



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Aistė Zentelytė

**VAISIAUS VANDENŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ AUGIMO,
DIFERENCIACIJOS IR SENĖJIMO ĮVERTINIMAS**

**EVALUATION OF GROWTH, DIFFERENTIATION AND SENESCENCE
OF AMNIOTIC FLUID STEM CELLS**

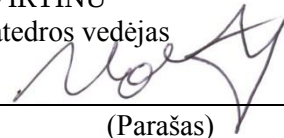
Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 621J70003
Biotechnologijų studijų kryptis

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius

(Data)

Aistė Zentelytė

**VAISIAUS VANDENŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ AUGIMO,
DIFERENCIACIJOS IR SENĖJIMO ĮVERTINIMAS**

**EVALUATION OF GROWTH, DIFFERENTIATION AND SENESCENCE
OF AMNIOTIC FLUID STEM CELLS**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijų studijų kryptis

Vadovas prof. dr. Rūta Navakauskienė

 2016-06-02

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantė dr. Vaida Buivydienė

 2016-06-02

(Parašas)

(Data)

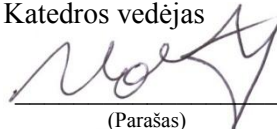
Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijų studijų kryptis

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 612J70003

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentei Aistei Zentelytei

Baigiamojo darbo (projekto) tema: Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių augimo, diferenciacijos ir senėjimo įvertinimas

patvirtinta 2015 m. lapkričio mėn. 6 d. dekanų potvarkiu Nr. 391fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2016 m. birželio 3 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

įvertinti augimo, diferenciacijos ir senėjimo procesus normalaus ir sutrikusio vaisiaus vystymosi nėštumo donorinių vaisiaus vandenų kamieninėse ląstelėse

Vadovas


.....
(Parašas)

prof. dr. Rūta Navakauskienė
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau


.....
(parašas)

.....Aistė Zentelytė.....

.....2015-11-14.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos baigiamasis darbas 4

Pavadinimas **Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių augimo, diferenciacijos ir senėjimo įvertinimas**

Autorius **Aistė Zentelytė**

Vadovas **prof. dr. Rūta Navakauskienė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Žmogaus vaisiaus vandenys – naujas ir labai perspektyvus kamieninių ląstelių šaltinis. Šios ląstelės traktuojamos kaip įvairiagalės, tačiau turi ir daugiagališkumo žymenų: pasižymi embrioninėms kamieninėms ląstelėms būdingų transkripcijos veiksnių raiška bei gali diferencijuoti visomis trimis gemalinių lapelių kryptimis. Šioms ląstelėms gauti beveik nėra etinių apribojimų, kadangi mėginiai gali būti gaunami planinės amniocentezės metu. Reikia atlikti dar daug tyrimų norint šias ląsteles pritaikyti terapijoje. Būtina išaiškinti ląstelių augimo, diferenciacijos ir senėjimo molekulinį mechanizmų reguliaciją.

Darbo metu vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės charakterizuotos pagal kamieninėms ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų ir transkripcijos veiksnių raišką, kokybiškai ir kiekybiškai įvertintas ląstelių diferenciacijos adipogenine, osteogenine, neurogenine ir miogenine kryptimis potencialas. Taip pat ištirti visuminio DNR metilinimo pokyčiai ląstelių diferenciacijos metu. Ištirta įvairių mikroRNR ir su ląstelės ciklo reguliavimu susijusių genų raiška normalaus ir sutrikusio vaisiaus vystymosi nėštumo mėginių ląstelėse auginant jas vienasluoksneje kultūroje. Taip pat įvertintas ląstelių β -galaktozidazinis aktyvumas vėlyvoje augimo fazėje.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, aparatūra, medžiagos, metodai, tyrimo rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis 50 p. teksto be priedų, 23 paveikslai, 6 lentelės, 75 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: vaisiaus vandenys, kamieninės ląstelės, augimas, diferenciacija, senėjimas

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study program Final Thesis 4

Title **Evaluation of Growth, Differentiation and Senescence of Amniotic Fluid Stem Cells**

Author **Aistė Zentelytė**

Academic supervisor **prof. dr. Rūta Navakauskienė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Amniotic fluid is a novel and promising source of stem cells. These stem cells are considered to be multipotent but it is also shown to have some pluripotency markers like expression of embryonic transcription factors and ability to differentiate to cell lineages from all three germ layers. There are practically no ethical restrictions for isolation of these stem cells since they can be isolated from samples obtained during amniocentesis. A lot needs to be done before amniotic fluid stem cells could be used for therapeutic approach. First of all, the regulation of molecular mechanisms during cell growth, differentiation and senescence needs to be studied.

In this work, amniotic fluid stem cells were characterized by the expression of stem cell specific surface markers and transcription factors, the cell potency to differentiate towards adipogenic, osteogenic, neurogenic and myogenic lineage was evaluated qualitatively and quantitatively. Also, global DNA methylation during cell differentiation was examined. The expression of different microRNAs and several genes associated with cell cycle regulation was established during amniotic fluid stem cell expansion in monolayer culture. Activity of β -galactosidase in late stage of cell culture was assessed as well.

Structure: introduction, literature review, equipment, materials, methods, results and discussion, conclusions and references.

Thesis consists of: 50 p. of text without appendixes, 23 figures, 6 tables, 75 bibliographic entries.

Keywords: amniotic fluid, stem cells, growth, differentiation, senescence

Vilniaus Gedimino technikos universiteto
egzaminų sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo
bei gynimo organizavimo tvarkos aprašo
2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Aistė Zentelytė, 20101843

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-14

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. gegužės 27 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių augimo, diferenciacijos ir senėjimo įvertinimas“ patvirtintas 2015 m. lapkričio 06 d. dekanų potvarkiu Nr. 391fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: prof. dr. Rūta Navakauskienė. Mano darbo vadovas prof. dr. Rūta Navakauskienė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (-usi).


(Parašas)

Aistė Zentelytė
(Vardas ir pavardė)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	8
IVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. KAMIENINĖS LĄSTELĖS	11
1.1.1. Savybės ir skirstymas	11
1.1.2. Embrioninės ir somatinės kamieninės ląstelės	12
1.1.3. Somatinių ląstelių perprogramavimas	14
1.2. VAISIAUS VANDENYS	15
1.2.1. Savybės ir sudėtis	15
1.2.2. Vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės.....	17
1.2.3. Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių epigenetinis reguliavimas	19
2. APARATŪRA, MEDŽIAGOS IR METODAI.....	22
2.1. APARATŪRA	22
2.2. MEDŽIAGOS	22
2.3. METODAI	23
2.3.1. Ląstelių iš žmogaus vaisiaus vandenų išskyrimas ir kultivavimas.....	23
2.3.2. Ląstelių iš vaisiaus vandenų diferenciacija ir kokybinis vertinimas	24
2.3.3. Ląstelių žymėjimas antikūnais paviršiaus žymenų raiškos tyrimui, tėkmės citometrijos duomenų analizė.....	25
2.3.4. RNR išskyrimas iš ląstelių vienasluoksnės kultūros ir komplementarios DNR (kDNR) sintezė.....	26
2.3.5. Realio laiko kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (RL-kPGR)	27
2.3.6. kDNR sintezė ir mikroRNR raiškos analizė naudojant RL-kPGR.....	29
2.3.7. Genominės DNR skyrimas.....	30
2.3.8. Visuminio DNR metilinio įvertinimas	30
2.3.9. β-galaktozidazės aktyvumo nustatymas	31
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	32
3.1. LĄSTELIŲ IŠ VAISIAUS VANDENŲ SKYRIMAS IR KULTIVAVIMAS	32
3.2. IŠSKIRTŲ LĄSTELIŲ CHARAKTERIZAVIMAS	33
3.3. LĄSTELIŲ DIFERENCIACIJA ĮVAIRIOMIS KRYPTIMIS	34
3.4. VISUMINIO METILINIMO POKYČIAI DIFERENCIACIJOS METU.....	37
3.5. MIKRONR RAIŠKOS POKYČIAI LĄSTELIŲ KULTIVAVIMO METU.....	37
3.6. LĄSTELIŲ SENĖJIMAS VIENASLUOKSNĖJE KULTŪROJE	39
IŠVADOS	42
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	43

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AF – amniotinis skystis (ang. k. *amniotic fluid*)

ALP – šarminė fosfatazė (ang. k. *alkaline phosphatase*)

ATM – serino/treonino kinazė, aktyvuojama esant DNR pažaidoms (ang. k. *Ataxia telangiectasia mutated*)

Bp – bazių pora

BSA – jaučio serumo albuminas (ang. k. *bovine serum albumin*)

CD – diferenciacijos antigenas (ang. k. *cluster of differentiation*)

CpG – 5'-citozinas-fosfatas-guaninas-3' (ang. k. *cytosine-phosphate-guanine*)

DEPC – dietilpirokarbonatas (ang. k. *diethylpyrocarbonate*)

DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle'o terpė (ang. k. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNMT – DNR metiltransferazė

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

EKL – embrioninės kamieninės ląstelės

ELISA – fermentinė imuninė reakcija (ang. k. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FBS – fetalinis veršelio serumas (ang. k. *fetal bovine serum*)

FITC – fluoresceino izotiocianatas

FSC – priekinis šviesos išbarstymas (angl. k. *forward scatter*)

GAPDH – gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazė (ang. k. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

HRP – krienų peroksidazė (ang. k. *horseradish peroxidase*)

IgG – imunoglobulinas G

iPSC – indukuotos daugiagalės kamieninės ląstelės (ang. k. *induced pluripotent stem cells*)

KLF4 – į Kruppel panašus veiksnys 4 (ang. k. *Kruppel-like Factor 4*)

KT – kambario temperatūra

MBD – metil grupę jungiantis baltymas (ang. k. *methyl-CpG-binding domain*)

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

OCT3/4 – oktamerus surišantis transkripcijos veiksnys 3/4 (ang. k. *octamer-binding transcription factor 3/4*)

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (ang. k. *phosphate-buffered saline*)

PE – fikoeritrinas (ang. k. *phycoerythrin*)

Rcf – santykinė išcentrinė jėga (ang. k. *relative centrifugal force*)

RISC – RNR aktyvuotas slopinimo kompleksas (ang. k. *RNA-induced silencing complex*)

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

PPAR- γ – peroksisomų proliferatorių aktyvuotas receptorius gama 2 (ang. k. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*)

PS – penicilinas, streptomicinas

REX1 – ZFP-42 cinko pirštų baltymas 42 (ang. k. *zinc finger protein 42*)

(i) RNR – (informacinė) ribonukleorūgštis

SOX2 – lytį nulemenčios srities Y-dėžutė 2 (ang. k. *sex determining region Y-box 2*)

SSC – šoninis šviesos išbarstymas (angl. k. *side scatter*)

TET – fermentas, katalizuojantis 5-metilcitozino virsmą į 5-hidroksimetilcitoziną (ang. k. *ten-eleven translocation*)

VV – vaisiaus vandenys

VVKL – vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės

IVADAS

Embrioninės kamieninės ląstelės sparčiai proliferuoja, geba diferencijuoti į bet kokias suaugusio organizmo ląsteles, bet formuoja teratomas *in vivo*, taip pat šių ląstelių gavimas kelia įvairias etines problemas. Suaugusio organizmo kamieninės ląstelės neformuoja teratomų ir nesusiduriama su etiniais apribojimais, tačiau jų organizme randama labai mažais kiekiais, o ląstelių diferenciacijos potencialas ribotas, tad sunku šias ląsteles pritaikyti terapijoje. Vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės lengvai prieinamos, jų gavimui beveik nėra etinių apribojimų, jos neformuoja teratomų *in vivo*, todėl tapo perspektyviu kamieninių ląstelių šaltiniu audinių inžinerijai ir ląstelių terapijai (Rennie ir kt., 2012). Galiausiai, VVKL yra kilusios iš paties vaisiaus, tad gali būti panaudotos kaip kamieninių ląstelių šaltinis autologinei priešgimdyvinei ir pogimdyvinei transplantacijai.

Norint pritaikyti vaisiaus vandenų kamienines ląsteles terapijoje, reikia išaiškinti ir nustatyti šių ląstelių augimo, diferenciacijos bei senėjimo procesų ypatumus bei molekulinį mechanizmų reguliatorius. Svarbu ištirti šių procesų pokyčius kultivuojant ir diferencijuojant VVKL vienasluoksnyje kultūroje. Epigenetinių reguliatorių funkcijų bei pokyčių nustatymas įvairių vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių gyvavimo procesų metu gali būti panaudotas ląstelių dauginimo ir diferenciacijos efektyvumui pagerinti. Taip pat, individualios mikroRNR gali tapti naujais kamieninių ląstelių būsenos žymenimis.

Magistro darbo tikslas – įvertinti augimo, diferenciacijos ir senėjimo procesus normalaus ir sutrikusio vaisiaus vystymosi nėštumo donorių vaisiaus vandenų kamieninėse ląstelėse. Tam tikslui pasiekti iškelti šie uždaviniai:

1. Išskirti kamienines ląsteles iš normalaus ir sutrikusio vaisiaus vystymosi nėščiųjų vaisiaus vandenų ir įvertinti jų augimo savybes.
2. Charakterizuoti kamienines ląsteles pagal ląstelių paviršiaus žymenų ir transkripcijos veiksmų raišką.
3. Kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti kamieninių ląstelių diferenciacijos įvairiomis kryptimis potencialą.
4. Įvertinti mikroRNR raiškos pokyčius kamieninių ląstelių augimo metu.
5. Charakterizuoti ląstelių senėjimo procesus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

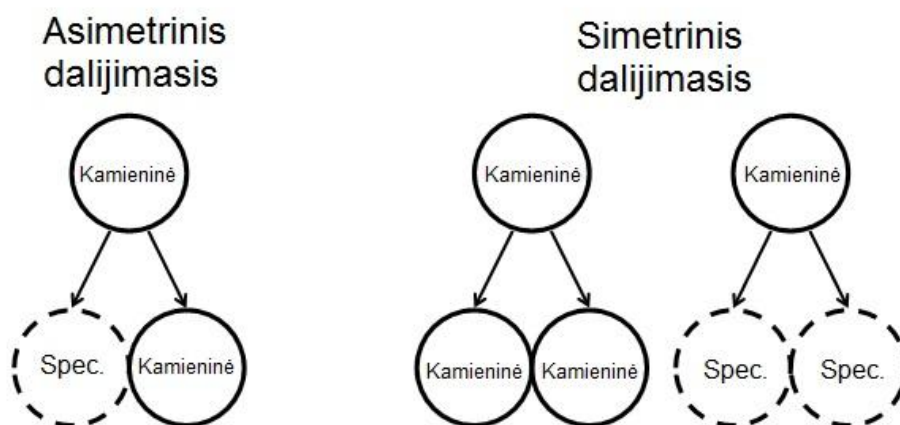
1.1.KAMIENINĖS LĄSTELĖS

1.1.1. Savybės ir skirstymas

Kamieninės ląstelės yra vis atsinaujinantis diferencijuotų ląstelių, būtinų žmogaus bei gyvūnų audinių ir organų išsivystymui, šaltinis. Pastaruoju metu šios ląstelės susilaukia vis daugiau dėmesio, jų pagrindu kuriamos terapijos, kurios siekia pakeisti dėl įvairių ligų ar traumų savo funkciją praradusias ar pažeistas organizmo ląsteles. Pagrindinės šių ląstelių savybės yra gebėjimas pasidalyti daug kartų išlaikant nepakitusias ląstelių savybes ir gebėjimas diferencijuoti į specifines subrendusias ląsteles bei taip atstatyti audinių ar organų pažeidimus.

Kamieninės ląstelės gali dalintis simetriškai į dvi panašias dukterines ląsteles arba asimetriškai – į kamieninę ir ląstelę, gebančią diferencijuoti. Audinių išsivystymui ir pažeidimų atsatymui svarbu palaikyti pusiausvyrą tarp ląstelių simetrinio ir asimetrinio dalijimosi (1 pav.).

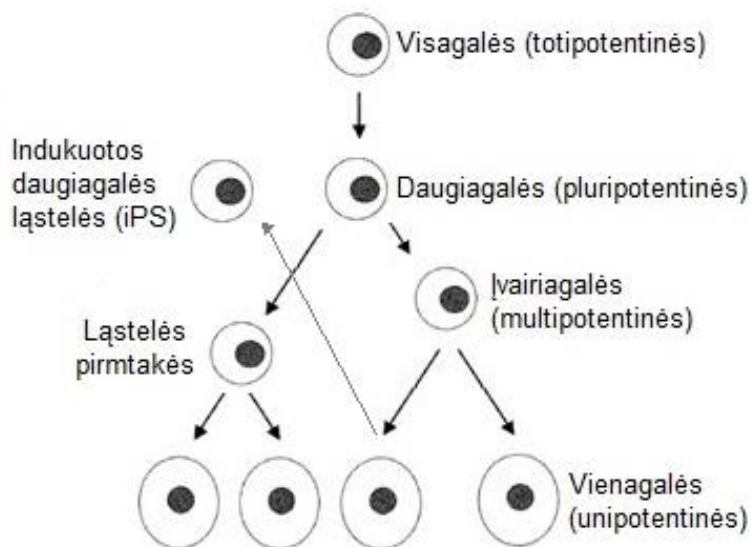
Asimetrinio dalijimosi modelio esmė: optimalaus kamieninių ląstelių kiekio kontrolė organizme palaikoma ląsteliniame lygyje, kuomet kiekviena kamieninė ląstelė pasidalija į tokia pačią kamieninę ląstelę ir į labiau specializuotą pirmtakinę (ang. k. *progenitor*) ląstelę. Simetrinio dalijimosi modelis palaiko kamieninių ląstelių homeostazę populiacijos lygmeniu. Ląstelė gali dalintis dviem kryptimis: proliferacinis dalijimasis, kuomet pasidalijama į dvi kamienines ląsteles, ir specializuotas dalijimasis, kuomet pasidalijama į dvi diferencijuotas ląsteles. Manoma, kad įvairūs signalai, gaunami iš supančio audinio bei sklindantys tarp pačių kamieninių ląstelių lemia apsisprendimą, koku būdu, proliferaciniu ar specializuotu, dalinsis ląstelė (Shahriyari ir Komarova, 2013).



1 pav. Kamieninių ląstelių dalijimosi būdai (Shahriyari ir Komarova, 2013)

Geriausiai žinomos dvi kamieninių ląstelių grupės – tai embrioninės ir somatinės kamieninės ląstelės, neseniai susiformavo dar viena šių ląstelių grupė – indukuotos daugiagalės

kamieninės ląstelės (Şimşek ir Şimşek, 2012; Takahashi ir Yamanaka, 2006). Kamieninės ląstelės taip pat klasifikuojamos pagal jų vystymosi ir diferenciacijos potencialą (2 pav.).



2 pav. Kamieninių ląstelių hierarchija (*Tissue Engineering With Mesenchymal Stem Cells*)

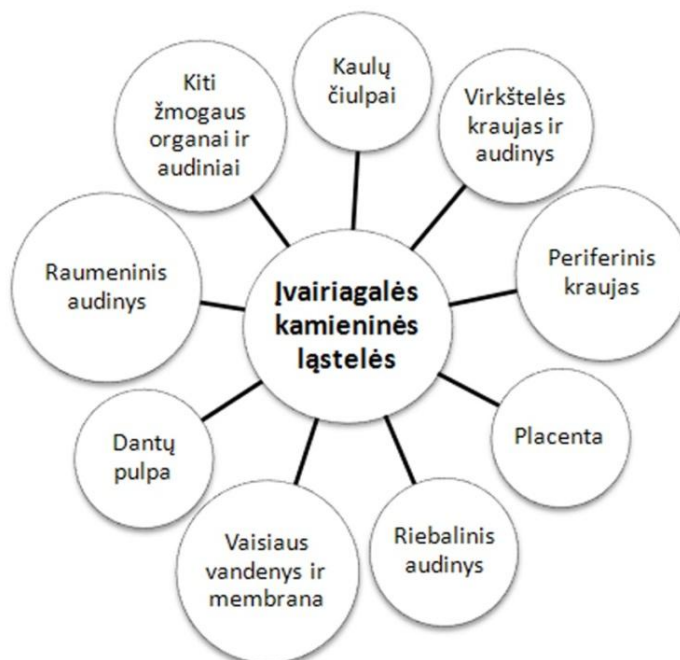
- visagalės arba totipotentinės – tai zigotos ląstelės, kurios gali diferencijuoti į embrionines ir ekstraembrionines (trofoblasto) ląsteles;
- daugiagalės arba pluripotentinės – embrioninės ląstelės, kurios diferencijuoja į ektodermos ląsteles (manoma, kad toliau vystosi oda ir nervinis audinys), mezodermos ląsteles (manoma, kad toliau vystosi kraujo ląstelės, raumuo, kaulai, kremzlės ir riebalinis audinys) ir endodermos ląstelės (manoma, kad toliau vystosi kvėpavimo ir virškinimo traktai);
- įvairiagalės arba multipotentinės – ląstelės, kurios gali diferencijuoti į tam tikro pogrupio (ektodermos, mezodermos ar endodermos) audinių ląsteles;
- keliagalės arba oligopotentinės – ląstelės, kurios gali diferencijuoti į labiau apribotą ląstelių pogrupį nei įvairiagalės ląstelės;
- viengalės arba unipotentinės – ląstelės galinčias diferencijuoti tik į vieno tipo ląsteles ir padedančios atstatyti audinio pažeidimus (Wagers ir Weissman, 2004).

1.1.2. Embrioninės ir somatinės kamieninės ląstelės

Žmogaus embrioninės kamieninės ląstelės – tai ląstelės, išskirtos iš vidinės blastocistos masės arba vienos ląstelės biopsijos būdu paimtos blastomeros iš *in vitro* apvaisintų embrionų (Damdimopoulou ir kt., 2016). Tinkamomis sąlygomis gali neribotai daugintis kultūroje *in vitro*, išlaiko stabilų kariotipą, pasižymi specifinių paviršiaus žymenų raiška, geba diferencijuoti į visų trijų gemalinių lapelių ląsteles, telomerezė ląstelėse aktyvi, tačiau formuoja teramotmas *in vivo*,

o šių ląstelių gavimas kelia įvairių etinių problemų. Embrioninės kamieninės ląstelės auginamos ant įvairių žmogaus ląstelių „maitintojų“ (vaisiaus fibroblastai, suaugusio žmogaus odos fibroblastai, placentos fibroblastai, suaugusio kaulų čiulpų ląstelės ir kt. (Miyamoto ir kt., 2004)) sluoksnio ar specializuotu substratu (pvz., rekombinantinis žmogaus lamininas-521) padengto paviršiaus, nes be šių komponentų ląstelės imtų spontaniškai diferencijuoti (Findikli ir kt., 2004; ir kt., 2003).

Suaugusio žmogaus kamieninės ląstelės arba somatinės kamieninės ląstelės – tai nediferencijuotos ląstelės randamos audiniuose ir organuose tarp jau diferencjavusių ląstelių. Pirminė šių ląstelių funkcija organizme yra audinio ar organo, kuriame jos randamos, palaikymas ir pažeidų atstatymas. Įvairių tyrimų metu somatinės įvairialės kamieninės ląstelės aptiktos daugybėje audinių (3 pav): riebaliniame audinyje, kaulų čiulpuose, periferiniame kraujyje ir kt. (Van, 2011).



3 pav. Įvairialėlių kamieninių ląstelių šaltiniai (Van, 2011; Ratajczak ir kt., 2012)

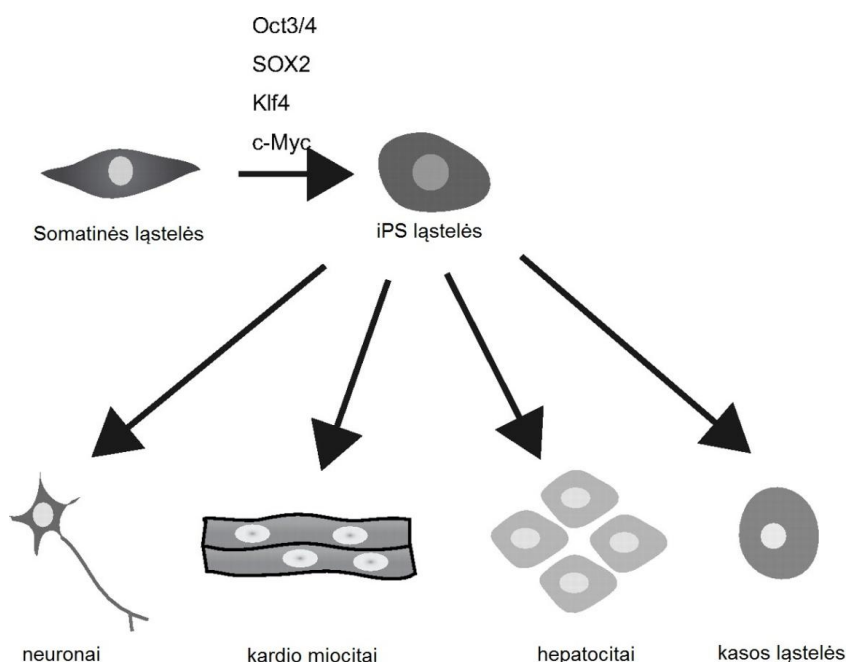
Somatinės įvairialės kamieninės ląstelės nėra tumorogeniškos, jomis reikia sąlyginai mažai manipuliuoti prieš panaudojant transplantacijose, yra autologinės, tad išvengiama atmetimo ar transplantato prieš šeimininką ligos tikimybė. Iš kaulų čiulpų išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės yra labiausiai ištirtos iš visų MKL rūšių, tačiau dėl labai invaziškos jų skyrimo metodikos pastaruoju metu daugiau dėmesio skirima MKL išskirtoms iš kitų šaltinių. Virkštelės audinys bei jos kraujas, vaisiaus vandenys, riebalinis audinys – tam tikrų procedūrų šalutiniai produktai, ilgai laikyti tiesiog biologinėmis atliekomis, tad jų panaudojimas kamieninių ląstelių tyrimams nesukelia jokių etinių problemų (New ir kt., 2015).

1.1.3. Somatinių ląstelių perprogramavimas

2006 metais Shinya Yamanaka ir Kazutoshi Takahashi (Takahashi ir Yamanaka, 2006) paskelbė tyrimų, kurių metu įrodyta, jog naudojant transkripcijos faktorius galima perprogramuoti somatinės ląstelės iki daugiagalių kamieninių ląstelių, rezultatus ir 2012 metais buvo apdovanoti Nobelio premija medicinos srityje kartu su Seru Johnu Gurdonu, kuris užsiiminėjo ląstelių perprogramavimu taikant branduolių perkėlimo metodiką.

Yamanaka darbuose naudoti pelių somatiniai fibroblastai buvo genetiškai perprogramuoti naudojant virusinę transfekciją, kuomet į ląsteles perneštos keturių transkripcijos faktorių genų sekos (OCT3/4, SOX2, KLF4 bei cMYC), atsakingos už daugiagališkumo palaikymą embrioninėse kamieninėse ląstelėse (4 pav.) (Takahashi ir Yamanaka, 2006). Ląstelės palaipsniui įgavo EKL morfologiją, pasižymėjo daugiagalėms kamieninėms ląstelėms būdingų žymenų raiška, gebėjo diferencijuoti visų trijų gemalinių lapelių kryptimis.

Nors odos fibroblastai ląstelių perprogramavimui naudojami dažniausiai (lengviausiai išgaunami, užtenka paprastos biopsijos), iPS ląsteles galima išgauti naudojant įvairias pradines organizmo ląsteles. iPS ląstelėms gauti naudojamos skirtingos metodikos, kurių tikslas yra daug kartų padidinti atrinktų transkripcijos faktorių raišką ir pagerinti indukuotų somatinių ląstelių virsmo į daugiagales kamienines ląsteles efektyvumą (Yoshida ir Yamanaka, 2010).



4 pav. Indukuotų daugiagalių kamieninių ląstelių gavimas (Yoshida ir Yamanaka, 2010)

2009 metais Li ir kolegos (Li ir kt., 2009) pirmieji perprogramavimui pasitelkė žmogaus vaisiaus vandenų ląsteles. Jau po šešių dienų gautos pirmosios iPSC kolonijos (iPSC iš žmogaus fibroblastų aptinkamos tik po kelių savaičių), kurios pasižymėjo visais daugiagalėms kamieninėms ląstelėms būdingais žymenimis. Tyrėjai įvertino, kad ląstelių perprogramavimo

efektyvumas siekia net 1,525 % (fibroblastų tik 0,01–0,1 %). Efektyvesnę ląstelių, išskirtų iš žmogaus vaisiaus vandenų, indukciją patvirtina ir vėlesni kitų mokslinių grupių publikuoti darbai (Karakikes ir kt., 2010; Jiang ir kt., 2014). 2012 metais Moschidou ir kolegės (Moschidou ir kt., 2012) parodė, kad VVKL, išskirtas iš pirmojo nėštumo trimestro vaisiaus vandenų, galima perprogramuoti nenaudojant virusinio vektoriaus, taip pašalinama ląstelių mutagenezės rizika. Mokslininkai tyrimams pasitelkė valproinę rūgštį (FDA (Amerikos maisto ir vaistų kontrolės tarnyba) patvirtintą preparatą epilepsijai gydyti), gautos ląstelės pasižymėjo visomis EKL būdingomis charakteristikomis. Manoma, kad šių ląstelių perprogramavimas toks greitas ir efektyvus dėl nenusistovėjusio epigenetinio profilio, kuris gali būti artimesnis EKL.

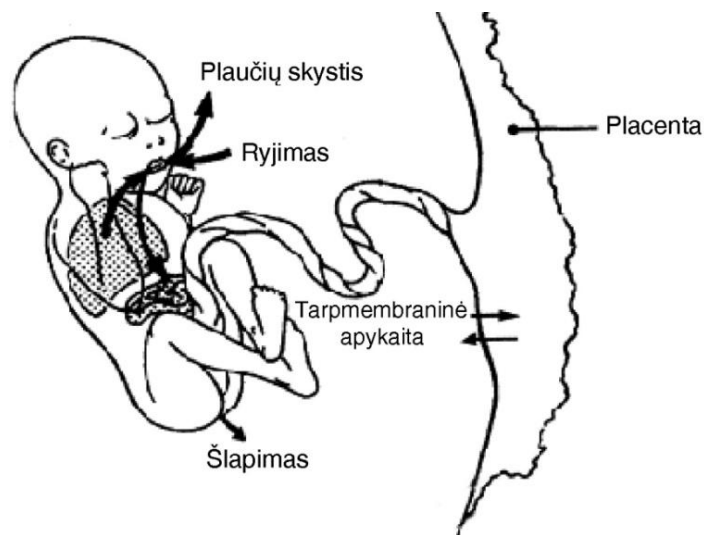
1.2. VAISIAUS VANDENYS

1.2.1. Savybės ir sudėtis

Amniotinis skystis arba vaisiaus vandenys yra labai svarbi aplinka vaisiaus vystymuisi. Amniotinis skystis supa embrioną ar vaisių, saugo jį nuo išorinių veiksnių, traumų, infekcijų ir toksinių agentų (Calvin ir Oyen, 2007), taip pat tai yra įvairių medžiagų transportinė erdvė tarp motinos ir vaisiaus. Vaisiaus vandenys yra neutralaus pH ($\text{pH} = 7,2$) skaidrus bei šviesiai gelsvas skystis, kurio pagrindiniai komponentai – tai vandens, elektrolitai, cheminiai junginiai (lipidai, baltymai bei peptidai, hormonai, piruvatai, laktatai), suspenduotos medžiagos (vernixas, vaisiaus plaukai, ekskrementai) bei ląstelės (Cananzi ir kt., 2009). Ląstelių populiacija vaisiaus vandenyse yra heterogeninė, vyrauja įvairios morfologijos ląstelės, pasižyminčios skirtingomis *in vitro* savybėmis ir *in vivo* potencialu. Ląstelių kiekis vaisiaus vandenyse priklauso nuo nėštumo laiko, jis tolygiai didėja, tačiau įvairių patologijų atveju ląstelių kiekis gali skirtis.

Vaisiaus vandenys pradeda formuotis praėjus 12 d. po apvaisinimo iš motinos kraujo plazmos atėjusio vandens, vėliau vaisiaus sekretuojamas šlapimas keičia amniotinio skysčio tūrį ir sudėtį (Delo ir kt., 2006). Embriogenezės metu vaisiaus vandenų tūris didėja greičiau nei vystosi pats embrionas. Vaisiaus vystymosi pradžioje vandenų tūris ir vaisiaus dydis gali būti susietas linijine priklausomybe (vaisiaus vandenų tūris 10 savaitę yra maždaug 20 ml, o 22 savaitę – apie 600 ml). Embriogenezės laikotarpiu amniotinio skysčio sudėtis yra panaši į vaisiaus kraujo plazmos sudėtį. Apie 8 nėštumo savaitę išsivysto šlaplė bei inkstai, pradedamas gaminti šlapimas. Netrukus po to vaisius pradeda ryti amniotinį skystį, tačiau nei vaisiaus šlapinimasis, nei vandenų ryjimas nedaro didelės įtakos vaisiaus vandenų sudėčiai ar tūriui, šie procesai tampa svarbūs tik antroje nėštumo eigos pusėje. 28 nėštumo savaitę vaisiaus vandenų tūris pasiekia maždaug 800 ml ir lieka pastovus iki 39 savaitės, tuomet tūris pradeda mažėti ir 41 savaitę tūris siekia ~400 ml. Vaisiaus vandenų sudėtis keičiasi viso nėštumo laikotarpiu (Underwood ir kt., 2005; Beall ir kt., 2007).

Amniotinis skystis atlieka daugybę funkcijų, kurios gali būti skirstomos į kelias pagrindines grupes, tai fizinės (apsaugo vaisių nuo išorinių traumų, padidina placentos paviršiaus plotą, reguliuoja temperatūrą ir slėgį), funkcinės (leidžia vaisiui laisvai judėti, padeda vystytis skeleto raumenų sistemai, vaisiui kvėpuojant užkertamas kelias plaučių hipoplazijos išsivystymui, vandenų ryjimas padeda vystytis virškinimo ir kvėpavimo sistemoms) (5 pav.) ir homeostazės palaikymo (išlaiko vaisiaus integralumą, neskatina sąrėmių, padeda palaikyti gimdos formą). Vaisiaus vandenyse palaikomas vaisiaus metabolizmas, vyksta mainai tarp placentos ir gemalo, užtikrinamas virkštelės mobilumas, neleidžiama jos užspausti ir sutrikdyti medžiagų apykaitos (Harman, 2008). Vaisiaus vandenys taip pat atlieka apsauginę funkciją ir yra įgimto imuniteto dalis (fizinis barjeras, antimikrobiniai peptidai, vandenyse randami neutrofilai ir makrofagai atsakingi už fagocitozę bei priešūždegiminių mediatorių sekretavimą) (Underwood ir kt., 2005).



5 pav. Skysčių apykaita tarp vaisiaus vandenų ir gemalo (Beall ir kt., 2007)

Amniocentezė – vaisiaus vandenų paėmimas medicininiams tyrimams, taikomas kasdienėje praktikoje maždaug nuo 1970-ųjų. Ši procedūra dažniausiai atliekama padidėjusios rizikos nėštumų atvejais, pavyzdžiui, motinos amžius rizika, giminėje pasitaikančių genetinių sutrikimų, buvusių persileidimų atvejais, taip pat ankstyvo nėštumo serumo kontrolei. Dažniausiai tyrimams vaisiaus vandenys imami 15–20 nėštumo savaitę. Vaisiaus vandenyse apstu genetinės medžiagos ir baltymų, kuriuos gamina ar talpina vaisiaus epitelio ląstelės, gemalo audiniai bei išskyros, todėl amniotinį skystį galima naudoti įvairių ligų bei sutrikimų ankstyvai diagnozei. Nustatomi amniotinio skysčio baltymai – tai įvairūs citokinai, chemokinai, matrikso metaloproteinazės, antigenams specifiški antikūnai, galimai dalyvaujantys ligų patogenezės mechanizmuose (Geer ir kt., 2015).

1.2.2. Vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės

2003 metais trys nepriklausomos tyrėjų grupės publikavo darbus, kuriuose aprašomos kamieninės ląstelės išskirtos iš antro nėštumo trimestro vaisiaus vandenų. Prusa ir kolegos patvirtino nedidelės kamieninių ląstelių subpopuliacijos (0,5–1,5 %), turinčios daugiagalėms kamieninėms ląstelėms būdingų žymenų, egzistavimą vaisiaus vandenyse, šios ląstelės pasižymėjo Oct-4 transkripcijos veiksnio raiška tiek transkriptomo, tiek baltyminiu lygmeniu (Prusa ir kt., 2003). Oct-4 transkripcijos veiksnys palaiko ląstelių daugiagališkumą ir savęs atsinaujinimo programą EKL, indukuotose daugiagalėse ląstelėse ir karcinomos ląstelėse. In `t Anker ir kolegos, įvertinę įvairių paviršiaus žymenų raišką bei gebėjimą diferencijuoti adipogenine ir osteogenine kryptimis, apibūdino šias ląsteles kaip mezenchimines kamienines ląsteles (in `t Anker ir kt., 2003). Kaviani ir kolegos remdamiesi ankstesniais tyrimais avių modeliuose išskyrė ląsteles iš žmogaus vaisiaus vandenų ir atrinko dominančias subpopuliacijas, kurias taip pat jas įvardijo kaip mezenchimines. Šios ląstelių subpopuliacijos pasižymėjo MKL būdingais paviršiaus žymenimis, taip pat nustatyta, jog šios ląstelės proliferuoja daug greičiau nei ląstelės, išskirtos iš suaugusio žmogaus audinių (Kaviani ir kt., 2003).

Vaisiaus vandenyse randamos įvairaus diferenciacijos lygio ir nediferencijuotos ląstelės kilusios, kaip manoma, iš vaisiaus (ląstelėse, išskirtose iš vaisiaus vandenų, kuomet motina laukėsi berniuko, visuomet identifikuojama Y chromosoma (De Coppi ir kt., 2007)) ir jį supančios amniotinės membranos, šios heterogeninės ląstelių populiacijos sudėtis priklauso nuo nėštumo laiko (Fauza, 2004; Bossolasco ir kt., 2006; Rosner ir kt., 2012). Antrojo nėštumo trimestro vaisiaus vandenyse ląstelių kiekis svyruoja tarp 10–1000 ląstelių/ μ l, tačiau ląstelių kiekis gali varijuoti labiau, kuomet tam tikri vaisiaus vystymosi sutrikimai paveikia ląstelių skaičių vaisiaus vandenyse (Prusa ir Hengstschlger, 2002).

Lyginant amniotinio skysčio kamieninių ląstelių morfologiją ir augimo charakteristikas galima išskirti tris ląstelių tipus: epitelio (E tipo), amniotinio skysčio (AF tipo) ir fibroblastoidines (F tipo). AF ir E tipo ląstelės vaisiaus vandenyse randamos nuo pat pradžios, o F tipo ląstelės atsiranda vėliau (Kim ir kt., 2007). Manoma, kad E tipo ląstelės yra kilusios iš vaisiaus odos ir šlapimo, AF tipo ląstelės – iš vaisiaus membranos ir placentos trofoblastų, o F tipo ląstelės – iš jungiamojo pluoštinio ir mezenchiminių audinių bei odos fibroblastų (Bossolasco ir kt., 2006). Įvairios mokslininkų grupės teigia, kad vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės pasižymi daugiagališkumo potencialu panašiu EKL ar iPSC (Parolini et al., 2009). Pagal visus kamieninių ląstelių charakterizavimo kriterijus VVKL priskiriamos įvairiagalėms kamieninėms ląstelėms su daugiagališkumo žymenimis (1 lentelė) (Moschidou ir kt., 2012; Moschidou ir kt., 2013).

1 lentelė. Pagrindinės kamieninių ląstelių charakteristikos (Joo ir kt., 2012; Rennie ir kt., 2012; Fekete ir kt., 2012; Ilic ir kt., 2015)

	EKL	iPSC	VVKL	MKL
Šaltinis	Ankstyvos stadijos embrionai	Somatinės ląstelės	Vaisiaus vandenys	Suaugusio žmogaus audiniai
<i>In vitro</i> kultūros trukmė, populiacijos padvigubėjimai	300+	300+	250+	10-15
Ląstelių plastiškumas	Daugiagalės	Daugiagalės	Daugiagalės	Ivairiagalės
Formuoja teratomas <i>in vivo</i>	Taip	Taip	Ne	Ne
Etinės problemos	Taip	Ne	Ne	Ne
Klinikiniai tyrimai	Taip	Taip/Ne	Ne	Taip

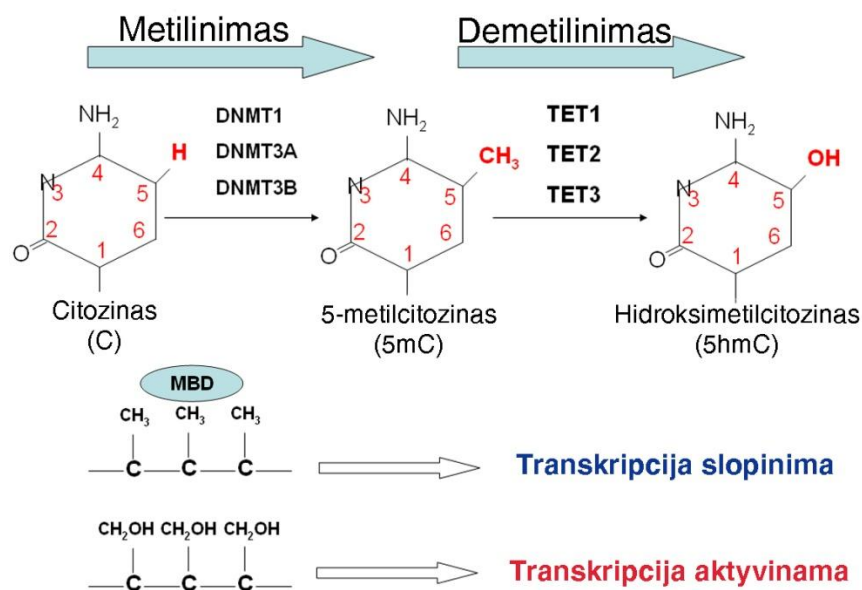
VVKL ilgą laiką auginamos monosluoksnyje kultūroje išlaiko stabilų kariotipą bei telomerazės aktyvumą, ląstelės neformuoja teratomų *in vivo* ir išlieka atsparios piktybinėms mutacijoms. Ištirta, kad žmogaus VVKL pasižymi MKL būdingų paviršiaus žymenų (CD29, CD44, CD49e, CD58, CD73, CD90, CD105, CD133, CD166) raiška ir nepasižymi hematopoetinėms kamieninėms ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų (CD11b, CD14, CD34, CD45, CD79) raiška (Li ir kt., 2014). VVKL taip pat pasižymi EKL būdingais daugiagališkumo žymenimis, tai transkripcijos faktorių OCT4, SOX2, Nanog ir REX1 raiška, stadijai specifinio embrioninio antigeno 4 (SSEA4) raiška (Roubelakis ir kt., 2012). Tyrimų metu nustatyta, jog OCT4, Nanog ir SOX2 raiška pasižymi didesnis ląstelių kiekis mėginiuose, paimtuose 15-17 nėštumo savaitėmis palyginus su vėlesnio nėštumo mėginių ląstelėmis (Dziodosz ir kt., 2016). De Coppi ir kolegos 2007 metais aptiko nedidelę VVKL subpopuliaciją, pasižyminčią CD117 (specifinė kamieninėms ląstelėms tirozino kinazė, būdinga EKL, pirmapradėms gemalo ląstelėms) raiška, šios subpopuliacijos ląstelės padaugintos klonavimo būdu, indukuotos diferencijuoti bei perkeltos į ligos/pažeidimo *in vivo* modelį sėkmingai inkorporavosi į audinius (De Coppi ir kt., 2007). Šie tyrimai patvirtino, jog VVKL gali būti pritaikytos audinių inžinerijos bei ląstelių terapijos tikslais.

Ivairių mokslininkų tyrimų metu parodyta, jog tinkamai indukuotos *in vitro* VVKL geba diferencijuoti visų trijų gemalinių lapelių audinių ir organų kryptimis: endoderma – tai kepenų ląstelės (hepatocitai), insuliną sekretuojančios ląstelės (Carnevale ir kt., 2013), ektoderma – tai nervinės ląstelės (neuronai), mezoderma – tai raumeninio audinio ląstelės (miocitai), širdies raumens ląstelės (kardiomiocitai), kraujagyslių endotelio ląstelės, inkstų ląstelės, kaulinio audinio ląstelės (osteocitai), riebalinio audinio ląstelės (adipocitai), kremzlinio audinio ląstelės (chondrocitai) (Joo ir kt., 2012; Bossolasco ir kt., 2006; De Coppi ir kt., 2007; Noronha ir kt., 2011). Diferenciacija visų trijų gemalinių lapelių kryptimis yra viena pagrindinių daugiagalių kamieninių ląstelių savybių.

1.2.3. Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių epigenetinis reguliavimas

Kamieninės ląstelės savęs atsinaujinimo bei proliferacijos metu geba išlaikyti savo populiaciją nediferencijuotoje būsenoje, o gavus reikiamus signalus diferencijuoti atitinkama kryptimi dėl specifinių genų raiškos aktyvinimo ar slopinimo. Šiem genų raiškos reguliacijos procesams labai svarbūs epigenetiniai mechanizmai, kurių veikimo profilius ląstelės dalinimosi metu perduoda dukterinėms ląstelėms. Epigenetiniai regulatoriai kontroliuoja ląstelių genų raišką tiek prieš, tiek po transkripcijos nepakeisdami DNR sekos. Tiesioginis DNR metilinimas, mikroRNR valdoma potranskripcinė kontrolė – vienos pagrindinių epigenetinių reguliatorių grupių.

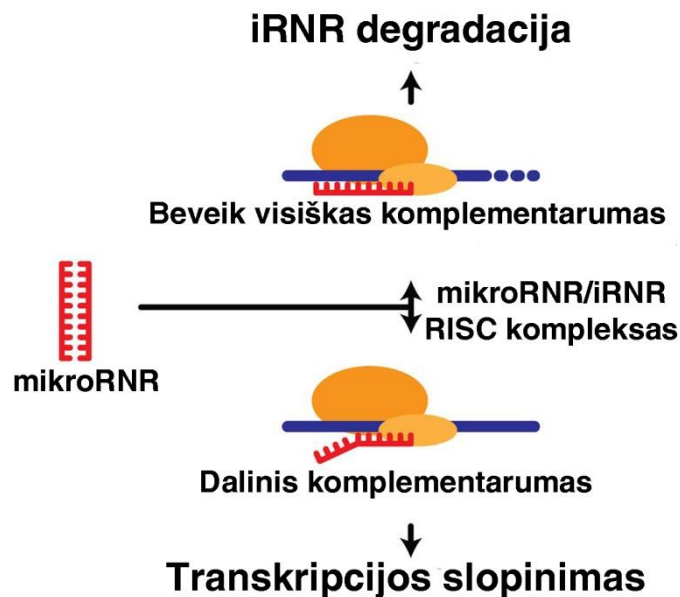
Žinduolių DNR gali būti kovalentiškai modifikuota metilinant citozino 5 padėtyje esančią anglį. DNR dažniausiai metilinama simetriškai išsidėsčiusiuose CpG dinukleotiduose (Wu ir Sun, 2006), susidarant 5-metilcitozinui (5mC). Žinduolių ląstelėse aptinkamos trys DNR metiltransferazės, katalizuojančios citozino metilinimą, tai DNMT1, DNMT3a ir DNMT3b. Šios metiltransferazės turi skirtingus aktyvavimo mechanizmus ir specifinius substratus (Wutz 2013). DNMT1 išlaiko jau metilintas CpG sritis vykstant DNR replikacijai, o DNMT3a ir DNMT3b reikalingos CpG sričių metilinimui *de novo*, vykstant embriogenezei arba ląstelių diferenciacijai. Dalyvaujant TET grupės baltymams, 5mC oksiduojamas iki 5'-hidroksimetilcitozino (5hmC) (6 pav.), šis metil- grupės virsmas hidroksimetil- grupe yra itin svarbus procesas DNR metilinimo lygio ir genų raiškos palaikymui, kadangi 5mC turintys genų promotoriai yra slopinami, o 5hmC grupė siejama su genų raiškos aktyvacija. Metilintuose promotoriuose prie 5mC metil- grupių jungiasi MBD baltymai, kurie inicijuoja transkripcijos represorinių kompleksų jungimąsi prie DNR sekos ir taip slopinama transkripcija (Zhou ir kt., 2011).



6 pav. Genominės DNR metilinimo ir demetilinimo schema (Leung ir kt., 2013)

Tam tikrose genomo vietose koncentruotai telkiasi CpG dinukleotidai, tokios vietos vadinamos CpG salomis. Jei tokios salos pasitaiko aktyviai transkribuojamų genų promotoriuose, tai jos bus nemetilintos, o „tyliųjų“ genų promotorinėse sekose šios salos bus metilintos. Nediferencijuotose EKL genų, susijusių su ląstelių daugiagališkumu (OCT4, Nanog), promotoriai yra nemetilinti, ir tampa metilinti, kuomet ląstelės specializuojasi, diferencijuojasi (Altun ir kt., 2008). EKL ir diferencijuotos ląstelės pasižymi panašiu visuminiu 5mC lygiu CpG srityse, tačiau tik EKL gausu 5mC ne CpG srityse, kurių funkcijos bei ryšys su euchromatinu kol kas neištirtas. Nustatyta, kad pelių EKL, su inaktyvuotais DNMT1/3a/3b genais, 5mC lygis itin sumažėjęs, tai neturėjo įtakos ląstelių proliferacijai, tačiau neigiamai paveikė ląstelių gebėjimą diferencijuoti (Kobayashi ir Kikyo, 2015). Kultivuojant žmogaus EKL ilgą laiką *in vitro* vienasluoksniėje kultūroje pastebimas genetinių pažeidimų ir epigenetinio nestabilumo atsiradimas su vėžiu susijusiuose genuose. Tos pačios ląstelių linijos EKL, praėjusios skirtingą pasažų kiekį, skiriasi tarpusavyje. Tyrimų metu klonavimo būdu pasažuojant VVKL nepastebėti jokie reikšmingi pokyčiai metilinimo profiliuose (Peng ir kt., 2012).

MikroRNR (miR) – tai evoliuciškai konservatyvios trumpos (20–23 nukleotidų ilgio) nekoduojančios RNR sekos, kurios dalyvauja genų raiškos reguliavime slopindamos iRNR translaciją ar inicijuodamos iRNR degradaciją. Šiuo metu žinoma apie 1600 skirtingų miR sekų, sekretuojamų žmogaus ląstelėse. Spėjama, kad apie 60 % žinduoliuose koduojančių genų turi miR prisijungimui reikiamas sekas. Kiekviena mikroRNR geba jungtis su keliais šimtais komplementarių iRNR sekų, tai parodo, jog šios molekulės reguliuoja genų raiškos šablonus, o ne atskirus genus. Nukleotidai, esantys 2–8 5' sekos galo pozicijose yra be galo svarbūs taikininės iRNR sekos atpažinime ir hibridizacijoje. Reguliacijos mechanizmai priklauso nuo miR ir iRNR komplementarumo lygio, kuomet šios sekos beveik visiškai komplementarios, inicijuojama iRNR degradacija per RISC endonukleazinį aktyvumą, o kai sekos tik dalinai komplementarios, vykdomas translacijos slopinimas per RISC kompleksą (7 pav.). Žinoma, kad miR dalyvauja EKL daugiagališkumo palaikymo, savęs atsinaujinimo ir diferenciacijos procesuose, taip pat ląstelių ciklo ir apoptozės reguliavime. Tyrimų metu nustatyta, jog daugiagalėms ląstelėms būdingi transkripcijos faktoriai (OCT4, SOX2, Nanog) jungiasi prie įvairių miR promotorių ir skatina jų raišką. MikroRNR raiškos sutrikimai siejami su vėžio ir neurodegeneracinių ligų išsivystimu (Mathieu ir Ruohola-Baker, 2013; Heinrich ir Dimmeler, 2012).



7 pav. mikroRNR veikimo principinė schema (Ryan ir kt., 2015)

Skirtingų šaltinių MKL pasižymi skirtingų mikroRNR raiška (Lazarini ir kt., 2014). Net to pačio šaltinio kamieninėse ląstelėse nustatomi mikroRNR raiškos skirtumai. Trohatou ir kolegos 2014 metais (Trohatou ir kt., 2014) išskyrė dvi morfologiškai skirtingas VVKL subpopuliacijas – verpstės formos ir apvalios formos ląsteles. Nors šių subpopuliacijų ląstelių paviešiaus žymenų raiška beveik nesiskyrė, pastebėti skirtumai ląstelių proliferacijoje, daugiagališkumo palaikyme, diferenciacijoje bei baltymų raiškoje. Ištirti 32 mikroRNR raiškos skirtumai tarp verpstės ir apvalios formos VVKL.

Su kamieninių ląstelių proliferacija ir diferenciacija siejama miR-21. Ištirta, kad ši mikroRNR reguliuoja transkripcijos faktoriaus SOX2 raišką. Pastebėta, kad po miR-21 indukcijos itin sumažėjo SOX2 raiška, tai paveikė ląstelių klonogeniškumą ir proliferaciją. Atvirkščias efektas pastebėtas slopinant miR-21 raišką, tuomet pagerėjo ląstelių proliferacinės galimybės. Be to, pastebėta, kad indukavus miR-21, pagerėja ląstelių diferenciacija osteogenine kryptimi, tačiau tai neigiamai paveikia adipogeninę ir chondrogeninę diferenciaciją (Ribocco-Lutkiewicz ir kt., 2016).

Su ląstelės ciklo, apoptozės ir ląstelių senėjimo procesais susijusi miR-34a geriausiai žinomas kaip navikinių auglių supresorius, neseniai ištirta, kad ji dalyvauja ir kamieninių ląstelių diferenciacijos valdyme. Jau žinoma, kad stipriai padidėjus miR-34a raiškai inicijuojama ląstelių apoptozė, taip pat tokios ląstelės greičiau sensta, pastebėtas padidėjęs β -galaktozidazinių aktyvumą turinčių ląstelių kiekis (Zhang ir kt., 2015).

Supratus epigenetinius reguliatorių veikimo mechanizmus, jų taikinius ir funkcijas kamieninių ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos valdyme, šią informaciją būtų galima pasitelkti manipuliuojant šiomis ląstelėmis ir taip sukurti puikius preparatus ląstelių terapijai ar audinių inžinerijai.

2. APARATŪRA, MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. APARATŪRA

Laminarinio oro srauto boksas, UV šviesos sterilus boksas, autoklavas, ledo mašina, svarstyklės, automatinės pipetės, sterilūs ir švarūs antgaliai, CO₂ inkubatorius, oro termostatas, šaldytuvai, šaldiklis (-20 °C ir -80 °C), šildymo vonelė, šviesinis mikroskopas, Neubauer hemocitometras, centrifuga, šaldomoji centrifuga, sterilūs mėgintuvėliai, mėgintuvėliai be ribonukleazų, auginimo flakonai, 96 šulinėlių apvaliadugnės plokštelės, 4 šulinėlių plokštelės, šaldomi stoveliai, tėkmės citometras, kompiuteris, traukos spinta, nanofotometras, termocikleris, kaitinimo blokas, spektrofotometras, purtyklė.

2.2. MEDŽIAGOS

2 lentelė. Naudotos medžiagos ir jų gamintojai

REAGENTAS	GAMINTOJAS
TRIzol®	Ambion
Alizarin Red S	Carl Roth
AmnioMAX™ C-100 Basal Medium	Gibco
AmnioMAX™ C-100 Supplement	
Arkliai serumas	
DMEM	
DMEM/F12	
FBS	
Gentamicinas (10 mg/ml)	
N-2 Supplement	
Penicilinas (100 U/ml)/Streptomicinas (100 µg/ml)	
PBS	
StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit	
StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit	
Tripsinas/EDTA	
Tripano mėlis	Pharmacia
BSA	Sigma-Aldrich
Chloroformas	
Izopropanolis	
Kristalo violetas	
L-glutaminas	
Oil Red	
Paraformaldehidas	
Retinoinė rūgštis	
Senescence Cells Histochemical Staining Kit	Vilniaus degtinė
Etanolis, 96 %	

2 lentelės tęsinys	
DEPC paveiktas vanduo	Thermo Fisher Scientific
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	
Maxima SYBR® Green qPCR Master Mix	
TaqMan® MicroRNA Assay	
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG	
Vanduo be nukleazių	Zymo Research
5-mC DNA Elisa Kit	
Genomic DNA™-Tissue MiniPrep	

3 lentelė. Naudoti antikūnai

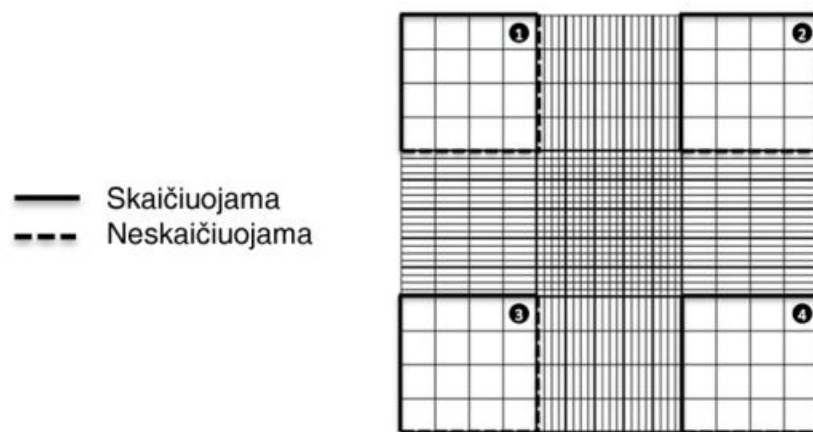
Pavadinimas	Fluoroforas	Rūšis	Izotipas	Gamintojas
Anti-CD34	FITC	Adhezijos molekulė	IgG2a	Miltenyi Biotec
Anti-CD44	FITC	Adhezijos molekulė	IgG2b	Invitrogen
Anti-CD90	FITC	Įvairiarūšis	IgG1	Molecular Probes
Anti-CD105	PE	Receptorius	IgG1	Invitrogen
IgG1	FITC	Izotipinė kontrolė	IgG1	Dako
IgG1	PE	Izotipinė kontrolė	IgG1	Invitrogen
IgG2a	FITC	Izotipinė kontrolė	IgG2a	Miltenyi Biotec
IgG2b	FITC	Izotipinė kontrolė	IgG2b	Dako

2.3.METODAI

2.3.1. Ląstelių iš žmogaus vaisiaus vandenų išskyrimas ir kultivavimas

Žmogaus vaisiaus vandenų pavyzdžiai gaunami steriliuose induose, priklausomai nuo patologijos tūris gali svyruoti nuo 2 iki 100 ml. Sterilaus laminarinio oro srauto bokse vaisiaus vandenys perkeliama į sterilius mėgintuvėlius ir centrifuguojami 20 min. 600 rcf KT, išsėdusios ląstelės du kartus praplaunamos PBS tirpalu centrifuguojant tokiomis pačiomis sąlygomis. Vizualiai įvertinus ląstelių kiekį, jos resuspenduojamos amniocitams specifikoje terpėje AmnioMAX (AnioMAX™ C-100 Basal Medium) su 1 % penicilino/streptomicino (PS) ir 10 % specialaus mitybinės terpės serumo (AmnioMAX™ C-100 Supplement) bei išsėjamos į kultivavimo flakonus. Ląstelės kultivuojamos inkubatoriuje, palaikančiame 5 % CO₂ koncentraciją ir 37 °C temperatūrą. Ląstelėms prikibus, mitybinė terpė keičiama kas 3–4 dienas, o pasiekus apie 80 % suaugimo tankį jos persėjamos.

Ląsteles persėjant auginimo terpė nusiurbiamas, monosluoksnis du kartus praplaunamas PBS tirpalu. Į auginimo indą pridedama 0,05 % tripsino/EDTA tirpalo (25 µl/cm²), flakonas laikomas kelias minutes CO₂ inkubatoriuje 37 °C temperatūroje. Įvertinus ląstelių atkibimą mikroskopu pridedama pilnos terpės santykiu 1:1, suspensija gerai išpipetuojama, ląstelės suskaičiuojamos naudojant Neubauer hemocitometrą (8 pav.):



Ląstelių kiekis = (ląstelių(1,2,3,4)vidurkis · skiedimo veiksnys)/(kvadrato tūris (ml))

Ląstelių kiekis = (ląstelių(1,2,3,4)vidurkis · 2)/(10⁴ (ml))

8 pav. Ląstelių skaičiavimui naudojamo hemocitometro schema ir ląstelių kiekiui apskaičiuoti naudojama formulė
(Hemocytometer protocol)

Prieš skaičiavimą ląstelės dažomos 0,2 % tripano mėlio tirpalu negyvoms ląstelėms nudažyti ir užnešamos į hemocitometro kišenėlę. Skačiuojamos tik nenusidažiusios blizgios ląstelės. Suskaičiavus ląstelės, jos atitinkamais kiekiais išsėjamos į auginimo indus, pridama mitybinės terpės.

2.3.2. Ląstelių iš vaisiaus vandenų diferenciacija ir kokybinis vertinimas

Išskirtų ląstelių plastiškumas *in vitro* įvertinamas indukuojant jas diferencijuoti adipogenine, osteogenine, neurogenine ir miogenine kryptimis. Ląstelių diferenciacija kokybiškai vertinama dažant ląstelių preparatus.

Adipogeninei ir osteogeninei diferenciacijai skatinti naudojami komerciniai rinkiniai: StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit. Diferenciacijos indukavimas atliekamas pagal gamintojo nurodymus. Paruošiama diferenciacijos terpė iš bazinės terpės ir diferenciacijai specifinio priedo bei 0,05 % gentamicino tirpalo. Ląstelės diferencijuojamos apie 2 savaites, terpė keičiama kas 3–4 dienas.

Adipogeninės diferenciacijos kokybiniam vertinimui ląstelės fiksuotos su 4 % paraformaldehido tirpalu 15 min. KT, po to du kartus praplaunamos su distiliuotu vandeniu, dažoma su Oil Red tirpalu 10 min. KT, dažas 4 kartus nuplautas distiliuotu vandeniu. Osteogeninės diferenciacijos vertinimui ląstelės fiksuotos su 4 % paraformaldehido tirpalu 30 min. KT, po to du kartus praplautos su distiliuotu vandeniu, dažoma su 2 % Alizarin Red S tirpalu 2–3 min. KT, dažas tris kartus nuplaunamas su distiliuotu vandeniu. Diferenciacija vertinama mikroskopuojant ląstelių preparatus ir lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis.

Neurogeninė diferenciacija indukuojama, kuomet ląstelių suaugimo tankis pasiekia apie 50 %. Mitybinė terpė pakeičiama į neurogeninės diferenciacijos terpę, kuri susideda iš

DMEM/F12 su 2 mM L-glutamino, N-2 priedu, 1,5 μ M retinoinės rūgšties ir 0,05 % gentamicino tirpalo. Diferencijacija trunka apie 5 paras, kokybiškai vertinama pagal pakitusią ląstelių morfologiją.

Miogeninė diferenciacija indukuojama ląstelių suaugimo tankiui pasiekus 70–80 %, mitybinė terpė pakeičiama į miogeninės diferenciacijos terpę, susidedančią iš DMEM, 10 % FBS, 2 % arklio serumo ir 1 % PS. Inkubuojama 2 savaites, diferenciacijos terpę keičiant kas 3–4 dienas. Naudojant šviesinį mikroskopą galima matyti diferencijuojančias daugiabranduoles ląsteles. Miogeninė ir diferenciacija vertinama ląstelių preparatus fiksavus ir nudažius 0,1 % kristalo violeto (paruoštas 20 % etanolyje) tirpalu. Stebimos daugiabranduolės susiliejusios ląstelės.

2.3.3. Ląstelių žymėjimas antikūnais paviršiaus žymenų raiškos tyrimui, tėkmės citometrijos duomenų analizė

Paviršiaus žymenų raiškos tyrimai svarbūs ląstelių populiacijos charakterizavimui, skirtingos kamieninių ląstelių kultūros pasižymi specifinių paviršiaus žymenų raiška.

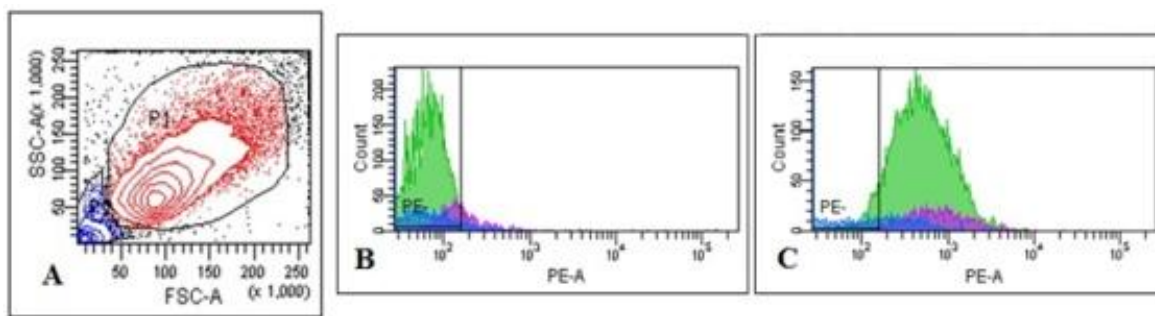
Iš vienasluoksnės kultūros surenkamos ir suskaičiuojamos ląstelės, kurios centrifuguojamos 5 min. 500 rcf, nuoplovos nupilamos. Jos persuspenduojamos 1 ml šalto PBS su 1 % BSA tirpalo ir centrifuguojamos 5 min. 500 rcf. Nuoplovos nupilamos, plovimas kartojamas dar kartą, tik šį kartą ląsteles padaliname į reikiamą kiekį 1,5 ml mėgintuvėlių (apie 80 tūkst. ląstelių vienam mėgintuvėliui) ir centrifuguojama 5 min. 500 rcf 4 °C.

Nuoplovos pašalinamos, ląstelės persuspenduojamos 50 μ l PBS su 1 % BSA tirpalo, pažymimos antikūnais, konjuguotais su vienu iš fluoroforų: PE ar FITC. Antikūnų kiekis dedamas pagal gamintojo rekomendacijas. Vykdoma 30 min. inkubacija 4 °C temperatūroje tamsoje. Pasibaigus inkubacijai ląstelės du kartus praplaunamos 200 μ l PBS su 1% BSA tirpalo, centrifuguojama 5 min. 500 rcf 4 °C. Resuspenduojamos 200–300 μ l PBS su 1 % BSA tirpalo, suspensija pernešama į 96 šulinėlių apvaliadugnę plokštelę ląstelių vertinimui tėkmės citometru.

Ląstelės tiriamos Millipore Guava® easyCyte 8HT tėkmės citometru, gauti duomenys analizuojami InCyte 2.2.2 kompiuterine programa.

Išmatuojama atskirų mėgintuvėlių su paruoštomis ląstelėmis fluorescencija. Viename iš mėgintuvėlių ląstelės nėra žymėtos antikūnais konjuguotais su fluorochormais. Nežymėtos ląstelės naudojamos ląstelių paskirstymui matavimo lauke pagal dydį ir grūdėtumą reguliuojant atitinkamai FSC ir SSC įtampas. Nustačius FSC ir SSC, regionu P1 pažymima mus dominanti ląstelių populiacija (9 pav. A). Į šį regioną neįtraukiamos mažos dalelės (šiukšlės, membranų nuolaužos ir pan.). Norint eliminuoti ląstelių agregatus ir apoptuojančias ląsteles, neįtraukiamos didelį FSC ir SSC turinčios dalelės. Tiriant ląstelių paviršiaus žymenis tėkmės

citometru, atidaromi papildomi atitinkamo fluorochromo (PE, FITC) intensyvumo langai (9 pav.), kuriuose uždedami skyrikliai (angl. k. *gate*).



9 pav. Tėkmės citometrijos duomenų analizės langai. A – tiriamų ląstelių regionas P1, B – izotipinės kontrolės regionas, C – fluoroforo regionas

Matuojant izotipine kontrole žymėtas ląsteles, skyriklio padėtis koreguojama taip, kad būtų atskirtos nesavitai besižyminčios ląstelės (9 pav. B). Iš duomenų lentelių ir histogramų (9 pav. C) sužinomas ląstelių, pasižyminčių tiriamų žymenų raiška, kiekis.

2.3.4. RNR išskyrimas iš ląstelių vienasluoksnės kultūros ir komplementarios DNR (kDNR) sintezė

Kamieninės ląstelės charakterizuojamos pagal tam tikrų transkripcijos veiksmų raišką, taip pat vertinamas ląstelių senėjimas tiriant su ląstelės ciklo reguliacija susijusių genų raišką, o diferenciacijų kiekybinė analizė atliekama tiriant genų, specifinių diferenciacijai, raišką. Tam iš ląstelių reikia išskirti RNR, skyrimui naudojamas komercinis TRIzol® reagentas.

Mitybinė terpė švariai pašalinama iš auginimo indo, ląstelių monosluoksnis paveikiamas TRIzol® reagentu ($30 \mu\text{l}/\text{cm}^2$), išpipetuojama, perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlį, homogenizuotas tirpalas inkubuojamas 5 min., KT. Po inkubacijos įpilama chloroformo ($250 \mu\text{l}/1 \text{ ml TRIzol}^\circ$), mėgintuvėlis švelniai pavartomas rankose, inkubuojama 10 min., KT. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 12000 rcf, 20 min., 4 °C. Nucentrifugavus matomos susidariusios fazės (viršutinė, vidurinė ir apatinė), RNR yra viršutinėje vandeninėje fazėje, kuri atsargiai nusiurbiamą ir perkeliama į mėgintuvėlį be ribonukleazių. RNR išsodinama pridėjus lygų tūrį izopropanolio, mėgintuvėliai sukratomi ir inkubuojami 10 min., KT. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 12000 rcf, 10 min., 4 °C, vizualiai įvertinamos RNR nuosėdos ant mėgintuvėlio dugno. Supernatantas pašalinamas, RNR nuosėdos du kartus plaunamos su 1 ml šaltu 75 % etanoliumi, centrifuguojama 7500 rcf, 5 min., 4 °C. Etanolis nusiurbiamas, nuosėdoms leidžiama pradžiūti, jos tirpinamos DEPC paveiktame vandenyje, RNR koncentracija matuojama nanofotometru ir saugoma -80 °C šaldiklyje tolimesniems eksperimentams.

kDNR sintezei naudojamas komercinis rinkinys Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR. Į kDNR sintezei skirtus mėgintuvėlius (be ribonukleazių) įpilta 4 μl 5X

reakcijos mišinio, 2 µl fermentų mišinio, 2 µg RNR ir vandens be nukleazijų iki galutinio bendro 20 µl tūrio. Nespecifinės sąveikos kontroliniai kDNR sintezės mėginiai buvo paruošti analogiškai, tik vietoje fermentų mišinio įpilama vandens be ribonukleazijų, mišiniai švelniai išmaišyti. kDNR sintetinama termocikleryje nustačius programą: 10 min. inkubacija 25 °C, 30 min. inkubacija 50 °C, 5 min. inkubacija 85 °C. Pasibaigus reakcijai, susintetinta kDNR buvo praskiesta 10 kartų naudojant vandenį be ribonukleazijų.

2.3.5. Realus laiko kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (RL-kPGR)

RL-kPGR analizei atlikti naudojamas komercinis rinkinys Maxima SYBR® Green qPCR Master Mix. Kiekvienam RL-kPGR taškui imama 2 µl 10 kartų skiestos kDNR (10 ng). Pagamintas bendras reakcijos mišinys, susidedantis iš specifinių pradmenų (5 lentelė), vandens be ribonukleazijų ir „SYBR® Green qPCR MM no ROX“, kuris išpilstomas į mėgintuvėlius po 8 µl. Tiriamieji ir kontroliniai (be fermentų mišinio) mėginiai paruošti įpilant 2 µl 10 kartų skiestos kDNR, o nespecifinės sąveikos kontroliniai mėginiai – 2 µl vandens be ribonukleazijų. Reakcija vykdoma termocikleryje Rotor-Gene™ 6000 pagal programą, nurodytą 4 lentelėje.

4 lentelė. RL-kPGR programa genų raiškai tirti

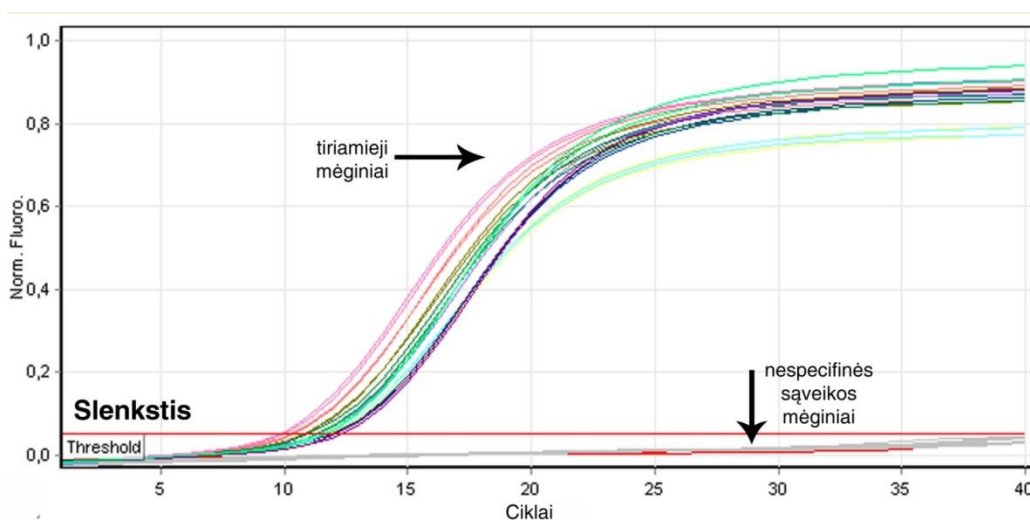
	Ciklų skaičius	
Polimerazės aktyvavimas	1	95 °C, 10 min.
DNR matricos denatūravimas	40	95 °C, 20 s
Pradmenų prilydimas prie DNR matricos		54–59 °C, 30 s
Kopijos ilginimas		72 °C, 30 s

5 lentelė. Genų raiškos analizei naudoti pradmenys

Genas	Pradmenų seka	Prilydimo T, °C	Amplikono ilgis, bp
GAPDH	F 5'-TCCATGACAACCTTTGGTATCG R 5'-TGTAGCCAAATTCGTTGTCA	50–60	471
OCT4	F 5'-CGAGAAGGATGTGGTCCGAG R 5'-CAGAGGAAAGGACACTGGTC	56	136
SOX2	F 5'-TGGACAGTTACGCGCACAT R 5'-CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	56	215
NANOG	F 5'-AGATGCCTCACACGGAGACT R 5'-GTTTGCCTTTGGGACTGGTG	56	96
REX1	F 5'-GCCTTATGTGATGGCTATGTGT R 5'-ACCCCTTATGACGCATTCTATGT	56	96
ATM	F 5'-CTCTGAGTGGCAGCTGGAAGA; R 5'-TTTAGGCTGGGATTGTTCGCT	58	129
p53	F 5'-TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC; R 5'-AGGACAGGCACAAACACGCACC	58	121

5 lentelės tęsinys			
p21	F 5'-GGCAGACCAGCATGACAGATT; R 5'-GCCGATTAGGGCTTCCTCT	58	73
p16	F 5'-GCTGCCCAACGCACCGAATA R 5'-ACCACCAGCGTGTCAGGAA	58	180
PPAR γ 2	F 5'-CGACCAGCTGAATCCAGAGT R 5'-TTGCCAAGTCGCTGTCATCT	59	554
ALP	F 5'-AGCCCTTCACTGCCATCCTGT R 5'-ATTCTCTCGTTCACCGCCCAC	56	68
Nestinas	F 5'-CTGCTACCCTTGAGACACCTG R 5'-GGGCTCTGATCTCTGCATCTAC	54	141
Desminas	F 5'-CCTACTCTGCCCTCAACTTC R 5'-AGTATCCCAACACCCTGCTC	59	519
Kalponinas	F 5'-TCCAAATATGACCCCCAGAA R 5'-CCCCTCTCAAACAGGTCGT	56	276

Gauti duomenys analizuoti Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 programa. Nespecifinės sąveikos signalas atskiriamas slenksčiu (10 pav.). Ciklo reikšmės, ties kuriomis tiriamųjų mėginių kreivės kerta slenkstį, vadinamos Ct reikšmėmis.



10 pav. RL-kPGR fluorescencijos priklausomybė nuo ciklų skaičiaus

Kiekybinis geno raiškos pokytis apskaičiuojamas pritaikius $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodą. Nustačius kontrolinio GAPDH geno bei tiriamų genų Ct reikšmes apskaičiuojama ΔCt reikšmė pagal formulę (1). $\Delta\Delta Ct$ reikšmė gaunama normalizavus ΔCt reikšmę pagal tiriamo geno kontrolinio mėginio ΔCt (2). Santykinė geno raiška apskaičiuota pagal formulę (3).

$$1 \Delta Ct = Ct \text{ tiriamo geno} - Ct \text{ GAPDH}$$

$$2 \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tiriamo mėginio} - \Delta Ct(\text{kontrolinio mėginio})$$

$$3 \text{ santykinė geno raiška} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.3.6. kDNR sintezė ir mikroRNR raiškos analizė naudojant RL-kPGR

kDNR sintezei bei mikroRNR raiškos tyrimams naudoti Applied Biosystems® komerciniai rinkiniai, reagentai ir mikroRNR pradmenys (TaqMan® MicroRNA Assay, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit ir TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG). Visos procedūros atliktos pagal gamintojo rekomendacijas.

kDNR sintezei naudotas atvirkštinės transkripcijos rinkinys. Reagentai atšildomi šaltuose stoveliuose, paruošiamas reikalingas mėgintuvėlių be ribonukleazijų skaičius. Atitinkamais kiekiais supilstomas bendras reakcijos mišinys, kai vienai reakcijai reikia 0,075 µl deoksiribonukleotidų tirpalo (100 mM), 0,5 µl atvirkštinės transkriptazės fermento, (50 U/µl), 0,75 µl 10x buferinio tirpalo, 0,095 µl RNazių slopiklio (20 U/µl) ir 2,08 µl vandens be nukleazijų. Pridedama po 2,5 µl RNR, kurios kiekis mėginiui 25 ng, nespecifinės sąveikos kontroliniuose mėginiuose vietoje RNR įpilamas toks pat tūris vandens be nukleazijų. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 1,5 µl tiriamos mikroRNR pradmenų. Mėginiai inkubuojami šaltai 5 min., sintezės reakcija paleidžiama termocikleryje pagal programą: 30 min. inkubacija 16 °C, 30 min. inkubacija 42 °C ir 5 min. inkubacija 85 °C. Pasibaigus sintezės reakcijai atliekama miRNR raiškos analizė naudojant RL-kPGR arba mėginiai užšaldomi -20 °C.

RL-kPGR naudoti reagentai bei susintetinta kDNR laikomi ant ledo, paruošiamas reikiamas kiekis mėgintuvėlių be ribonukleazijų. Reakcijos mišinys gaminamas kiekvienam kDNR mėginiui atskirai. Trims to pačio mėginio pakartojimams sumaišomas reakcijos mišinys, susidedantis iš 3,6 µl TaqMan® mažų RNR tirpalo (20x), 4,8 µl kDNR, 36 µl „TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG (2x)“ ir 27,61 µl vandens be nukleazijų. Nespecifinės sąveikos kontroliniai mėginiai paruošti vietoje kDNR įpilant tokį patį tūrį vandens be nukleazijų. Galutinis reakcijos tūris – 20 µl. RL-kPGR paleidžiama termocikleryje pagal programą nurodytą 6 lentelėje:

6 lentelė. RL-kPGR programa mikroRNR raiškai tirti

	Fermentų aktyvinimas	PGR	
		40 ciklų	
		DNR denatūravimas	Pradmenų prilydimas ir kopijos ilginimas
Temperatūra	95 °C	95 °C	60 °C
Trukmė	2 min.	15 s	60 s

Duomenys apdorojami kaip nurodyta 2.3.5 skyriuje. Kiekybinis geno raiškos pokytis apskaičiuojamas pritaikius $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodą. Nustačius kontrolinės miRNR RNU 48 bei tiriamų mikroRNR C_t reikšmes apskaičiuojama ΔC_t reikšmė pagal formulę (4). $\Delta\Delta C_t$ reikšmė gaunama

normalizavus ΔCt reikšmę pagal tiriamos mikroRNR kontrolinio mėginio ΔCt (5). Santykinę mikroRNR raišką apskaičiuota pagal formulę (6).

$$4 \Delta Ct = Ct \text{ tiriamos miRNR} - Ct \text{ RNU 48}$$

$$5 \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tiriamo mėginio} - \Delta Ct(\text{kontrolinio mėginio})$$

$$6 \text{ santykinė mikroRNR raiška} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.3.7. Genominės DNR skyrimas

Įvertinant visuminį DNR metilinimą ląstelėse, iš jų buvo išskirta genominė DNR (gDNR). Skyrimui naudotas komercinis Zymo Research rinkinys Genomic DNA™-Tissue MiniPrep. Visos procedūros atliekamos remiantis gamintojo protokolu.

Ląstelės atkabinamos nuo auginimo indų paviršiaus kaip nurodyta 2.3.1. dalyje, surenkamos į mėgintuvėlį ir centrifuguojamos 500 rcf, 5 min., KT. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 1 ml PBS ir pernešamos į 1,5 ml centrifuginius mėgintuvėlius. Mėginiai vėl centrifuguojami tokiais pačiomis sąlygomis. Supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 195 μ l lizavimo mišinyje, paruoštame iš 1 dalies proteinazės K (20 mg/ml), 19 dalių vandens ir 19 dalių 2x apdorojimo buferio, mėginiai inkubuojami 55 °C apie 2 valandas. Po inkubacijos į mėginius pridedama po 700 μ l genominės lizės buferio, gerai išpipetuojama ir supurtoma, centrifuguojama 10000 rcf, 1 min., KT, išėda netirpios nuosėdos, o supernatantas perkeliamas į Zymo-Spin™ IIC kolonėles, patalpintas surinkimo mėgintuvėliuose. Centrifuguojama tokiais pačiomis sąlygomis, kolonėlės perkeliama į naujus surinkimo mėgintuvėlius. Į kolonėles pridedama 200 μ l DNR pirminio plovimo buferio, centrifuguojama tokiais pačiomis sąlygomis. Kolonėlės plaunamos su 400 μ l g-DNR plovimo buferio, centrifuguojama dar kartą. Po centrifugavimo kolonėlės perkeliama į švarius 1,5 ml mėgintuvėlius, ant membranos užlašinama apie 50–100 μ l DNR eliucijos buferio, inkubuojama 5 min., KT. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami greičiausiu greičiu 30s, išskirtos genominės DNR koncentracija manuojama nanospektrofotometru, naudojama iš karto arba laikoma -20 °C.

2.3.8. Visuminio DNR metilinimo įvertinimas

VVKL visuminiams DNR metilinimui nustatyti naudojas komercinis Zymo Research rinkinys 5-mC DNA ELISA Kit. Visos procedūros atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas.

Reakcijoms reikalingas gDNR kiekis – 100 ng. Pagal išskirtos genominės DNR koncentraciją paskaičiuojamas reikiamas gDNR kiekis, kuris patalpinamas 0,5 ml mėgintuvėliuose ir naudojant buferį pasiekiamas galutinis 100 μ l tūris. Kaitinimo bloke vykdoma DNR denaturacija 98 °C, 5 min. Po inkubacijos mėginiai patalpinami lede ir laikomi

10 min. 100 µl denatūruotos DNR perkeliama į 96 šulinėlių plokštelės šulinėlius, plokštelė uždengiama folija ir inkubuojama 1 val. 37°C. Po inkubacijos buferis pašalinamas iš plokštelės, šulinėliai 3 kartus plaunami su 200 µl 5-mC ELISA buferio, į kiekvieną šulinėlį įpilama po 200 µl 5-mC ELISA buferio, plokštelė uždengiama folija ir inkubuojama 30 min. 37 °C. Po inkubacijos buferis pašalinamas, į šulinėlius įpilama 100 µl antikūnų mišinio, susidedančio iš 5-mC ELISA buferio (100 µl šulinėliui), anti-5-metilcitozino pirminio antikūno (0,05 µl/100 µl buferio) ir antrinio antikūno (0,1 µl/100 µl buferio), plokštelė uždengiama folija ir inkubuojama 1 val. 37 °C. Po inkubacijos antikūnų mišinys pašalinamas, šulinėliai 3 kartus plaunami su 200 µl 5-mC ELISA buferio. Spalvinės reakcijos vyksmui į kiekvieną šulinėlį reikia įpilti po 100 µl HRP tirpalo ir inkubuoti 30 min. KT. Spektrofotometru matuojama šviesos sugertis ties 405–450 nm bangos ilgiu. Visuminis metilinimo lygis apskaičiuojamas pagal gamintojo protokole esančią formulę.

2.3.9. β-galaktozidazės aktyvumo nustatymas

β-galaktozidazinis ląstelių aktyvumas vertinamas naudojant komercinį Sigma-Aldrich rinkinį Senescence Cells Histochemical Staining Kit. Visos procedūros atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas.

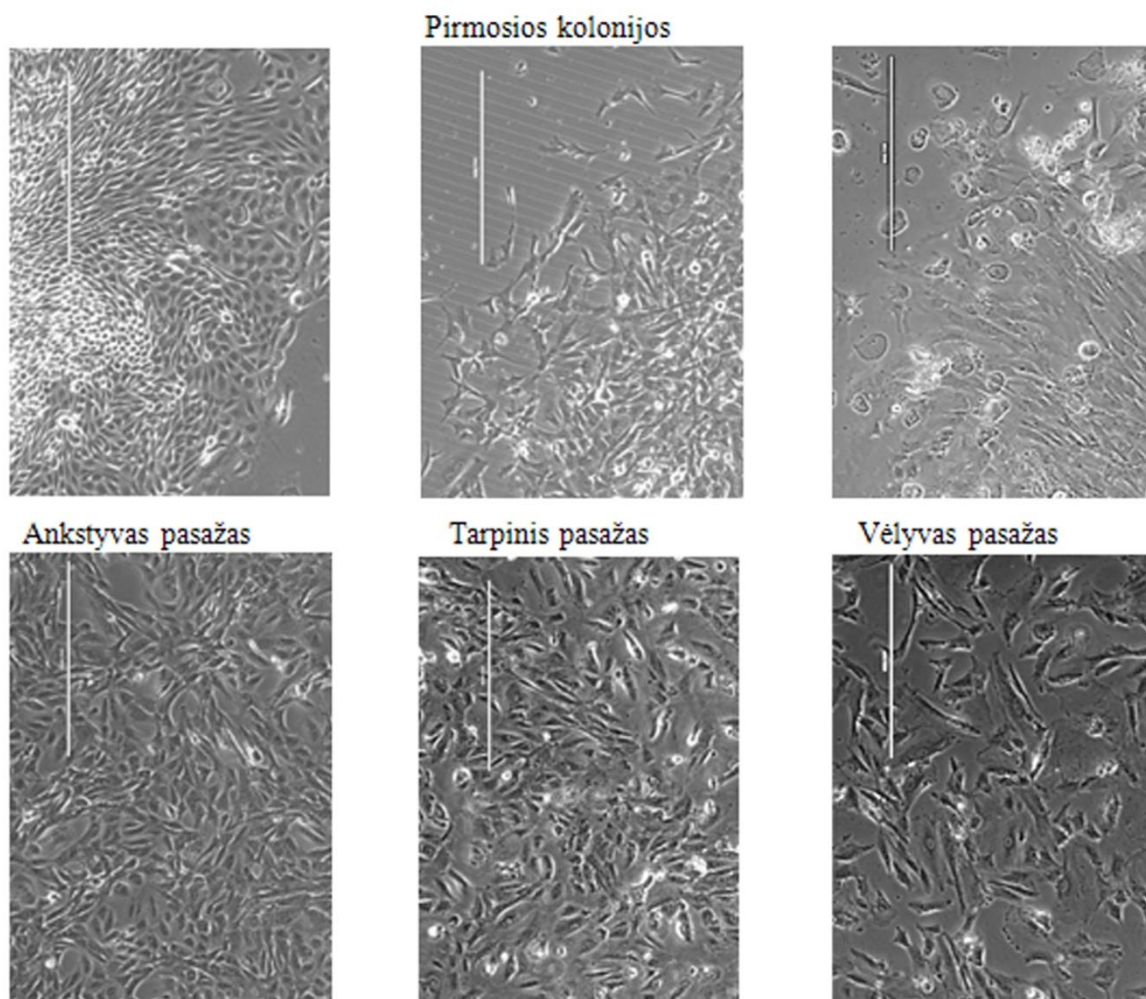
Mitybinė terpė pašalinama nuo ląstelių monosluoksnio, kuris du kartus atsargiai praplaunamas su PBS (0,1 ml/cm²). Paruošiamas fiksacijos buferis (10x fiksavimo buferis praskiedžiamas iki 1x naudojant distiliuotą vandenį), kuriuo paveikiamas ląstelių monosluoksnis 7–10 min. KT (0,16 ml/cm²), praėjus inkubacijai fiksavimo buferis pašalinamas, o ląstelės tris kartus praplaunamos su PBS (0,1 ml/cm²). Ant užfiksuoto ląstelių monosluoksnio užpilamas dažymo mišinys (0,1 ml/cm²), paruoštas iš 8,5 dalių distiliuoto vandens, 1 dalies 10x dažymo tirpalo, 0,25 dalies X-gal tirpalo ir po 0,125 dalies reagento B ir reagento C. Ląstelės inkubuojamos 37 °C oro termostate apie 16 valandų. β-galaktozidazinis ląstelių aktyvumas vertinamas mikroskopuojant ląstelių preparatus, skaičiuojamos žalsvai/melsvai nusidažiusios ląstelės bei bendras ląstelių skaičius (500 ląstelių), nusidažiusių ląstelių kiekis išreiškiamas procentine išraiška.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. LĄSTELIŲ IŠ VAISIAUS VANDENŲ SKYRIMAS IR KULTIVAVIMAS

Tyrimams naudotos ląstelės išskirtos iš 6 vaisiaus vandenų mėginių, gautų amniocentezių metu, atliktų dėl padidintos chromosominių ligų rizikos (vyresnis motinos amžius, padidinta biocheminė rizika, echoskopiškai nustatyta arba įtarta vaisiaus patologija arba chromosominės patologijos žymenys) 18–27 nėštumo savaitėmis. Pacienčių amžius svyravo tarp 24–43 metų. Mėginių tyrimams gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200-428-PP2-45. Pacientės buvo supažindintos su ketinimais atlikti tyrimus bei pasirašė oficialų informuoto asmens sutikimą.

Tirti mėginiai su gydytojų genetikų patvirtintais skirtingais vaisiaus vystymosi sutrikimais bei mėginiais patvirtintais kaip sveiko, normalaus nėštumo. Išskirtoms ląstelėms leidžiama prikibti prie auginimo indų paviršiaus 7–14 dienų, stebimas pirmųjų kolonijų susidarymas (11 pav.).



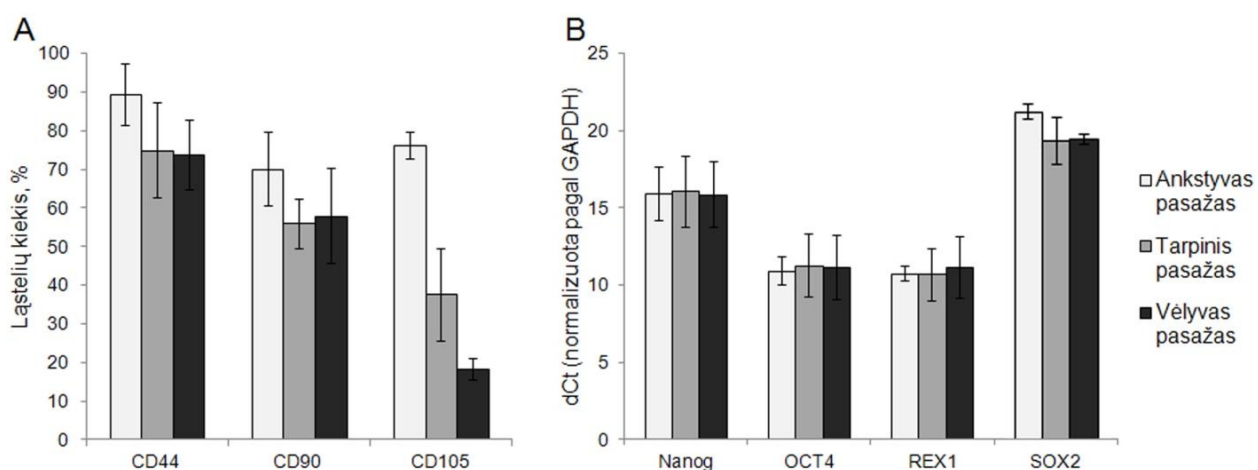
11 pav. Susidariusios pirmosios kolonijos mėginiuose bei auginamų ląstelių kultūrų morfologiniai pokyčiai (mastelis 400 μm)

Prikibusios ląstelės formuoja morfologiškai skirtingas ląstelių kolonijas, tad turima ląstelių kultūra yra heterogeniška. Prie augimo indų paviršiaus prisitvirtina dalis iš vaisiaus kilusių jau specializuotų ląstelių, ir mezenchiminės kamieninės ląstelės.

Taip pat stebimi ląstelių morfologiniai pokyčiai ir jas kultivuojant vienasluoksnyje kultūroje. Pagal augimo charakteristikas išskirtos trys ląstelių kultūros fazės: ankstyva, tarpinė ir vėlyva (11 pav.). Ankstyvoje fazėje (pasaže) kultūra tvarkinga, ląstelės taisyklingos, panašios formos, daug besidalinančių ląstelių, tarpinėje fazėje (pasaže) jau pastebėti kultūros pokyčiai, atsiranda dalinai išplokštėjusių ląstelių, nors dar nemažai gražios formos, proliferuojančių ląstelių, kurių itin sumažėja vėlyvoje fazėje (pasaže), kuomet didžioji dalis ląstelių kultūroje yra padidėjusios, išplokštėjusios bei užima didelį paviršiaus plotą (palyginus su ankstyvo pasažo ląstelėmis), tampa nevienodos formos. Jau senai žinoma, kad tokie kultūros pokyčiai siejami su ląstelių senėjimo procesais (Bayreuther ir kt., 1988), kuriuos reguliuoja įvairūs molekuliniai mechanizmai.

3.2. IŠSKIRTŲ LĄSTELIŲ CHARAKTERIZAVIMAS

Kamieninės ląstelės įprastai apibūdinamos pagal specifinių paviršiaus žymenų ir būdingų transkripcijos veiksnių raišką. Darbo metu tirti MKL paviršiaus žymenys CD44, CD90 ir CD105, taip pat kaip neigiamas žymuo pasirinktas hematopoetinių ląstelių žymuo CD34, tikrinta daugiagalėms kamieninėms ląstelėms būdingų transkripcijos veiksnių OCT4, Nanog, SOX2, REX1, palaikančių ląsteles nediferencijuotoje būsenoje, raiška (12 pav.).



12 pav. Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių charakterizavimas pagal paviršiaus žymenų (A) ir transkripcijos veiksnių (B) raišką

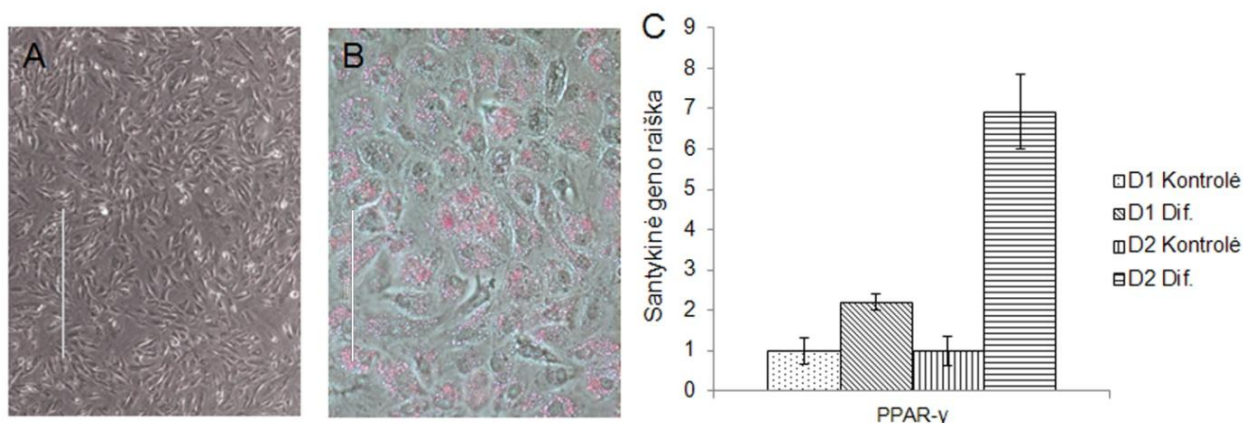
Tirtos vaisiaus vandenų kamieninės ląstelės pasižymėjo MKL būdingais paviršiaus žymenimis. Įvertinus jų raišką pastebėta, jog auginant ląsteles šių žymenų raiška keičiasi. CD44 ir CD90 raiška sumažėja jau tarpiniame pasaže ir lieka pastovi iki vėlyvo pasažo. CD44 svarbus

ląstelių adhezijai, tarpląstelinei sąveikai (Mun ir Boo, 2010), auginant ląsteles žymens raiška mažėja, o ląstelėms sunkiau išlikti prikibusioms prie auginimo indų paviršiaus. Kitų mokslininkų darbuose teigiama, kad kultivuojant gryną MKL kultūrą CD90 raiška nesikeičia (Yu ir kt., 2014), tad šio žymens raiškos sumažėjimui įtakos gali turėti turima nevienalytė kultūra. Rezultatai rodo, kad itin sumažėja (daugiau nei tris kartus) CD105 raiška vėlyvame pasaže, šis žymuo siejamas su ląstelių citoskeleto organizacijos, morfologijos ir ląstelių migracijos pokyčiais (Sanz-Rodriguez et al., 2004), kurie pastebimi ir stebint ląsteles šviesiniu mikroskopu. Nė vienas iš tirtų ląstelių mėginių nepasižymėjo CD34 žymens raiška (duomenys nerodomi).

Ištyrus transkripcijos veiksnių raišką nustatyta, jog ląstelės viso auginimo metu pasižymi daugiagalėms kamieninėms ląstelėms būdingų transkripcijos veiksnių raiška. Pastebėta bendra tendencija, jog auginant ląsteles transkripcijos metu susintetintos iRNR kiekis išlieka pastovus lyginant su ląstelėse sintetinama GAPDH geno iRNR, išskyrus SOX2 transkripcijos veiksni, kurio iRNR kiekis didėjo (nustatomo produkto kiekis pasirodė ankstesniame cikle).

3.3. LĄSTELIŲ DIFERENCIACIJA ĮVAIRIOMIS KRYPTIMIS

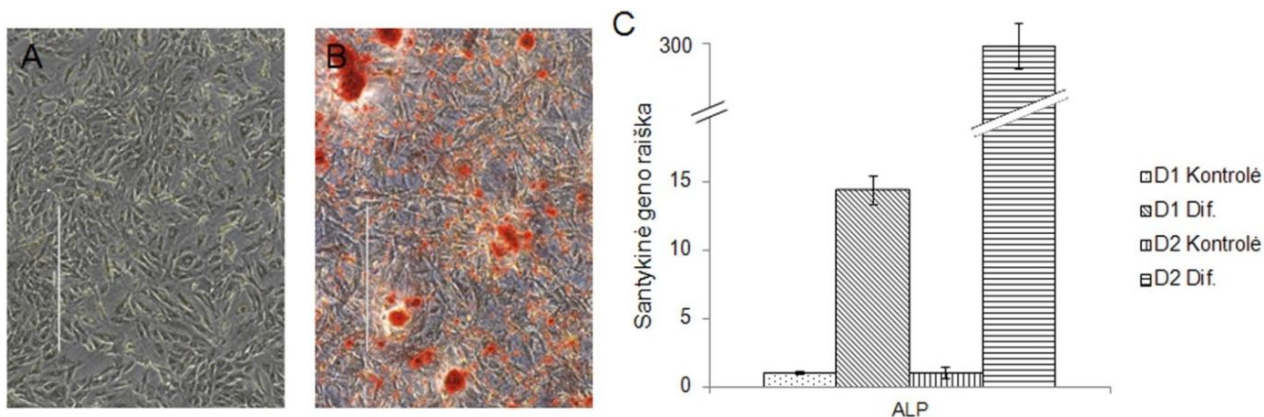
Vaisiaus vandens kamieninių ląstelių plastiškumas įvertintas tiriant jų gebėjimą diferencijuoti įvairiomis kryptimis: adipogenine, osteogenine, neurogenine, miogenine ir kardiomiogenine. Atlikta tiek kokybinė (dažant ląstelių preparatus specialiais cheminiais dažais), tiek kiekybinė (būdingų genų raiška) diferenciacijos analizė (13–16 pav.). Diferenciacijos tyrimai atlikti su ląstelėmis, išskirtomis iš mėginių, kuriuose patvirtinti skirtingi vaisiaus vystymosi sutrikimai (D1 ir D2).



13 pav. Adipogeninės diferenciacijos įvertinimas. A – kontrolinių ląstelių dažymas (mastelis 400 μm), B – diferenciacijos kokybinis vertinimas (mastelis 100 μm), C – diferenciacijos kiekybinis vertinimas

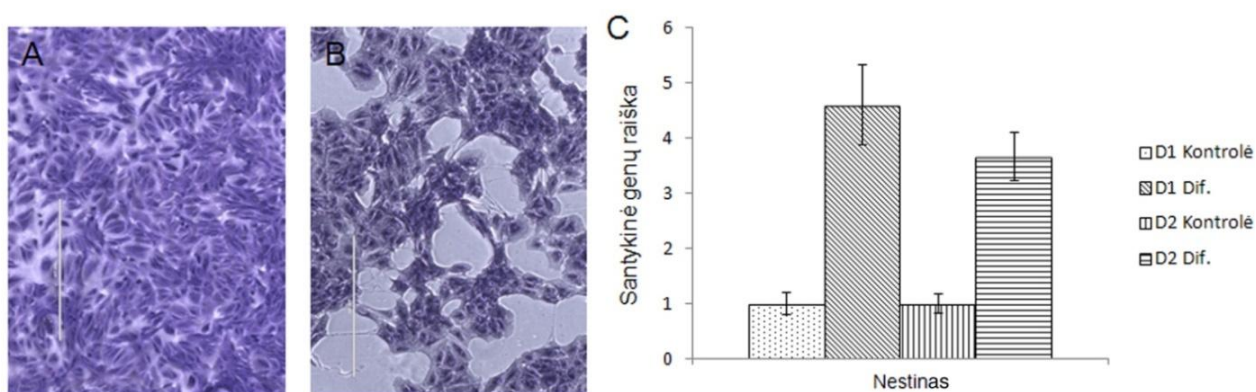
Adipogenine kryptimi skirtingų mėginių ląstelės diferencijuotos 12 dienų, kurių metu pasikeitė ląstelių morfologija, jos tapo apvalesnės, taip pat diferenciuotose ląstelėse kaupėsi būdingos riebalinės vakuolės (13 pav. B). Adipogeninei diferenciacijai būdinga padidėjusi

PPAR- γ 2 transkripcijos veiksnio, reguliuojančio riebalų rūgščių kaupimąsi ląstelėse (Delo ir kt., 2006), raiška (13 pav. C). Geno raiška šiuose mėginiuose didesnė palyginus su kontrole, bet ląstelių, išskirtų iš vaisiaus vandens, būdingų skirtingiems vaisiaus vystymosi sutrikimams (D1 ir D2), diferenciacijos galimybės skiriasi.



14 pav. Osteogeninės diferenciacijos įvertinimas. A – kontrolinių ląstelių dažymas (mastelis 400 μ m), B – diferenciacijos kokybinis vertinimas (mastelis 400 μ m), C – diferenciacijos kiekybinis vertinimas

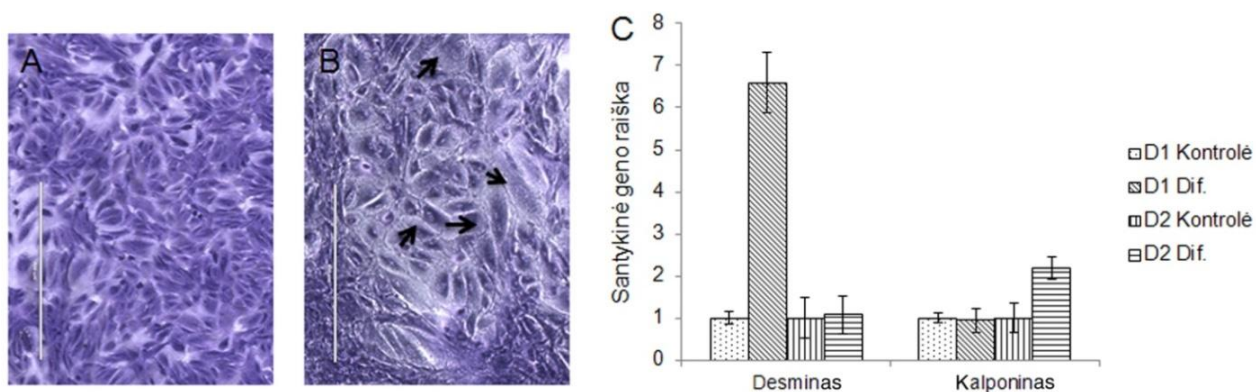
Osteogenine kryptimi skirtingų mėginių ląstelės taip pat diferencijuotos 12 dienų. Diferenciacijos metu kultūroje esančios ląstelės užmezga savotišką tinklą, o kokybiškai vertinant ląstelių preparatus matomi raudonai nusidažę kalcifikatai (14 pav. B). Žinoma, kad ALP raiška suaktyvėja vykstant osteogenezei (14 pav. C), šis fermentas generuoja fosfatus, kurie reikalingi audinio mineralizacijai (Pittenger ir kt., 1999). Abiejų ląstelių linijų diferenciacijų metu ALP geno raiška padidėja, tačiau raiškos skirtumas tarp ląstelių, išskirtų iš vaisiaus vandens, būdingų skirtingiems vaisiaus vystymosi sutrikimams, itin didelis.



15 pav. Neurogeninės diferenciacijos įvertinimas. A – kontrolinių ląstelių dažymas (mastelis 400 μ m), B – diferenciacijos kokybinis vertinimas (mastelis 400 μ m), C – diferenciacijos kiekybinis vertinimas

Neurogenine kryptimi ląstelės diferencijuojamos greičiau, jau po 5 dienų pastebėta pakitusi ląstelių kultūra. Diferenciacijos metu ląstelės keičiasi morfologiškai, įgauna neuronams būdingesnę formą (15 pav. B), kaip pastebėta ir ankstesniuose tyrimuose (Delo ir kt., 2006)

kultūroje vyrauja dviejų tipų ląstelių populiacijos – morfologiškai didelės, plokštesnės ląstelės ir nedidelės bipolinės ląstelės, nors reikšmingi skirtumai tarp šių dviejų subpopuliacijų dar neišaiškinti. Kiekybiškai diferenciacija įvertinta ištyrus geno, koduojančio neuroprogenitorinėms ląstelėms būdingo baltymo nestino, raišką (15 pav. C). Diferenciacijos metu šio geno raiška suaktyvėjo palyginus su kontroliniais mėginiais, o skirtumas tarp skirtingų mėginių nedidelis.



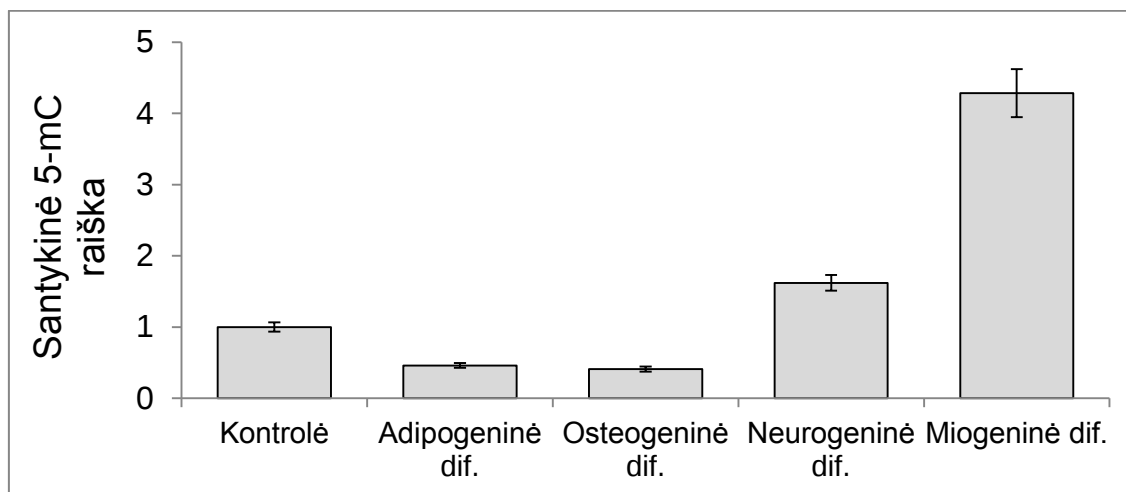
16 pav. Miogeninės diferenciacijos įvertinimas. A – kontrolinių ląstelių dažymas (mastelis 400 μm), B – diferenciacijos kokybinis vertinimas, juodomis rodyklėmis pažymėtos daugiabrandoelės ląstelės (mastelis 400 μm), C – diferenciacijos kiekybinis vertinimas

Miogenine kryptimi ląstelių diferenciacija truko 12 dienų, stebėtas susiliejusių daugiabrandolių ląstelių susidarymas. Kiekybinės diferenciacijos analizės metu tirta desminą ir kalponiną koduojančių genų raiška. Desminas reguliuoja sarkomeros architektūrą miocituose, kalponinas atsakingas už kalcio jonų surišimą ir taip dalyvauja raumeninių susitraukimų procese. Rezultatai rodo, kad diferenciacijos skirtingose ląstelių linijose metu, specifinių genų raiška skirtinga, t.y. D1 diferencijuotos ląstelės pasižymėjo suaktyvėjusia desmino geno raiška, o D2 mėginio ląstelėse padidėjusi kalponino raiška.

Vaisiaus vandens kamieninių ląstelių diferenciacijos įvairiomis kryptimis metu kokybiškai ir kiekybiškai įvertintas ląstelių plastiškumas *in vitro*. Visų diferenciacijų metu ląstelės pasižymėjo diferenciacijai būdinga morfologija, vyko specifinių produktų susikaupimas, pasižymėjo būdingų genų raiška. Tačiau taip pat pastebėta, jog vienodomis sąlygomis diferencijuojamos ląstelės pasižymi skirtingu specifinių genų raiškos lygiu. Manoma, jog tai vyko dėl skirtingo diferenciacijos molekulinės mechanizmų aktyvavimo ląstelėse, išskirtose iš vaisiaus vandens, būdingų skirtumams vaisiaus vystymosi sutrikimams. Taip pat šie skirtumai gali atsirasti dėl nevienalytės ląstelių kultūros, kurioje yra įvairaus diferenciacijos lygio ir jau specializuotų ląstelių.

3.4. VISUMINIO METILINIMO POKYČIAI DIFERENCIACIJOS METU

DNR metilinimas turi įtakos genų raiškai ląstelėse įvairių procesų metu. Taisyklingas DNR metilinimas ypač svarbus kamieninių ląstelių diferenciacijoje, specifinių genų transkripcijos aktyvacijoje. Visuminis DNR metilinimas VVKL įvertintas kontrolinėse ir diferencijuotose ląstelėse, išskirtose iš D6 mėginio, kuriame patvirtintas vaisiaus vystymosi sutrikimas. Diferenciacija įvertinta mikroskopiškai stebint ląsteles ir specifinius jų pokyčius. Tyrimo rezultatai pateikti 17 paveiksle.



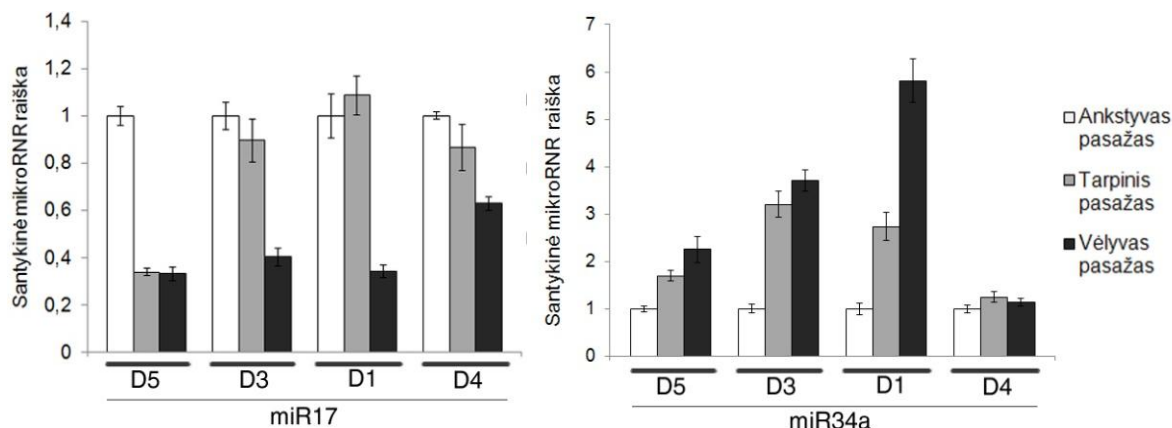
17 pav. 5-mC raiškos skirtumai tarp kontrolinių ir diferencijuotų ląstelių

Gauti duomenys rodo, kad palyginus su kontrolinėmis ląstelėmis visuminis DNR metilinimas adipogeninės ir osteogeninės diferenciacijos metu sumažėja, o neurogeninės ir miogeninės diferenciacijos metu jis padidėja. DNR metilinimas siejamas su genų promotorinių sekų blokavimu ir genų raiškos slopinimu (Zhou ir kt., 2011), tad neurogeninės ir miogeninės diferenciacijos metu genų raiška yra slopinama, o adipogeninės ir osteogeninės diferenciacijos metu genų raiška yra aktyvinama. Be to, tam tikras bendras DNR metilinimas visada yra palaikomas galutinai specializuotoje ląstelėje. Mūsų tyrimuose pastebėta, jog neurogeninė ir miogeninė diferenciacija įvyksta per trumpesnę laiką nei adipogeninė ir osteogeninė diferenciacijos. Manome, jog tai taip pat galėtų lemti didesnę metilinimo lygį galutinai diferencijuotose ląstelėse.

3.5. MIKRONR RAIŠKOS POKYČIAI LĄSTELIŲ KULTIVAVIMO METU

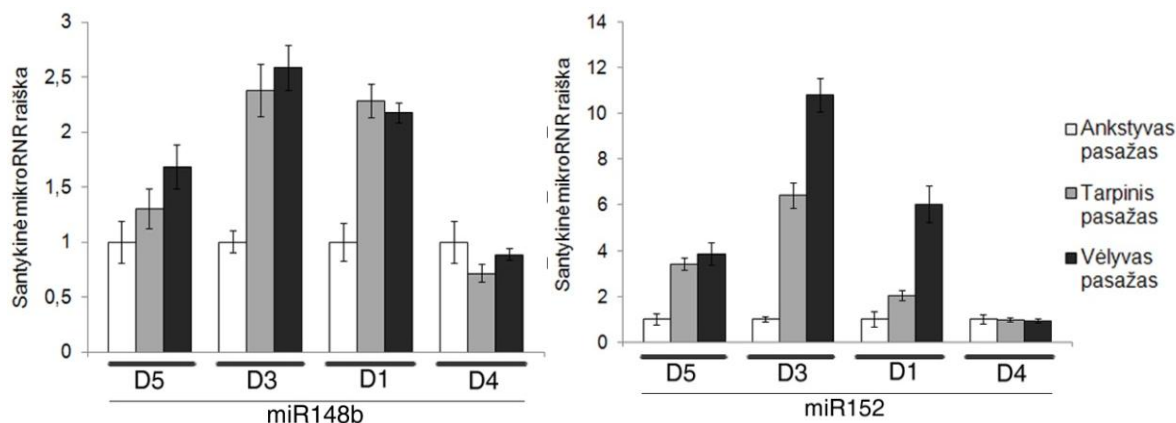
Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių augimo ir senėjimo procesai vertinami tiriant tokių epigenetinių reguliatorių kaip mikroNR raišką. Įvairių mikroNR raiška tirta mėginiuose, kurie atitinka skirtingus vaisiaus vystymosi sutrikimus ir pateikiami D1, D3 ir D4 bei sveiko

nėštumo atvejai (D5). MikroRNR raiškos tyrimų įvairiose ląstelių augimo fazėse rezultatai pateikti 18–20 paveiksluose.



18 pav. miR17 ir miR34a raiška mėginiuose įvairiose kultivavimo stadijose

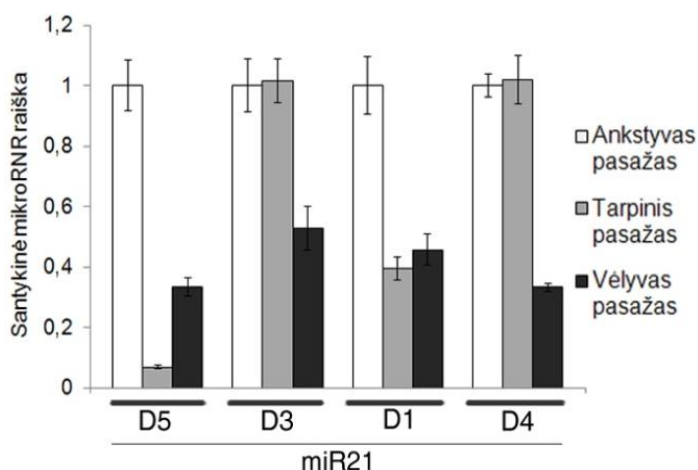
miR17 ir miR34a reguliuoja ląstelių proliferacijos ir senėjimo procesus. Tiriant šių mikroRNR raišką skirtingose augimo fazėse nustatyta, jog miR17 raiška vėlesniuose pasažuose sumažėja visuose mėginiuose, miR34a raiška padidėja D1, D3 ir D5 mėginiuose, o D4 išlieka pastovi. Skelbiama, kad žmogaus somatinėse ląstelėse miR17 raiška mažėja joms senstant (Hackl ir kt., 2010), o miR34a raiška priešingai – padidėja šių procesų metu (Zhang ir kt., 2015). D4 mėginyje miR17 raiška sumažėjo ne taip žymiai, o miR34a raiška nepasikeitė, tad galima manyti, kad šiose ląstelėse senėjimo procesai nėra tokie aktyvūs palyginti su kitomis linijomis.



19 pav. miR148b ir miR152 raiška mėginiuose įvairiose kultivavimo stadijose

miR148/152 šeimai priklausančios mikroRNR, tarp jų ir miR148b bei miR152, dalyvauja sveiko audinio vystymesi ir ląstelių augime. Ištyrus šių miR raišką mėginiuose, nustatyta, jog tiek miR148b, tiek miR152 raiška padidėja visuose mėginiuose išskyrus D4, kur raiška išlieka panaši visose tirtose kultivavimo stadijose. Kamieninėse ląstelėse miR148b labiausiai ištirtas kaip osteogeninės diferenciacijos reguliatorius, tačiau tiriant vėžines ląsteles pastebėta, kad padidėjusi miR148b raiška blokuoja vėžinių ląstelių proliferaciją (Zhang ir kt.,

2015). Mancini ir kolegos 2012 metais nustatė, kad miR152 raiška padidėja žmogaus odos fibroblastų senėjimo metu (Mancini ir kt., 2012), o Huang ir kolegos 2015 metais parodė, kad padidėjusi miR152 raiška stabdo vėžinių kamieninių ląstelių proliferaciją (Huang ir kt., 2015). Šie duomenys sutampa su mūsų rezultatais, gautais tiriant miR148b ir miR152 raiškos pokyčius žmogaus vaisiaus vandenų kamieninėse ląstelėse. Nustatėme, kad D4 mėginyje miR148b ir miR152 raiška išliko beveik nepasikitusi, o tai patvirtina, kad tyrimams paimtose ląstelėse senėjimo procesai dar ne tokie aktyvūs.



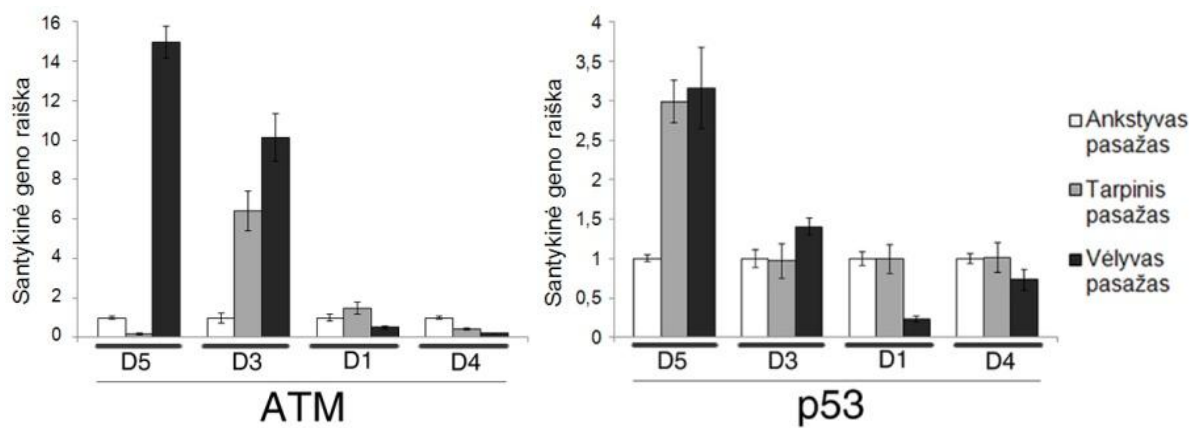
20 pav. miR21 raiška mėginiuose įvairiose kultivavimo stadijose

Žinoma, kad miR21 dalyvauja transkripcijos veiksnio SOX2 raiškos reguliacijoje, padidėjusi miR21 raiška blokuoja SOX2 raišką ir taip sumažėja ląstelių proliferacija, o sumažėjusi miR21 raiška indukuoja SOX2 ir ląstelės sparčiau dauginasi (Ribecco-Lutkiewicz ir kt., 2016). Tyrimų metu nustatėme miR21 raiškos sumažėjimą visų mėginių vėlyvuose pasažuose palyginus su ankstyvais pasažais, tad ląstelės turėtų itin gerai proliferuoti, tačiau tiek stebint ląstelių kultūrą mikroskopu, tiek tiriant kitų mikroRNR raišką, nustatėme, jog ląstelės vėlesniuose pasažuose geriau dalijasi lėčiau. Šių rezultatų paaiškinimui reiktų papildomų tyrimų.

Tiriant pasirinktą mikroRNR raišką ląstelėse, išskirtose iš sveiko ir sutrikusio vaisiaus vystymosi nėštumų, nustatyta, jog raiškos modeliai mėginiuose panašūs. Išsiskyrė tik D4 mėginys, o rezultatai parodė, kad senėjimo programa ląstelėse dar neaktyvi.

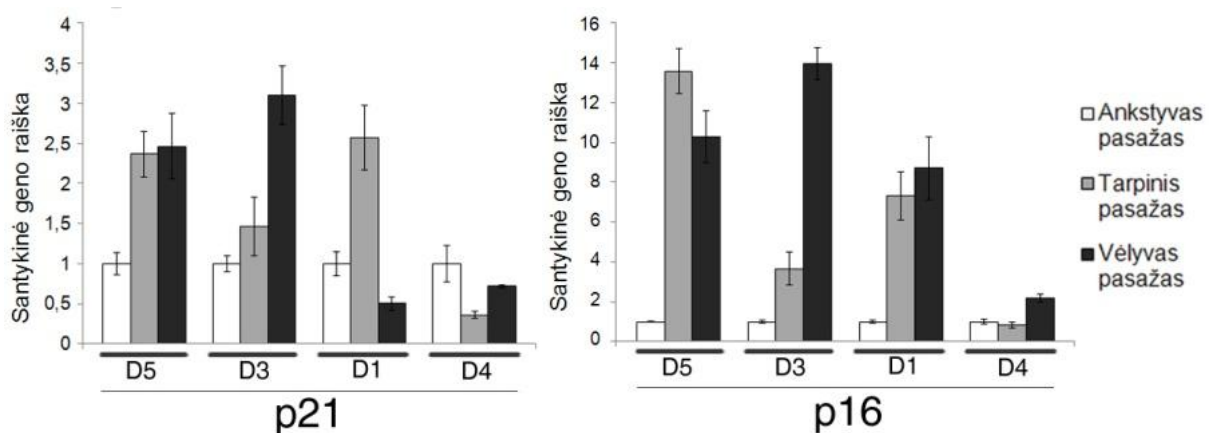
3.6. LĄSTELIŲ SENĖJIMAS VIENASLUOKSNĖJE KULTŪROJE

Vaisiaus vandenų kamieninių ląstelių senėjimas vienasluoksnėje kultūroje įvertintas tiriant su ląstelės ciklo reguliavimu susijusių genų raišką (21–22 pav.) bei su ląstelių senėjimu siejamą β -galaktozidazinių aktyvumą (23 pav.). Tyrimai atlikti su ląstelėmis, išskirtomis iš skirtingų mėginių, kuriuose patvirtinti skirtingi vaisiaus vystymosi sutrikimai (D3, D1 ir D4) ir D5 reprezentuoja sveiką nėštumą.



21 pav. ATM ir p53 genų raiška įvairiose kultivavimo stadijose

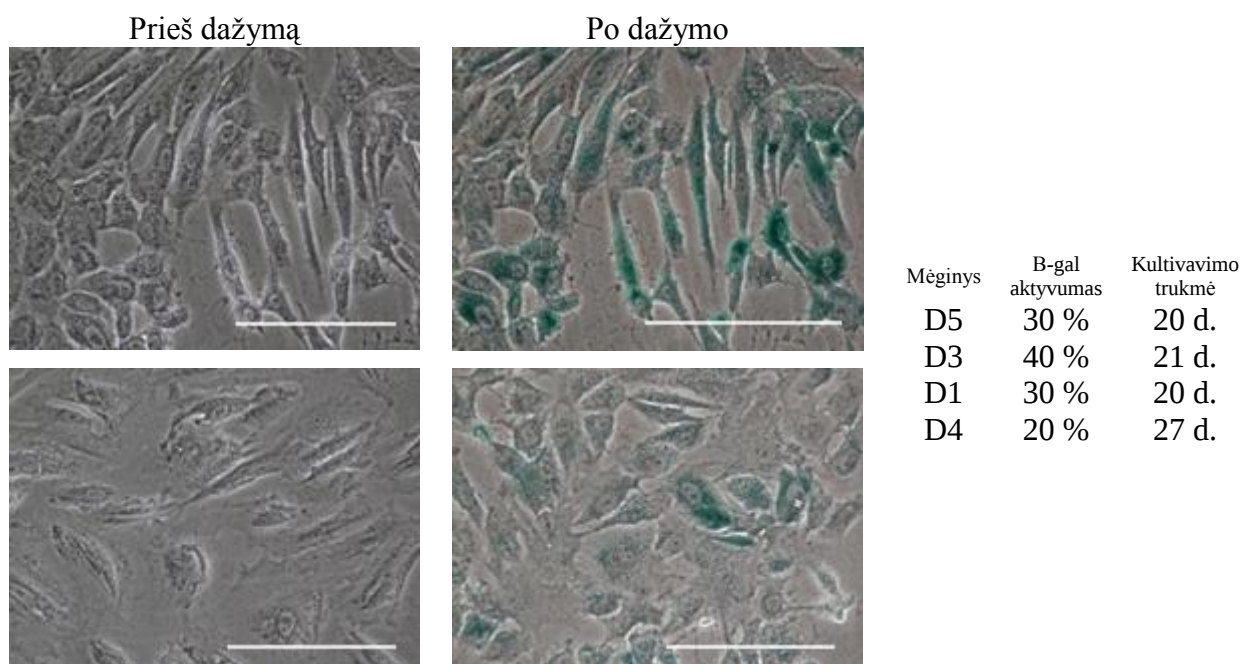
Ląstelėse, atsiradus dvigrandės DNR trūkiams, autofosforilinimo metu aktyvuojama serino/treonino kinazė ATM, kuri fosforilimo metu aktyvuoja ląstelės ciklo reguliatorių p53. Tuo tarpu p53 signalinės kaskados būdu inicijuoja ląstelės ciklo stabdymą, DNR pažeidų taisymą arba ląstelių apoptozę (Khalil ir kt., 2012). Tiriant šių baltymų genų raišką nustatyta, kad D5 ir D3 mėginiuose vėlyvuose pasažuose tiek ATM, tiek p53 raiška padidėja, o D1 ir D4 raiška atvirkščiai – sumažėja. D5 mėginio tarpiniame pasaže ATM raiška smarkiai sumažėjusi, o p53 raiška padidėjusi. Manome, kad p53 yra reguliuojama kitais signaliniais keliais.



22 pav. p21 ir p16 genų raiška įvairiose kultivavimo stadijose

Signalinės kaskados metu p53 aktyvuoja nuo ciklino priklausančių kinazių slopiklio p21 raišką ir taip inicijuojamas ląstelės ciklo stabdymas pereinant iš G1 į S fazę. Taip pat yra darbų, teigiančių, kad p53 nėra būtinas p21 aktyvacijai ląstelės ciklo reguliavimo metu (Mackleod ir kt., 1995). Kitas nuo ciklino priklausančių kinazių slopiklis p16 taip pat stabdo ląstelės ciklą G1/S metu (Becker ir Haferkamp, 2013). Negrįžtamas ląstelės ciklo stabdymas būtent šioje stadijoje būdingas ląstelių senėjimui (Sherwood ir kt., 1988). Tiriant šių genų raišką ląstelių kultivavimo metu pastebėta, kad D5 ir D3 mėginiuose p21 ir p16 raiška padidėja vėlesniuose pasažuose, D1 ir D4 mėginiuose p21 raiška sumažėja, o p16 raiška padidėja. Teigiama, kad p21 raiška pradeda mažėti, kuomet ląstelės galutinai „pasensta“, o p16 raiška didėja ir toliau (Stein ir kt., 1999). Tad

būtų galima teigti, kad D1 mėginyje ląstelės „paseno“ jau tarpiniame pasaže, kadangi jame p21 raiška padidėjo tris kartus palyginus su anktyvo pasažo ląstelėmis, o vėlyvame pasaže sumažėjo perpus, palyginus su ankstyvo pasažo ląstelėmis.



23 pav. β -galaktozidazinis aktyvumas ląstelių (D3 mėginio reprezentacinės dažymo nuotraukos) vėlyvame pasaže (mastelis 100 μ m)

β -galaktozidazė – tai lizosomų hidrolazė, fermentas, kuris normaliomis sąlygomis aktyvus, kuomet aplinkos pH=4, tačiau senstančiose ląstelėse β -galaktozidazinis aktyvumas pastebimas, kuomet aplinkos pH=6. Su senėjimu susijusio β -galaktozidazinio aktyvumo padidėjimas taip pat siejamas su ląstelių morfologiniais pokyčiais (Toussaint ir kt., 2000). Fermento aktyvumo pasikeitimą nulemia lizosomų aktyvumo ir kiekio padidėjimas senstančiose ląstelėse (Kurtz ir kt., 2000). Kultivavimo metu visų mėginių vėlyvuose pasažuose nustatytas padidėjusi β -galaktozidazės raiška. Nustatyta, kad ląstelės vienasluoksnėje kultūroje auko 20–27 dienas, o fermento aktyvumas siekia 20–40 %. Nors visų mėginių rezultatai panašūs, išsiskyrė D4 mėginys, kuris kultūroje augintas ilgiausiai, tačiau jo β -galaktozidazinis aktyvumas mažiausias.

Tiriant su ląstelės ciklo valdymu susijusių genų raišką ir β -galaktozidazės aktyvumą ląstelėse, išskirtose iš sveiko ir sutrikusio vystymosi nėštumų, nustatyta, jog raiškos modeliai D5, D3 ir D1 mėginiuose panašūs. Išsiskyrė D4 mėginys, abiejų tyrimų metu gauti duomenys rodo, kad ląstelės sensta lėtai, senėjimo procesas nėra toks aktyvus palyginus su kitais mėginiais.

IŠVADOS

1. Iš vaisiaus vandenų išskirtos ir atrinktos kamieninės ląstelės. Nustatyta, kad auginamos vienasluoksnėje kultūroje keitė savo morfologiją vėlesniuose pasažuose.
2. Tirtų paviršiaus žymenų (CD44, CD90 ir CD105) raiška keičiasi dauginant atrinktas kamienines ląsteles – ji mažėja vėlesniuose pasažuose. Transkripcijos veiksmų raiška ląstelių dauginimosi metu lieka nepakitusi, nežymiai didėja tik SOX2 raiška.
3. Nustatyta, kad VVKL diferencijuoja adipogenine, osteogenine, neurogenine ir miogenine kryptimis, tai patvirtinta morfologiniais ir specifinių genų raiškos pokyčiais.
4. MikroRNR raiškos pokyčių tendencijos tarp normalaus ir sutrikusio vaisiaus vystymosi nėštumų mėginių nesiskyrė.
5. Nustatyti genų, susijusių su senėjimo (ATM, p53, p21 ir p16) procesais pokyčiai, kurie patvirtina ląstelėse vykstančius senėjimo procesus vėlesniuose ląstelių augimo pasažuose.

 Aistė Gentelė

LITERATŪROS SĄRAŠAS

ALTUN G., LAURENT L. C., LORING J. F. Epigenetic remodeling and stem cells. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2008, 5(4), p. 139–142.

AMIT M., MARGULETS V., SEGEV H., SHARIKI K., LAEVSKY I., COLEMAN R., ITS KOVITZ-ELDOR J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(6), p. 2150–2156.

BAYREUTHER K., RODEMANN H. P., HOMMEL R., DITTMANN K., ALBIEZ M., FRAN CZ P. I. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(14), p. 5112–5116.

BEALL M. H., VAN DEN WIJNGAARD J. P. H. M., VAN GEMERT M. J. C., ROSS M. G. Amniotic Fluid Water Dynamics. *Placenta*, 2007, 28, p. 816–823.

BECKER T., HA FERKAMP S. Molecular Mechanisms of Cellular Senescence, Senescence and Senescence-Related Disorders. *InTech*, 2013, p. 25–50.

BOSSOLASCO P., MONTEMURRO T., COVA L., ZANGROSSI S., CALZAROSSA C., BUIAT IOTIS S., SOLIGO D., BOSARI S., SILANI V., DELIL IERS G. L., REBULLA P., LAZZARI L. Molecular and Phenotypic Characterization of Human Amniotic Fluid Cells and their Differentiation Potential. *Cell Research*, 2006, 16, p. 329 –336.

CALVIN S. E., OYEN M. L. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1101, p. 166–185.

CANANZI M., ATALA A., DE C. P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reproductive Biomedicine Online*, 2009, 18, p. 17-27.

CARNEVALE G., RICCIO M., PISCIOTTA A., BERETTI F., MARALDI T., ZAVATTI M., CAVALLINI G. M., BATTISTA LA SALA G., FERRARI A., DE POL A. In vitro differentiation into insulin-producing β -cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Digestive and Liver Disease*, 2013, 45, p. 669-676.

- DAMDIMOPOULOU P., RODIN S., STENFELT S., ANTONSSON L., TRYGGVASON K., HOVATTA O. Human embryonic stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2016, 31, p. 2–12.
- DE COPPI P., BARTSCH JR. G., SIDDIQUI M. M., XU T., SANTOS C. C., PERIN L., MOSTOSLAVSKY G., SERRE A. C., SNYDER E. Y., YOO J. J., FURTH M. E., SOKER S., ATALA A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(1), p. 100–106.
- DELO D. M., DE COPPI P., BARTSCH G., ATALA A. Amniotic Fluid and Placental Stem Cells. *Methods in Enzymology*, 2006, 419, p. 426-438.
- DZIADOSZ M., BASCH R. S., YOUNG B. K. Human amniotic fluid: a source of stem cells for possible therapeutic use. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2016, 214(3), p. 321-327.
- FAUZA D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2004, 18(6), p. 877–891.
- FEKETE N., ROJEWSKI M. T., FÜRST D., KREJA L., IGNATIUS A., DAUSEND J., SCHREZENMEIER H. GMP-Compliant Isolation and Large-Scale Expansion of Bone Marrow-Derived MSC. *PloS ONE*, 2012, 7(8), p. e43255.
- FINDIKLI N., CANDAN N. Z., KAHRAMAN S. Human embryonic stem cell culture: current limitations and novel strategies. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006, 13 (4), p. 581–590.
- GEER L. A., PYCKE B. F. G., SHERER D. M., ABULAFIA O., HALDEN R. U. Use of amniotic fluid for determining pregnancies at risk of preterm birth and for studying diseases of potential environmental etiology. *Environmental Research*, 2015, 136, p. 470–481.
- HACKL M., BRUNNER S., FORTSCHEGGER K., SCHREINER C., MICUTKOVA L., MÜCK C., LASCHNER G. T., LEPPERDINGER G., SAMPSON N., BERGER P., HERNDLER-BRANDSTETTER D., WIESER M., KÜHNEL H., STRASSER A., RINNERTHALER M., BREITENBACH M., MILDNER M., ECKHART L., TSCHACHLER E., TROST A., BAUER J. W., PAPAK C., TRAJANOSKI Z., SCHEIDELER M., GRILLARI-VOGLAUER R., GRUBECK-LOEBENSTEIN B., JANSEN-DÜRR P., GRILLARI J. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell*, 2010, 9, p. 291–296.

- HARMAN C. R. Amniotic Fluid Abnormalities. *Seminars in Perinatology*, 2008, 32, p. 288-294.
- HEINRICH E. M., DIMMELER S. MicroRNAs and Stem Cells: Control of Pluripotency, Reprogramming and Lineage Commitment. *Circulation Research*, 2012, 110, p. 1014-1022.
- Hemocytometer protocol* [interaktyvus] [žiūrėta: 2016 m. gegužės 10 d.]. Prieiga per internetą: < <http://www.hemocytometer.org/tag/neubauer-chamber/>>.
- HUANG H., HU M., LI P., LU C., LI M. Mir-152 inhibits cell proliferation and colony formation of CD133(+) liver cancer stem cells by targeting KIT. *Tumor Biology*, 2015, 36(2), p. 921-928.
- ILIC D., DEVITO L., MIERE C., CODOGNOTTO S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *British Medical Bulletin*, 2015, 116, p. 19–27.
- IN 'T ANKER P. S., SICCO A. SCHERJON, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C., NOORT W. A., CLAAS F. H. J., WILLEMZE R., FIBBE W. E., KANHAI H. H. H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003, 102(4), p. 1548–1549.
- JIANG G., DI BERNARDO J., MAIDEN M. M., VILLA-DIAZ L. G., MABROUK O. S., KREBSBACH P. H., O'SHEA K. S., KUNISAKI S. M. Human transgene-free amniotic-fluid-derived induced pluripotent stem cells for autologous cell therapy. *Stem Cells and Development*, 2014, 23(21), p. 2613–2625.
- JOO S., KO I. K., ATALA A., YOO J. J., LEE S. J. Amniotic Fluid-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine Research. *Arch Pharm Res*, 2012, 35, p. 271–280.
- KARAKIKES I., EDELMANN L., DESNICK R. J., KERENYI T., KHOUEIRY G., LAFFERTY J., MCGINN J. T., BRODMAN M., FUSTER V., HAJJAR R. J., POLGAR K. Amniotic Fluid Cells Are More Efficiently Reprogrammed to Pluripotency Than Adult Cells. *Cellular Reprogramming*, 2010, 12(2), p. 117–125.
- KAVIANI A., GULESERIAN K., PERRY T. E., JENNINGS R. W., ZIEGLER M. M., FAUZA D. O. Fetal Tissue Engineering from Amniotic Fluid. *Journal of the American College of Surgeons*, 2003, 196(4), p. 592–597.
- KHALIL H. S., TUMMALA H., CHAKAROV S., ZHELEV N., LANE D. P. Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. *Biodiscovery*, 2012; 1: 3.

- KIM J., LEE Y., KIM H., HWANG K. J., KWON H. C., KIM S. K., CHO D. J., KANG S. G., YOU J. Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Have Characteristics of Multipotent Stem Cells. *Cell Proliferation*, 2007, 40, p. 75–90.
- KOBAYASHI H., KIKYO N. Epigenetic regulation of open chromatin in pluripotent stem cells. *Translational Research*, 2015, 165, p. 18–27.
- KURZ D. J., DECARY S., HONG Y., ERUSALIMSKY J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(20), p. 3613–3622.
- LAZZARINI R., OLIVIERI F., FERRETTI C., MATTIOLI-BELMONTE M., DI PRIMIO R., ORCIANO M. mRNAs and miRNAs profiling of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid and skin: the double face of the coin. *Cell and Tissue Research*, 2014, 355, p. 121–130.
- LEUNG C. M., TSAI K. W., PAN H. W. DNA Methylation in Aggressive Gastric Carcinoma. *Gastric Carcinoma- New Insights into Current Management*, 2013, p. 223-242.
- LI C., ZHOU J., SHI G., MA Y., YANG Y., GU J., YU H., JIN S., WEI Z., CHEN F., JIN Y. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18(22), p. 4340–4349.
- LI Y., XU W., YAN J., XIA Y., GU C., MA Y., TAO H. Differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells *in vitro*. *International Journal Of Molecular Medicine*, 2014, 33, p. 1507–1513.
- MACLEOD K. F., SHERRY N., HANNON G., BEACH D., TOKINO T., KINZLER K., VOGELSTEIN B., JACKS T. p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & Development*, 1995, 9, p. 935–944.
- MANCINI M., SAINTIGNY G., MAHÉ C., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI M., MELINO G., CANDI E. MicroRNA-152 and -181a participate in human dermal fibroblasts senescence acting on cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix. *Aging*, 2012, 4(11), p. 843-853.
- MATHIEU J., RUOHOLA-BAKER H. Regulation of Stem Cell Populations by microRNAs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 786, p. 329–351.

- MIYAMOTO K., HAYASHI K., SUZUKI T., ICHIHARA S., YAMADA T., KANO Y., YAMABE T., ITO Y. Human Placenta Feeder Layers Support Undifferentiated Growth of Primate Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 2004; 22, p. 433–440.
- MOSCHIDOU D., MUKHERJEE S., BLUNDELL M. P. Valproic acid confers functional pluripotency to human amniotic fluid stem cells in a transgene-free approach. *Molecular Therapy*, 2012, 20(10), p. 59–67.
- MOSCHIDOU D., MUKHERJEE S., BLUNDELL M. P. Human mid-trimester amniotic fluid stem cells cultured under embryonic stem cell conditions with valproic acid acquire pluripotent characteristics. *Stem Cells Development*, 2013, 22(3), p. 449–458.
- MUN G. I., BOO Y. C. Identification of CD44 as a senescence-induced cell adhesion gene responsible for the enhanced monocyte recruitment to senescent endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2010, 298, p. H2102–H2111.
- NEW S. E. P., ALVAREZ-GONZALEZ C., VAGASKA B., GOMEZ S. G., BULSTRODE N. W., MADRIGAL A., FERRETTI P. A matter of identity —Phenotype and differentiation potential of human somatic stem cells. *Stem Cell Research*, 2015, 15, p. 1–13.
- NORONHA I. L., CAVAGLIERI R. C., JANZ F. L., DUARTE S. A., LOPES M. A. B., ZUGAIB M., BYDLOWSKI S. P. The potential use of stem cells derived from human amniotic fluid in renal diseases. *Kidney International Supplements*, 2011, 1, p. 77–82.
- PAROLINI O., SONCINI M., EVANGELISTA M. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? *Regenerative Medicine*, 2009, 4(2), p. 275–281.
- PENG H. H., CHANG S. D., CHAO A. S., WANG C. N., CHENG P. J., HWANG S. M., WANG T. H. DNA methylation patterns of imprinting centers for H19, SNRPN, and KCNQ1OT1 in single-cell clones of human amniotic fluid mesenchymal stem cell. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2012, 51, p. 342–349.
- PITTENGER M. F., MACKAY A. M., BECK S. C., JAISWAL R. K., DOUGLAS R., MOSCA J. D., MOORMAN M. A., SIMONETTI D. W., CRAIG S., MARSHAK D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284, p. 143–147.
- PRUSA A. R., HENGSTSCHLÄGER M. Amniotic fluid cells and human stem cell research – a new connection. *Medical Science Monitor*, 2002, 8(11), p. 253–257.

PRUSA A. R., MARTON E., ROSNER M., BERNASCHEK G., HENGSTSCHLÄGER M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Human Reproduction*, 2003, 18(7), p. 1489–1493.

RATAJCZAK M. Z, ZUBA-SURMA E., KUCIA M., PONIEWIERSKA A., SUSZYNSKA M., RATAJCZAK J. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in Medical Sciences*, 2012, 57(1), p. 1–17.

RENNIE K., GRUSLIN A., HENGSTSCHLAGER M., PEI D., CAI J., NIKAIDO T., BANI-YAGHOUB M. Applications of Amniotic Membrane and Fluid in Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. *Stem Cells International*, 2012, ID 721538.

RIBECCO-LUTKIEWICZ M., LY D., SODJA C., HAUKENFRERS J., SMITH B., LIU Q. Y., SIKORSKA M., BANI-YAGHOUB M. MicroRNA Expression in Amniotic Fluid Cells. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*, 2016, 11, p. 215–228.

ROSNER M., SCHIPANY K., SHANMUGASUNDARAM B., LUBEC G., HENGSTSCHLÄGER M. Amniotic Fluid Stem Cells: Future Perspectives. *Stem Cells International*, 2012, ID 741810.

ROUBELAKIS M. G., TROHATOU O., ANAGNOU N. P. Amniotic Fluid and Amniotic Membrane Stem Cells: Marker Discovery. *Stem Cells International*, 2012, ID 107836.

RYAN B., JOILIN G., WILLIAMS J. M. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2015, 8, p. 1–17.

SANZ-RODRIGUEZ F., GUERRERO-ESTEO M., BOTELLA L. M., BANVILLE D., VARY C. P., BERNABÉU C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (31), p. 32858–32868.

SHAHRIYARI L., KOMAROVA N. L. Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions: An Adaptation against Cancer? *PLoS ONE*, 2013, 8 (10), p. e76195.

SHERWOOD, S. W., RUSH, D., ELLSWORTH, J. L., AND SCHIMKE, R. T. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(23), p. 9086–9090.

STEIN G. H., DRULLINGER L. F., LARD A., 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*, 1999, 19(3), p. 2109–2117.

ŞİMŞEK G., ŞİMŞEK E. Stem Cells, Challenging Era Beyond Debate. *Niche*, 2012, 1, p. 46–48.

TAKAHASHI K., YAMANAKA S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 2006, 126, p. 663–676.

Tissue Engineering with Mesenchymal Stem Cells [interaktyvus] [žiūrėta: 2016 m. gegužės 3 d.]. Prieiga per internetą: <<http://cellmalaysia.com/tissue-engineering-with-mesenchymal-stem-cells/>>.

TOUSSAINT O., DUMONT P., DIERICK J. F., PASCAL T., FRIPPIAT C., CHAINIAUX F., SLUSE F., ELIAERS F., REMACLE J. Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, 908, p. 85–98.

TROHATOU O., ZAGOURA D., BITSIKA V., PAPPA K. I., ANTSAKLIS A., ANAGNOU N. P., ROUBELAKIS M. G. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem Cells Translational Medicine*, 2014, 3(1), p. 54–68.

UNDERWOOD M. A., GILBERT W. M., SHERMAN M. P. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *Journal of Perinatology*, 2005, 25, p. 341–348.

VAN P. P. Stem Cell Therapy for Islet Regeneration. *Stem Cells in Clinic and Research*, 2011. [interaktyvus] [žiūrėta: 2016 m. balandžio 28 d.]. Prieiga per internetą: <<http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/stem-cell-therapy-for-islet-regeneration>>.

WAGERS A. J., WEISSMAN I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*, 2004, 116, p. 639–648.

WU H., SUN Y. E. Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation. *Pediatric Research*, 2006, 59(4), p. 21–25.

WUTZ A. Epigenetic Regulation of Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 786 p. 307–328.

YOSHIDA Y., YAMANAKA S. Recent Stem Cell Advances: Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Stem Cell-Based Regeneration. *Circulation*, 2010, 122, p. 80–87.

YU Y., PARK Y. S., KIM H. S., KIM H. Y., JIN Y. M., JUNG S. C., RYU K. H., JO. I. Characterization of long-term in vitro culture-related alterations of human tonsil-derived mesenchymal stem cells: role for CCN1 in replicative senescence-associated increase in osteogenic differentiation. *Journal of Anatomy*, 2014, p. 1–9.

ZHANG F., CUI J., LIU X., LV B., LIU X., XIE Z., YU B. Roles of microRNA-34a targeting SIRT1 in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, 6, p. 195–208.

ZHANG J. G., SHI Y., HONG D. F., SONG M., HUANG D., WANG C. Y., ZHAO G. MiR-148b suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting WNT1/ β -catenin pathway. *Scientific Reports*, 2015, 5, 80–87.

ZHOU Y., KIM J., YUAN X., BRAUN T. Epigenetic Modifications of Stem Cells. *Circulation Research*, 2011, 109, p. 1067–1081.