



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Romualda Vaineikytė

**NANODALELIŲ POVEIKIS ENDOTELINĖS IR
MIOGENINĖS KILMĖS KAMIENINĖMS LĄSTELĖMS IR
JŲ KOKULTŪRAI**

**EFFECT OF NANOPARTICLES ON ENDOHELIAL AND
MYOGENIC ORIGIN STEM CELLS AND THEIR CO-
CULTURE**

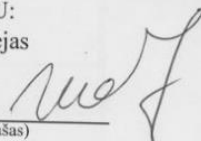
Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU:
Katedros vedėjas

(parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

Romualda Vaineikytė

**NANODALELIŲ POVEIKIS ENDOTELINĖS IR
MIOGENINĖS KILMĖS KAMIENINĖMS LĄSTELĖMS IR
JŲ KOKULTŪRAI**

**EFFECT OF NANOPARTICLES ON ENDOHELIAL AND
MYOGENIC ORIGIN STEM CELLS AND THEIR CO-
CULTURE**

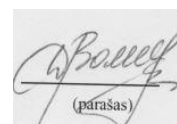
Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

dr. Daiva Baltriukienė


(parašas)

2016-05-30

Konsultantas

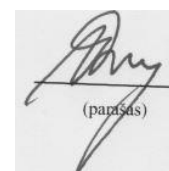
dr. Rūta Aldonytė



2016-05-31

Lietuvių kalbos konsultantas

lekt. Vaida Buivydienė


(parašas)

2016-06-02

Vilnius, 2016

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

ISBN

ISSN

Egz. sk.

Data 2016-05-30

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas: Nanodalelių poveikis endotelinės ir miogeninės kilmės kamieninėms ląstelėms bei jų kultiūrai

Autorius: **Romualda Vaineikytė**

Vadovas: **dr. Daiva Baltriukienė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Iš skirtingų ląstelių tipų sudarytos kokultiūros geriau ir tiksliau *in vitro* atkartoja audinio struktūrą nei pavienių ląstelių populiacija, todėl jos vis dažniau yra naudojamos tiek toksiškumo, tiek ir audinių inžinerijos tyrimuose. Tuo tikslu, siekėme suformuoti naujo tipo kokultiūrą, sudarytą iš žiurkės endotelinių ląstelių pirmtakių (ELP) ir žiurkės nepilnos diferenciacijos raumens kilmės ląstelių (Mio) bei ištirti šios kokultiūros savybes.

Nanodalelių naudojimas yra sparčiai besivystanti sritis, tačiau duomenų apie jų ilgalaikį poveikį žmogaus organizmui vis dar nepakanka. Nedaug žinoma ir apie nanodalelių poveikį kamieninėms ląstelėms. Todėl antra darbo dalis skirta ZnO, TiO₂ nanodalelių ir anglies nanovamzdelių (CnV), plačiai naudojamų pramonėje bei medicinoje, poveikio įvertinimui panaudojant ELP bei Mio ląsteles ir jų kokultiūrą. Nustatėme, kad didžiausiu toksiniu poveikiu pasižymėjo ZnO nanodalelės. Tačiau mažesnės šių nanodalelių koncentracijos, atvirkščiai, skatino kokultiūros proliferaciją. Jos taip pat veikė ELP ląstelių morfologiją, adheziją, migraciją bei angiogeninį potencialą. CnV akivaizdžiai stiprino ELP bei Mio ląstelių ir jų kokultiūros adheziją. Kokultiūra buvo atsparesnė TiO₂ poveikiui. Taigi, nanodalelių poveikis ELP-Mio kokultiūroje skiriasi nuo atskirų ląstelių populiacijų.

Darbą sudaro 6-ios dalys: įvadas; literatūros apžvalga; medžiagos, metodai, aparatūra; rezultatai ir jų aptarimas; išvados; literatūros sąrašas.

Darbo apimtis: 64 psl. teksto be priedų, 26 paveikslai, 6 lentelės, 134 bibliografiniai šaltiniai

Prasminiai žodžiai: endotelinės ląstelės pirmtakės; nepilnos diferenciacijos miogeninės ląstelės; kokultiūra; nanodalelės; citotoksiškumas.

Vilnius Gediminas Technical University

Faculty of Fundamental Sciences

ISBN ISSN

Copies No.

Date 2016-05-30

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Final Thesis

Title: Effect of Nanoparticles on Endothelial and Myogenic Origin Stem Cells and Their Co-culture

Author: **Romualda Vaineikytė**

Academic supervisor: **dr. Daiva Baltriukienė**

Thesis language

☒ X

Lithuanian

Annotation

Cell co-culture is a better example of tissue structure *in vitro* than singled out cell populations and show more use in toxicology and tissue engineering. The first our aim was to create a novel type of co-culture based on the rat endothelial progenitor cells (EPC) and rat myogenic progenitor cells (Myo).

Nanoparticles is a rapidly developing area, however there is still much remaining to be elucidated concerning their possible health effects. Little is also known about the impact of nanoparticles on stem cells. Therefore, the second part of this thesis is directed at the elucidation of ZnO and TiO₂ nanoparticles, and carbon nanotubes (CnT) effect on EPC, Mio cells and their co-culture. Data obtained showed, that ZnO nanoparticles had higher effect on EPC and Mio cells than on their co-culture. However, the smallest tested concentrations of ZnO stimulated the proliferation of co-culture. These nanoparticles had also effect on EPC morphology, adhesion, migration, and angiogenic potential. CnT had remarkable effect on adhesion of tested cell populations. Co-culture was rather resistant to TiO₂. Consequently, the effect of nanoparticles on co-culture differs from ELP and Mio cell populations.

The thesis consists of the 6 following parts: introduction; literature review; reagents and methods; results and discussion; conclusions; references.

The thesis contains — 64 p. text without appendixes, 26 pictures, 6 tables, 134 references.

Keywords: endothelial progenitor cells; myogenic progenitor cells; co-culture; nanoparticles; toxicity

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Romualda Vaineikytė, 20141393

(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 30 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Nanodalelių poveikis endotelinės ir miogeninės kilmės kamieninėms ląstelėms bei jų kokultūrai“ 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: dr. Rūta Aldonytė, dr. Daiva Baltriukienė. Mano darbo vadovas dr. Rūta Aldonytė.

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



(Parašas)

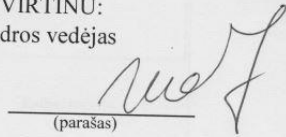
Romualda Vaineikytė

(Vardas ir pavardė)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

TVIRTINU:
Katedros vedėjas

(parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

2016-06-03

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentui (ei) Romualdai Vaineikytei

Baigiamojo darbo (projekto) tema: Nanodalelių poveikis endotelinės ir miogeninės kilmės ląstelėms bei jų kokultūrai

patvirtinta 2015 m. spalio 11 d. dekanų potvarkiu Nr. 391fm

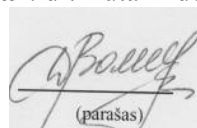
Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2016 m. gegužės 30 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

- Gauti iš endotelinų ląstelių pirmtakių (ELP) ir nepilnos diferenciacijos miogeninės kilmės ląstelių (Mio) sudarytą kokultūrą ir įvertinti jos savybes – proliferacijos potencialą, kolonijų formavimosi intensyvumą, angiogeninį potencialą, migraciją.
- Iširti ZnO, TiO₂ nanodalelių ir anglies nanovamzdelių galimą citotoksinį poveikį ELP-Mio ląstelių kokultūrai ir palyginti jį su atskirų ELP ir Mio ląstelių kultūromis.
- Įvertinti nanodalelių poveikį ELP bei Mio ląstelių ir jų kokultūros adhezijai, migracijai, angiogeniniam potencialui.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantai: dr. Rūta Aldonytė

Vadovas: dr. Daiva Baltriukienė


(parašas)

2016-05-30

Užduotį gavau: Romualda Vaineikytė



2016-05-30

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	8
IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. Endotelinės ląstelės pirmtakės	10
1.2. Raumens kamieninės ląstelės.....	12
1.3. Kokultūra.....	16
1.4. Ląstelių savybės.....	19
1.4.1. Adhezija.....	19
1.4.2. Migracija.....	21
1.4.3. Proliferacija.....	23
1.4.4. Diferenciacija.....	24
1.4.5. Žūties mechanizmai.....	25
1.5. Nanodalelės.....	26
1.5.1. Cinko oksido nanodalelės.....	27
1.5.2. Titano dioksido nanodalelės.....	28
1.5.3. Anglies nanovamzdeliai.....	29
2. MEDŽIAGOS. METODAI. APARATŪRA.....	31
2.1. Medžiagos.....	31
2.2. Aparatūra.....	31
2.3. Tyrimų metodai.....	31
2.3.1. Endotelinį ląstelių išskyrimas iš kraujagyslių.....	31
2.3.2. Miogeninių ląstelių išskyrimas iš griaučių raumens.....	32
2.3.3. Ląstelių auginimas <i>in vitro</i>	32
2.3.4. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo vertinimas.....	32
2.3.5. AcLDL absorbcija.....	32
2.3.6. Miogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas.....	33
2.3.7. Kokultūros gavimas.....	33
2.3.8. Gyvų ląstelių žymėjimas fluorescenciniais dažais.....	33
2.3.9. Ląstelių kolonijų formavimo vertinimas.....	34
2.3.10. Ląstelių proliferacijos vertinimas.....	34
2.3.11. Nanodalelių paruošimas.....	35
2.3.12. Ląstelių citotoksiškumo vertinimas.....	35
2.3.13. Ląstelių migracijos vertinimas.....	35
2.3.14. Angiogenetinio potencialo vertinimas.....	35
2.3.15. Ląstelių dydžio vertinimas.....	36
2.3.16. Ląstelių gyvybingumo vertinimas.....	36
2.3.17. Ląstelių adhezijos vertinimas.....	37
2.3.18. Statistinė duomenų analizė.....	37
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	38
3.1. ELP bei Mio ląstelės ir jų charakteristikos.....	38
3.2. ELP bei Mio ląstelių kokultūros gavimas ir savybių tyrimas.....	47
3.3. Nanodalelių poveikis ELP, Mio ląstelėms bei jų kokultūrai.....	47
3.3.1. Nanodalelių citotoksiškumo vertinimas.....	49
3.3.2. Nanodalelių sukeliamos žūties pobūdžio nustatymas.....	52
3.3.3. Nanodalelių indukuojamų morfologinių pokyčių ELP ir Mio ląstelėse įvertinimas.....	55
3.3.4. Ląstelių angiogeninio potencialo priklausomybė nuo poveikio nanodalelėmis.....	57
3.3.5. Ląstelių adhezijos priklausomybė nuo poveikio su nanodalelėmis.....	57
IŠVADOS.....	59
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	60

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AO – akridino oranžas

EB – etidžio bromidas

EDTA – etilendiamino tetraacto rūgštis

ELP – endotelinės ląstelės pirmtakės

FB – fosfatinis buferis

FVS – fetalinis veršelio serumas

IMDM - Iscoves‘ s modifikuota Dulbecco terpė

AcLDL – acetilinti mažo tankio lipoproteinai

MTT (3-(4,5- dimetiltiazol- 2 – yl) – 2,5- difeniltetrazolio bromidas

Mio – nepilnos diferenciacijos miogeninės ląstelės

ZnO – cinko oksidas

TiO₂ – titano dioksidas

CnV – anglies nanovamzdeliai

ND – nanodalelės

TU – tarpląstelinis užpildas

IVADAS

Dviejų ir daugiau ląstelių tipų auginimas kartu kokultūroje geriau ir tiksliau atspindi ląstelių sąveikas audinyje, todėl tokios sistemos vis dažniau taikomos įvairiuose biomediciniuose tyrimuose. Ypač sėkmingai kokultūrų metodikos yra taikomos siekiant sukurti funkcionalų pilno storio odos lopą, kuris galėtų būti taikomas odos regeneracijai, įvairiems odos pažeidimams gydyti, žaizdų gijimui tirti, taip pat citotoksinių medžiagų vertinimui. Be to, kokultūros laikomos ypatingai perspektyviomis ir audinių inžinerijos tyrimuose.

Kita sparčiai besivystanti nauja sritis biomediciniuose tyrimuose yra nanodalelių (ND) kūrimas ir jų panaudojimas diagnostikai bei terapijai. Jau žinoma, kad ND gali būti naudojamos kaip vaistų pristatymo sistemos, taip pat genų įvedimui į ląsteles, tokiu būdu išvengiant virusinių vektorių naudojimo. Dėl savo savybių, jos gali būti naudojamos ir ląstelių vaizdinimui, dominančių baltymų lokalizavimui ląstelėje ir kt. tikslams. Ir nors pastaraisiais metais ND yra intensyviai tiriamos, tačiau ilgalaikis poveikis žmogaus sveikatai dar nėra pakankamai įvertintas. Pavyzdžiui, TiO_2 ND laikomos pakankamai saugiomis ir naudojamos kosmetikos pramonėje. Tačiau yra duomenų, kad šios ND gali praeiti pro hematoencefalinį bei placentos barjerus ir net sukelti vėžį.

Todėl norint įvertinti nanodalelių poveikį ir jų indukuojamus molekulinis mechanizmus, reikalingi detalūs tyrimai. Ir čia gali pasitarnauti kokultūros, sudarytos iš kelių ląstelių tipų.

Šio darbo tikslas – įvertinti nanodalelių poveikį kokultūrai, sudarytai iš endotelinių ląstelių pirmtakių ir raumens kilmės kamieninių ląstelių.

Darbo uždaviniai:

- Gauti iš endotelinių ląstelių pirmtakių (ELP) ir raumens kilmės kamieninių ląstelių (Mio) sudarytą kokultūrą ir įvertinti jos savybes – proliferacijos potencialą, kolonijų formavimosi intensyvumą, angiogeninį potencialą, migraciją.
- Ištirti ZnO ir TiO_2 nanodalelių bei anglies nanovamzdelių galimą citotoksinį poveikį ELP-Mio ląstelių kokultūrai ir palyginti jį su atskirų ELP ir Mio ląstelių kultūromis.
- Įvertinti nanodalelių poveikį ELP bei Mio ląstelių ir jų kokultūros adhezijai, migracijai, angiogeniniam potencialui.

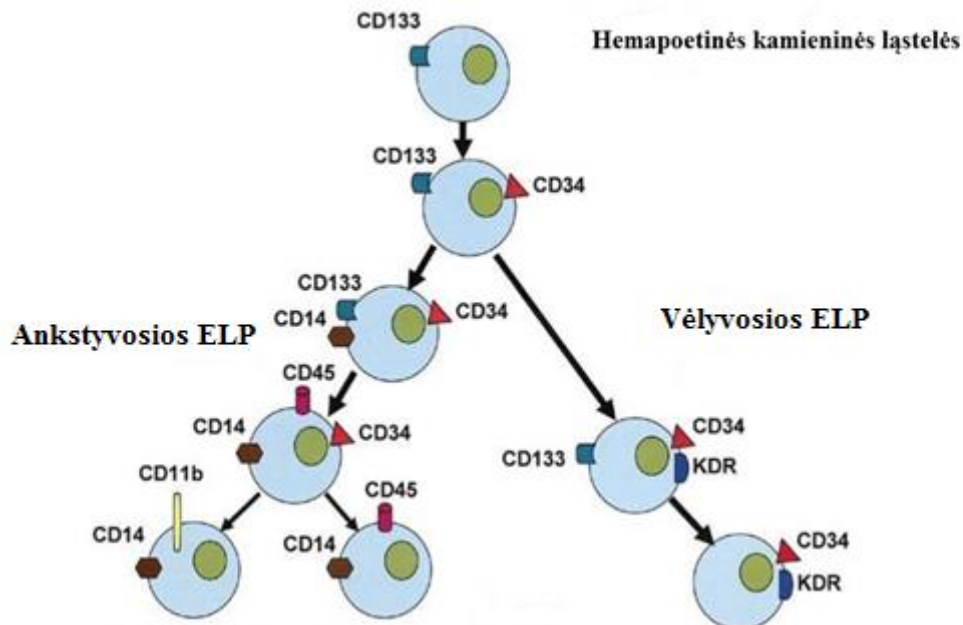
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Endotelinės ląstelės pirmtakės

Pirmą kartą endotelinės ląstelės pirmtakės (ELP) nustatytos 1990 m. vystantis širdies ir kraujagyslių sistemai embriono organizme. Nustatyta, kad šios ląstelės neturi didelių diferencijavimo galimybių, bet pasižymi dideliu potencialu diferencijuotis į endotelines ląsteles. Tokios ląstelės buvo pavadintos angioblastais (Kränkel *et al.*, 2012). Suaugusio žmogaus kraujyje cirkuliuojančias ELP pirmasis aptiko Asahara su kolegomis (Asahara *et al.*, 1997).

Embrioninės ELP, kurių funkcija - kraujo indų formavimas, vystosi iš migruojančių mezoderminių ląstelių. Jos geba proliferuoti, migruoti ir diferencijuotis į endotelines ląsteles. Suaugusio žmogaus kaulų čiulpuose gausu audiniams specifinių kamieninių ląstelių ir ląstelių pirmtakių. ELP sudaro iki 5 procentų šių ląstelių. Jos gali būti suskirstytos į dvi pagrindines rūšis – hemopoetinės (HELP) ir nehemopoetinės (NHELP) (Kränkel *et al.*, 2012). HELP kilusios tiesiogiai iš kaulų čiulpų ir atpažįstamos pagal hemapoetinių ląstelių markerius. Tačiau yra ganėtinai sudėtinga atskirti ELP nuo likusių hemapoetinių ląstelių. NHELP yra randamos ne kaulų čiulpuose, o kraujyje ar audiniuose ir savo morfologija labiau primena endotelines ląsteles. Iš kokio šaltinio jos tiksliai yra kilusios - nėra aišku (Kränkel *et al.*, 2012; Vasa *et al.*, 2001; Werner and Nickenning, 2005).

Suaugusio organizmo ELP gali būti išskiriamos iš periferinio kraujo, kaulų čiulpų, kraujagyslių sienelės. Jos gali būti skirstomos į ankstyvasias (aELP) ir vėlyvasias (vELP) (1.1 pav.) (Hristov and Weber, 2004; Hur *et al.*, 2004; Atesok, 2011). Ankstyvosios ELP susideda iš monocitinių ląstelių, kurios nevirsta subrendusiomis endotelinėmis ląstelėmis, bet integruojasi į pažeistos kraujagyslės apatinį endotelio sluoksnį (Kränkel *et al.*, 2012). Iš kaulų čiulpų išskirtos aELP ekspresuoja ankstyvuosius hemapoetinius žymenis: CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺/VE-kaderinas⁻ (Peichev *et al.*, 2000). Tuo tarpu iš periferinio kraujo išskirtos ankstyvosios ELP po 7 dienų kultivavimo pasižymi CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺/CD14⁻/VE-kaderinas⁻/eNOS⁻ fenotipu. aELP būdinga ištišusios verpstės formos morfologija (Hur *et al.*, 2004). Šio ląstelės matrigelyje neformuoja vamzdelių formos struktūrų, nors jų citoplazmos poliai ir pailgėja. aELP VEGF ir IL-8 citokinų koncentracija didesnė, nei vELP. aELP populiacija yra heterogeniška, kurios keletas klonų formuoja vELP. Skirtinguose eksperimentuose nustatyti skirtingi aELP KDR, CD14 ir Flt-1 genų raiškos lygiai, parodantys šios ląstelių populiacijos heterogeniškumą (Cheng *et al.*, 2013). aELP *in vitro* išgyvena trumpai – 2-4 savaites (Hur *et al.*, 2004).



1.1 pav. ELP diferenciacija iš hemapoetinių kamieninių ląstelių. Numanoma ELP diferenciacija į ankstyvasias ir vėlyvasias ELP, šioms ląstelėms būdingi paviršiaus žymenys (pagal Atesok, 2011).

Po 2-4 savaičių formuojasi vELP. Jos susideda tik iš minimalaus skaičiaus mieloidinių ląstelių, o didžioji jų dalis gali diferencijuotis į endotelines ląsteles (Kränkel *et al.*, 2012). Ląstelėms virstant į vELP, keičiasi jų morfologija, citoplazma tampa lygesnė, ląstelės tvirčiau prilimpa prie paviršiaus ir formuoja grindinio tipo monosluoksnį, mažėja CD45 raiška, o KDR ir Ve-kaderino ekspresija išauga. Būdinga aukšta ir CD31 raiška (Hur *et al.*, 2004). Po kelių savaičių palaikymo *in vitro* tokia ląstelių linija pradeda panašėti į suaugusias endotelines ląsteles ir ekspresuoja CD133⁻/CD34⁺/VEGFR-2⁺/CD14⁻/VE-kadherinas⁺/eNOS⁺/von Willebrand faktorius⁺ (Gulati *et al.*, 2003; Rehman *et al.*, 2003). NO sintezė yra būdinga abiejų tipų ląstelėms, tačiau vELP ji intensyvesnė. vELP matrigelyje formuoja kapiliaro tipo vamzdelius. vELP homogeniškos ir labiau diferencijuotos nei aELP, be to ilgiau išlieka gyvybingos kultivuojant *in vitro* (Hur *et al.*, 2004).

ELP pasižymi tiek hemapoetinėms, tiek ir endotelinėms ląstelėms būdingomis savybėmis. ELP, kaip ir hemapoetinės ląstelės, formuoja kolonijas sudarančius vienetus (Hill *et al.*, 2003). Kaip ir endotelinės ląstelės, ELP formuoja kapiliaro tipo vamzdelius ir išskiria NO (Qiurici *et al.*, 2001; Hristov ir Weber, 2004). Bendra izoliuotų ELP savybė yra prisijungti acetilintus mažo tankio lipoproteinus (ac-LDL) ir prisijungti endoteliui tipinę lektiną (Asahara *et al.*, 1997; Gulati *et al.*, 2003; Hristov and Weber, 2004).

ELP išskyrimas ir identifikavimas. ELP identifikuoti ir išskirti iš kraujo galima skirtingais metodais. Vienas iš jų, tai surinkti mažo tankio vienbranduolės ląstelės iš žmogaus periferinio kraujo ir jas užsėti į fibronektinu padengtų lėkštelių su endotelio augimo faktoriais praturtinta terpe. Po 4-5 dienų pašalinamos neprilipusios ląstelės (Vasa *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2002;

Badorff *et al.*, 2002; Yoder, 2012). Šiuo metodu ELP atrenkamos pagal jų morfologiją, adheziją prie fibronektino, ląstelės paviršiaus baltymų ekspresiją, AcLDL įsisavinimą ir prisijungimą prie lektino (Yoder, 2012).

Kitas metodas susijęs su ląstelės paviršiaus antigenų nustatymu (Walter *et al.*, 2002; Badorff *et al.*, 2002; Yoder, 2012). Šio metodo trūkumas - unikalių ELP paviršiaus žymenų trūkumas, todėl reikia atsižvelgti į jų derinius (Yoder, 2012). Jų identifikavimui gali būti naudojamos magnetinės nanodalelės padengtos antikūnais prieš CD133, CD34 ir CD31 (Quirici *et al.*, 2001; Hristov and Weber, 2004).

ELP atrinkti galima ir pagal jų gebėjimą plokštelėje formuoti kolonijas (Vasa *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2002; Badorff *et al.*, 2002; Yoder, 2012). Iš vienos koloniją formuojančios ląstelės per 14 dienų galima gauti 10 tūkst. ląstelių (Yoder, 2012).

In vitro kamieninės ir pirmtakinės ląstelės pasižymi gebėjimu savaime atsistatyti ir diferencijuotis į organui specifines ląstelių linijas. Todėl tokių ląstelių transplantacija gali būti taikoma audinių atstatymui. Parodyta, kad ELP transplantacija gali būti naudinga netgi nenaudojant augimo faktorių (Asahara *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2013). Be to, ELP gali būtų naudojamos kaip biožymuo įvairių ligų diagnostikoje, nes kraujyje esančių ELP sumažėjimas stebimas sergant vainikinių arterijų liga, insulto (Kränkel *et al.*, 2012), inkstų nepakankamumo atvejais (Goligorsky *et al.*, 2009; Kale *et al.*, 2003) ar sergant smegenų kraujagyslių ligoms. ELP skaičius išauga miokardo infarkto, vainikinių arterijų sindromo ar nestabilios krūtinės anginos atvejais (Werner and Nickenig, 2005). ELP kiekis didėja, nes jos yra mobilizuojamos iš kaulų čiulpų į kraujotakos sistemą (Kränkel *et al.*, 2012). Padidėjęs ELP skaičius išeminio miokardo vietoje lemia kapiliarų vystymąsi ir prisideda prie pagerėjusių širdies funkcijų (Badorff *et al.*, 2002; Doyle *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013). ELP blokuoja miokardo fibrozę ir išsaugoti miokardo funkcijas (Asahara *et al.*, 1997).

1.2. Raumens kamieninės ląstelės

Raumens audinyje egzistuoja kelios nepilnos diferenciacijos ląstelių populiacijos, iš kurių gausiausia raumens satelitinės ląstelės. Tai – nediferencijuotos vienbranduolės miogeninės ląstelės, randamos griaučių raumenyse (Charge and Rudnicki, 2004). Joms yra būdingas savęs atnaujinimo potencialas bei diferenciacija į subrendusias miofibriles (Wagers and Conboy, 2005). A. Mauro 1961 m. pirmasis paskelbė, kad satelitinės ląstelės gali atkurti griaučių raumenų miogenezę po įvykusio sužeidimo (Mauro, 1961). Suaugusiame organizme satelitinės ląstelės aptinkamos šalia bazinės laminos, išsidėsčiusios apie miofibriles (Charge and Rudnicki, 2004). Paprastai satelitinės ląstelės yra mitotiškai ramios, bet jas gali aktyvuoti stresas ar įvairūs raumenų

sužeidimai. Satelitinės ląstelės nuo savo palikuonių – miogeninių pirmtakinių ląstelių (mioblastų) skiriasi biochemiškai ir genetiškai (Peault *et al.*, 2007).

Šių ląstelių pirmtake laikoma Pax3⁺/Pax7⁺ ląstelių populiacija (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004, Peault *et al.*, 2007; Zammit *et al.*, 2006). Suaugusio organizmo satelitinės ląstelės ekspresuoja paviršiaus žymenį CD34, kuris taip pat yra būdingas ir endotelinėms mikrokraujagyslių ląstelėms (Zammit *et al.*, 2006). Satelitinės ir endotelinės ląstelės gali būti kilusios iš to paties šaltinio (Kardon *et al.*, 2002) arba kai kurios endotelinės ląstelės gali būti pirmtakinės daliai satelitinių ląstelių (Zammit *et al.*, 2006). Iš kaulų čiulpų išskirtos ląstelės dalyvauja miofibrilių formavime ir ekspresuoja satelitinių ląstelių žymenis (Dreyfus *et al.*, 2004). Tačiau tik satelitinių ląstelių nišoje esančios ląstelės gali būti pilnai funkcionalūs miogeninių ląstelių pirmtakai, o kitos ląstelių linijos, pvz. išskirtos iš kaulų čiulpų, tokiu funkcionalumu nepasižymi (Zammit *et al.*, 2006).

Satelitinių ląstelių morfologija. Subrendusiuose raumenyse satelitinės ląstelės yra paplokščios, verpsto formos, ilgėjančios lygiagrečiai miofibrilėms (Miur *et al.*, 1965). Satelitinėms ląstelėms būdingas sumažėjęs branduolys, tačiau didesnis heterochromatino kiekis bei mažesnis organelių kiekis (Schultz *et al.*, 1978; Charge and Rudnicki, 2004).

Subrendusiame raumenyje ramybės būsenoje esančios satelitinės ląstelės ekspresuoja Pax7, CD34, adhezijos molekulę M-kadheriną (Beauchamp *et al.*, 2000; Zammit *et al.*, 2006, Tedesco *et al.*, 2010), tačiau neekspresuoja MyoD ar miogenino (Wagers and Conboy, 2005). Satelitinių ląstelių atpažinimui geriausiais žymuo yra Pax7 (Zammit *et al.*, 2006). Kai satelitinės ląstelės yra aktyvuojamos, inicijuojama ekspresuoti MyoD raiška (Grounds *et al.*, 1992). Ląstelės pradeda dalintis, aktyvuojami ląstelės ciklo genai, pvz., PCNA. Miogeninas žymi diferenciacijos miogenine linkme pradžių (Grounds *et al.*, 1992; Zammit *et al.*, 2006). Kiti satelitinėms ląstelėms būdingi žymenys: VCAM-1 (kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė 1), c-met (hepatocitų augimo faktoriaus receptorių), CD56 (nervinių ląstelių adhezijos molekulė 1), Foxk1, sindekanai 3 ir 4 ir kiti (1 lentelė).

Satelitinėms ląstelėms būdingas nesimetriškas dalijimasis. Prieš dalijantis ląstelės pradeda ekspresuoti Pax7 ir MyoD genus. Didžioji dalis ląstelių toliau skatina padidėjusią Pax7, MyoD ekspresiją ir diferencijuojasi (Tedesco *et al.*, 2010). Likusioje ląstelių dalyje MyoD geno ekspresija stabdoma, ląstelės ciklas sustoja ir satelitinės ląstelės tampa „tylinčiomis“ (Zammit *et al.*, 2006). Nustatyta, kad apie 80% ląstelių diferencijuojasi, likusi dalis atnaujiną satelitinių ląstelių nišą (Charge and Rudnicki, 2004). Šių ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos reguliacijai Notch signalinis kelias (Conboy and Rando, 2002).

Kitos raumens kamieninės ląstelės. Griaučių raumens regeneracijos procese gali dalyvauti ir kitos raumens kamieninių ląstelių populiacijos (2 lentelė). Tai *raumens kilmės kamieninės ląstelės* - MDSC (angl. *muscle-derived stem cells*). Jos yra ankstyvos miogeninės kamieninės ląstelės ir

gali būti satelitinių ląstelių pirmtakai (Jankowski *et al.*, 2002; Peault *et al.*, 2007). Joms būdinga visos kamieninių ląstelių savybės – savęs atnaujinimas, proliferacija bei diferenciacija osteogenine, miogenine adipogenine, chondrogenine, hemapoetine linkme (Jankowsky *et al.*, 2002).

1.1 lentelė. Satelitinių ląstelių žymenys.

Genas	Ekspresija tylinčiose ląstelėse	Ekspresija aktyvuotose ląstelėse	Funkcija	Literatūros šaltinis
Pax7	+	+	Transkripcijos faktorius	Zammit <i>et al.</i> , 2006
Pax3	+	-	Transkripcijos faktorius	Zammit <i>et al.</i> , 2006
Myf5	+/-	+	Transkripcijos faktorius	Kassar-Duchossoy <i>et al.</i> , 2004
Sindekanas 3 ir 4	+	+	Transmembraninis proteoglikanas	Cornelison <i>et al.</i> , 2000
VCAM-1	+	+	Adhezijos molekulė	Wagers and Conboy, 2005
c-met	+	+	HGF receptoriaus	Zammit <i>et al.</i> , 2006
Foxk1	+	+	Branduolio faktorius	Garry <i>et al.</i> , 2000
CD34	+	+	Adhezijos baltymas	Beauchamp <i>et al.</i> , 2000
M-kadherinas	+	+	Adhezijos baltymas	Beauchamp <i>et al.</i> , 2000
Kaveolinas-1	+	+	Membranos baltymas	Garry <i>et al.</i> , 2000
$\alpha 7$ integrinas	+	+	Adhezijos baltymas	Blanco-Rose <i>et al.</i> , 2001
$\beta 1$ integrinas	+	+	Adhezijos baltymas	Blanco-Rose <i>et al.</i> , 2001
Cd56	+	+	Homofilinis glikoproteinas	Fukada <i>et al.</i> , 2004
Cxcr4	+/-	-	SDF1 receptoriaus	Sherwood <i>et al.</i> , 2004
Nestinas	+	-	Tarpinių filamentų baltymas	Fukada <i>et al.</i> , 2004
NCAM	+	+	Adhezijos molekulė	Illa <i>et al.</i> , 1992
Desminas	-	+	Citoskeleto baltymas	Wagers and Conboy, 2005
MyoD	-	+	Transkripcijos faktorius	Kassar-Duchossoy <i>et al.</i> , 2004
MNF	+	+	Transkripcijos faktorius	Garry <i>et al.</i> , 1997
MSTN	+	-/+	Transkripcijos faktorius	Cornelison <i>et al.</i> , 2000
IRF2	+	+	Transkripcijos faktorius	Jesse <i>et al.</i> , 1998
Msx1	+	-	Transkripcijos faktorius	Cornelison <i>et al.</i> , 2000

Parodyta, kad CD45⁺/Sca1⁺ ląstelių subpopuliacija aptinkama raumenyse ir ekspresuojanti Pax7 gali diferencijuotis į *mioblastus* (Peault *et al.*, 2007). Šiuo atveju, ląsteles miogenine linkme nukreipti padeda nuo Wnt kelio priklausantis mechanizmas (Seale *et al.*, 2004). Proliferuojantiems mioblastams yra būdingi Myf5⁺/ MyoD⁺. Jiems diferencijuojantis į miocitus, inicjuojama miogenino, MRF4 ir raumenims specifinio MHC bei MCK raiška (Charge and Rudnicki, 2004).

Raumenų šoninės populiacijos ląstelėms SP (angl. *side population*) būdinga Sca-1⁺ (kamieninių ląstelių antigenas 1), CD45⁻, CD43⁻, c-kit⁻ (hemapoetiniai žymenys) (Montanaro *et al.*, 2004). SP populiacija skiriasi nuo satelitinių ląstelių. Jai nebūdinga Pax7 geno ekspresija. Tačiau *in vitro* kultivuojant su miogeninėmis ląstelėmis, SP įgauna fenotipą būdingą „tylinčioms“ ir aktyvuotoms satelitinėms ląstelėms (Asakura *et al.*, 2002). Po ląstelių suleidimo į pažeistą

raumens audinį, SP ląstelėse indukuojamos Myf5, Pax7, desminino genų raiškos. Taip pat šioms ląstelėms būdingas parakrininis veikimas, jos sekretuoja faktorius, kurie aktyvuoja kitų miogeninių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją (Peault *et al.*, 2007).

Kitos ląstelės, turinčios potencialą atstatyti pažeistus raumenis. Mesoangioblastai pirmiausiai buvo identifikuoti embriono aortos sienelėje, kaip ląstelės ekspresuojančios ankstyvųjų endotelinų ląstelių žymenis (De Angelis *et al.*, 1999) ir galinčios diferencijuotis į skirtingo tipo mezodermos ląsteles (Peault *et al.*, 2007). *CD133⁺ ląstelės* ekspresuoja CD44, limfocitų funkcinį antigeną 1, P selektino glikoproteininį ligandą 1, vėlyvąjį antigeną 4 ir L selektiną. Šių ląstelių populiacija geba migruoti pro kraujagyslių sienelę ir atkurti raumeninį audinį po kraujagyslės pažeidimo (Torrente *et al.*, 2004; Tedesco *et al.*, 2010). *Pericitai* dengia endotelines ląsteles kapiliaruose ir mikrokraujagyslėse. Šios ląstelės reguliuoja kraujagyslių susitraukimus ir gali stabdyti endotelinų ląstelių dalijimąsi. Joms yra būdingas miogeninis potencialas (Peault *et al.*, 2007). Žmogaus multipotentinės riebalinės ląstelės (hMADS) suleistos į pažeistą raumenį spontaniškai diferencijuojasi į mioblastus (Tedesco *et al.*, 2010).

Taip pat miogeninis potencialas pastebėtas ELP, hemapoetinių kamieninių ląstelių, mezenchiminių kamieninių ląstelių, multipotentinių suaugusio organizmo kamieninių ląstelių populiacijose (Tedesco *et al.*, 2010).

1.2 lentelė. Kitos (ne satelitinės) miogeninės krypties ląstelių populiacijos.

Ląstelių populiacija	Anatominė lokalizacija	Diferenciacijos kryptis	Miogeniniai molekuliniai žymenys	Literatūros šaltinis
Mioblastai	Raumenys	Miogeninė, osteogeninė	CD56, MyoD, Myf5, Desminas	Charge and Rudnicki, 2004
Šoninės populiacijos	Tarpinės, susijusios su kraujagyslėmis	Miogeninė	CD34 ⁺ /, CD133 ⁺ /	Montanaro <i>et al.</i> , 2004
MDSC	Miofibrilių periferija	Miogeninė, osteogeninė, hematopoetinė, kardiogeninė, chondrogeninė	CD34 ⁺ /	Qu-Peterson <i>et al.</i> , 2002
Mio-endotelinės	Miofibrilių periferija netoli kraujagyslių	Miogeninė, kardiogeninė, chondrogeninė, osteogeninė	CD34, CD144, CD56, CD31	Peault <i>et al.</i> , 2007
Pericitai	Kapiliarų periferija	Miogeninė, kardiogeninė, chondrogeninė, osteogeninė	CD146, PDGFRB, NG2	Peault <i>et al.</i> , 2007
Mesoangioblastai	Kraujagyslių sienelė	Miogeninė, kardiogeninė, osteogeninė, adipogeninė	NG2	Peault <i>et al.</i> , 2007
CD133 pirmtakai	Miofibrilių periferija šalia kraujagyslių sienelės	Miogeninė, hematopoetinė, vaskulogeninė	CD34 ⁺ / Thy-1 ⁺ /, CD133, CD146	Torrente <i>et al.</i> , 2004
CD45 ⁺ /Sca1 ⁺	Raumenyse	Miogeninė, vaskulogeninė	CD45, Sca1, Pax7	Peault <i>et al.</i> , 2007
hMADS	Riebalinis audinys	Miogeninė, adipogeninė, osteogeninė	MyoD	Tadesco <i>et al.</i> , 2010

1.3. Kokultūra

Biologinių audinių formavimasis, išsilaikymas, atsistatymas priklauso nuo ląstelių tarpusavio sąveikos, signalinių molekulių bei tarpląstelinio užpildo (TU), kuris reikalingas ląstelių mikroaplinkai palaikyti, audinių formai išlaikyti, ląstelių prisitvirtinimui, organizacijai ir migracijai (Bogdanowicz and Lu, 2013; Paschos *et al.*, 2014). TU savybės (geometrija, elastiškumas, topografija, kietumas) yra svarbios kamieninių ląstelių elgsenai, proliferacijai ir diferenciacijai (Paschos *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2011). Signalinės molekulės tiesiogiai veikia ląstelių fenotipą, metabolizmą, migraciją, organizaciją, o diferencijuotų ląstelių išskirtos molekulės gali suaktyvinti kamieninių ląstelių diferenciaciją (Paschos *et al.*, 2014). Audiniuose paprastai yra daugiau nei vienas ląstelių tipas, todėl siekiant suformuoti *in vitro* aplinką artimą *in vivo* aplinkai pradėtos vystyti kokultūrų metodikos. Pirmasis kokultūrą savo darbuose paminėjo Lawrence su kolegomis 1987 m., kai kokultūrą panaudojo ląstelių komunikacijos tyrimams (Lawrence *et al.*, 1987). Vėliau kokultūros naudotos embriono vystymuisi tirti, regeneracinės biologijos tikslams, dirbtinių audinių kūrimui (Paschos *et al.*, 2014), infekcijų, vaistų tyrimams (Goers *et al.*, 2014), stromos ir mezenchimos sąveikos tyrimams (Miki *et al.*, 2011) bei tirpių medžiagų, išskirtų parakrininio veikimo metu, tyrimui (Bogdanowicz and Lu, 2013). Kokultūras sudaro skirtingi ląstelių tipai auginami tiesiogiai arba netiesiogiai naudojant tą pačią aplinką.

Kokultūros tarpusavyje skiriasi auginimo būdu, ląstelių linijomis, ląstelių kultūrų skaičiumi, auginimo trukme, skirtingu ląstelių santykiu.

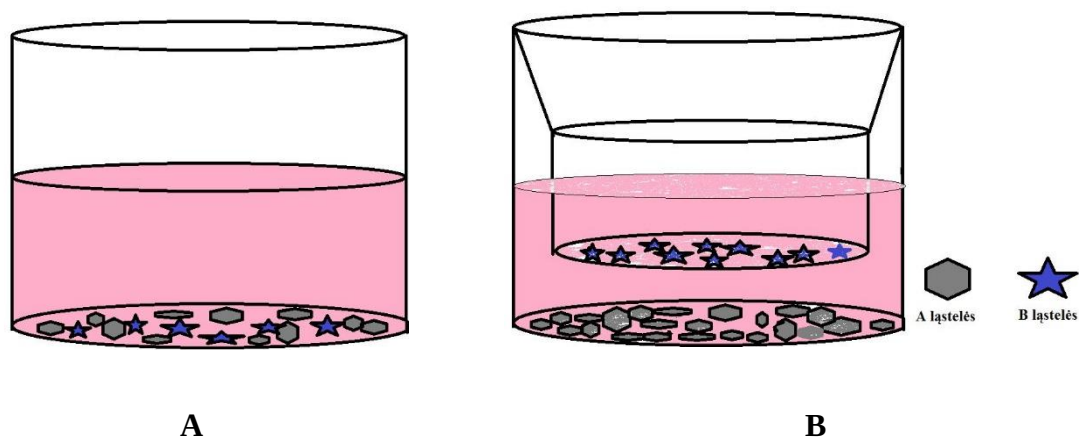
Šiuo metu dažniausiai tiriamos kokultūros sudarytos iš dviejų tipų ląstelių: pagrindinės ir pagalbinės ląstelių populiacijos. Pagrindinių ląstelių funkcija – užtikrinti pagrindines formuojamo audinio funkcijas. Pagalbinių – išskirti signalines molekules, TU baltymus, palaikyti ląstelių tarpusavio kontaktus, skatinti proliferaciją, diferenciaciją. Pagalbinės ląstelės prisitaiko prie pagrindinių ląstelių poreikių ir esant skirtingoms aplinkos sąlygoms, jų funkcijos gali skirtis (Paschos *et al.*, 2014). Dažnai kokultūrose ląstelių vaidmenys gali varijuoti. Pastebėta, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės skatina chondrocitų proliferaciją, o chondrocitai inicijuoja mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciaciją (Acharya *et al.*, 2012). Taigi, abiejų ląstelių tipai yra svarbūs kokultūros gyvavimui.

Kokultūrą įprastai sudaro diferencijuotos ląstelės gautos iš subrendusio audinio ir kamieninės ląstelės, galinčios diferencijuotis į daugelio tipų ląsteles ir gebančios proliferuoti neprarasdamos kamieninių ląstelių savybių. Jos dažniausiai yra pagrindinės ląstelės, kurios galiausiai diferencijuosis į audiniui specifines ląsteles ir atliks joms būdingas funkcijas (Paschos *et al.*, 2014). Kamieninės ląstelės taip pat gali būti ir pagalbinėmis ląstelėmis (Goers *et al.*, 2014). Audinio regeneracijoje kamieninės ląstelės dalyvauja ne tik kaip ląstelių šaltinis, bet ir netiesioginiu būdu, slopindamos imunines reakcijas, stabdydamos apoptozę bei skatinant kitų ląstelių proliferaciją (Paschos *et al.*, 2014).

Kokultūras gali sudaryti ir daugiau tipų ląstelių, tačiau kartu auginti daugiau nei tris skirtingus ląstelių tipus yra sudėtinga, nes sunku parinkti tinkamas tokios kultūros augimo sąlygas - terpę, persėjimo laiką ir kt. Be to, gali atsirasti dominuojanti kultūra, kuri laikui bėgant užgoš kitas (Goers *et al.*, 2014). Visgi parodyta, kad trijų ląstelių tipų kokultūra yra pranašesnė prieš dviejų ląstelių tipų kokultūrą širdies regeneracijos eksperimente (Badorff *et al.*, 2003), tačiau smegenų – kraujo barjero tyrime didesnis efektyvumas pasiektas auginant kartu dviejų tipų ląsteles, o ne trijų (Hatherell *et al.*, 2011).

Kokultūrų gavimo būdai. Pati paprasčiausia kokultūros sistema, užtikrinanti fizinį skirtingų ląstelių kontaktą, gaunama sumaišant skirtingų ląstelių tipų suspensijas (1.2 pav., A). Ląstelės maišomos pasirinktu tankiu, įvairiais santykiais (Bogdanowicz and Lu, 2013). Galimas ir kitas variantas, kai iš pradžių užsėjama viena ląstelių linija, o po tam tikro laiko ant viršaus užsėjamos kito tipo ląstelės (Miki *et al.*, 2011). Tokia kokultūra gali būti auginama ant 2D arba 3D paviršiaus. 2D kultūros patogios tirti ląstelių elgsenai bei tarpusavio kontaktų sudarymui. Tuo tarpu 3D kultūros dažniausiai naudojamos kuriant dirbtinius audinius ir organus (Paschos *et al.*, 2014). 3D kokultūros gali būti patogios tiriant kraujagyslių susidarymą. Pavyzdžiui, ant kolageno gelio pirmiausiai užsėjamos žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės, o vėliau ant viršaus

užsėjamos endotelinės ląstelės, stebimas kraujagyslių formos vamzdelių susidarymas (Traphagen *et al.*, 2013). Auginant skirtingus ląstelių tipus kartu, svarbu tinkamai parinkti augimo sąlygas, norint išvengti ląstelių žūties ar netinkamo vėlesnių rezultatų interpretavimo (Bogdanowicz and Lu, 2013). Jei ląstelių linijos nėra panašios, parenkama tarpinė auginimo terpė, mažiausiai turinti neigiamą įtaką abiejų tipų ląstelėms (Miki *et al.*, 2011). Tiesioginio auginimo metu galima stebėti ląstelių tarpusavio kontaktų svarbą ir įtaką kokultūrai. Nustatyta, kad susidarius plyšinėms jungtims tarp kamieninių ir diferencijuotų ląstelių, kamieninės ląstelės pradeda diferencijuotis. Mezenchiminės ląstelės sudarydamos glaudžiasias jungtis geba panaikinti kito tipo ląstelių jungtis (Paschos *et al.*, 2014). Tačiau auginant kokultūrą šiuo būdu yra sunku įvertinti atskirų ląstelių tipų vaidmenį kokultūroje (Bogdanowicz and Lu, 2013).



1.2 pav. Tiesioginė (A) ir netiesioginė (B) kokultūra.

Kitas būdas – stebėti ląstelių sąveiką susijęs su fizinio barjero įvedimu tarp skirtingų ląstelių populiacijų. Šie fiziniai barjerai leidžia reguliuoti ląstelių užsėjimą erdvės ir laiko atžvilgiu. Vėliau barjeras gali būti pašalinamas, leidžiant ląstelėms lengvai migruoti bei sudaryti tarpusavio kontaktus (Bogdanowicz and Lu, 2013). Kartais fizinis barjeras neįvedamas, o tiesiog paliekamas tarpas tarp dviejų kultūrų, kol migruojančios ląstelės galiausiai šį tarpą užpildo. Auginant kartu adhezinės ir suspensinės ląstelės atsiranda natūralus barjeras tarp ląstelių (Miki *et al.*, 2011). Teigiama, kad tokie modeliai yra pranašesnis prieš tiesioginį ląstelių užsėjimą, nes tai suteikia galimybę kontroliuoti heterotipinės ir homotipinės sąveikos apimtį (Bogdanowicz and Lu, 2013). Be to, galima stebėti ir fizinių ląstelių kontaktą, ir parakrininį veikimą.

Tiriant parakrininį veikimą, galima formuoti izoliuotų ląstelių kokultūrą, kai iš pradžių suformuojamos individualios ląstelių kultūros, o vėliau jos auginamos bendroje aplinkoje, tačiau fiziškai atskirtos (Bogdanowicz and Lu, 2013). Šiuo atveju taip pat galima 2D ir 3D kokultūra (Paschos *et al.*, 2014). 2D kultūroje naudojamas intarpas, atskiriant dvi ląstelių kultūras (1.2 pav., B). Atskirymui gali būti naudojama pusiau pralaidi membrana, skysčių kanalas, jungiantis du atskirus ląstelių indus, ląstelių lašeliai ir panašios sistemos (Miki *et al.*, 2011). Vats su kolegomis

žmogaus endotelinių pirmtakinių ląstelių diferenciaciją inicijavo kokultūroje su chondrocitais. Plokštelėje buvo auginamos žmogaus endotelinės pirmtakinės ląstelės, o ant viršaus uždėtas porėtos membranos intarpas su chondrocitais (Vats *et al.*, 2006). 3D modelyje vienos ląstelės gali būti įterptos į hidrogelį (Paschos *et al.*, 2014). Šiame modelyje yra lengviau įvertinti atskirų ląstelių indelį į bendrą kokultūros aplinką, nors ląstelės tarpusavyje tiesiogiai ir nesąveikauja (Bogdanowicz and Lu, 2013). Netiesioginėje ląstelių kokultūroje patogiau tirti parakrininį veikimą.

Parakrininis veikimas taip pat gali būti analizuojamas per augimo terpės tyrimus, kai vienos ląstelių kultūros auginimo terpė (po ląstelių auginimo joje) naudojama kito tipo ląstelių kultūrai auginti. Šis metodas yra paprastas, galima ištirti konkrečių ląstelių išskirtų signalinių molekulių poveikį kito tipo ląstelių augimui ir pokyčiams (Bogdanowicz and Lu, 2013). Tokiu būdu buvo nustatyta, kad adipocitinės kamieninės ląstelės pagerina žmogaus odos fibroblastų žaizdos gijimą būtent dėl išskirtų tirpių medžiagų - augimo faktorių ir TU baltymų (Kim *et al.*, 2007). Tačiau šiuo atveju gali būti sudėtinga parinkti reikiamą kiekį terpėje esančių maistinių medžiagų, be to kiekvieną sykį signalinių molekulių kiekis terpėje gali skirtis, todėl sunku atkartoti eksperimentus.

Tinkamiausiais būdas ištirti kokultūrą ir nustatyti jos potencialą audinių inžinerijai yra auginimas ant TU. Tam gali būti naudojamos tiek natūralios, tiek sintetinės medžiagos, 2D ar 3D struktūros (Bogdanowicz and Lu, 2013). 3D modeliai leidžia erdviškai atskirti skirtingus ląstelių tipus ir imituoti natūralią audinio struktūrą.

1.3. Ląstelių savybės

1.3.1. Adhezija

Ląstelių adhezija – tai procesas, kurio metu ląstelių paviršiaus molekulės sąveikauja ir prisijungia prie paviršiaus ar substrato. Kaip atskiras adhezijos rūšis galima būtų išskirti tarpląstelinę sąveiką ir kitų ląstelių. Adhezija yra būtina audinių ir organų susidarymui, komunikavimui bei formos palaikymui. Ląstelių prisitvirtinimas prie paviršiaus priklauso nuo įvairių baltymų. Svarbiausi iš jų – ląstelių adhezijos molekulės, kurios jungiasi su panašaus tipo baltymais esančiais ant kitų ląstelių bei adhezijos receptoriai, prie kurių jungiasi įvairūs ligandai ir pagalbinių baltymų. Pagrindinės ląstelių adhezijos molekulių šeimas sudaro integrinai, kadherinai, imunoglobulinai, selektinai ir proteoglikanai (Lock *et al.*, 2008). Skirtingo tipo adhezijos kompleksus sudaro skirtingi baltymai, tačiau visų tipų adhezijos kompleksai priklauso nuo aktino filamentų polimerizacijos ir išsiardymo.

Ląstelių su sąveika su tarpląstelinio užpildu (TU). Svarbiausi šioje sąveikoje dalyvaujantys ląstelių adhezijos receptoriai yra integrinai ir proteoglikanų šeimai priklausančios sindekanai. Šie

baltymai dalyvauja susidarant ląstelės – TU adhezijos baltymų kompleksams – fokalinei adhezijai arba sutelktiniam sąlyčiui, trumpai gyvuojantiems taškiniams adhezijos kompleksams, fibrilinei adhezijai, podosomoms bei invadopodijoms (Geiger ir Yamamda, 2011). Fokalinę adheziją sudaro daugiau nei 100 baltymų, jungiančių ląstelių citoskeleto tinklą su TU, kurie kontroliuoja ląstelių gebėjimą migruoti bei formuoti filopodijas. Iš fokalinės adhezijos vystosi fibrilinė adhezija bei podosomos. Fibrilinė adhezija jungia ekstraląstelinę matriksą su ląstelės centru. Podosomos sąveikauja su matrikso baltymais bei poliarizuoja ląstelę migracijos metu (Smilenoy *et al.*, 1999).

Ląstelių tarpusavio sąveika yra adhezijos atmaina, kuri gali vykti tarp to paties tipo ląstelių – homotipinė adhezija ir tarp skirtingų tipų ląstelių – heterotipinė adhezija. Sąveikauti gali tiek tos pačios rūšies adhezinės molekulės – homofilinė adhezija, tiek skirtingos molekulės – heterofilinė sąveika (Lodish *et al.*, 1996). Hemofilinėje sąveikoje dalyvauja daugelis kadherinų ir imunoglobulinai, heterofilinėje sąveikoje – selektinai, dalis integrinų, imunoglobulinų superšeimos tarpląstelinės adhezijos molekulių klasė ir kai kurie kadherinai (pvz.: E-kadherinas). Ląstelėms tarpusavyje sudaryti jungtis yra būtini transmembraniniai ląstelių adhezijų baltymai ir receptoriai, adaptoriniai baltymai, jungiantys citoskeletą su adhezinėmis ir signalinėmis molekulėmis bei citoskeletas (Lock *et al.*, 2008).

Ląstelių tarpusavio sąveikai būdingos 4 tipų jungtys: adhezinės, tampriosios, plyšinės ir desmosominės jungtys. Adhezinės jungtys reguliuoja ląstelių formą, palaiko audinių integralumą. Šias jungtis sudaro transmembraniniai glikoproteinai kadherinai, kurie jungiasi su tarpląsteliniais baltymais kateniniais (Niessen *et al.*, 2014). Tampriosios jungtys sudaro difuzinį barjerą ir padalina ląstelių paviršių į funkciškai ir biochemiškai atskirus regionus. Jas sudaro jungties adheziniai baltymai ir adaptoriniai baltymai – klaidinai okludiniai, tricelulinas (Steed *et al.*, 2010). Plyšinės jungtys tiesiogiai jungia dviejų ląstelių citozolius, tokiu būdu leisdamos judėti smulkioms molekulėms ir jonams tarp ląstelių. Šias jungtis daugiausiai sudaro koneksino baltymai. Desmosomos jungia tarpinius filamentus su plazmine membrana ir taip palaiko mechaninių ląstelių stabilumą. Desmosomas sudaro desmosominiai kadherinai ir citoplazminiai desmosominiai komponentai – tai plakoglobinas ir plakofilinas (Delva *et al.*, 2009).

Ląstelių tarpusavio adhezija yra svarbi ne tik palaikant audinio struktūrą. Ji leidžia ląstelėms tarpusavyje dalintis medžiagomis bei informacija. ***Endotelinų ląstelių pirmtakių adhezija.*** Įvykus tam tikro audinio pažeidimui iš kaulų čiulpų kartu su krauju atkiliauja ELP. Po kontakto su audiniais specifiniais chemokinais (pvz.: IL-8, SDF-1, CXCR4), jos yra aktyvuojamos ir per specialius integrinus jungiasi prie kraujagyslių endotelinų ląstelių (Lock *et al.*, 2008). Šioje sąveikoje prie angiogeninių zonų dalyvauja $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ integrinai. $\alpha 4\beta 1$ integrinai jungiasi prie VCAM-1 kraujagyslių ląstelių adhezinės molekulės ir prie TU baltymo fibronektino. $\beta 2$ integrinai jungiasi prie vidinių adhezijos molekulių ICAM-1. $\alpha 5\beta 1$ integrinai

fiziologinio streso sąlygomis jungiasi prie fibronektino receptoriaus RGD sekų. $\alpha\beta 1$ integrinai dalyvauja susidarant ryšiams tarp ELP ir bazinės membranos komponentų. $\alpha\beta 5$ integrinai tiesiogiai jungiasi prie diferencijuotų endotelinų ląstelių (Dias and Caiado, 2012). Taip pat adhezijoje dalyvauja ir selektinai.

Raumens kamieninių ląstelių adhezija. Šios ląstelės ekspresuoja įvairias adhezijos molekules. Tai nuo kalcio priklausomas M-kadherinas, nervinė ląstelių adhezijos molekulė (NCAM) ir kraujagyslių adhezijos molekulė 1 (VCAM-1), kurios reikalingos ląstelių prisitvirtinimui ant miofibrilių bazinės membranos (Hawke and Garry, 2001).

1.3.2. Migracija

Ląstelių migracija - tai procesas, kurio metu ląstelės juda iš vienos vietos į kitą. Ląstelių migracija gali būti ameboidinė, mezenchiminė arba kolektyvi migracija. Ameboidinės migracijos metu ląstelės juda lengvai, nes jos prie paviršiaus tvirtinasi nestipriai, citoskeletas būna silpnai organizuotas. Mezenchiminė migracija vyksta lėčiau, jų citoskeletas išsidėstęs sudėtingiau, būdinga tvirta adhezija (Welf and Hough, 2011). Ląstelės gali judėti ne tik po vieną, bet ir grupėmis, kai dvi ar daugiau ląstelių išlaiko tarpusavio jungtis ir juda kartu TU paviršiumi (Ilna and Friedl, 2008). Kartais ląstelės gali pakeisti savo judėjimo tipą priklausomai nuo aplinkos pokyčių. Visų tipų migracijos mechanizmuose dalyvauja daug skirtingų molekulių. Tai mažos GTPazės, kinazės, citoskeletą modifikuojantys baltymai, TU remodeliuojantys baltymai, judėjimo baltymai, antrinės lipidinės signalinės molekulės, citoskeleto baltymai ir kt.

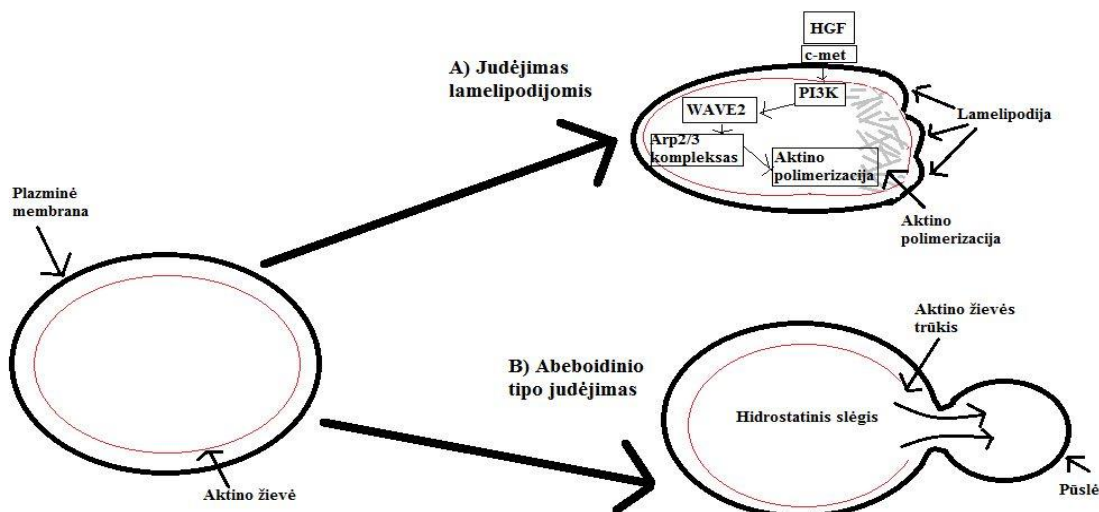
Pavienių ląstelių migracija vyksta 5 etapais: poliarizacija, membranos ilgėjimas, adhezija, integracija, ląstelės kūno perkėlimas ir galinio citoskeleto susitraukimas. Poliarizacijos metu ląstelė įgauna priekinį ir galinį polius. Priekiniam poliui būdinga intensyvi aktino polimerizacija. Membranos ilgėjimo etape ląstelės membrana išsitiesia dominuojančiame poliuje migracijos kryptimi. Pirmiausia išsiplečia ląstelės plazminė membrana, formuojasi citoskeleto tinklas, palaikantis membranos išsikišimą ir galiausiai membrana kontaktuoja su paviršiumi. Adhezijos metu ląstelė kontaktuoja su paviršiumi per integrinų receptorių, įvyksta citoplazmos susitraukimas, kurį reguliuoja aktino polimerizacija, aktomiozino susitraukimas ir mikrovamzdelių dinamika. Paskutiniame etape ląstelė perkelia savo kūną į priekį. Miozinas II ir mikrovamzdeliai kontroliuoja branduolio perkėlimą. Ląstelės galinės dalies sutraukime vyksta koordinuotas aktino citoskeleto susitraukimas ir adhezijos nutraukimas (Welf and Hough, 2011). Ląstelei persikėlus į priekį – ciklas kartojasi, kol ląstelė pasiekia reikiamą vietą.

Kolektyvinio judėjimo metu judėjimo principas panašus į pavienių ląstelių, tačiau yra keletas skirtumų. Svarbiausia tai, kad ląstelės lieka susijungusios tiek priekinėje dalyje, tiek šoniniuose

regionuose ir juda kaip koordinuota grupė (Mayor and Etienne-Manneville, 2016). Ląstelės poliarizuojasi koordinuotai, TU persitvarko judėjimo kryptimi, formuojasi bazinė membrana ir galiausiai koordinuotai įtraukiamos galinės ląstelės. Kolektyvinė ląstelių migracija būdinga daugeliui fiziologinių ir patologinių procesų – morfogenezei, audinių regeneracijai ar vėžio vystymuisi (Friedl and Gilmour, 2009).

Endotelinių ląstelių pirmtakių migracija. Po ELP adhezijos prie kraujagyslių endotelinių ląstelių, prasideda transendotelinė migracija. ELP migruoja per kraujagyslių bazinę membraną ir vidinį TU sluoksnį link specifinių nišų, kuriose jos galės atlikti savo funkcijas (Welf and Hough, 2011). Patekimui į reikiamą vietą reikalingos užląstelinės proteazės: matrikso metalo proteinazės (MMP), katepsino šeimos, serino proteazės, audiniams specifinio plazminogeno aktyvatorius. ELP migraciją paskatina TU standumas. Standumą ląstelės „pastebi“ per integrinų sąveiką su TU, kuris paskatina Rho guanozino trifosfato hidrolazės aktyvaciją. Taip pat skatinama ir kitų proteazių veikla. Be proteazių migracijoje svarbūs $\beta 2$ integrinai, kurių aktyvavime dalyvauja MCP-1 ir VEGF molekulės. $\alpha 5\beta 1$ ir $\alpha 6\beta 1$ integrinai skatina migraciją link VEGF gradiento (Dias and Caiado, 2012). Taip pat migracijoje dalyvauja CD99, CD9 molekulės.

Raumens kamieninių ląstelių migracija vyksta dviem mechanizmais: judėjimas lamelipodijomis ir pūslių sudarymas (ameboidinis judėjimas) (1.3 pav.). Pirmuoju atveju judėjimą inicijuoja įvairūs augimo veiksniai – hepatocitų augimo faktorius (HGF), transformuojantis augimo faktorius beta (TGF-beta) ir fibroblastų augimo faktorius (bFGF) (Bishoff, 1998). Vienas pirmųjų aktyvatorių – HGF jungiasi prie ląstelių receptoriaus c-met. Įvykus reakcijai aktyvuojamas PI3K signalinis kelias, kuris skatina aktinofilamentų polimerizaciją. Galiausiai susiformuoja lamelipodija ir filopodija. Kitu atveju, kai ląstelė juda susidarant pūslelėms arba ameboidiniu būdu, aktino filamentų polimerizacija nereikalinga. Pūslelės susidaro pertraukiant aktino žievę ties ląstelės membrana ir susidarant hidrostatiniam slėgiui. To pasekoje pailgėja plazminė membrana. Ląstelei pajudėjus, pūslelės įtraukiamos susitraukiant aktino žievei. Šį procesą reguliuoja Rho signalinis kelias (Ishido, 2012).



1.3 pav. Satelitinių ląstelių migracijos būdai. A) Judėjimas lamelipodijomis; B) Ameboidinio tipo judėjimas (pūslių susidarymo būdu).

1.3.3. Proliferacija

Ląstelių proliferacija – tai procesas, kurio metu ląstelės auga, dalijasi ir pakeičia žuvusias ląsteles. Sveikame organizme proliferacija yra griežtai ribojama, siekiant išlaikyti reikiama ląstelių skaičių audinyje. Suaugusiame organizme diferencijuotose ląstelėse proliferacijos dažnis sumažėja, dauguma ląstelių pereina į G0 ląstelės ciklo fazę (Agathocleous and Harris, 2013). Keletas diferencijuotų ląstelių tipų daugiau niekada nebesidalija, tačiau dauguma ląstelių geba proliferuoti. Tai yra svarbu atstatant ląstelių skaičių po traumos. Didelis proliferacinis dažnis būdingas kamieninėms ląstelėms ir ląstelėms pirmtakėms. Didžioji dalis kamieninių ląstelių aktyvinamos, dalijasi ir diferencijuoja po pažeidimo atstatydamos pažeistą audinio sritį. Tai pasiekama asimetrinio ląstelių dalijimosi metu, kai viena dukterinė ląstelė dalyvauja audinio pažeidimo atstatyme, o kita lieka nediferencijuota. Jos užduotis – palaikyti kamieninių ląstelių populiaciją. Galimybė proliferuoti be diferenciacijos kontroliuojama ląstelės ciklo S fazėje, kai įprasta proliferacija kontroliuojama G1 fazės patikros taške (Mulard, 2008). Tačiau galimybė proliferuoti daugelyje ląstelių yra ribota ir po tam tikro laiko ląstelės nebesidalija.

Endotelinių ląstelių pirmtakių proliferacija. ELP proliferaciją reguliuoja VEGF šeimos augimo faktoriai, angiopoietino-tirozino kinazė ir EGF tipo domeno 1 receptoriai (Dias and Caiado, 2012).

Raumenų satelitinių ląstelių proliferacija. Įprastai audinyje raumenų kamieninės ląstelės ląstelės yra „ramios“, tačiau įvykus raumens audinio pažeidimui, įvairūs signalai iš raumeninių ląstelių, mikrokraujagyslių tinklo ir uždegiminių ląstelių, jas aktyvina. Nustatyta, kad aktyvacijoje dalyvauja hepatocitų augimo faktorius (HGF), azoto oksido sintazė (NOS), fibroblastų augimo

faktorius (FGF) (Yablonka-Reuveni, 2011). Aktyvuotose ląstelėse dar prieš proliferacijos pradžią aktyvinama Myf-5 geno raiška. Proliferacijos žymeniu gali būti laikoma Ki67 geno raiška. Ki67 yra ekspresuojamas ląstelės ciklo eigoje ir jo neaptinkama G0 fazės metu (Maully *et al.*, 1997). Kitas proliferacijai svarbus faktorius – Pax7 baltymas, kuris skatina mioblasto proliferaciją, bet stabdo diferenciaciją (Grand and Rudnicki, 2008).

1.3.4. Diferenciacija

Ląstelių diferenciacija tai procesas, kurio metu ląstelės pasikeičia iš vieno tipo į kitą. Dažniausiai diferenciacija vyksta mažai specializuotose ląstelėse – kamieninėse arba pirmtakinėse ląstelėse, kurios diferencijuojasi į subrendusias specializuotas ląsteles. Diferenciacijos metu pakinta ląstelių dydis, forma, membranos potencialas, metabolinis aktyvumas, atsakas į signalus (Agathocleous and Harris, 2013). Ląstelės genų raiškos pokyčiai įprastai reguliuojami epigenetiškai (Feng and Wang, 2012). Ląstelių diferenciaciją reguliuoja įvairūs transkripcijos faktoriai, augimo faktoriai, aplinkos pokyčiai, TU topografija ir standumas.

Ląstelės pagal galimybę diferencijuotis skirstomos į totipotentes, pliuripotentes, multipotentes, oligopotentes ir unipotentes. Totipotentinės ląstelės gali diferencijuotis į visus ląstelių tipus įskaitant ir placentos audinį. Totipotentinės ląstelės būdingos zigotai ir blastomerai. Pliuripotentinės ląstelės negali diferencijuotis į placentos ląsteles, tačiau gali tapti visomis kitomis trijų gemalinių lapelių ląstelėmis. Pliuripotentiskumu pasižymi embriono kamieninės ląstelės. Multipotentinės ląstelės yra labiau specializuotos ir jų diferenciacijos potencialas mažesnis. Jos gali diferencijuotis į vieno gemalinio lapelio ląsteles. Suaugusiam organizmui būdingos multipotentinės kamieninės ląstelės. Oligopotentinės ląstelės gali diferencijuotis į kelių tipų ląsteles (Majo *et al.*, 2008). Unipotentinės ląstelės, dar vadinamos pirmtakinėmis ląstelėmis, diferencijuojasi į vieno tipo ląsteles.

Endotelinų ląstelių pirmtakių diferenciacija. ELP diferenciacija į subrendusias endotelines ląsteles yra sudėtingas procesas, kurį sudaro pagrindiniai 3 etapai. Pirmiausia įvyksta ląstelių adhezija prie TU baltymų. Pirmasis diferenciacijos iniciatorius yra integrino $\alpha 5 \beta 1$ prisijungimas prie fibronektino. Antras etapas susideda iš augimo faktorių indukuotos ląstelių proliferacijos ir išgyvenimo. Šiame etape dalyvauja VEGF šeimos augimo faktoriai, angiopoietino-tirozino kinazė ir EGF tipo domeno 1 receptoriai. Paskutinis etapas apima ELP brendimą ir endotelinų ląstelių fenotipo įgijimą (Dias and Caiado, 2012). Fenotipinius pokyčius daugiausia reguliuoja transkripcijos faktorius HoxA, kurį reguliuoja histonų deacetilazės. Nustatyta, kad HoxA9 faktorius reguliuoja endotelinų genų, atsakingų už NO sintazės, VEGFR-2 ir kraujagyslių endotelinų ląstelių kadherino, aktyvavimą (Bahrami *et al.*, 2011).

Raumens kamieninių ląstelių diferenciacija. Ląstelėms pereinant iš proliferacijos fazės į diferenciacijos fazę stabdoma Pax7 geno raiška ir inicijuojama MyoD reguliacinio faktoriaus ekspresija. Ląstelių Notch signalinį kelią, atsakingą už proliferaciją, keičia Wnt3a signalinis kelias, skatinantis ląsteles diferencijuotis (Bentzinger *et al.*, 2012). Diferenciacijos pabaigai svarbus miogeninas ir MRF4, kurie reguliuoja miovamzdelių ir fibrilių formavimąsi (Grand and Rudnicki, 2008). Satelitinėms ląstelėms būdinga diferenciacija ne tik į raumenų ląsteles, bet ir į kitus ląstelių tipus. Paveikus kaulų morfogenetinius baltymus satelitinės ląstelės gali diferencijuotis osteogenine linkme, o esant aplinkoje adipogenetiniams veiksniams – diferencijuojasi adipogenine linkme (Asakura *et al.*, 2001).

1.3.5. Žūties mechanizmai

Ląstelių žūtis skirstoma į du pagrindinius tipus: užprogramuota ląstelių žūtis ir atsitiktinė. Užprogramuota ląstelių žūtis yra normalus biologinis procesas, kurio metu pašalinamos senos, nebereikalingos ląstelės. Užprogramuota ląstelių žūtis taip pat dalyvauja embriogenezės procese, imuninės sistemos vystymesi ir kituose biologiniuose procesuose (Maino and Joris, 1995). Atsitiktinė žūtis įvyksta dėl neigiamo aplinkos poveikio, pažeidų ar ligos.

Dažniausiai pasitaikanti užprogramuotos žūties būdas – apoptozė. Apoptozė yra reguliuojama, energijos reikalaujanti cheminių reakcijų seka, kurios metu yra pašalinamos kenksmingos arba nebenaudingos pavienės ląstelės ir nėra sukeliamas uždegimas. Apoptozę sudaro dvi fazės: aktyvacijos ir egzekucijos fazės. Aktyvacijos metu ląstelių morfologija nekinta, tačiau prasideda apoptozės genų raiškos pokyčiai, aktyvuojamos iniciatorinės kaspazės (Kroemer *et al.*, 2009). Egzekucijos fazėje prasideda negrįžtami pokyčiai, pakinta morfologija, ląstelės suapvalėja ir susitraukia, kondensuojasi chromatinas ir suyra branduolys, ląstelė subyra į apoptozinius kūnelius. Dalyvauja vykdomosios kaspazės (Kroemer *et al.*, 2009). Apoptozinius kūnelius pašalina makrofagai, kurie atpažįsta savo taikinį pagal išorinėje membranoje atsiradusį fosfatidilseriną (Maino and Joris, 1995).

Be apoptozės ląstelėje gali vykti ir kitokio tipo užprogramuota ląstelių žūtis – autofagija. Jos metu lizosomos skaido organeles, susidaro autofaginės pūslelės, tačiau chromatino kondensacija nevyksta. Dažnai autofagija vyksta tokiose ląstelėse, kurioms nėra būdinga nuo mitochondrijų priklausoma apoptozė. Ją gali sukelti maisto medžiagų netekimas, stresas ar kiti veiksniai (Yuan and Kroemer, 2010).

Nekroptozė – tai programinė nekrozė. Daugiausia vyksta pataloginėmis sąlygomis, kai apoptozės mechanizmas yra sustabdomas, inhibavus kaspazes (Tait *et al.*, 2014).

Anoikis – tai vienas iš apoptozės tipų, kai ląstelės žūsta atkibusios nuo TU (Gilmore, 2005).

Ląstelėms būdinga ir daugiau užprogramuotos žūties rūšių - netozis, kornifikacija, entozis, piroptosis, nuo kaspažių nepriklausoma žūtis, eriptozis ir kiti (Kroemer *et al.*, 2009).

Atsitiktinės ląstelių žūties pagrindinis būdas – nekrozė. Ją sukelia infekcijos, sužeidimai. Ląstelės žūsta staiga, grupėmis, vyksta uždegimas. Nekrozės metu ląstelės citoplazma išbrinksta, padaugėja pūslelių, DNR skyla atsitiktinėse vietose, mitochondrijos išbrinksta, pakinta kitos organelės, plazminė membrana tampa pralaidi ir suyra, į aplinką patenka citoplazminiai baltymai. Žinoma, kad į aplinką patenka HMGB1 branduolio baltymas, dalyvaujantis uždegimo sukėlime (Lotze, 2009).

Onkosis – atsitiktinė, pasyvi ląstelių žūtis, kurios metu išbrinksta mitochondrijos, branduolys, o citoplazma pasidalina į vakuoles. Manoma, jog tai įvyksta dėl sutrikusių plazminės membranos jonų kanalų (Maino and Joris, 1995).

Mitozinė katastrofa – ląstelių žūtis, išstinkanti dėl mitozės metu įvykstančių klaidų. Tačiau kartais šis žūties būdas gali būti priskiriamas ir užprogramuotai ląstelių žūčiai – apoptozei (Kroemer *et al.*, 2009).

1.4. Nanodalelės

Nanodalelės yra pavienės 1-100 nm skersmens dalelės, sudarančios nanomedžiagas. Nanodalelės (ND) gali būti klasifikuojamos pagal jų kilmę: tai natūralios ir žmogaus sukurtos nanodalelės. Natūralios nanodalelės (NND) pasaulyje egzistuoja milijardus metų ir yra tiek žemės atmosferoje, vandenynuose ar dirvožemyje, tiek ir gyvuose organizmuose (Smitha *et al.*, 2010). Dirbtinės nanodalelės šiuo metu naudojamos įvairiose srityse – optikoje, transzistoriuose, energijos ir informacijos saugojime, aplinkos apsaugoje, kosmetikoje, biologijoje, medicinoje. Nanodalelės gali būti gaminamos iš metalo, metalo oksidų, polimerų, keramikos, silicio, taip pat dendritų ar liposomų pagrindu.

Nanodalelės gyvuose organizmuose gali būti naudojamos diagnostikai ir terapijai. Mažesnės nei 50 nm dydžio nanodalelės į ląstelę patenka endocitozės būdu. Jos gali sąveikauti su ląstelės receptoriais, nukleorūgštimis, transkripcijos faktoriais ir kitomis molekulėmis. ND optinės, elektrinės ir magnetinės savybės padeda lengviau suprasti ir nustatyti viduląstelinius signalus ir procesus (Xu *et al.*, 2004). Terapijos tikslams nanodalelės gali būti įvairiai modifikuojamos, prie jų paviršiaus prijungiant specifines molekules, nukreipiančias daleles į pasirinktą tikslą ląstelėje. Į ND darinių ertmę galima įkapsuliuoti vaistus ir įvairius žymenis, kurie būtų selektyviai išleidžiami pasirinktoje vietoje. Kadangi patekusios į organizmą ND nesukelia imuninio atsako, jų nesuardo fermentai, vaistai efektyviau pristatomi į ląsteles – taikinius.

Tačiau naudojant nanodalelės gyvuose organizmuose iškyla toksiškumo grėsmė. Dėl ND mažo dydžio (<100 nm) ir didelio paviršiaus ploto lyginant su jų tūriu, ND pasižymi ypatingai dideliu reaktyvumu ir gali sukelti ląstelių pažeidimus (Hanain *et al.*, 2013). Nanodalelių toksiškumui įtakos turi koncentracija, dydis, forma, poveikio laikas, agregacija, dispersija, tirpumumas, cheminė sudėtis, krūvis ir pačių ląstelių savybės.

1.4.1. Cinko oksido nanodalelės

Cinko oksido (ZnO) ND yra neorganinė vandenyje tirpi medžiaga, sintetinama iš cinko sulfato ir natrio hidroksido. Dalelės gali būti sintetintos įvairiais metodais – hidroterminiais elektrocheminiais, tirpalų, cheminio garinimo, šiluminiais, deginimo, ultragarsiniais, mikrobangų, išsodinimo, elektroforetiniais ir kt. (Kumar *et al.*, 2013). ZnO ND forma gali taip pat būti įvairi – nanodalelės nanovamzdeliai, nanolazdelės ir t.t.

Cinko oksidas yra n tipo puslaidininkis su plačia tiesiogine 3,37 eV draustine juosta ir didele 60 meV eksitono prisijungimo energija kambario temperatūroje (Vaseem *et al.*, 2010). Taip pat pasižymi pjezoelektinėmis savybėmis dėl savo ne centriškai simetriškos kristalografinės fazės (angl. *non-centrosymmetric crystallographic phase*). Tokios dalelių savybės leidžia jas panaudoti gaminant lazerius, elektromagnetinius jutiklius, saulės baterijas, fotodetektorius, nanogeneratorius, antimikrobinius preparatus, kremus nuo saulės, terpines medžiagas vėžio ir autoimuninių ligų gydymui (Talam *et al.*, 2012; Sabr *et al.*, 2014).

Cinko oksido nanodalelių poveikis ląstelėms. ZnO nanodalelės pasižymi toksiškumu ląstelėms. Setyawati ir kt. atliktame eksperimente buvo tiriamos trijų rūšių – SiO₂, TiO₂ ir ZnO ND poveikis žarnyno ląstelėms. Nustatyta, kad cinko oksidas pasižymi didžiausiu citotoksiškumu. Paveiktose ląstelėse pasireiškė oksidacinis stresas, uždegimas, DNR pažeidimas, sutriko ląstelės ciklas. ZnO aktyvino nuo Chk-1 ir p21/ERK priklausomą ląstelės ciklo stabdymą G2/M patikros taške. Ląstelių ciklo stabdymas lėmė ląstelių žūtį (Setyawati *et al.*, 2015). Kito eksperimento tikslas buvo įvertinti ZnO toksiškumo priklausomybę nuo formos ir koncentracijos. Lazdelės formos ND sunkiau patenka į ląstelę endocitozės būdu nei apvalios formos, tačiau gali pereiti ląstelės membraną ją perdurdamos. Mechaninis ląstelės pažeidimas dažniausiai veda link nekrozinės ląstelių žūties. Dalelės patekusios į ląstelę endocitozės būdu gali patekti į mitochondrijas ir jose skatinti reaktyvių deguonies formų gamybą. Nustatyta, kad limfocituose padidėjęs ROS kiekis tiesiogiai priklauso nuo ZnO koncentracijos abiejų tirtų formų nanodalelių atvejais, tačiau labiau išreikšta buvo lazdelės formos ND. Nuo jų koncentracijos taip pat priklauso DNR pažeidimų kiekis. Dėl savo mažo dydžio ND pereina ląstelių branduolio membraną, sąveikauja su DNR, skatinama chromatino fragmentaciją ir ląstelėje inicijuojama apoptozė (Aula *et al.*, 2014). Kang su kolegomis žmogaus tiesiosios žarnos epitelio adenokarcinomos ląstelėse nustatė ZnO

toksiškumo priklausomybę nuo ND dydžio (26, 62 ir 90nm). Didžiausiu poveikiu pasižymėjo 26nm dydžio ND, o mažiausiai toksiškos ZnO dalelės buvo 62 nm dydžio (Kang *et al.*, 2013). ZnO citotoksiškumą lemia ir poveikio laikas. 4 ląstelių linijos: Hs888Lu, SH-SY5Y, U937 ir A549 buvo veikiamos ZnO nanodalelėmis 24 ir 96 valandas. Didesnis žūties dažnis pasireiškė po ilgesnio 96 valandų poveikio. Tačiau ZnO ND išgyvenimui įtakos neturėjo A549 – plaučių vėžinėms ląstelėms, nepriklausomai nei nuo ZnO koncentracijos, nei nuo poveikio laiko (Najim *et al.*, 2014). Taigi, ZnO toksiškas poveikis ląstelėms priklauso nuo nanodalelių koncentracijos, formos, dydžio, poveikio laiko ir nuo pačių ląstelių savybių.

1.4.2. Titano dioksido nanodalelės

Titano dioksidas (TiO_2) yra mažai tirpus cheminis junginys dažniausiai gaminamas iš titano alkoksilatų, juos hidrolizuojant ir veikiant karščiu. Dalelių modifikacija priklauso nuo proceso metu naudojamos temperatūros. Kiti galimi TiO_2 gamybos metodai: tirpalų, ultragarsinis, mikrobangų, micelių, zolių metodai, cheminis, fizinis, elektrinis išgarinimas (Chen and Mao, 2007). TiO_2 gali būti išgaunamas įvairių formų, pvz.: pudros, kristalai, plonos plėvelės, nanovamzdeliai, nanolazdelės.

TiO_2 yra puslaidininkis, kurio draustinė juosta gali būti 3.2, 3.02 arba 2.96 eV. Dalelės valentingumo juosta susideda iš 2p deguonies orbitalės su 3d titano orbitale. Sumažėjus dalelių dydžiui iki 10nm pasireiškia kvanto mechaninės savybės, sustiprėja fotokatalitinis aktyvumas (Mital and Manoj, 2010). TiO_2 ND savybės pritaikomos gaminant apsauginius kremus nuo saulės, plastikuose, spausdinimo rašale, oro gryninimo sistemose, antibakteriniuose preparatuose, balinamuose kremuose, kosmetinėje pudroje, ortopedijoje, odontologijoje, maisto pakuotėse, popieriaus gamyboje, dujų jutikliuose, metalurgijoje ir kitur.

Titano dioksido nanodalelių poveikis ląstelėms. TiO_2 ND plačiai naudojamos kosmetikos bei maisto pramonėje ir yra laikomos mažai toksiška medžiaga, tačiau *in vitro* eksperimentai su ląstelėmis pateikia toksiškumo pavyzdžių, kuris siejamas su ND dydžiu. Kuo mažesnės ND – tuo lengviau jos patenka į ląstelę. Manoma, kad TiO_2 ND į ląstelę patenka pasyvios difuzijos arba endocitozės būdu dalyvaujant klatrinui ar nuo receptorių priklausomu mechanizmu (Hamzeh and Sunahara, 2012). Agregatų forma ar pavienės dalelės gali patekti ne tik į ląstelę, bet ir į mitochondrijas ar branduolį (Gosh *et al.*, 2013). TiO_2 ND gali sąveikauti su ląstelės baltymais, mikrovamzdeliais, ar nukleorūgštimis. Keletas eksperimentų parodė, kad šios nanodalelės generuoja didelius laisvo hidroksilo radikalo kiekius. Shi su kolegomis parodė, kad TiO_2 sustiprina fotokatalizę, oksidacinį stresą, DNR aduktus, atsiranda DNR grandinės trūkiai ir chromosomų pažaidos (Shi *et al.*, 2010). Ląstelė negali ištaisyti DNR pažaidų, nes TiO_2 „išjungia“ nukleotidų šalinimo (NER) ir bazių šalinimo (BER) mechanizmus (Shi *et al.*, 2013). Didžiojoje dalyje ląstelių,

paveiktų su titano dioksido dalelėmis vyksta apoptozė ir tik dalis ląstelių, ND koncentracijai pasiekus 500 μM , žūsta nekrozės būdu (Gosh *et al.*, 2013). Tačiau ne visose ląstelėse apoptozė yra vienodai aktyvinama. Žmogaus limfocituose apoptozė inicijuojama per kaspazės-8/Bid signalio kelio aktyvaciją (Shi *et al.*, 2013), o BEAS 2B ląstelėse vyksta nuo pastarojo signalinio kelio nepriklausoma mitochondrinė apoptozė (Shi *et al.*, 2010). Bronchiolių epitelinėse ląstelėse TiO_2 ND apoptozė sukelia per lizosomas. Lizosomų membrana pažeidžiama ir į citoplazmą patenka lizosomų proteazės, tokios kaip katepsinas B, kurios tiesiogiai sukelia proteolizę arba aktyvuoja kaspazes (Saqib *et al.*, 2012).

1.4.3. Anglies nanovamzdeliai

Anglies nanovamzdeliai (CnV) yra alotropinė anglies forma. Nanovamzdelio struktūra panaši į grafitą, bet plokštelės yra uždarnos ir suformuoja vamzdelį. Nanovamzdelis gali susidaryti iš vienos cilindrinės grafito plokštelės – vienasienis nanovamzdelis arba iš kelių cilindų – daugiasienis nanovamzdelis. Tarp sluoksnių yra 0,34 – 0,36 nm tarpas. C-C jungtis yra 0,14 nm ilgio. Nanovamzdeliui būdinga tai, kad visi anglies atomai vamzdelyje išsidėstę heksagoniniuose žieduose ir užima vienodas padėtis, o viršūnėse atomai sudaro pentagoninius žiedus (Dai, 2002). Cheminis aktyvumas didžiausias viršūnėse. Anglies atomai sudaro aromatinius žiedus, bet kampanai tarp C=C jungties nėra išsidėstę plokštumoje, nėra išlaikoma sp^2 hibridizacija, pasireiškia ir sp^3 savybės.

CnV stipresnė už deimantą medžiaga. Vamzdelių tempiamoji jėga gali siekti 100 GPa. Tai labai kieta medžiaga, kurios vienasienis nanovamzdelis gali išlaikyti savo formą veikiant 63 GPa spaudimui (Min-Feng, 2000). Anglies nanovamzdeliai yra laidūs šilumai ir yra termostabilūs (Ajayan and Zhou, 2001). Nanovamzdeliai gali pasižymėti metalo arba puslaidininkio savybėmis. Priklausomai nuo skersmens ir chirališkumo turi skirtingus draustinių energijos tarpus.

Nanovamzdeliai gali būti sintetinami lazerio pagalba, elektrinio lauko iškrovos metu (angl. *arc discharge*), cheminio nusodinimo, aukšto spaudimo anglies monoksido disproporcionavimo metodu (Dai, 2002). CnV gali būti naudojami telefonų gamyboje, apsauginėse liemenėse, saulės baterijose, vandens užterštumui mažinti, audinių inžinerijoje, DNR apsaugoje nuo oksidacijos ir kitur.

Anglies nanovamzdelių poveikis ląstelėms. CnV panaudojimas biologijoje ir medicinoje yra daug žadantis. Jie gali būti naudojami kaip substratas ląstelių augimui, mezenchiminių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją skatinanti priemonė, osteoblastų funkcijų pagerinimui ir kitiems tikslams. Tačiau priklausomai nuo ND dydžio, koncentracijos, sandaros, laiko ar ląstelių rūšies jie gali būti citotoksiški. Nustatyta, kad HEK293 ląstelėse vienasieniai nanovamzdeliai stabdė proliferaciją, silpnino adheziją. Adipocituose mažos vienasienių anglies nanovamzdelių

koncentracijos (0,1 ir 1 $\mu\text{g/ml}$) pagerino proliferaciją ir išgyvenimą, tačiau didesnės koncentracijos (50, 100 $\mu\text{g/ml}$) stabdė proliferaciją, susilpnino adheziją ir indukavo apoptozę (Esfandiary *et al.*, 2014). CnV toksiškumui svarbus vamzdelių ilgis ir forma. Nustatyta, kad ilgi adatos formos nanovamzdeliai makrofaguose aktyvuoja IL-1 α ir IL-1 β sekreciją, priklausomą nuo reaktyvių deguonies formų ląstelėje (Liu *et al.*, 2012). Nuo vamzdelių ilgio priklauso ir jų patekimo į ląsteles mechanizmas bei pasiskirstymas ląstelėje. Kang *et al.* nustatė, kad 100-200 nm ilgio nanovamzdeliai į ląsteles patenka per klatrinu dengtas pūsleles arba nuo kaveolino priklausomu keliu ir daugiausia lokalizuojasi citoplazmoje. Tuo tarpu mažesni 50 nm nanovamzdeliai į ląstelę patenka tiesiogiai pasyvios difuzijos būdu ir išsidėsto arčiau ląstelės branduolio (Kang *et al.*, 2010). Trumpi (10 nm) vienasieniai nanovamzdeliai gali spontaniškai įsiterpti į plazminės membranos lipidinį sluoksnį ir suformuoti dirbtinius molekulių kanalus (Gao *et al.*, 2015). Tokiais kanalais į ląsteles ir iš jos gali pereiti vandens molekulės, jonai, protonai ir nukleorūgštys. Kitas svarbus veiksnys anglies vamzdelių toksiškumui – jų agregacija. Pastebėta, kad žiurkės aortos lygiųjų raumenų ląstelėse po 3,5 dienų inkubacijos su nanovamzdelių agregatais žymiai sulėtėjo ląstelių proliferacija lyginant su pavienėmis nanodalelėmis (Kang *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2015). Taigi, CnV, kaip ir kitų nanodalelių naudojimas gyvuose organizmuose dar turi būti gerai ištirtas.

2. MEDŽIAGOS. METODAI. APARATŪRA

2.1. Medžiagos

Darbui su ląstelėmis buvo naudojama Iscoves modifikuota Dulbecco terpė (IMDM, *Gibco*) su 10 proc. fetalinio veršelio serumu (FBS, *Gibco*) ir antibiotikai (penicilinas 100 U/mL ir streptomocinas 100 µg/mL). Ląstelių monosluoksniui pakelti naudotas tripsino-EDTA (etilendiamino tetraatco rūgštis) tirpalas (1:4 skiedimas). Ląstelių praplovimui ir terpės likučių pašalinimui naudotas fosfatinis buferinis tirpalas (PBS, *Gibco*).

Etanolis 96,3% ; etanolis 70%; MTT (3-(4,5- dimetiltiazol- 2 – yl) – 2,5- difeniltetrazolio bromidas (*Sigma-Aldrich*); 0,4% tripano mėlio tirpalas (*Sigma-Aldrich*); akridino oranžas (AO, *Molecular Probes*); etidžio bromidas (EB, *Molecular probes*); DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); DIO (*Thermofisher Scientific*); 4 % PFA (paraformaldehidas), hialuronidazė; kolagenazė; AcLDL (*Thermofisher Scientific*); matrigelis; DMSO; Arklio serumas (*Gibco*); Dulbecco modifikuota terpė (DMEM, *Gibco*).

Darbuose buvo naudojami ląstelių augimo flakonai; pipetės; 6, 12, 24, 96 duobučių plokštelės; 15 ir 50 mL konusiniai propileniniai mėgintuvėliai, 1,5 ml ependorfiniai mėgintuvėliai.

2.2. Aparatūra

Termostatas palaikantis 37 ° temperatūrą ir 5 proc. CO₂ (*Thermofisher Scientific*); laminaras (*Thermofisher Scientific*); invertuotas mikroskopas *Olympus CKX41*, fluorescencinis mikroskopas *Olympus IX51*; centrifūga (*Thermofisher Scientific*), spektrofotometras (*Thermofisher Scientific*); purtyklė (*Eppendorf Thermomix Comfort*); ultragarsinė vonelė (VWR).

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Endotelinių ląstelių išskyrimas iš kraujagyslių

Endotelinės ląstelės pirmtakės buvo išskiriamos iš pelių kraujagyslių. Eksperimentai su laboratoriniais gyvūnais buvo atlikti vadovaujantis LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Leidimu naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam darbui Nr. 0212, 2011-2015; G2-39, 2016-03-08. Pelei atlikus eutanaziją, paimtas nedidelis kraujagyslės audinio fragmentas, kuris laikomas transportavimo terpėje (auginimo terpė be serumo, kurioje yra 3 kartus didesnė antibiotikų koncentracija). Audinio fragmentas buvo sukarpomamas steriliais autoklavuotais įrankiais. Sukarpytas audinys užpilamas IMDM terpe ir laikomos termostate.

2.3.2. Miogeninių ląstelių išskyrimas iš griaučių raumens

Atlikus pilną gyvūno anesteziją iš kojos šlaunies paimamas 0,50*0,5 cm dydžio raumens audinio gabalėlis, kuris dedamas į transportavimo terpę (auginimo terpė be serumo, kurioje yra 3 kartus didesnė antibiotikų koncentracija). Audinys laminariname bokse perkeliamas į kitą buteliuką su tokia pat terpe. Laikoma 5 min. Tuo tarpu pasirošiamas virškinamasis tirpalas. Į 0,125% tripsino – 0,01% EDTA tirpalą pridedama 0,5% kologenazės ir 0,3% hialuronidazės. Audinio fragmentas perkeliamas į sterilią stiklinaitę ir ten sukarpomamas steriliais autoklavuotais įrankiais. Užpilama apie 1 mL virškinamojo tirpalo. Suspensija perkeliama į sterilų mėgintuvėlį ir statoma į 37° termostatą periodiškai purtant 45min. Audiniui virtus suspensija, užpilama auginimo terpė su serumu iki 10 mL, išmaišoma ir centrifuguojama 10 min, 1500 rpm. Supernantas pašalinamas, užpilama kita porcija terpės su serumu, centrifuguojama. Ląstelės išsėjamos į sterilius kultivavimo indus su IMDM terpe ir laikomos termostate.

2.3.3. Ląstelių auginimas *in vitro*

Ląstelės auginamos flakonuose. Susidaręs monosluoksnis yra įvertinamas invertuotu mikroskopu. Nupilama auginimo terpė ir ląstelės veikiamos EDTA-tripsino tirpalu. Praplaunama 2 kartus, antra karta paliekama 0,5-1 mL tirpalo ir inkubuojama 2-3 min. 37 ° temperatūroje. Suardžius monosluoksnį, ląsteles buvo užpilamos auginimo terpe (IMDM, 10 proc. FBS ir antibiotikai) ir naudojamos tolimesniems eksperimentams arba išsėjamos į naujus flakonėlius.

2.3.4. Ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas

Ląstelės skaičiuojamos hemicitometro (Neubauerio kamera) ir šviesinio mikroskopo pagalba. Prieš tai ląstelių monosluoksnis suardomas ir užpilama auginimo terpė. Skaičiavimui paimamas nedidelis kiekis ląstelių suspensijos. Skaičiuojama pagal formulę:

$$LS = (A+B)/2 * 10000$$

Kur LS – ląstelių skaičius, A, B – kameros laukeliai.

Gyvybingumas nustatomas dažant ląstelės 0,4 proc. tripano mėlio tirpalu. Negyvos ląstelės nusidažo tamsiai mėlyna spalva. Gyvybingumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$LS = (A+B) * 10000$$

Kur LS – ląstelių skaičius, A, B – kameros laukeliai.

2.3.5. AcLDL abzorbcija

Kai kurios ląstelių linijos linkusios pasisavinti acetilintus mažo tankio lipoproteinus (acLDL). Šis metodas yra klasikinis endotelių ląstelių patikrinimo būdas. AcLDL taip pat linkusios pasisavinti mikroglija bei makrofagai (Yoder, 2012).

Į 48 duobučių plokštelę išsėjamos ląstelės tankiu $7,5 \times 10^4$ ląst./mL. Ląstelės auginamos parą termostate 37 °C, 5% CO₂. Eksperimento dieną šulinėliuose esanti terpė pakeičiama nauja terpė turinčia 10 µg/mL AcLDL. Inkubuojama 5 valandas termostate 37 °C, 5% CO₂. Po inkubacijos terpė pašalinama, tris kartus praplaunama su fosfatiniu buferiu, užpilama nauja terpė ir rezultatai vertinami fluorescentiniu mikroskopu.

2.3.6. Miogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas

Ląsteles išsėjamos į 24 šulinėlių plokštelę, tankis $3-4 \times 10^4$ ląst./mL. Ląsteles diferencijuojamos susidarius 80-90 proc. monosluoksniui. Paruošiama diferenciacijos terpė: DMEM su antibiotikais (penicilinas 100 U/mL ir streptomocinas 100 µg/mL) bei 2 proc. arklio serumo. Pašalinama augimo terpė, ląstelės praplaunamos PBS ir užpilama diferenciacijos terpė. Diferencijuojama 1-2 savaitės keičiant diferenciacijos terpę kas 2-3 dienas.

Diferenciacija vertinama ląsteles nudažius 0,1% kristalvioleto tirpalu. Ląstelės plaunamos PBS, pašalinus buferį dažoma 30 min kambario temperatūroje. Dažas 3 kartus nuplaunamas PBS. Analizuojama fluorescentiniu mikroskopu.

2.3.7. Kokultūros gavimas

Kokultūros gavimui buvo naudojamos dvi ląstelių rūšys: žiurkės plaučių kamieno endotelinės ląstelės (toliau darbe vadinamos ELP) ir žiurkės raumens nepilnos diferenciacijos ląstelės (toliau darbe vadinamos Mio). Prieš sudarant kokultūrą ląstelės auginamos atskirai. Dieną prieš eksperimentą paruošiamos vienodos koncentracijos ląstelių suspensijos auginimo terpėje. ELP ir Mio ląstelės sumaišomos santykiu 1:1 ir išsėjamos į kultivavimo indus. Auginamos termostate 37 °C, 5% CO₂.

2.3.8. Gyvų ląstelių žymėjimas fluorescenciniais dažais

Su dažu DiO. Pasiruošiama ląstelių suspensija tankiu 10^6 ląst./mL be seruminėje terpėje. Pridedama dažo DiO 5 µg/mL. Inkubuojama 20 min termostate 37 °C, 5% CO₂. Po inkubacijos

ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min 1500 rpm. Pašalinama terpė, pridedama naujos terpės su serumu. Pakartotinai centrifuguojama. Ląstelės išsėjamos į sterilius kultivavimo indus.

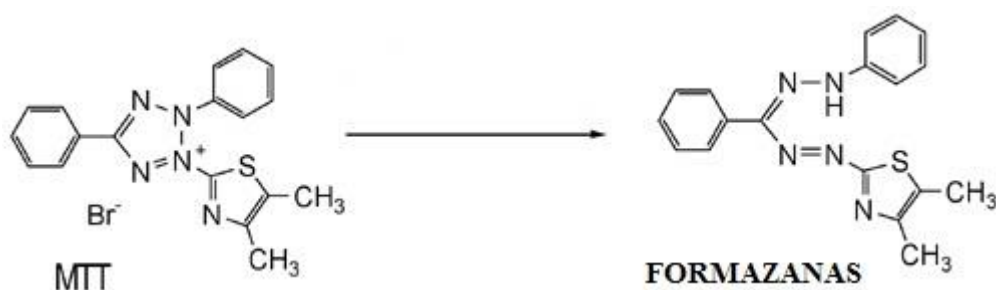
Su DAPI. Flakonėlyje su pilnu ląstelių monosluoksniu pakeičiama augimo terpė. Pridedama dažo DAPI 10µg/mL. Ląstelės grąžinamos parai į termostatą 37 °C, 5% CO₂. Kitą dieną terpė su dažu pakeičiama nauja augimo terpe.

2.3.9. Ląstelių kolonijų formavimo vertinimas

Į 6 duobučių plokštelę išsėjama 200 ląstelių. Auginama savaitę termostate 37 °C, 5% CO₂. Susidariusios kolonijos įvertinamos kokybiškai – invertuoto mikroskopo pagalba. Skaičiuojamos kolonijos turinčios daugiau nei 50 ląstelių.

2.3.10. Ląstelių proliferacijos vertinimas

Ląstelių proliferacija vertinama MTT metodu. Naudojamas tirpus geltonos spalvos MTT reagentas, kurį gyvų ląstelių mitochondrijos fermentai redukuoja iki violetinės spalvos netirpių formazano kristalų. Gyvų ląstelių skaičius yra proporcingas susidariusio produkto kiekiui. Formazano kristalai yra ištirpinami etanolyje ir įvertinama spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje.



2.1 pav. MTT redukcijos reakcija (Huamin *et al.* 2002).

Paruošta ląstelių suspensija 3×10^4 ląst./mL tankio ir išsiejama į 24 šulinėlių plokštelę. Auginama termostate 37 °C, 5% CO₂. Atliekami 4 matavimai kas 24 valandas. Pašalinama augimo terpė ir užpilama po 500 µL MTT tirpalo (0,2 mg/mL). Inkubuojama termostate 1 valandą. Susidariusios nuosėdos tirpinamos 96,3 proc. etanolyje po 200 µL/šulinėliui prieš tai pašalinus MTT tirpalą. Optinis tankis (OT), matuojamas spektrofotometriškai (570 nm), yra proporcingas gyvų ląstelių skaičiui.

2.3.11. Nanodalelių paruošimas

Nanodalelės buvo gautos iš VGTU Fundamentinių mokslų fakulteto Chemijos ir bioinžinerijos katedros. Nanodalelių charakteristika: zinko oksido (ZnO) nuo 10 iki 60 nm dydžio nanodalelių mišinys; titano dioksido (TiO₂) kristalografinės rutilo formos nuo 8 iki 115 nm dydžio nanodalelės; daugiasieniai anglies nanovamzdeliai (CnV) 10-25 nm skersmens ir 200 μm ilgio.

Pasiruošiama 10 mg/mL ZnO, TiO₂ ir anglies nanovamzdelių suspensija steriliame fosfatiniame buferyje. Prieš eksperimentą nanodalelės sonifikuojamos ultragarsinėje vonelėje 1 valandą. Prieš pat naudojimą purtoma purtyklėje apie 30s.

2.3.12. Ląstelių citotoksiškumo vertinimas

ELP, Mio ląstelės ir jų kokultūra išsėjama į 48 duobučių plokštelę tankiu $5 \cdot 10^4$ ląst/mL. Auginama 24 val. termostate 37 °C, 5% CO₂. Sekančią dieną ląstelių populiacijos paveikiamos trimis skirtingomis ZnO, TiO₂ ir CnV nanodalelių koncentracijomis (100 μg/mL, 10 μg/mL, 1 μg/mL). Nanodalelių toksiškumas ląstelėms vertinamas po 24 ir 48 valandų MTT metodu.

2.3.13. Ląstelių migracijos vertinimas

Ląstelių migracija buvo vertinama žaizdos metodu, t.y. plokštelėje išsėjamos ląstelės tokiu tankiu, kad po paros susidarytų pilnas monosluoksnis. Tada padaroma žaizda šulinelio viduryje. Ląstelių migracija ir žaizdos gijimo kinetika stebima laike.

Paruoštos ląstelių suspensijos (žiurkės nepilnos diferenciacijos miogeninės ląstelės (Mio) tankis 10^5 ląst./mL; plaučio kamieno endotelinių ląstelių (ELP) tankis 10^5 ląst./mL, kokultūra tankis 10^5 ląst./mL) užsėjamos į 24 duobučių plokštelę. Auginamos 24 valandas. Susidarius monosluoksniui, padaroma žaizda, pipetės galu perbraukiant ląstelių monosluoksnį. Gauti duomenys analizuojami Q-CAPTURE PRO 7 programa.

2.3.14. Angiogenetinio potencialo vertinimas

Kraujagysles sudarančios ląstelės yra linkusios formuoti vamzdelius auginamos ant ekstraląsteliniai matriksui artimos medžiagos, tokios kaip matrigelis.

96 duobučių plokštelė padengiama skystu matrigeliu (32 μL į šulinėlį). Pusvalandžiui laikoma 37⁰ termostate, kol medžiaga sustingsta. Pasiruošiama ląstelių suspensija tankiu $2 \cdot 10^5$ ląst/mL beseruminėje terpėje. Ląstelės išsėjamos ant matrigelio (64 μL į šulinėlį). Inkubuojama termostate.

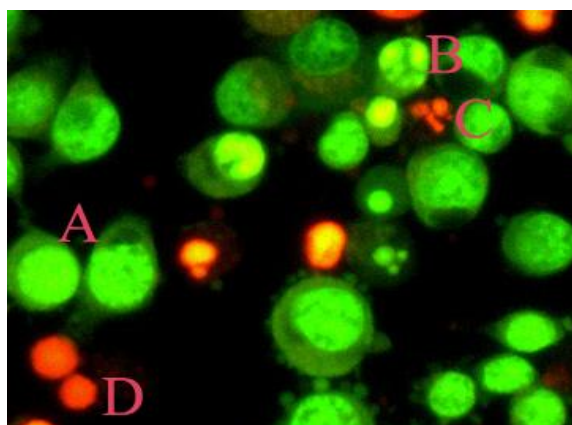
Vamzdelių formavimasis stebimas po 8 – 24 valandų. Vamzdelių savybės analizuojamos Q-CAPTURE PRO 7 programa.

2.3.15. Ląstelių dydžio vertinimas

Paruošiama ląstelių suspensija 15×10^4 ląst./mL tankio ir išsiejama į 24 šulinėlių plokštelę po 1 mL. Ląstelės laikomos termostate vieną parą. Po 24 val. ląstelės paveikiamos nanodalelių tirpalu ZnO 10 µg/mL, TiO₂ 1 µg/mL, anglies nanovamzdeliai 1 µg/mL. Po paros ląstelės dažomas AO/EB tirpalu 2 minutes, terpė su dažu pakeičiama nauja terpe. Toliau ląstelės analizuojamos fluorescenciniu mikroskopu. Ląstelių dydžiai nustatomi Q-CAPTURE PRO 7 programa.

2.3.16. Ląstelių gyvybingumo vertinimas

Ląstelių gyvybingumas vertinamas liuminescentinės mikroskopijos metodu, naudojant fluorescuojantį, su DNR besijungiantį dažų mišinį: AO – 100 µg/mL ir EB – 100 µg/mL. Į 30 µl tiriamos ląstelių suspensijos dedama 3 µL dažų mišinio ir uždengiama dengiamuoju stikleliu. Analizuojama fluorescenciniu mikroskopu. AO dažas susijungia su dvigrande DNR ir fluorescuoja žaliai. AO taip pat jungiasi su RNR ir viengrande DNR fluorescuodamas rausvai oranžine spalva. Nudažytoje ląstelių populiacijoje galima išskirti keturių rūšių ląsteles (2.2 pav.) gyvas ląsteles (ryškiai žali branduoliai), gyvas apoptozines ląsteles (žalsvos, su fragmentuotais branduoliais), negyvas apoptozines (oranžinės spalvos su fragmentuotais branduoliais), nekrozines ląsteles (oranžinės spalvos su vientisais branduoliais) (Marcille and Massie, 1994).



2.2 pav. Diferencijuotas ląstelių dažymas AO/EB dažų mišiniu: A – gyvos ląstelės, B – gyvos apoptozinės ląstelės, C - negyvos apoptozinės ląstelės, D - nekrozinės ląstelės. Fotografuota fluorescenciniu mikroskopu.

Ląstelių pasiskirstymas populiacijoje skaičiuojamas procentais.

2.3.17. Ląstelių adhezijos vertinimas

Ląstelių adhezija vertinama dvejais būdais. Pirmu atveju pasiruošiamos ELP, Mio ir jų ląstelių kokultūros suspensijos tankiu 5×10^4 ląst./mL. Užsėjama į sterilią 12 duobučių plokštelę ir auginama parą termostate 37 °C, 5% CO₂. Sekančią dieną ląstelių populiacijos veikiamos 10 µg/ml ZnO, 1 µg/ml TiO₂ ir 1 µg/ml CnV nanodalelių koncentracijomis. Poveikis atliekamas 24 val. Eksperimento dieną ląstelės purtomos purtyklėje 15 min, esant 600 rpm. Adhezija vertinama MTT metodu.

Antru atveju atliekama trumpas adhezijos tyrimas. Eksperimento dieną į 12 duobučių plokštelę išsėjamos 5×10^4 ląst./mL tankio ELP, Mio ląstelės bei jų kokultūra. Naudojama augimo terpė su pridėtomis 10 µg/mL ZnO, 1 µg/mL TiO₂ ir 1 µg/mL CnV nanodalelėmis. Pradėjus ląstelėms kibti prie paviršiaus (po 3 val.), ląstelės purtomos 15 s esant 600 rpm. Rezultatai vertinami MTT metodu.

2.3.18. Statinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis Microsoft Office Excel 2013 programa. Duomenys pateikti kaip vidurkis $\pm$ SN, reikšmės ir paklaidos buvo skaičiuojamos iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų. Rezultatai laikyti patikimais, kai $P < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

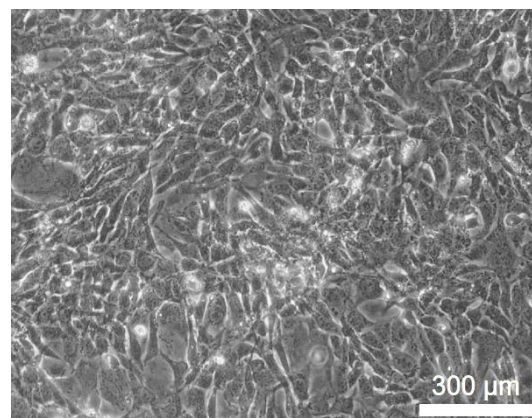
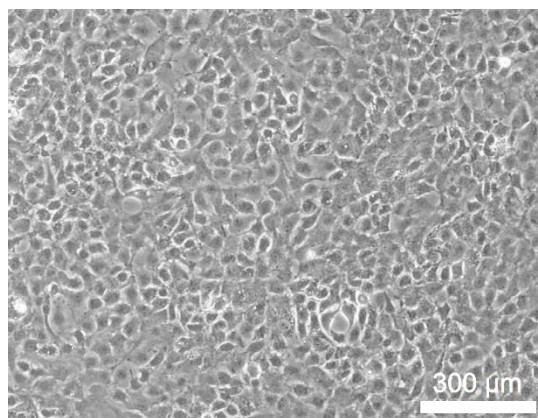
3.1. ELP bei Mio ląstelės ir jų charakteristikos

Dviejų ir daugiau ląstelių tipų kokultūros vis dažniau ir intensyviau naudojamos audinių inžinerijos tikslams. Tokio tipo kultūros geriau atspindi audinio struktūrą ir fiziologiją, todėl puikiai pritaikomos ir potencialių vaistų paieškoje bei toksikologiniuose tyrimuose. Šio darbo vienas iš uždavinių buvo suformuoti naujo tipo kokultūrą, panaudojant endotelinės kilmės bei miogeninės kilmės nepilnos diferenciacijos ląsteles. Iki šiol šių dviejų tipų ląstelių sąveika kokultūroje tirta nebuvo. Tuo tikslu gavome dvi pirmines ląstelių linijas: endotelinės ląsteles pirmtakes (ELP) bei nepilnos diferenciacijos raumens kilmės ląsteles (Mio). Abi šios ląstelių linijos buvo išskirtos iš žiurkės audinių - plaučių kamieno (ELP) bei griaučių raumens (Mio). Visi eksperimentai vykdyti gavus Bioetikos komiteto leidimą (leidimo Nr. 0212, 2011-02). Abiejų tipų ląstelės iki kokultūros eksperimentų buvo persėtos daugiau nei 60 kartų, ląstelių proliferacinis dažnis bei morfologija išliko nepakitę. Tai parodo šių ląstelių gebėjimą atsinaujinti, kuris yra svarbus kriterijus apibūdinant ląstelių kamieniškumą (Asahara *et al.*, 1997). Ankstesniuose darbuose buvo vertinta specifinių šioms ląstelėms žymenų raiška bei diferenciacinis potencialas (Burinskij, 2014).

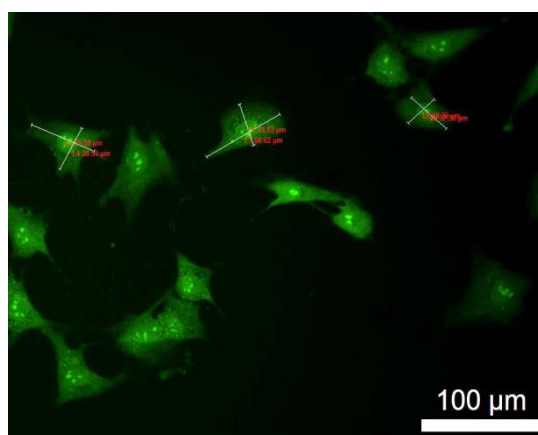
Darbo pradžioje buvo palyginta šių ląstelių morfologija bei dydis, įvertintas endotelinis ir miogeninis tiriamų ląstelių potencialas.

Iš 3.1 paveiksle pateiktų duomenų matome, kad abi tirtos priminės ląstelių linijos pasižymėjo tipiška endotelinėms ir miogeninėms ląstelėms morfologija. Pirmasis ELP aprašęs Asahara (1977 m.) pažymėjo, jog šios ląstelės formuoja „grindinio“ tipo monosluoksni. Taigi, šiame darbe naudotų ELP morfologija atitinka literatūroje aprašytą pavyzdį. Analizuojant Mio ląstelių populiaciją matome, kad ląstelių populiaciją sudaro skirtingos morfologijos ląstelės, kurių vienos labiau ištįsusios (tai atspindi ir ląstelių ilgio bei pločio matavimai) ir primena miogeninių ląstelių morfologiją, kitos labiau trikampės ar žvaigždės formos. Šiuos Mio ląstelių morfologinius skirtumus gali lemti tai, jog raumenyse aptinkama daugiau nei viena rūšis nepilnos diferenciacijos ląstelių ir kultūroje *in vitro* jų populiacijos homogeniškumą taip pat gana sunku palaikyti dėl asimetrinio dalijimosi (Peault *et al.*, 2007). Papildomai, naudojant Q-CAPTURE PRO 7 programą buvo palyginti ELP bei Mio ląstelių dydžiai. Iš pateiktų duomenų (3.1 pav., C) matome, kad Mio ląstelės yra ilgesnės už ELP, atitinkamai 55 μm ir 45 μm, tačiau siauresnės (ELP plotis - 25 μm, o Mio – 19 μm).

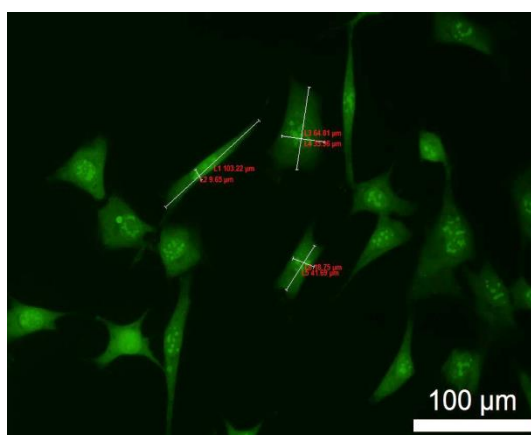
A



B

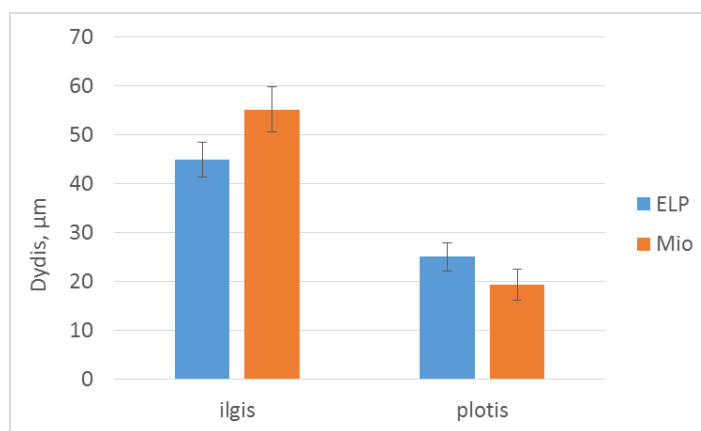


ELP



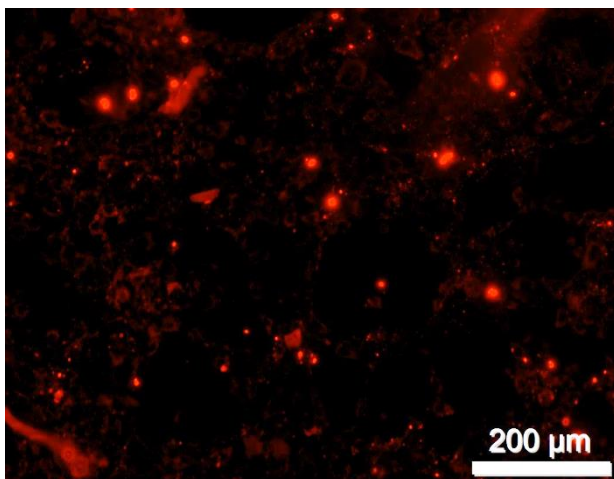
Mio

C

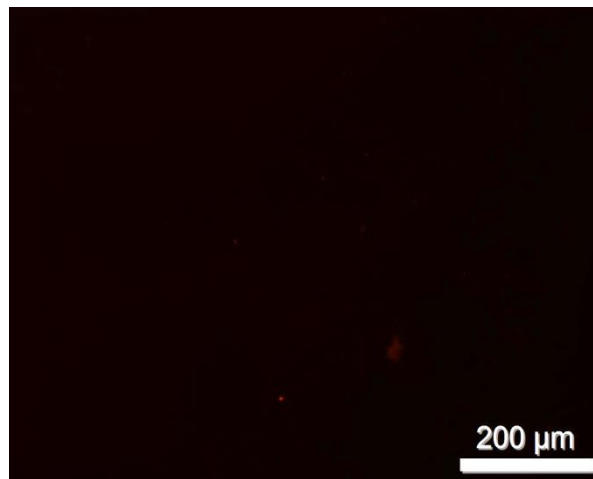


3.1 pav. Darbe naudotų endotelių ląstelių primtakių (ELP) bei miogeninės kilmės nepilnos diferenciacijos ląstelių morfologijos (A) bei dydžio (B ir C) palyginimas.

Toliau buvo patikrinta ELP savybė įsisavinti acetilintus mažo tankio lipoproteinus (AcLDL). LDL yra mažo tankio lipoproteinai, kurie jungiasi prie specifinių ląstelių receptorių ir patenka į ląsteles nuo receptorių priklausomos endocitozės būdu. AcLDL gali pasisavinti tik kelios ląstelių rūšys: endotelinės ląstelės, makrofagai ir mikroglijos ląstelės. Dėl didelio specifškumo AcLDL dažnai naudojami endotelinių ląstelių atpažinimui (Yoder, 2012). Tuo tikslu, tiriamos ELP 4 val. 37° C buvo inkubuojamos su augimo terpėje pridėtu AcLDL. Kontrolinės ląstelės augintos terpėje be AcLDL. Rezultatus išanalizavę fluorescenciniu mikroskopu, nustatėme, kad darbe naudotos ELP pasižymėjo savybe įsisavinti AcLDL (3.2 pav.).



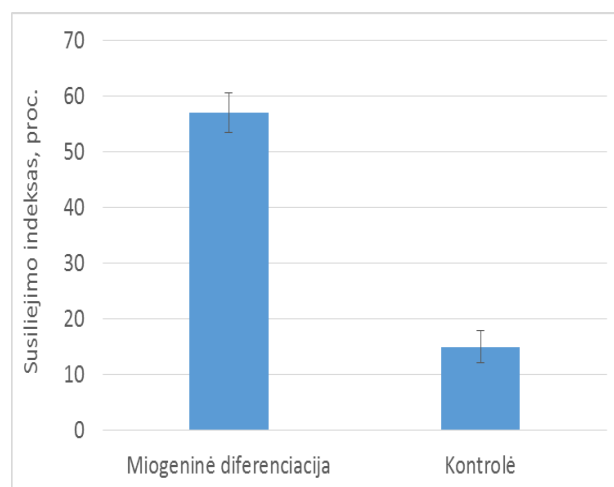
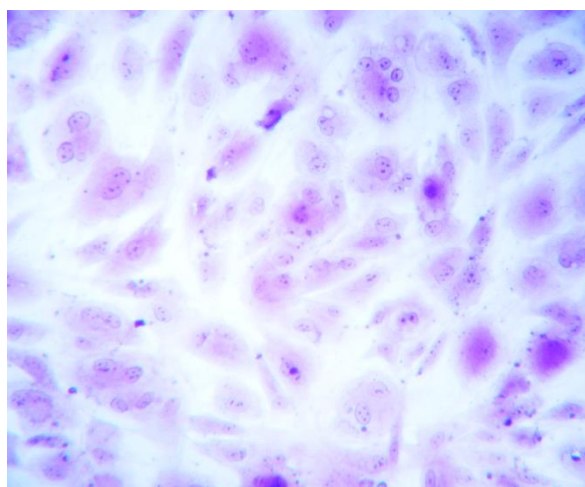
AcLDL



K

3.2 pav. AcLDL patekimo į ELP vertinimas.

Nepilnos diferenciacijos miogenininės ląstelės esant raumeninių ląstelių pažeidimui diferencijuojasi į raumens ląsteles. Tačiau yra literatūroje duomenų, kad nepilnos diferenciacijos miogeninės ląstelės (ypač satelitės ląstelės) esant išoriniams veiksniams geba diferencijuotis ir į kito tipo ląsteles, tokias kaip adipocitai, osteocitai, chondrocitai, lygiųjų raumenų ląstelės, hemapoetinės ląstelės, nervinės ląstelės (Fujimaki *et al.*, 2013). Šiame darbe pateikiame Mio ląstelių miogeninės diferenciacijos vertinimo duomenis. Iš 3.3 paveiksle pateiktų duomenų matome, kad po 14 d. šių ląstelių auginimo terpėje su miogeninės diferenciacijos induktoriumi (šiuo atveju naudota 2 proc. arklio serumo) didelė populiacijos dalis buvo linkusi susilieti į dvi ir daugiau branduolių turinčių ląstelių. Įvertinus kiekybiškai matome, kad diferencijuotų Mio ląstelių populiacijoje beveik 60 proc. ląstelių turėjo du ir daugiau branduolių. Palyginimui, kontrolinėje

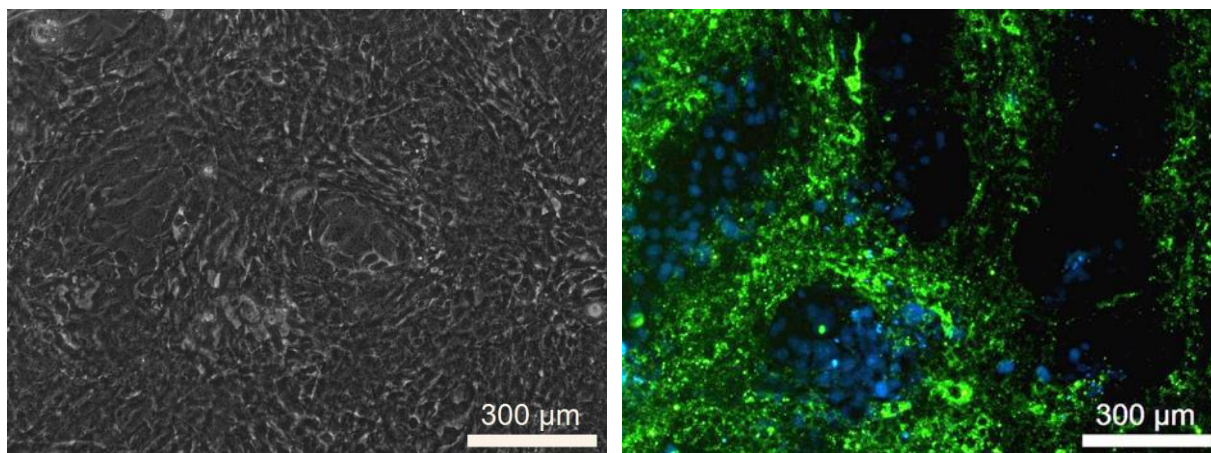


3.3 pav. Mio ląstelių diferenciacijos raumenine linkme vertinimas.

ląstelių populiacijoje, susiliejo indeksas buvo 14 proc. Nedidelis kiekis suliejusių ląstelių kontrolinėje populiacijoje galimas dėl spontaninės diferenciacijos.

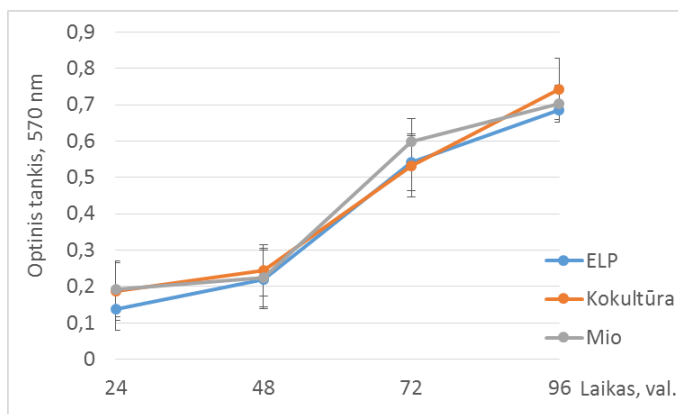
3.2. ELP bei Mio ląstelių kokultūros gavimas ir savybių tyrimas

Šiame darbe, buvo tiriamas tiesioginės ELP ir Mio ląstelių kokultūros variantas. Tuo tikslu tiriamos ląstelės maišomos santykiu 1:1, išsėjamos į kultivavimo indus ir auginamos 37^o C 5% CO₂ termostate. Siekiant atskirti ELP ir Mio ląsteles kokultūroje, jos buvo pažymimos fluorescencinėmis žymėmis – su DNR susirišančiu dažu DAPI arba membraną žyminčiais dažais DiO. Pirmiausia įvertinome ELP ir Mio ląstelių augimo pobūdį kokultūroje. Nustatėme, abi tiriamos skirtingos kilmės ląstelės kokultūroje linkusios augti organizuotai (3.5 pav.) ir tarpusavyje nesusimaišo. ELP sudaro pailgas struktūras, Mio ląstelės labiau linkusios augti vientisai. Iš literatūros yra žinoma, kad ELP išskirtos iš periferinio kraujo ir auginamos kokultūroje su osteoblastais po kurio laiko pradeda sudaryti mikrokraujagyslių tipo struktūras (Fuchs *et al.*, 2007). Kale su kolegomis (2005) ELP augino kokultūroje su pericitais bei stimuliavo pastaruosius sintetinti VEGF. Pericitų sintetinamas VEGF, savo ruožtu, jau po 24 valandų nuo kokultūros sudarymo skatino ELP formuoti kapiliarų tipo struktūras.



3.4 pav. ELP ir Mio ląstelių kokultūros morfologija. Kairėje monosluoksnio nuotrauka, dešinėje fluorescenciniu mikroskopu daryta nuotrauka, kur žaliai DiO žymėtos ELP, mėlynai DAPI – Mio.

Proliferacijos vertinimas. Aukštas ląstelių proliferacijos potencialas yra svarbus kriterijus ląstelių kamieniškumui nustatyti. Audinių inžinerijos darbuose naudojant iš skirtingų ląstelių populiacijų sudarytą kokultūrą yra svarbu, kad kokultūra išlaikytų aukštą proliferacijos potencialą. Šioje darbo dalyje lyginome ELP bei Mio ląstelių ir jų kokultūros proliferacinį potencialą. Tuo tikslu ląstelės buvo išsėjamos vienodu tankiu ir jų dauginimaisi pradėtas vertinti praėjus 24 valandoms, kai visos ląstelės jau pilnai prilipusios prie paviršiaus.

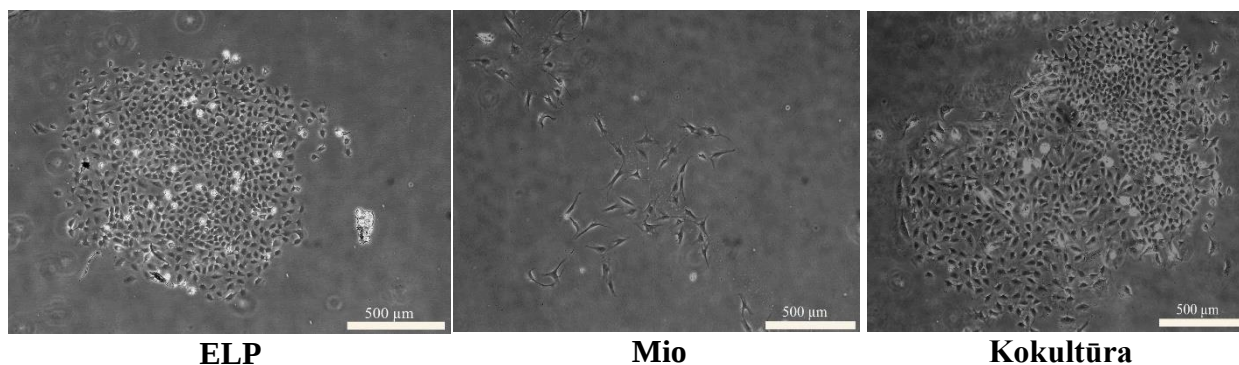


Ląstelės	Ląstelių skaičiaus pokytis per 72 val.
ELP	$5 \pm 2,12$
Mio	$3,64 \pm 1,6$
Kokultūra	$3,98 \pm 1,8$

3.5 pav. ELP, Mio ląstelių bei jų kokultūros proliferacijos vertinimas MTT metodu.

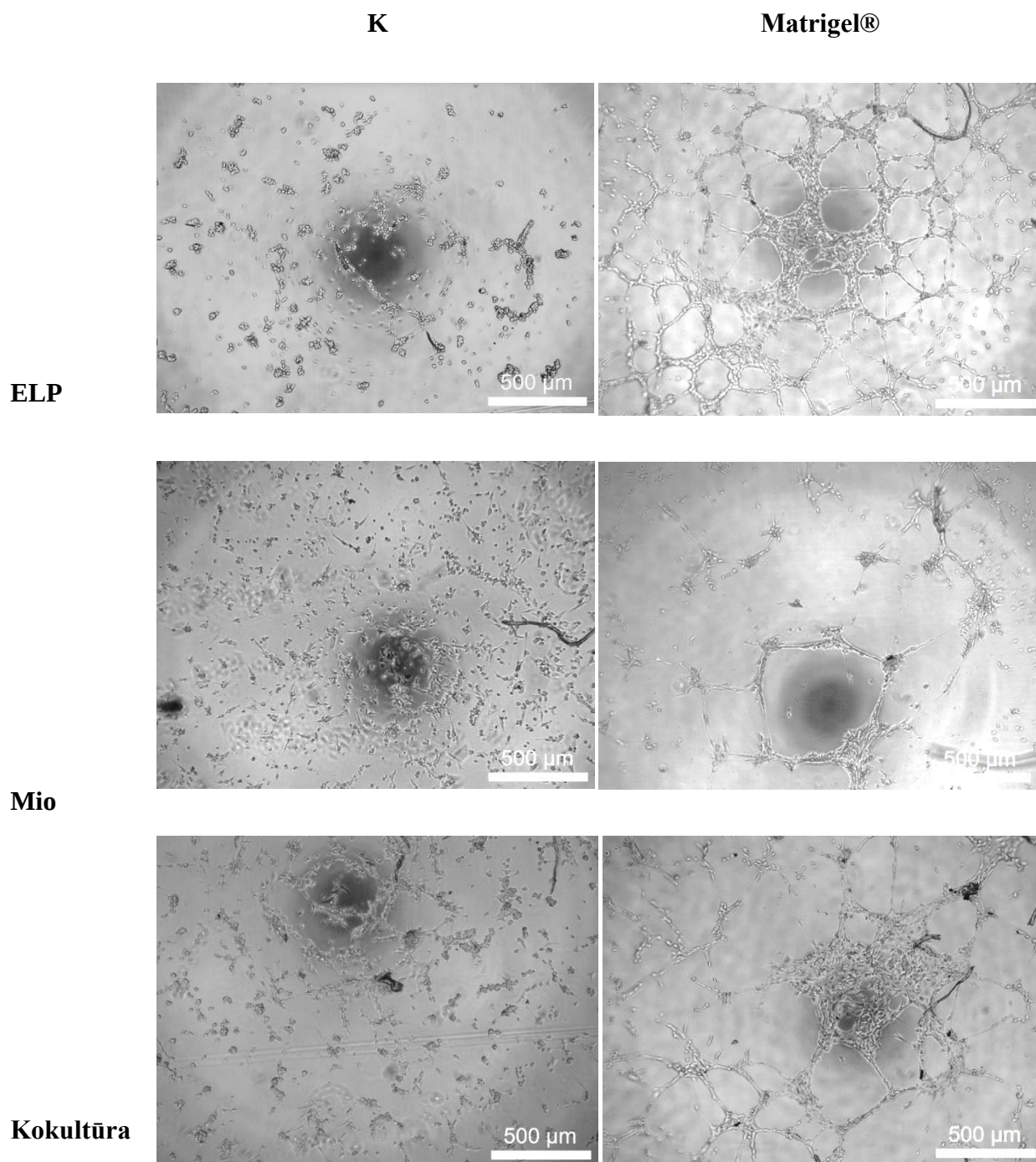
Staigus visų trijų ląstelių skaičiaus padidėjimas nustatytas tarp 48 ir 72 tyrimo valandos. Per šį laikotarpį ELP populiacija padidėjo 2,7 karto, o Mio ir kokultūra pasidaugino atitinkamai 2,3 karto ir 2,2 karto. Iš viso eksperimento metu intensyviausiai dauginosi ELP, kurių populiacija per 72 tyrimo valandas padidėjo net 5 kartus. Mio ir kokultūros proliferacinis dažnis buvo panašus ir siekė beveik 4 kartus: 3,64 ir 3,98 kartai. Kokultūros proliferacijos potencialo didesnis panašumas į Mio ląstelių nei į ELP gali būti paaiškinamas tuo, kad kai kuriuos ląstelės, pvz.: lygiųjų raumenų ląstelės, kokultūroje su ELP stabdo pastarųjų proliferaciją (Truskey, 2010).

Kolonijų formavimo potencialo vertinimas. Kolonijų formavimas – tai kamieninių ląstelių savybė iš vieno ląstelės sudaryti daugiau nei 50 ląstelių populiaciją. Šią kamieninių ląstelių savybę vertinome, į 6 duobučių plokštelę išsėdami po 200 ELP, Mio ląstelių ir jų kokultūros mišinio. Kolonijų susidarymą analizavome po 7 d. (3.6 pav.). Gauti duomenys parodė, kad Mio ląstelės pasižymi silpniausiu gebėjimu formuoti kolonijas, jų sudarytos kolonijos nesiekė 50 ląstelių. Tuo tarpu ELP bei ELP-Mio kokultūra per analizuojamą laikotarpį suformavo akivaizdžius klonus. Tačiau, sprendžiant pagal ląstelių morfologiją, kokultūroje ELP ir Mio ląstelės nesusimaišė, bet jų kolonijos augo šalia. Kokultūroje su ELP Mio ląstelės sudarė didesnes kolonijas, nei augdamos vienos. Apie ELP gebėjimas pagerinti kitų ląstelių proliferaciją yra žinoma iš literatūros. 1993 metais Fillinger su kolegomis tyrė lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos priklausomybę nuo ELP ląstelių ir nustatė, kad lygiųjų raumenų ląstelėms augant kokultūroje su ELP, ląstelių proliferacijos dažnis padidėjo net 56% lyginant su kontroline grupe (Fillinger *et al.*, 1993). Kito eksperimento metu nustatyta, kad ELP ir lygiųjų raumenų kokultūroje sustiprėja VEGF, PDGF-AA, PDDGFF-BB ir TGF- β 1 genų raiška. Šių genų produktai skatina lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003). Nors šie aptarti eksperimentai nėra identiški mūsų darbui, tačiau tikėtina, kad panašiu veikimu ELP pasižymėjo ir Mio ląstelių atžvilgiu.



3.6 pav. Kolonijų formavimo potencialo vertinimas ELP ir Mio ląstelių populiacijose bei jų kokultūroje.

Angiogeninio potencialo vertinimas. Ląstelių savybė formuoti mikrokraujagyslių tipo struktūras yra svarbus kriterijus audinių inžinerijoje. *In vitro* angiogeninio potencialo vertinimui naudojamas ekstraląstelinio matrikso pakaitalas Matrigel®, išskirtas iš pelių sarkomos auglio. Šioje medžiagoje gausu laminino, kolageno IV, heparino sulfato proteolikanų, entaktino ir įvairių augimo faktorių. Daugelio eksperimentų metu pastebėta, kad endotelinio tipo ląstelės ant Matrigel® formuoja voratinklio tipo vamzdelių struktūras, kurios yra panašios į kapiliarų tinklus. Šiame darbe angiogeninis potencialas buvo tiriamas ELP, Mio ląstelių populiacijose bei jų kokultūroje. Ląstelės beseruminėje terpėje užsėtos ant Matrigel® padengto paviršiaus po 8 tyrimo valandų pradėjo formuoti vamzdelių tipo struktūras. Kadangi vamzdelių ilgis variavo, todėl šiame darbe vamzdeliu laikytos struktūros, kurios yra mažiausiai du kartus ilgesnės už vidutinį ląstelių ilgį ir matuotos nuo vienos didesnės ląstelių sankaupos iki kitos. Vamzdelių skaičius apskaičiuotas 3,7 mm² plote. Galimybė formuoti vamzdelių tipo struktūras pasižymėjo visos tirtos ląstelių populiacijos (3.7 pav.). Tačiau ELP reikėjo ilgesnio laiko suformuoti struktūras ir jų vamzdeliai buvo trumpesni (3.1 lentelė). Mio ląstelės vamzdelius formuoti pradėjo anksti, tačiau jie pradėjo irti greičiau nei suformuoti ELP ir po 24 val. buvo likę tik pavieniai ilgi vamzdeliai. ELP ir Mio ląstelių kokultūroje vamzdeliai formotis pradėjo greitai, jų vidutinis ilgis išliko panašus ir po 24 valandų, tačiau vamzdelių skaičius sumažėjo. Ilgiausi vamzdeliai pastebėti kokultūroje, o daugiau trumpų vamzdelių buvo ELP populiacijoje. Nei viena iš tirtų ląstelių populiacijų kontrolinėse duobutėse vamzdelių tipo struktūros neformavo.



3.7 pav. Angiogeninio potencialo vertinimas ELP ir Mio ląstelių populiacijose bei jų kokultūroje.

Nors Matrigel® naudojamas endotelinų ląstelių angiogenezei įvertinti, tačiau šiame darbe atliktuose eksperimentuose vamzdelius formavo ne tik ELP, bet ir Mio ląstelė. Apie tai, kad griaučių raumenų kilmės nepilnos diferenciacijos ląstelės geba formuoti vamzdelius ant Matrigel® medžiagos, iki šiol aprašyta nebuvo. Vo su kolegomis panašų tyrimą atliko su lygiųjų raumenų ląstelėmis. Buvo tiriama žmogaus lygiųjų raumenų ląstelių ir žmogaus endotelinų pirmtakinių ląstelių kokultūros savybės. Eksperimentuose su Matrigel® pastebėta, kad pavienės

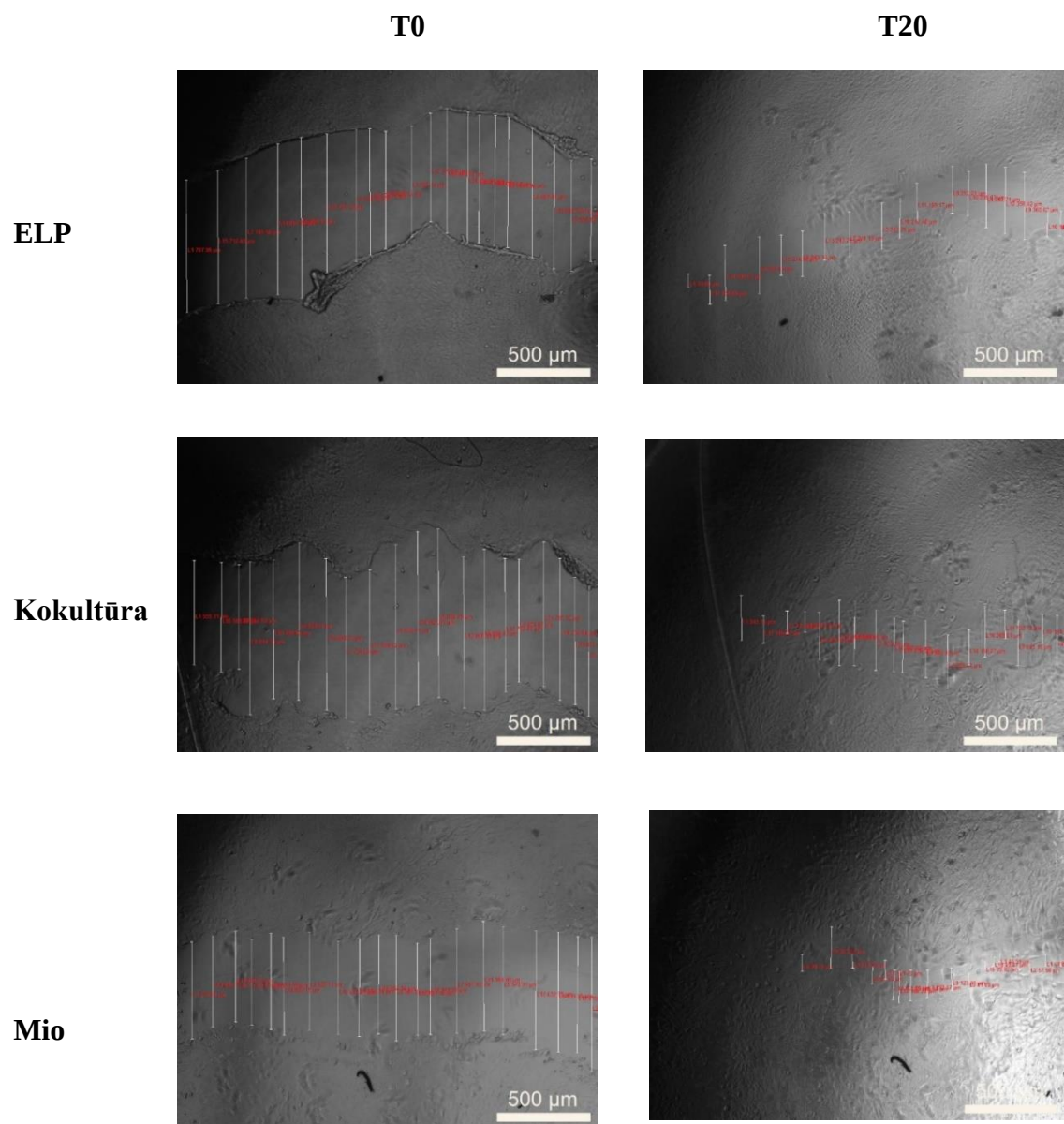
ELP formuoja daugiau, bet trumpesnių vamzdelių, tuo tarpu lygiųjų raumenų ląstelės formavo pavienius, bet ilgesius vamzdelius (Vo *et al.*, 2010).

3.1 lentelė. Angiogeninio potencialo vertinimas.

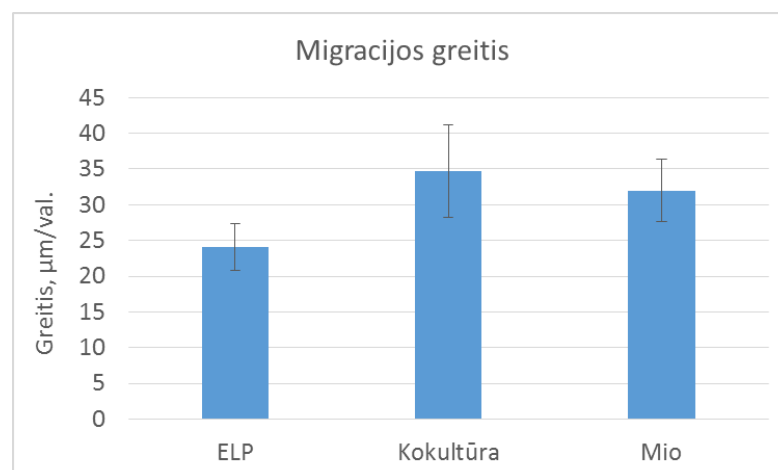
	ELP		Mio		Kokultūra	
	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.
Vidutinis vamzdelio ilgis, μm	148 $\pm$ 35	248 $\pm$ 81	246 $\pm$ 83	348 $\pm$ 193	262 $\pm$ 66	270 $\pm$ 103
Vamzdelių skaičius	56 $\pm$ 23	69 $\pm$ 18	51 $\pm$ 5	6 $\pm$ 4	60 $\pm$ 18	37 $\pm$ 17
Trumpiausias vamzdelis, μm	100	103	134	180	180	240
Ilgiausias vamzdelis, μm	376	506	496	646	540	678

Migracijos greičio vertinimas. Migracijos greičio vertinimas buvo atliktas žaizdos metodu. Ląstelių migracija stebėta 20 valandų ir duomenys analizuoti Q-CAPTURE PRO 7 programa. Iš 3.8 bei 3.9 paveiksluose pateiktų duomenų matome, kad lėčiausiai migravo ELP ląstelės, o greičiausiai ELP ir Mio ląstelių kokultūra.

Duomenų apie nepilnos diferenciacijos miogeninių ląstelių įtaką ELP migracijai ar atvirkščiai nėra, tačiau eksperimente su ELP ir osteoklastų pirmtakinėmis ląstelėmis, pastebėta, kad ELP po 4 dienų kultivavimo kartu pagerino osteoklastų pirmtakių migraciją per pusiau pralaidžią membraną (Pang *et al.*, 2012).



3.8 pav. Migracijos vertinimas žaizdos metodu ELP ir Mio ląstelių populiacijose bei jų kokultūroje. T0 – žaizdos suformavimas; T20 – žaizdos plotas praėjus 20 val. nuo žaizdos suformavimo.



3.9 pav. Migracijos greičio palyginimas ELP, Mio ląstelių populiacijose ir jų kokultūroje.

3.3. Nanodalelių poveikis ELP, Mio ląstelėms bei jų kokultūrai

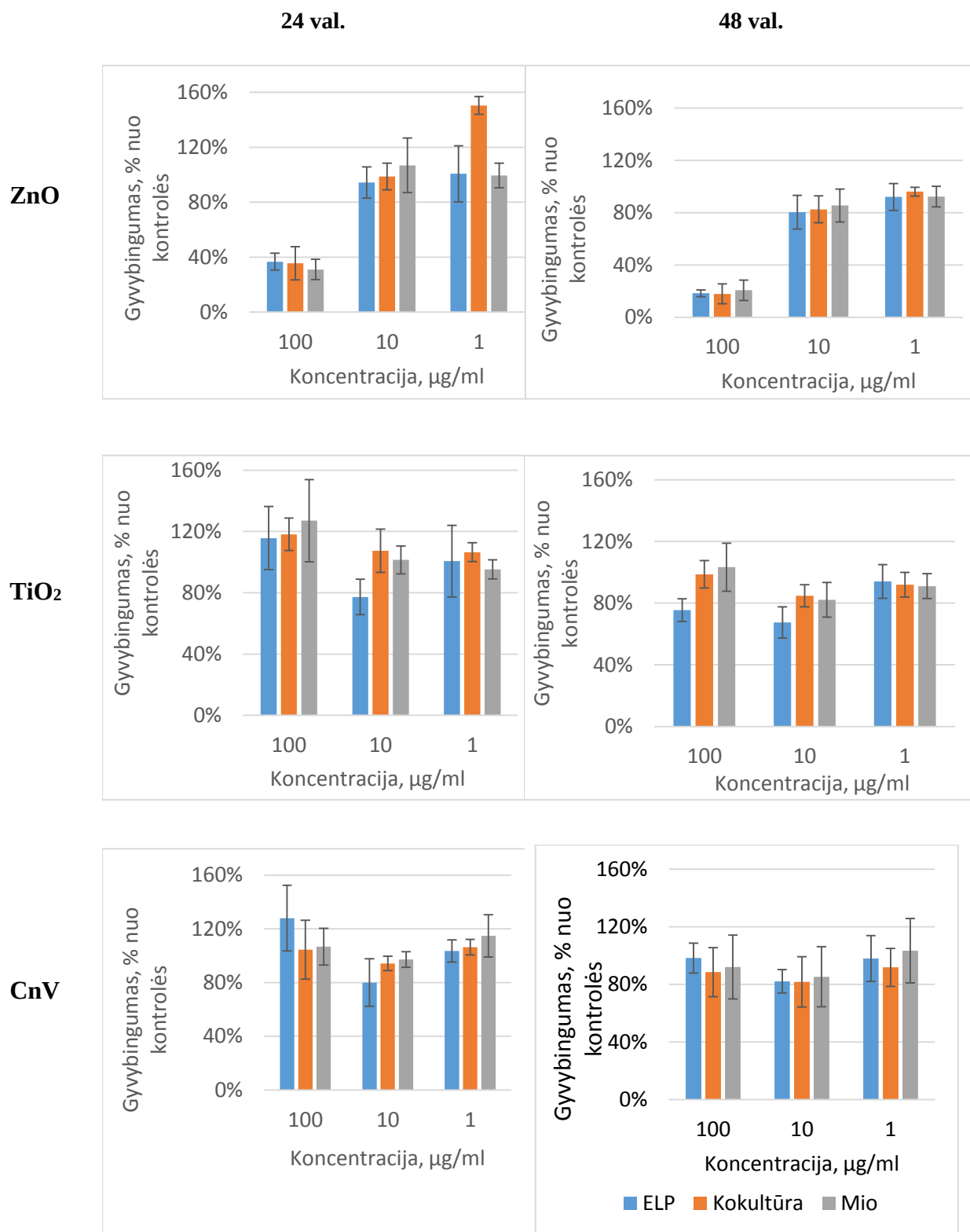
3.3.1. Nanodalelių citotoksiškumo vertinimas

Šiuo metu nanodalelės naudojamos daugelyje sričių, įskaitant ir mediciną, kosmetologiją ar maisto pramonę. Sąveika su gyvais organizmais gali sukelti neigiamą poveikį ir pažeisti ląsteles. Šiame darbe analizavome ZnO, TiO₂ bei CnV nanodarinių poveikį mūsų tirtoms ELP bei Mio ląstelėms ir jų kokultūrai. Vertinant nanodalelių poveikį ląstelėms, dažniausiai tiriamos diferencijuotos odos, plaučių ar žarnyno ląstelės. Eksperimentų su kamieninėmis ląstelėmis yra atlikta tik keletas, o literatūros duomenų su ELP ar nepilnos diferenciacijos miogeninėmis ląstelėmis, kaip ir su jų kokultūromis šiuo metu publikuota nėra.

Citotoksiškumo vertinimui nanodalelių koncentracijos buvo pasirinktus išanalizavus literatūroje pateiktus duomenis - 100 µg /mL, 10 µg /mL ir 1 µg /mL. Poveikis vertintas po 24 ir 48 poveikio valandų. Gauti duomenys pateikiami 3.10 paveiksle. Matome, kad toksiškiausios buvo ZnO nanodalelės, jų toksiškumas tiesiogiai priklausė nuo naudotos koncentracijos. Esant didžiausiai 100 µg/mL koncentracijai tirtų ląstelių gyvybingumas sumažėjo apie 80%. Panašaus lygio toksiškumas buvo nustatytas tiriant ZnO poveikį žarnyno ir plaučių ląstelėms. Šiuo atveju taip pat ZnO ND pasižymėjo didesniu toksiniu poveikiu nei titano dioksido nanodalelės (Setyawati *et al.*, 2015). ZnO ND toksiškumas taip pat priklausė ir nuo poveikio laiko. Po 48 valandų visos trys tirtos koncentracijos visoms ląstelių populiacijoms buvo akivaizdžiai toksiškos. ZnO ND toksiškumo priklausomybę nuo poveikio trukmės yra nustatę ir kiti autoriai. Najim ir kt. (2014) parodė kur kas didesnę toksiškumą ląstelėms pasireiškusį po 96 poveikio valandų, lyginant su 24 val. poveikiu. Po 24 val. poveikio 1 µg /mL ZnO ND kokultūroje žymiai padidėjo proliferacija, lyginant tiek su kitomis ND koncentracijomis, tiek su kitomis ląstelėmis. Esant 10 µg /ml ZnO ND koncentracijai citotoksiškumas visoms ląstelėms buvo panašus, tik Mio ląstelės buvo kiek atsparesnės.

TiO₂ ND nanodalelių toksiškumo rezultatai gana kontraversiški. Daugeliu atveju jų poveikis priklausė nuo laiko - 24 val. poveikis TiO₂ ND ryškesnio toksiškumo ląstelėms nesukėlė, tačiau 48 valandų poveikis beveik visais atvejais (išskyrus ELP poveikį 10 µg /ml koncentracija) mažino tirtų ląstelių gyvybingumą. 100 µg /ml TiO₂ ND koncentracija netgi skatino ląsteles proliferuoti, ypač Mio ląsteles. Po 48 val. toksiškiausia TiO₂ koncentracija buvo 10 µg /ml, ląstelių išgyvenamumas siekė mažiau 85%. Titano dioksidas pasirodė esantis toksiškiausias ELP. Tai, kad TiO₂ poveikis priklauso nuo laiko, buvo parodyta ir tiriant mezenchimines kamienines ląsteles - praėjus 7 TiO₂ ND poveikio dienoms ląstelių išgyvenamumas sumažėjo 56% lyginant su kontroline grupe (Hou *et al.*, 2013). Tačiau skirtingai nei šiame darbe atliktame eksperimente,

mezenchiminių kamieninių ląstelių toksiškumas priklausė nuo TiO_2 koncentracijos, kai ELP atveju toksiškumo priklausomybė nuo koncentracijos nebuvo tiesinė.



3.11 pav. ZnO, TiO_2 ir CnV nanodalelių citotoksiškumo tyrimas ELP, Mio ląstelių populiacijoms bei jų kokultūrai.

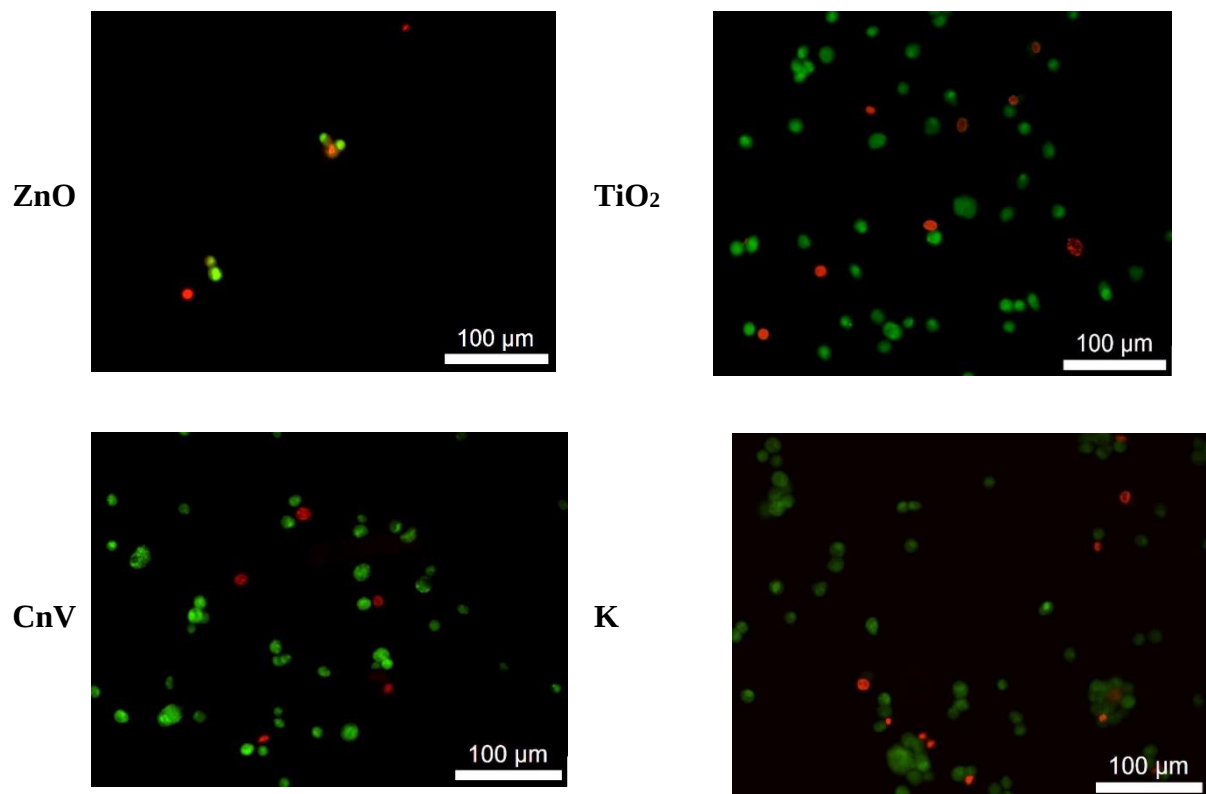
Anglies nanovamzdelių toksiškumas buvo panašus kaip ir titano dioksido nanodalelių. Citotoksiškumas priklausė nuo poveikio laiko ir toksiškesnė koncentracija buvo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nei 100 ar 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Net ir esant didžiausiam toksiškumui, ląstelių išgyvenamumas siekė ne mažiau 80% lyginant su kontrole. Esant toksiškiausiai koncentracijai didžiausiu išgyvenamumu pasižymėjo Mio ląstelės. Didžiausia įtaką koncentracijai turėjo ELP. Po 24 val. poveikio esant 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CnV koncentracijai ELP išgyvenamumas buvo didesnis nei kontrolinėje grupėje ir siekė 128%, tuo tarpu esant 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentracijai išgyvenamumas krito iki 80 %. Literatūroje yra įvairių duomenų apie CnV poveikį ląstelėms: tiriant MSC pastebėtas šių mezenchiminių ląstelių proliferacijos skatinimas, tuo tarpu, kai HEK293 proliferaciją CnV inhibuoja, o adipocituose proliferacijos dažnis priklauso nuo CnV koncentracijos (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ skatina proliferaciją, o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stabdo) (Esfandiary *et al.*, 2014). Taigi, CnV poveikis ląstelėms labai priklauso nuo ląstelių rūšies.

Apibendrinant, didžiausiu toksiškumu iš trijų tirtų nanodalelių, esant koncentracijai nuo 1 iki 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pasižymėjo ZnO ND, mažiausiu – CnV. ZnO toksiškumas priklausė nuo ND koncentracijos, o TiO_2 ir CnV toksiškiausia koncentracija buvo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Geriausiu išgyvenamumu esant toksiškiausiai koncentracijai veikiant ląsteles ZnO po 24 poveikio valandų pasižymėjo ELP, o po 48 val. – Mio ląstelės. Veikiant ląsteles TiO_2 , didžiausiu atsparumu pasižymėjo ELP ir Mio ląstelių kokultūra, o CnV mažiausiai toksiškas buvo Mio ląstelėms.

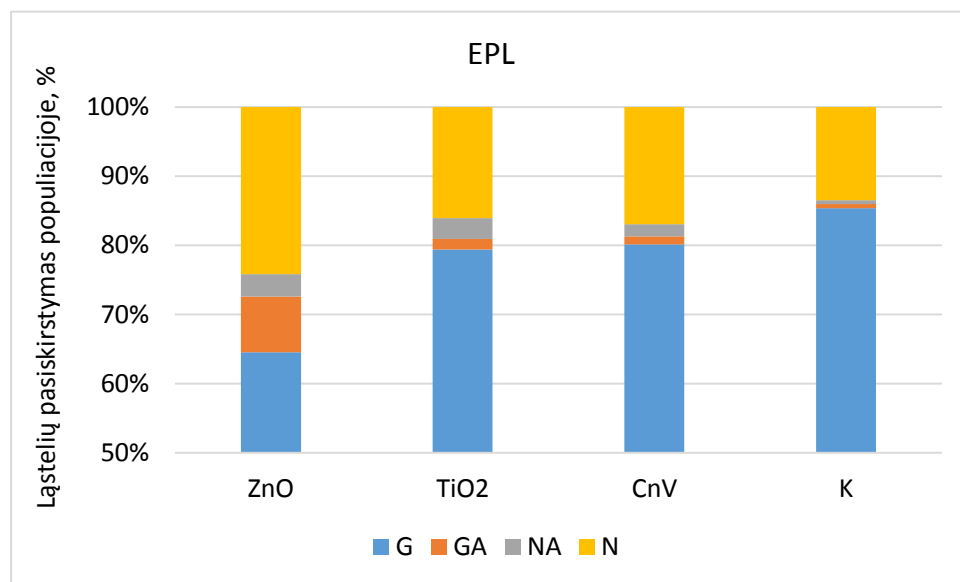
3.3.2. Nanodalelių sukeltos žūties pobūdžio nustatymas

Toliau vertinome ND sukeltos žūties pobūdį. Tuo tikslu naudojame šias nanodalelių koncentracijas: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZnO, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TiO_2 ir 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CnV. Ląstelių žūties pobūdis buvo vertinamas po 24 poveikio valandų diferencijuotai dažant tiriamas ląsteles AO/EB dažų mišiniu. Ląstelių žūties pobūdis paveiksluose nurodomas sutrumpinimais: G – gyvos ląstelės, GA – gyvos apoptotinės, NA – negyvos apoptotinės ir N – nekrozinės (3.13 ir 3.15 pav.). Ląstelių gyvybingumas taip pat tikrintas po poveikio nanodalelėmis praėjus 15 min, 3 val., 48 val., ir 72 val., tačiau skirtumo nepastebėta, todėl šie duomenys nepateikiami.

Iš 3.12 bei 3.13 paveiksluose pateikamų duomenų matome, kad ELP populiacijoje ZnO sukelė apie 25 proc. ląstelių žūtį apoptozės būdu (kontrolinėje populiacijoje tokių ląstelių buvo iki 15 proc.). Čia taip pat buvo apie 8 proc. apoptozės būdu žuvusių ląstelių. Žinoma, kad ZnO ND ląstelėse sukelia ROS gamybą, kas veda link ląstelių žūties apoptozės būdu (Kako *et al.*). Po TiO_2 ir CnV poveikių ELP daugiausia žuvo nekrozės būdu.

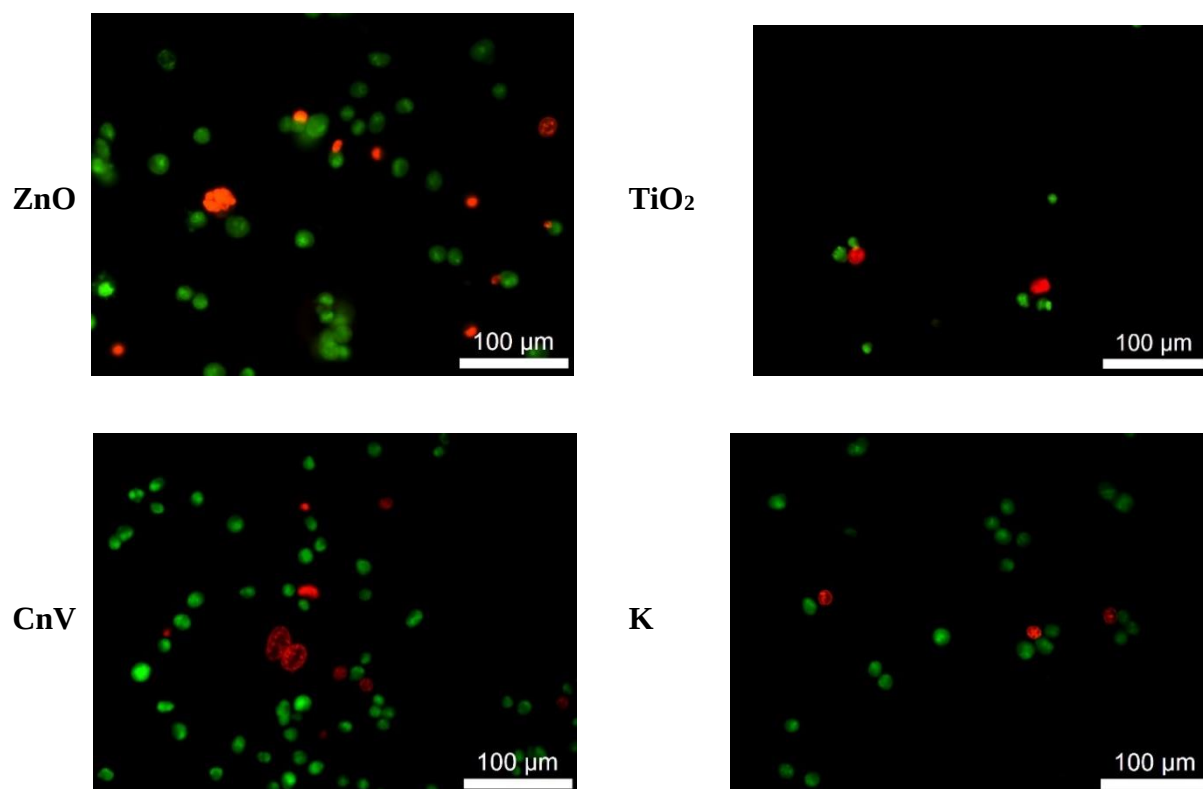


3.12 pav. ELP žūtis po 24 val. poveikio nanodalelėmis.

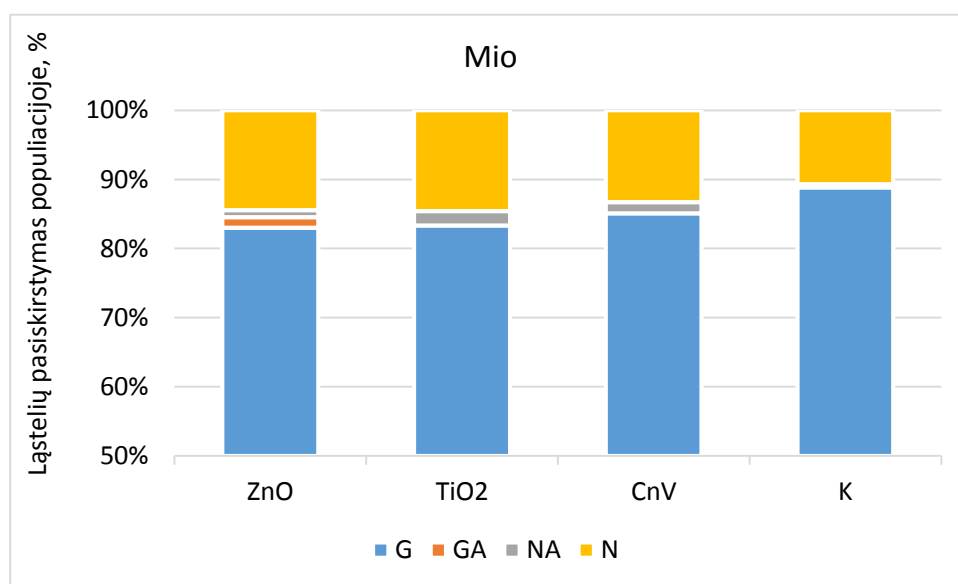


3.13 pav. ELP žūties pobūdžio vertinimas būdai po poveikio nanodalelėmis.

Mio ląstelių poliacijos gyvybingumas visose grupėse siekė daugiau nei 80 %. Žūtis čia daugiausia vyko nekrozės būdu (3.14 ir 3.15 pav.). Apoptozė pastebėta tik ląstelių populiacijoje, paveiktoje su ZnO nanodalelėmis.



3.14 pav. Mio ląstelių žūtis po 24val poveikio nanodalelėms.



3.15 pav. Mio ląstelių žūties būdai po poveikio nanodalelėmis.

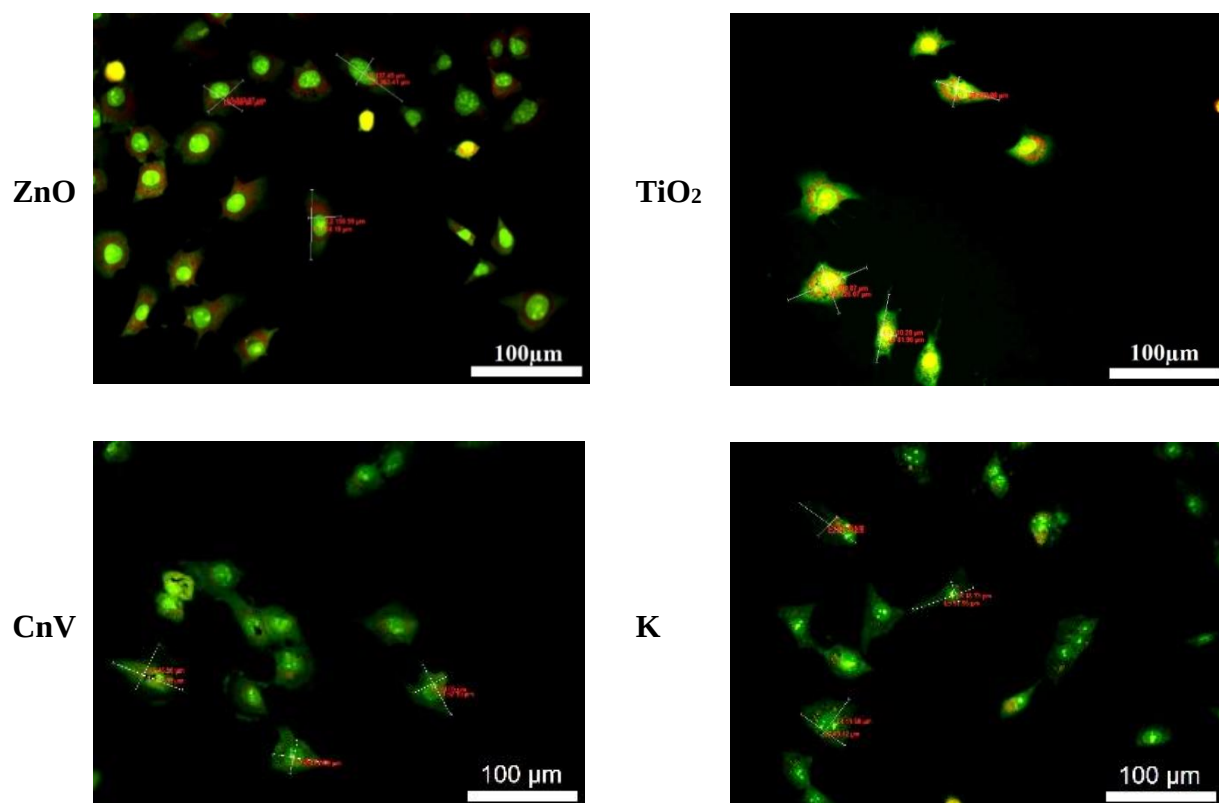
Apibendrinant gautus duomenis, matome, kad tiek ELP, tiek Mio ląstelės daugiausia žuvo nekrozės būdu. Tačiau literatūros duomenimis, nanodalelės dažniau sukelia apoptozę. Ir tik esant didelei koncentracijai ar esant dideliems ND dydžiams sukeliamą nekrozę (Gosh *et al.*, 2013; Kang

et al., 2010; Aula *et al.*, 2014). Žinoma, kad mūsų tiramos ND yra gana heterogeniškos dydžio atžvilgiu. Tai galėtų paaiškinti mūsų gautus duomenis.

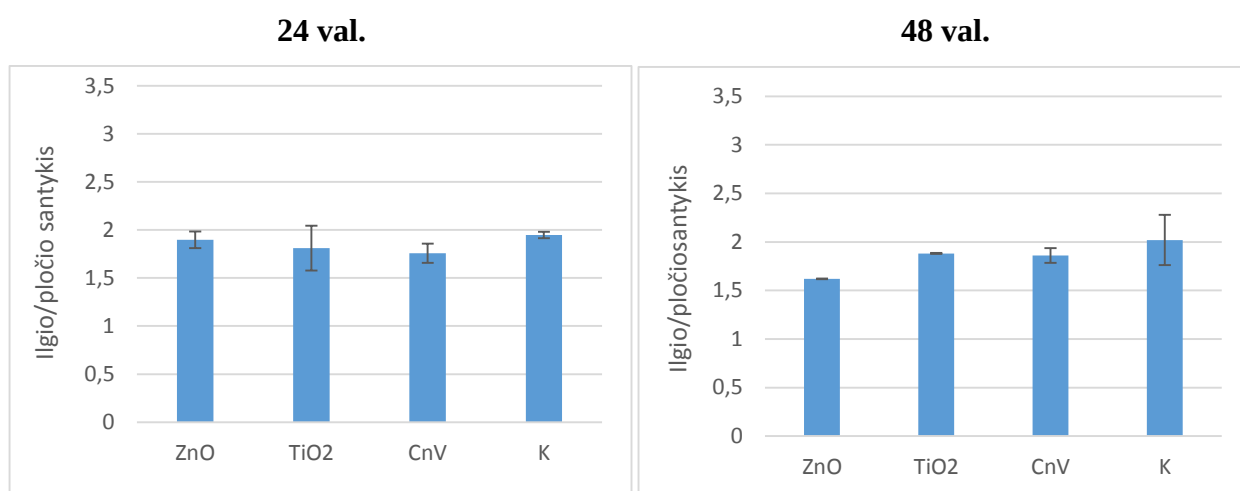
3.3.3. Nanodalelių indukuojamų morfologinių pokyčių ELP ir Mio ląstelėse įvertinimas

Literatūroje yra duomenų, kad ilgesnis poveikis ND gali sukelti tiriamų ląstelių morfologijos pokyčius. Į tai atsižvelgdami, tyrėme, ar tokią įtaką ND turi mūsų tiriamoms ELP ir Mio ląstelėms. Šiuo atveju naudojome mažesnės tirtų ND koncentracijas - 10 µg /mL ZnO ND, 1 µg /mL TiO₂ ir 1µg /mL CnV. Ląstelių morfologijai įvertinti ląstelės buvo pažymėtos AO/EB dažų mišiniu ir rezultatai analizuojami Q-CAPTURE PRO 7 programa. Gauti duomenys pateikiami 3.16 – 3.19 paveiksluose. Matome, kad po 24 valandų poveikio nanodalelėmis akivaizdžių morfologinių pokyčių ELP nepastebėta, tik kad šios ląstelės šiek tiek suapvalėjo veikiamos CnV nanodalelių (lyginant su kontrole) (3.16 pav.). Po 48 val. poveikio su ZnO ND ląstelių ilgio/pločio santykis sumažėjo lyginant su kontrole (atitinkamai 1,6 ir 2). Kitos nanodalelės didelės įtakos ELP morfologijai neturėjo. Najim su kolegomis (2014) pastebėjo ZnO ND sukeliamus morfologinius pokyčius, priklausomai nuo ląstelių tipo. Ląstelės buvo veikiamos su ZnO 96 valandas. Pastebėti morfologiniai pokyčiai neuroblastomos ląstelėse. Jos suapvalėjo, padidėjo jų tūris. Tuo tarpu plaučių vėžinių ląstelių morfologijai ND įtakos neturėjo.

Tačiau pastebėta didesnė genų raiška ELP paveiktose su ZnO ir TiO₂ (ypač ZnO) ND lyginant su CnV ir kontroline grupe (3.16 pav.). Apie genų raiškos aktyvumą galima spręsti pagal ląstelių citoplazmos spalvą, nes akridino oranžo dažas jungdamasis su RNR įgauna raudoną spalvą, skirtingai nei jungdamasis su DNR (fluoresuoja žaliai).



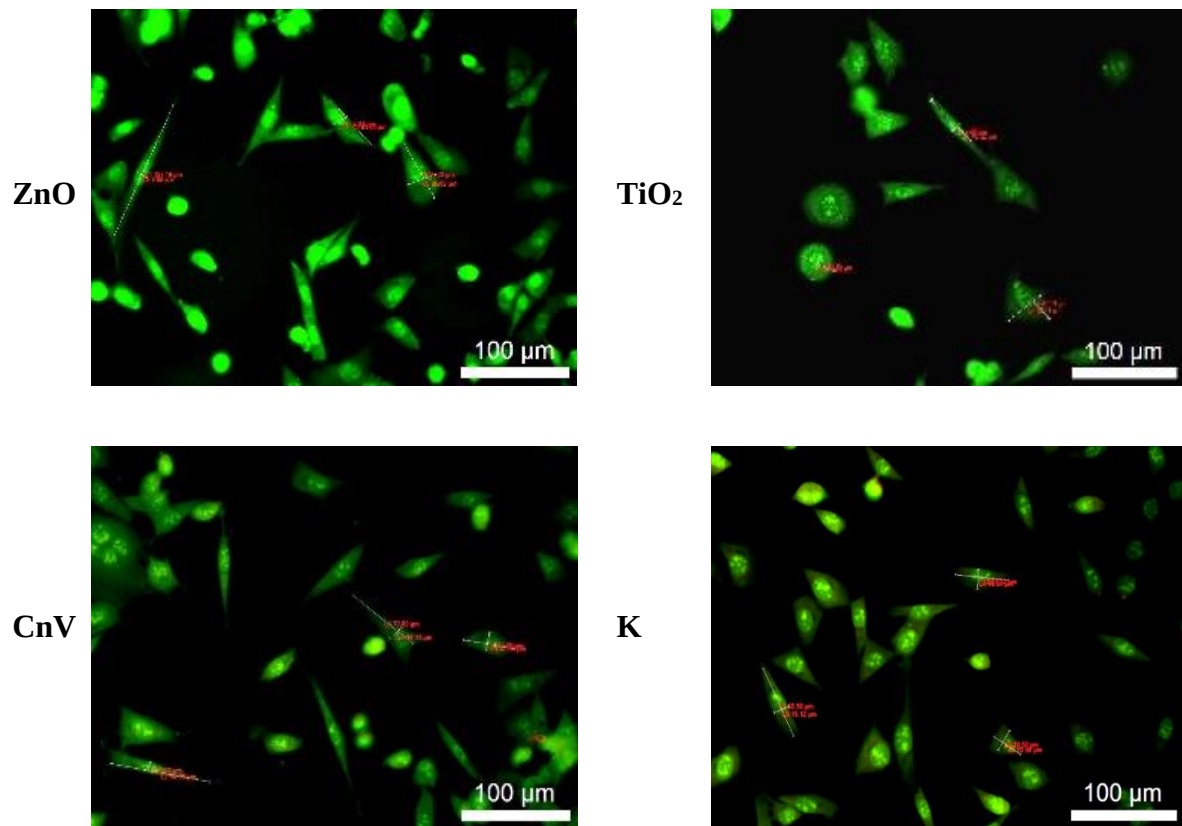
3.16 pav. ELP morfologija po 24 val. nanodalelių poveikio.



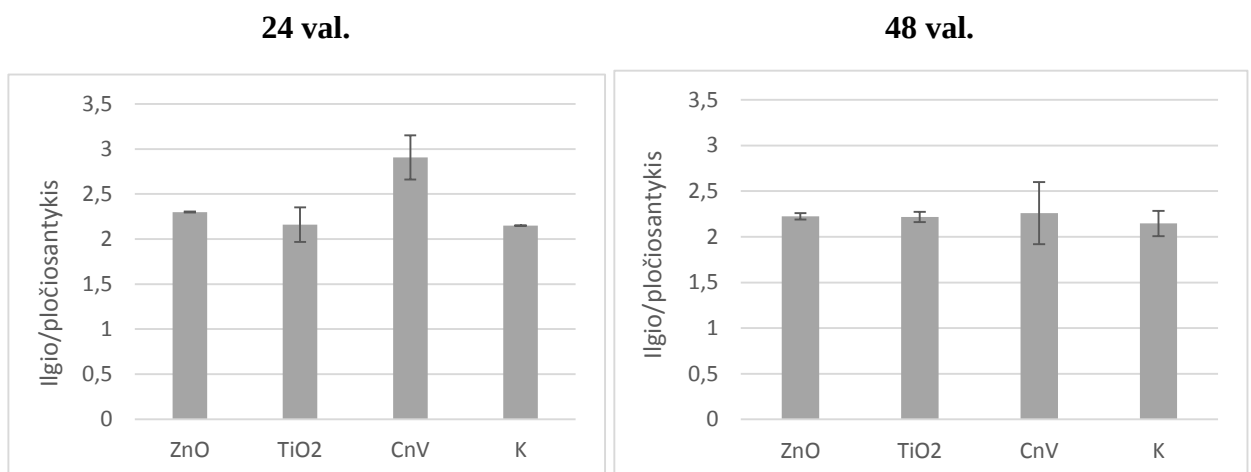
3.17 pav. ELP ilgio santykis su pločiu po 24 val. ir 48 val. nanodalelių poveikio.

Mio ląstelių morfologijos pokyčiai pastebėti po 24 val. poveikio ZnO bei CnV nanodalelėmis (3.18 ir 3.19 pav.). Ląstelių populiacijoje paveiktoje su CnV gerokai padidėjo ilgio/pločio santykis. Tačiau šis padidėjimas buvo trumpalaikis ir po 48 val. poveikio ryškesnių skirtumų jau fiksuota nebuvo. Literatūroje yra pateiktas pavyzdys, kaip daugiasieniai anglies nanovamzdeliai veikia astrocitų morfologiją. Nustatyta, kad paveikus astroцитus 50 nm CnV, jie suapvalėja. CnV esant ilgesniems – 1000 nm, ląstelių morfologija beveik nesiskyrė su kontroline grupe (Min *et al.*, 2015).

Šiame darbe buvo gauti atvirkštiniai rezultatai, tačiau reikia paminėti, jog darbas buvo atliekamas su kitos rūšies ląstelėmis, nei Min ir kolegų eksperimente, be to, čia naudoti CnV gerokai ilgesni – 200 μm .



3.18 pav. Mio ląstelių morfologija po 24 val. nanodalelių poveikio.



3.19 pav. Mio ląstelių ilgio santykis su pločiu po 24 val. ir 48 val. nanodalelių poveikio.

3.18 paveiksle matome, kad Mio ląstelėse paveiktose su TiO₂ gana stipriai išreikštą populiacijos heterogeniškumą. Dalis ląstelių populiacijoje įgavo apvalią formą, kuri nebuvo pastebima kontrolinėje grupėje ar po poveikio kitomis ND.

3.3.4. Ląstelių angiogeninio potencialo priklausomybė nuo poveikio nanodalelėmis

Toliau buvo tiriamas ELP angiogeninis potencialas veikiant ląsteles ND. Ląstelės ant Matrigel® užsėtos beseruminėje terpėje kartu su nanodalelėmis. Ląstelės paveiktos 10 µg /mL ZnO, 1 µg /mL TiO₂ ir 1 µg /mL CnV koncentracijomis. Matome, kad didžiausią įtaką ELP vamzdelių formavimui darė ZnO ND – po poveikio 8 valandų vamzdeliai buvo trumpesni ir jų kiekis buvo mažesnis nei kontrolėje (3.2 lentelė). Šie rezultatai buvo priešingi literatūroje aprašytam pavyzdžiui, kai ZnO nanodalelės indukavo angiogenezę, sukeldamos ląstelėse ROS formų gamybą, kas paskatino proangiogenetinių faktorių, tokių kaip VGF ar VEGF, ekspresiją (Augustine *et al.*, 2014).

Mio ląstelių populiacijoje vidutinis vamzdelių ilgis buvo didžiausias kontrolinėje grupėje tiek po 8 valandų, tiek ir po 24 tyrimo valandų (3.3 lentelė). Visose grupėse sumažėjo vamzdelių skaičius. Tačiau ląstelėse paveiktose su ZnO buvo mažiau ilgų vamzdelių nei kitose Mio ląstelių bandiniuose.

3.2 lentelė. ELP angiogeninio potencialo vertinimas po nanodalelių poveikio.

	ZnO		TiO ₂		CnV		K	
	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.
Vidutinis vamzdelio ilgis, µm	101±65	315±102	161±45	268±61	161±15	283±19	182±41	309±28
Vamzdelių skaičius	83±62	57±30	86±14	96±16	61±8	104±41	108±40	80±12
Trumpiausias vamzdelis, µm	94	139	96	101	100	126	100	101
Ilgiausias vamzdelis, µm	215	534	271	578	348	582	376	562

3.3 lentelė. Mio ląstelių angiogeninio potencialo vertinimas po nanodalelių poveikio.

	ZnO		TiO ₂		CnV		K	
	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.
Vidutinis vamzdelio ilgis, μm	228±44	342±54	281±24	350±100	262±50	469±18	308±33	501±36
Vamzdelių skaičius	96±24	10±4	66±11	7±2	63±10	3±2	46±4	2±2
Trumpiausias vamzdelis, μm	126	244	111	243	131	121	180	393
Ilgiausias vamzdelis, μm	425	480	485	606	535	503	521	608

ELP ir Mio ląstelių kokultūroje nanodalelės pastebimos įtakos vamzdelių vidutiniui ilgiui neturėjo (3.4 lentelė). Tačiau po 24 val. su TiO₂ ir CnV paveiktose ląstelėse išliko daugiau vamzdelių, nei kontrolėje ar paveiktose su ZnO. Nors literatūroje yra duomenų, kad TiO₂ nanodalelės slopina angiogenezę. Buvo atliktas eksperimentas su pelės akies retinos ląstelėmis ir pastebėta, kad mažos TiO₂ koncentracijos (130 ng /mL) stabdė angiogenezę *in vitro* ir retinos neovaskuliarizaciją *in vivo* (Jo *et al.*, 2014). Šiame eksperimente tokie rezultatai nebuvo gauti, tačiau naudotos kitos nei literatūroje pateiktos ląstelės, taip pat skyrėsi nanodalelių koncentracijos.

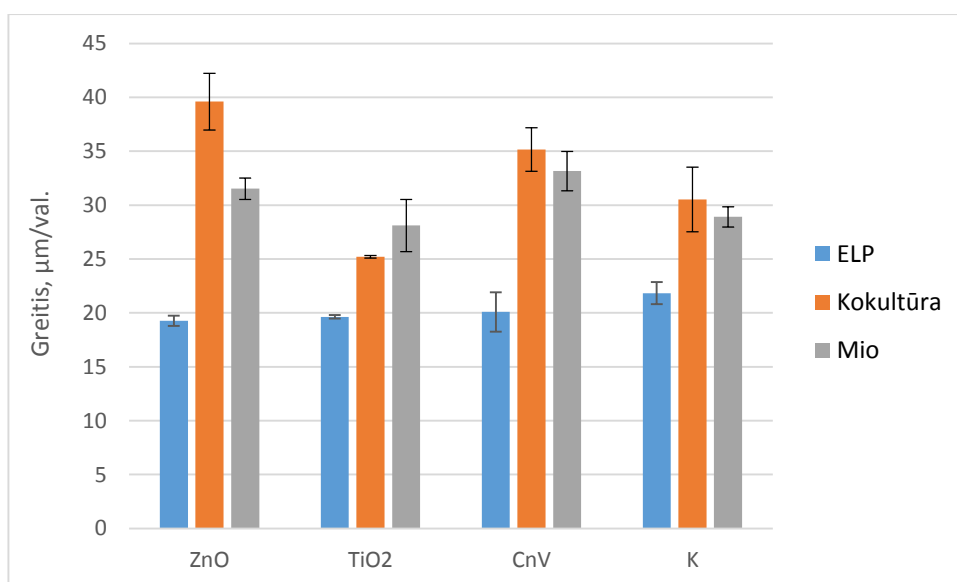
Apibendrinant gautus duomenis matome, kad didžiausią poveikį angiogeninui potencialui turėjo ZnO nanodalelės ELP po 8 val. augimo ant Matrigel®.

3.4 lentelė. ELP ir Mio ląstelių kokultūros angiogeninio potencialo vertinimas po nanodalelių poveikio.

	ZnO		TiO ₂		CnV		K	
	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.	8 val.	24 val.
Vidutinis vamzdelio ilgis, μm	241±47	343±55	242±24	385±75	278±18	449±33	274±10	394±29
Vamzdelių skaičius	77±4	19±10	80±17	39±12	73±9	27±14	78±19	15±10
Trumpiausias vamzdelis, μm	120	165	102	168	121	202	134	180
Ilgiausias vamzdelis, μm	453	785	420	739	503	762	493	676

3.3.5. Ląstelių migracijos greičio priklausomybė nuo poveikio nanodalelėmis

Ląstelių migracijos vertinimas buvo atliktas žaizdos metodu. Padarius ląstelių monosluoksnyje atitinkamo pločio žaizdą, ląstelės buvo veikiamos nanodalelėmis. Naudotos nanodalelių koncentracijos: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZnO ND, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TiO_2 ir 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CnV. Nustatėme, kad nei viena iš tirtų ND ELP migracijai pastebimos įtakos neturėjo (3.20 pav). Mio ląstelių migracijos greitis šiek tiek padidėjo esant terpėje CnV (33 $\mu\text{m}/\text{val}$ lyginant su kontrole 28 $\mu\text{m}/\text{val}$.), o TiO_2 nanodalelės šiuo atveju jokios įtakos praktiškai neturėjo. Didžiausia ND įtaka migracijai pastebėta ELP ir Mio ląstelių kokultūroje. Migraciją slopinačiu veikimu pasižymėjo TiO_2 nanodalelės (25 $\mu\text{m}/\text{val}$ lyginant su kontrole 30 $\mu\text{m}/\text{val}$.), o didžiausiais migracijos greitis fiksuotas esant terpėje ZnO (40 $\mu\text{m}/\text{val}$). Cinko oksido įtaka migracijos greičiui buvo stebėta 2014 metais Suzuki darbe, tuomet buvo nustatyta, jog ZnO ND sukelia spartesnę migraciją žmogaus monocitų leukemijos ląstelėse (Suzuki *et al.*, 2014), tuo tarpu TiO_2 ND mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse migraciją stabdė (priklausomai nuo ND dydžio – didesnės stabdė labiau) (Hoe *et al.*, 2013).

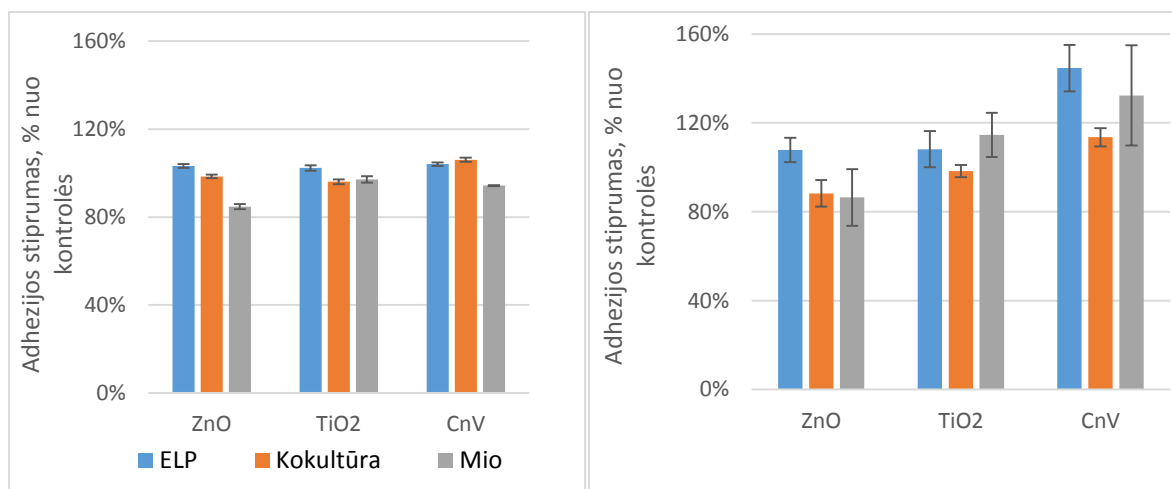


3.20 pav. ELP, Mio ląstelių bei jų kokultūros judėjimo greičio priklausomybė nuo poveikio skirtingos kilmės nanodalelėmis.

3.3.6. Ląstelių adhezijos priklausomybė nuo poveikio su nanodalelėmis

Ląstelių adhezijos eksperimentai atlikti dvejais būdais. Pirmu atveju ląstelės buvo užsėjamos kartu su nanodalelėmis, adhezijos stipris vertintas po 3 val., ląstelėms pradėjus kibti prie paviršiaus. Tuo tikslu ląstelės buvo purtomos 15s 600 rpm. Antru atveju ląstelės buvo auginamos parą prieš jas paveikiant su nanodalelėmis, poveikio trukmė 24 val. Eksperimento dieną ląstelės buvo purtomos 15 min. 600 rpm. Abiem atvejais paveikiamas naudotos nanodalelių koncentracijos buvo: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2 ir 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CnV.

Pirmojo eksperimento metu tą pačią dieną užsėtas ląsteles purtant 15 s adhezijos pokyčiai pastebėti tik Mio ląstelėse (3.21 pav., A) - paveikus ZnO ND Mio ląstelių adhezija lyginant su kontrole sumažėjo 15%, o veikiant su CnV ir TiO₂ mažiau nei 10 %. ELP adhezija visose grupėse išliko panaši. Kokultūroje adhezija padidėjo paveikus su CnV 106% (lyginant su kontrole).



A

B

3.21 pav. Nanodalelių poveikio ląstelių adhezijai vertinimas. Adhezija tirta nanodalelėmis užsėjant kartu su ląstelėmis, vertinant po 3 val. (A) arba ląstelių monosluksnį paveikus 24 val. nanodalelėmis (B).

Labiau išreikšti adhezijos pokyčiai pastebėti antrame eksperimente, kai ląstelės buvo veikiamos su nanodalelėmis parą. Šiuo atveju, adhezijos sumažėjimas daugiau nei 10 % pastebėtas tik su ZnO ND paveiktose Mio ląstelėse ir kokultūroje (3.21 pav., B). Nors yra duomenų, jog ZnO ND sustiprina adheziją žmogaus monocitų leukemijos ląstelėse (Suzuki *et al.*, 2014). Tuo tarpu ELP paveiktose su visų trijų tipo nanodalelėmis adhezija sustiprėjo lyginant su kontrole. Ypač didelis adhezijos pokytis pastebėtas visose ląstelių grupėse paveiktose su CnV. ELP adhezija sustiprėjo 145% lyginant su kontrole. Mažiausią įtaką CnV turėjo kokultūrai. Šiuo atveju adhezijos stiprumas buvo 14% didesni nei kontrolinėje ląstelių populiacijoje.

Apibendrinant šiuos duomenis galime teigti, kad ZnO neigiamai veikia tirtų ląstelių adhezijos stiprumą, tuo tarpu CnV veikimas priešingas. Tačiau tai būdinga ne visiems ląstelių tipams. Pavyzdžiui, Esfandiary (2014) pateikti duomenys rodo, CnV silpnina adipocitų ir HEK293 linijos ląstelių adheziją. Taip pat literatūroje aprašomas TiO₂ neigiamas poveikis ląstelių adhezijai (Hou *et al.*, 2013), tačiau mes savo darbe akivaizdus TiO₂ poveikio tirtų ląstelių adhezijai nepastebėjome.

IŠVADOS

- Endotelinių ląstelių pirtakių (ELP) bei miogeninės kilmės kamieninių ląstelių (Mio) auginimas kokultūroje neturėjo ryškesnės įtakos šių ląstelių proliferacijai, kolonijų formavimo intensyvumui bei angiogeniniam potencialui, tačiau skatino aktyvesnę ląstelių migraciją lyginant su ELP ir Mio ląstelėmis augintomis atskirai.
- ZnO nanodalelės pasižymėjo didžiausiu toksiniu poveikiu, tačiau esant mažesnei - 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijai ZnO akivaizdžiai skatino ELP – Mio ląstelių kokultūros proliferaciją.
- ELP – Mio ląstelių kokultūra buvo nežymiai atsparesnė toksiniam TiO_2 nanodalelių poveikiui, tačiau jautresnė anglies nanovamzdelių veikimui.
- Anglies nanovamzdeliai skatino stipresnę ELP ir Mio ląstelių bei jų kokultūros sąveiką su paviršiumi, o ZnO nanodalelės, atvirkščiai, ją silpnino.
- ZnO nanodalelės didino kokultūros judėjimo greitį, nors pavienėms ląstelių populiacijoms jų įtaka nebuvo ryški. TiO_2 nanodalelės pasižymėjo priešingu, ląstelių migraciją slopinančiu veikimu.
- ZnO nanodalelės neigiamai veikė ELP angiogeninį potencialą.



LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Acharya T. *et al.* Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *J Cell Physiol.* 2012; 227: 88–97.
2. Agathocleous M., Harris W. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 2013; 9.
3. Ajayan P., Zhou J. Applications of Carbon Nanotubes. *Topics in Applied Physics.* 2001; 80: 391 – 425.
4. Asahara T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275: 964 – 967.
5. Asahara T., Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: 572–579.
6. Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A. and Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; 159: 123–134.
7. Atesok K., Li R., Stewart D.J., Schemitsch E.H. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res.* 2010; 28:1007 – 1114.
8. Augustine L. *et al.* Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. *RSC Adv.* 2014; 4: 51528 – 51536.
9. Aula S. *et al.* Biological interactions in vitro of zinc oxide nanoparticles of different characteristics. *Materials Research Express.* 20014; 1: 35 – 41.
10. Badorff B. *et al.* Transdifferentiation of Blood-Derived Human Adult Endothelial Progenitor Cells Into Functionally Active Cardiomyocytes. *Circulation.* 2003;107:1024 – 1032.
11. Badorff C. *et al.* Transdifferentiation of Blood-Derived Human Adult Endothelial Progenitor Cells Into Functionally Active Cardiomyocytes. *Circulation.* 2002; 120 – 125.
12. Bahrami S., Veis M., Dunn A., Boudreau H. Temporal changes in Hox gene expression accompany endothelial cell differentiation of embryonic stem cells. *Cell Adh Migr.* 2011; 5(2): 133–141.
13. Beauchamp J.R., *et al.* Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 2000;151:1221–1234.
14. Bentzinger C., Wang Y., Rudnicki M. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4.
15. Bischoff R. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics.* 1998; 208: 505-515.
16. Blanco-Bose W.E., Yao C.C., Kramer R.H., Blau H.M. Purification of mouse primary myoblasts based on alpha 7 integrin expression. *Exp Cell Res.* 2001;265:212–220.
17. Bogdanowicz H., Lu H. Studying cell-cell communication in co-culture. *Biotechnol J.* 2013; 8: 394 – 396.
18. Burinskij J. Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, savybių palyginimas. 2014. Magistro baigiamasis darbas.
19. Caiado F., Dias S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2012; 5: 41 – 48.
20. Charge S., Rudnicki M. Cellular and Molecular Regulation Of Muscle Regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84: 209–238,
21. Chen X., Mao S. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem. Rev.* 2007; 107: 2891–2959.
22. Cheng Ch. *et al.* Distinct Angiogenesis Roles and Surface Markers of Early and Late Endothelial Progenitor Cells Revealed by Functional Group Analyses. *BMC Genomics.* 2013; 14:172 – 182.

23. Cornelison D.D., Olwin B.B., Rudnicki M.A., Wold B.J. MyoD(−/−) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* 2000; 224: 122–137.
24. Dai H. Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. *Acc. Chem. Res.* 2002; 35: 1035 – 1044.
25. De Angelis L. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1990; 147: 869–878.
26. Delva E., Tucker D.K., Kowalczyk A.P. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1.
27. Doyle B., Metharom P., Caplice N.M. Endothelial progenitor cells. *Endothelium.* 2006.
28. Erik S., Jason M. Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011; 3(2): 231–240.
29. Esfandiary E., Valiani A., Hashemibeni B., Moradi I., Narimani M. The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose-derived-stem cells in-vitro. *Adv Biomed Res.* 2014; 3.
30. Feng H., Wang J. A new mechanism of stem cell differentiation through slow binding/unbinding of regulators to genes. *Scientific Reports.* 2012; 550.
31. Fink M., Cookson D. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Immun.* 2005;73: 1907 – 1916.
32. Friedl P., Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2009; 10: 445 – 457.
33. Fuchs S., Hofmann A., Kirkpatrick J. Microvessel-Like Structures from Outgrowth Endothelial Cells from Human Peripheral Blood in 2-Dimensional and 3-Dimensional Co-Cultures with Osteoblastic Lineage Cells. *SSUE ENGINEERING.* 2007; 13: 45 – 51.
34. Fujiimaki S. *et al.* Intrinsic Ability of Adult Stem Cell in Skeletal Muscle: An Effective and Replenishable Resource to the Establishment of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International.* 2013; 420164.
35. Fukada S. *et al.* Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res.* 2004;296:245–255.
36. Gao Z., Varela J., Groc L., Lounis B., Cagnet L. Toward the suppression of cellular toxicity from single-walled carbon nanotubes. *Biomater. Sci.* 2015; 5: 65-70.
37. Garry DJ., *et al.* Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:5416–5421.
38. Garry DJ., Yang Q., Bassel-Duby R., Williams RS. Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. *Dev Biol* 1997; 188: 280–294.
39. Geiger B., Yamada H. M. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a005033.
40. Ghosh M., Chakraborty A., Mukherjee A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *J. Appl. Toxicol.* 2013; 33: 1097–1110.
41. Gilmore A. Anoikis. *Cell Death and Differentiation.* 2005; 12: 1473–1477.
42. Goers P., Freemont K., Polizzi M. Co-culture Systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface.* 2014; 11.
43. Goligorsky M.S., Kuo M.C., Patschan D., Verhaar M.C. Review article: Endothelial progenitor cells in renal disease. *Nephrology* 2009; 14, 291–297.
44. Grand F., Rudnicki M. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19(6): 628–633.
45. Grounds M.D. *et al.* Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* 1992; 267:99–104.
46. Gulati R. *et al.* Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ. Res.*, 2003; 93:1023-1025.
47. Hamzeh M., Sunahara G. In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro.* 2013; 27: 864–873

48. Hasnain S. *et al.* Application of Nanotechnology in Health and Environmental Research: A Review. *Res. J. Environ. Earth Sci.* 2013; 5(3): 160 – 166.
49. Hatherell P. *et al.* Development of three-dimensional, all-human in vitro model of the bloodbrain barrier using mono-, co-, and tri- cultivation. *J. Neurosci. Methods.* 2011; 199: 223 – 229.
50. Hawke T. and Garry D. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology.* 2001; 91: 534 – 551.
51. Herrera A.A., Banner L.R. The use and effects of vital fluorescent dyes: observation of motor nerve terminals and satellite cells in living frog muscles. *J Neurocytol* 1990; 19:67 – 83.
52. Hill J.M. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 593 – 600.
53. Hosack L.W. *et al.* Microvascular maturity elicited in tissue treated with cytokine-loaded hyaluronan-based hydrogels. *Biomaterials* 2008; 29:2336-47;
54. Hou K. *et al.* Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine* 2013;8: 358 – 367.
55. Hristov M. and Weber Ch. Endothelial Progenitor Cells: Characterization, Pathophysiology, and Possible Clinical Relevance. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 4: 498 – 508.
56. Huamin J., Ci Z., Hui S., Yong L., Huijun Q., Bingyan Z., 2002. Determination of pretransplant viability of leydig cells by MTT colorimetric assay. *Transpl. Proc.* 34: 3419 – 3421.
57. Hur A. *et al.* Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 288 – 293.
58. Ilina O., Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *Journal of Cell Science.* 2009; 122: 3203 – 3208.
59. Illa I., Leon-Monzon M., Dalakas M.C. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 1992; 31: 46 – 52.
60. Ishido M. The regulatory mechanisms of satellite cell migration in skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med.* 2012; 1(4): 675 – 677.
61. Yablonka-Reuven Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell Still Young and Fascinating at 50. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(12): 1041–1059.
62. Yoder M.C. Human Endothelial Progenitor Cells. *Perspectives in Medicine.* 2012;2
63. Yuan J., Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Journal of Cell Science.* 2010; 127: 2135 – 2144.
64. Jesse T.L., Lachance R., Iademarco M.F., Dean D.C. Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 1998; 140: 1265–1276.
65. Jo D.H. *et al.* Anti-angiogenic effect of bare titanium dioxide nanoparticles on pathologic neovascularization without unbearable toxicity. *Nanomedicine.* 2014; 10: 1109 – 1117.
66. Kale S. *et al.* Microarray analysis of in vitro pericyte differentiation reveals an angiogenic program of gene expression. *FASEB J.* 2005; 19: 270 – 271.
67. Kang B., Chang S., Dai Y., Yu D., Chen D. *Small.* 2010; 6: 2362–2366.
68. Kang T. *et al.* In vitro toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells. *Nanoscale Research Letters.* 2013; 8: 496 – 508.
69. Kardon G., Campbell JK., Tabin CJ.. Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Dev Cell* 2002; 3:533–545
70. Kassam-Duchossoy L. *et al.* Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature* 2004; 431:466–471
71. Kim B. *et al.* Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2007; 48: 15–24.
72. Kränkel N., Lüscher TF., Landmesser U. Endothelial Progenitor Cells as a Therapeutic Strategy in Cardiovascular Disease. *Current Vascular Pharmacology.* 2012; 10: 107 – 124.
73. Kroemer G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 3–11.

74. Kumar S., Venkateswarlu P., Rao V., Rao G. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide. *International Nano Letters*. 2013; 3:30.
75. Lawrence W., Beers H., Gilula P. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature*. 1978; 272: 501–506.
76. Liu H.B. *et al.* Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: from biomarker to therapeutic agent. *Regenerative Medicine Research* 2013, 1:9
77. Liu Y., Zhao Y., Sun B., Chen Ch. Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH*. 2013; 4: 702–713.
78. Lock J.G., Wehrle-Haller B., Strömblad S. Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin. Cancer Biol.* 2008; 18(1).
79. Lodish H., Berk Z., Zipursky A. Review The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*. 1996; 84: 345 – 357.
80. Lotze M. Dying Dangerously: Necrotic Cell Death and Chronic Inflammation. *Discovery Medicine*. 2009; 4: 448 – 456.
81. Maino G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995; 146(1): 3–15.
82. Mayor R., Etienne-Manneville. The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016; 17: 97 – 109.
83. Majo F., Rochat A., Nicolas M., Abou G. and Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*. 2008; 456: 250 – 254.
84. Masudaa H., Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovascular Research* .2003; 58: 390–398
85. Mauro A. Satellite cells of muscle skeletal fibers. *J. Biophys. Biochem.*1961; 9: 493–495.
86. Mercille S., Massie B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient – deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotech. and bioeng.* 9: 1140 – 1154.
87. Miki K. *et al.* The advantages of co-culture over mono cell culture in stimulating in vivo environment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2012; 131: 68 – 75.
88. Min J., Kim S., Shin U., Yoon B. Multi-walled carbon nanotubes change morpho functional and GABA characteristics of mouse cortical astrocytes. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015; 13: 92 – 101.
89. Min-Feng Y. Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load. *Science.e*, 2000;. 637 – 640.
90. Mital G. and Manoj T. A review of TiO₂ nanoparticles. *Physical Chemistry*. 2011;.56: 1639–1657.
91. Montanaro F. *et al.* Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res* 2004; 298: 144–154.
92. Mouly T. *et al.* Satellite Cell Proliferation: Starting Point and Key Steps to Regeneration and Cell-Mediated Gene Therapy. *Basic Appl. Myol.* 1997; 7: 167 – 176.
93. Muir A.R., Kanji A.H., Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat* 1965; 99: 435 – 444.
94. Mullard A. Proliferation without differentiation. *Nature Reports Stem Cells*. 2008; 28.
95. Najim N. *et al.* Effects of the Absorption Behaviour of ZnO Nanoparticles on Cytotoxicity Measurements. *Journal of Nanomaterials*. 2014. 10
96. Niessen C.M., Leckband D., Yap AS. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol. Rev.* 2011; 91(2).
97. Ontell M., Kozeka K. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. *Am J Anat* 1984; 171:133–148
98. Pang H. *et al.* Co-culture with endothelial progenitor cells promotes survival, migration, and differentiation of osteoclast precursors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 430: 729 – 734.
99. Pashos W., Brown E., Eswaramoorthy R., Hu J., Athanasiou K. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014. DOI: 10.1002/term.1870

100. Péault B. *et al.* Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. *Molecular Therapy*. 2007; 15: 867–877.
101. Peault B. *et al.* Stem and Progenitory Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. *Molecular therapy*. 2007; 15:867 – 877.
102. Peichev M. *et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000; 95: 952 – 958.
103. Peng R., Yao X., Ding J. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials*. 2011; 32 8048 – 8057.
104. Quirici N. *et al.* Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells. *Br. J. Haematol*. 2001; 115: 186 – 194.
105. Qu-Petersen Z. *et al.* Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J. Cell Biol*. 2002;157: 851–864.
106. Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003; 107: 1164 – 1169.
107. Rudnicki M.A. *et al.* MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993; 75:1351–1359
108. Sabir S., Arshad M., Chaudhari S. Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications. *The Scientific World Journal*. 2014; 8.
109. Saquib Q. *et al.* Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in Vitro*. 2012; 26: 351–361.
110. Schultz E. and McCormic A. Skeletal Muscle Satellite Cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 1994; 123: 214 – 244.
111. Schultz E., Gibson M.C., Champion T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* 1978; 206: 451–456.
112. Setyawati I., Tay C.H., Leong D. Mechanistic Investigation of the Biological Effects of SiO₂, TiO₂, and ZnO Nanoparticles on Intestinal Cells. *Small*. 2015; 11: 3458 – 68.
113. Sherwood I.R. *et al.* Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell*. 2004;119:543–554.
114. Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* 2013; 10: 15 – 23.
115. Shi Y. *et al.* Synergistic genotoxicity caused by low concentration of titanium dioxide nanoparticles and p,p'-DDT in human hepatocytes. *Environ. Mol. Mutagen*.2010; 51: 192–204.
116. Smilenov L.B. *et al.* Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 1999; 286(5442).
117. Smita S. *et al.* Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health*. 2012; 11.
118. Steed E., Balda M.S., Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol*. 2010; 20(3).
119. Suzuki Y. *et al.* Zinc oxide nanoparticles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014; 278: 16 – 25.
120. Tait S., Ichim G. and Green D. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*. 2014; 127: 2135 – 2144.
121. Talam S., Karumuri S., Gunnam N. Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles. *ISRN Nanotechnology*. 2012 ; 6.
122. Tedesco FS. *et al.* Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.*. 2010: 120:11–19.
123. Torrente Y. *et al.* Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004; 114: 182–195.
124. Traphagen I. *et al.* Endothelial invasive response in a coculture model with physically-induced osteodifferentiation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7: 621–630.

125. Truskey G. Endothelial Cell Vascular Smooth Muscle Cell Co-Culture Assay For High Throughput Screening Assays For Discovery of Anti-Angiogenesis Agents and Other Therapeutic Molecules. *Int J High Throughput Screen.* 2011; 1: 171 – 181.
126. Vasa M. *et al.* Increase in Circulating Endothelial Progenitor Cells by Statin Therapy in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2001; 2885 – 2991.
127. Vaseem M., Umar A., Hahn U. ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. *Metal Oxide Nanostructures and Their Applications*, 2012; 5: 1–36
128. Vats R. *et al.* Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: the effect of the micro-environment. *Tissue Eng.* 2006;12: 1687–1697.
129. Vo E. *et al.* Smooth-Muscle-Like Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells Support and Augment Cord-Like Structures In Vitro. *Stem Cell Rev and Rep.* 2010; 6: 237 – 247.
130. Wagers A., Conboy I. Cellular and Molecular Signatures Review of Muscle Regeneration: Current Concepts and Controversies in Adult Myogenesis. *Cell.* 2005; 122, 659–667,
131. Walter DH. *et al.* Statin Therapy Accelerates Reendothelialization A Novel Effect Involving Mobilization and Incorporation of Bone Marrow–Derived Endothelial Progenitor Cells. *Circulation.* 2002; 3017 – 3025.
132. Werner N., Nickenig G. Influence of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cells Limitations for Therapy *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 26 – 33.
133. Xu X. H., Brownlow W.J., Kyriacou S.V. Real-time probing of membrane transport of living microbial cells using nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry.*, 2004. 10400 – 10413.
134. Zammit P., Partridge T., and Yablonka-Reuveni Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54: 1177–1191.