES ląstelių likimą (pagal Schuettengruber ir kt., 2009).

EK ląstelėse ankstyvieji diferenciacijos genų žymenys yra slopinami/represuojami PcG baltymų kompleksais, kurie užtikrina stabilią ląstelių būklę ir identitetą. Dauguma PcG baltymų genų taikinių yra metilinti aktyviu žymeniu H3K4me3 ir represyviu H3K27me3 ir yra „bivalentėje“ būklėje. Vėlyvi diferenciacijos žymenys gali būti H3K4 metilinti, bet nėra ekspresuojami. Diferenciacijos pradžioje ankstyvieji diferenciacijos žymenys, kurie dalyvauja ląstelių tipo formavimesi, aktyvuojami ir praranda represyvų H3K27me3 žymenį, tuo tarpu kaip kiti KL-specifiniai „bivalentiniai“ genai, kurie lieka represuoti aktyvojoje diferenciacijos stadijoje, išlaiko H3K27 metilinimą, bet praranda H3K4 metilinimą. Tuo metu pluripotentinai genai tampa stabiliai represuoti, o DNR metilinti. Priešingai, PcG baltymai diferenciacijos pradžioje represuoja vėlyvos diferenciacijos žymenis, kurie vėliau tampa H3K27 metilinti *de novo*. Diferencijuotose ląstelėse kai kurie vėlyvos diferenciacijos genai aktyvinami (netenka H3K27me3), tuo tarpu kiti ankstyvos diferenciacijos genai lieka represuoti (Reik, 2007).



Epigenetinėje reguliacijoje taip pat dalyvauja mikroRNR (miRNR) – baltymus nekoduojančių 20 – 25 nukleotidų transkriptų šeima, atsakinga už ląstelėje vykstančius epigenetinius kitimus dėl jų poveikio potranskripcinei genų reguliacijai, nes miRNR moduliuoja genų raišką slopindamos mRNA translaciją arba indukuodamos mRNA degradaciją (Sato ir kt., 2011; Bianchi ir kt., 2017). Šios molekulės įtakoja normalius ir patologinius procesus, signalo perdavimo kaskadas, ląstelių tarpusavio ryšius, imuninę sistemą. MKL ląstelių diferenciacijos procesuose miRNR reguliuoja įvairių genų, tiesiogiai susijusių su atitinkama diferenciacija, veiklą (2.6.3 pav.).



**2.6.3 pav.** miRNR reguliacinis vaidmuo MKL įvairių krypčių diferenciacijoje į mezoderminius ir nemezoderminius audinius (pagal Schuettengruber ir kt., 2009). Raudonai pažymėtos miRNR yra slopinančios ir juodai pažymėtos miRNR – aktyvinančios genų veiklą MKL diferenciacijos į adipocitus, osteocitus, miocitus, chondrocitus, hepatocitus ir neuronus metu.

miRNR kaip MKL būsenos ir funkcijų epigenetinio regulatoriaus svarba dar nelabai seniai įvertinta bei tyrinėjama, tačiau neabejotinai jos kontroliuoja EKL pluripotentiškumą, savęs atsinaujinimą ir diferenciaciją (Guo ir kt., 2011). Bet to, dauguma miRNR, kurios ekspresuojamos žmogaus EK ląstelėse (Lakshimipathy ir kt., 2008), nedalyvauja MK ląstelių reguliacijoje. Kai kurios miRNR, kurios siejamos su pluripotentiškumu EK ląstelėse (miR302a, b, c, d ir miR200c) nėra ekspresuojamos MKL (Lakshimipathy ir kt., 2008). Kita vertus, miRNR šeimos let-7 nėra aptinkamas EKL, bet ekspresuojamas MKL ir dalyvauja osteogeninėje diferenciacijoje (Lakshimipathy ir kt., 2008). Nustatyta, jog osteogeninėje diferenciacijoje svarbų vaidmenį atlieka miR-2861, miR-335 bei miRNR-20a skatinamos diferenciaciją (Li ir kt., 2009; Tome ir kt., 2011; Zhang ir kt., 2011), tuo tarpu miR-27a, miRNR-489, miRNR-204 ir miRNR-138 ją stabdo slopindamos specifinių genų raišką (Schoolmeesters ir kt., 2009; Huang ir kt., 2010). MKL chondrogeninėje diferenciacijoje dalyvauja ir ją aktyvina/palaiko miR-130b, miR-152, miRNR-28, miRNR-26b (Han ir kt., 2010). Adipogeninę diferenciaciją skatinančios ar aktyvinančios yra miR-143, miR-17-92, miR-103, miRNR-21, o slopinančios ar blokuojančios yra miR-27, miR-130 ir Let-7 (Zhang ir kt., 2013).

Taigi, kamieninių ląstelių diferenciacija yra sudėtingas ir pakankamai griežtai apibrėžtas procesas, tad epigenetinė genų raiškos reguliacija atlieka be galo svarbų vaidmenį ląstelių gyvenime ir specializacijoje. Vaisiaus vandenys ir iš jų išskirtos ląstelės turi unikalias informacijos diagnozuojant nėštumo komplikacijas. Pačios vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės yra labai perspektyvios panaudojant biomediciniams tikslams kaip audinių ar organų regeneracijoje.

### 3. MEDŽIAGOS IR METODAI

#### 3.1. Vaisiaus vandenų kameninių ląstelių (VVKL) išskyrimas ir kultivavimas

Amniotinis skystis surenkamas ir transportuojamas steriliuose indeliuose, saugomas šaltai (4 – 8°C) ne ilgiau 12 val. Skystis perpilamas į sterilius mėgintuvėlius, centrifuguojamas 600 G 10 – 20 min. kambario temperatūroje (KT). Nusėdusios ląstelės (vadinamos AL – amniotinės ląstelės) praplaunamos 2 kartus steriliu PBS tirpalu arba 1 kartą su DMEM terpe be serumo; suskaičiuojamas ląstelių kiekis ir gyvybingumas nudažius 0,2% tripano mėliu. Ląstelių morfologija stebima šviesiniu mikroskopu. Ląstelės skiedžiamos augimo terpėje AmnioMAX II Complete (Gibco, Invitrogen Corp.), kultivuojamos 37°C termostate, 5% CO<sub>2</sub>. Pirmosios kolonijos (0 pasažas) pasirodo po 10 – 20 dienų. Pakeičiama terpė ir pašalinamos neprikibusios ir žuvusios ląstelės. Prikibusios, suformavusios pirmąsias kolonijas ląstelės auginamos šviežioje augimo terpėje iki reikiamo suaugimo tankio (80 – 90%) ir tada persėjamos kitam pasažui. Tolimesniuose pasažuose ląstelės kultivuojamos taip pat: mitybinė terpė vidutiniškai keičiama kas 2 – 3 paras iki 80 – 90% suaugimo tankio, kuris pasiekiamas per 2 – 5 paras. Persėjant ląsteles terpė nusiurbiamą, ląstelės 2 kartus praplaunamos su steriliu PBS. Ant ląstelių užpilama tripsino tirpalo (0,05% tripsinas, 1 mM EDTA) (25 µl/cm<sup>2</sup>), laikoma termostate 3 – 6 min., kol ląstelės atkimba nuo paviršiaus. Atkibusios ląstelės praskiedžiamos šiltoje augimo terpėje su serumu (1 – 2 ml), ląstelės suskaičiuojamos ir pernešamos į naujus flakonus (apie 1·10<sup>4</sup> ląst./cm<sup>2</sup>).

#### 3.2. VVKL išskyrimas dviejų pakopų metodu

Kai nulinio pasažo ląstelių klonai po terpės pakeitimo paauga apie 5 dienas, neprilipusios (blizgios) ląstelės (vadinamos MKL – mezenchiminės kilmės) surenkamos nuo adhezinių ląstelių, centrifuguojamos, skiedžiamos 1 ml AmnioMax terpėje ir suskaičiuojamos; po to išsėjamos optimaliu tankiu į plokštelę ar flakoną ir kultivuojamos; po poros pasažų VVKL kultūra yra homogeninė „šakotos“ formos (fibroblastinio tipo) ląstelių populiacija, kultivuojama iki ketvirto, penkto pasažus (kol likusios epitelinės ląstelės žūva) ir toliau naudojama eksperimentams. Visą kultivavimo laiką ląstelių morfologija stebima šviesiniu mikroskopu (Nicon Eclipse TS100). Ląstelės paprastai kultivuojamos, kol sulėtėja ląstelių proliferacija arba ląstelėse pasimato senėjimo požymiai. Ląstelių senėjimas įvertinamas naudojant β-galaktozidazės (SA-β-gal) dažymo rinkinį (Cell Signaling): ląstelės kultivuojamos 48 val. 48-duobelių plokštelėje, atplaunamos su PBS, fiksuojamos 4% formaldehidu 15 min. ir β-galaktozidazės aktyvumas nustatomas pagal nusidažymo intensyvumą po inkubavimo 37 °C termostate be CO<sub>2</sub>.

#### 3.3. Ląstelės paviršiaus žymenų nustatymas tėkmės citometrijos būdu

VVKL tripsinizuojamos, suspenduojamos DMEM terpėje su 10% fetalinio jaučio serumo (FBS), suskaičiuojamos, centrifuguojamos 600 g greičiu 6 min., nusėdusios ląstelės skiedžiamos 5 ml PBS su 0,2% FBS, surenkamos centrifuguojant. Ląstelėms, suspenduotoms 50 µl PBS su 1% jaučio serumo albumino (BSA) (8·10<sup>4</sup> ląst./mėg.), pelės antikūnų prieš žmogaus antigenus kiekis pridedamas pagal gamintojo rekomendacijas: CD105, žymėto fikoeritrinu (PE) (Invitrogen); CD44, žymėto FITC (Invitrogen), CD90, žymėto FITC arba antikūnų izotipinei kontrolei (pelės IgG2b-FITC (Miltenyi Biotech), žymėto PE, toliau inkubuojama 30 min., 4°C temperatūroje, tamsoje. Ląstelės centrifuguojamos, plaunamos su PBS ir 1% BSA tirpalu ir skiedžiamos 300 µl PBS su 1% BSA tirpalo, po to analizuojamos tėkmės citometru FACS Canto (Becton-Dickinson) įvertinant CD44-, CD90- ir CD105- teigiamų ląstelių imunofluorescenciją.

#### 3.4. Genų raiškos įvertinimas kiekybiniu realaus laiko (RL)-kPGR metodu

RNR išskiriama iš VVK ląstelių su TRIzol (Invitrogen) reagentu pagal gamintojo metodiką. Atvirkštinė transkripcija į kDNR atliekama naudojant Maxima komercinį rinkinį (First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific). RL-kPGR atliekama naudojant rinkinį (Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo Scientific) Rotor-Gene 6000 sistemoje (Corbett Life Science). RL-kPGR

būdu genų raiškos lygis standartizuojamas pagal GAPDH lygį. Santykinė genų raiška įvertinama palyginamuoju delta-delta Ct metodu (3.4.1 – 3.4.3 formulės). RL-kPGR buvo naudojami šie pradmenys (5’-3’ orientacija) (3.4.1 lentelė):

**3.4.1 lentelė.** Genų raiškos analizei naudotų pradmenų sekos.

Adiponektinas	F: GGAGACAGCTACTCCCAAGAT
	R:GTCCAGTCTTACCTCTCAAACCT
ALP	F: AGCCCTTCACTGCCATCCTGT
	R: ATTCTCTCGTTCACCGCCAC
ATM	F: CTCTGAGTGGCAGCTGGAAGA
	R: TTTAGGCTGGGATTGTTCGCT
GAPDH	F: AACTCTGGTAAAGTGGATATTG
	R: GGTGGAATCATATTGGAACA
Miogeninas	F: CAGCGAATGCAGCTCTCCACA
	R: AGTTGGGCATGGTTCATCTG
Nanog	F: CCTATGCCTGTGATTTGTGG
	R: 5’CCGGGACCTTGTCTTCCTTT
Nestinas	F: CAGCTGGCGCACCTCAAGATG
	R: AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG
Oct-4	F: CGAGAAGGATGTGGTCCGAG
	R: CAGAGGAAAGGACACTGGTC
p16	F: GCTGCCCAACGCACCGAATA
	R: ACCACCAGCGTGTCCAGGAA
p21	F: GGCAGACCAGCATGACAGATT
	R: GCGGATTAGGGCTTCCTCT
p53	F: TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC
	R: AGGACAGGCACAAACACGCACC
Rex1	F: ATGGCTATGTGTGCTATGAGC
	R: CCTCAACTTCTAGTGCATCC
Sox-2	F: GGCAGCTACAGCATGATGCAGGAC
	R:CTGGTCATGGAGTTGTACTGCAGT

$$(3.4.1)\Delta Ct = Ct (\text{tiriamo geno}) - Ct (\text{GAPDH})$$

$$(3.4.2)\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tiriamo geno}) - \Delta Ct (\text{kontrolinio mėginio})$$

$$(3.4.3) \text{ santykinė geno raiška} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**3.5. Vaisiaus vandens kamieninių ląstelių diferenciacija**

VVKL auginamos pilnoje AmnioMax terpė keičiama kas 5 – 7 dienas. Persėjant ląstelės auginamos iki 60 – 80% suaugimo tankio (vidurinėje logaritminio augimo fazėje, 90% gyvybingumas), kiekvienam pasažui išsėjama apie  $1 \cdot 10^4$  ląst./cm<sup>2</sup>. Diferenciacijai naudojamos ankstyvų pasažų (4 – 5 p) ląstelės; prieš diferenciaciją paauginamos 2 – 4 dienas iki reikiamo tankio. Dažytos ir nedažytos ląstelės stebimos šviesiniu mikroskopu Nikon Eclipse TS100.



### 3.5.1. Adipogeninė diferenciacija

Adipogeninė diferenciacija indukuojama naudojant STEM Pro Adipogenezės diferenciacijos rinkinį (Gibco, Invitrogen). Keičiant terpę kas 3 – 4 dienas, ląstelės diferencijuojamos per 12 – 20 dienų. Diferenciacija nustatoma pagal morfologinius požymius (susidaro lipidinės vakuolės) arba dažymu. Tam ląstelės praplaunamos su 60% izopropanoliu, išdžiovinamos ir dažomos šviežiai paruoštu Oil Red O tirpalu (3 dalys 0,35% dažo + 2 dalys distiliuoto vandens) 37 °C termostate, 10 min. Po to dažas nuplaunamas kelis kartus vandeniu. Diferenciacijos žymenys įvertinami RL-kPGR būdu.

### 3.5.2. Osteogeninė diferenciacija

Osteogeninė diferenciacija indukuojama pakeičiant augimo terpę pilna diferenciacijos terpe naudojant STEM Pro Osteogenezės diferenciacijos rinkinį (Gibco, Invitrogen). Ląstelės diferencijuojamos per 7 – 14 dienų keičiant terpę kas 3 – 4 dienas. Diferenciacija nustatoma pagal morfologinius požymius (mineralizuoto kalcio sankaupos) ir dažymu. Tam ląstelės praplaunamos 1 kartą su PBS, fiksuojamos 4% formaldehidu 30 min., po to praplaunamos 2 kartus distiliuotu vandeniu ir dažomos 2 – 3 min. 2% Alizarin red S tirpalu (pH 4,2). Praplovus 2 kartus distiliuotu vandeniu, įvertinama diferenciacija – raudonai dažosi mineralizuoto kalcio sankaupos. Diferenciacijos žymenys įvertinami RL-kPGR būdu.

### 3.5.3. Neurogeninė diferenciacija

Ląstelės auginamos augimo terpėje iki 40 – 60% tankio. Terpė pakeičiama į neurogeninės diferenciacijos terpę (DMEM/F-12 HAM, N2 priedas) su 1,5 μM *all-trans* retinoine rūgštimi (RA). Kultivuojama 6 – 12 dienų pakeičiant terpę kas 3 – 4 dienas, diferenciacija įvertinama pagal pakitusią ląstelių morfologiją ir nudažant su 0,1% Kristalo violeto tirpalu 20% etanolyje, po to dažas nuplaunamas vandeniu. Diferenciacijos žymenys įvertinami RL-kPGR būdu.

### 3.5.4. Miogeninė diferenciacija

Ląstelės išsėjamos augimo terpėje, auginamos iki 70 – 80% tankio. Prieš diferenciaciją ląstelės atplaunamos su Hank's terpe, po to užpilama miogeninės diferenciacijos terpė: DMEM su 2% arklio serumu. Diferencijuojama 4 – 14 dienų pakeičiant terpę kas kelias dienas. Diferencijuotos ląstelės fiksuojamos 4% formaldehidu 30 min., dažomos 0,1% Kristalo violeto tirpalu 20% etanolyje, po to dažas nuplaunamas vandeniu. Matomi susilieję branduoliai ląstelėje. Diferenciacijos žymenys įvertinami RL-kPGR būdu.

### 3.5.5. Chondrogeninė diferenciacija

Prieš diferenciaciją ląstelės suspenduojamos šiltoje augimo terpėje. Paruoštos koncentracijos 5 μl ląstelių suspensijos ( $0,8 \cdot 10^4$  ląst.) užlašinamos į plokštelės šulinėlio centrą. Inkubuojama terpėje 37 °C drėgnoje aplinkoje apie 2 val. Po to pridėjama pilna diferenciacijos terpė iš STEM Pro Chondrogenezės diferenciacijos rinkinio (Gibco, Invitrogen). Inkubuojama apie 3 savaites keičiant terpę kas 3 – 4 dienas. Įvykusi diferenciacija vertinama nudažant ląsteles. Tam ląstelės praplaunamos 1 kartą su PBS ir dažomos 30 min. 1% Alcian Blue tirpalu 3% acto rūgštyje. Po to, rūgšties pašalinimui jos perplaunamos vandeniu 3 kartus.

Diferenciacijos galimybių įvertinimui buvo naudotos kontrolinės grupės (normalaus nėštumo) ir su vaisiaus defektais (patologinio nėštumo) antro ar trečio trimestro vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės. Ląstelių morfologijos nustatymui ląstelės išsėjamos į šulinėlius plokštelėse, o RNR analizei – į auginimo flakonus.

### **3.6. Baltymų išskyrimas iš vaisiaus vandenų ir kamieninių ląstelių**

Ląstelių lizato paruošimui jos (1,5 – 3·10<sup>6</sup> ląst.) centrifuguojamos 600 G, 6 min., 4°C. Nusėdusios ląstelės suspenduojamos PBS buferyje ir nusodinamos centrifuguojant 600 g, 5 min., 4 °C. Procedūra pakartojama 2 kartus. Nusodintų ląstelių 1 tūriui pilama 0,1 tūris benzonazės, inkubuojama ledo vonelėje 30 min. Ląstelės lizuojamos SDS mėginio buferyje. Homogenizuotas mėginys inkubuojamas 5 min., 96 °C, nucentrifuguojamas ir saugomas -20 °C.

### **3.7. Baltymų paruošimas ir skirstymas SDS/PAGE ir dvikryptės (2-DE) elektroforezės sistemose**

Baltymai frakcionuojami SDS/PAGE ir 2-DE (IEF/SDS) elektroforezės sistemose. Baltymų pavyzdžiai izofokusavimui paruošiami sumaišius ištirpusius baltymus (mažiausiu santykiu 1:4) su pavyzdžio tirpalu (9M ureja, DTT, IPG buferis, pH 3 – 10, Tritonas X-100, bromfenolio mėlis). SDS elektroforezei naudojamas 7 – 12% PA gelis ir Tris-glicino elektroforezės buferis. Dvikryptėje elektroforezėje naudojami Immobililine DryStrip rinkiniai (Pharmacia Biotech), pH 3 – 10 ir 8 – 18 % SDS gradientiniai geliai. 2-DE elektroforezė atlikta vadovaujantis gamintojų pateiktais protokolais (Pharmacia Biotech). Tiek SDS-PAGE, tiek 2-DE geliai buvo dažomi sidabro dažymo rinkiniu (Pierce) arba Kumasi mėlio dažu vadovaujantis gamintojų nurodytomis instrukcijomis.

### **3.8. Baltymų paruošimas masių spektrometrijai**

Gelio juostelės su frakcionuotais baltymais iškerpamos ir praplaunamos 100 µl H<sub>2</sub>O kratant purtyklėje 5 min.; pašalinus vandenį, užpilama 100 µl 100% acetonitrilo, kratoma purtyklėje 10 – 15 min. Skystis pašalinamas ir geliukai džiovinami vakuuminėje centrifugoje 1 val. Ant išdžiūvusių gelių užpilama 100 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ir purtoma 10 – 15 min., po to užpilama 100 µl 100% acetonitrilo ir centrifuguojama 20 min.; po to tirpalas pašalinamas ir ant geliukų užpilamas toks pat tūris 100% acetonitrilo. Pašalinus acetonitrilą, geliukai džiovinami vakuuminėje centrifugoje apie 2 val. Baltymai geliukuose skaldomi iki peptidų su tripsinu 12 val., 37 °C (bendras tūris – 50 µl: 5 µl fermento Arg-C, 35 µl inkubacijos buferio (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 µl H<sub>2</sub>O). Po inkubacijos pridedama 10 – 15 µl H<sub>2</sub>O ir inkubuojama 15 min., 37 °C, po to vėl pridedama 20 µl 100% acetonitrilo ir inkubuojama purtant 15 min., 37 °C. Supernatantas po inkubacijos surenkamas į naują mėgintuvėlį. Ant nuosėdų užpilama 40 µl 5% skruzdžių rūgšties, sumaišoma ir inkubuojama 15 min., 37 °C kratant, po to nusiurbiamas supernatantas ir apjungiamas su pirmuoju supernatantu. Bendras supernatantas išdžiovinamas vakuuminėje centrifugoje. Prieš proteominę analizę MALDI-TOF Voyager (Applied Biosystems) ir ESI MS-MS Q STAR (Applied Biosystems) sistemose peptidai ištirpinami 5µl 5% acetonitrilo su TFA (galutinė koncentracija 0,01%). Mėginys užnešamas ant specialios plokštelės ir atliekama MALDI-TOF MS (ant kieto paviršiaus jonizavimas lazeriu ir masės nustatymas pagal jonų skriejimo laiką) analizė. Gauti masių spektrai analizuojami lyginant juos su esančiais duomenų bazėse. Baltymų spektrai, gauti MALDI-TOF Voyager būdu, apdoroti Data Explorer programa, o ESI MS-MS Q STAR – Analyst programa.

Baltymų identifikavimui naudotos šios duomenų bazės:

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

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

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

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

### **3.9. VVKL imunofluorescencinė analizė**

Ląstelės kultivuojamos plokštelės šulinėliuose ant stikliukų. Prieš analizę mėginiai perplaunami 3 kartus PBS tirpalu, pH 7,6 ir fiksuojami PBS-4% formaldehido tirpalu 15 min. Fiksuotos ląstelės perplaunamos 3 kartus PBS buferiu ir permeabilizuojamos 0,2% Triton X-100 tirpalu, 20 min. Toliau ląstelės vėl perplaunamos 3 kartus su PBS, vėl užpilamos ir laikomos 30 min. PBS tirpale su 1% BSA ir 10% (v/v) ožkos serumo (Dako Cytomation) kambario temperatūroje.

Stikliukai perplaunami tirpalu PBS/1% BSA ir inkubuojami su pirminiais antikūnais prieš H4ac(penta), H4K16ac, H3K9ac, H3K14ac, H3K9me2, H3K9me3 (Upstate Biotechnology), H3K27me3 (Millipore), 5-mC (Abcam) 60 min., 37°C užpilant 4 kartus su PBS/1% BSA, pH 7,6. Po to stikliukai yra inkubuojami su antriniais antikūnais (Alexa Fluor 488, ožkos antikūnas prieš triušio IgG (H+L), 37°C, 60 min. tamsoje, po to perplaunant 4 kartus su PBS/1% BSA. Tokia pat darbo eiga mėginiai inkubuojami su DAPI dažu 10 min., kambario temperatūroje ir perplaunant 5 kartus su PBS/1% BSA. Kiekvieno pavyzdžio imunodažymas atliekamas 3 pakartojimais ir ne mažiau 3 kartus kiekvienai histonų modifikacijai. Analizuojami tie mėginiai, kuriuose 70 – 80% ląstelių pasižymėję teigiamai tiriamais histonų žymenimis. Dažyti mėginiai perplaunami ir fotografuojami naudojant Zen 2011 programinę įrangą Axio Cam Hrm fotoaparatu, įmontuotu Carl Zeiss Overall View Axio Observer ir Z1 mikroskope ir panaudojant 63X aliejaus imersinį objektyvą.

Imunofluorescencinių pavyzdžių analizei nustatomi integruotos fluorescencijos intensyvumo (IFI) pokyčiais tiriamuose ląstelės srityse, t.y. branduolyje. Reikiami nustatymai ir parametrai atliekami Matlab™ aplinkoje (The MathWorks, Natick MA). IFI nustatymui segmentuojami DAPI vaizdai (norint apibrėžti branduolio kontūrus) ir sumuojami Alexa Fluor 488 vaizdo pikselių intensyvumai branduoliuose. Vaizdų segmentacijos įvertinimas branduolio srityse apima vaizdų manipuliavimo pakopas, tokias kaip Gauso vaizdo išlyginimas, simetrinis funkcijų aptikimas, Watershed transformacijos ir ribų nustatymas. Simetrinių galimybių detektorius sugeneruoja antrinius žemėlapius pagal Johansson (2004) metodą. Baltymo kiekis yra siejamas su IF intensyvumu tam tikroje ląstelės vietoje. IFI rezultatų apskaičiavimui naudojama formulė (3.9.1), kur  $(x, y)$  – pikselių koordinatės:

$$(3.9.1) \quad IFI = \sum_{(x,y) \in ROI} I^{FITC}(x,y)$$

Skirtingų eksponavimo laikų raiškos atskiruose pavyzdžiuose išlyginimui naudojama kalibravimo kreivė iš vaizdų matavimų nustatytuose laiko intervaluose. Statistinis patikimumas tarp dviejų mėginių atliktas Wilcoxon testu. Statistinės reikšmės pokyčiai tarp mėginių pateikti VVKL fluorescentinės analizės paveiksluose.

### 3.10. VVKL mikroRNR analizė

kDNR sintezei bei miRNR raiškos tyrimams naudoti Applied Biosystems® komerciniai rinkiniai ir reagentai (TaqMan® MicroRNA Assay (JAV), TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Lietuva) ir TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG (JAV)). Visos procedūros atliktos pagal gamintojo rekomendacijas. kDNR sintezės reakcija atliekama termocikleryje (Finnzymes) pagal programą: 30 min. inkubavimas 16 °C, 30 min. 42 °C ir 5 min. 85 °C. Pasibaigus sintezės reakcijai, atliekama miRNR raiškos analizė naudojant RL-kPGR arba mėginiai užšaldomi -20°C. RL-kPGR paleidžiama termocikleryje (Corbett Research) tokiomis sąlygomis: 2 min. 95 °C, 15 sek. 95 °C, 1 min. 60 °C. Visos reakcijos vykdytos tripletais. Kiekybinis miRNR raiškos pokytis apskaičiuojamas pritaikius  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodą (3.10.1 – 3.10.3 formulės). Nustačius kontrolinės miRNR RNU 48 bei tiriamų miRNR Ct reikšmes apskaičiuojama  $\Delta Ct$  reikšmė pagal formulę (3.10.1).  $\Delta\Delta Ct$  reikšmė gaunama normalizavus  $\Delta Ct$  reikšmę pagal tiriamos miRNR kontrolinio mėginio  $\Delta Ct$  (3.10.2). Santykinė gero raiška apskaičiuota pagal formulę (3.10.3).

$$(3.10.1) \Delta Ct = Ct(\text{tiriamos miRNR}) - Ct(\text{RNU 48})$$

$$(3.10.2) \Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tiriamo mėginio}) - \Delta Ct(\text{kontrolinio mėginio})$$

$$(3.10.3) \text{ santykinė geno raiška} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.11. Statistinė duomenų analizė

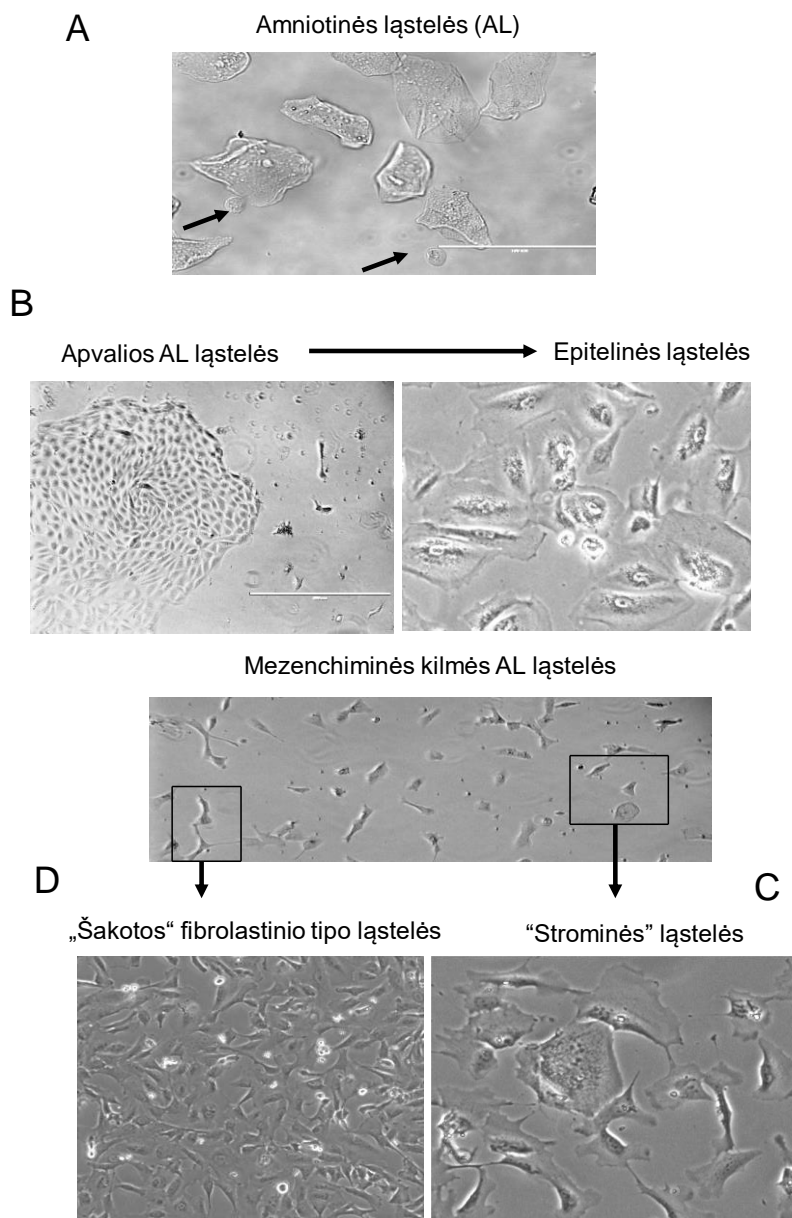
Gauti rezultatai panaudojus tėkmės citometrijos metodą, RL-PGR ir Western blotų įvertinti gauti rezultatai naudojant Student't testą ir pateikti kaip vidurkis  $\pm SD$  (standartinis nuokrypis), apskaičiuotas iš kelių (dažniausiai trijų) nepriklausomų bandymų. Reikšmės \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 ir \*\*\*P < 0.001 vertinamos kaip statistiškai patikimi rezultatai.

## **4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

### **4.1. Antro ir trečio trimestro VVKL charakterizavimas**

#### **4.1.1. Ląstelių morfologija**

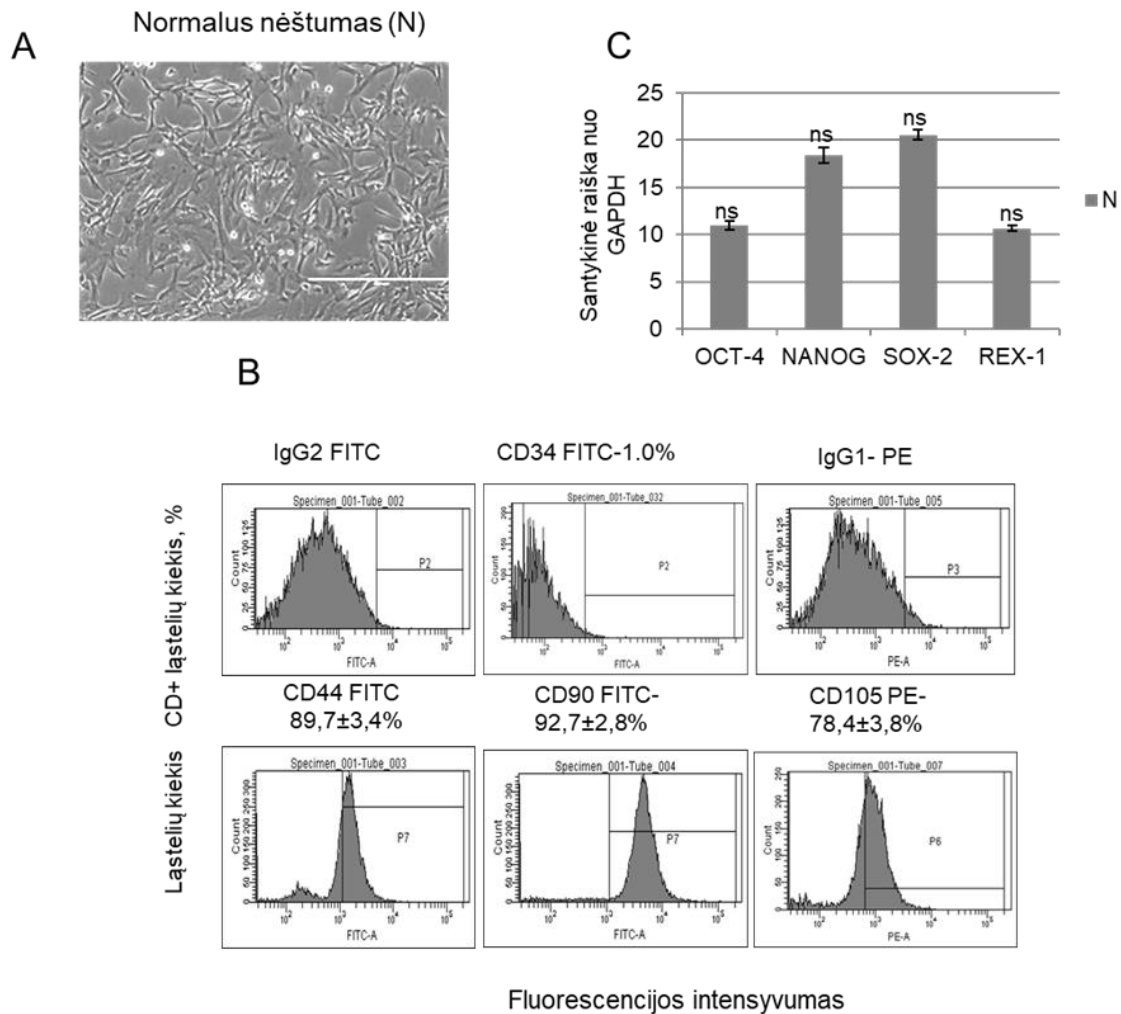
Vaisiaus vandenų ląstelės yra heterogeninė populiacija ir tik 1% iš jų yra kamieninės prigimties, turinčios visas kamieniškumo charakteristikas. Šiame darbe VVK ląstelės buvo gaunamos panaudojant dviejų pakopų išskyrimo metodą. Ląstelės buvo išskiriamos iš antro ir trečio trimestro vaisiaus vandenų mėginio paėmimo dieną ir kultivuojamos. Pirminėje kultūroje stebima mišri populiacija sudaryta iš apvalios ir „šakotos“ ląstelių, sudarančių kolonijas po 10 – 20 dienų (4.1.1.1 pav. A). Kultivavimo metu 2 – 3 pasaže aptinkamos salelės kolonijas sudarančių mažų sferinių ląstelių, panašių į epitelines, kurių centrinėje dalyje lokalizuotas branduolys (4.1.1.1 pav. B). Pirminėje kultūroje aptinkamos lėtai augančios didelės, plačios „strominio“ tipo ląstelės su netaisyklingu citoplazmos ištįsimu ir mažu branduoliu citoplazmos pakraštyje (4.1.1.1 pav. C). Verpstės formos fibroblastinio tipo ląstelės, kurios turi didelį proliferacijos potencialą, gerai ir greitai dalijasi, vyrauja kultūroje nuo trečio pasažo (4.1.1.1 pav. D). Kamieninių ląstelių gavimas naudojant dviejų pakopų išskyrimo protokolą buvo sėkmingas pasirinkimas, nes šios nesudėtingos procedūros metu gaunama ląstelių populiacija jau po 4 pasažo buvo homogeninė ir fibroblastinio (mezenchiminio M) tipo (4.1.1.1 pav. D). Tokios VV-MKL ląstelės pasiekia 80 – 90% tankį per 2 – 4 dienas. Jų fenotipo bei diferenciacijos potencialo charakteristikos buvo įvertinamos po 4 – 6 kultivavimo pasažų.



**4.1.1.1 pav.** Vaisiaus vandenų ląstelių morfologija. (A) – vaisiaus vandenų ląstelės iš mėginių, paimtų amniocentezės metu. (B) – epitelinio tipo ląstelės, suformuojančios kolonijas 7 – 14 d. po išsėjimo. (C) – „strominio“ tipo mezenchiminės ląstelės. (D) – mezenchiminio tipo „šakotos“ formos ląstelės, suformuojančios kolonijas 7 – 20 d. po išsėjimo.

#### 4.1.2. VV-MKL imunofenotipinės savybės

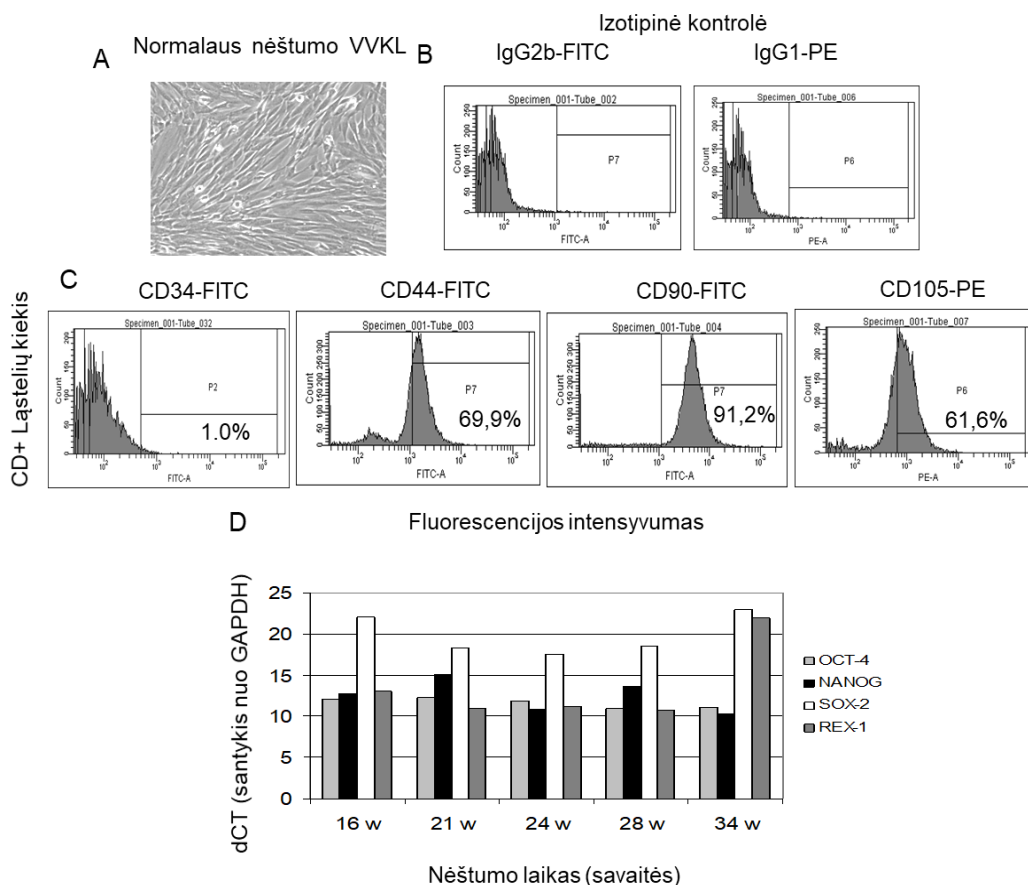
VVKL paviršiaus žymenų charakteristikos buvo įvertintos tėkmės citometrijos metodu. MKL tipine morfologija ir tipine proliferacija pasižyminčių ląstelių (4.1.2.1 pav. A), išskirtų iš trijų normalaus nėštumo vaisiaus vandenų mėginių, paviršiaus žymenų (CD44, CD90, CD105) su izotipine kontrole analizės reprezentacinė histograma pateikta 4.1.2.1 paveikslo B dalyje.



**4.1.2.1 pav.** VV-MKL, išskirtų iš normalaus nėštumo VV mėginių, imunofenotipinės charakteristikos. (A) MKL morfologija 5 pasaže. (B) tėkmės citometrijos histogramos, gautos analizuojant normalaus nėštumo MKL (N, n=3). Reikšmės pateiktos CD-teigiamų ląstelių kiekiu (%) kultūroje. (C) kamieniškumo žymenų raiška kultūroje N (n=3), įvertinta RL-kPGR. Visi duomenys pateikti kaip vidurkis ± SD, \* P ≤ 0.05 – statistiškai patikimi, ns – statistiškai nereikšmingi.

Tėkmės citometrijos (TC) analizės duomenimis, normalaus nėštumo MKL pasižymi teigiamais ląstelių paviršiaus kamieniškumo žymenimis: CD105 (endoglinas) (78,4±3,8%), ląstelių adhezijos CD44 (89,7±3,4%), ir mezenchiminių ląstelių CD90 (Thy-1) (92,7±2,8%).

Taip pat gauti rezultai parodė (4.1.2.2. pav.), kad MKL gautose iš skirtingų donorių (n=12), skirtingais nėštumo laikotarpiais (16-34 savaitė) santykinė kamieniškumo raiška kinta (4.1.2.2 pav. D) ir kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų lygis svyruoja: CD44 (nuo 53,9 iki 69,9%), CD90 (nuo 69,9 iki 91,2%), CD105 (nuo 49,3 iki 61,6%), MKL neturėjo hematopoetinių ląstelių žymens CD34 (4.1.2.2 pav. C). Vis dėlto, MKL fenotipinės savybės kiek skyrėsi priklausomai nuo nėštumo laikotarpio ir atskiro individo. 4.1.2.2 paveikslo C dalyje pateikta KL, išskirtų iš sveikos donorės 3-jo trimestro nėštumo, TC analizės rezultatai, parodantys gana aukštą CD90 (91,2%) lygį, tačiau sumažėjusį CD44 (69,9%) ir CD105 (61,6%) teigiamų žymenų kiekį populiacijoje.



**4.1.2.2 pav.** MKL, gautų iš trečiojo trimestro VV, fenotipinės charakteristikos. (A) VV-MKL morfologija, 4 pasažas; (B) Tėkmės citometrijos izotipinės neigiamos kontrolės histogramos. (C) MK ląstelių, gautų iš trečiojo trimestro VV, paviršiaus žymenys; (D) Santykinė kamieniškumo žymenų Oct4, Nanog, Sox2 and Rex1 raiška VV-MKL populiacijoje iš antrojo ir trečiojo trimestro mėginių (n=5) (4-6 pasaže), gauta RL-kPGR būdu. Santykinė mRNA raiška GAPDH atžvilgiu.

#### 4.1.3. VV-MKL kamieniškumo žymenų charakteristika

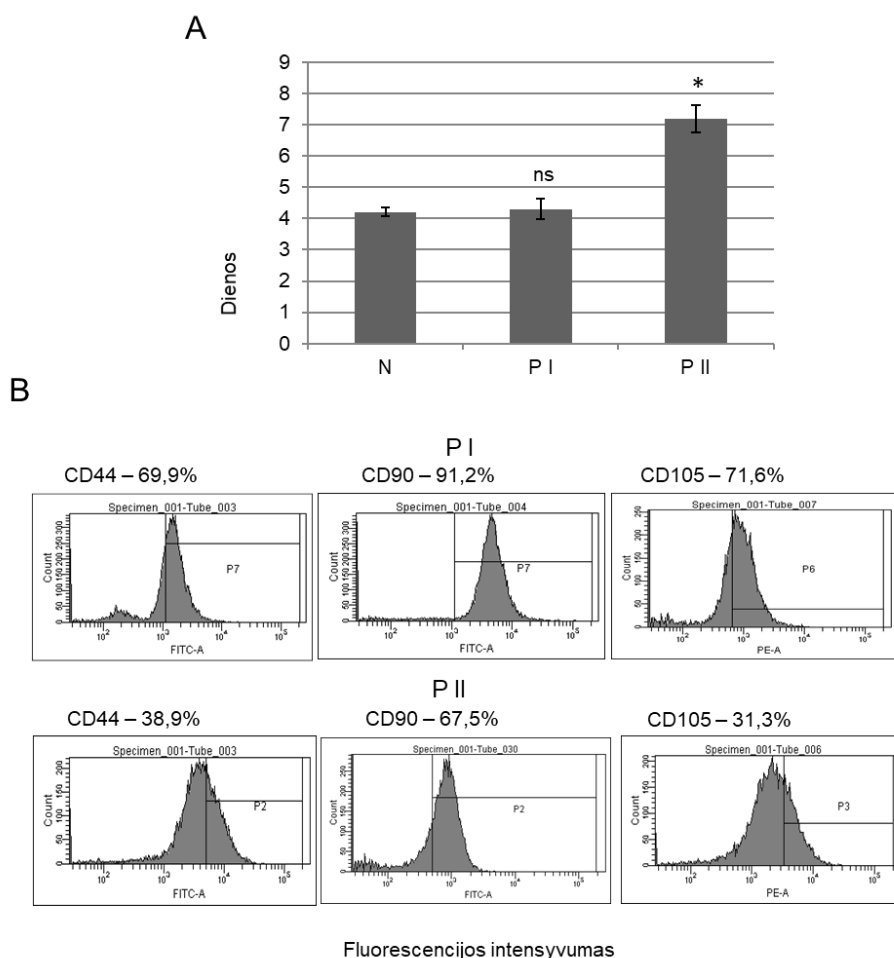
MKL, išskirtos iš VV esant normaliam nėštumui buvo įvertintos tiriant jų kamieniškumo žymenis, kurie yra atsakingi už ląstelės vystymąsi ir palaiko jų atsinaujinimą. RL-kPGR analizės rezultatai parodė, kad 4 – 6 pasažo MK ląstelės pastoviai ekspresavo Oct-4, Nanog, Sox-2 ir Rex-1 (4.1.2.1 pav. C) patvirtinant šių ląstelių kamieniškumo prigimtį.

VV-MKL buvo išskirtos skirtingu nėštumo laikotarpiu, t.y. iš individualių donorių, antrojo ir trečiojo trimestro mėginių (16 – 28 savaitė), ir įvertinta kamieniškumo žymenų raiška (4.1.2.2 pav.). Šiuose mėginiuose santykinis Oct-4 ir Nanog lygis išlieka mažai pakitęs, o kai kurie Sox-2 ir Rex-1 raiškos lygių skirtumai buvo susiję su nėštumo trimestru. Vėlyvuoju nėštumo laikotarpiu (34 savaitė) MK ląstelėse tiek Sox-2, tiek Rex-1 raiška buvo sumažėjusi (4.1.2.2 pav. D).

#### 4.2. Normalaus ir vaisiaus patologinio nėštumo VVKL savybių palyginimas

MKL išskirtos ir kultivuotos iš VV mėginių, paimtų amniocentezės metu esant normaliam ir patologiniam nėštumui. Ląstelės buvo sėkmingai išskirtos ir kultivuotos iki tol, kol jų proliferacija pradėjo mažėti. Iš įvairių nėštumo būklių išskirtos ląstelės sudarė homogenines populiacijas, kuriose vyravo mezenchiminio tipo „šakotos“ formos ląstelių kolonijos, kultivuojamos bent iki aštunto pasažo. Analizuojant donorių mėginius ir įvertinus MKL morfologiją, fenotipą ir augimo charakteristikas, buvo išskirtos trys pagrindinės grupės: normalaus nėštumo – N grupė (donorės D1, D2, D3) iš 16 – 20

nėštumo savaičių mėginių, bei su patologijomis: PI grupė – esant vaisiaus vystymosi sutrikimams, kai mėginiai gauti iš trijų donorių (D4 – vaisiaus stemplės atrezija, D5 – neimuninė vaisiaus vandenė, D6 – dvynių transfuzijos sindromas. Grupę PII sudarė mėginiai iš donorių su vaisiaus genetiniais/chromosominiais pakitimais ar daugiasisteminiais sutrikimais (D7 - kraujotakos sutrikimai, D8 – Edvardso sindromas, D9 – displazija, teratoma).



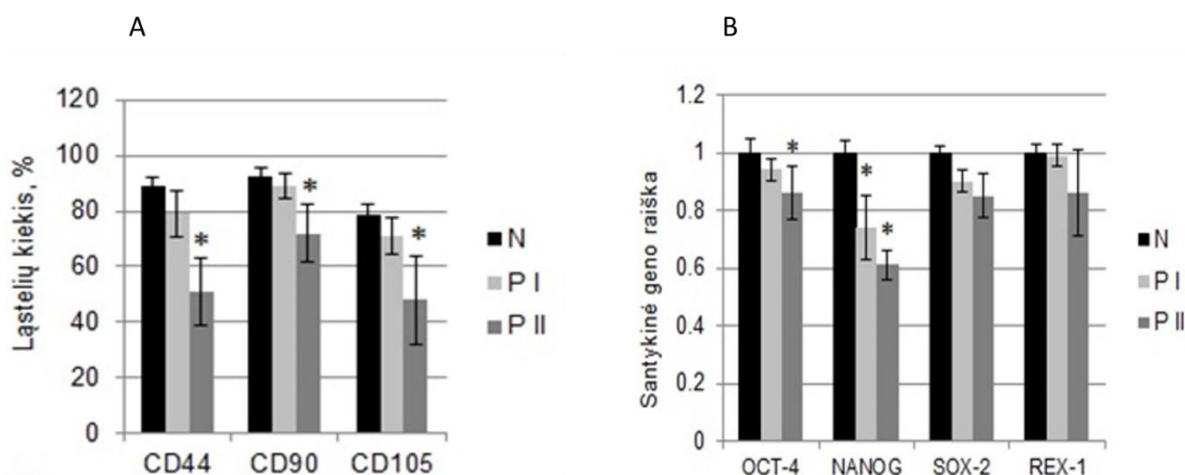
**4.2.1 pav.** MKL, gautų iš vaisiaus vandenų esant vaisiaus patologijoms, charakteristikos. (A) Ląstelių proliferacijos lygis (kultivavimo laikas (d.)/bendras pasažų skaičius) kultūroje iš normalaus nėštumo mėginių (N, n=3) ir mėginių esant nėštumo patologijoms (PI ir PII, n=3 kiekvienoje grupėje) kultivavimo metu. (B) Tėkmės citometrijos histogramos iš grupės PI (donorė 5) ir grupės PII (donorė 8) MKL 5 pasaže. CD44, CD90, CD105 (%) – teigiamų ląstelių kiekis iš normalaus vaisiaus vystymosi mėginių (N, n=3) ir mėginių su vaisiaus vystymosi sutrikimais (PI ir PII, n=3 kiekvienoje grupėje) (5 pasaže). Visi gauti rezultatai pateikti kaip vidurkis +SD, \*P <0.05 – statistiškai patikimas, ns – nereikšmingas pokytis.

MKL, išskirtos iš PI mėginių buvo vyraujančios „šakotos“ formos ląstelės su panašiomis proliferacijos galimybėmis kaip ir N kultūrose. PII grupės MKL turėjo mažesnę proliferacinę potencialą ir ryškiai išreikštą mezenchiminio tipo ląstelių morfologiją, bet 5 pasaže atsiranda kitokios formos ląstelių: jos buvo padidėjusios, plokščios su padidinta citoplazmine granuliacija, kuriose pastebimi senėjimo požymiai ir SA-β-galaktozidazės aktyvumas. Ląstelės paviršiaus žymenų analizė PI (n=3) ir PII (n=3) grupėse 5 pasaže buvo atlikta tėkmės citometrijos metodu. 4.2.1 paveikslas B dalyje pateiktos analizuojamo mėginio D5 iš PI grupės MKL histogramos parodė panašias CD90 (91,2%) ir CD105 (71,6%) reikšmes, bet mažesnę CD44 raišką, kuri buvo 38,9% (palyginus su grupe N). Ir priešingai, mėginio D8 iš PII grupės ląstelių, kurių proliferacija buvo kur kas lėtesnė, CD90 (67,5%) lygis buvo sumažėjęs ir ypač pastebimai kritę CD44 (38,9%) ir CD105 (31,3%) lygiai.



Atlikus platesnę paviršiaus žymenų analizę N (n=3), PI (n=3) ir PII (n=3) pavyzdžiuose, apibendrinti rezultatai pateikti 4.2.2 paveikslo A dalyje. Taigi, nebuvo pastebėti didesni morfologiniai ir fenotipiniai pokyčiai tarp analizuojamų N ir PI mėginių, tačiau, CD žymenų lygis buvo akivaizdžiai mažesnis PII grupėje, stebima pakitusi ląstelių morfologija, tikėtina dėl prasidėjusių senėjimo procesų (padidėja SA- $\beta$ -galaktozidaze nusidažusių ląstelių), įtakojančių ir ląstelių proliferacijos sumažėjimą.

RL-kPGR pluripotentiškumo žymenų Oct-4, Nanog, Sox-2, Rex-1 raiškos analizė atskleidė jų skirtumus lyginant PI (n=3) ir PII (n=3) kultūras. Palyginus šių žymenų profilį su N grupės kultūra, pastebėta, kad pagrindinių daugiagališkumo žymenų, Oct-4 ir Nanog, raiška buvo panaši į PI grupės, bet kur kas mažesnė šių transkripcijos veiksnių raiška buvo PII mėginių grupėje (4.2.2 pav. B). Transkripcijos veiksnių tinklo procesuose dalyvaujančių Sox-2 ir Rex-1 raiškos pokyčiai buvo mažesni visose ląstelių kultūrose. Taigi, galime daryti prielaidą, kad ląstelės paviršiaus ir kamieniškumo žymenų profilis kinta priklausomai nuo ląstelių būklės ir jų kultivavimo metu arba taip pat gali būti susiję su donorės individualiomis savybėmis.

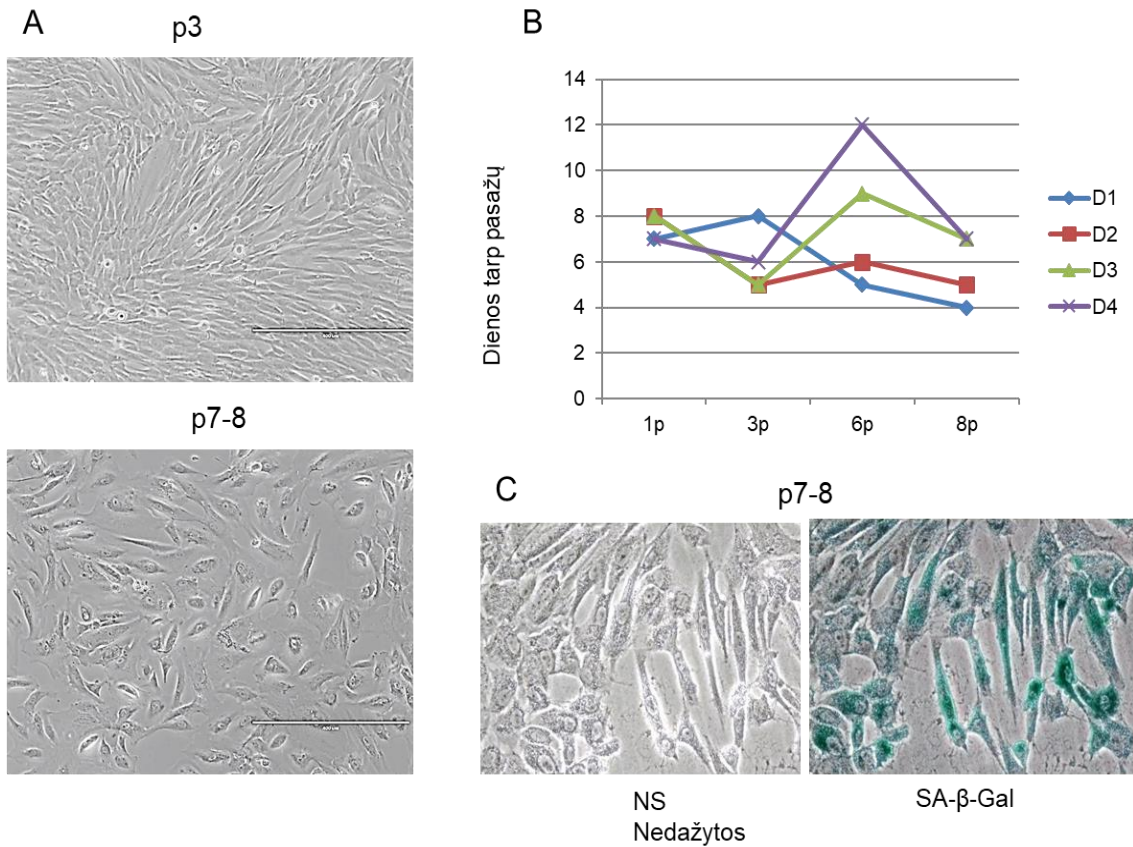


**4.2.2 pav.** MKL, išskirtų iš vaisiaus vandenų esant vaisiaus vystymosi sutrikimams, charakteristikos. Rezultatuose (A) pateikta CD44, CD90, CD105 (%) – teigiamų ląstelių kiekis N, PI ir PII kultūrose (n=3 kiekvienoje grupėje), (B) kamieniškumo žymenų raiška, nustatyta RL-kPGR metodu, normalizuota pagal GAPDH raiškos lygį. Visi gauti rezultatai pateikti kaip vidurkis +SD, \*P < 0.05 – statistškai patikimas, ns – nereikšmingas pokytis.

### 4.3. VVKL senėjimo molekuliniai mechanizmai

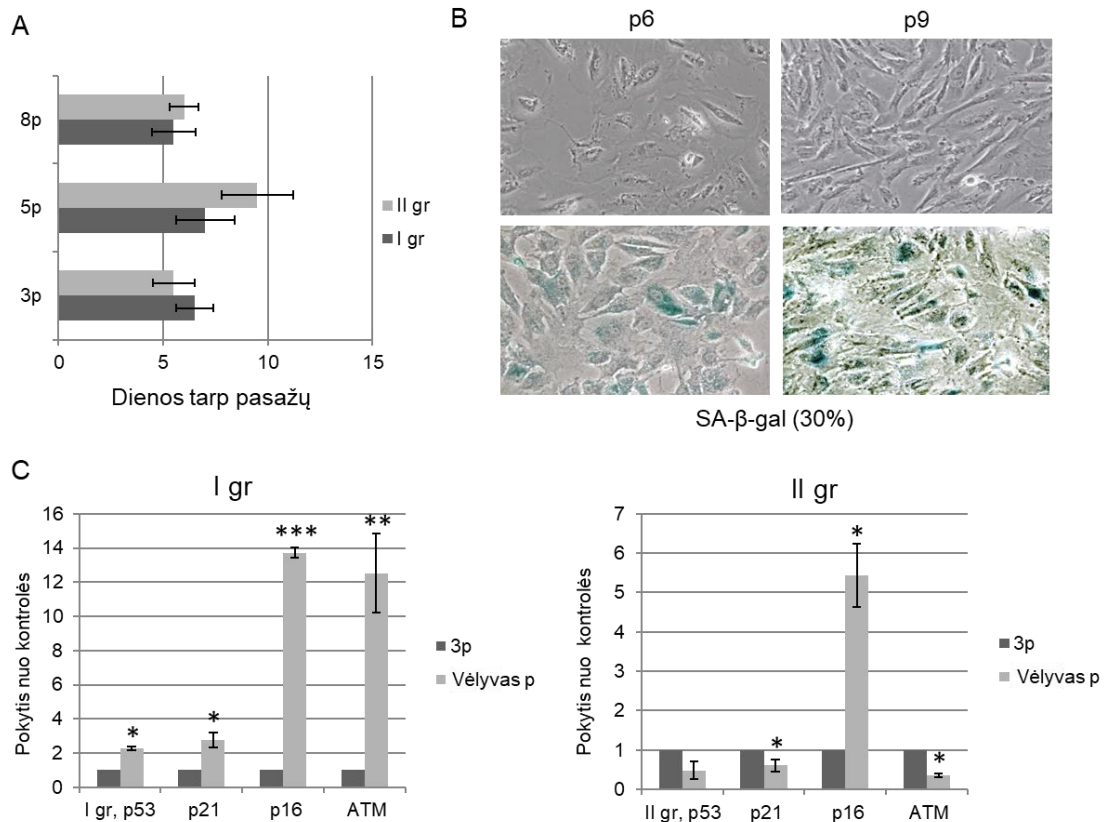
Pasažuojant ląstelių kultūras, kurios išskirtos iš VV, apibendrinus ir įvertinus, matyti, kad MKL išlaiko savo charakteristikas, tokias kaip: imunofenotipas ir kamieniškumo veiksniai, tačiau jų proliferacinis potencialas labai kito vėlyvose pasažuose. MKL buvo auginamos iki 3 - 9 pasažų pasiekiant konfluenciją iki 80 - 90%. Ankstyvuose pasažuose (3 - 4 p) ląstelių kultūros iš abiejų VV šaltinių formavo vienodą tipišką pailgos, mezenchiminio tipo ir verpstės formos morfologiją (4.3.1 pav. A). Vėlyvesniuose pasažuose nuo 5 – 8, ląstelių kultūrose pastebimas proliferacinis sumažėjimas. Laikas, per kurį pasiekiami senėjimo procesai, yra skirtingi kaip parodyta paveiksle (4.3.1 pav. B). Kai kurie mėginiai, įskaitant VV esant normaliam nėštumui (D1, D2) ir esant vaisiaus patologijai (D4) išskirtų ląstelių proliferacija sumažėjo gana anksti (5 - 6 p).

Taip pat pastebimi morfologiniai ląstelių pokyčiai pasažuojant ląstelių kultūras iš skirtingų pacienčių mėginių, kurios turėjo tipinių MKL savybių su plokščios formos morfologija (4.3.1 pav. A). Palyginant ląstelių nuotraukas, darytas kultivavimo metu paskutiniuose pasažuose yra pastebimos ląstelės plokščios formos su padidinta citoplazmine granuliacija, jos dažosi  $\beta$ -galaktozidaze (SA- $\beta$ -gal) patvirtinant senėjimo procesą (4.3.1 pav. C). Šie su senėjimo procesais susiję pokyčiai pasireiškiantys MKL mėginiuose (D3, D4) taip pat siejami su lėtesniu proliferacijos procesu.



**4.3.1 pav.** MKL gautų iš VV charakteristikos. (A) Ląstelių morfologija ankstyvajame 3 pasaže, bei vėlesniajame pasažas 7-8. (B) Ląstelių, gautų iš individualių donorių VV mėginių, proliferacijos lygis dienomis ir bendras pasažų skaičius. (C) Su senėjimu siejamas  $\beta$ -galaktozidazės dažymas, NS-nedažytos ląstelės. Pateikti rezultatai gauti iš keturių nepriklausomų analizuojamų mėginių.

Analizuojant MKL kultūrų gautus rezultatus matyti, kad kiekvienoje kultūroje skirtingai prasideda senėjimo procesai. I grupė - greičiau proliferuojančių ląstelių kultūra, kurioje anksčiau prasidėjo senėjimo procesai (5 - 6p). II grupė apima lėčiau proliferuojančią ir lėčiau senstančią kultūrą (8 - 9p) (4.3.2 pav. A).



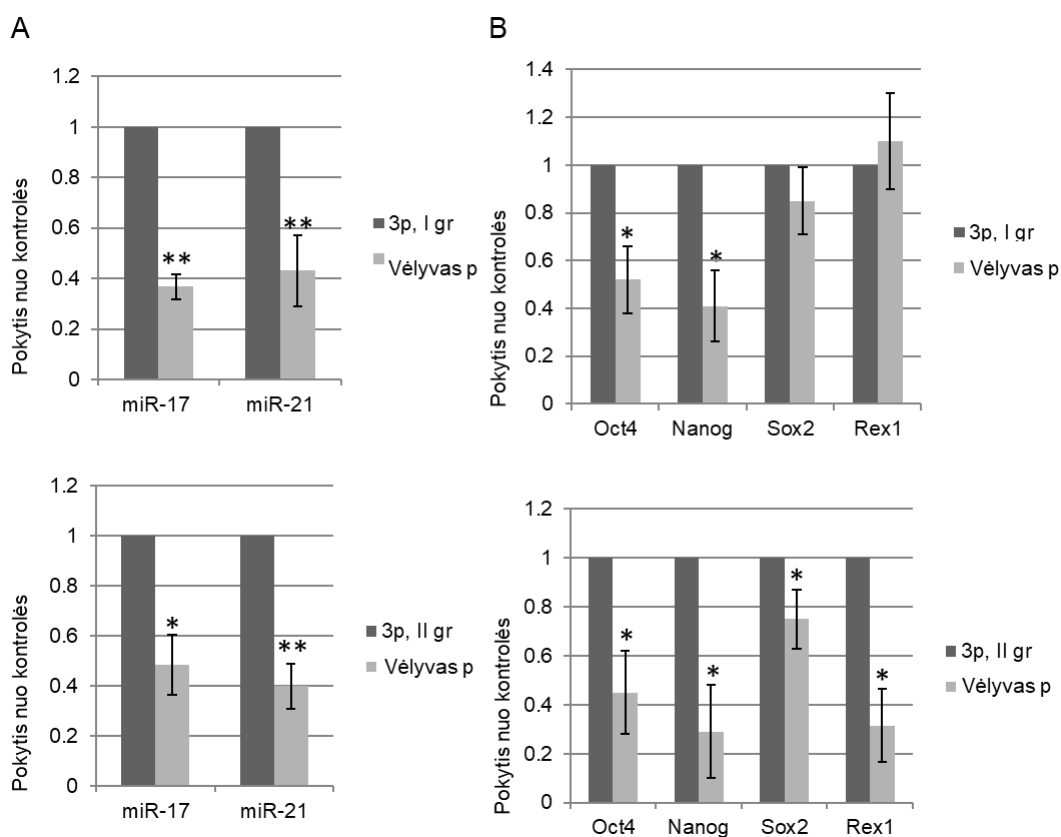
**4.3.2 pav.** Ląstelių senėjimo žymenų kitimas MKL ląstelių kultūrose kultivavimo metu. (A) MKL proliferacijos potencialas I ir II grupės kultūrose kultivuojant ląsteles 3p, 5p ir 8p (n=3, kiekvienoje grupėje). (B) Kontrolinės ir SA-β-galaktozidaze nusidažiusios I ir II grupės MKL 6 ir 9pasaže. (C) Senėjimo žymenų iRNR raiška I ir II grupės MKL kultūrose 3p ir vėlyvuose kultivavimo pasažuose nustatyta RL-kPGR būdu. Duomenys normalizuoti su GAPDH, genų raiškos pokyčiai (kartais) apskaičiuoti kontrolės (3p) atžvilgiu. Visi gauti rezultatai pateikti kaip vidurkis +SD, \*P ≤0,05, \*\*P≤0,01 ir \*\*\* P≤0,001 – statistiškai patikimi.

Visose senstančiose kultūrose vyksta ląstelių morfologiniai pokyčiai atsirandant padidėjusioms išplokštėjusios formos ląstelėms, kuriose sustiprėja SA-β-galaktozidazės aktyvumas (4.3.2 pav. B). SA-β-galaktozidaze nusidažančių mėlynų ląstelių kiekis (apie 30%) aptinkamas I grupėje maždaug po 6 pasažų, o II grupėje – po 9 pasažų (t.y. vėlyvesniuose pasažuose). Toliau nagrinėjome molekulinį pokyčių charakteristikas šiose ląstelių grupėse. RL-kPGR būdu nustatyta, jog *p16* geno raiška žymiai padidėja vėlesniuose pasažuose, I grupės mėginiuose – padidėja 14 kartų, o II grupės – apie 5,5 karto palyginus su ankstyvo pasažo (3p) MKL kiekvienoje grupėje (4.3.2 pav. C). Norint įvertinti mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) senėjimo charakteristikas, pasitelkėme iRNR raiškos profilių analizę bei morfologinių ląstelių pokyčių stebėjimus. Tyrėme klasikinių, su ląstelių senėjimu susijusių genų, tokių kaip p16 INK4A (p16), p21 WAF1 (p21), p53 bei ATM (angl. *Ataxia telangiectasia mutated protein kinase*) raišką tiek ankstyvo, tiek vėlyvo pasažo ląstelių kultūrose.

Atsižvelgdami į mūsų pastebėjimus, kad įvairių MKL kultūrų dauginimosi greitis ir senėjimo efektyvumas kultivavimo metu yra nevienodas, MKL mėginius išskyrėme į 2 grupes: I grupę sudarė gerai besidauginančios MKL, kurių pirmieji senėjimo požymiai atsiranda po 5 – 6 pasažo, o II grupei priklausė lėtai besidauginančios MKL, kurios atvirksčiai koreliavo su ląstelių proliferacijos greičiu. Įdomu tai, kad *p21* ir *p53* genų raiška, lyginant vėlyvus ląstelių pasažus su ankstyvais, padidėja greičiau senstančioje I grupės mėginių grupėje, o šių genų raiška sumažėja lėčiau senstančioje II-oje mėginių grupėje. ATM, dalyvaujančio ląstelės ciklo uždelsime atsiradus DNR pažaidoms, geno raiškos analizė parodė teigiamą koreliaciją tarp padidėjusios ATM ir *p53/p21* raiškos senėjančiose I grupės kultūrose, ir neigiama ATM

koreliacija – II grupės kultūrose. Šie duomenys parodo, jog šiose MKL kultūrose skirtingai stabdomas ląstelės ciklas kartu su lėtėjančiu proliferaciniu potencialu, išryškėjančia senėjančių ląstelių morfologija.

Vis daugėja duomenų, jog mikroRNR yra svarbios su ląstelių senėjimu susijusių genų raiškos reguliacijai. Toliau analizavome, kokį vaidmenį šiuose procesuose atlieka miR-17 ir miR-21 (4.3.3 pav. A), ir nustatėme, kad ląstelių kultivavimo metu šių abiejų mikroRNR raiška sumažėja vėlyvuose pasažuose tiek I-os, tiek II-os grupės mėginiuose miR-17 raiška sumažėja 2,7 karto I-oje grupėje ir 2,2 karto II-oje grupėje, tuo tarpu miR-21 raiška sumažėja 2,3 ir 2,5 karto atitinkamose grupėse. Norėdami įvertinti galimą ryšį tarp mikroRNR ir ląstelių savęs atsinaujinimo programoje dalyvaujančių veiksnių, ištyrėme ir pagrindinių kamieninių ląstelių transkripcijos veiksnių – Oct-4, Nanog, Sox-2 ir Rex-1, raišką ankstyvame ir vėlyvame pasažuose (4.3.3 pav. B). Rezultatai parodė, jog I grupės mėginiuose senėjimo metu itin sumažėjo Oct-4 ir Nanog raiška, o Sox-2 ir Rex-1 raiška sumažėjo nežymiai. Ląstelėse visų tirtų transkripcijos veiksnių II grupėje raiška ženkliai sumažėjo lyginant ankstyvus ir vėlyvus MKL pasažus. Galima daryti prielaidą, jog miR-17 ir miR-21, veikdamos per ląstelės ciklo reguliacijos komponentus bei su ląstelių proliferacija ir savęs atsinaujinimu susijusiais transkripcijos veiksniais, turi įtakos ląstelių proliferacijos ir senėjimo procesams.

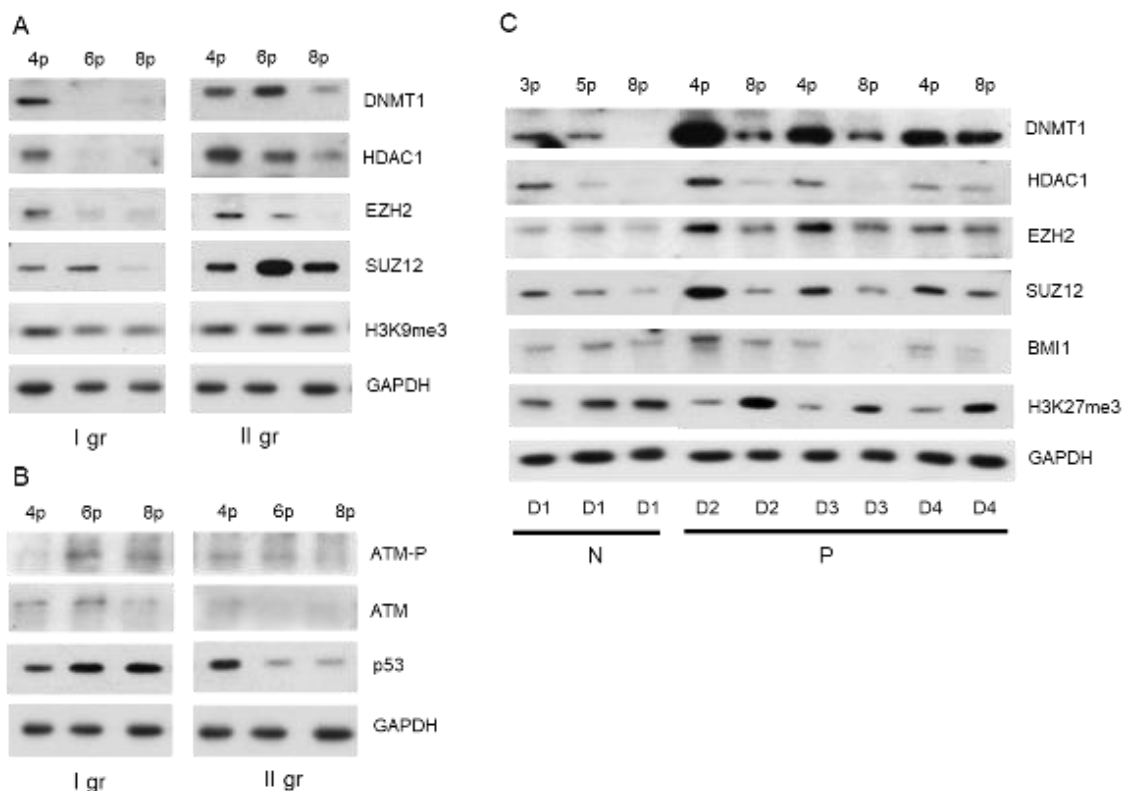


**4.3.3 pav.** mikroRNR ir transkripcijos veiksnių raiška MKL kultūrose skirtingais pasažavimo momentais (ankstyvame (3p) ir vėlyvame pasaže). RL-kPGR metodu atlikta (A) miR-17 ir miR-21 raiškos analizė, (B) *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Rex1* raiškos analizė I-os ir II-os grupės mėginiuose. Duomenys normalizuoti su GAPDH, genų raiškos pokyčiai (kartais) apskaičiuoti kontrolės (3p) atžvilgiu. Visi gauti rezultatai pateikti kaip vidurkis +SD (n=3), \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01 -statistiškai patikimi.

MKL senėjančiose kultūrose (I ir II grupės) tyrėme epigenetinius ir molekulinis pokyčius baltymų lygyje. Western blotingo būdu analizavome svarbių epigenetinių reguliatorių – histonų deacetilazių (HDAC) ir DNMT1 metiltransferazės 1 (DNMT1) funkcionavimą MKL senėjimo procesuose. Pastebėta, jog DNMT1, pastoviai ekspresuojamo proliferuojančiose ląstelėse ir palaikančio DNMT metilinimo lygį, lygis pasažavimo metu I-os ir II grupės mėginiuose krinta lygiagrečiai senėjimo procesui ir menkai aptinkamas 6 p (I gr.) ir 8 p (II gr.) MKL mėginiuose (4.3.4 pav. A). ATM baltymo analizė padėjo apibūdinti MKL kultūros būseną prieš pereinant prie augimo stabdymo, būdingo ląstelių senėjimui. I-os grupės MKL

mėginiuose fosforilinto ATM baltymas (ATM-P) susikaupia 6 ir 8 pasažuose kartu su padidėjusiu p53 baltymo lygiu, tuo tarpu nefosforilintas ATM baltymas aptiktas 4 ir 6 pasažuose, o 8 pasaže jo kiekis akivaizdžiai sumažėjęs (4.3.4 pav. B) – tai atspindi ląstelės ciklo stabdymą dėl atsiradusių DNR pažeidimų ir suardytos dvigubos DNR grandinės struktūros. II-os grupės MKL kultūrose mažiau pastebimi ATM-P ir ATM raiškos mažėjimo pokyčiai pasažavimo metu (nuo 4p iki 8p), su žymiu p53 baltymo kritimu (4.3.4 pav. B).

Kadangi epigenetiniai tyrimai potencialiai gali padėti diagnozuoti įvairias ligas ir sutrikimus, įvertinome VV-MKL epigenetinius veiksnius, tokius kaip HDAC1, DNMT1, polikombo baltymus (EZH2, SUZ12, BMI1) bei histono H3K27me3 modifikacijos kitimus normalaus ir patologinio nėštumo atvejais. Šių epigenetinių baltymų Western blotingo analizė (4.3.4 pav. A) parodė, kad HDAC1 ir PRC2 baltymų, EZH2 ir SUZ12, bei DNMT1 lygio sumažėjimo tendencijos buvo panašios I ir II grupės mėginiuose MKL pasažavimo metu (nuo 4p iki 8p). Greičiau senstančių I-os grupės ląstelių kultūrose heterochromatino žymės H3K9me3 raiška sumažėjo ląstelių kultivavimo metu, tuo tarpu II-ojoje grupėje šio žymens lygis pasažavimo metu išliko pastovus.



**4.3.4 pav.** Pasažavimo metu vykstantys epigenetiniai pokyčiai MK ląstelėse, išskirtose iš normalių ir patologinių nėštumų vaisiaus vandenų. Ląstelių lizatų iš sveikų (N) donorių (D) bei iš donorių su vaisiaus vystymosi sutrikimais (P) Western blotingo analizė, atlikta naudojant atitinkamus nurodytus antikūnus. (A, B) Baltymai iš MKL kultūrų (I ir II grupės) ląstelių pasažavimo metu (4, 6 ir 8 pasažuose). (C) Baltymų iš normalaus nėštumo (D1) ir vaisiaus patologinio nėštumo (D2 – D4) mėginių. Pateikti reprezentaciniai geliai bent iš 2 gelių su panašiais rezultatais.

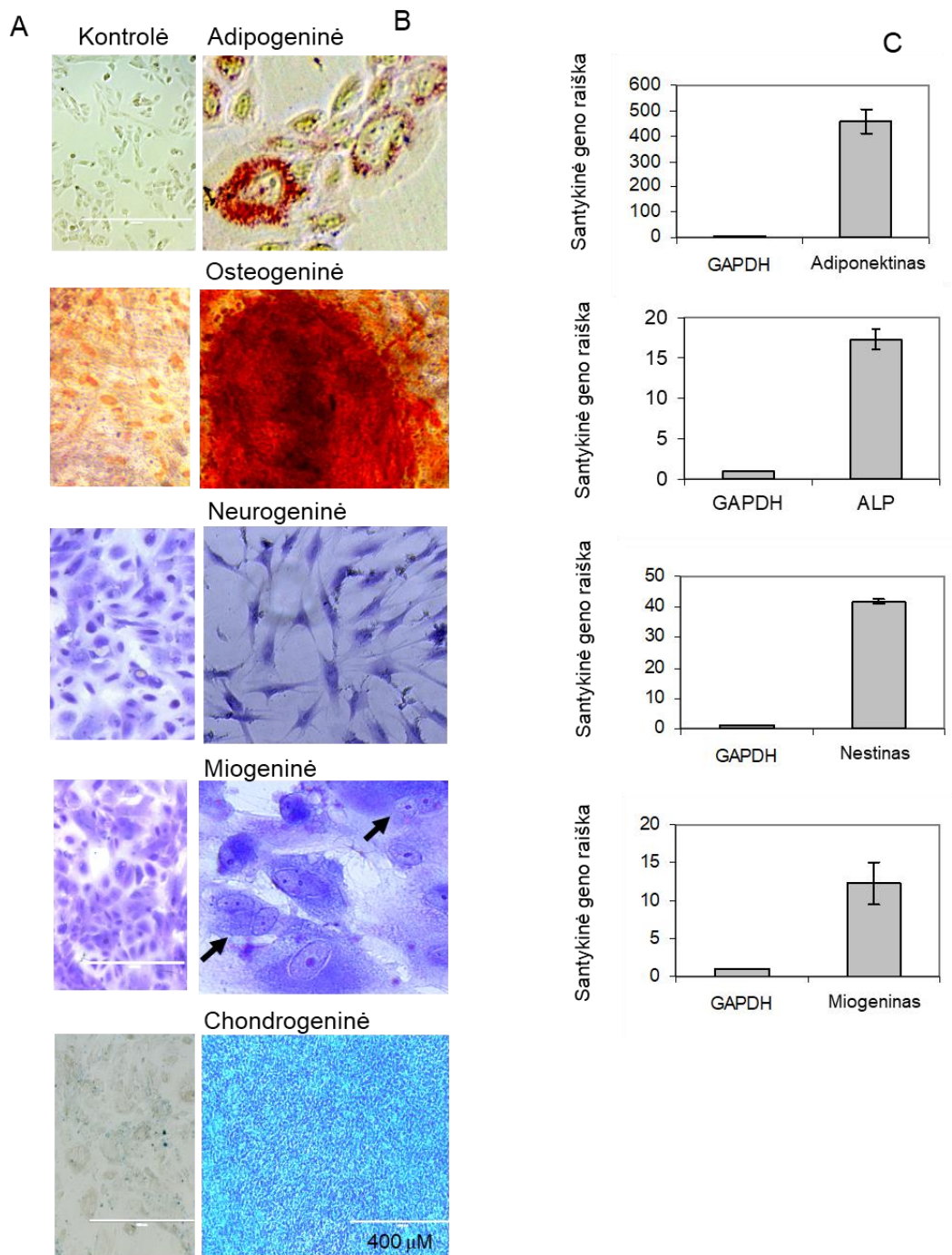
DNMT1 ir HDAC1 kiekio sumažėjimas MKL vėlyvuose pasažuose buvo stebimas tiek normalaus (N), tiek ir patologinio (P) nėštumo atvejais, ir tai atspindi kiekvienos kultūros ląstelių replikacinio gebėjimo laipsnį. Pavyzdžiui, donoro D4 (21 chromosomos trisomija), kurio MKL senėjimo procesai vystėsi lėčiau, DNMT1 ir HDAC1 lygis išliko didesnis nei kitų mėginių tuose pačiuose vėlyvuose pasažuose. Panašūs baltymų kiekio pokyčių svyravimai būdingi ir PRC2 baltymams (EZH2 ir SUZ12), bei PRC1 komponentams BMI1 tuose pačiuose mėginiuose (4.3.4 pav. C). Tai liudija, kad tokie baltymai dalyvauja ląstelių senėjimo procese. Chromatiną represuojančio histono H3K27me3 (heterochromatino žymuo) ir EZH2, kuris specifiskai trimetilina H3K27, lygių atvirkštinė koreliacija, pastebėta mėginiuose su diagnozuotomis patologijomis. H3K27me3 žymens susikaupimas pastebimas jau ankstyvame pasaže ir pasažuojant (nuo 3p iki 8p) šis lygis išliko pastovus greičiau senstančioje D1 kultūroje. Lyginant H3K27me3 raišką patologinio nėštumo mėginiuose (D2, D3, D4) iš 4p ir 8p MKL kultūrų, aiškiai

matomas didesnis šio žymens susikaupimas vėlyvo pasažo pavyzdžiuose. Priešingai, šiuose mėginiuose EZH2 lygis vėlyvame pasaže buvo sumažėjęs. Rezultatai parodė dinامينius pokyčius chromatino struktūroje senstant MK ląstelėms tiek normalaus, tiek ir patologinio nėštumo atvejais, ir šiame procese aktyviai dalyvauja epigenetiniai modifikatoriai, PRC2 ir PRC1 kompleksų baltymai bei chromatino represyvos histonų modifikacijos kartu su mirkoRNR.

#### **4.4.VV-MKL diferenciacijos potencialas**

VV-MKL, išskirtų iš įvairios nėštumo vaisiaus vandenų, diferenciacijos potencialo įvertinimui ląstelės buvo indukuotos diferencijuoti adipogenine, osteogenine, chondrogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis. MK ląstelių, gautų iš antrojo (16 – 19 savaičių) ir trečiojo ( $\geq 34$  savaitės) trimestro amniocentezės pavyzdžių, kultūros pasižymėjo galimybe diferencijuoti įvardintomis mezoderminės ir ektoderminės kilmės audinių kryptimis (4.4.1 pav.). Ląstelės, indukuotos diferencijuoti adipogenine kryptimi, po 12 dienų pasižymėjo gausiu lipidinių vakuolių kiekiu, diferencijuotų ląstelių kultūra intensyviai dažėsi Oil Red O dažais (4.4.1 pav. B). RL-kPGR būdu įvertinta Adiponektino žymens, būdingo vėlyvai specializacijos stadijai, raiška buvo padidėjusi 456 kartus (4.4.1 pav. C) palyginus su nediferencijuota kontrole. Osteogeninės diferenciacijos, trukusios 12 dienų, metu stebėta tarpląstelinio užpildo mineralizacija nudažius su Alizarin Red bei šarmine fosfatazės (ALP), siejamos su tarpląstelinio užpildo gamyba, geno raiškos padidėjimas (apie 18 kartų). Neurogeninės diferenciacijos metu, nudažius ląstelių kultūrą su 0,1% Kristalo violetu, matomos morfologiškai į neuronus panašios ląstelės. Ankstyviausi morfolginiai pokyčiai pastebėti praėjus 5 dienoms po indukcijos, o tipinės neuronams struktūros (pailga forma, į neuritus panašios projekcijos) šviesiniu mikroskopu matomos po 12 dienų. Diferencijuotose ląstelėse nervinių kamieninių ląstelių žymens – Nestino, raiška padidėjo 38 kartus palyginus su nediferencijuotomis kontrolinėmis ląstelėmis.





**4.4.1 pav.** VV-MKL diferenciacijos potencialas. Kamieninės ląstelės, išskirtos iš antrojo ir trečiojo nėštumo trimestro amniocentezės mėginių, 5 – 8 pasaže buvo kultivuojamos kontrolinėmis sąlygomis (A) ir diferenciacijai specifinėse terpėse (B). (B) VV-MKL, diferencijuotose adipogenine kryptimi, matomos lipidinės vakuolės po dažymo Oil Red O dažais; osteogeninės diferenciacijos metu stebimas kalcifikatų dažymasis Alizarin Red dažais; neurogeninės bei miogeninės diferenciacijos metu po dažymo Kristalo violetu išryškėja specifinės ląstelių struktūros; chondrogenine kryptimi diferencijuotose ląstelėse po dažymo Alciano mėlio dažais vyksta glikozaminoglikanų produkcija ir chondrogeninių gumulėlių susidarymas. (C) atitinkamų genų (adiponektino, ALP, nestino, miogenino) santykinė raiška, nustatyta RL-kPGR būdu. Pateikti trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ( $\pm$ SD).

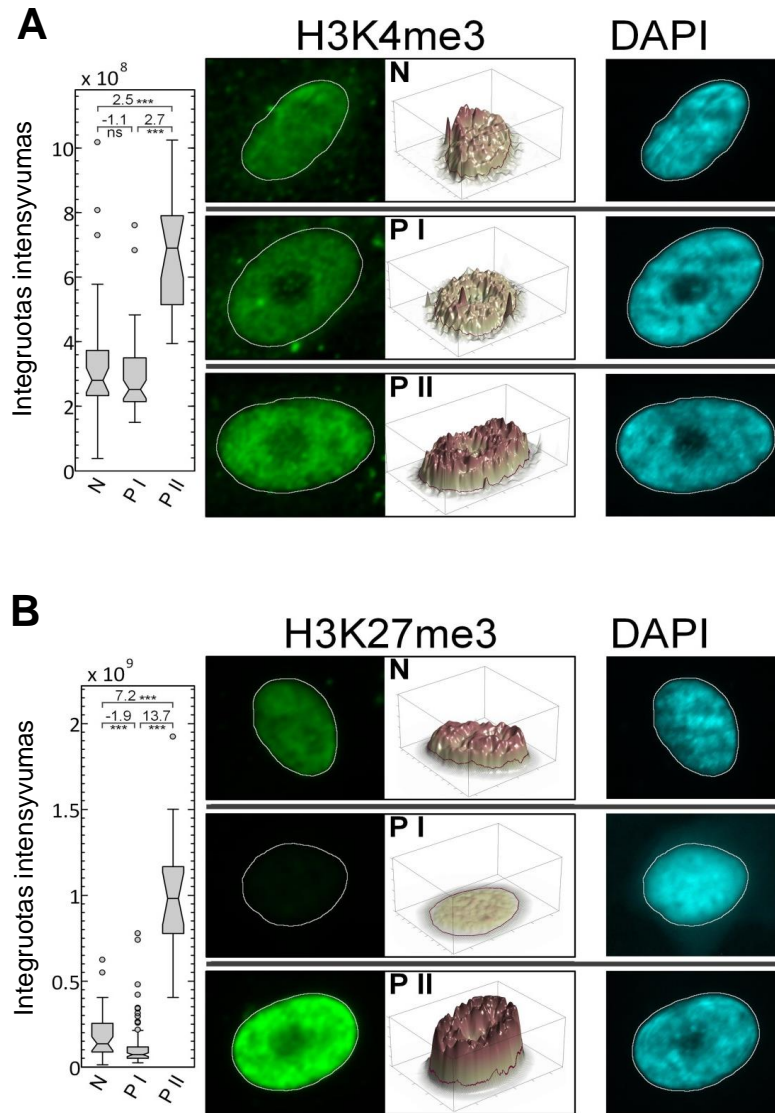
Miogeninės diferenciacijos kryptimi indukuotoje ląstelių kultūroje stebimos daugiabranduolės ląstelės (dažyta 0,1% Kristalo violetu), o vėlyvo diferenciacijos žymens – Miogenino, raiška buvo padidėjusi (daugiau nei 12 kartų) palyginus su kontrolinėmis ląstelėmis (4.4.1 pav. C). Chondrogeninė diferenciacija, trukusi 20 dienų, pasižymėjo ląstelių formuojamais chondrogeniniais gumulėliais bei

glikozaminoglikanų produkcija (dažyta Alciano mėliu). Kontrolinių ląstelių kultūros nepasižymėjo jokiomis išvardintų diferenciacijų charakteristikomis (4.4.1 pav. A).

#### **4.5. Epigenetiniai pokyčiai VV-MKL kultūrose normalaus ir patologinio nėštumo atvejais**

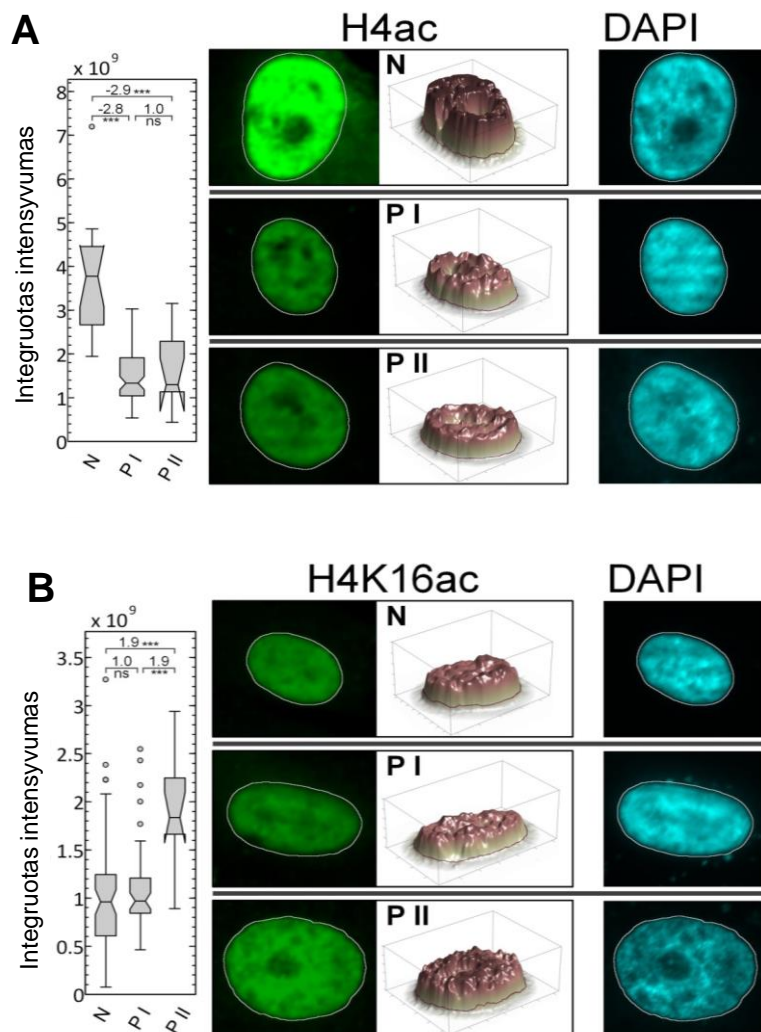
VV-MKL epigenetinės būsenos įvertinimui naudojome platų spektrą histonų metilinimui ir acetilinimui – specifinius antikūnus ir imunofluorasencijos metodą histonų modifikacijų įvertinimui ląstelių branduoliuose. Tiriamąją grupę sudarė mėginiai, paimti amniocentezės būdu iš pacientės (normalaus vaisiaus vystymosi) 20 nėštumo savaitę (N); iš donorės (D4) 34 nėštumo savaitę esant polihidramnionui ir vaisiaus stemplės adrezijai (P I); iš donorės (D9) 23 nėštumo savaitę (PII) su vaisiaus raidos sutrikimais – hepatosplenomegalija, kardiomegalija, teratoma. Imunodažymą antikūnais naudojome aktyvių ir represyvių histonų modifikacijų įvertinimui ląstelių branduolyje, tame pačiame mėginyje naudojant ir fluorescuojančius DNR dažus – DAPI, branduolių lokalizacijos nustatymui. Alexa flour 488 žymėti antriniai antikūnai naudoti po branduolių žymėjimo pirminiais antikūnais prieš acetilintas histono H4 (H4ac ir H4K16ac) bei histono H3 (H3K9ac ir H3K14ac) modifikacijas bei metilintas histono H3 (H3K4me3, H3K9me2/me3 ir H3K27me3) modifikacijas. Visi mėginiai buvo įvertinti fluorescenciniu mikroskopu ir palyginti pagal branduolių fluorescencinį intensyvumą (IF). Kiekybinį IF įvertinimas, naudojantis kompiuterinėmis programomis (kaip aprašyta Metodų skyriuje), leido branduoliuose aptikti pagrindinius skirtumus tarp ląstelių iš skirtingų šaltinių. Darbe gauti rezultatai pateikti 4.5.1 – 4.5.4 pav., kuriuose fluorescencinio intensyvumo – Alexa Flour 488 fluorescencijos intensyvumo profiliai yra pateikiami 2D formatu (vidurinė kolona) ir paviršiaus vizualizavimo 3D vaizdais (vidurinė dešinioji kolona). Branduolių ribos nustatytos pagal DAPI nusidažymą. Alexa Fluor 488 – integruotas fluorescencinis intensyvumas (IFI) yra gaunamas susumuojant visų taškų, sudarančių branduolio sritį, intensyvumą.



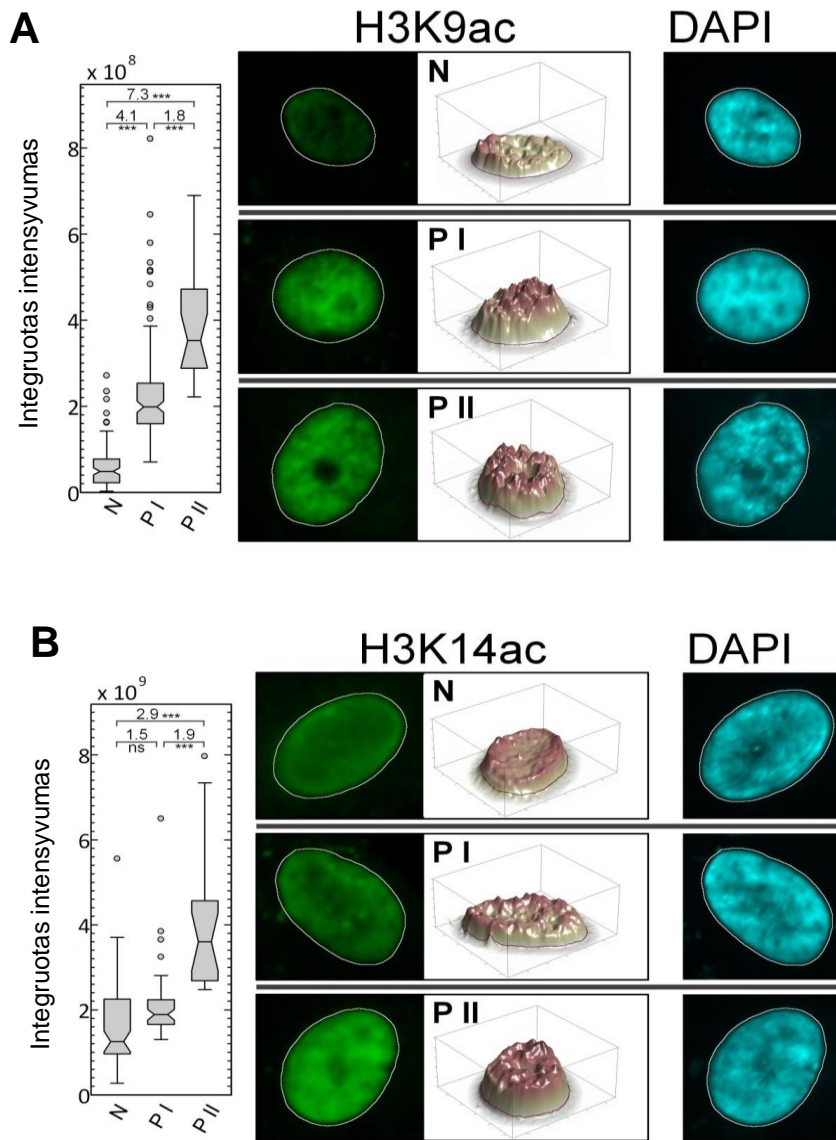


**4.5.1 pav.** „Bivalentinių“ histonų modifikacijų skirtumai MK ląstelėse normalaus ir patulinio nštumo atvejais. MKL, išskirtos normalaus (N) ir patulinio nštumo atvejais: PI (donorė D5) ir PII (donorė D9). Analizuojamų mėginių (N, PI ir PII) IFI išreikšti Turkey – formos grafiniu vaizdu (kairioji kolona); analizuojamų ląstelių apimtis kiekvienoje grupėje: n=33, 56 ir 22 (H3K4me3 žymeniui), ir n=41, 89 ir 16 (H3K27me3 žymeniui). Statistinei analizei naudotas Wilcoxon testas. \* P <0,05, \*\* P <0,01 ir \*\*\* P <0,001 – statistiškai reikšmingi pokyčiai, ns – nereikšmingi pokyčiai (P > 0,05).

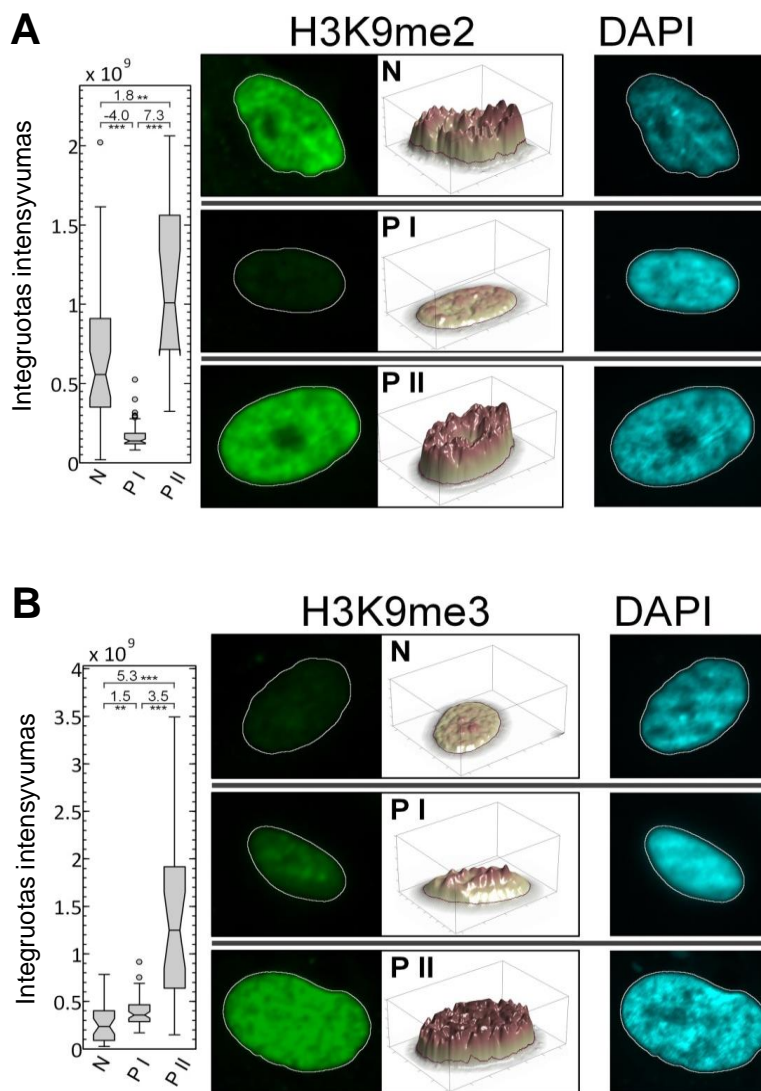
„Bivalentinių“ histonų modifikacijų (H3K27me3 ir H3K4me3) analizė N, PI ir PII MK ląstelių branduoliuose, pateikta 4.5.1 paveiksle, rodo PII pavyzdžiuose žymiai aukštesnį H3K4me3 (2,5 karto > nei N ir 2,7 karto > nei PI), taip pat ir H3K27me3 (7,2 karto > nei N ir 12,7 karto > nei PI) modifikacijų lygį. Priešingai, PI mėginiai nesiskyrė nuo N mėginių H3K4me3 signalų intensyvumu, tačiau H3K27 me3 IFI lygis buvo 1,9 karto žemesnis nei N mėginiuose. Acetilinto histono H4 lygis N mėginiuose buvo 2,9 karto aukštesnis nei P I ir P II, kuriuose IFI reikšmės buvo panašios, tuo tarpu H4K16ac žymens intensyvumas PII mėginiuose buvo 1,9 karto > nei N ir P I (4.5.2 pav.). Palyginus su N, PI ir PII mėginiai pasižymėjo didesniu H3K9ac (atitinkamai 7,3 ir 4,1 karto) bei H3K14ac žymenų (atitinkamai, 2,9 ir 1,5 karto) signalo intensyvumo lygiu (4.5.3 pav.).



**4.5.2 pav.** Histono H4 acetilintų modifikacijų skirtumai MK ląstelėse normalaus ir pataloginio nėštumo atvejais. MKL, išskirtos normalaus (N) ir pataloginio nėštumo atvejais: PI (donorė D5) ir PII (donorė D9). Analizuojamų mėginių (N, PI ir PII) IFI išreikšti Tukey – formos grafiniu vaizdu (kairioji kolona); analizuojamų ląstelių apimtis kiekvienoje grupėje: n=16, 82 ir 19 (H4ac žymeniui) ir n=60, 47 ir 12 (H4K16ac žymeniui). Statistinei analizei naudotas Wilcoxon testas. \* P <0,05, \*\* P <0,01 ir \*\*\* P <0,001 – statistiškai reikšmingi pokyčiai.



**4.5.3 pav.** Histono H3 acetilintų modifikacijų skirtumai MK ląstelėse normalaus ir patulinio nėštumo atvejais. MKL, išskirtos normalaus (N) ir vaisiaus patulinio vystymosi atvejais: P I (donorė D5) ir P II (donorė D9). Analizuojamų mėginių (N, P I ir P II) IFI išreikšti Turkey – formos grafiniu vaizdu (kairioji kolona); analizuojamų ląstelių apimtis kiekvienoje grupėje: n=112, 129 ir 22 (H3K9ac žymeniui) ir n=68, 53 ir 19 (H3K14ac žymeniui). Statistinei analizei naudotas Wilcoxon testas. \* P <0,05, \*\* P <0,01 ir \*\*\* P <0,001 – statistiškai reikšmingi pokyčiai.



**4.5.4 pav..** Histonų H3 metilintų modifikacijų skirtumai MKL ląstelėse normalaus ir patologinio nėštumo atvejais. MKL, išskirtos normalaus (N) ir vaisiaus patologinio vystymosi atvejais: PI (donorė D5) ir PII (donorė D9). Analizuojamų mėginių (N, PI ir PII) IFI išreikšti Turkey – formos grafiniu vaizdu (kairioji kolona); analizuojamų ląstelių apimtis kiekvienoje grupėje: n=38, 70 ir 16 (H3K9me2 žymeniui) ir n=36, 66 ir 25 (H3K9me3 žymeniui). Statistinei analizei naudotas Wilcoxon testas. \* P <0,05, \*\* P <0,01 ir \*\*\* P <0,001 – statistiškai reikšmingi pokyčiai.

Heterochromatino histonų H3 modifikacijų (4.5.4 pav.) H3K9me2/me3 analizė parodė, PII mėginiuose abiejų žymenų pakankamai aukštą IFI lygį (1,8/5,3 karto > nei N ir 7,3/3,5 karto > nei PI). Pažymėtina, kad H3K9me2 žymuo vyraavo N mėginiuose palyginus su PII. Akivaizdu, kad represyvūs chromatinų žymenys ir kai kurie acetilinti histonai (H3K9ac, H3K14ac ir H4K16ac) aiškiai dominavo PII mėginiuose palyginus su šių modifikacijų lygiu PI ląstelių mėginiuose.

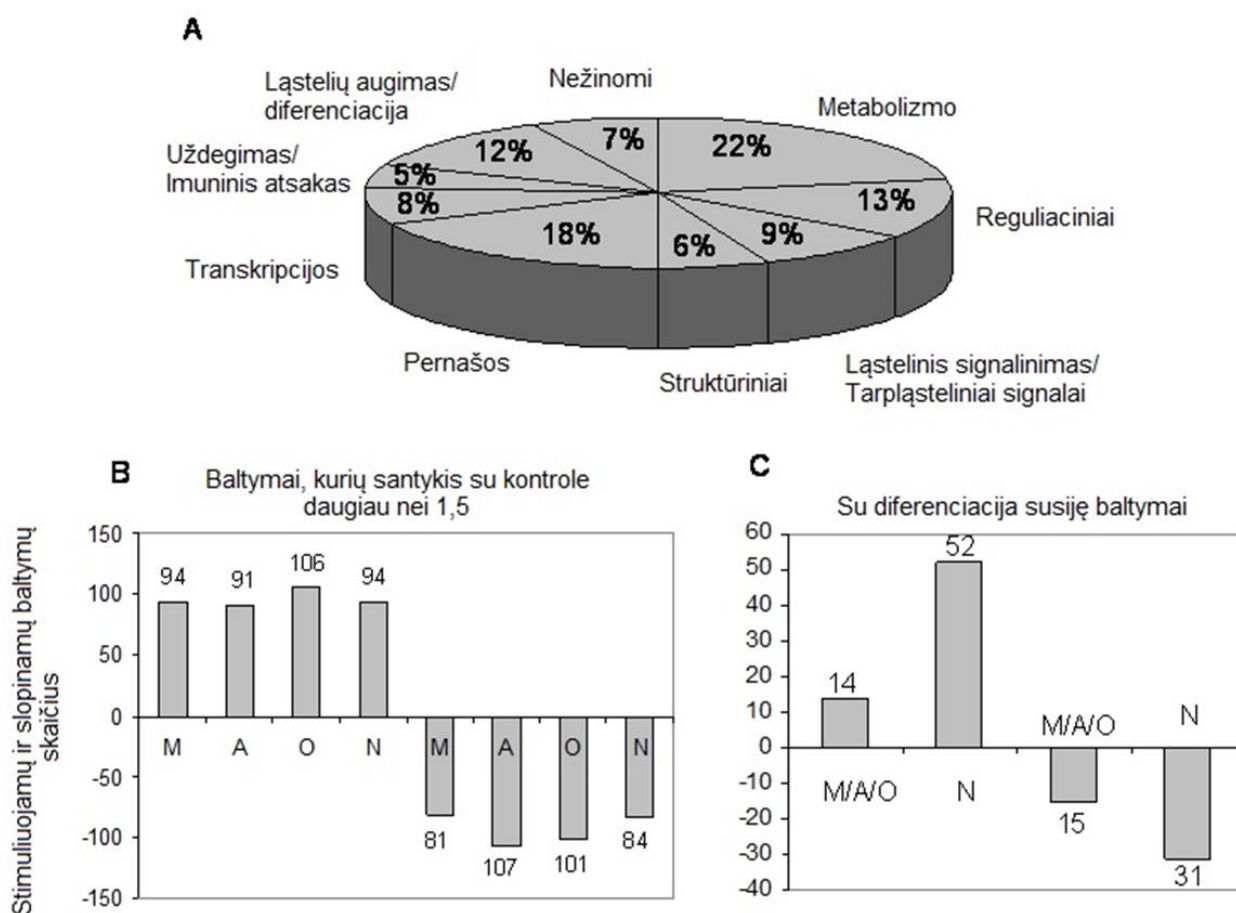
Šių bandymų rezultatai rodo, kad epigenetinė aplinka yra skirtinga MKL kultūrose, gautose iš skirtingų VV šaltinių, ir priklauso nuo MKL kultūros būklės ar donorių individualumo patologinio nėštumo sąlygomis.

#### **4.6. Adipogeninė, osteogeninė, miogeninė ir neurogeninė kryptimis diferencijuotų VVKL proteominė analizė**

Proteominei palyginamajai analizei buvo naudotos normalaus nėštumo, antrojo trimestro (16 savaitė) 5 pasąžo VV-MKL (kontrolinės ląstelės), kultivuotos specifinėse terpėse indukuojant diferenciacijai miogenine, adipogenine, osteogenine ir neurogenine kryptimis. Naudojant SYNAPT G2 didelės raiškos masių analizės spektrometrą, buvo identifikuoti MKL baltymai (bendras skaičius –

1423) ir apskaičiuota santykinė baltymų raiška kiekvienoje diferencijuotų ląstelių kultūroje. Baltymai, kurių santykinė raiška viršijo 1,5 karto palyginus su nediferencijuota kontrole, buvo atrinkti palyginamai analizei.

4.6.1 paveiksle pateikta 250 atrinktų baltymų iš VV-MKL, diferencijuotų miogenine, adipogenine, osteogenine ir neurogenine kryptimis, funkcinės charakteristikos, kai baltymų raiškos santykis su kontrole buvo didesnis nei 1,5 karto. Pasirinktų baltymų grupėje aptikti baltymai, atsakingi už ląstelės augimą ir diferenciaciją (12%), reguliaciniai (13%), dalyvaujantys ląstelės signalų perdavimo/komunikacijos procesuose (9%) ir dalyvaujantys transkripcijoje/transliacijoje (8%). Kitai grupei priskiriami baltymai, atsakingi už metabolizmą (22%), transportą (18%), struktūrą (6%), imuninį atsaką (5%); 7% sudaro nežinomos kilmės baltymai (4.6.1 pav. A). Iš 250 vyraujančių baltymų, MK ląstelėse, diferencijuotose miogenine (M), adipogenine (A), osteogenine (O) ir neurogenine (N) kryptimis, dalies baltymų (91, 89, 96 ir 87, atitinkamai kiekvienai diferenciacijai) raiška buvo padidėjusi palyginus su kontrole arba sumažėjusi (89, 105, 106 ir 81) (4.6.1 pav. B). Tirmamoje baltymų grupėje buvo identifikuoti su konkrečia diferenciacija susiję baltymai, kurių raiška buvo padidėjusi (apie 14 M/A/O ir 52 N atvejais) ir sumažėjusi (apie 15 M/A/O ir 31 N atvejais) palyginus su kontrole.

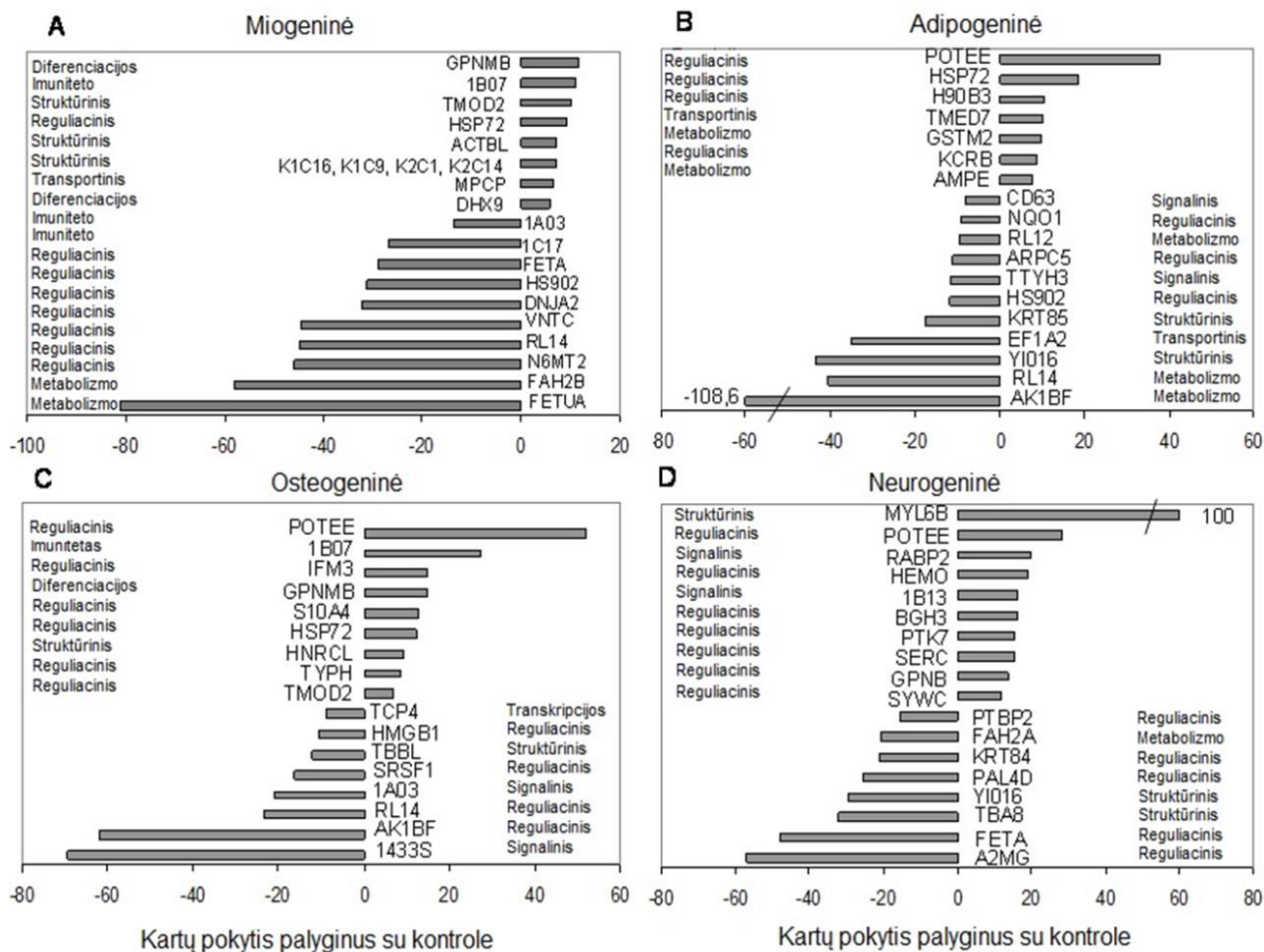


**4.6.1 pav.** Baltymų raiškos skirtumai MK ląstelėse, diferencijuotose miogenine (M), adipogenine (A), osteogenine (O) ir neurogenine (N) kryptimis. (B) Baltymų, kurių kiekis padidėjęs arba sumažėjęs 1,5 karto kontrolės atžvilgiu. (C) Su diferenciacija siejamų baltymų, kurių santykis viršija 1,5 karto už kontrolės, įvairiom kryptimis diferencijuotų ląstelių populiacijose.

4.6.2 paveiksle pateikti įvairiomis kryptimis diferencijuotų MK ląstelių baltymų raiškos santykiniai skirtumai daugiau nei 6 kartus didesni arba daugiau nei 8 kartus mažesni palyginus su nediferencijuota kontrole (K) (toliau žymimi kaip s+ arba s-). Vykstant miogeninei diferenciacijai (4.6.2 pav. A), didžiausi santykiniai pokyčiai pastebėti tarp šių baltymų: transmembraninis glikoproteinas NMB (GPNMB, 11.7 s+) – neigiamai dalyvauja ląstelės proliferacijoje ir adhezijoje



HLA I klasės histologinio nesuderinamumo antigenas B7 alfa grandinė (1B07, 11.2 s+), ekspresuojamas beveik visose ląstelėse; tropomodulinas 2 (TMOD2, 10.0 s+), dalyvaujantis aktino gijų reguliacijoje raumenyse bei ne raumenų prigimties ląstelėse; 70 kDa šilumos šoko baltymas 2 (HSP72, 9,2 s+), dalyvauja signalų pernešime, ląstelės mitotinio ciklo reguliacijoje); keratinų šeimos I/II tipo citoskeletiniai baltymai (K1C9, K1C14, K1C16, K2C14, 7,9 – 5,8 s+), dalyvaujantys citoskeleto formavime ir ląstelių diferenciacijoje;  $\beta$ -aktino tipo baltymas 2 (ACTBL, 7,3 s+), raumenų citoskeleto komponentas; fosfatą pernešantis mitochondrinis baltymas (MPCP, 6,6 s+), katalizuojantys fosfato perdavimą į mitochondrijas); nuo ATP priklausanti helikazė (DHX9, 5,7 s+), dalyvaujantys ląstelės augimo procese, dalijimosi ir diferenciacijos procesuose. 9 baltymų, kurie reguliuoja skirtingus ląstelių procesus, raiška buvo ryškiai sumažėjusi (13,8 – 58 s-), panašiai kaip ir dar 20 papildomų baltymų (5 s-).



**4.6.2 pav.** Baltymų raiškos pokyčiai diferencijuotose MK ląstelėse. Analizuoti padidėjusios ir sumažėjusios raiškos baltymai (A) miogeninės, (B) adipogeninės, (C) osteogeninės ir (D) neurogeninės diferenciacijos kultūrose, gautose iš antrojo trimestro VV-MKL. Kiekviena kolona atitinka diferencijuotų ląstelių baltymų raiškos skirtumus, daugiau nei 6 kartus didesnius arba daugiau nei 8 kartus mažesnius nei nediferencijuotoje kontrolėje.

Vykstant adipogeninei diferenciacijai (4.6.2 pav. B), padidėjusios raiškos baltymų tarpe nustatyti 7 reguliaciniai baltymai: POTE domeno šeimos narys E (POTEE, 37,9 s+), ekspresuojamas embrioninėse ląstelėse linijai- specifinės diferenciacijos metu); šilumos šoko 70 kDa baltymas 2 (HSP72, 18,8 s+); spėjamas šilumos šoko baltymas HSP90 beta 3 (H90B3, 10,6 s+, molekulinis šaperonas, skatinantis brendimą, struktūrinį palaikymą ir tikslią specifinių baltymų-taikinių reguliaciją); kreatino kinazė B (KCRB, 8,6 s+), ekspresuojama įvairiuose audiniuose ir ląstelių

tipuose; taip pat ir metaboliniai baltymai, tokie kaip glutationo S tranferazė Mu 2 (GSTM2, 9,8 s+), glutamilaminopeptidazė (AMPE, 7,9 s+), ir transporto funkciją atliekantys baltymai, tokie kaip transmembraninis emp24 domeną turintis baltymas (TMED7, 10,0 s+). 10 baltymų grupėje jų raiška buvo labai sumažėjusi (8,0 – 40,6 s-), tuo tarpu aldo-keto reduktazės šeimos 1 atstovo B15 (AF1BF), dalyvauja oksidacijos-redukcijos procesuose), kurio raiška sumažėjusi net 108,6 kartų lyginant su kontroline grupe.

Osteogeninės diferenciacijos metu (4.6.2 pav. C), 10 baltymų raiška buvo itin padidėjusi lyginant su kontrole. Tarp šių baltymų – POTE (51,9 s+); HLA I klasės histologinio nesuderinamumo antigeno B7 alfa grandinė (1B07, 27,4 s+); interferono indukuotas transmembraninis baltymas 3 (IFM3, 14,9 s+), transmembraninis glikoproteinas NMB (GPNMB, 14,8 s+), dalyvauja osteoblastų diferenciacijoje ir kaulų mineralizacijoje; baltymas S100 4A (S10A4, 12,9 s+), skatina osteopontino raišką ir sekreciją; HSP72 (12,4 s+); heterogeninis branduolinis ribonukleoproteinas C-1 (HNRCL, 9,3 s+), timidino fosforilazė (TYPH, 8,6 s+); tropomodulinas 2 (TMOD2, 6,8 s+, dalyvauja aktino gijų susidaryme). Dviejų baltymų raiška buvo ryškiai sumažėjusi t.y., aldo-keto reduktazės šeimos 1 narys B15 (AF1BF, 62,0 s+), dalyvauja oksidacijos-redukcijos procesuose; 14 3 3 baltymas sigma (14 3 3S, 64,3 s+, gali prisijungti prie daugelio funkciškai skirtingų signalinių baltymų. Identifikuoti 6 baltymai su įvairiai sumažėjusia raiška (8,8 – 23,4, s-).

Vykstant neurogeninei diferenciacijai, 8 baltymų, atliekančių skirtingas funkcijas, raiška buvo labai sumažėjusi (15,6 – 56,8 s-) (4.6.2 pav. D). Tarp ženkliai sumažėjusios raiškos baltymų buvo: alpha 2 makroglobulinas (A2MG, 56,8 s-), dalyvauja augimo faktorių ir citokinų reguliacijoje; alfa fetoproteinas (FETA, 47,9 s-), dalyvauja vaisiaus apsaugoje nuo motinos estradiolio; tubulino alfa 8 grandinė (TBA8), 31,9 s-), dalyvauja aksoneminių mikrokanalėlių susirinkime ir dinamikos reguliacijoje. Padidėjusios raiškos (15 – 20, s+) baltymai daugumoje pasižymėjo reguliacinėmis funkcijomis, taip pat ir signalų perdavimu.

Panaudodami UniprotKB/SwissProt duomenų bazes, įvertinome padidėjusios raiškos baltymus, kurie buvo žinomi kaip specifinės diferenciacijos žymenys. Apibendrinti miogeninės, adipogeninės, osteogeninės ir neurogeninės diferenciacijos žymenų rezultatai pateikti 4.6.1 lentelėje. Miogeninių pirmtakų žymenys (integrinas alfa 5, kaveolinas 1), lygiųjų raumenų žymuo (desminas, kalponinas 1, transgelinas 3, kaldesmonas, miozino lengvosios grandinės lygiųjų raumenų kinazė) ir raumens ląstelių struktūrinis baltymas (tropomiozino alfa 4 grandinė, miozinas 10, miozino reguliacinė lengvoji grandis 12A) buvo identifikuoti, bet jų raiška buvo padidėjusi 1,2 – 3,3 karto lyginant su nediferencijuota kontrole. Adipocitų žymenų, tokių kaip ląstelinis retinoinę rūgštį surišantis baltymas 2, peroksisominis multifunkcinis 21 tipo fermentas, adipocitų plazminės membranos baltymas, raiška diferencijuotose ląstelėse buvo 1,3 – 2,4 karto didesnė nei kontrolėje. Tropomiozino alfa 4 grandis, kalogeno  $\alpha$  3-6 grandis, kaseino kinazės II subvienetas alfa, matrikso metalproteinazė 14, kurie yra siejami su osteogenine diferenciacija, raiška taip pat buvo padidėjusi 1,2 – 2,5 karto palyginus su kontrole. Neurogeninės diferenciacijos žymenų tarpe kalponinas 3, kadherinas 13, tubulino beta 3 grandis ir nestino, raiškos lygiai buvo didesni 1,2 – 2,5 karto nei nediferencijuotose ląstelėse.

**4.6.1 lentelė.** Diferenciacijai specifinių baltymų-žymenų raiška MK ląstelėse, diferencijuotose miogenine (M), adipogenine (A), osteogenine (O) ir neurogenine (N) kryptimis. Santykinė raiška, didesnė daugiau nei 1,3 karto už kontrolę, diferencijuotose ląstelėse laikoma kaip padidėjusi.

Baltymo pavadinimas	Santykinė raiška	Pastabos
<b>Santykis M/K</b>		
Kalponinas 1	2,8	Lygiųjų raumenų žymuo
Transgelinas 3	2,0	Lygiųjų raumenų žymuo
Tropomiozinas $\alpha$ 4	1,9	Raumens ląstelių susitraukimo reguliacija
Integrinas alpha 5	1,8	Miogeninių pirmtakų žymuo
Miozino L gr. kinazė	1,7	Lygiųjų raumenų žymuo
Miozinas 10	1,7	Aktomiozino struktūros organizacija
Miozino regul. L gr. 12A	1,6	Raumens ląstelių susitraukimo reguliacija
Kaveolinas 1	1,5	Miogeninių pirmtakų žymuo
Desminas	3,3	Lygiųjų raumenų žymuo
<b>Santykis A/K</b>		
RA-surišantis baltymas 2	2,4	Ekspresuojamas preadipocituose
Peroksisomų multifunkcinis fermento tipo 21 baltymas	1,7	Dalyvauja riebiųjų rūgščių, lipidų metabolizme
Adipocitų plazminės membranos baltymas	1,3	Ekspresuojamas adipocituose
<b>Santykis O/K</b>		
Tropomiozinas $\alpha$ 4	2,1	Osteoblastų diferenciacija
Kolagenas $\alpha$ 3-6	2,5	Matrikso komponentų organizacija
Kazeino kinazė II $\alpha$	1,4	Ląstelių procesų reguliacija
<b>Santykis N/K</b>		
Kaderinas 13	2,5	Adhezija nervų sistemoje
Kalponinas 3	2,1	Aktomiozino struktūros organizacija
Nestinas	1,5	Nervinių ląstelių pirmtakų žymuo
Tubulinas $\beta$ 3	1,3	Aksonų augimui/valdymui

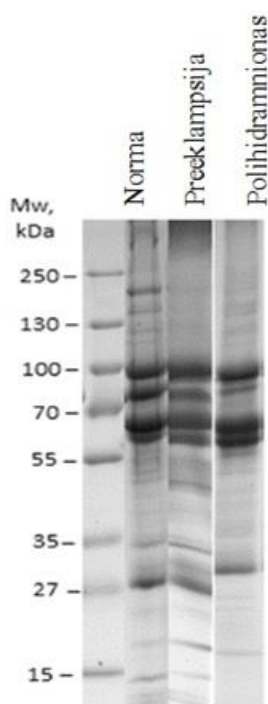
Apibendrinus išsamios palyginamosios proteominės analizės rezultatus, paaiškėjo specifinių baltymų raiškų skirtumai įvairiomis kryptimis diferencijuotose MK ląstelėse. Manome, gauti duomenys pasitarnautų tolesniems tyrimams ir molekulinį profilį, siejamą su specializuotų ląstelių grupių žymenų raiška, identifikavimui.



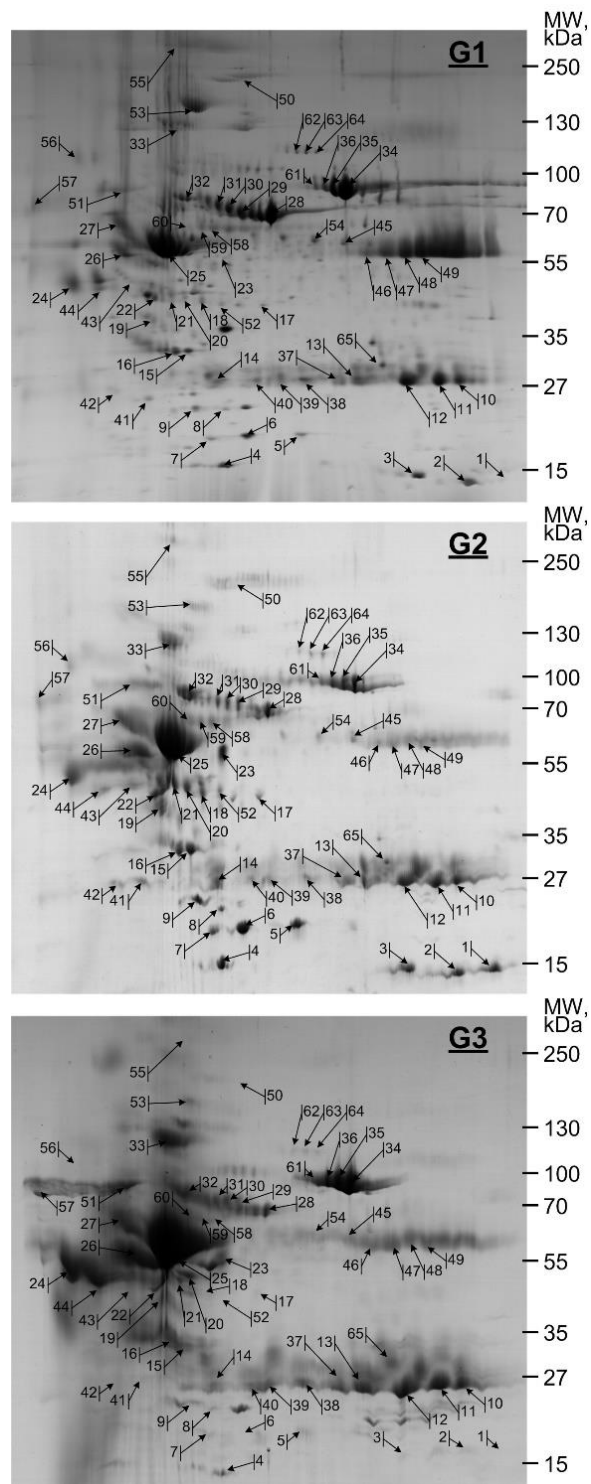
## 4.7. Baltymai, būdingi normos, preeklampsijos ir polihidramniono nėštumo vaisiaus vandenims

### 4.7.1. Baltymų, išskirtų iš vaisiaus vandenų normalaus ir patulinio nėštumo atvejais, palyginamoji analizė

Baltymai buvo išskirti iš skirtingo nėštumo būsenų vaisiaus vandenų pagal aprašytą protokolą Metodų skyriuje ir frakcionuoti SDS/PAGE sistemoje (4.7.1.1 pav.). Nustatytos baltymų grupės, kurios buvo išskirstytų pagal molekulinę masę, t.y. nuo 27, 60 – 65 ir 75 – 90 kDa. Nustatytų baltymų kiekybinis lygis grupėse, lyginant normalaus ir patulinės būklės nėštumų pavyzdžius, buvo nereikšmingas. Vėliau šie baltymai buvo frakcionuoti 2DE sistemoje, vizualizuoti nudažius Coomassie Coloidal Blue G-250 dažu (4.7.1.2 pav.). Kiekviename baltymų žemėlapyje buvo nustatyta daugiau nei 100 baltymų, iš jų 65 baltymų dėmelės identifikuotos MALDI-TOF/TOF masės spektrometrijos būdu. Kai kuriose baltymų taškų vietose buvo nustatyta daugiau nei vienas baltymas. 4.7.1.1 lentelėje pateikiami visų identifikuotų baltymų apibendrinti rezultatai. Naudojant skaičiavimo metodus, buvo įvertintas pokytis tarp normalaus ir komplikotų nėštumų: (norma/preeklampsija - G1/G2) ir (norma/polihidramnionas - G1/G3) mėginių. Padidėjęs kai kurių baltymų kiekis yra būdingas abiem atvejais (preeklampsija ir polihidramnionas): tai haptoglobinas (nr. 20), lumikanas (nr. 23c), alfa1B glikoproteinas (nr. 32a), angiotenzinogenas (nr. 60). Komplikotų nėštumo atvejais kai kurių baltymų kiekis yra sumažėjęs: tai transtiretinas (nr. 4), serumo amiloido P komponentas (nr. 14), CD5 antigeno tipo (nr. 18a), hemopeksino (nr. 31a), serotransferinas (nr. 34 - 38), beta 2 glikoproteinas 1 (nr. 45b, nr. 46), fibrinogeno beta grandinė (nr. 49), alfa 2 makroglobulinas, (nr. 50a), ceruplasminas (nr. 53a) alfa 1 rūgštusis glikoproteinas 1 (nr. 56). Kiti identifikuoti baltymai yra labiau specifiški preeklampsijai arba polihidramnionui. Kai kurių baltymų kiekis sumažėjęs 2 - 3 kartus ar net iki 20 kartų ir siejamas tik su polihidramniono nėštumo atveju, jų tarpe- haptoglobinas (nr. 5 – 7), apolipoproteinas AI (nr. 9a), fibrinogeno beta grandinė (nr. 17), klasterinas (nr. 19a).



**4.7.1.1 pav.** Baltymų grupės iš normos ir patulinio nėštumo vaisiaus vandenų: norma (G1), preeklampsija (G2), polihidramnionas (G3). Baltymai išskirti iš VV ir frakcionuoti 8-18% gradiento gėlyje SDS/PAGE sistemoje, nudažyti su Colloidal Coomassie G-250. Molekulinės masės žymenys (Mw) pavaizduoti kairėje pusėje.



**4.7.1.2 pav.** 2D gelio elektroforetinis VV baltymų žemėlapis. Baltymai išskirti iš normalaus nėštumo ir patologinio vandenų: norma (G1), preeklampsija (G2), polihidramnionas (G3). Išskirti baltymai buvo išskirstyti 2DE sistemoje ir nudažyti su Coomassie G-250. Buvo naudojami 2DE ir Immobiline DryStrip rinkinys, pH 3-10, Exel gelis SDS, gradientas 8 – 18%. Rodyklės ir numeriai pavaizduoti 2DE žemėlapiuose nurodo MALDI-TOF MS/MS gautų ir identifikuoatų baltymų padėtį. 4.7.1.1 lentelėje ir žemėlapyje baltymų vietos sužymėtos vienodai. Pateikiamos nuotraukos iš trijų eksperimentinių tyrimų, kai gauti panašūs rezultatai.

**4.7.1.1 lentelė.** UniProt duomenų bazėje gautų rezultatų apibendrinimas. Baltymai, išskirti iš VV normalaus neštumo ir pataloginių neštumų (preeklampsijos ir polihidroamnionas), identifikuoti iš 2DE gelių žemėlapių. Parodytas normalizuotų integruotų intensyvumų vidurkis  $\pm$  SD baltymų taške. Intensyvumo padidėjimas taške nurodo teigiamą pokytį (kartais), o sumažėjimas – neigiamą. “1” reiškia vienodą baltymų raišką. Wilcoxon testas naudotas patikimumo (*p* reišmės) įvertinimui.

Nr.	AC <sup>a)</sup>	Įvestis	Baltymo pavadinimas/apibūdinimas	Atitikmuo <sup>b)</sup>	TP <sup>c)</sup>	DP <sup>d)</sup>	Teorinis baltymas		Ekspermentinis		Pokytis	
							Mw, kDa	pI	Mw, kDa	pI	G1/G2	G1/G3
1	P69905	HBA_HUMAN	Hemoglobinas subunit alpha OS Homo sapiens GN HBA1 PE 1 SV 2	67	9	7	15.2	9.18	15.1	9.9	-12.8	2.3
2	P69905	HBA_HUMAN	Hemoglobinas subunit alpha OS Homo sapiens GN HBA1 PE 1 SV 2	30	9	4	15.2	9.18	14.8	9.4	1.1	8.9
3	P69905	HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha OS Homo sapiens GN HBA1 PE 1 SV 2	11	9	2	15.2	9.18	15.2	8.5	1	17.6
4	P02766	TTHY_HUMAN	Transferinas OS Homo sapiens GN TTR PE 1 SV 1	32	9	4	15.9	5.40	15.9	5.4	1.2	2.7
5	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	8	28	3	45.2	6.12	19.2	6.7	-2.2	1.6
6	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	11	28	4	45.2	6.12	18.8	6.1	-1.3	20.1
7	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	6	28	2	45.2	6.12	18.7	6.0	-1.7	2
8	P32119	PRDX2_HUMAN	Peroksiredoksinas 2 OS Homo sapiens GN PRDX2 PE 1 SV 5	40	17	8	21.9	5.57	21.5	6.0	-1.2	1.4
9a	P02647	APOA1_HUMAN	Apolipoproteinas A I OS Homo sapiens GN APOA1 PE 1 SV 1	53	32	15	30.8	5.43	22.1	5.7	-1.5	2.8
9b	P02753	RET4_HUMAN	Retinolį jundiantis baltymas 4 OS Homo sapiens GN RBP4 PE 1 SV 3	13	14	3	23.0	5.67				
10	P02747	C1QC_HUMAN	Komplekso C1q dalinis komponentas C OS Homo sapiens GN C1QC PE 1 SV 3	7	16	2	25.8	8.54	25.4	9.1	1.4	1.3
12a	P00746	CFAD_HUMAN	Komplekso faktorius D OS Homo sapiens GN CFD	18	18	3	27.0	7.55	25.2	8.6	1.8	1.3

			PE 1 SV 5										
12b	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	11	76	9	77.0	6.75					
14	P02743	SAMP_HUMAN	Serumo amiloidas P komponentas OS Homo sapiens GN APCS PE 1 SV 2	30	17	7	25.4	6.10	25.2	5.9	1.7	1.3	
15a	P02760	AMBP_HUMAN	Baltymas AMBP OS Homo sapiens GN AMBP PE 1 SV 1	20	26	5	39.0	5.87	30.4	5.4	-1.3	1.2	
15b	P08833	IBP1_HUMAN	Į insuliną panašus augimo faktorius jungiantis baltymas 1 OS Homo sapiens GN IGFBP1 PE 1 SV 1	29	16	8	27.9	4.94					
16a	P08833	IBP1_HUMAN	Į insuliną panašus augimo faktorius jungiantis baltymas1 OS Homo sapiens GN IGFBP1 PE 1 SV 1	24	16	6	27.9	4.94	30.4	5.3	1.4	1.1	
16b	P02760	AMBP_HUMAN	Baltymas AMBP OS Homo sapiens GN AMBP PE 1 SV 1	16	26	4	39.0	5.87					
17	P02675	FIBB_HUMAN	Fibrinogenas beta grandis OS Homo sapiens GN FGB PE 1 SV 2	30	42	13	55.9	8.25	41.5	6.9	-1.6	2.4	
18a	O43866	CD5L_HUMAN	CD5 panašus į antigeną OS Homo sapiens GN CD5L PE 1 SV 1	26	31	8	38.1	5.14	42.6	5.8	1.1	4.5	
18b	P60709	ACTB_HUMAN	Aktino citoplazminis 1 OS Homo sapiens GN ACTB PE 1 SV 1	10	34	6	41.7	5.14					
18c	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	31	28	12	45.2	6.12					
19a	P10909	CLUS_HUMAN	Klasterinas OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	28	36	10	52.5	5.84	38.1	5.2	-1.5	2.8	
19b	P01024	CO3_HUMAN	Kompleksas C3 OS Homo sapiens GN C3 PE 1 SV 2	8	136	14	187.0	5.96					
20	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	22	28	8	45.2	6.12	43.7	5.5	-1.7	-1.3	
21a	P60709	ACTB_HUMAN	Aktino citoplazminis 1 OS Homo sapiens GN ACTB PE 1 SV 1	9	34	2	41.7	5.14	43.9	5.4	-1.4	1.8	

21b	Q5VTE0	EF1A3_HUMAN	Tariamias prailginimo katorius 1 panašus į alfa 3 OS Homo sapiens GN EEF1A1P5 PE 5 SV 1	10	32	2	50.2	9.41				
21c	P25311	ZA2G_HUMAN	Cinko alfa 2 glikoproteinas OS Homo sapiens GN AZGP1 PE 1 SV 2	7	27	2	34.2	5.64				
22a	P25311	ZA2G_HUMAN	Cinko alfa 2 glikoproteinas OS Homo sapiens GN AZGP1 PE 1 SV 2	40	27	11	34.2	5.64	43.0	5.3	1.1	5.1
22b	P27169	PON1_HUMAN	Serumo paraoksonazė aril-esterazė 1 OS Homo sapiens GN PON1 PE 1 SV 3	32	18	10	39.7	4.92				
23a	P02766	TTHY_HUMAN	Tranferinas OS Homo sapiens GN TTR PE 1 SV 1	76	9	9	15.9	5.40	56.2	5.8	-24.8	-18.7
23b	P51884	LUM_HUMAN	Lumikanas OS Homo sapiens GN LUM PE 1 SV 2	32	20	9	38.4	6.16				
24a	P02763	A1AG1_HUMAN	Alfa 1 rūgštusis glikoproteinas 1 OS Homo sapiens GN ORM1 PE 1 SV 1	4	17	3	23.5	4.74	47.2	3.8	1.2	-1.3
24b	P02766	TTHY_HUMAN	Transferinas OS Homo sapiens GN TTR PE 1 SV 1	43	9	4	15.9	5.40				
25a	P02774	VTDB_HUMAN	Vitaminą D jungiantis baltymas OS Homo sapiens GN GC PE 1 SV 1	64	45	24	52.9	5.24	58.5	5.3	1	1
25b	P01019	ANGT_HUMAN	Angiotenzinogenas OS Homo sapiens GN AGT PE 1 SV 1	26	25	10	53.1	5.85				
26a	P01019	ANGT_HUMAN	Angiotenzinogenas OS Homo sapiens GN AGT PE 1 SV 1	4	25	1	53.1	5.85	57.1	5.0	1.3	1.5
26b	P51884	LUM_HUMAN	Lumikanas OS Homo sapiens GN LUM PE 1 SV 2	43	20	13	38.4	6.16				
26c	P02765	FETUA_HUMAN	Alfa 2 HS glikoprotein OS Homo sapiens GN AHSG PE 1 SV 1	30	18	8	39.3	5.33				
26d	P01042-2	KNG1_HUMAN	Kininogeno izoforma LMWK 1 OS Homo sapiens GN KNG1	17	45	6	47.9	6.26				
26e	P02750	A2GL_HUMAN	Sotusis leucino alfa 2 glikoproteinas OS Homo	5	24	6	38.2	6.50				

			sapiens GN LRG1 PE 1 SV 2									
27a	P51884	LUM_HUMAN	Lumikanas OS Homo sapiens GN LUM PE 1 SV 2	28	20	8	38.4	6.16	71.2	4.8	1.4	2.2
27b	P08185	CBG_HUMAN	Kortikosteroidinis jungiantis globulinas OS Homo sapiens GN SERPINA6 PE 1 SV 1	18	23	7	45.1	5.59				
27c	P01042-2	KNG1_HUMAN	LMW kininogeno izoforma 1 OS Homo sapiens GN KNG1	49	45	17	47.9	6.26				
29	P02790	HEMO_HUMAN	Hemopeksinas OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	43	34	17	51.6	6.57	77.6	6.1	3.1	2.1
30	P02790	HEMO_HUMAN	Hemopeksinas OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	33	34	13	51.6	6.57	79.2	6.1	2.9	1.7
31	P02790	HEMO_HUMAN	Hemopeksinas OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	36	34	14	51.6	6.57	80.2	6.0	3	1.8
32a	P04217	A1BG_HUMAN	Alfa 1B glikoproteinas OS Homo sapiens GN A1BG PE 1 SV 4	31	26	15	54.2	5.48	84.4		-1.7	-1.7
32b	P02790	HEMO_HUMAN	Hemopeksinas OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	27	34	11	51.6	6.57				
34	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	48	76	34	77.0	6.75	89.4	7.8	4.2	1.8
35	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	44	76	31	77.0	6.75	90.1	7.7	1.8	1.1
36	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	27	76	16	77.0	6.75	91.2	7.7	1.1	1.1
40	P02743	SAMP_HUMAN	Seruminis amiloido P componentas OS Homo sapiens GN APCS PE 1 SV 2	5	17	3	25.4	6.10	25.5	6.3	1.6	-1.2
45	P02749	APOH_HUMAN	Beta 2 glikoproteinas 1 OS Homo sapiens GN APOH PE 1 SV 3	23	22	6	38.3	7.87	62.0	7.9	1.5	-1
46	P02749	APOH_HUMAN	Beta 2 glikoprotein 1 OS Homo sapiens GN APOH PE 1 SV 3	8	22	4	38.3	7.87	59.0	8.2	3.6	1.7

48	P02675	FIBB_HUMAN	Fibrinogenas beta grandis OS Homo sapiens GN FGB PE 1 SV 2	20	42	10	55.9	8.25	59.6	8.4	5.2	3.5
49	P02675	FIBB_HUMAN	Fibrinogenas beta grandis OS Homo sapiens GN FGB PE 1 SV 2	12	42	10	55.9	8.25	59.3	8.6	8	3.5
50a	P01023	A2MG_HUMAN	Alfa 2 makroglobulinas OS Homo sapiens GN A2M PE 1 SV 3	23	95	27	163.2	6.00	203.1	6.2	1.1	2.3
50b	P20742-2	PZP_HUMAN	Nėštumo baltymo izoforma 2 OS Homo sapiens GN PZP	3	72	7	140.3	5.86				
50c	P02768	ALBU_HUMAN	Serumo albuminas OS Homo sapiens GN ALB PE 1 SV 2	7	55	9	69.3	5.86				
51a	Q14624-4	ITIH4_HUMAN	Inter alfa tripsino inhibitoriaus sunkiosios grandies izoforma 4 H4 OS Homo sapiens GN ITIH4	14	57	11	93.8	6.06	90.5	5.1	-1.4	-2
51b	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	45	76	30	77.0	6.75				
51c	P04004	VTNC_HUMAN	Vitronektinas OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	33	28	14	54.3	5.43				
51d	P04196	HRG_HUMAN	Histidino sotusis glikoproteinas OS Homo sapiens GN HRG PE 1 SV 1	10	33	5	59.5	7.10				
51e	P43251	BTD_HUMAN	Biotinidazė OS Homo sapiens GN BTD PE 1 SV 2	7	33	4	61.1	5.79				
51f	P51884	LUM_HUMAN	Lumikanas OS Homo sapiens GN LUM PE 1 SV 2	11	20	6	38.4	6.16				
52	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	30	28	12	45.2	6.12	40.5	6.0	-1.9	1.5
53a	P00450	CERU_HUMAN	Ceruloplasminas OS Homo sapiens GN CP PE 1 SV 1	27	80	22	122.1	5.34	164.4	5.5	5.5	3.8
53b	P02808	STAT_HUMAN	Staterinas OS Homo sapiens GN STATH PE 1 SV 2	48	2	1	7.3	9.07				
55a	P19823	ITIH2_HUMAN	Inter alfa tripsino inhibitoriaus sunkioji grandis H2 OS Homo sapiens GN ITIH2 PE 1 SV 2	11	70	12	106.4	6.40	274.0	5.3	-1.5	-1.3
55b	P02760	AMBP_HUMAN	Baltymas AMBP OS Homo sapiens GN AMBP PE 1	7	26	3	39.0	5.87				

			SV 1										
56	P02763	A1AG1_HUMAN	Alfa 1- rūgštinis glikoproteinas 1 OS Homo sapiens GN ORM1 PE 1 SV 1	4	17	2	23.5	4.74	108.2	3.9	1.1	2	
57	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	46	76	31	77.0	6.75	80.3	3.3	1.9	-2.5	
60	P01019	ANGT_HUMAN	Angiotenzinogenas OS Homo sapiens GN AGT PE 1 SV 1	8	25	3	53.1	5.85	69.3	5.5	-6.2	-5.4	
61	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	28	76	17	77.0	6.75	92.6	7.2	1.3	-1.5	
63	P00751	CFAB_HUMAN	Komplekso faktorius B OS Homo sapiens GN CFB PE 1 SV 2	18	64	11	85.5	6.66	114.9	7.0	1.5	3.6	
64	P00751	CFAB_HUMAN	Komplekso faktorius B OS Homo sapiens GN CFB PE 1 SV 2	13	64	10	85.5	6.66	115.5	7.2	-1.3	2.3	
65	P00915	CAH1_HUMAN	Anglies anhidrazė 1 OS Homo sapiens GN CA1 PE 1 SV 2	27	18	6	28.9	6.67	28.1	8.0	1.3	-1	

a) AC įvesties numeris pagal programa UniProt (accession number)

b) Sutapimas (Matching [sequence coverage. %])

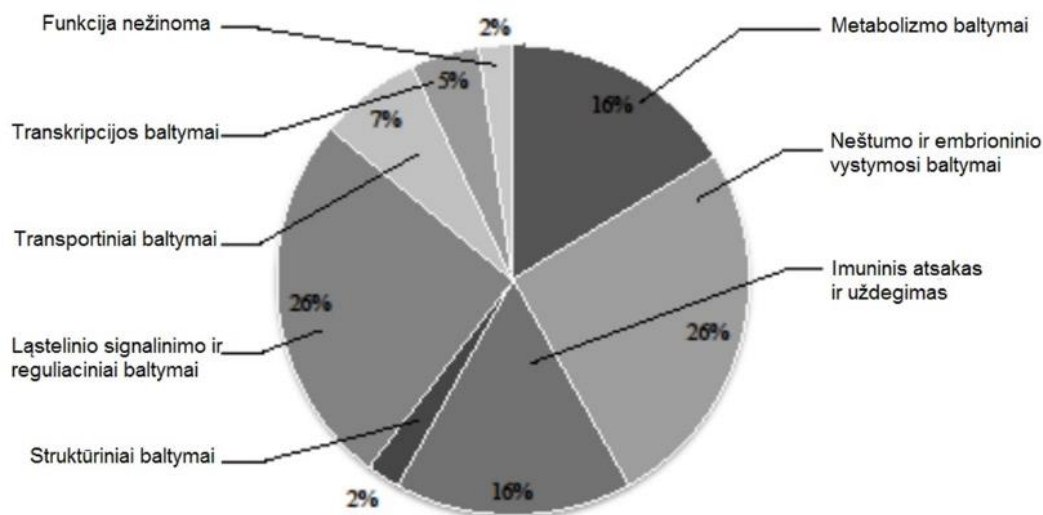
c) TP – Teoriniai peptidai (Theoretical Peptides)

d) DP – peptidai po tripsinizacijos ( Digest Peptides)



#### 4.7.2. Specifinės baltymų funkcijos siejamos su normaliu ir patologiiniu nėštumu

Visi nustatyti baltymai su jiems būdingomis funkcijomis buvo sugrupuoti naudojant AgBase programą (4.7.2.1 pav.). Patologinio nėštumo atveju pastebime padidėjusias baltymų raiškas, kurie atsakingi už ląstelės signalų perdavimą bei reguliaciniai baltymai iki 26,5%, nėštumo ir embriono vystymosi baltymai 24,5%, metaboliniai baltymai 15,5%, imuninio atsako ir uždegiminiams procesams būdingi baltymai 15,5%, transporto baltymai 9%. Transkripcijos procese dalyvaujantys ir struktūriniai baltymai sudaro atitinkamai 4,5% ir 2%, nežinomos funkcijos baltymai – 2,5% nuo visų tirtų baltymų (4.7.2.1 pav.).



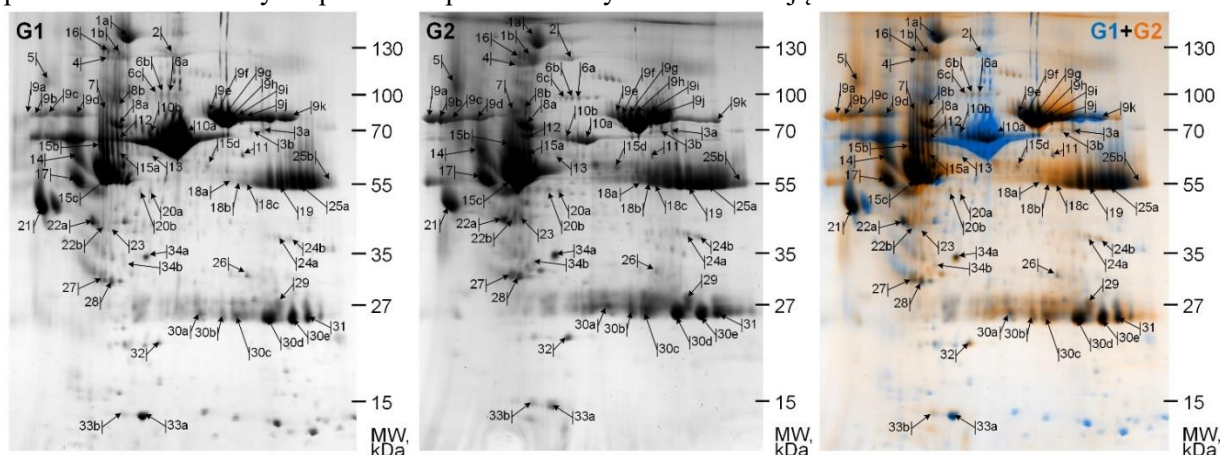
4.7.2.1 pav. Padidintos raiškos baltymai, identifikuoti patologiinio nėštumo atveju ir jų funkcijos. Baltymai sugrupuoti pagal jų funkcijas naudojant AgBase programą[2.00 v].

Palyginus gautų baltymų žemėlapi G1, kuriame identifikuoti baltymai iš VV esant normaliam nėštumui (VVN) su G2, kuriame identifikuoti baltymai iš VV esant polihidramnionui (VVP), buvo apskaičiuoti G2/G1 kiekybinių pokyčių santykiai. Pažymėtina, kad  $G2/G1 > 1$  – kai gautų baltymų taškai G2 gelyje yra didesnio ploto ir kai  $G2/G1 < 1$  – kai baltymų taškai G1 gelyje didesnio ploto už G2 gelio. Gautų baltymų taškai žemėlapiuose buvo normalizuoti pagal jų kiekio santykį norint nustatyti ar pirmojo žemėlapio vaizdas yra didesnis už antrojo, ir atvirkščiai. Apskaičiuotos tiriamų baltymų taškų reikšmės yra nurodytos 4.7.3.1 ir 4.7.3.2 lentelėje. Dėl biologinės ir techninės kilmės galimų paklaidų eksperimentuose priimta, kad baltymai, kurių kiekybinis pokytis yra daugiau nei du kartai, atspindi tų baltymų raiškos padidėjimą.

#### 4.7.3. Vaisiaus vandenų proteominė charakteristika normalaus nėštumo ir polihidramniono atvejais

Vaisiaus vandenų baltymų apibendrinimui normalaus nėštumo (VVN, G1) ir patologiinio nėštumo, esant polihidramnionui (VVP, G2), baltymai buvo frakcionuojami 2DE (pI 3 – 11) (4.7.3.1 pav.), identifikuoti, palyginti tarpusavyje ir apskaičiuoti kiekvieno identifikuoto baltymo pokyčių skirtumai (VVN vs. VVP). Analizavome 95 baltymus, ir 34 baltymų iš VVN ir VVP charakteristikos (pI 3 – 11) su atitinkamų vertinimų rezultatais pateikti 4.7.3.1 lentelėje. Daugelio nustatytų VV baltymų lygis buvo padidėjęs esant polihidramnionui. Baltymams, kurių lygis buvo daugiau nei 2,5 karto padidėjęs, priklausė: ceruloplasminas, inter-alfa-tripsino inhibitoriaus sunkioji grandis, plazminis proteazės C1 inhibitorius, protrombinas, alfa-1B-glikoproteinas, lumikanas, pagrindinis membranos specifinis heparano sulfato proteoglikano baltymas. Kitų baltymų, įskaitant

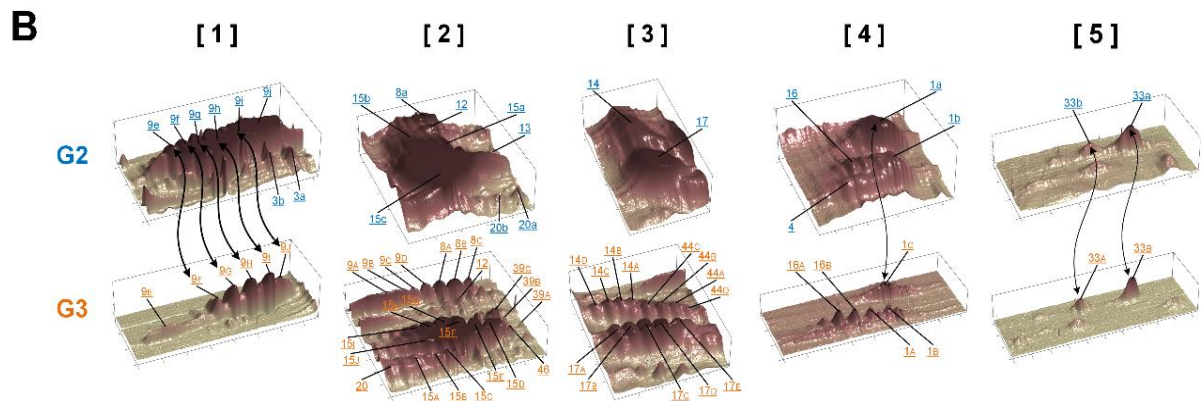
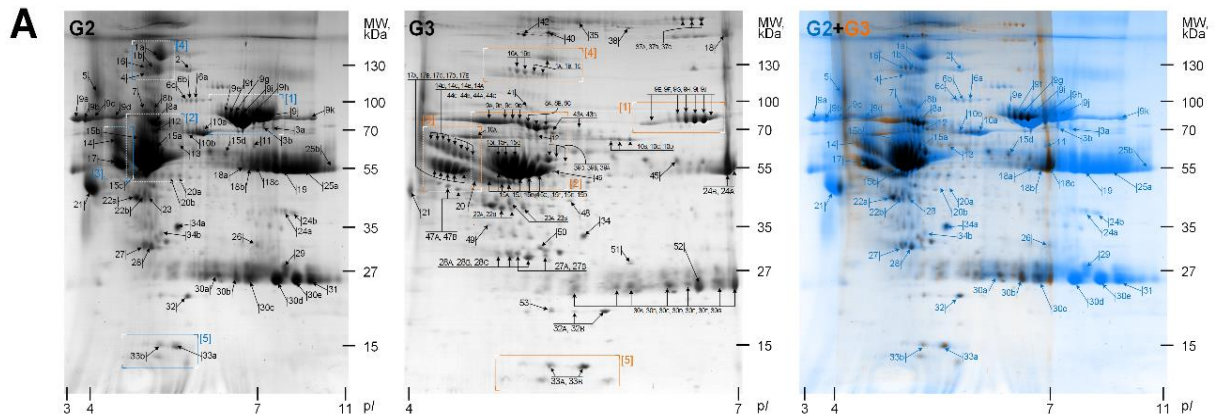
serotransferiną, lygiai buvo didesni arba mažesni lyginant norma/polihidramnionas, ir pasikeičia priklausomai nuo baltymo paviršiaus pI ar nuo baltymo modifikacijų.



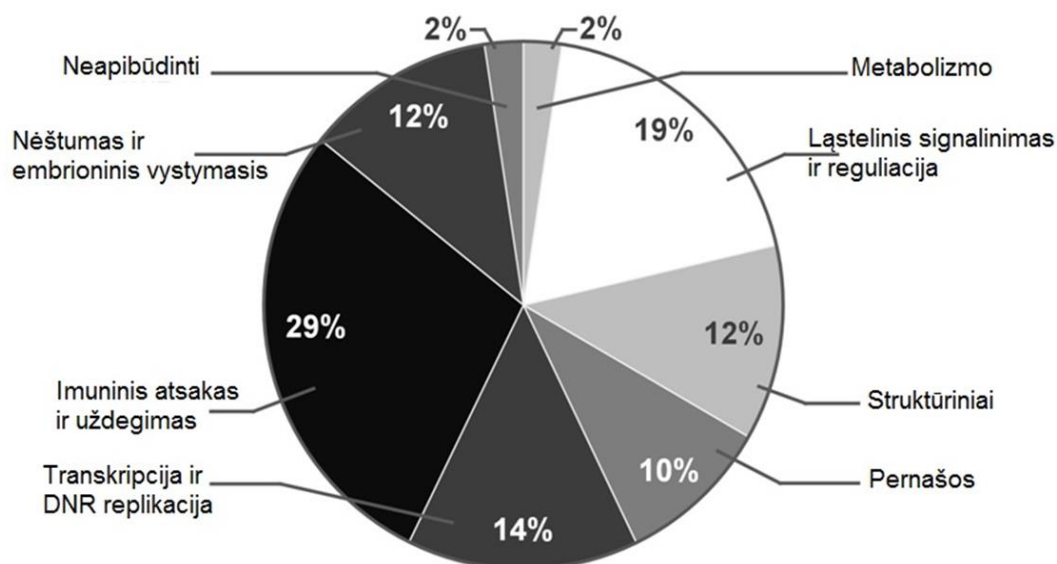
**4.7.3.1 pav. 2DE proteominė baltymų žemėlapių palyginamoji analizė VVN/VVP atvejais.** Baltymai išskirstyti 2DE, pH ribos 3 – 11, Exel Gel SDS, gradientas 8 – 18%. Baltymų, gautų iš VV esant normaliam nėštumui, vizualizavimas (VVN, G1; mėlynas G1+G2) ir polihidramnionui (VVP, G2; oranžinis G1+G2). 2DE geliai sudedami vienas ant kito ir palyginami G1+G2. Baltymai sužymėti rodyklėmis ir numeriais ir pateikti 4.7.3.1 lentelėje. Molekulinės masės (Mw) markeriai pažymėti kairėje. Pavaizduota nuotrauka yra viena iš trijų eksperimentų, kurių rezultatai yra panašūs.

Atskirai baltymai iš VVP buvo išskirstyti 2DE (pI 4 – 7) ir 146 baltymai buvo identifikuoti naudojant masių spektrometriją. 4.7.3.2 lentelėje pateikti 53 labiausiai specifiniai baltymai. Be to, VVP baltymų žemėlapis (kai pI 3 – 11 ir pI 4 – 7) (4.7.3.2 pav. A, G2 ir G3) buvo analizuojamas, baltymų taškai lyginami tarp 2DE žemėlapių (kai pI 3 – 11 ir pI 4 – 7) ir frakcionuojami kompiuterinių metodų pagalba (G2+G3). Ši baltymų taškų grupių analizė (4.7.3.2 pav. B) parodė, kad tokie baltymai, kaip ceruloplazminas (nr.1), alfa-1B-glikoproteinas (nr.8), serotransferinas (nr.9), kinogenenas-1 (nr.44) ir kiti, buvo nustatyti keliuose taškuose su skirtingais pI, kai frakcionuojama esant pI 4 – 7. Skirtingi to paties baltymo taškai gali būti siejami su jų modifikacijomis. Baltymų taškų ploto pokyčiai galėtų būti kaip vertinga, informatyvi diagnostinė priemonė prenatalinėje diagnostikoje.

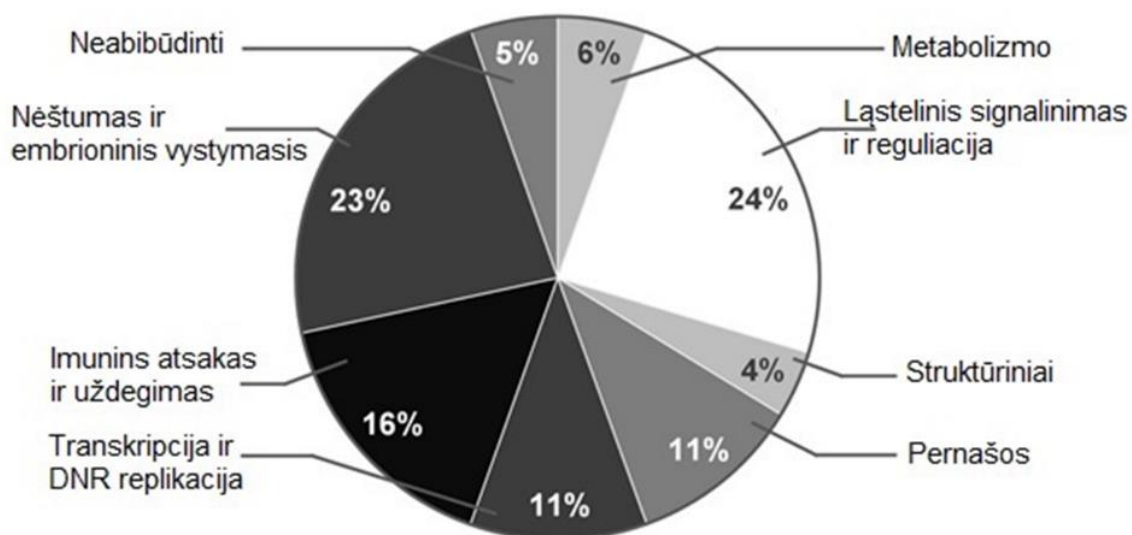
Nustatėme didžiausios raiškos baltymus VVP mėginiuose lyginant su normos mėginiais, šie baltymai buvo identifikuoti (pateikti 4.7.3.3 lentelėje). Kiekvienas nustatytas baltymas buvo priskirtas tam tikrai grupei, atitinkančiai jų funkcijas, remiantis informacija iš Aga bazės ([www.agbase.msstate.edu](http://www.agbase.msstate.edu)) (4.7.3.3 ir 4.7.3.4 pav.). Dauguma nustatytų baltymų iš VVN/VVP (kai pI 3 – 11 ir pI 4 – 7 (pateikti skliaustuose)) priklauso: imuninio atsako ir uždegiminio proceso baltymams – 29% (16%), ląstelės signaliniams ir reguliaciniams baltymams – 19% (24%), transkripcijos ir DNR replikacijos baltymams – 14% (11%), nėštumo ir embriono vystymosi baltymams – 12% (23%), struktūriniais baltymams – 12% (4%), metaboliniams baltymams – 2% (6%) ir dalyvaujantiems molekulinio transporto procesuose – 10% (11%).



**4.7.3.2 pav.** Palyginamoji VV proteominė 2DE žemėlapių analizė esant polihidramnionui po frakcionavimo skirtingose pI ribose. (A) Baltymai iš VVP atitinkamai frakcionuojami skirtingose pI ribose: pI 3 – 11 (G2, mėlynas gelis G2+G3) ir pI 4 – 7 (G3, oranžinis gelis G2+G3), Exel Gel SDS, gradientas 8 – 18%. Rodyklės ir numeriai 2DE gelio žemėlapyje nurodo baltymus, kurie identifikuoti masių spektrometrijos (MALDI-TOF MS/MS) būdu. Baltymų, frakcionuotų pI 3 – 11 ir pI 4 – 7 ribose. (B) Apskaičiuojami keletos baltymų grupių rezultatai, jų pasiskirstymo skirtingose pI ribose įvertinimui. Tai rodo, kad baltymų kiekis esant skirtingoms pI reikšmėms gali kisti dėl jų modifikacijų. 4.7.3.2 lentelėje pateiktas baltymų taškų pasiskirstymas, atitinkantis skirtingus modifikacijų lygius dalis %. Pateikti parodomieji rezultatai iš trijų ekperimentų, kurių rezultatai yra panašūs.



**4.7.3.3 pav.** Baltymų, išskirtų iš VV esant normaliam nėštumui ir polihidramnionui, funkcijos, kai baltymai frakcionuojami pI 3 – 11 ribose. Baltymai sugrupuoti pagal jų atitinkamas funkcijas naudojant programą AgBase [2.00 v].



**4.7.3.4 pav.** Baltymų, išskirtų iš VV esant normaliam nėštumui ir polihidramnionui, funkcijos, kai baltymai frakcionuojami pI 4 – 11 ribose. Baltymai sugrupuoti pagal jų atitinkamas funkcijas naudojant programą AgBase [2.00 v].

**4.7.3.1 lentelė.** Identifikuotų baltymų apibendrinimas naudojant programą (UniProt, Expacy), kai VV baltymai išskirti esant norma vs.polihidramnionas (VVN vs.VVP) ir frakciuuojami pI 3 – 11 ribose. Baltymo kiekio padidėjimas taške rodo teigiamą pokytį, o sumažėjimas – neigiamą (-) lyginant VVN/VVP (žymima G1/G2).

Nr.	AC <sup>a)</sup>	Įvestis	Baltymo pavadinimas/apibūdinimas	Baltymo identifikavimo vertė <sup>b)</sup>	Atitiktumo <sup>c)</sup>	TP <sup>d)</sup>	DP <sup>e)</sup>	Teorinis baltymas		Eksperimentinis		Pokytis G1/G2
								Mw, kDa	pI	Mw, kDa	pI	
1a	P004 50	CERU_HUMAN	Ceruloplasminas OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	100	20	107	21	122.128	5.44	155.47	5.00	-1.57
1b				100	12		13			137.48	4.93	-2.11
2	P010 24	CO3_HUMAN	Komponentas C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	99.95	11	196	21	187.030	6.02	138.40	5.40	-1.05
3a	P010 24	CO3_HUMAN	Komponentas C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	100	15	196	29	187.030	6.02	77.14	6.51	1.29
3b				98.66	14		28			76.93	6.38	1.05
4	Q146 24	ITIH4_HUMAN	Inter-alfa-tripsino inhibitoriaus siunkioji grandinė H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	100	18	98	18	103.293	6.51	132.41	4.83	-5.11
5	P051 55	IC1_HUMAN	Plazmos proteazės C1 inhibitorius OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	100	7	44	3	55.119	6.09	110.98	4.16	-2.93
6a	P063 96	GELS_HUMAN	Gelsolinas OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	100	13	88	11	85.644	5.9	100.95	5.49	1.08
6b				94.55	2		2			100.68	5.41	-1.12
6c				100	8		7			100.47	5.35	1.12
7	P007 34	THRB_HUMAN	Protrombinas OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	99.99	5	74	4	69.992	5.64	89.00	4.80	-12.51
8a	P042 17	A1BG_HUMAN	Alfa-1B-glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	100	16	45	7	54.220	5.56	79.91	4.95	-2.36
8b				99.89	11		5			92.19	4.93	-4.39
9a	P027 87	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	100	22	86	19	77.014	6.81	85.76	3.89	-3.49
9b				100	13		11			85.99	4.00	-1.85
9c				99.99	17		15			86.26	4.13	-2.53
9d				99.99	20		17			85.52	4.42	-3.20

9e				100	19		16			86.63	5.88	2.28
9f				100	23		20			85.03	5.94	3.04
9g				100	14		12			82.63	6.01	2.41
9h				100	15		13			82.25	6.11	1.59
9i				100	23		20			83.99	6.25	1.11
9j				100	5		4			84.30	6.39	-1.01
9k				100	19		16			84.56	7.03	2.99
10a	P027 68	ALBU_HUMAN	Serumo albuminas OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	100	24	88	21	69.321	5.92	70.29	5.59	5.45
10b				100	19		17			75.28	5.38	-1.37
11	P027 68	ALBU_HUMAN	Serumo albuminas OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	100	15	88	13	69.321	5.92	64.25	6.26	1.09
12	P027 48	CO9_HUMAN	Komplekso komponentas C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	100	17	70	12	63.133	5.43	72.20	4.94	-3.02
13	P018 76	IGHA1_HUMAN	Ig alfa-1 grandinës C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	99.96	23	26	6	37.631	6.08	64.70	5.26	-1.32
14	P010 11	AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	100	26	43	11	47.621	5.33	63.68	4.43	-2.11
15a	P010 09	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	100	46	41	19	46.707	5.37	65.21	4.97	-2.11
15b				100	54		22			68.91	4.74	-4.52
15c				100	17		7			55.64	4.82	-3.24
15d				94.67	29		12			59.76	5.88	2.12
16	P010 09	A1AT_HUMAN	Alfa-1-antitripsinas OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	100	39	41	16	46.707	5.37	139.43	4.82	-5.12
17	P027 65	FETUA_HUMAN	Alfa-2-HS-glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	94.42	21	29	6	39.300	5.43	54.46	4.47	-2.18
18a	P018 59	IGHG2_HUMAN	Ig gama-2grandinës C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	99.49	19	32	6	35.878	7.66	54.11	6.12	2.05
18b				99.31	16		5			53.51	6.22	1.45



18c				99.49	19		6			53.38	6.30	1.19
19	P018 60	IGHG3_HUMAN	Ig gama-3 grandinės C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	99.5	3	40	1	41.260	8.23	52.99	6.67	-1.08
20a	P518 84	LUM_HUMAN	Lumikanas OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	100	23	35	8	38.405	6.16	50.27	5.26	-1.80
20b				100	17		6			50.64	5.16	-2.26
21	P027 63	A1AG1_HUMAN	Alfa-1-rūgštis glikoproteinas 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	100	13	23	3	23.497	4.93	46.02	4.10	-1.39
22a	P253 11	ZA2G_HUMAN	Cinko-alfa-2-glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2	100	41	34	14	34.237	5.71	41.51	4.68	-4.38
22b				98.89	32		11			39.71	4.79	-4.48
23	P007 38	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	45.47	18	45	8	45.177	6.13	39.41	4.86	-3.54
24a	P018 57	IGHG1_HUMAN	Ig gama-1 grandinės C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	99.98	18	34	6	36.083	8.46	37.54	6.67	1.86
24b				34.45	9		3			37.01	6.80	-1.63
25a	P018 57	IGHG1_HUMAN	Ig gama-1 grandies C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	100	24	34	8	36.083	8.46	53.65	6.93	1.14
25b				100	21		7			53.23	7.30	-1.13
26	P0C0 L5	CO4B_HUMAN	Komponentas C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2	99.36	6	187	12	192.631	6.89	29.70	6.29	1.25
27	P088 33	IBP1_HUMAN	I insulino panašus-augimo faktorius jungiantis baltymas 1 OS=Homo sapiens GN=IGFBP1 PE=1 SV=1	99.97	24	21	5	27.885	5.11	28.94	4.80	-3.41
28	P027 60	AMBP_HUMAN	Baltymas AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	100	8	38	3	38.974	5.95	28.51	4.89	-1.41
29	A0M 8Q6	LAC7_HUMAN	Ig lambda-7 grandies C regiono OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1	99.45	25	12	3	11.296	8.49	25.21	6.67	1.07

			SV=2									
30a	P018 34	IGKC_HUMAN	Ig kappa grandies C regiono OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	54.8	27	11	3	11.602	5.58	23.89	5.77	3.89
30b				54.65	27		3			23.47	6.03	2.58
30c				96.48	18		2			23.32	6.18	1.71
30d				99.66	27		3			23.30	6.56	1.27
30e				99.93	18		2			23.43	6.81	1.33
31	P016 22	KV304_HUMAN	Ig kappa grandies 5-3 regiono Ti OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	54.65	20	10	2	11.781	8.72	23.39	7.02	-1.38
32	P981 60	PGBM_HUMAN	Pagrindinės membranos-spezifinis heparano sulfato proteoglikano baltymas OS=Homo sapiens GN=HSPG2 PE=1 SV=4	100	2	329	8	468.532	6.06	20.25	5.37	-2.76
33a	P027 66	TTHY_HUMAN	Transferinas OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	100	21	14	3	15.877	5.52	14.10	5.21	-2.08
33b				47.6	36		5			14.22	5.00	-2.48
34a	P027 66	TTHY_HUMAN	Transferinas OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	100	57	14	8	15.877	5.52	32.99	5.24	-1.82
34b				43.3	36		5			31.48	5.01	-2.61

a) AC įvesties numeris pagal programą UniProt (accession number)

b) Baltymo identifikavimo vertė ( Score – protein Score C.I. %)

c) Sutapimas (Matching [sequence coverage. %])

d) TP – teoriniai peptidai (Theoretical Peptides)

e) DP – peptidai po tripsinizacijos ( Digest Peptides)



**4.7.3.2 lentelė.** Gautų baltymų apibendrinimas naudojant programą (UniProt, Expasy), kai VV baltymai išskirti esant normaliam nęštumui ir polihidramnionui. Frakciuonuojami pI 3-11 ir pI 4-7 ribose; lyginama norma vs. polihidramnionas (VVN vs. VVP).

Nr.	AC <sup>a)</sup>	Įvestis	Baltymo pavadinimas/apibūdinimas	Baltymo identifikavimo vertė <sup>b)</sup>	Atitiktumo <sup>c)</sup>	TP <sup>d)</sup>	DP <sup>e)</sup>	Teorinis baltymas		Eksperimentinis		Pokytis, %
								Mw, kDa	pI	Mw, kDa	pI	
1A	P00450	CERU_HUMAN	Ceruloplasminas OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	100	7	107	6	122.128	5.44	125.413	5.11	13.8
1B				38.76	13		11			124.394	5.2	15.9
1C				100	7		6			160.438	5.22	70.3
8A	P04217	A1BG_HUMAN	Alfa-1B-glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	95.3	20	45	7	54.220	5.56	78.913	5.1	30.7
8B				100	31		11			73.612	5.19	23.6
8C				91.35	20		8			73.460	5.22	45.7
9A	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	100	24	86	17	77.014	6.81	82.460	4.72	27.6
9B				99.99	21		16			82.617	4.85	5.0
9C				99.99	17		13			82.309	4.97	7.2
9D				100	20		13			82.416	5.04	13.1
9E				92.46	15		11			81.032	6.1	12.3
9F				100	16		12			87.691	6.33	5.1
9G				100	23		17			86.703	6.37	7.7
9H				100	25		17			86.995	6.46	7.5
9I				100	24		16			87.640	6.51	6.4
9J				99.99	22		16			88.003	6.6	8.0
10A	P02768	ALBU_HUMAN	Serumo albuminas OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	100	26	88	17	69.321	5.92	68.406	4.63	82.4
10B				99.81	15		10			66.982	5.83	4.6
10C				99.75	19		13			66.903	5.87	8.3
10D				97.61	24		14			66.783	5.96	4.7
12	P02748	CO9_HUMAN	Komplekso kompotentas C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	99.64	21	70	12	63.133	5.43	67.943	5.18	
14A	P01011	AACT_HUMAN	Alfa-1-antichimotripsinas OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	99.99	36	43	12	47.621	5.33	63.391	4.42	28.4
14B				100	37		13			64.130	4.4	21.1
14C				100	40		14			64.980	4.37	31.8

14D				100	36		12			65.103	4.32	18.7
15A	P01009	A1AT_HUMAN	Alfa-1-antitripsinas OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	95.46	25	41	12	46.707	5.37	52.167	4.81	2.8
15B				100	36		15			52.340	4.9	5.3
15C				99.48	34		13			51.942	4.98	1.9
15D				100	43		20			55.594	5.12	16.9
15E				100	43		18			56.410	5.06	10.0
15F				100	16		8			57.418	5.04	16.4
15G				100	45		16			58.708	5.02	19.8
15H				100	51		21			57.694	4.99	10.5
15I				100	53		22			58.746	4.93	8.3
15J				100	38		15			54.340	4.87	8.0
16A	P01009	A1AT_HUMAN	Alfa-1-antitripsinas OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	99.99	35	41	15	46.707	5.37	125.779	4.98	65.1
16B				77.76	36	41	14			124.943	5.05	34.9
17A	P02765	FETUA_HUMAN	Alfa-2-HS-glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	99.4	15	29	4	39.300	5.43	57.132	4.31	28.2
17B				99.99	13		3			57.942	4.39	19.9
17C				98.94	14		4			57.136	4.43	18.9
17D				99.33	15		4			57.461	4.51	15.8
17E				100	15		4			56.984	4.58	17.2
18	P01859	IGHG2_HUMAN	Ig gama-2 grandies C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	99.86	14	32	5	35.878	7.66	246.031	6.62	
20	P51884	LUM_HUMAN	Lumikanas OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	99.99	15	35	6	38.405	6.16	51.234	4.69	
21	P02763	A1AG1_HUMAN	Alfa-1-rūgšties glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	97.2	17	23	4	23.497	4.93	48.113	4.16	
22A	P25311	ZA2G_HUMAN	Cinko-alfa-2-glikoproteinas OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2	100	35	34	12	34.237	5.71	42.866	4.92	40.5
22B				99.99	26		9			42.745	5.02	59.5
23A	P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobinas OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	95.86	18	45	8	45.177	6.13	44.988	4.97	68.2

23B				95.86	18	45	8			43.946	5.11	31.8
24A	P01857	IGHG1_HUMAN	Ig gama-1 grandies C regiono OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	100	12	34	3	36.083	8.46	58.164	6.82	33.7
24B				100	41		10			57.942	6.75	66.3
27A	P08833	IBP1_HUMAN	I insuliną panašus augimo faktorius jungiantis baltymas 1 OS=Homo sapiens GN=IGFBP1 PE=1 SV=1	75.3	29	21	6	27.885	5.11	31.024	5.07	55.4
27B				24.73	19		4			30.460	5.3	44.6
28A	P02760	AMBP_HUMAN	Baltymas AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	98.5	8	38	3	38.974	5.95	30.648	4.9	22.4
28B				98.06	11		4			30.712	5.02	46.0
28C				100	21		8			29.843	5.17	31.5
30A	P01834	IGKC_HUMAN	Ig kappa grandies C regiono OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	76.74	18	11	2	11.602	5.58	24.106	5.59	18.3
30B				92.81	18		2			25.013	5.9	6.9
30C				73.4	45		5			25.647	6.01	7.1
30D				99.97	36		4			25.687	6.32	8.2
30E				95.96	36		4			25.946	6.49	4.5
30F				54.8	27		3			26.768	6.7	24.8
30G				85.98	18		2			26.416	6.9	30.3
32A	P98160	PGBM_HUMAN	Pagrindinės membranos-specifinis heparano sulfato proteoglikano baltymas OS=Homo sapiens GN=HSPG2 PE=1 SV=4	97.93	3	329	9	468.532	6.06	21.035	5.59	57.8
32B				100	5		15			21.546	5.82	42.2
33A	P02766	TTHY_HUMAN	Transferinas OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	100	36	14	5	15.877	5.52	13.645	5.38	51.0
33B				100	50		7			13.681	5.68	49.0
34	P02766	TTHY_HUMAN	Transferinas OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	100	36	14	5	15.877	5.52	34.100	5.63	
35	P02751	FINC_HUMAN	Fibronektinas OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	34.38	16	204	28	262.460	5.46	281.640	5.43	
36	P00450	CERU_HUMAN	Ceruloplazminas OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	98.8	19	107	16	122.128	5.44	301.394	5.17	
37A	P02787	TRFE_HUMAN	Serotransferinas OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	99.95	17	86	12	77.014	6.81	282.942	6.31	35.9

37B				99.95	17		12			279.480	6.38	32.5
37C				99.99	17		7			280.342	6.44	31.5
38	P02768	ALBU_HUMAN	Serumo albuminas OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	89.83	24	88	14	69.321	5.92	250.992	5.88	
39A	P01008	ANT3_HUMAN	Antitrombinas-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	90.29	33	60	13	52.569	6.32	58.761	5.43	18.5
39B				100	31		12			60.463	5.38	13.7
39C				100	38		16			59.465	5.34	67.8
40	P01008	ANT3_HUMAN	Antitrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	100	36	60	17	52.569	6.32	246.108	5.18	
41	P43652	AFAM_HUMAN	Afaminas OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1	90.07	22	76	14	69.024	5.64	95.405	5.08	
42	P01009	A1AT_HUMAN	Alfa-1-antitripsinas OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	100	17	41	7	46.707	5.37	232.691	5.03	
43A	P02790	HEMO_HUMAN	Hemopeksinas OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	100	24	46	10	51.643	6.55	68.403	5.31	47.2
43B				98.19	16		6			69.730	5.52	52.8
44A	P01042	KNG1_HUMAN	Kininogenas-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	100	15	73	10	71.912	6.34	60.418	4.62	24.2
44B				100	16		9			61.470	4.57	28.5
44C				100	13		8			63.011	4.51	36.8
44D				100	9		6			59.137	4.64	10.5
45	P02749	APOH_HUMAN	Beta-2-glikoproteinas 1 OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3	19.26	8	41	3	38.273	8.34	60.134	6.33	
46	P01019	ANGT_HUMAN	Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	71.35	22	39	7	53.121	5.87	55.993	5.37	
47A	P02750	A2GL_HUMAN	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	99.85	13	32	4	38.154	6.45	50.640	4.41	56.3
47B				99.85	13		4			48.940	4.52	43.7
48	P63261	ACTG_HUMAN	Citoplazminis aktinas 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	81.07	17	38	5	41.766	5.31	44.097	5.32	
49	P10909	CLUS_HUMAN	Klasterinas OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	76.74	7	59	4	52.461	5.89	37.061	4.78	
50	P02452	CO1A1_HUMAN	Kalogenas alfa-1(I) grandis OS=Homo sapiens GN=COL1A1	99.7	3	129	4	138.857	5.6	32.106	5.25	

			PE=1 SV=5									
51	P08123	CO1A2_HUMAN	Collagen alpha-2(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A2 PE=1 SV=7	99.98	5	122	6	129.235	9.08	29.514	6.02	
52	P18136	KV313_HUMAN	Ig kappa chain V-III region HIC OS=Homo sapiens PE=2 SV=2	91.75	20	10	2	14.080	6.18	26.543	6.57	
53	P02753	RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBP4 PE=1 SV=3	49.11	22	27	6	22.995	5.76	21.842	5.37	

a) AC įvesties numeris pagal programą UniProt (accession number)

b) Baltymo identifikavimo vertė (Score – protein Score C.I. %)

c) Sutapimas (Matching [sequence coverage. %])

d) TP – teoriniai peptidai (Theoretical Peptides)

e) DP – peptidai po tripsinizacijos (Digest Peptides)

**4.7.3.3 lentelė.** Identifikuoti VVP baltymai, kurių raiška kinta frakcionuojant 2DE gelyje pI 4 – 7 ir pI 3 – 11 ribose. (A) Baltymai, kurie aptinkami skirtinguose taškuose frakcionuojant pI 4 – 7 ribose; (B) Didelės raiškos baltymai VVP mėginiuose frakcionuojant pI 3 – 11 ribose.

<b>(A) Baltymai atitinkantys skirtingas dėmesles VVP mėginiuose, kai pI 4 – 7</b>	<b>(B) Didelės raiškos baltymų sąrašas iš VVP, kai pI 3 – 11</b>
Serotransferinas	Protrombinas
Kininogenas -1	Alfa-1-antitripsinas
Alfa - antichimotripsinas	Inter-alfa-tripsino inhibitoriaus sunkioji grandis H4
I insuliną panašus augimo faktorius - jungiantis baltymas 1	Ig kappa grandinės C regionas
Cinko-alfa-2-glikoproteinas	Cinko-alfa-2-glikoproteinas
Baltymas AMBP	Alfa-1B-glikoproteinas
Ceruloplasminas	Serotransferinas
Transferinas	I insuliną panašus augimo faktorius jungiantis baltymas 1
Haptoglobinas	Komplekso komponentas C9
Alfa-1-antitripsinas	Plazmos proteazės C1 inhibitorius
Kininogenas	Pagrindinės membranos specifinis heparano sulfato proteoglikano baltymas
Alfa-1B-glikoproteinas	Baltymas AMBP
Antitrombinas-III	Transferinas
	Alfa-1B-glikoproteinas
	Keruloplasminas
	Alfa-1-antichimotripsinas

#### **4.8. Rezultatų aptarimas**

Vykdam šiuos tyrimus analizavome VV-MKL, išskirtas iš antrojo trimestro (18 – 21 nėštumo savaitės) amniocentezės mėginių, esant normaliam ir patologiniam nėštumui, bei trečiojo trimestro (29 – 38 savaitės) polihidramniono vaisiaus vandenų mėginių. Daugelis VV-MKL kultūrų pasižymėjo panašia ląstelių morfologija, imunofenotipu, proliferaciniu bei diferenciacijos potencialu. MKL kultūros, išskirtos iš VV su vaisiaus patologija, šiek tiek skyrėsi savo fenotipu (CD44+, CD90+, CD105+) bei proliferaciniu potencialu. Ląstelės paviršiaus žymenų raiška (CD90) buvo labai aukšta ir siekė virš 95%, CD44 – 90%, CD – 80%, ląstelių kultūrose išskirtose iš normalaus nėštumo, taip pat šios ląstelės neturėjo hematopoetinių ląstelių žymens CD34. Vis gi, skirtinga ląstelių paviršiaus žymenų raiška gauta analizuojant patologinio nėštumo VV ląsteles : CD90 – 67%, CD44 – 38%, CD105 – 31%. Kaip ir kamieniškumo žymenų: Sox-2, Oct-4, Rex-1, Nanog buvimas įrodo ląstelių charakteristikas artimas embrioninėms, kurie siejami su nediferencijuotos ląstelės būseną ir

pluripotentiškumu. Skirtingų nėščiujų MKL pasižymėjo būdinga „šakotos“ formos morfologija ankstyvoje kultūroje, o vėlyvuose pasažuose ląstelės buvo pakitusios formos (padidėjusios, išplokštėjusios), būdingos ląstelių senėjimui. Mūsų gauti rezultatai koreliuoja su mokslinėje literatūroje pateikta informacija, jog VV-MKL ląstelių proliferacijos intensyvumas ilgalaikėje kultūroje skiriasi priklausomai nuo nėščiujų individualumo, taip pat pastebėta neigiama koreliacija tarp nėščiosios amžiaus ir MKL proliferacinio potencialo (Wagner ir kt., 2008). Ląstelės, išskirtos iš VV esant vaisiaus patologijoms, taip pat pasižymi neįprastomis augimo charakteristikomis, ypač vaisiaus aneuploidijos, aneuploidinio kariotipo ir vėlyvojo nėštumo laikotarpiu (Persutte ir Lenke, 1995; Moschidou ir kt., 2013). Ląstelės, išskirtos iš trečiojo trimestro, auga lėčiau nei ląstelės, išskirtos iš pirmojo trimestro vaisiaus vandenų mėginių (Shibata ir kt., 2007). Parodyta, kad visos jos gali diferencijuoti į skirtingų audinių ląsteles, bet išskirtos ląstelės vėlesniu nėštumo laikotarpiu lėčiau diferencijuoja miogenine kryptimi, tačiau greičiau neurogenine kryptimi (Bottai D. Ir kiti 2012).

Mes parodėme, jog tam tikrų pataloginių mėginių kultivuojamose MKL anksčiau atsiranda senėjimo požymiai: pakankamai ankstyvuose pasažuose (nuo 5 iki 8), pastebima pasikeitusi ląstelių morfologija ir išryškėja su senėjimu susijusios molekulinės charakteristikos. Kultivavimo metu VV-MKL mėginiuose genų, susijusių su ląstelių senėjimo procesais (p16, p21, p53 ir ATM), raiškos pokyčiai koreliavo su kultūros proliferacijos greičio pokyčiais bei suaktyvėjusia su senėjimu siejama  $\beta$ -galaktozidaze. Greičiau senstančiose MKL kultūrose p21, p53 ir ATM genų raiška yra padidėjusi nei lėčiau senstančiose ląstelėse, tačiau abiejų tipų kultūros pasižymėjo padidėjusia p16 geno raiška. Kaip žinoma, ląstelių senėjimą daugiausia reguliuoja p53/p21 ir p16/pRb signaliniai keliai, p53/p16 kelias dalyvauja senėjimo procesuose ląstelėms dalinantis ir atliekant svarbią funkciją DNR pažaidų atsake, tuo tarpu p16/pRb kelias dalyvauja streso sukeltame ir priešlaikiniame senėjime (Ben-Porath ir Weinberg, 2005). Remiantis mūsų rezultatais, galima teigti, jog abu signaliniai keliai yra aktyvūs greičiau senti linkusiose MKL kultūrose. Lėčiau senėjančiose VV-MKL kultūrose tik p16 raiška buvo padidėjusi. Taigi, senėjimo procesuose dalyvavo p16/pRb kelias, ir tai patvirtina, kad p16 ir p21 atlieka skirtingas ląstelių senėjimo iniciacijos ir reguliacijos funkcijas (Stein ir kt., 1999).

Epigenetiniai mechanizmai ir biožymenys pataloginių nėštumų atvejais kol kas menkai apibūdinti. Tsurubuchi ir kt. (2013) tyrinėjo VVK ląstelių, išskirtų iš mėginių su nervinio vamzdelio pažeidimais, epigenetinius žymenis ir nustatė padidėjusį H3K4me2/me3 ir H3K27me2/me3, bet sumažėjusį H3K9ac bei H3K18ac baltymų modifikacijų lygį. Atlikus imunofluorescencinius ląstelių branduolių tyrimus, pastebėjome reikšmingus pokyčius kultūrose (PII), kuriose ląstelių fenotipinės ir proliferacijos charakteristikos yra pakitusios. Šie MKL mėginiai buvo praturtinti histono H3 žymėmis (H3K27me3 ir H3K9me2/me3) bei acetilintomis baltymų modifikacijomis (H3K9ac, H3K14ac ir H4K16ac). Taip pat nustatėme reikšmingą H3K9me2/me3 žymens susikaupimą pataloginio nėštumo mėginiuose (PII) bei H3K9me3 padidėjimą PI mėginių ląstelių branduoliuose, kurių charakteristikos yra panašios kaip ir normalaus nėštumo mėginių ląstelėse (N). Tokie histono H3 represyvių žymenų pokyčiai leidžia atskirti skirtingas VV-MKL kultūrų būsenas. Priimta manyti, jog histono H3K27 bei H3K9 metilimas yra siejamas su genų nutildymu, tuo tarpu genų raiškos slopinimas dėl H3K27me3 yra siejamas su fakultatyviu (reguliuojamas vystymosi metu) heterochromatinu, o H3K9me2/me3 lemia konstitutyvaus (pastovus) heterochromatino formavimąsi (Gan ir kt., 2007). Kaip žinoma, histonų H3K4me3 ir H4ac modifikacijos siejamos su genų raiškos aktyvinimu tam tikruose ląstelių tipuose, o H3K4me3 modifikacija svarbi genų, susijusių su svarbiausiomis ląstelės biologinėmis funkcijomis, tokiomis kaip ląstelių proliferacija ir metabolizmas, aktyvavimu (Struhl, 1998). Iki šiol dar nėra galutinai išaiškintos histono H3K9ac ir H3K14ac funkcijos MK ląstelėse. Abi modifikacijos aptiktos ant aktyviai transkribuojamų genų promotorinių sekų bei ant „bivalentinių“ promotorių, praturtintų H3K27me3 ir H3K4me3 modifikacijomis, tuo tarpu kai kurių genų neaktyvūs promotoriai yra praturtinti H3K14ac žymeniu (Karmodiya ir kt., 2012). Remiantis mūsų rezultatais, PII mėginiuose H3K14 pasižymėjo aukštu acetilinimo lygiu lygiagrečiai su vyraujančiu H3K27me3, tuo tarpu pataloginių mėginių (PI ir PII) MKL pasižymėjo padidėjusiu H3K9ac lygiu lyginant su norma (N). Žinoma, kad H3K16ac reikalingas ląstelės ciklo S fazėje, chromatino decondensacijoje, ir

sąryšyje su kitais chromatinio baltymais pagerina transkripcinį aktyvumą (Fullgrabe ir Joseph, 2010). Mes pastebėjome žymų H4K16 acetilinimo padidėjimą PII mėginių ląstelėse, ir tai galima sieti su šio žymens susikaupimu G1/S fazėje, kas būdinga lėtai besidalinančių ląstelių populiacijai (Fullgrabe ir Joseph, 2010). Skirtingi histonų modifikacijų profiliai, aptikti normalaus (N) nėštumo (20 savaičių) ir patologinio nėštumo (PI) mėginiuose (34 nėštumo savaitės) gali būti dėl skirtingu nėštumo laiku išskirtų VV ląstelių, ir patvirtina idėją, jog VV-MKL būseną yra dinamiškai reguliuojama nėštumo laikotarpiu (Maguire ir kt., 2013).

Nuoseklūs epigenetinės būsenos pokyčiai gali būti priežastiniai veiksniai, lemiantys VV-MKL senėjimo procesus. Senstančioms ląstelėms būdinga tankiai supakuoto fakultatyvaus heterochromatino struktūra, DNR hipermetilinimas su senėjimu susijusių genų srityse, praturtintose su H3K27me3 ir H3K4me1/me3 žymenimis (Hanselmann ir kt., 2015). Senėjimo metu prarandamas H3K9me3 žymuo ir pasikeičia heterochromatino būseną (Zhang ir kt., 2015). Mūsų rezultatai rodo DNR metiltransferazės (DNMT1) lygio mažėjimą VV-MKL senėjimo metu kartu su PRC2 komplekso baltymų, EZH2 ir SUZ12, lygio sumažėjimu bei p16 ir p21 raiškos padidėjimu. Parodėme represyvių histonų modifikacijų pokyčius – H3K9me3 sumažėjimą ir H3K27me3 padidėjimą – VV-MKL kultivavimo metu 4 ir 8 pasaužuose. Taip pat mes nustatėme žymų histonų deacetilazės (HDAC1) raiškos sumažėjimą VV-MKL senėjimo procese. Taigi, chromatiną modifikuojantys fermentai bei represyvios histonų modifikacijos iš dalies apsprendžia VV-MKL lemį per chromatinio remodeliavimą.

Palyginamąją proteomo analizę detaliam ištyrėme normalaus nėštumo (antras trimestras, 16 savaitė) VV-MKL ląsteles ir palyginome su diferencijuotomis miogenine, adipogenine, osteogenine ir neurogenine kryptimis. Analizei pasitelkta SYNAPT G2 aukštos raiškos masių spektrometrija, nustatyti 1423 VV-MKL sintetiniai baltymai, detaliam išanalizuotas 250 baltymų proteominis profilis. Identifikavome kiekvienai linijai-specifinius baltymus, kurių raiška buvo padidėjusi arba sumažėjusi atskiros diferenciacijos metu. Nustatėme apie 20 baltymų, dalyvaujančių įvairiuose ląsteliniuose procesuose, kurių lygis buvo ypatingai sumažėjęs ar padidėjęs (6, 8 ar daugiau kartų) adipogeninės, osteogeninės, miogeninės ir neurogeninės diferenciacijos metu. Taip pat identifikavome baltymų, žinomų kaip atskirų linijų diferenciacijos žymenys, raiškos pokyčius. Apibendrinant, proteomo analizė pademonstravo panašų nediferencijuotų ir diferencijuotų ląstelių proteomą, tik 6 baltymai buvo neaptikti kontrolinėse VV-MKL, tuo tarpu diferenciacijos metu 215 baltymų lygis buvo sumažėjęs ar padidėjęs tarp 250 vyraujančių baltymų, atrinktų iš daugiau nei 1400 baltymų.

Taip pat šių tyrimų metu išanalizavome normalių ir polihidramnionu komplikuotų nėštumų vaisiaus vandenų baltymų žemėlapius. Identifikavome dešimtis baltymų, kurių kiekis yra padidėjęs polihidramniono atvejais. Nemažos dalies baltymų kiekis pasikeitė priklausomai nuo izoelektrinio taško, tad galima teigti, jog skirtingos to pačio baltymo modifikacijos yra svarbios patologiniam nėštumui.

Didesnę baltymų koncentraciją lemia polihidramniono patologija – neimuninė vaisiaus vandenė (NIVV), kuri gali pasireikšti dėl įvairių etiologinių sąlygų, maždaug trečdaliu atvejų NIVV priežastis neišaiškinama. Vaisiaus vandenė diagnozuojama maždaug 1 iš 2000 gimdymų (Yetgin ir kt., 2007).

Trečdalis NIVV atvejų nustatoma atsitiktinai atliekant prenatalinės diagnostikos metu pirmojo ar antrojo trimestro nėštumo laikotarpiu (Yurdakök ir kt., 2014). Neimuninės vaisiaus vandenės etiologines priežastis galima suskirstyti į kelias grupes: širdies ir kraujagyslių sistemos (17 – 35%), nežinoma (15 – 25%), limfagyslių displazija (15%), chromosominė (7 – 16%), hematologinė (4 – 12%), dvynių tranfuzija (3 – 10%), infekcijos (5 – 7%), krūtinės ląstos (6%), sindromai (5,5%), skeleto displazijos (3 – 4%), įvairūs (3,6%), įgimtos metabolizmo klaidos (1,3%), virškinimo sistemos (1,3%), šlapinimosi sistemos anomalijos (0,9%), krūtinės navikai (0,9%) (Bellini ir kt., 2015). Keletas širdies pažeidimų buvo išskirti kaip susiję su NIVV, struktūrinės anomalijos, aritmijos ir kraujagyslių anomalijos. Dažniausiai pasitaikančios širdies struktūrinės anomalijos yra širdies pertvaros defektas, hipoplastinė kairė ir dešinė širdis, skilvelių ar prieširdžių pertvaros defektai (Yetgin ir kt., 2007). Mūsų tyrimų metu pastebėtas baltymų, susijusių su širdies ir kraujotakos funkcionavimu, kiekio



padidėjimas. Analizės metu pastebėtas padidėjęs protrombino ir transferino santykinis kiekis. Protrombinas yra glikoproteinas, aptinkamas kraujo plazmoje ir dalyvauja kraujo krešėjimo procesuose. Žinoma, kad pernelyg padidėjęs motinos protrombino kiekis yra siejamas su krešėjimo sistemos pokyčiais, kurie sumažina nukraujavimo riziką gimdymo metu (Chaiworapongsa ir kt., 2002). Baltymų – protrombino ir serotransferino kiekiai motinos kraujyje padidėja priešlaikinio gimdymo metu (Elovitz ir kt., 2001), esant preeklampsijai (Schjetlein ir kt., 1999), vaisiaus augimo sulėtėjimo atvejais. Oksidacinio streso atvejais fosfolipazės A2 aktyvumas padidėja, o tai lemia padidėjusį arachidono rūgšties skaidymą, todėl yra stimuliuojama protrombino ir serotransferino sintezė (Hayashi ir Ohkura, 2002). Tokius pokyčius, kurie gali baigtis nėštumo komplikacijomis kaip preeklampsija, vaisiaus augimo sulėtėjimu, priešlaikiniu gimdymu, vaisiaus dangalų plyšimu, įtakoja veiksniai kaip, pvz.: infekcija, uždegimas, trombozė, endokrininės, genetinės ligos. Visų šių sindromų atvejais nustatyta placentos kraujotakos patologija ir padidėjęs trombino kiekis (Mastrolia ir kt., 2014). Karamessinis ir kolegų tyrimų metu nustatė potransliacinių alfa-2-HS glikoproteino (fetuinas-A) modifikacijų pokyčius vaisiaus augimo sulėtėjimo atvejais, o šis baltymas glaudžiai siejamas su vaisiaus augimu, ląstelių proliferacija ir osteogeneze (Karamessinis ir kt., 2008). Žinoma, kad transtiretiną (TTR) yra sintetinamas kepenyse, tai homotetramerinis baltymas, kuris perneša tiroksiną (T4) ir retinolį. Manoma, kad apsunkintas veninio kraujo grąžinimas gali prisidėti prie NIVV išsivystymo (Hutchison ir kt., 1982). Pastaraisiais metais vykdyta nemažai TTR ir jo dalyvavimo amiloidinėse ligose, tokiose kaip centrinės nervų sistemos amiloidozė, senatvinė sisteminė amiloidozė, paveldima amiloidinė kardiomiopatija, tyrimų. Šias ligas sukelia TTR baltymo agregacija, pagrįde širdies audiniuose, daugiau nei 100 skirtingų mutacijos yra siejami su TTR susijusiomis amiloidozėmis (Krishnaswamy ir kt., 2005). Aiškios patofiziologinės trombino funkcijos vaisiaus vandenyse dar nenustatytos, kadangi pasireišiantys pokyčiai atsiranda ir nevykstant koaguliacijai, tad manoma, jog trombinas amniotinėje ertmėje atlieka ir kitas funkcijas, kurios gali būti nesusijusios su krešėjimo sistema (Erez ir kt., 2009). Hipersplenizmo ar eritropoetino sumažėjimo kaulų čiulpų kamieninėse ląstelėse sukelta anemija gali iššaukti NIVV, kuri taip pat gali išsivystyti dėl kepenų nepakankamumo sukeltos hipoproteinemijos (Staretz-Chacham ir kt., 2009).

Ištirta, jog sveiko vaisiaus ir esant vaisiaus vandenei, kraujo plazmos tyrimų rodikliai skiriasi. Hipoalbuminemija nustatyta šešiams iš septynių vaisiaus vandenės atvejais bei dviems esant normaliam nėštumui. Didelės albumino koncentracijos nustatytos keturiuose vaisiaus vandenės paveiktuose mėginiuose, o trijuose albumino kiekiai buvo didesnis nei 50 % albumino kiekio kraujo plazmoje (Nicolaidis ir kt., 1985). Mūsų gauti rezultatai patvirtina šiuos paskelbtus duomenis.

Mažos molekulinės masės baltymas klasterinas (CLU) buvo nustatytas vaisiaus vandenyse esant nėštumo patologijai (pI 3 – 7), tai glikoproteinas dalyvaujantis biologiniuose procesuose ir jis yra siejamas su daugeliu patologijų buvimu, bei neuronų žūtimi išeminės hipoksijos atvejais (Jones ir Jomary, 2002). Padidėję klasterino kiekiai stebimi preeklampsijos atvejais, esant mažai nėštumo trukmei (Blumenstein ir kt., 2012). Paskelbta, jog klasterinas gali būti naujas terapinis biologinis žymuo vertinant ūminius smegenų veiklos pokyčius (Han ir kt., 2001).

Baltymų transtiretino (TTHY), ceruloplazmino (CERU), afamino (AFAM), alfa-1-mikroglobulino (AMBP), serumo amiloido P-komponento (SAMP), histidinai praturtintas glikoproteino (HRG), alfa-1-antitripsino (A1AT) ir klasterino (CLU) kiekis padidėja esant nėštumo patologijai. Žinoma, jog visi šie baltymai dalyvauja vaisiaus augimo ir vystymosi procesuose, o identifikuoti kininai yra biologinio vaisiaus vandenų aktyvumo veiksniai lygiesiems raumenims (Choolani ir kt., 2009).

Baltymo ceruloplazmino, kuris yra varį rišantis glikoproteinas, padidėję kiekiai pataloginių nėštumų atvejais, vaidina svarbų vaidmenį metabolizme ir nervinio audinio vystymosi etapuose (Choolani ir kt., 2009). Varis dalyvauja įvairiuose biologiniuose redukcijos-oksidacijos procesuose, taip pat yra svarbus daugelio redukuojančių fermentų kofaktorius. Manoma, kad jis gali dalyvauti vaisiaus plaučių vystyme ir kvėpavimo takų antioksidacinėje gynyboje. Taip pat geležies pernašoje per ląstelės membraną, tarpininkaujamoje deaminazės vykdomoje heparano sulfato grandinių

degradacijoje. Kaip žinoma, ceruloplazmino kiekiai yra padidėję Wilsono ligos atvejais, kuomet varis negali įsiterpti į keruloplazminą kepenyse, kadangi yra sutrikusi varį pernešanti ATPazė 2. Serumo Keruloplazminas yra svarbus diagnozuojant Wilsono ligą (Mak ir kt., 2008) Yra žinoma, jog nuo 20 nėštumo savaitės iki gimimo vaisiaus vandenyse vario kiekis ir ceruloplazmino oksidazės aktyvumas svyruoja. Baltymų kiekis vaisiaus vandenyse mažėja nėštumo laikotarpiui artėjant link gimdymo, o ceruloplazmino kiekis didėja 20 – 38 nėštumo savaitėmis, o po 38 savaitės pradeda mažėti (Chan ir kt., 1980). Anagnostopoulos ir kolegos paskelbė, kad ceruloplazmino, alfa-1-antitripsino ir cinko-alfa-2-glikoproteino kiekiai padidėję, kai vaisiui diagnozuotas Klinefelterio sindromas (Anagnostopoulos ir kt., 2010). Kaip paminėta anksčiau, oksidacinis stresas siejamas su PTL, priešlaikiniu gimdymu, preeklampsija, PPRM, IUGR bei kitomis įvairiomis ligomis ir sutrikimais (Knuppel ir kt., 2012).

Alfa-1 rūgšties glikoproteinas ir C3 komplementas, dauguma šių baltymų yra susiję su metabolizmu (34%) ir imuniniu atsaku (18%) (Hitti ir kt., 2010). Alfa-1-antitripsinas yra elastasės ir tripsino inhibitorius. Fiziologinė funkcija – apatinių kvėpavimo takų proteolitinio sunaikinimo apsauga nuo leukocitų elastasės (HLE). Plazmos proteazė C1 – C1 komplekso aktyvacija yra kontroliuojama C1 inhibitoriumi. Tai sudaro proteolitinio požiūriu neaktyvų kompleksą su C1r arba C1s proteazėmis. Šis baltymas gali vaidinti svarbų vaidmenį reguliuojant svarbius fiziologinius procesus, įskaitant kraujo krešėjimą, komplemento aktyvavimą, fibrinolizę ir kinių susidarymą. Alfa-2-HS-glikoproteinas, taip pat žinomas kaip fetinas A, pirmojoje nėštumo pusėje su kitais baltymais dalyvaujantis metabolizmo procesuose (Iliodromiti ir kt., 2012). Glikoproteinas sintetinamas kepenyse, per placenta patenka į kraujotaką ir yra siejamas su įvairiomis funkcijomis, kaip kaulų rezorbcijos procesai, insulino aktyvumą reguliuojanti faktorių, uždegiminių procesų slopinime (Jenkins ir kt., 2011). Nustatytas baltymas lumikanas (LUM) reguliuoja fibrilinio kolageno organizavimą ir periferinį augimą. Chakravarti ir kolegos apibūdino lumikaną kaip vieną iš pagrindinių tarpląstelių: ragenos stromos, aortos, kaulų, skeleto raumenų, odos, plaučių, inkstų, kremzlių ir tarpslankstelių diskų kolageninių matricų komponentų (Chakravarti ir kt., 1989). LUM taip pat įtakoja fibrilinio kolageno sąveiką su kitais tarpląstelinės matricos komponentais (Mavrou ir kt., 2007).

Cinko alfa-2-glikoproteinas stimuliuoja lipidų skilimą adipocituose ir sukelia didelius riebalų nuostolius, susijusius su kai kuriomis pažengusiomis vėžio formomis. Antrojo trimestro nėštumo laikotarpiu jis gali surišti polinesočiausias riebalų rūgštis, bendruosius vaisiaus vandenų baltymus, taip pasiekiamą didžiausią jų koncentraciją VV (Jirka ir kt., 1978). Insulino tipo augimo faktorius rišantis baltymas yra susijęs su insulino tipo I ir II augimo faktoriaus reguliacija (IGF-I ir II), kurie atlieka svarbų vaidmenį augimo, apoptozės, metabolizmo, procesuose. Ankstyvuojų nėštumo laikotarpiu IGF baltymų šeima (IGF peptidai, IGFBP ir IGFBP proteazės) turi didelį poveikį implantacijai ir trofoblastų invazijai. Nenormalus trofoblastų invazija ankstyvuojų nėštumo laikotarpiu gali įtakoti klinikinės-patologinės situacijas, netinkamą implantaciją ir placentos formavimąsi, o sutrikusi placentos veikla, kliniškai gali pasireikšti vėlyvesniu nėštumo laikotarpiu kaip preeklampsija, placentos nepakankamumas ir gimdos augimo sutrikimas (Fowler DJ., 2000).

Insulino tipo augimo faktoriaus jungiančio baltymą 1 koncentracija vaisiaus vandenyse yra informatyvus biologinis žymuo esant vaisiaus augimo sutrikimams vertinti (Chevallier ir kt., 1998). VVP mėginyje mes nustatėme baltymo afamino koncentracijos padidėjimą, kuris dalyvauja vitamino E pernašoje (Kratzer ir kt., 2009). Tai rodo galimą afamino vaidmenį reguliuojant vitamino E įsisavinimą ir transportavimą smegenų kraujotakos dalyje.

Nustatyti baltymų skirtumai tarp vaisiaus vandenų esant normaliam nėštumui ir nėštumo komplikacijoms rodo konkrečius pokyčius baltymų lygyje, todėl tai informatyvus šaltinis prenatalinėje diagnostikoje. Baltymų pokyčiai vaisiaus vandenyse esant normaliam ir patologiniam nėštumui gali būti naudojami kaip biožymenys, nes labai padidėję baltymų kiekiai (nuo 6 iki 24 kartų) angiotensinogenas, transferinas, kai sumažėjęs kiekis siejamas su patologijomis yra šių baltymų: lumikanas, hemopeksinas, serotransferinas, fibrinogenas. Vis tik, baltymų biožymenų patvirtinimui reikalinga daugiau išsamesnių tyrimų, vertinant skirtingus nėštumų atvejus.

VV yra tinkamas biologinis šaltinis vertinant patologinius nėštumus bei prognozuojant ligos eigą ir gydymą. VV-MKL gali būti naudojamos regeneracinėje medicinoje panaudojant jų multipotentines savybes, nes jų gavimas nesukelia etinių ir moralinių konfliktų, išskyrimas yra paprastas, bet efektyvus.

## 5. IŠVADOS

1. Kamieninių ląstelių, išskirtų iš antro ir trečio trimestro vaisiaus vandens, imunofenotipinės ir kamieniškumo savybės (*CD44*, *CD90*, *CD105*; *Sox-2*, *Rex-1*, *Nanog*, *Oct-4*) bei proliferacijos potencialas skiriasi, priklausomai nuo individo, nėštumo laikotarpio bei nėštumo patologijų.
2. Senstančioms VV kultūroms būdingi morfologiniai ir epigenetiniai pokyčiai, o su senėjimu susijusių baltymų-žymenų (*p16*, *p21*, *p53*, *ATM*) ir mikroRNR (miR-17, miR-21) raiška priklauso nuo senėjimo proceso intensyvumo.
3. Normalaus ir pataloginio nėštumo VVKL pasižymi aktyviu (*H4ac*, *H3K9ac*, *H4K16ac*, *H3K4me3*) ir slopinimo (*H3K9me2/3*, *H3K27me3*) histonų modifikacijų specifiniu profiliu, priklausomai nuo jų fenotipinių ir augimo savybių.
4. Detalios proteominės analizės būdu identifikuoti specifiniai baltymai ir jų pokyčiai ląstelėse, diferencijuotose osteogenine, miogenine ir neurogenine kryptimis. Nustatyti specifiniai baltymai būdingi miogeninei diferenciacijai : *TMOD2*, *K1C14*, *K1C16*, *K2C14*; osteogeninei diferenciacijai: *GPNMB*, *S10A4*; neurogeninei diferenciacijai: *PTK7*, *GPNB*, *ITA8*, *WNT5A*.
5. Įvertinti VV baltymų skirtumai esant normaliam nėštumui, preeklampsijai ir polihidramnionui. Nustatytas padidėjęs baltymų – *angiotensinogeno*, *transferino*, kiekis siejamas su pataloginiu nėštumu. Nustatytas sumažėjęs šių baltymų – *lumikano*, *hemopeksino*, *serotransferino*, *fibrinogeno* kiekis vaisiaus vandenyse esant pataloginiam nėštumui.

## 6. REZULTATŲ VIEŠINIMAS

1. **Baronaitė S**, Treigytė G, Arlauskienė A, Navakauskienė R. Normalaus ir patologinio nėštumo vaisiaus vandenų proteominiai tyrimai. 10-asis Lietuvos akušerių ginekologų draugijos suvažiavimas, Šiauliai, Lietuva, 2013 m. rugsėjo 13-14 d., „Lietuvos akušerija ir ginekologija“, t. 16, nr. 3.
2. Navakauskienė R; Zaikova I, **Baronaitė S**, Arlauskienė A, Matuzevičius D, Navakauskas D, Treigytė G. Mass spectrometry-based proteomics of amniotic fluid incident to normal, preeclampsia and polyhydramnion pregnancies. IMSC 2014 Conference, Geneva, August 24-29, 2014.
3. **Baronaitė S**, Zaikova I, Savickienė J, Arlauskienė A, Treigytė G, Navakauskienė R. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells' differentiation potential, epigenetic signature and proteome analysis. 12th World congress of Perinatal Medicine. Madrid-Spain, 3-6 November, 2015, p. 536, P-0096.
4. **Baronaitė S**, Zentelytė A, Savickienė J, Krasovskaja N, Arlauskienė A, Navakauskienė R. Assessment of stem markers and epigenetic environment in amniotic fluid derived mesenchymal stem cells from normal and pathological pregnancy. 15th World Congress in Fetal Medicine. Palma de Mallorca, Spain. 2016 June 26-30.
5. Navakauskienė R, **Baronaitė S**, Matuzevičius D, Treigytė G, Savickienė J, Navakauskas D. Mass spectrometry and computational approach for proteomic characterization of amniotic fluid in polyhydramnios pregnancies. 21st International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2016), Toronto, Canada. 2016 August 20-26.
6. Glemzaitė M, **Baronaitė S**, Zentelytė A, Savickienė J, Wojtas B, Kaminska B and Navakauskiene R. Assessment of epigenetic changes during cardiac differentiation of human amniotic fluid stem cells. IMB Conference “Epigenetics in development”. Mainz, Germany. 2016 October 20-22.
7. **Baronaitė S**, Zentelytė A, Krasovskaja N, Savickienė J, Arlauskienė A, Navakauskienė R. Kamieninių ląstelių, išskirtų iš vaisiaus vandenų, augimo, senėjimo ir diferenciacijos molekulinės reguliacijos tyrimai. Lietuvos akušerių ginekologų draugijos 11-asis suvažiavimas “Kontraversijos akušerijoje ir ginekologijoje”. Vilnius, Lietuva. 2016 m. spalio 28-29.
8. **Baronaitė S**, Zentelytė A, Savickienė J, Krasovskaja N, Arlauskienė A, Navakauskienė R. Differential expression of micro RNAs from amniotic fluid-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation at normal and pathological pregnancy. 16th World Congress in Fetal Medicine 2017. 25-29 June 2017, Ljubljana, Slovenia.
9. Borutinskaitė V, **Baronaitė S**, Glemzaitė M, Zentelytė A, Krasovskaja N, Arlauskienė A, Savickienė J, Utkus A, Navakauskienė R. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells are a new promising source for clinical applications. Stem Cell Community Day. 4 April, 2017 Hamburg, Germany.

10. Navakauskienė R, Glemžaitė M, **Baronaitė S**, Zentelytė A, Krasovskaja N, Borutinskaitė V, Savickienė J, Utkus A. Isolation and characterization of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells as a potential new source for stem cell research and regenerative medicine. World Advanced Therapies & Regenerative Medicine Congress 2017. 17-19 May, 2017 London, UK.
11. Zentelytė A, **Baronaitė S**, Krasovskaja N, Savickienė J, Navakauskienė R. Characteristics and differentiation profiles of human stem cells isolated from amniotic fluid of healthy and pathological pregnancies. XVth International Conference Of The Lithuanian Biochemical Society, Dubingiai, Lithuania, 2018.

## 7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

- 1.ACOG committee on practice bulletins: obstetrics, ACOG practice bulletin: diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2002; 99:159–167.
- 2.Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, *ir kt.* Termamniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007; 7:11.
- 3.Anagnostopoulos AK, Kolialexi A, Mavrou A, Vougas K, Papantoniou N, Antsaklis A, *ir kt.* Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Klinefelter syndrome fetuses. *J Proteomics.* 2010; 73:943–950.
- 4.Anderson JJ, Swayzee Z, Hansen MH. Human amniotic allograft in use on talar dome lesions: A prospective report of 37 patients. *Stem Cell Discov.* 2014; 4:55–60.
- 5.Antonucci I, Stuppia L, Kaneko Y, Yu S, Tajiri N, Bae EC, *ir kt.* Amniotic fluid as a rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. *Cell Transplant.* 2011; 20(6):789–795.
- 6.Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni PB, Sanzone S, Lombardi G, *ir kt.* Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation.* 2004; 78(10):1439–1448.
- 7.Bajek A, Olkowska J, Gurtowska N, Kloskowski T, Walentowicz-Sadlecka M, Sadlecki P, Grabiec M, *ir kt.* Human amniotic-fluid-derived stem cells: a unique source for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 2014; 14(6):831–839.
- 8.Baschat AA, Hecher K. Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin Perinatol.* 2004; 28(1):67–80.
- 9.Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells.* 2004; 22:675–682.
- 10.Beall MH, van den Wijngaard JP, van Gemert MJ, Ross MG. Amniotic fluid water dynamics. *Placenta* 2007; 28:816–823.
- 11.Bellini C, Donarini G, Paladini D, Calevo MG, Bellini T, Ramenghi LA, *ir kt.* Etiology of non-immune hydrops fetalis: An update. *Am J Med Genet A.* 2015; 167A(5): 1082–1088.
- 12.Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(5):961–976.
- 13.Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, *ir kt.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006; 125:315–326.
- 14.Bianchi M, Renzini A, Adamo S, Moresi V. Coordinated actions of microRNAs with other epigenetic factors regulate skeletal muscle development and adaptation. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(4):E840.
- 15.Bibikova M, Chudin E, Wu B, Zhou L, Garcia EW, Liu Y, *ir kt.* Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature. *Genome Res.* 2006; 16(9):1075–1083.
- 16.Blumenstein M, Mccowan L, Wu S, Cooper GJ, North RA, SCOPE consortium. Plasma clusterin increased prior to small for gestational age (SGA) associated with preeclampsia and decreased prior to SGA in normotensive pregnancies. *Reprod Sci.* 2012; 19(6):650–657.
- 17.Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, *ir kt.* Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006; 441(7091):349–353.
- 18.Bottai D., Cigognini D., Nicoraetal E., “Third trimester amniotic fluid cells with the capacity to develop neural phenotypes and with heterogeneity among sub-populations,” *Restorative Neurologyand Neuroscience*, vol. 30, no.1, pp.55–68; 2012.
- 19.Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, *ir kt.* Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.* 2006; 16:329–336.

20. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol.* 1997; 40:280–289.
21. Buhimschi CS, Rosenberg VA, Dulay AT, Thung S, Sfakianaki AK, Bahtiyar MO, *ir kt.* Multidimensional system biology: genetic markers and proteomic biomarkers of adverse pregnancy outcome in preterm birth. *Am. J. Perinatol.* 2008; 25:175–187.
22. Calvin SE, Oyen ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1101:166–185.
23. Cananzi M, Atala A, De CP. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reprod Biomed.* 2009; 18:17–27.
24. Chan WY, Richichi J, Griesmann GE, Cushing W, Kling OR, Rennert OM. Copper and ceruloplasmin activity in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 138: 257–259.
25. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Biol Chem.* 1998; 141:1277–1286.
26. Chaiworapongsa T, Espinoza J, Yoshimatsu J, Kim YM, Bujold E, Edwin S, *ir kt.* Activation of coagulation system in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002; 11:368–373.
27. Chen WQ, Siegel N, Li L, Pollak A, Hengstschläger M, Lubec G. Variations of protein levels in human amniotic fluid stem cells CD117/2 over passages 5–25. *J Proteome Res.* 2009; 8:5285–5295.
28. Cheng FC, Tai MH, Shu ML, Chen CJ, Yang DY, Su HL, *ir kt.* Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg.* 2010; 112(4):868–879.
29. Chevallier B, Lagarde A, Degrelle H, Belaisch-Allart J, Giraudet P, Gallet JP. Insulin-like growth factor binding protein 1 level in amniotic fluid: correlation with birth weight. *Biol Neonate.* 1998; 73:404–406.
30. Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(4):746–759.
31. Christiansen M, Jaliashvili I, Overgaard MT, Ensinger C, Obrist P, Oxvig C. Quantification and characterization of pregnancy-associated complexes of angiotensinogen and the proform of eosinophil major basic protein in serum and amniotic fluid. *Clin Chem.* 2000; 46:1099–1105.
32. Cho CK, Shan SJ, Winsor EJ, Diamandis EP. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6(8):1406–1415.
33. Cho CK, Smith CR, Diamandis EP. Amniotic fluid proteome analysis from Down syndrome pregnancies for biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2010; 9:3574–3582.
34. Choolani M, Narasimhan K, Kolla V, Hahn S. Proteomic Technologies for Prenatal Diagnostics: Advances and Challenges Ahead. *Expert Rev Proteomics.* 2009; 87–101.
35. Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008; 14:53–60.
36. Collas P. Epigenetic states in stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790:900–905.
37. Da Sacco S, Sedrakyan S, Boldrin F, Giuliani S, Parnigotto P, Habibian R, *ir kt.* Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. *J Urol.* 2010; 183(3):1193–2000.
38. Da Sacco S, De Filippo RE, Perin L. Amniotic fluid as a source of pluripotent and multipotent stem cells for organ regeneration. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011; 16:101–105.
39. De Coppi P, Bartsch Jr G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, *ir kt.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(1):100–106.
40. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol.* 2006; 419:426–438.



41. Delo DM, Guan X, Wang Z, Groba L, Callahan M, Smith T, Sane DC, Payne RM, Atala A, Soker S. Calcification after myocardial infarction is independent of amniotic fluid stem cell injection. *Cardiovasc Pathol.* 2011; 20(2):e69–78.
42. Di Trapani M, Bassi G, Fontana E, Giacomello L, Pozzobon M, Guillot PV, et al. Immune regulatory properties of CD117(pos) amniotic fluid stem cells vary according to gestational age. *Stem Cells Dev.* 2015; 24:132–143.
43. Dziadosz M, Basch RS, Young BK. Human amniotic fluid: a source of stem cells for possible therapeutic use. *Amer J Obstet Gynecol.* 2016; 214(3) 321–327.
44. Elovitz MA, Baron J, Phillippe M. The role of thrombin in preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185:1059–1063.
45. Erez O, Romero R, Vaisbuch E, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, *ir kt.* Changes in amniotic fluid concentration of thrombin-antithrombin III complexes in patients with preterm labor: evidence of an increased thrombin generation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009; 22:971–982.
46. Espino Y Sosa S, Flores-Pliego A, Espejel-Núñez A, Medina-Bastidas D, Vadillo-Ortega F, Zaga-Clavellina V, Estrada-Gutierrez G. New insights into the role of matrix metalloproteinases in preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7):1448.
47. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18(6):877–891.
48. Fullgrabe J, Joseph B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ.* 2010; 17:1238–1243.
49. Gan Q, Yoshida T, McDonald OG, Owens GK. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25:2–9.
50. Gardner RL, Beddington RS. Multi-lineage ‘stem’ cells in the mammalian embryo. *J Cell Sci Suppl.* 1988; 10:11–27.
51. Geer LA, Pycke BF, Sherer DM, Abulafia O, Halden RU. Use of amniotic fluid for determining pregnancies at risk of preterm birth and for studying diseases of potential environmental etiology. *Environ Res.* 2015; 136:470–481.
52. Gervasi MT, Romero R, Bracalente G, Erez O, Dong Z, Hassan SS, *ir kt.* Midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10: evidence for heterogeneity of intra-amniotic inflammation and associations with spontaneous early (<32 weeks) and late (>32 weeks) preterm delivery. *J Perinat Med.* 2012; 40(4):329–343.
53. Guoa L, Zhao RC, Wua Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology.* 2011; 39:608–616.
54. Gosden CM, Brock DJ. Combined use of alphafetoprotein and amniotic fluid cell morphology in early prenatal diagnosis of fetal abnormalities. *J Med Genet.* 1978; 15(4):262–270.
55. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull.* 1983; 39:348–354.
56. Graca G, Duarte IF, Barros AS, Goodfellow BJ, Diaz SO, Pinto J, *ir kt.* Impact of prenatal disorders on the metabolic profile of second trimester amniotic fluid: a nuclear magnetic resonance metabolomic study. *J Proteome Res.* 2010; 9(11):6016–6024.
57. Gravett MG, Novy MJ, Rosenfeld RG, Reddy AP, Jacob T, Turner M, *ir kt.* Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers. *JAMA.* 2004; 292(4):462–469.
58. Guerrero R, Florez PE. The duration of pregnancy. *Lancet* 1969; 2:268–269.
59. Han BH, DeMattos RB, Dugan LL, Kim-Han JS, Brendza RP, Fryer JD, *ir kt.* Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat Med.* 2001; 7:338–343.
60. Han J, Yang T, Gao J, Wu J, Qiu X, Fan Q, *ir kt.* Specific microRNA expression during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2010; 25:377–384.

61. Hanselman AE, Tidwell JE, Santrock RD. Cryopreserved human amniotic membrane injection for plantar fasciitis: A randomized, controlled, double-blind pilot study. *Foot Ankle Int.* 2015; 36(2):151–158.
62. Hamid AA, Joharry MK, Mun-Fun H, Hamzah SN, Rejali Z, Yazid MN, *ir kt.* Highly potent stem cells from full-term amniotic fluid: a realistic perspective. *Reprod Biol.* 2017; 17(1):9–18.
63. Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol.* 2008; 32:288–294.
64. Hayashi M, Ohkura T. Elevated levels of serum macrophage colony-stimulating factor in normotensive pregnancies complicated by intrauterine fetal growth restriction. *Exp Hematol.* 2002; 30:388–393.
65. Hipp J, Atala A. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev.* 2008; 4:3–11.
66. Hitti J, Lapidus JA, Lu X, Reddy AP, Jacob T, Dasari S, *ir kt.* Noninvasive diagnosis of intraamniotic infection: proteomic biomarkers in vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 203:32.
67. Hoehn H, Bryant EM, Karp LE, Martin GM. Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. *Pediatr Res.* 1974; 8:746–754.
68. Hoehn H, Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. *Methods Cell Biol.* 1982; 26:11–34.
69. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells.* 2010; 28:357–364.
70. Huang B, Li G, Jiang XH. Fate determination in mesenchymal stem cells: A perspective from histone-modifying enzymes. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6:35.
71. Hutchison AA, Drew JH, Yu VY, Williams ML, Fortune DW, Beischer NA. Nonimmunologic hydrops fetalis: a review of 61 cases. *Obstet Gynecol.* 1982; 59: 347–352.
72. Hui L, Slonim DK, Wick HC, Johnson KL, Koide K, Bianchi DW. Novel neurodevelopmental information revealed in amniotic fluid supernatant transcripts from fetuses with trisomies 18 and 21. *Hum Genet.* 2012; 131(11):1751–1759.
73. Iliodromiti S, Vrachnis N, Samoli E, Iliodromiti Z, Pangalos C, Drakoulis N, *ir kt.* Fetuin A concentration in the second trimester amniotic fluid of fetuses with trisomy 21 appears to be lower: phenotypic considerations. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 138971.
74. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-Van Der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, *ir kt.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003; 102(4):1548–1549.
75. Izetbegovic S., Mehmedbasic S. Early amniocentesis as a method of choice in diagnosing gynecological diseases. *Acta Inform Med.* 2013; 21(4):270–273.
76. Yang XX, Xue SR, Dong WL, Kong Y. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cell transplantation into the lateral ventricle of hemiparkinson rats. *Chin Med J.* 2009; 122(20):2449–2454.
77. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, *ir kt.* Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells.* 2005; 23(1):3–9.
78. Yetgin S, Aytac S, Gurakan F, Yurdakok M. Nonimmune hydrops fetalis in two cases of consanguineous parents and associated with hereditary spherocytosis and hemophagocytic hystiocytosis. *J Perinat.* 2007; 27:252–254.
79. Yurdakök M. Non-immune hydrops fetalis. *J Ped Neonat Individ Med.* 2014; 3:e030214.
80. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003; 33:245–254.
81. Jenkins NT, McKenzie JA, Hagberg JM, Witkowski S. Plasma fetuin-A concentrations in young and older high- and low-active men. *Metabolism.* 2011; 60: 265–271.
82. Jirka M, Blanický P, Srajer J, Zwinger A, Jirásek JE. Human serum Zn-alpha2-glycoprotein in amniotic fluid. *Clin Chim Acta.* 1978; 85:107–110.

83. Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34:427–431.
84. Karamessinis PM, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Makridakis M, Vougas K, Fountoulakis M, *ir kt.* Marked defects in the expression and glycosylation of alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction: proteomics screening and potential clinical implications. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(3):591–599.
85. Karmodiya K, Krebs AR, Oulad-Abdelghani M, Kimura H, Tora L. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomic.* 2012; 13:424.
86. Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *J Am Coll Surg.* 2003; 196(4):592–597.
87. Kilpatrick SJ, Safford KL. Maternal hydration increases amniotic fluid index in women with normal amniotic fluid. *Obstet Gynecol.* 1993; 81:49–52.
88. Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, *ir kt.* Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif.* 2007; 40(1):75–90.
89. Klemmt PA, Vafaizadeh V, Groner B. Murine amniotic fluid stem cells contribute mesenchymal but not epithelial components to reconstituted mammary ducts. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1(4):20.
90. Klemmt PA, Vafaizadeh V, Groner B. The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11(10):1297–1314.
91. Kobayashi H, Naruse K, Sado T, Noguchi T, Yoshida S, Shigetomi H, *ir kt.* Search for amniotic fluid-specific markers: novel biomarker candidates for Amniotic Fluid Embolism. *The open women's health journal.* 2011; 5:7–15.
92. Kolialexi A, Anagnostopoulos AK, Mavrou A, Tsangaris GT. Application of proteomics for diagnosis of fetal aneuploidies and pregnancy complications. *J. Proteomics.* 2009; 72(5):731–739.
93. Kolialexi A, George T Tsangaris GT, Ariadni Mavrou A. Proteomics in prenatal diagnosis. *Expert Rev Proteom.* 2014; 6(2):111–113.
94. Kratzer I, Bernhart E, Wintersperger A, Hammer A, Walti S, Sperk G, *ir kt.* Afamin is synthesized by cerebrovascular endothelial cells and mediates alpha-tocopherol transport across an in vitro model of the blood–brain barrier. *J Neurochem.* 2009; 108: 707–718.
95. Krishnaswamy S. Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:54–67.
96. Lakshmi pathy U, Love B, Goff LA, Jornsten R, Graichen R, Hart RP, *ir kt.* MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008; 16:1003–1016.
97. Lee JH, Park JS, Norwitz ER, Kim BJ, Park CW, Jun JK, *ir kt.* Identification and characterization of proteins in amniotic fluid that are differentially expressed before and after antenatal corticosteroid administration. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202(4):388.e1–388.e10.
98. Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, *ir kt.* A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(12):3666–3677.
99. Liberatori S, Bini L, De Felice C, Magi B, Marzocchi B, Raggiaschi R, *ir kt.* A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation. *Electrophoresis.* 1997; 18(15):2816–2822.
100. Lim KI, Butt K, Naud K, Smithies M. Amniotic fluid: technical update on physiology and measurement. *J Obstet Gynaecol Can.* 2017; 39(1):52–58.
101. Loebel DA, Watson CM, De Young RA, Tam PP. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol.* 2003; 264(1):1–14.
102. Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Stem cells from amniotic fluid - potential for regenerative medicine. *Best Practice & Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; 31:45–57.

103. Maguire T, Demarest BL, Hill JT, Palmer JD, Brothman AR, Yost HJ, *ir kt*. Genome-wide analysis reveals the unique stem cell identity of human amniocytes. *Plos One*. 2013; 8(1):e53372.
104. Mak CM, Lam CW, Tam S. Diagnostic accuracy of serum ceruloplasmin in Wilson disease: determination of sensitivity and specificity by ROC curve analysis among ATP7B-genotyped subjects. *Clin Chem*. 2008; 54:1356–1362.
105. Maraldi T, Guida M, Zavatti M, Resca E, Bertoni L, La Sala GB, et al. Nuclear Nox4 role in stemness power of human amniotic fluid stem cells. *Oxid Med Cell Longev* 2015; Article ID 10130.
106. Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury IWJ, *ir kt*. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*. 2009; 461(7265):762–767.
107. Markiewicz B, Sajnog A, Lorenc W, Hanć A, Komorowicz I, Suliburska J, *ir kt*. Multielemental analysis of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS: Full procedure validation and estimation of measurement uncertainty. *Talanta*. 2017; 174:122–130.
108. Mastrolia SA, Mazor M, Loverro G, Klaitman V, Erez O. Placental vascular pathology and increased thrombin generation as mechanisms of disease in obstetrical syndromes. *PeerJ*. 2014; 2:e653.
109. Mauro A, Turriani M, Ioannoni A, Russo V, Martelli A, Di Giacinto O, *ir kt*. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Vet Res Commun*. 2010; 34:S25–28.
110. Mavrou A, Anagnostopoulos AK, Kolialexi A, Vougas K, Papantoniou N, Antsaklis A. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Turner syndrome fetuses. *J Proteome Res*. 2007; 7:1862–1866.
111. Michaels JEA, Dasari S, Pereira L, Reddy AP, Lapidus JA, Lu X, *ir kt*. Comprehensive Proteomic Analysis of the Human Amniotic Fluid Proteome: Gestational Age-Dependent Changes. *J Proteome Res*. 2007; 6(4):1277–1285.
112. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9(1):168.
113. Moorefield EC, McKee EE, Solchaga L, Orlando G, Yoo JJ, Walker S, *ir kt*. Cloned, CD117 selected human amniotic fluid stem cells are capable of modulating the immune response. *PLoS One*. 2011; 6:e26535.
114. Moschidou D, Drews K, Eddaoudi AJ, De Coppi P, Guillot PV. Molecular signature of human amniotic fluid stem cells during fetal development. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013; 8:73–81.
115. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, *ir kt*. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010; 1:1E.6
116. Murphy SV, Atala A. Amniotic fluid and placental membranes: unexpected sources of highly multipotent cells. *Semin Reprod Med*. 2013; 31(1):62–68.
117. Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Kocher T, *ir kt*. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J*. 2007; 26(18):4078–4088.
118. Nicolaides KH, Warenski JC, Rodeck CH. The relationship of fetal plasma protein concentration and hemoglobin level to the development of hydrops in rhesus isoimmunization. *Am J Obstet Gynecol*. 1985; 152:341–344.
119. Noronha IL, Cavaglieri RC, Janz FL, Duarte SA, Lopes MAB, Zugaib M, *ir kt*. The potential use of stem cells derived from human amniotic fluid in renal diseases. *Kidney Int Suppl*. 2011; 1:77–82.
120. Oh JE, Fountoulakis M, Juranville JF, Rosner M, Hengstschläger M, Lubec G. Proteomic determination of metabolic enzymes of the amnion cell: basis for a possible diagnostic tool? *Proteomics*. 2004; 4:1145–1158.

121. O'Rahilly R, Müller F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs*. 2010; 192(2):73–84.
122. Pan HC, Yang DY, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, *ir kt*. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *J Clin Neurosci*. 2006; 13(5):570–575.
123. Park JS, Oh KJ, Norwitz ER, Han JS, Choi HJ, Seong HS, *ir kt*. Identification of proteomic biomarkers of preeclampsia in amniotic fluid using SELDI-TOF mass spectrometry. *Reprod Sci*. 2008; 15:457–468.
124. Park J, Cha DH, Jung JW, Kim YH, Lee SH, Kim Y, *ir kt*. Comparative proteomic analysis of human amniotic fluid supernatants with down syndrome using mass spectrometry. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(6):959–967.
125. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. 2004; 23(20):4061–4071.
126. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril*. 1999; 71:482–489.
127. Pérez-Campo FM, Riancho JA. Epigenetic mechanisms regulating mesenchymal stem cell differentiation. *Current Genomics*. 2015; 16:368–383.
128. Persutte WH, Lenke RR. Failure of amniotic-fluid-cell growth: is it related to fetal aneuploidy? *Lancet*. 1995; 345(8942):96–97.
129. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit*. 2002; 8:253–257.
130. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*. 2003; 18(7):1489–1493.
131. Queloz PA, Crettaz D, Thadikkaran L, Sapin V, Gallot D, Jani J, *ir kt*. Proteomic analyses of amniotic fluid: potential applications in health and diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 850:336–342.
132. Qiu J. Epigenetics: Unfinished symphony. *Nature*. 2006; 441:143–145.
133. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007; 447:425–432.
134. Robinson WP, McFadden DE, Barrett IJ, Kuchinka B, Peñaherrera MS, Bruyère H, *ir kt*. Origin of amnion and implications for evaluation of the fetal genotype in cases of mosaicism. *Prenat Diagn*. 2002; 22(12):1076–1085.
135. Romero R, Munoz H, Gomez R. Two-thirds of spontaneous abortion/fetal deaths after midtrimester amniocentesis are the result of a pre-existing subclinical inflammatory process of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 40:375–379.
136. Romero R, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, *ir kt*. Isobaric labeling and tandem mass spectrometry: A novel approach for profiling and quantifying proteins differentially expressed in amniotic fluid in preterm labor with and without intra-amniotic infection/inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010, 23(4):261–280.
137. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, *ir kt*. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007; 16:931–951.
138. Roubelakis M. G., Bitsika V, Zagoura D., “In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol.15, no. 9, pp. 2011; 1896–1913.
139. Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(12):1896–1912.

- 140.Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 2011; 278:1598–1609.
- 141.Schjetlein R, Abdelnoor M, Haugen G, Husby H, Sandset PM, Wisloff F. Hemostatic variables as independent predictors for fetal growth retardation in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999; 78:191–197.
- 142.Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Aldred SF, *ir kt.* Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE.* 2009; 4:e5605.
- 143.Schuettengruber B, Cavalli G. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development.* 2009; 136(21):3531–3542.
- 144.Sedrakyan S, Villani V, Sacco S, Da, Tripuraneni N, Porta S, Achen A, Lavarreda-Pearce M, Petrosyan A, Soloyan H, Filippo R. E. De, Bussolati & L. Perin B. Amniotic fluid stem cell-derived vesicles protect from VEGF-induced endothelial damage. *Nature.com, Scientific Reports,* 2017; Volume 7, 16875.
- 145.Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Mogni M, Raviolo V, *ir kt.* Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica.* 2008; 93:339–346.
- 146.Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, *ir kt.* Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells.* 2007; 25(9):2371–2382.
- 147.Steigman SA, Fauza DO. Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2007; 1:1E.2
- 148.Stein G. H., Drullinger L. F., Soulard A., and Dulić V., “Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 2109–2117; 1999.
- 149.Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. *Pediatrics.* 2009; 1191–1207.
- 150.Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129(3):163–173.
- 151.Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, *ir kt.* MiR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2011; 18(6):985–995.
- 152.Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(4):297–306.
- 153.Trounson A. A fluid means of stem cell generation. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25:62–63.
- 154.Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004; 19:1450–1456.
- 155.Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, Lee JL, Chang YJ. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod.* 2006; 74(3):545–551.
- 156.Tsangaris GT, Weitzdorfer R, Pollak D, Lubec G, Fountoulakis M. The amniotic fluid cell proteome. *Electrophoresis.* 2005; 26(6):1168–1173.
- 157.Tsangaris GT, Kolialexi A, Karamessinis PM, Anagnostopoulos AK, Antsaklis A, Fountoulakis M, *ir kt.* The normal human amniotic fluid supernatant proteome. *In Vivo.* 2006a; 20(4):479–490.

158. Tsangaris GT, Karamessinis P, Kolialexi A, Garbis SD, Antsaklis A, Mavrou A, *ir kt*. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics*. 2006b; 6(15):4410–4419.
159. Tsangaris GT, Anagnostopoulos AK, Tounta G, Antsaklis A, Mavrou A, Kolialexi A. Application of proteomics for the identification of biomarkers in amniotic fluid: are we ready to provide a reliable prediction? *EPMA Journal*. 2011; 2:149–155.
160. Ulker K, Cicek M. Effect of maternal hydration on the amniotic fluid volume during maternal rest in the left lateral decubitus position: a randomized prospective study. *J Ultrasound Med*. 2013; 32:955–961.
161. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol*. 2005; 25:341–348.
162. Van Kruijsbergen I, Hontelez S, Veenstra GJ. Recruiting polycomb to chromatin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 67:177–87.
163. Vascotto C, Salzano AM, D'Ambrosio C, Fruscalzo A, Marchesoni D, di Loreto C, *ir kt*. Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia. *J Proteome Res*. 2007; 6:160–170.
164. Vincent A, Van Seuning I. Epigenetics, stem cells and epithelial cell fate. *Differentiation*. 2009; 78:99–107.
165. Vines JB, Aliprantis AO, Gomoll AH, Farr J. Cryopreserved amniotic suspension for the treatment of knee osteoarthritis. *J Knee Surg*. 2016; 29(6):443–450.
166. Zelen CM, Poka A, Andrews J. Prospective, randomized, blinded, comparative study of injectable micronized dehydrated amniotic/chorionic membrane allograft for plantar fasciitis-A feasibility study. *Foot Ankle Int*. 2013; 34(10):1332–1339.
167. Zhang JF, Fu WM, He ML, Xie WD, Lv Q, Wan G, *ir kt*. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biol*. 2011; 8(5):829–838.
168. Zhang R, Wang D, Xia Z, Chen C, Cheng P, Xie H, *ir kt*. The role of microRNAs in adipocyte differentiation. *Front Med*. 2013; 7(2):223–230.
169. Zhang W, Li J, Suzuki K, Qu J, Wang P, Zhou J, *ir kt*. Aging stem cells. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science*. 2015; 348:1160–1163.
170. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, *ir kt*. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2213.
171. Wang TH, Chao AS, Chen JK, Chao A, Chang YL, Cheng PJ, *ir kt*. Network analyses of differentially expressed proteins in amniotic fluid supernatant associated with abnormal human karyotypes. *Fertil Steril*. 2009; 92:96–107.
172. Wang CN, Chang SD, Peng HH, Lee YS, Chang YL, Cheng PJ, *ir kt*. Change in amniotic fluid levels of multiple anti-angiogenic proteins before development of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:1431–1441.
173. Wang CN, Chen JY, Sabu S, Chang YL, Chang SD, Kao CC, *ir kt*. Elevated amniotic fluid F(2)-isoprostane: A potential predictive marker for preeclampsia. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50:1124–1130.
174. Werber B. Amniotic tissues for the treatment of chronic plantar fasciosis and Achilles tendinosis. *J Sports Med*. 2015; Article ID 219896.

#### **Disertacijos:**

1. Johansson B. Low level operations and learning in computer vision. 2004. In: Dissertation No. 912, Sweden, Linköping University.

**Internetinės svetainės:**

1. MAYO clinic. „Amniocentesis“ skyrius. <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/amniocentesis/about/pac-20392914>. Paskutinį kartą naudotasi 2018 m. liepos 14 d.
2. <https://bioinformant.com/category/stem-cells/>

**Internetinės duomenų bazės:**

1. AgBase programa [2.00 v].
2. <http://www.matrixscience.com/>
3. <http://www.expasy.org/tools/pepident.html>
4. <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>
5. <http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msfit.htm>

**Elektroninės knygos:**

1. Campbell N.A., Reece J.B., Mitchell L.G. „Biology (5th Edition)“. Skyrius „Introduction to Animal Evolution“. Leidėjas Benjamin-Cummings Pub Co; 1999. ISBN-13: 978-0805330441.
2. Cunningham F.G., Leveno K., Bloom S., Hauth J., Rouse D., Spong C. „Williams Obstetrics (23rd edition)“. Skyrius „Maternal and Fetal Anatomy and Physiology“. Leidėjas McGraw-Hill Professional; 2009. ISBN-13: 978-0071497015.
3. Knuppel R.A., Hassan M.I., McDermott J.J., Tucker J.M., Morrison J.C. „Preterm Birth – Mother and Child“. Skyrius „Oxidative stress and antioxidants: preterm birth and preterm infants“. Leidėjas InTech; 2012. ISBN-13: 978-953-307-828-1.



## **PADĖKA**

Sėkmingas ir įdomus disertacijos rašymas nebūtų įgyvendintas be darbo vadovės, kolegų mokslininkų – Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus darbuotojų, Proteomikos centro mokslininkų ir VULSK gydytojų.

Ypatingai norėčiau padėkoti:

Savo mokslinei vadovei prof. Rūtai Navakauskienei už darbo idėjų vystymą, paramą, patarimus ir mokymus, labai išsamų ir kūrybingą vadovavimą visais mokslinio darbo vykdymo etapais.

Mokslinei konsultantei gydytojai ginekologei doc. Audronei Arlauskienei už klinikinių atvejų aiškinimus, bei profesionalų bendradarbiavimą analizuojant biologinius mėginius.

Gydytojai ginekologei-genetikei Natalijai Krasovskajai už galimybę gauti svarbius biologinius mėginius amniocentezės būdu. Klinikinių atvejų paaiškinimus.

Mokslo darbuotojoms dr. Gražinai Treigytei ir dr. Jūratei Savickienei perduodant praktinę ir teorinę patirtį, teikiant pastabas ir patarimus.

Doktorantei Aistei Zentelytei už bendrą indėlį atliekant tekmės citometrijos ir RL-kPGR tyrimus.

## *Curriculum Vitae*

### **Asmeninė informacija**

Vardas, pavardė : Sandra Baronaitė

El.paštas : [baronaite.sandra@gmail.com](mailto:baronaite.sandra@gmail.com)

Kontaktinis tel.nr. : +37061619700

### **Išsilavinimas**

2007 – 2009 Chemijos Magistro laipsnis

Vilniaus edukologijos universitetas, Studentų g. 39, LT-08106 Vilnius, Lietuva.

1999 – 2007 Chemijos Bakalauro laipsnis

Vilniaus edukologijos universitetas, Studentų g. 39, LT-08106 Vilnius, Lietuva.

### **Darbo patirtis**

2011 – 2017 Doktorantė

Laštelės molekulinės biologijos skyrius, Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius.

### **Dalyvavimas moksliniuose projektuose**

Epigenetinių veiksmų ir mikro RNR vaidmuo vaisiaus vandens kamieninių ląstelių funkcionavime. Projekto numeris MIP-57/2015.

Hematologinės sistemos molekuliniai veiksniai ir jų vaidmuo žmogaus ląstelių senėjimo, diferenciacijos ir regeneracijos sankityoje. Projekto numeris LIG-12/2015.

Vaisiaus vandens citologiniai, molekuliniai ir epigenetiniai tyrimai. Projekto numeris MIP-033/2013.

Leukemijos kompleksinis molekulinis persitvarkymų biožymenų tyrimas. Projekto numeris LIG-06/2012.

### **Domėjimosi sritys**

Kamieninės ląstelės, ląstelės biologija, prenatalinė diagnostika, embriologija, regeneracinė medicina.

### **Narystė draugijose**

Lietuvos biochemikų draugija.

Lietuvos kamieninių ląstelių tyrėjų asociacija.

Vilniaus universiteto leidykla  
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 12 egz.