



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Julija Mackevič

**ENDOTELINIŲ LĄSTELIŲ-PIRMTAKIŲ FUNKCINIŲ SAVYBIŲ
TYRIMAI**

**EVALUATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL
FUNCTIONS**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Katedros vedėjas

(parašas)

habil. dr. prof. Juozas Kulys
(Vardas, pavardė)

(data)

Julija Mackevič

**ENDOTELINIŲ LĄSTELIŲ-PIRMTAKIŲ FUNKCINIŲ SAVYBIŲ
TYRIMAI**

**EVALUATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL
FUNCTIONS**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas dr. Daiva Baltriukienė _____
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė) (parašas) (data)

Lietuvių kalbos konsultantas doc. dr. Angelė Kaulakienė _____
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė) (parašas) (data)

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Biotechnologijos studijų kryptis
Nanobiotechnologijos studijų programa,
valstybinis kodas 621J70003

Katedros vedėjas

(parašas)

habil. dr. prof. Juozas Kulys

(data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.....

Vilnius

Studentei Julijai Mackevič

Baigiamojo darbo tema: Endotelinių ląstelių - pirmtakių funkcinių savybių tyrimai.

Patvirtinta 2012 m. spalio mėn. 25 d. dekanų potvarkiu Nr. 385 fm.

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2013 birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

- Nustatyti vandenilio peroksido koncentracijas, kurios stabdo ląstelių dauginimąsi ir indukuoja ląstelių žūtį.
- Įvertinti Akt signalinių molekulių aktyvinimo charakteristikas, paveikus tiriamas ląsteles parinktomis vandenilio peroksido koncentracijomis.
- Gauti endotelines ląsteles – pirmtakes su padidinta Akt kinazės raiška ir ištirti PI3K/ Akt signalinio kelio vaidmenį endotelinėse ląstelėse pirmtakėse atsako į oksidacinį stresą metu.
- Įvertinti kaip oksidacinis stresas veikia ląstelių adheziją ant fibronektinu dengtų mikrosubstratų;

Vadovas dr. Daiva Baltriukienė

(moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(parašas)

(data)

Užduotį gavau:

Julija Mackevič

(vardas, pavardė)

(parašas)

(data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Nanobiotechnologijos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas: **Endotelinų ląstelių – pirmatinių funkcinių savybių tyrimai.**

Autorius: **Julija Mackevič**

Vadovė: **dr. Daiva Baltriukienė**

Kalba

☒ X

Lietuvių

☐

Užsienio (anglų)

Anotacija

Oksidacinis stresas pasireiškiantis įvairių širdies ir kraujagyslių ligų atvejais neigiamai veikia endotelinų ląstelių-pirmtakių funkcijas. Pastaraisiais metais didelis dėmesys skiriamas molekulinį mechanizmų, kurie reguliuoja šių ląstelių atsaką į oksidacinį stresą, išaiškinimui. Baigiamojo darbo tikslas buvo įvertinti oksidacinio streso įtaką endotelinų ląstelių-pirmtakių funkcijoms. Oksidacinio streso imitacijai naudotas vandenilio peroksidas. Žinoma, kad PI3K/Akt signalinis kelias yra atsakingas už ląstelių išgyvenimą įvairių stresinių poveikių metu, todėl Akt kinazė buvo pasirinkta pagrindiniu taikiniu vertinant vandenilio peroksido poveikį tiriamoms ląstelėms. Panaudodami specifinius šio signalinio kelio slopiklius bei genetiškai modifikuotas Akt atžvilgiu ląsteles nustatėme, kad Akt kinazė yra svarbi molekulė, atsakinga už šių, kraujagyslių kilmės endotelinų ląstelių-pirmtakių išgyvenimą. Toliau tiriant endotelinų ląstelių savybes oksidacinio streso sąlygomis buvo įvertinta jų adhezija ant fibronektino mikrosubstratų bei citoskeleto baltymo – vinkulino organizacija.

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

Darbo apimtis – 57 p. teksto be priedų, 24 pav., 1 lent., 79 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: endotelinės ląstelės – pirmtakės; oksidacinis stresas; proliferacija; apoptozė; Akt kinazė; mikrosubstratai; adhezija.

Vilnius Gediminas Technical University
Fundamental sciences faculty
Chemistry and bioengineering department

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

Nanobiotechnology study programme master thesis.

Title: **Evaluation of endothelial progenitor cell functions.**

Author: **Julija Mackevič**

Academic supervisor: **dr. Daiva Baltriukienė**

Thesis language

☒ Lithuanian

☐ Foreign (English)

Annotation

Oxidative stress during the cardiovascular diseases negatively affects endothelial progenitor cells functions. In recent years a big attention is given to the molecular mechanisms, which regulates the cells response to the oxidative stress. The main aim of the final thesis was to evaluate influence of the oxidative stress to the endothelial progenitor cells functions. For the oxidative stress simulation was used the hydrogen peroxide. It is known that PI3K/Akt signaling pathway is responsible for the cells survival during the oxidative stress, that's why Akt kinases was chosen as a principal target in order to evaluate hydrogen peroxide impact on the cells. Using the specific Akt kinases inhibitors and genetically modified Akt cells we detect that Akt kinases are very important molecules for the endothelial progenitor cells survival. Afterwards was evaluated the endothelial cells adhesion on the fibronectin micropatterns and cytoskeleton protein-vinculin organization, during the oxidative stress.

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

Thesis consist of: 57 p. text without appendixes, 24 pictures, 1 table, 79 bibliographical entries.

Keywords: endothelial progenitor cells; oxidative stress; proliferation; apoptosis; Akt kinases; micropatterns; adhesion.

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų,
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo 2011-2012 m. m.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Julija Mackevič, 20110610

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-11

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

2013 m. gegužės 29 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Endotelinių ląstelių pirmtakių funkcinių savybių tyrimai“ patvirtintas 2012 m. spalio 25 d. dekanato potvarkiu Nr. 385fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Mano darbo vadovas dr. Daiva Baltriukienė.

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

Julija Mackevič

TURINYS

Paveikslų sąrašas.....	9
Santrumpų sąrašas.....	10
IVADAS.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Endotelinės ląstelės pirmtakės.....	13
1.1.1. Endotelinių ląstelių-pirmtakių charakterizavimas.....	13
1.1.2. Endotelinių ląstelių-pirmtakių mobilizacija.....	15
1.2. Oksidacinis stresas ir jo įtaka endotelinių ląstelių savybėms.....	16
1.2.1. Vandenilio peroksidas.....	16
1.2.2. Oksidacinio streso poveikis endotelinėms ląstelėms.....	18
1.2.3. Oksidacinio streso veikimo mechanizmai.....	19
1.3. Akt signalinio kelio įtaka endotelinių ląstelių pirmtakių migracijai, proliferacijai ir gyvybingumui.....	21
1.3.1. Akt vaidmuo, reguliuojant endotelinių ląstelių savybes.....	22
1.3.2. PI3K/Akt signalinio kelio reguliacija oksidacinio streso metu.....	24
1.4. Endotelinių ląstelių pirmtakių struktūriniai ir funkciniai tyrimai, panaudojant mikrosubstratus.....	25
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	28
2.1. Naudotos medžiagos.....	28
2.2. Tyrimo metodai.....	29
2.2.1. Kraujagyslių kilmės endotelinių ląstelių-pirmtakų skyrimas.....	29
2.2.2. Ląstelių auginimas <i>in vitro</i>	29
2.2.3. Ląstelių veikimas tiriamosiomis medžiagomis.....	29
2.2.4. Ląstelių skaičiaus ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu.....	29
2.2.5. Ląstelių gyvybingumo vertinimas su AO/EB mišiniu.....	30
2.2.6. Ląstelių proliferacijos vertinimas MTT metodu.....	31
2.2.7. Ląstelių charakterizavimas.....	32
2.2.8. Ląstelių transfekcija.....	32
2.2.9. Ląstelių lizavimas.....	32
2.2.10. Baltymų elektroforezė.....	33
2.2.11. Imunoblotingas.....	34
2.2.12. Imunofluorocitochemija.....	34
2.2.13. Mikrosubstratų paruošimas.....	35
2.2.14. Ląstelių ir mikrosubstratų sąveikos tyrimas.....	35
2.2.15. Statistinė duomenų analizė.....	35
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	36
3.1 Endotelinių ląstelių-pirmtakių gavimas ir jų charakterizavimas.....	36
3.2. Vandenilio peroksido poveikio ELP ląstelėms tyrimas.....	38
3.3. Akt vaidmuo ELP ląstelėse oksidacinio streso metu.....	40
3.3.1. ELP ląstelių atsako į H ₂ O ₂ poveikį tyrimas, nuslopinus Akt veikimą.....	40
3.3.2. Ląstelių su padidinta Akt raiška gavimas.....	41
3.3.3. H ₂ O ₂ poveikio ląstelėms su padidinta Akt raiška tyrimas.....	43
3.4. ELP ląstelių sąveika su mikrosubstratais.....	43
3.4.1. ELP ląstelių sąveika su linijas sudarančiais mikrosubstratais.....	44

3.4.2. Oksidacinio streso poveikis ELP ląstelių sąveikai su saleles sudarančiais mikrosubstratais.....	46
3.5. Rezultatų apibendrinimas.....	47
IŠVADOS.....	49
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	50
Padėka.....	57

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. ELP mobilizacija iš kaulų čiulpų.....	15
2 pav. H ₂ O ₂ susidarymo organizme mechanizmas.....	17
3 pav. Biocheminis H ₂ O ₂ susidarymo ir metabolizmo kelias.....	18
4 pav. H ₂ O ₂ aktyvinami signaliniai keliai, dalyvaujantys endotelinų ląstelių proliferacijoje ir apoptozėje.....	19
5 pav. PI3K/Akt kelias ir pagrindinės šio kelio signalinės molekulės.....	22
6 pav. VEGF ir EMB įtaka endotelinų ląstelių gyvybingumui.....	23
7 pav. Endotelinės ląstelės ant įvairios formos fibronektino mikrosubstratų.....	26
8 pav. Diferencijuotas ląstelių dažymas AO/EB dažų mišiniu.....	31
9 pav. MTT redukcijos reakcija.....	31
10 pav. Žmogaus endotelinės ląstelės- pirmtakės auginamos in vitro.....	36
11 pav. Adhezinių endotelinų ląstelių dydžio analizė fluorescentinių mikroskopu.....	37
12 pav. Skirtingų H ₂ O ₂ koncentracijų poveikis ELP gyvybingumui.....	38
13 pav. Ląstelių gyvybingumo tyrimai panaudojus AO/ EB dažų mišinį.....	39
14 pav. Akt raiškos ir fosforilinimo tyrimas po 100 μM H ₂ O ₂ poveikio.....	40
15 pav. Darbe naudoti PI3K/Akt signalinio kelio slopikliai ir jų taikiniai.....	40
16 pav. Akt kinazės vaidmens tyrimas ELP ląstelėse po 100 μM H ₂ O ₂ poveikio.....	41
17 pav. Akt baltymo lygis genetiškai modifikuotose ELP ląstelėse ir kontrolinėse ELP.....	41
18 pav. Genetiškai modifikuotų ir kontrolinių ląstelių proliferacinio aktyvumo palyginimas MTT metodu.....	42
19 pav. Genetiškai modifikuotų Akt atžvilgiu ELP ląstelių jautrumo H ₂ O ₂ poveikiui tyrimas.....	43
20 pav. Fn mikrosubstratai.....	44
21 pav. ELP sąveika su Fn linijų mikrosubstratais.....	45
22 pav. Vinkulino raiška ELP.....	45
23 pav. ELP sąveika su Fn salelių mikrosubstratais prieš purtumą.....	46
24 pav. ELP sąveika su Fn salelių mikrosubstratais po purtymo.....	47

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Ang-1 - angiopoetinas-1

AO - akridino oranžas

CO₂ - anglies dioksidas

DNR - deoksiribonukleorūgštis

EB - etidžio bromidas

EDTA - etilendiamino tetraacto rūgštis

EGF (*angl.* epidermal growth factor) - epidermio augimo faktorius

ELP (*angl.* endothelial progenitor cells) - endotelinės ląstelės- pirmtakės

FB - fosfatinis buferis

FVS - fetalinis veršelio serumas

GSK3 (*angl.* glycogen synthase kinase 3) - glikogeno sintazės kinazė 3

H₂O₂ - vandenilio peroksidas

IGF-I (*angl.* insulin-like growth factor 1) - insulino priklausomas augimo veiksnys-I

IMDM - Iscoves' s modifikuota Dulbecco terpė

LDL (*angl.* low density lipoproteins) - mažo tankio lipoproteinai

MAP kinazės

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

MMP-9 - matrikso metaloproteinazės-9

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

NADPH (*angl.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) oksidazė

NDS - natrio dodecilsulfatas

NOS - nitrito oksido sintetazė

O₂^{·-} - superoksido anijonas

OH[·] - hidroksido radikalas

ONOO⁻ - peroksinitritas

PAK (*angl.* p21-activated kinase) - p21 aktyvuota kinazė

PDGF (*angl.* platelet – derived growth factor) - trombocitų augimo faktorius

PDK1 (*angl.* pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1) - nuo 3-fosfoinozido baltymo priklausoma kinazė 1

PH - plekstrino homologijos domenas

PI3K (*angl.* phosphatidylinositol 3 - kinases) – Fosfatidylinozitol – 3 kinazė

PMSF - fenilmetilsulfonil fluoridas

PP2A (*angl.* protein phosphatase 2A) - baltymų fosfatazė 2A

RDD - reaktyvūs deguonies dariniai

ROS (*angl.* reactive oxygen species) - reaktyvios deguonies formos

SS (*angl.* focal adhesion) - sutelktinis sąlytis

TEMED - tetrametiletilendiaminas

TU - tarpląstelinis užpildas

UV – ultravioletinė šviesa

VEGF (*angl.* vascular endothelial growth factor) - kraujagyslių endotelio augimo veiksnys

VEGFR-2 (*angl.* vascular endothelial growth factor receptor 2) - kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptoriaus 2

IVADAS

Endotelinės ląstelės-pirmtakės (ELP) yra gana reta ląstelių populiacija, esanti žmogaus kaulų čiulpuose, virkštelės kraujyje ir periferiniame kraujyje. Uždegiminio proceso metu - sergant ateroskleroze, išemija arba hipertensija, šios ląstelės migruoja į uždegimo vietą, diferencijuojasi į subrendusias kraujagyslių ląsteles ir atstato pažeistą audinį. Taigi, ELP yra ypač svarbios neovaskuligenezei ir angiogenezei, taip pat vėžio augimui bei vystymuisi.

Nustatyta, kad vykstant uždegiminiam procesui organizme, susidaro reaktyvūs deguonies dariniai (RDD), kurie sukelia oksidacinį stresą, aktyviai veikiantį endotelinių ląstelių funkcijas, jų mobilizaciją. Tyrimais parodyta, kad oksidacinis stresas sumažina ELP kiekį organizme, skatina jų žūtį apoptozės būdu, taip slopindamas šių ląstelių gebėjimą atstatyti pažeistą audinį uždegimo metu. PI3K/Akt signalinis kelias yra atsakingas už ląstelių išgyvenimą įvairių stresinių poveikių metu, todėl šio kelio moduliavimas gali būti veiksmingas terapinis taikinyss uždegimo metu. Tačiau mokslininkai yra nustatę, kad ypatingai stipraus uždegimo metu, šio signalinio kelio veikla susilpnėja, todėl gali būti stipriai pažeidžiamos ir ELP atstatomosios funkcijos.

Pastaraisiais metais vis plačiau tiriami ląstelių struktūriniai ir funkciniai pokyčiai, panaudojant įvairiomis technologijomis pagamintus mikrosubstratus. Šie tyrimai leidžia geriau suprasti, kaip ląstelių morfologijos bei citoskeleto pasikeitimai veikia ląstelių struktūrą ir funkcijas. Nustatyta, kad skirtingi mikrosubstratai gali keisti ląstelių proliferacijos, apoptozės, citoskeleto organizacijos procesus ir apskritai ląstelių funkcionavimą.

Darbo tikslas: įvertinti nepilnos diferenciacijos endotelinių ląstelių savybes oksidacinio streso metu.

Uždaviniai:

- Nustatyti vandenilio peroksido koncentracijas, kurios stabdo ląstelių dauginimąsi ir indukuoja jų žūtį.
- Įvertinti Akt signalinių molekulių aktyvinimo charakteristikas, paveikus tiriamas ląsteles parinktomis vandenilio peroksido koncentracijomis.
- Gauti endotelines ląsteles – pirmtakes su padidinta Akt kinazės raiška ir ištirti PI3K/Akt signalinio kelio vaidmenį endotelinėse ląstelėse-pirmtakėse atsako į oksidacinį stresą metu.
- Įvertinti, kaip oksidacinis stresas veikia ląstelių adheziją ant fibronektinu dengtų mikrosubstratų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Endotelinės ląstelės pirmtakės

Endotelinės ląstelės pirmtakės (ELP, *angl.* endothelial progenitor cells) yra gana reta ląstelių populiacija, cirkuliuojanti kraujyje, galinti diferencijuotis į endotelines ląsteles, kurios padengia kraujagysles. Procesas, kurio metu vyksta *de novo* vaskuliarizacija dalyvaujant ELP vadinamas vaskuliogeneze. Endotelinės ląstelės pirmtakės taip pat atlieka svarbų vaidmenį patloginėje angiogenezeje, kuri lemia vėžio vystymąsi ir augimą (metastazavimą).

Subrendusios endotelinės ląstelės vystosi iš angioblastų embriono stadijoje, o suaugusio žmogaus organizme iš ELP bei multipotentinių endotelinių ląstelių esančių kaulų čiulpuose. Pirmą kartą terminas „angioblastai“ buvo panaudotas prieš šimtą metų. Šis pavadinimas tuo metu charakterizavo ląsteles, iš kurių susidaro kraujo plazma, raudonieji kraujo kūneliai ir endotelinės ląstelės. Šiuo metu mokslinėje literatūroje taip pat yra dažnai naudojami terminai - „angioblastas“ ir „angiogenezė“, vykdoma daug mokslinių tyrimų, kurių tyrinėjimo objektas yra endotelinės ląstelės-pirmtakės. ELP pirmą kartą aprašytos 1997 m. (Asahara ir kt., 1997) ir per paskutinį dešimtmetį joms skiriamas didelis mokslininkų dėmesys. Nustatyti trys pagrindiniai šioms ląstelėms būdingi žymenys - CD133, CD34 ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptorius (VEGFR-2). Šie žymenys aptinkami pirminiuose angioblastuose, lokalizuotuose kaulų čiulpuose. ELP pradėdžius migruoti į periferinį kraują, šios ląstelės pradeda sintetinti VE-kadheriną, endotelinę nitrito oksido (NO) sintetazę ir von Willenbrand faktorių.

ELP kiekis periferiniame kraujyje yra labai mažas ir tiesiogiai priklauso nuo įvairių veiksnių. Šios ląstelės turi ypatingai didelį potencialą, ieškant naujų gydymo strategijų širdies ir kraujagyslių ligų gydymui (Kovacic ir kt., 2008).

1.1.1. Endotelinių ląstelių-pirmtakių charakterizavimas

Asahara su kolegomis 1997 m. išspausdino straipsnį, kuriame detalai aprašė ELP išskyrimą (Asahara ir kt., 1997). Ląstelės, savo paviršiuje turinčios glikoproteiną CD34 buvo pirmą kartą išskirtos iš periferinio kraujo, naudojant magnetinį mikrodalelių atskyrimo metodą (*angl.* magnetic microbeads method). Tokiu būdu atskirtas ląsteles, užsėjus ant fibronektinu dengto paviršiaus, jos pradėjo diferencijuotis į endotelines ląsteles.

CD133, 120 kDa transmembraninis peptidas, yra ankstyvųjų hemapoetinių kamieninių ląstelių paviršiaus žymuo, kurio raiška yra būdinga hemapoetinėms kamieninėms ląstelėms ir ląstelėms pirmtakėms, esančioms žmonių kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje (Yin ir kt., 1997). Daugelio autorių duomenimis, ankstyvosios endotelinės ląstelės-pirmtakės, lokalizuotos kaulų čiulpuose, savo paviršiuje šalia CD34, turi CD133 ir VEGFR-2 žymenis, tačiau joms nebūdinga kraujagyslių endotelio (VE) kadherino ir von Willebrand faktoriaus raiška (Quirici ir kt., 2001). Suaugusio žmogaus periferiniame kraujyje cirkuliuojančios ELP nebeturi CD133 žymens, bet išlaiko CD34 ir VEGFR-2 raišką. Iki galo subrendusios ELP savo paviršiuje ypatingai gausiai ekspresuoja VEGFR-2, VE-kadheriną ir von Willebrand faktorių. Yra svarbu pažymėti, kad ELP, išskirtoms iš virkštelės kraujo, nebūdinga CD133 raiška (Yin ir kt., 1997). Tai galėtų reikšti, kad subrendusios endotelinės ląstelės neekspresuoja CD133. Iki galo nėra aišku, kuriuo metu ELP praranda CD133 žymenį - ar migruodamos iš kaulų čiulpų į periferiją, ar vėliau - cirkuliacijos metu.

Cirkuliuojančios ELP savo paviršiuje turi paviršiaus žymenis, kurie yra būdingi endoteliniam audiniui: CD31, CD146, von Willebrand faktorių, endotelinę NO sintetazę ir E-selektiną. Tačiau šių žymenų raiškos intensyvumas skiriasi (Asahara ir kt., 1997, Quirici ir kt., 2001, Kaushal ir kt., 2001). *1 lentelėje* pateikiami pagrindiniai endotelinių ląstelių paviršiaus žymenys, panaudojami šių ląstelių išskyrimui.

1 lentelė. Pagrindiniai endotelinių ląstelių paviršiaus žymenys, naudojami jų išskyrimui (Watt ir kt., 2010).

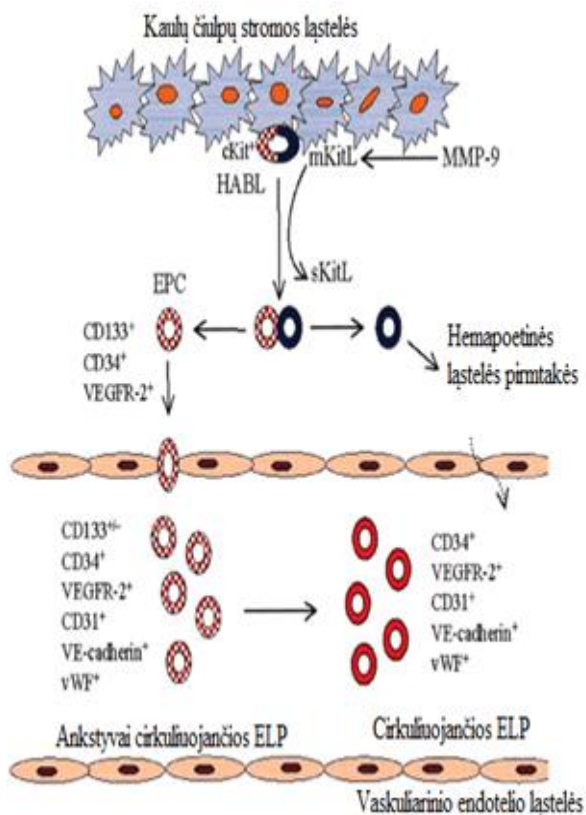
Ląstelių tipas	Paviršiaus žymenys
Proangiogeninės hemapoetinės ląstelės	CD133 +, CD34+, CD309+ (VEGFR)
Cirkuliuojančios endotelinės ląstelės	CD146+, CD34+, CD31+, CD45-, CD105+
Kolonijas formuojančios endotelinės ląstelės	CD31+, CD133-, CD45-, CD14-

Apibendrinant galima pažymėti, kad egzistuoja dvi ELP rūšys - ankstyvosios endotelinės ląstelės-pirmtakės, išskiriamos iš kaulų čiulpų, kurioms yra būdinga CD133, CD34 ir VEGFR-2 raiška, bei cirkuliuojančiame kraujyje aptinkamos ELP, kurios nebeturi CD133, tačiau joms būdinga von Willebrand faktoriaus raiška. Įdomius rezultatus paskelbė Harraz su kolegomis (Harraz ir kt., 2001). Ši mokslininkų grupė nustatė, kad ląstelės, kurioms nebūdinga CD34 raiška, yra CD14+

monocitų pogrupis, o šie monocitai, savo ruožtu, gali diferencijuotis į endotelines ląsteles. Monocitams būdinga daugelio endotelinų ląstelių žymenų raiška, jie angiogeninėmis sąlygomis gali sudaryti vamzdelio pavidalo struktūras (Schmeisser ir kt., 2001). Monocitus veikiant įvairiais veiksniais, pvz. VEGF, jie gali diferencijuotis į skirtingų fenotipų endotelinį audinį. Šis monocitų transdiferenciacinis potencialas tik patvirtina bendrą ląstelių kilmę iš kaulų čiulpuose lokalizuotų hemangioblastų (Nishikawa ir kt., 2001).

1.1.2. Endotelinų ląstelių-pirmtakių mobilizacija

ELP mobilizacija iš kaulų čiulpų yra reguliuojama įvairių augimo veiksnių - fermentų, ligandų ir ląstelių paviršiaus receptorių. Pavyzdžiui, dažnai yra tiriamas VEGF, kuris ypatingai stimuliuoja ELP mobilizaciją iš kaulų čiulpų (Kalka et al., 2000). Matriksinio metaloproteinazės-9 (MMP-9) aktyvacija sukelia membraninio Kit ligando virsmą į tirpų Kit ligandą. O tai lemia kamieninių ir ląstelių-pirmtakių, kurioms būdinga c-kit raiška, judėjimą link vaskuliarinės zonos kaulų čiulpuose. Tai yra ląstelių mobilizacijos iniciacijos stadija (Heissig ir kt., 2001). *1 paveiksle* yra pavaizduotas ELP mobilizacijos procesas kaulų čiulpuose.



1 pav. ELP mobilizacija iš kaulų čiulpų (pagal Heissig ir kt., 2001).

Kol kas nėra iki galo aišku, koku būdu ELP tampa pilnai subrendusiomis, diferencijuotomis endotelinėmis ląstelėmis *in vivo*. Viena iš hipotezių yra CD133 raiškos mažėjimas, o von Willebrand faktoriaus raiškos didėjimas. Diferenciacijos proceso pradžia yra laikoma ELP migracija iš kaulų čiulpų.

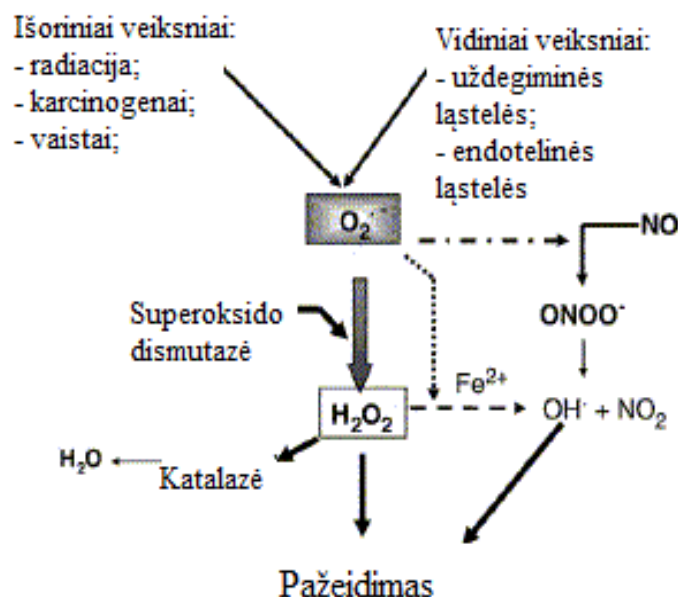
1.2. Oksidacinis stresas ir jo įtaka endotelinių ląstelių savybėms

Oksidacinis stresas yra susijęs su širdies ir kraujagyslių susirgimais - ateroskleroze, hipertenzija ir kt. Jis gali pasireikšti diabeto metu (Hwang ir kt., 2003). Oksidacinis stresas yra apibūdinamas balanso tarp antioksidacinių ir prooksidacinių procesų vykstančių organizme sutrikimu. $O_2^{\cdot-}$ ir H_2O_2 turi didelės įtakos normaliam ląstelių funkcionavimui ir signalų perdavimui. Kraujagyslių ląstelės palaiko antioksidacinius mechanizmus, apsaugančius nuo oksidacinio streso. Dažniausiai organizme susidarančios reaktyvios deguonies formos (*angl.* reactive oxygen species (ROS)) yra vandenilio peroksidas (H_2O_2), hidroksido radikalas ($OH^{\cdot}$), superoksido anijonas ($O_2^{\cdot-}$) ir peroksinitritas ($ONOO^-$) (Taniyama ir kt., 2003). Susirgus širdies ir kraujagyslių ligomis pro-oksidantų kiekis žymiai padidėja. Tai lemia sumažėjusią antioksidantinių fermentų ekspresiją (Muller ir kt., 2004).

1.2.1. Vandenilio peroksidas

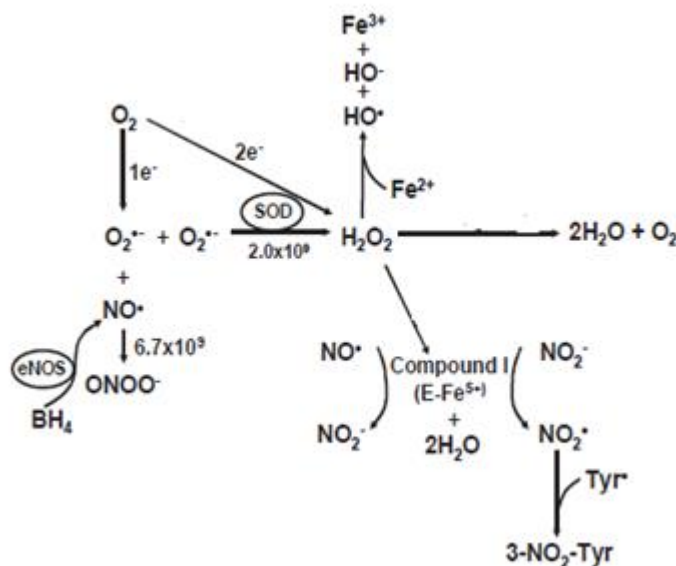
Vandenilio peroksidas (H_2O_2) yra stabili reaktyvaus deguonies forma, gebanti pereiti per kraujagyslių ląstelių membranas ir veikti kaip signalinė molekulė. Fiziologinėmis sąlygomis H_2O_2 susidaro jungiantis $O_2^{\cdot-}$ anijonams tarpusavyje, dalyvaujant superoksido dismutazei (Lassegue ir kt., 2003) (2 pav.). Moksliniai tyrimai parodė, kad būtent H_2O_2 yra labai svarbus tarpląsteliniais signaliniais mechanizmais.

Ši molekulė gali skatinti kraujagyslių ląstelių apoptozę, reguliuoti jų proliferaciją ir Ca^{2+} kiekį ląstelėse (Brown ir kt., 1999). H_2O_2 reguliacijai būtini trombocitų augimo faktorius (PDGF), epidermio augimo faktorius (EGF) ir angiotensinas II. Vandenilio peroksidas taip pat aktyvina mitogenų aktyvinamas proteinkinazių signalinio kelio (MAPK) molekules, dalyvauja serino grupių forforilavimo ir defosforilavimo procesuose. Nustatyta, kad H_2O_2 stimuliuoja atsparumą insulinui, blokuodamas Akt signalinį kelią (Yamaguchi ir kt., 2003). Įvairių sutrikimų metu H_2O_2 virsta vandens molekulėmis, dalyvaujant katalazei - glutationo peroksidazei (Cai ir kt., 2003).



2 pav. H_2O_2 susidarymo organizme mechanizmas (pagal Muth ir kt., 2004).

H_2O_2 plazmoje yra aptinkamas labai mažais kiekiais, nes jis labai greitai reaguoja su hemo grupės baltymais ir dėl šitos priežasties endotelinės ląstelės susijungia su cirkuliuojančiu H_2O_2 (Hallowell ir kt., 2000). Be to, H_2O_2 lengvai pereina per ląstelių membranas. Esant uždegiminiam procesui organizme H_2O_2 kiekis kraujagyslėse gali siekti iki $100 \mu\text{mol/l}$. Detalus mechanizmas, kuriuo H_2O_2 sukelia kraujagyslių ląstelių pažeidimus nėra iki galo gerai išaiškintas ir aprašytas. H_2O_2 neturi nesuporuotų elektronų ir yra mažiau reaktyvus nei kiti reaktyvūs deguonies dariniai (RDD). Įrodyta, kad H_2O_2 aktyvina signalinius kelius ir stimuliuoja RDD gamybą kraujagyslių ląstelėse. H_2O_2 aktyvina NADPH oksidazę, kuri produkuoja $O_2^{\cdot -}$, sukeldama oksidacinį stresą organizme (Liet ir kt., 2001). Endotelinėse ląstelėse H_2O_2 taip pat stimuliuoja NO sintetazės ekspresiją (Cai ir kt., 2003). Nustatyta, kad endotelinės ląstelės *in vivo* susiduria su išoriniu stresu, kuris iš dalies keičia ląstelių metabolizmą ir funkcijas, pavyzdžiui, NO (azoto oksido) išskyrimą, NO sintetazės ekspresiją, vario/cinko superoksido dismutazės ir kitų genų ekspresiją (Davis ir kt., 2004; Griffith ir kt., 2002). $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 ir jų reakcijų produktai (3 pav.) veikia kraujagyslių ląstelių funkcijas.



3 pav. Biocheminis H_2O_2 susidarymo ir metabolizmo kelias (pagal Cai et al., 2005).

1.2.2. Oksidacinio streso poveikis endotelinėms ląstelėms

Oksidacinio streso įtaka endotelinėms ląstelėms-pirmtakėms širdies kraujagyslių susirgimų metu gerai aprašyta. Uždegimo metu ELP juda link pažeisto endotelio, integruojasi jame ir skatina neovaskuliarizaciją. Šių susirgimų metu ELP kiekis žymiai sumažėja ir susilpnėja jų funkcionalumas (Yao ir kt., 2006). Tai lemia, kad organizmas negali pilnai palaikyti savo funkcijų, slopinamas organizmo audinių atsistatymas. Oksidacinis stresas organizme įvyksta, susidarius reaktyviems deguonies dariniams arba laisviems deguonies radikalams. Reaktyvus deguonis organizme pažeidžia biologines struktūras ir yra laikomas pagrindiniu veiksniu, nulemiančiu tokių susirgimų kaip aterosklerozė, atsiradimą (Torsney ir kt., 2005). RDD veikimas pasireiškia tiesioginiu citotoksiniu poveikiu kraujagyslių endoteliui. Padidėjęs superoksido susidarymas organizme sumažina ELP kiekį ir sutrikdo jų funkcijas organizme.

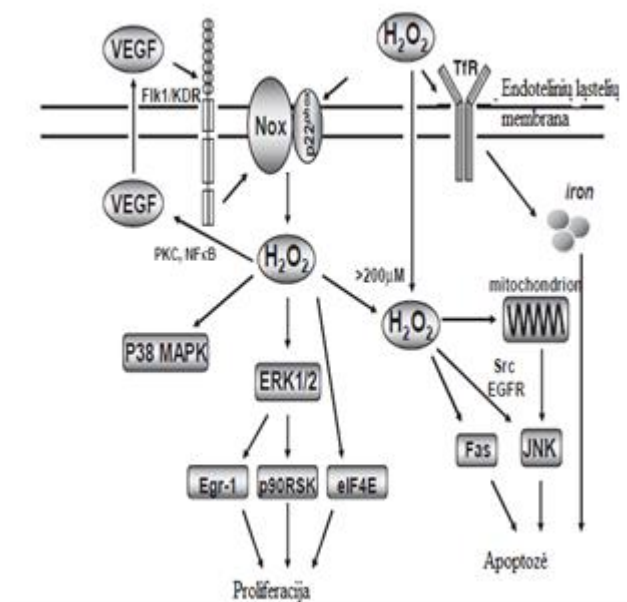
Yra nustatyta, kad inkubuojant ELP su didelėmis H_2O_2 koncentracijomis, yra sukeliamas šių ląstelių priešlaikinė apoptozė ir patikimai sumažinamas jų kiekis (Hung ir kt., 2003). Tyrinėjant dirbtinai sukeltą miokardo infarktą modeliniuose gyvūnuose – žiurkėse, buvo nustatyta, kad RDD susidarymas yra tiesiogiai proporcingas sumažėjusiam ELP kiekiui kraujyje. Taip pat yra žinoma, kad oksidacinis stresas ne tik sumažina ELP skaičių, bet ir pažeidžia pagrindines jų funkcijas, o tai lemia sutrikusią kraujagyslių homeostazę (Lin ir kt., 2012). Iš kitos pusės, padidėjęs oksidacinis stresas tiesiogiai veikia ELP mobilizaciją pažeidimo vietoje.

1.2.3. Oksidacinio streso veikimo mechanizmai

Oksidacinis stresas sukelia endotelio disfunkciją ir ląstelių pažeidimus, dažniausiai lemiančius aterosklerozę ir kitus kardiovaskuliarinius susirgimus (Cai ir kt., 2000; Harrison ir kt., 2003). $O_2^{\cdot -}$ susidaro organizme, dalyvaujant įvairiems ląstelės fermentams - NADPH oksidazei, ksantino oksidazei, ciklooksigenazei ir kitiems mitochondrijų kvėpavimo grandinės fermentams (Wolin ir kt., 2002). Be to, endotelinė azoto oksido sintetazė (NOS), kai yra nesusijungusi su savo substratu, gali produkuoti didelį kiekį $O_2^{\cdot -}$ (Landmesser ir kt., 2003).

Ksantino oksidazės arba gliukozės oksidazės organizme gamina H_2O_2 , kuris, savo ruožtu, stimuliuoja endotelinių ląstelių proliferaciją (Ruiz-Ginez ir kt., 2000). Signaliniai keliai, kurie dalyvauja endotelinių ląstelių proliferacijos ir apoptozės reguliacijoje yra pavaizduoti 4 paveiksle.

Tyrimai rodo, kad H_2O_2 turi didelę įtaką ląstelių proliferacijai. Esant padidėjusiai katalazės arba citoplazminės gliutatio peroksidazės ekspresijai endotelinių ląstelių proliferacija yra slopinama (Zanetti ir kt., 2002). Ląstelių proliferaciją reguliuoja p90 RSK, kuri indukuoja H_2O_2 . Taip pat H_2O_2 efektyviai padidina VEGF, kuris tiesiogiai veikia endotelinių ląstelių pirmtakių proliferaciją, migraciją, ekspresiją ir sekreciją (Chua ir kt., 1999).



4 pav. H_2O_2 aktyvinami signaliniai keliai, dalyvaujantys endotelinių ląstelių proliferacijoje ir apoptozėje (pagal Cai ir kt., 2005).

Be to, nustatyta, kad H_2O_2 padidina eukariotinio baltymų sintezės iniciacijos faktoriaus eIF4E ekspresiją, tokiu būdu indukuodamas endotelinų ląstelių migraciją. Nemažai mokslinių tyrimų rodo, kad H_2O_2 reguliuoja angiogenezę ir VEGF ekspresiją *in vivo*. O endotelinų ląstelių proliferacija ir angiogenezė yra labai svarbi išemijos pažeisto audinio regeneracijai.

Tyrimų metu buvo nustatyta, kad virkštelės kraujo kilmės endotelinės ląstelės yra jautresnės oksidacijai, nei pavyzdžiui aortos endotelinės ląstelės. Paveikus iš aortos išskirtas endotelines ląsteles 200 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 koncentracija, jokio poveikio ląstelių gyvybingumui nustatyta nebuvo. Tuo tarpu, paveikus iš virkštelės kraujo išskirtas endotelines ląsteles didėjančiomis H_2O_2 koncentracijomis nuo 50 iki 100 $\mu\text{mol/l}$ buvo nustatyta suaktyvėjusi apoptozė (Thomas ir kt., 2004). Šis tyrimas taip pat parodė, kad H_2O_2 indukuota apoptozė, dažniausiai vyko dalyvaujant JNK. Kitų mokslinių grupių atlikti tyrimai taip pat patvirtina, kad JNK/c-Jun kelias atlieka svarbų vaidmenį H_2O_2 indukuotoje apoptozėje (Cia ir kt., 2005).

Kitais duomenimis, 800 μM H_2O_2 koncentracija indukuoja endotelinų ląstelių apoptozę *in vitro* (Niwa ir kt., 2003). Eksperimentų rezultatai parodė, kad 500 μM koncentracija patikimai sumažino endotelinų ląstelių gyvybingumą per pirmas keturias H_2O_2 poveikio valandas. Parodyta, kad veikiant ląsteles H_2O_2 , per pirmas 30 minučių Anneksinas V prisijungė prie endotelinų ląstelių plazminės membranos, o praėjus dar 30 minučių, jo kiekis padvigubėjo. Po 4 H_2O_2 poveikio valandų stebima DNR fragmentacija, patvirtinanti ląstelių žūtį apoptozės būdu. Šiuos duomenis patvirtina kaspazės-3 aktyvacija praėjus vienai H_2O_2 poveikio valandai (Gulden ir kt., 2010).

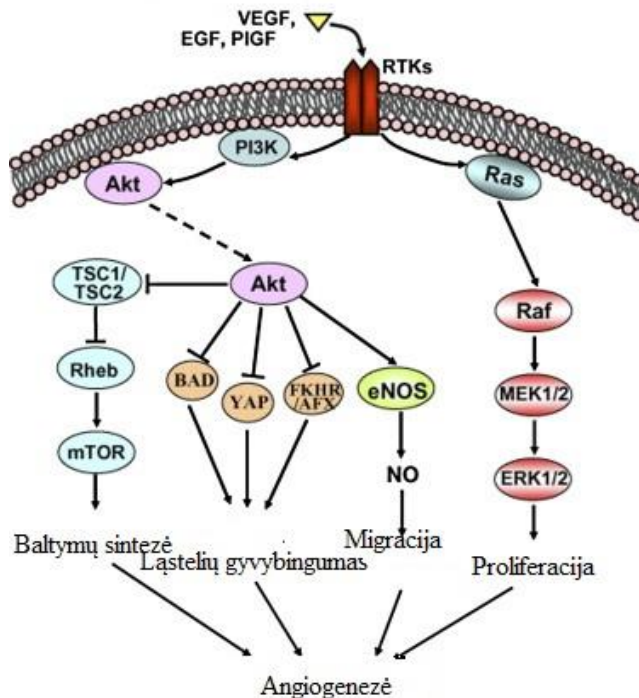
Nuo citotoksinio H_2O_2 poveikio iš virkštelės kraujo išskirtas endotelines ląsteles apsaugo PI3K/Akt signalinis kelias (Martindale et al., 2002; Thomas ir kt., 2002). Teigiama, kad H_2O_2 aktyvina/fosforilina Akt ir, tokiu būdu, užtikrina šios signalinės molekulės antiapoptozinį veikimą. Parodyta, kad panaudojus PI3K inhibitorių, Ly294002, yra slopinama Akt aktyvacija ir skatinama apoptozė.

Kaip ir ERK aktyvinimo atveju, Akt aktyvacija po oksidacinio poveikio įvyksta dalyvaujant augimo veiksmų receptoriams. Pavyzdžiui, H_2O_2 paveikus HeLa ląsteles, šios medžiagos inicijuotas signalo perdavimas vyksta per EGF receptorių, o panaudojus specifinį šio receptoriaus inhibitorių, Akt aktyvumas slopinamas (Wang ir kt., 2000). PI3K/Akt kelio aktyvacija vyksta oksidacinio streso metu ir ši aktyvacija yra labai svarbi ląstelėms, nes tokiu būdu ląstelės gali apsisaugoti nuo apoptozės ir išgyventi.

1.3. Akt signalinio kelio įtaka endotelinų ląstelių pirmtakių migracijai, proliferacijai ir gyvybingumui

Akt yra serino/treonino baltymų kinazė, aktyvuojama skirtingų augimo veiksnių ir citokinų nuo fosfatidylinositol- 3-kinazės priklausomu keliu. Anti-apoptozinis Akt aktyvumas reguliuoja pagrindines ląstelių funkcijas: migraciją, gliukozės metabolizmą ir baltymų sintezę. Yra svarbu pažymėti, kad Akt signalinis kelias endotelinėse ląstelėse yra svarbus kraujagyslių homeostazei palaikyti ir angiogenezei (Carmeliet ir kt., 2000).

Žinduolių genome yra nustatyti tris Akt genai: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β ir Akt3/PKB γ (Datta ir kt., 1999). Šie genai koduoja baltymus, turinčius plekstrino homologijos domenų (PH) N-galuose, centrinį kinazinį domeną ir reguliacinį domeną C- gale. Visi šie genai yra aktyviai ekspresuojami įvairiuose audiniuose, bet Akt1 yra daugiau būdingas smegenų, širdies raumens ir plaučių audiniams, Akt 2 - raumeniniam audiniui, o Akt 3 raiška yra padidėjusi smegenyse, skydliaukėje ir embrioninio vystymosi metu (Brodbeck ir kt., 1999). Nestimuliuotose ląstelėse Akt baltymai dažniausiai yra citoplazmoje ir turi dvi nefosforilintas sritis: treonino 308 ir serino 473. Veikiant augimo veiksniams, PH domenai susijungia su PI3K ir prisijungia prie plazmos baltymų. Toliau Akt yra fosforilinamas kitų kinazių: nuo 3-fosfoinozido baltymo priklausoma kinazės 1 ir 2 (*angl.* pyruvate dehydrogenase lipamide kinase isozyme 1 - PDK1 ir PDK2) (Downward ir kt., 1998). Aktyvi Akt gali fosforilinti savo substratus. Vieni jų - plazminės membranos baltymai. Akt defosforilina ir inaktyvuoja baltymų fosfatazės, pavyzdžiui baltymų fosfatazės 2A (PP2A). 5 *paveiksle* yra pavaizduota PI3K/Akt kelio schema. Akt yra svarbiausia PI3K signalinio kelio molekulė reguliuojanti ląstelių gyvybingumą (Franke ir kt., 1995). PI3K/Akt signalinio kelio taikiniai yra apoptozę reguliuojančios molekulės: Bad, FKHR, IKK α (Brunet ir kt., 1999). Yra žinoma ir kitų PI3K/Akt signalinio kelio funkcijų. Tai gliukozės transporterio GLUT4 translokacija; glikogeno sintezė, inaktyvuojant glikogeno sintazės kinazę 3 (GSK3); ląstelės ciklo reguliacija per žmogaus telomerų atvirkštinės transkriptazės subvienetą (hTERT); baltymų sintezės skatinimas, fosforilinant mTOR (Shah ir kt., 2000). Apibendrinant Akt vaidmenį galima pasakyti, kad tai yra daugiafunkcinė baltymų kinazė, aktyviai reguliuojanti ląstelių gyvybingumą.

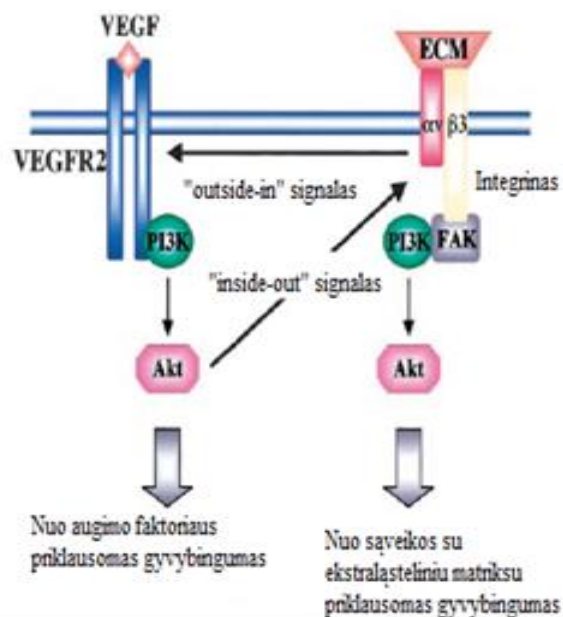


5 pav. PI3K/Akt kelias ir pagrindinės šio kelio signalinės molekulės (pagal Yang ir kt., 2006).

1.3.1. Akt vaidmuo, reguliuojant endotelinųjų ląstelių savybes

Kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (VEGF) yra svarbus endotelinėms ląstelėms, nes aktyvina šių ląstelių funkcijas, gyvybingumą (Alon ir kt., 1995). VEGF vaidmuo, reguliuojant šių ląstelių gyvybingumą pasireiškia, aktyvinant Flk1/VEGFR2-PI3K-Akt signalinį kelią (Gerber ir kt., 1998). Yra nustatyta, kad endotelinųjų ląstelių gyvybingumas, reguliuojamas PI3k/Akt signalinio kelio, gali būti priklausomas ir nuo kitų veiksnių: angiopoetino-1 (Ang-1), insulino, nuo insulino priklausomo augimo veiksnio-I (IGF-I), hepatocitų augimo veiksnio, mažų proteoglikanų - dekorinų, estrogeno, aktyvaus deguonies formų (pvz. H_2O_2) (Dimmeler ir kt., 1998).

Augimo veiksnių aktyvinama angiogenezė yra labai priklausoma nuo ryšių tarp ląstelių ir tarpląstelinio užpildo (TU) baltymų. VEGF nulemta Akt aktyvacija taip pat labai priklauso nuo ląstelės sąveikos su TU. Ląstelių ir TU sąveika užtikrinama per membranoje esančių baltymų integrinų molekules. 6 paveiksle pavaizduotas VEGF ir ląstelės sąveikos su TU nulemiamas endotelinųjų ląstelių gyvybingumas. Kai integrinai susijungia su TU baltymais, jie aktyvinasi (susigrupuoja) ir susijungę su ląstelės aktino citoskeletu per jungiamąsias molekules duoda signalą



6 pav. VEGF ir EMB įtaka endotelinių ląstelių gyvybingumui (pagal Shiojima ir kt., 2002).

formuotis sutelktiniam sąlyčiui (*angl.* focal adhesion, SS) ir aktyvinti tarpląstelinius signalus (Hafezi-Moghadam ir kt., 2002).

Angiogeniniais veiksniais stimuliuotos endotelinės ląstelės labai gausiai ekspresuoja $\alpha_v\beta_3$ integriną. $\alpha_v\beta_3$ integrinas, savo ruožtu, jungiasi su VEGF ir trombocitų augimo veiksnio (PDGF) receptoriais (Brooks ir kt., 1994). Apibendrinant galima teigti, jog signalai gauti iš integrinų, endotelinių ląstelių sąveikos su TU metu, yra labai svarbūs reguliatoriai, užtikrinantys nuo augimo veiksnių priklausomą ląstelių išgyvenamumą ir angiogenezę, reguliuojamą PI3K/Akt signalinio kelio (Shiojima ir kt., 2002).

Endotelinių ląstelių ypatybė migruoti ir sudaryti kapiliaro pavidalo struktūras yra įprasta *in vivo* angiogenezėje (Carmeliet ir kt., 2000). VEGF padidina endotelinių ląstelių migraciją ir kapiliarinių struktūrų formavimą *in vitro*, taip pat veikiant PI3K/Akt signaliniam keliui. Panašiu veikimu pasižymi ir kiti veiksniai. Yra nustatyta, kad S1P baltymas inicijuoja endotelinių ląstelių migraciją ir kapiliarinių struktūrų formavimą *in vitro*. Tai vyksta dalyvaujant PI3K/Akt signaliniam keliui. O oksiduoti mažo tankio lipoproteinai (LDL) slopina endotelinių ląstelių migraciją, skatindami Akt defosforilinimą. Tyrinėjant kitų rūšių ląsteles buvo nustatyta, kad jų migraciją link ląstelių judėjimą skatinančių medžiagų (*angl.* chemoattractants), taip pat reguliuoja PI3K/Akt signalinis kelias.

Ląstelių judėjimo metu vyksta aktino citoskeleto reorganizavimas (Meili ir kt., 1999). Endotelinėse ląstelėse VEGF indukuotai migracijai yra labai svarbios Rho šeimos GTPazės (Li ir kt., 2000). Šiuo metu yra vyraujanti kontraversiška nuomonė apie Akt sąveiką su G baltymu. Iš vienos pusės Akt neigiamai reguliuoja Rac1 aktyvumą, fosforilindama Rac1 ir slopina jo GTP jungiantį domeną, o iš kitos pusės – Akt fosforilina S1P receptorių EDG-1 ir skatina Rac aktyvaciją bei endotelinių ląstelių migraciją (Lauffenburger ir kt., 1996).

Kitas svarbus baltymas aktyvinantis Akt ir reguliuojantis ląstelių migraciją yra p21 aktyvuota proteinkinazė (PAK). PAK yra dažnai apibūdinama, kaip su Rac-1 susijungiantis baltymas. Yra parodyta, kad PAK aktyvina Rac arba Cdc42, o šis, savo ruožtu, reguliuoja citoskeleto reorganizavimą. Šiuo metu yra manoma, kad PAK šeimos proteinkinazės yra efektyvūs Akt aktyvatoriai, kurie reguliuoja endotelinių ląstelių migraciją (Higuchi ir kt., 2001).

1.3.2. PI3K/Akt signalinio kelio reguliacija oksidacinio streso metu

PI3K/Akt aktyvacija pasireiškus oksidaciniam stresui vyksta dalyvaujant įvairių augimo veiksmų receptoriams. H_2O_2 aktyvuoja PI3K/Akt signalinį kelią per EGF receptorių, o specifiniai EGF slopikliai efektyviai slopina PI3K/Akt kelią (Wang ir kt., 2000). Nustatyta, kad H_2O_2 paskatinta PI3K/Akt signalinio kelio aktyvacija pirminiuose fibroblastuose įvyksta dalyvaujant PDGF receptoriams ir šiai aktyvacijai EGF inhibitoriai poveikio neturi (Klotz ir kt., 2000).

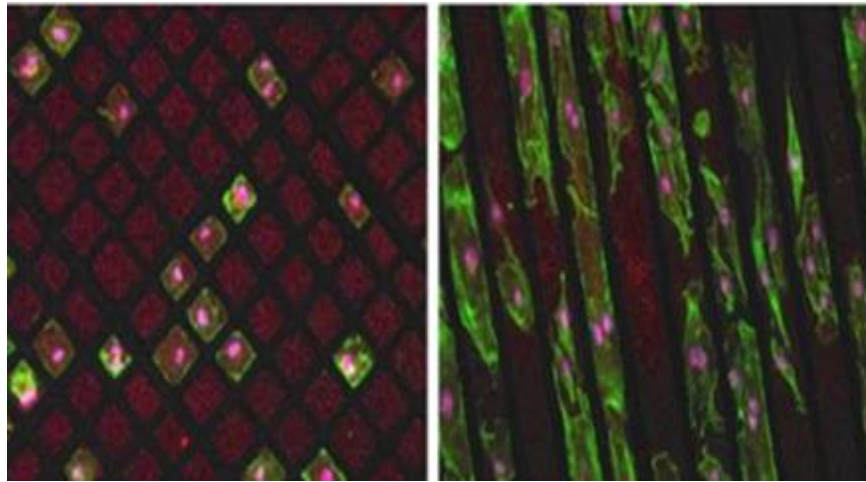
Yra nustatyta, kad PI3K/Akt signalinio kelio aktyvacija, esant oksidaciniam stresui, yra labai svarbi ląstelių išgyvenamumui ir gali būti reguliuojama PI3K inhibitoriaus wortmanino (*angl.* wortmannin), kuris yra daug efektyvesnis PI3K inhibitorius nei Ly294002. Panaudojus PI3K inhibitorių yra blokuojamas H_2O_2 aktyvintas signalo perdavimas PI3K/Akt keliu ir skatinama ląstelių žūtis (Sonoda ir kt., 1999). Modifikuojant/padidinant Akt signalinės molekulės raišką gali būti padidinamas ląstelių atsparumas oksidaciniam stresui (Wang ir kt., 2000).

PI3K/Akt signalinis kelias skatina ląstelių išgyvenimą oksidacinio streso metu, slopindamas baltymus, atsakingus už apoptozės vykdymą - BAD, kaspazę-9, GSK3 ir IKK α . (Martindale ir kt., 2002). Dar vienas mechanizmas, kuriuo aiškinamas PI3K/Akt signalinio kelio nulemiamas ląstelių išgyvenamumas po H_2O_2 poveikio, yra ASK1 fosforilinimas, neleidžiantis šiai kinazei aktyvinti žemiau esančių kinazių - JNK ir ATF2.

1.4. Endotelinių ląstelių pirmtakių struktūriniai ir funkciniai tyrimai, panaudojant mikrosubstratus

Vis daugiau mokslininkų tiria ląstelių struktūrinius ir funkcinius pokyčius, panaudodami mikrosubstratus (*angl.* micropatterning), pagamintus įvairiais litografijos metodais, pavyzdžiui, Dip-Pen nanolitografija (*angl.* Dip-Pen Nanolithography) ir fotopersodinimas (*angl.* photografting). Šie tyrimai leidžia geriau suprasti, kaip ląstelių morfologijos bei citoskeleto pasikeitimai veikia ląstelių struktūrą ir funkcijas. Yra nustatyta, kad skirtingi mikrosubstratai gali keisti ląstelių proliferacijos, apoptozės, citoskeleto organizacijos procesus ir, apskritai, ląstelių funkcionavimą. Tikimasi, kad ateityje tokie mikrosubstratai galės būti pritaikomi biomedicininės inžinerijos tyrimuose (angiogenezeje, ląstelių migracijoje ir audinių inžinerijoje). Dažniausiai mikrosubstratų gaminimui pagrindu naudojami ploni stiklo paviršiai, kurie yra apdorojami ląstelėms netoksiškomis medžiagomis. Vėliau ant tokio paviršiaus, pasitelkiant įvairias metodikas, yra „prikabinami“ įvairūs tarpląstelinio užpildo (TU) baltymai (fibronektinas, lamininas ir t.t.).

Mikrosubstratų linijų dydis veikia endotelinių ląstelių išsidėstymą ir orientaciją. Mažinant linijų plotį, didėja tvarkingai išsidėsčiusių ląstelių kiekis (Jang ir kt., 2010). Maksimalus linijų plotis, kurį autoriai naudoja endotelinių ląstelių tyrimams ant mikrosubstratų yra 200 μm . Atlikta nemažai tyrimų, kurių metu buvo tirtos 15, 30 ir 60 μm pločio fibronektino linijos. Ant 60 μm pločio linijų ląstelės visiškai nelietė linijų kraštų, kontaktavo tarpusavyje ir buvo tvarkingai išsidėsčiusios. 15 μm linijose dėl reto ląstelių išsidėstymo buvo stebimas didžiausias ląstelių pailgėjimas (elongacija). Autoriai pažymi, kad didinant linijų storį (nuo 200 nm iki 1 μm) didėja tvarkingas ląstelių išsidėstymas, vyksta jų elongacija (Vartanian ir kt., 2009). 7 paveiksle parodytos taisyklingai išsidėsčiusios endotelinės ląstelės ant fibronektinu dengtų mikrosubstratų.



7 pav. Endotelinės ląstelės ant įvairios formos fibronektino mikrosubstratų. Ląstelėms vaizdinti panaudoti antikūnai prieš aktiną (Anderson ir kt., 2011).

Nemažai įtakos endotelinių ląstelių morfologijai turi ir tarpai tarp linijų. Tose vietose, kurios nėra padengtos TU baltymais, bet yra citofilinės, ląstelės pradeda formuoti tiltus tarp linijų. Tokiu būdu ląstelės sąveikauja. Tačiau šie duomenys nevienareikšmiai. Vienų ląstelių taisyklingas išsidėstymas yra stebimas ant linijų, kai jų plotis siekia 10-20 μm . Dvi endotelinės ląstelės gali išsidėstyti ant 30 μm pločio linijos (Jiang ir kt., 2002). Yra nustatyta, kad kai fibronektino linijos plotis bei tarpai tarp linijų 5 μm , ląstelės visiškai nesirikiuoja. Tačiau padidinus linijų plotį ir tarpus iki 10 μm , ląstelės taisyklingai išsidėsto ant tokių mikrosubstratų linijų (Kofron ir kt., 2009). Di Canio ir kt., nustatė fibronektino linijų pločio ribą - 9,2 μm , nuo kurios endotelinės ląstelės, išskirtos iš žmonių vainikinių arterijų, pradeda tvarkingai išsidėstyti. Autorių nuomone, kad toks tvarkingas ląstelių išsidėstymas ant mikrosubstratų priklauso nuo ląstelių branduolio dydžio (Di Canio ir kt., 2010).

Mikrosubstratų paviršiuose galima formuoti ir įvairių formų bei dydžių TU baltymų saleles (kvadratus, apskritimus, žvaigždės formos saleles ir t.t.). Pasitelkus pavienes fibronektino saleles ant mikrosubstratų buvo atlikti tyrimai, kurių metu buvo nustatyta, kad ant kvadrato formos, 20-40 μm pločio, fibronektino salelių, ląstelės įgaudavo kvadrato formą, o kai kvadrato plotis buvo sumažintas iki 5 μm ląstelės buvo taisyklingo apskritimo formos (Kam ir kt., 2001).

Mikrosubstratai naudojami ir specifinių citoskeleto elementų pokyčių tyrimams. Nustatytas jų poveikis aktino išsidėtymui, sutelktiniam sąlyčiui, mikrotubulėms. Tačiau mikrosubstratai neveikė citoskeleto baltymo vimentino arba VE-kadherino raiškos. Tyrimai parodė, kad aktino kiekis patikimai mažėja, ląsteles užsėjus ant mažesnių nei 15 μm pločio linijų (Wu ir kt., 2007). Aktino

taisyklingas išsidėstymas prasidėdavo pirmą valandą po ląstelių užsėjimo ant mikrosubstrato ir tęsėsi iki 24 valandos.

Sutelktinio sąlyčio vietų skaičius didesnis ląstelėms augant ant mikrosubstratų, nei ant kontrolinio lygaus paviršiaus, jos koncentruojasi ties linijų kraštais. Kai kurie autoriai pastebi, kad šio tipo sąveikų su substratu mažėja, kai fibronektino linijų plotis yra mažesnis nei 15 μm . Užsėjus endotelines ląsteles ant kvadrato formos fibronektino salų (10-50 μm), SS pirmiausia susidaro ties kvadrato kraštais, kur įtempimo jėgos yra didžiausios (Uttayarat ir kt., 2005). Prieštaringi rezultatai buvo gauti, kai buvo sėjamas skirtingas endotelinų ląstelių tankis ant substratų. Nustatyta, kad didinant ląstelių tankį, mažėja SS vietų kiekis. SS ant substratų dažniausiai susiformuoja per pirmas 24 valandas po ląstelių užsėjimo.

Mikrosubstratai dažnai yra naudojami ląstelių proliferacijai ir kontaktams tarp jų tirti. Yra nustatyta, kad susidarę kontaktai tarp ląstelių ant mikrosubstratų paviršiaus (2-4 ląstelės) skatina proliferaciją, lyginant su pavienėmis ląstelėmis. Tai įrodo ir tyrimai atlikti vienos ląstelės pločio linijų – ant šių linijų ląstelės dauginasi žymiai greičiau, nors tipiniu atveju tvarkingas išsidėstymas neturi įtakos ląstelių proliferacijai. Dike ir kt. savo tyrimuose parodė, kad ant 10 μm pločio linijų endotelinės ląstelės sustoja proliferuoti jau po 72 valandų (Dike ir kt., 1999).

Ribotas ląstelių užsėjimo plotas didina endotelinų ląstelių programuotą žūtį - apoptozę. Yra nustatyta, kad užsėjus endotelines ląsteles ant 10 μm skersmens apskritimų, ląstelės labai greitai pradeda žūti. Wu ir kt. nustatė, kad užsėjus ląsteles ant 15 μm pločio linijų 50 % ląstelių pradeda apoptotiškai žūti jau po 12 valandų. O užsėjus tas pačias endotelines ląsteles ant 30 μm pločio linijų, apoptozė stebima nebuvo (Wu ir kt., 2007).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos

Ląstelių auginimui buvo naudojama Iscoves's modifikuota Dulbecco terpė (IMDM) (*Gibco*), praturtinta 10% fetaliniu veršelio serumu (toliau tekste:FVS) (*Lonza*) ir antibiotikais (penicilinu 100 TV/mL), streptomycinu (100 µg/mL) (*Lonza*). Mikrosubstratų praplovimams buvo naudojama IMDM terpė su triguba antibiotikų - penicilino, streptomicino, koncentracija. Adhezinių ląstelių monosluksnio suardymui naudotas 0,25% tripsino-EDTA (etilendiamino tetraatco rūgštis) tirpalas (*Lonza*).

Etanolis (96,3°) (*Merck chemicals*); MTT (3-(4,5- dimetiltiazol- 2 – yl) – 2,5- difeniltetrazolio bromidas) (*Sigma-Aldrich*); 0,4% tripano mėlio tirpalas (*Sigma-Aldrich*); akridino oranžas (toliau tekste: AO) (*Molecular Probes*); etidžio bromidas (toliau tekste :EB) (*Molecular probes*); fosfatinis buferis (80 mM Na₂PO₄, 20mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl) (toliau tekste: FB) (*Lonza*); 10 mM Tris-HCL tirpalas (*Lonza*); 50 mM NaCl (*Applichem*); 5 mM NaF (*Applichem*); aprotininas (*Sigma-Aldrich*); 1 mM fenilmetilsulfonil fluoridas (toliau tekste: PMSF) (*Applichem*); 2 mM Na₃VO₄ (*Applichem*); natrio dodecilsulfato buferio (toliau tekste: NDS) (*Merck chemicals*); 30 % akrilamido tirpalas (*Applichem*); 2% bis-akrilamido tirpalas (*Applichem*); 1 M HCl tirpalas (*Applichem*); 0,1 % Triton X-100 reagentas (*Applichem*); vandenilio peroksidas 30% (toliau tekste: VP) (*Sigma-Aldrich*); ląstelių transfekcijos rinkinys (*Qiagen*); Ly294002 inhibitorius, wortmannin, Akt inhibitorius VIII (*Sigma- Aldrich*); pirminiai antikūnai prieš Akt (*Cell signaling*); antriniai antikūnai prieš ožkos IgG konjuguoti su kreinų peroksidaze (HRP) (*Abcam*).

Ląstelių auginimo flakonai (*BD Falcon*); termostatas, kuris palaiko 37 ° temperatūrą ir 5% anglies dioksido (toliau tekste: CO₂) (*Thermofisher Scientific*); pipetės; laminaras (*Thermofisher Scientific*), centrifūga (*Thermofisher Scientific*), spektrofotometras - Themoscientific Varioskan Flash, purtyklė (*Eppendorf Thermomix Comfort*); 12, 24 ir 96 duobučių plokštelės; invertuotas mikroskopas Olympus CKX41, šviesinis mikroskopas Olympus CK40, fluorescencinis mikroskopas Olympus IX50;

2. 2. Tyrimo metodai

2. 2. 1. Kraujagyslių kilmės endotelinių ląstelių skyrimas

Kraujagyslių kilmės endotelinės ląstelės buvo skirtos iš laboratorinės žiurkės plautinio kamieno. Žiurkei atlikus eutanaziją buvo paimtas kraujagyslės audinio fragmentas. Eksperimentas buvo atliktas vadovaujantis LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Leidimu naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam darbui Nr. 0212, 2011-02-04. Biopsijos metu paimamas audinio gabaliukas buvo inkubuojamas tripsino/kolagenazės tirpale, išskirtos ląstelės buvo užpilamos auginimo terpe (IMDM su FVS ir antibiotikais). Ląstelės auginamos 37 °C termostate, esant 5 % CO₂. Maždaug po dviejų savaitių susiformavo endotelinių ląstelių monosluoksnis. Ši ląstelių kultūra buvo persėjama 1-2 kartus per savaitę.

2.2.2. Ląstelių auginimas *in vitro*

Ląstelių monosluoksnis flakonėlyje buvo apžiūrimas invertuotu mikroskopu, auginimo terpė nupilama ir ląstelių monosluoksnis 2 kartus praplaunamas EDTA- tripsino tirpalu. Antrą kartą praplovus buvo paliekama 0,5 ml tirpalo ir flakonėlis dedamas 3-5 min. į 37 °C termostatą. Monosluoksniui disocijavus suspensija buvo skiedžiama terpe (IMDM su FVS ir antibiotikais), ląstelės suskaičiuojamos ir išsėjamos į naujus flakonėlius arba naudojamos tolimesniems eksperimentams.

2.2.3. Ląstelių veikimas tiriamosiomis medžiagomis

- Ląstelės buvo išsėjamos į 24 duobučių plokšteles, ~30000 ląst./ml tankiu. Ląstelėms esant eksponentinėje augimo stadijosje (praėjus 20-24 val. po išsėjimo) jos buvo veikiamos didėjančiomis tiriamosios medžiagos - H₂O₂, koncentracijomis (nuo 50 iki 300 μM).
- Tiriant Akt kinazės vaidmenį, Akt signalinio kelio inhibitoriai Ly294002 (20 μM), wortmanin (1 μM) ir Akt inhibitorius VIII (10 μM) buvo pridedami į prieš 24 val. išsėtą ląstelių terpę 30 min. prieš ląsteles paveikiant H₂O₂.

2.2.4. Ląstelių skaičiaus ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu

Ląstelių skaičius ir gyvybingumas buvo nustatomas, remiantis negyvų ląstelių membranos pralaidumu. Dažant ląsteles tripano mėliu negyvos ląstelės greitai nusidažo tamsiai mėlyna spalva

(Seglen,1976). Vertinimui buvo naudojamas 0,4 % tripano mėlio tirpalas, paruoštas FB. Ląstelių monosluksnis buvo suardomas 0,25 % tripsino- EDTA tirpalu, ląstelės praskiedžiamos auginimo terpe. Gera sususpendavus buvo paimama 20 μ l ląstelių suspensijos ir 20 μ l tripano mėlio tirpalo (lygiomis dalimis). Ląstelės buvo skaičiuotos Gorjajevo kameroje, naudojant šviesinį mikroskopą. Gyvų ląstelių skaičius (N) yra išreiškiamas ląstelių skaičiumi viename ml ląstelių suspensijos (ląstelių sk./ml):

$$N = a \cdot n \cdot 1000 / V$$

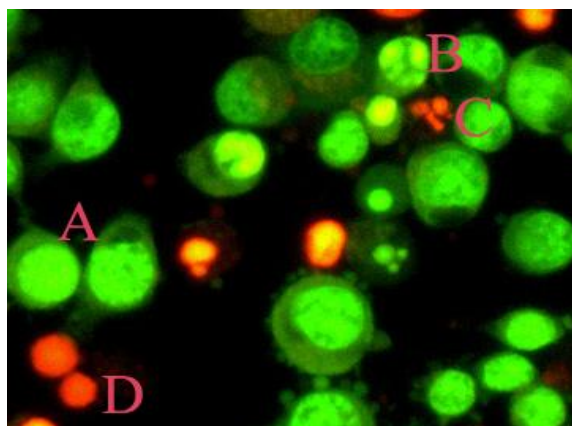
Kur: a- suskaičiuotas ląstelių skaičius kameroje;

n- praskiedimas

V- kameros tūris lygus 0,9 mm³;

2.2.5. Ląstelių gyvybingumo vertinimas su AO/EB mišiniu

Ląstelių gyvybingumas buvo vertinamas liuminescencinės mikroskopijos metodu, naudojant fluorescuojantį, su dezoksiribonukleorūgštimis (toliau tekste: DNR) besijungiantį dažų mišinį: AO – 100 μ g/ml ir EB – 100 μ g/ml ištirpintus FB. Į 25 μ l tiriamos ląstelių suspensijos imama 1 μ l dažų mišinio. 10 μ l tokio paruošto nudažytų ląstelių mišinio dedama ant objektinio stiklelio, uždengiama dengiamuoju stikleliu. Analizuojama fluorescenciniu mikroskopu. AO dažas susijungia su dvigrande DNR ir nudažo branduolį žaliai. AO taip pat jungiasi su ribonukleorūgštimis (toliau tekste: RNR) ir viengrande DNR ir nudažo rausvai oranžine spalva. Suskaičiuojant visas ląsteles ir įvertinant gyvų/negyvų ląstelių skaičių AO/EB nudažytoje suspensijoje, galima spręsti apie ląstelių gyvybingumą. Tokiu būdu nudažytoje ląstelių populiacijoje galima išskirti keturių rūšių ląsteles (8 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 (Mercille ir kt. 1994).

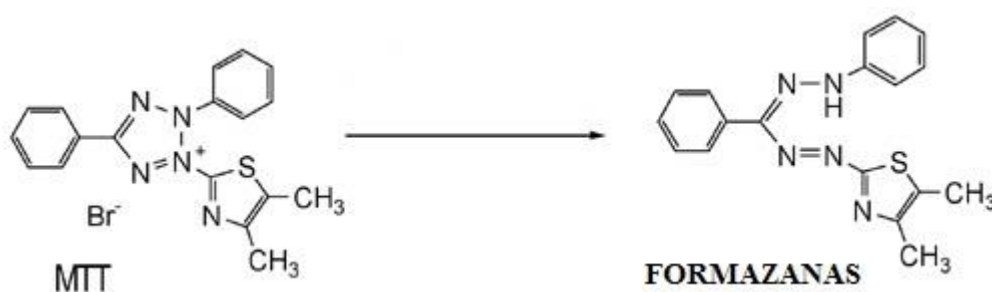


8 pav. Diferencijuotas ląstelių dažymas AO/EB dažų mišiniu: A – gyvos ląstelės, B – gyvos apoptozinės ląstelės, C - negyvos apoptozinės ląstelės, D - nekrozinės ląstelės. Fotografuota fluorescenciniu mikroskopu Olympus IX51.

Kiekviename pavyzdyje du kartus skaičiuojama po 100 ląstelių. Ląstelių pasiskirstymas populiacijoje skaičiuojamas procentais.

2.2.6 Ląstelių proliferacijos vertinimas MTT metodu

Endotelinių ląstelių proliferacija buvo vertinama naudojant MTT reagentą. Metodas yra paremtas tuo, kad gyvų ląstelių mitochondrijų fermentai redukuoja tirpų geltonos spalvos MTT į violetinės spalvos netirpius formazano kristalus (9 pav.). Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas susidariusio produkto – formazano kiekiui, kuris įvertinamas spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje, gautus netirpius produktus ištirpinus etanolyje.



9 pav. MTT redukcijos reakcija (Huamin ir kt. 2002).

Paruošta ląstelių suspensija, kurios tankis 30000 ląst./ml, išsėjama į 24 duobučių plokštelę. Auginama termostate 37 °C, 5% CO₂. Po nustatytų laiko intervalų (24, 48, 72 ir 96 val.) augimo terpė buvo pašalinama, o ląstelių monosluoksnis užpilamas įvertinimui naudotu 1 mg/ml MTT tirpalu, paruoštu FB, kurio buvo pilama po 1 ml į kiekvieną šulinėlį. Inkubuojama 1 val., susidariusios

nuosėdos tirpinamos etanolyje (96,3°), kurio buvo pilama po 200 µl į kiekvieną šulinėlį. Optinis tankis matuojamas spektrofotometriškai, esant 570 nm bangos ilgiui. Gautas optinis tankis yra proporcingas gyvų ląstelių skaičiui. Rezultatai išreiškiami santykiniu gyvybingumu t.y., santykiu optinio tankio, išmatuoto po tam tikro laiko (24, 48, 72 ir 96 val.) su optiniu tankiu išmatuotu ląstelių proliferacijos vertinimo pradžioje.

2.2.7. Ląstelių charakterizavimas

Ląstelių monosluoksnis buvo suardomas tripsino-EDTA tirpalu, 1×10^6 ląstelių/ml plaunama šaltu FB, pH 7.4, fiksuojama šaltu metanoliu 5 min., permebelizuojama 0,2 % Triton X-100 ir blokuojamos 2 % FVS, paruoštu fosfatiniame buferyje, 1 val. Tada inkubuojama su antikūnais prieš CD34 ir CD133 +4 °C temperatūroje. Analizuojama BD FACSCanto™ II tėkmės citometru.

2.2.8. Ląstelių transfekcija

Ląstelių transfekcija buvo vykdoma, naudojant Effectene transfekcijos rinkinį (Qiagen). Ląstelių transfekcija atlikta vadovaujantis gamintojo instrukcija. Transfekuotų ląstelių atrankai naudotas antibiotikas puromicinas (2 µg/ml). Akt raiškos padidinimui naudota plazmidė pBabe-puro-Akt (kontrolei naudota pBabe-puro-Vekt.), turinti atsparumą puromicinui bei pSG5 vektoriaus pagrindu sukurti Akt konstruktai - padidintos Akt raiškos vektoriai (HA-Akt, *akt* genas, sulietas su HA epitopo seka ir dominantinis negatyvus Akt (Akt-CAAX, *akt*, sulietas su CAAX seka (Burgering & Coffey, 1995; von Gise ir kt., 2001).

2.2.9. Ląstelių lizavimas

Paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis 3×10^5 ląst./ml. Ši suspensija išsėjama į 25 cm² flakonėlius ir auginama termostate 37 °C, 5% CO₂. Kitą dieną yra pakeičiama auginimo terpė, tam tikrais momentais pridedamas reikiamas kiekis medžiagos taip, kad poveikis truktų 5, 10, 15, 30 min., 1, 3, 6 ir 24 valandas.

Paruošiamas lizės buferis: 10 mM TrisHCl, pH 7,4; 50mM NaCl; 5 mM NaF; 0,1%BSA; 1% Triton X-100. Prieš buferio naudojimą pridedama 20 µg/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄. Tirpalo pH turi būti 7,2. Vienam milijonui monosluoksnių ląstelių 250 µl lizės buferio.

Ant ląstelių monosluoksnio užpilamas reikiamas kiekis lizės buferio. Laikoma lede 20 min. Šiuo laikotarpiu turinys perkeliamas į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 0 –

4°C 20 000 g 15 min. Supernatantas lygiomis dalimis sumaišomas su pavyzdžio buferiu. Baltymai denatūruojami inkubuojant 5 min. verdančiame vandenyje.

Pavyzdžio buferiui sumaišoma 2,5 ml 4x TrisHCl/natrio dodecilsulfato buferio(NDS) pH 6,8 (žiūrėti elektroforezė); 2 ml glicerolio; 0,2 ml β-merkaptotanolio; 0,1 mg bromfenolio mėlio dažo ir pripilama dejonizuoto vandens iki 10 ml. Laikoma -20°C temperatūroje.

2.2.10 Baltymų elektroforezė

Paruošiami tirpalai:

1. 4x Akrilamido/Bis-akrilamido tirpalas: 30% akrilamido; 0,8% bis-akrilamido. 100 ml tirpalo reikia 30 g akrilamido ir 0,8 g bis-akrilamido.

2. 4x TrisHCl/NDS tirpalas: 1,5 M TrisHCl, pH 8,8; 0,4% NDS.

500 ml tirpalo reikia 91 g Tris bazinio, 2 g NDS, 300 ml bedestiliuoto vandens. 1N HCl nustatoma tirpalo pH 8,8 ir pripilama vandens iki 500 ml, filtruojama per 0,45μm porų dydžio filtrą. Laikoma 4°C temperatūroje.

3. 4x TrisHCl/NDS tirpalas: 0,5 M TrisHCl, pH 6,8; 0,4% NDS.

Į 80 ml bedestiliuoto vandens pridedama 12,1 g Tris bazinio; 0,8 g NDS. 1N HCl nustatoma tirpalo pH 6,8 ir pripilama vandens iki 200 ml. Filtruojama ir laikoma 4°C temperatūroje.

4. 4x elektrodinis buferis.

5000 ml buferio reikia 15,1 g Tris bazinio, 72 g glicino, 5 g NDS. Buferio pH 8,3.

5. 10% (NH₄)₂S₂O₈ (AP) – 1 ml.

6. Tetrametiletilendiaminas (TEMED).

10% skiriamąjo gelio 10 ml gamybai imama: Akril/Bis – 3,3 ml; 4x TrisHCl/NDS, pH 8,8 – 2,5 ml; H₂O – 4,2 ml; AP – 100 μl; TEMED – 15,6 μl. Viskas gerai sumaišoma ir polimerinama poliakrilamido gelio paruošimo gardelėje. Kad poliakrilamido gelio paviršius būtų lygu, prieš polimerizaciją užsluoksniuojama izopropanolio, kuris po polimerizacijos nupilamas ir plaunama destiliuotu vandeniu.

4% koncentruojamojo gelio 5,08 ml gamybai imama: Akril/Bis – 0,65 ml; 4x TrisHCl/NDS pH6,8 – 1,27 ml; H₂O – 3,1 ml; AP – 50 μl; TEMED – 10 μl. Gerai išmaišoma ir užpilama ant

skiriamojo 10% poliakrilamido gelio paviršiaus. Įdedamos “šukos”. Geliui susipolimerinus, “šukos” atsargiai išimamos.

Į elektroforezės aparatą pripilame elektrodinio buferio. Į “kišenėles” įnešama po 50 µl paruoštų ląstelių lizatų. Įjungiamo elektros srovė. Srovės stiprumas padidinamas, kai bromfenolio mėlio dažas įeina į skiriamąjį gelį. Kai bromfenolio mėlio dažas pasiekia skiriamojo gelio pabaigą, srovė išjungiamo.

2.2.11. Imunoblotingas

Baltymai iš poliakrilamido gelio pernešami ant PVDF membranos. Tuo tikslu membrana 15 s inkubuojama metanolyje ir 2 min. vandenyje. Prieš naudojimą ji dar papildomai laikoma pernešimo buferyje (500 ml buferio paruošimui reikia: 1,5 g Tris bazinio; 7,2 g glicino; 100 ml metanolio; 0,5 g NDS ir vandens iki 500 ml). Naudojamas pusiau šlapias pernešimas, srovė 5 mA/cm². Pernešimo trukmė – 15 min.

Po pernešimo membranos merkiamos į “bloto” tirpalą (1% neriebaus pieno milteliai; 0,05% Tween 20; 0,01% NaN₃) ir laikoma per naktį. Išėmus iš šio tirpalo du kartus plaunama plovimo tirpalu (10 mM TrisHCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Tada paveikiama pirminiais antikūnais ir inkubuojama kambario temperatūroje 1 val. Po to, nusiurbus priminius antikūnus, plaunama plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Tada užpilami antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze, ir vėl inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos plaunama 3 kartus po 5 min. plovimo tirpalu. Imunoblotas išryškinamas ECL (sustiprinta chemoluminescencija) metodu.

2.2.12. Imunofluorocitochemija

Ląstelės fiksuojamos 4% paraformaldehidu 15 min. Po to tris kartus po 5 min. plaunama 0,2 % Triton X-100 paruoštu FB, blokuojama 3 % JSA/10 % FVS/FB, 1 val. Tada inkubuojama su antikūnais prieš vinkuliną 60 min., kambario temperatūroje. Plaunama FB su 0,5 % Tween-20 3 kartus po 5 min. ir inkubuojama su antikūnais prieš pelės Fab fragmentą, konjuguotais su Cy3 (1:500) 1 val. Plaunama, dažoma 5 mg/ml DAPI. Dar kartą plaunama FB. Mėginiai analizei paliekami FB, analizuojama fluorescentiniu mikroskopu.

2.2.13. Mikrosubstratų paruošimas

Fizinių ir technologinių mokslų centre pagaminti substratai buvo sterilinami ir paruošiami darbui su ląstelių kultūra. Jie buvo užpilami fosfatinio buferiu su trigubai didesne antibiotikų - penicilino ir streptomicino koncentracija ir laikomi 24 val. 4 °C. Po to, nupylus fosfatinį buferį mikrosubstratai papildomai sterilinti 15 min. po UV.

2.2.14. Ląstelių ir mikrosubstratų sąveikos tyrimas

Ant paruoštų sterilių mikrosubstratų yra užsėjamos endotelinės ląstelės ne didesniu nei 20000 ląst./ml tankiu. Šie užsėti mikrosubstratai paliekami inkubuotis termostate 37 °C, 5% CO₂ 24 valandoms. Praėjus inkubacijos laikui, ląstelių sąveika su mikrosubstratu vertinta ląsteles purtant 600 rpm 15 min. Po purtymo ant mikrosubstratų likusios ląstelės analizuotos imunofluorocitocheminiu būdu (žr. 2.2.12 sk.).

2.2.15. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atliekama Microsoft Office Excel 2007 programa. Duomenys pateikti kaip vid. $\pm$ SN, apskaičiuotas iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų

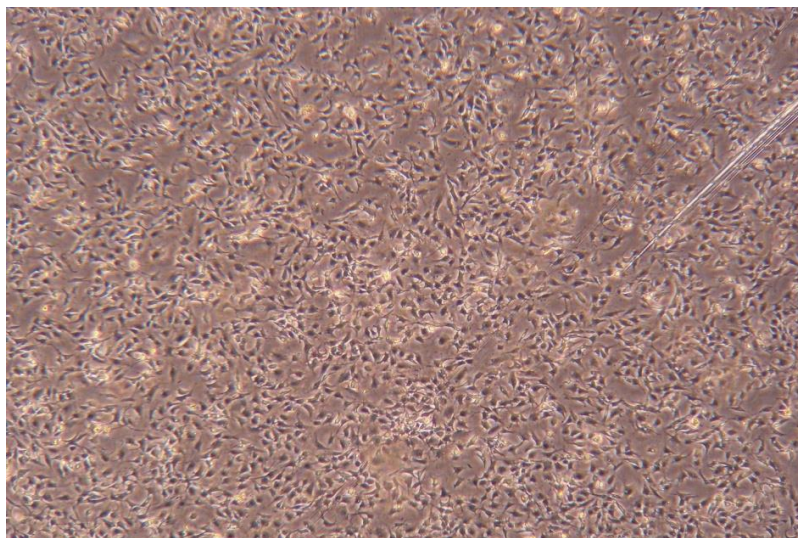
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Esant uždegiminiam procesui organizme, pvz. sergant širdies ir kraujagyslių ligomis arba ateroskleroze susidaro oksidacinis stresas. Oksidacinio streso metu organizme padaugėja RDD, kurie neigiamai veikia ELP kiekį kraujyje ir sutrikdo jų funkcijas.

In vitro ELP taip pat jautriai reaguoja į oksidacinį stresą, tačiau detalūs šių ląstelių veikimo mechanizmai nėra iki galo aiškūs. Šis darbas skirtas išsiaiškinti, kaip H_2O_2 (oksidacinio streso imitatorius *in vitro* sąlygomis) veikia ELP struktūrines ir funkcines savybes. Baigiamajame darbe buvo tiriama kaip oksidacinis stresas veikia ELP savybes, kokie galimi šio veikimo mechanizmai. Tuo tikslu buvo vertinta Akt kinazės, vienos svarbiausių signalinių molekulių, užtikrinančių ląstelių išgyvenimą nepalankiomis sąlygomis, vaidmuo. Pastaraisiais metais tiriant ląstelių savybes vis plačiau naudojami įvairūs mikrosubstratai. Tokie tyrimai buvo atlikti ir šiame darbe - vertinta ELP auginimo ant dirbtinių mikrosubstratų suformuotų iš TU baltymų, ypatumai.

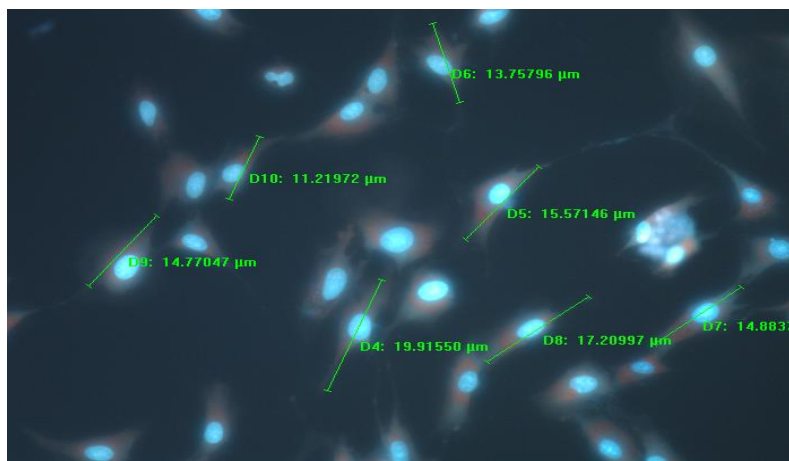
3.1. Endotelinų ląstelių gavimas ir jų charakterizavimas

Baigiamajame darbe buvo naudotos pirminės ląstelės, gautos iš žiurkės plautinio kamieno kraujagyslės (10 pav.). Nepilną ląstelių diferenciaciją įrodo jų ilgalaikio auginimo *in vitro* galimybė. Mūsų tiriamos ląstelės jau yra persėtos daugiau nei 100 kartų, tačiau jų dauginimosi intensyvumas nemažėja.



10 pav. Žmogaus endotelinės ląstelės- pirmtakės auginamos *in vitro*. Ląstelių monosluoksniu natyvinis vaizdas gautas invertuotu mikroskopu Olympus CKX41.

Toliau siekdami charakterizuoti šias ląsteles, tyrėme jų dydį. Tuo tikslu, ląstelės buvo išsėtos tokiu tankiu, kad po 24 val. dar nesuformuotų monosluoksnio, o augtų pavieniui. Vaizdinimui ląstelės buvo pažymėtos fluorescentiniais AO/EB dažais ir analizuotos fluorescentiniu mikroskopu Olympus IX51. Qcapture Pro 6.0 programa buvo nustatyta, kad vidutinis mūsų analizuojamų ląstelių dydis yra $15,33 \pm 1,91 \mu\text{m}$, o atstumai tarp ląstelių buvo $21,12 \pm 4,37 \mu\text{m}$, aišku didėjant ELP ląstelių tankiui atstumai mažėdavo (11 pav.).



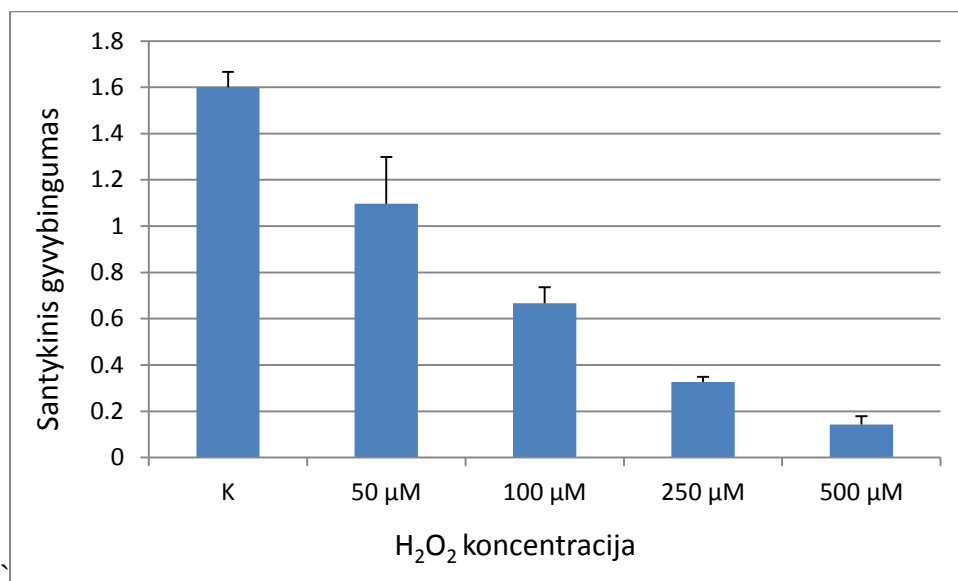
11 pav. Adhezinių endotelinų ląstelių dydžio analizė fluorescentiniu mikroskopu.

Siekiant detaliau charakterizuoti šias ląsteles, buvo vertinta žymenų CD34 ir CD133 raiška. Žinoma, kad ELP ląstelėms turėtų būti būdinga paviršiaus žymens CD 34 raiška, tačiau iš kraujagyslių gautoms ELP ląstelėms jau nėra būdinga CD133 raiška (Watt ir kt., 2010). Mes patikimai nustatėme, kad mūsų tiriamos ląstelės neturi CD133, tačiau nenustatėme ir CD34 raiškos. Gali būti, kad mūsų tiriamai ląstelių populiacijai yra būdinga CD14. Būtent apie tokią ląstelių populiaciją yra paskelbė Harraz su kolegomis (Harraz ir kt., 2001). Ši mokslininkų grupė parodė, kad $\text{CD34}^- \text{CD14}^+$ ląstelės gali diferencijuotis į endotelines ląsteles, taigi yra nepilnos diferenciacijos.

3.2. Vandenilio peroksido poveikio ELP ląstelėms tyrimas

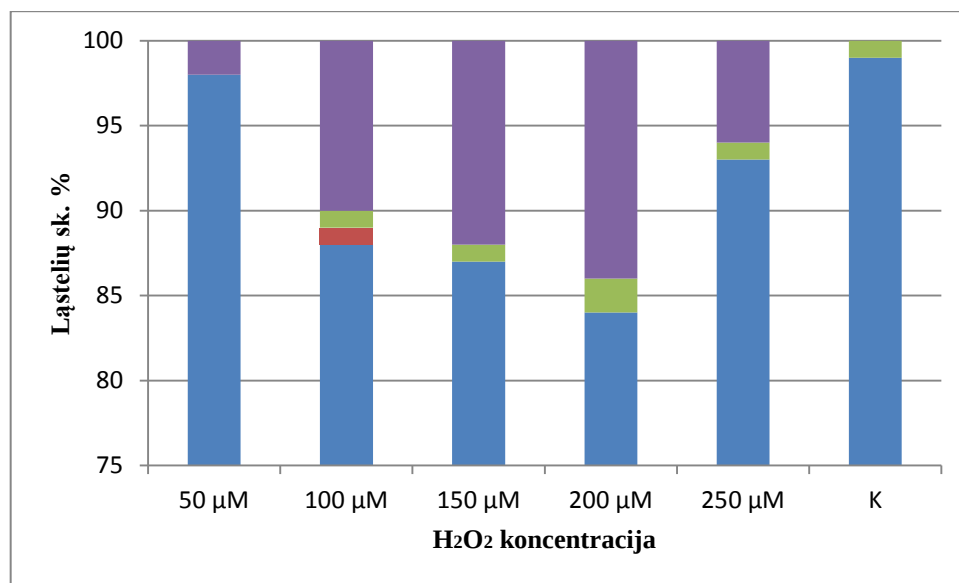
In vitro oksidacinio streso modeliui buvo pasirinktas oksidacinio streso iniciatorius - H_2O_2 . Iš literatūros yra žinoma, kad didelės H_2O_2 koncentracijos sukelia ELP ląstelių priešlaikinę apoptozę, slopina jų dauginimąsi (Hung ir kt., 2003). Kiti autoriai yra nustatę, kad $200 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 neturi jokio poveikio iš aortos išskirtų endotelinų ląstelių gyvybingumui. Tuo tarpu, paveikus iš virkštelės

išskirtas endotelines ląsteles H_2O_2 koncentracijomis nuo 50 iki 100 $\mu\text{mol/l}$ buvo nustatyta suaktyvėjusi jų apoptozė (Thomas ir kt., 2004). Norėdami įvertinti H_2O_2 poveikį žiurkės plautinio kamieno kilmės ELP, naudojome 50, 100, 250 ir 500 μM H_2O_2 koncentracijas. Gauti rezultatai parodė, kad 50 μM H_2O_2 koncentracija stabdo šių ląstelių proliferaciją. Tuo tarpu 100 μM H_2O_2 koncentracija jau ne tik slopina šių ląstelių dauginimąsi, bet ir skatina jų žūtį. Šiuo atveju nustatėme, kad ląstelių gyvybingumas sumažėjo apie 30 % palyginus su išsėtų ląstelių skaičiumi. Padidinant H_2O_2 koncentraciją, ELP gyvybingumas mažėjo, o paveikus ląsteles 500 μM H_2O_2 buvo nustatyta tik 14 % gyvų ląstelių (12 pav.). Tolimesniame darbe buvo naudotos dvi vandenilio peroksido koncentracijos: stabdanti ląstelių dauginimąsi 50 μM H_2O_2 koncentracija buvo naudota tiriant ELP ląstelių sąveiką su mikrosubstratais, o 100 μM H_2O_2 koncentracija, kuri indukavo 30-50 proc. ląstelių žūtį – Akt vaidmens tyrimui.



12 pav. Skirtingų H_2O_2 koncentracijų poveikis ELP gyvybingumui. Rezultatai išreikšti santykinio gyvybingumu - santykiu ląstelių skaičiaus nustatyto po 24 val. inkubacijos su pasirinkta H_2O_2 koncentracija su ląstelių skaičiumi prieš H_2O_2 poveikį.

Mūsų rezultatai patvirtino Thomas ir kt. gautus rezultatus, kad net nedidelės H_2O_2 koncentracijos skatina ELP žūtį. Toliau norėdami įvertinti ląstelių žūties pobūdį oksidacinio streso sąlygomis, atlikome ląstelių gyvybingumo tyrimus, panaudodami diferencijuotą ląstelių dažymą AO/EB dažų mišiniu. Šis metodas leidžia patikimai atskirti apoptozės ir nekrozės būdu žūstančias ląsteles. Gauti duomenys po 24 H_2O_2 poveikio valandų pateikti 13 paveiksle.

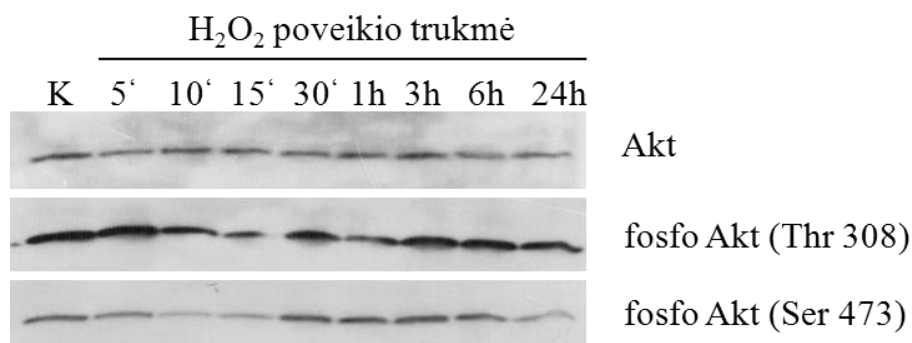


13 pav. Ląstelių gyvybingumo tyrimai panaudojus AO/ EB dažų mišinį. Čia: ■ Nekroziinių ląstelių skaičius (N); ■ Negyvų apoptotinių ląstelių skaičius; ■ Gyvų apoptotinių ląstelių skaičius; ■ Gyvų ląstelių skaičius. Poveikio trukmė – 24 val.

Gyvybingumo analizė AO/EB parodė, kad didėjant H₂O₂ koncentracijai daugėjo nekrozės būdu žuvusių ląstelių. Įdomu tai, kad paveikus ląsteles 250 μM H₂O₂ koncentracija, nustatyta mažiau nekrozės būdu žuvusių ląstelių. Kadangi, anksčiau esame nustatę, kad didinant H₂O₂ koncentraciją, gyvų ląstelių kiekis patikimai mažėja, tikėtina, kad šiuo atveju nustatyta didesnė gyvų ląstelių dalis yra susijusi su greitesniu žuvusių ląstelių suirimu. Šie rezultatai paneigė daugelio autorių nustatytus rezultatus, kad oksidacinio streso metu ELP žūsta apoptozės būdu (Thomas ir kt. 2004). Todėl buvo atlikti ląstelių gyvybingumo vertinimai po trumpesnio 3 ir 6 val. H₂O₂ poveikio laiko. Gauti rezultatai parodė, kad trumpiau veikiant H₂O₂ yra skatinama apoptozinė ląstelių žūtis (duomenys nepateikiami). Tai patvirtina ir Gulden su kolegomis stebėta DNR fragmentacija po 4 H₂O₂ poveikio valandų, patirtinanti ląstelių žūtį apoptozės būdu (Gulden ir kt. 2010).

3.3. Akt vaidmuo ELP ląstelėse oksidacinio streso metu

PI3K/Akt signalinis kelias yra atsakingas už ląstelių išgyvenimą įvairių citotoksinių poveikių metu, jų tarpe ir oksidacinio streso (Martindale et al., 2002). Teigiama, kad H₂O₂ aktyvina/fosforilina Akt ir, tokiu būdu, užtikrina šios signalinės molekulės antiapoptozinį veikimą. Norėdami įvertinti Akt raišką ir fosforilinimą/aktyvinimą endotelinėse ląstelėse-pirmtakėse panaudojome imunoblotingo metodą (14 pav.).

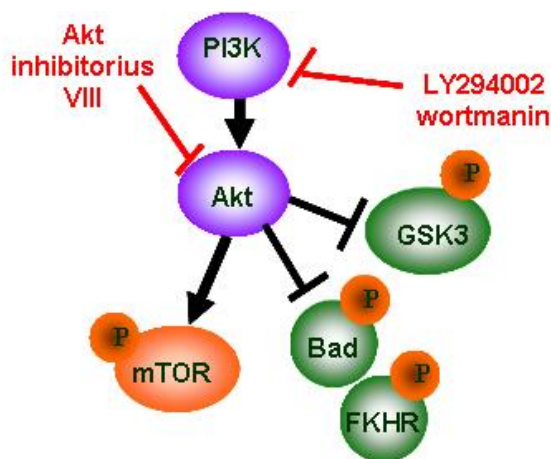


14 pav. Akt raiškos ir fosforilavimo tyrimas po 100 μ M H₂O₂ poveikio. Analizuota imunoblotingo metodu.

Gauti rezultatai parodė, kad H₂O₂ nekeitė Akt kinazės raiškos, tačiau skatino trumpalaikį fosforilinto baltymo lygio sumažėjimą. Šis fosfo-Akt lygio sumažėjimas gali būti siejamas su anksčiau mūsų nustatytą padidėjusiu ELP ląstelių žuvimo po trumpesnio H₂O₂ poveikio laiko – 3 ir 6 val.

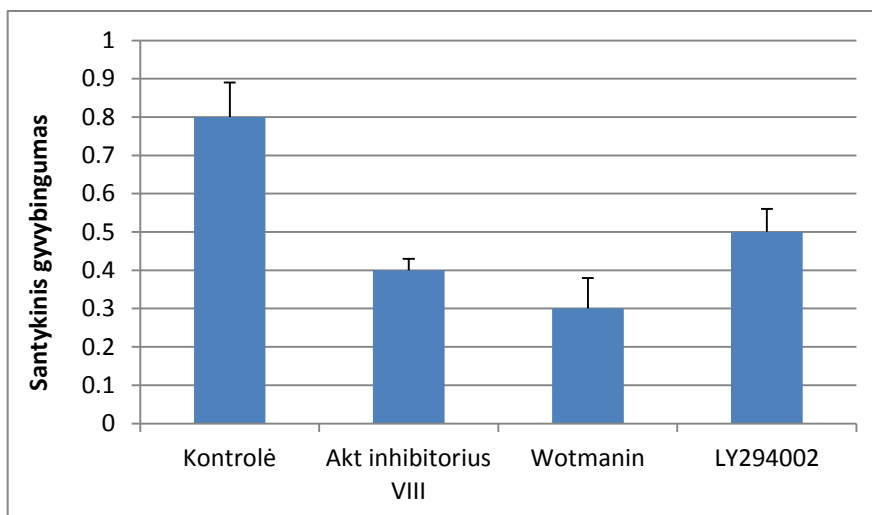
3.3.1. ELP ląstelių atsako į H₂O₂ poveikį tyrimas, nuslopinus Akt veikimą

Akt yra labai svarbus ELP antiapotozinis veiksnis stabdantis ląstelių apoptozę įvairių stresinių poveikių metu. Norėdami įvertinti, kiek svarbus yra Akt ELP išgyvenamumui, naudojome specifinius PI3K/Akt signalinio kelio slopiklius: PI3 kinazės veikimą slopinančius Ly294002 ir wortmanin bei Akt slopiklį VIII (15 pav.). Kiti autoriai pažymi, kad panaudojus PI3K inhibitorių, Ly294002, yra slopinama Akt aktyvacija ir skatinama apoptozė (Thomas ir kt. 2002).



15 pav. Darbe naudoti PI3K/Akt signalinio kelio slopikliai ir jų taikiniai

16 paveiksle pateikiami duomenys gauti panaudojus anksčiau minėtus PI3K/Akt kelio slopiklius. Matome, kad visi tirti inhibitoriai didino mūsų tiriamų ląstelių jautrumą oksidacinio streso imitatoriui H_2O_2 .



16 pav. Akt kinazės vaidmens tyrimas ELP ląstelėse po 100 μM H_2O_2 poveikio. Duomenys išreikšti santykinio gyvybingumu t.y. ląstelių skaičiumi nustatytu po 24 val. poveikio su ląstelių skaičiumi poveikio pradžioje.

3.3.2. Ląstelių su padidinta Akt raiška gavimas

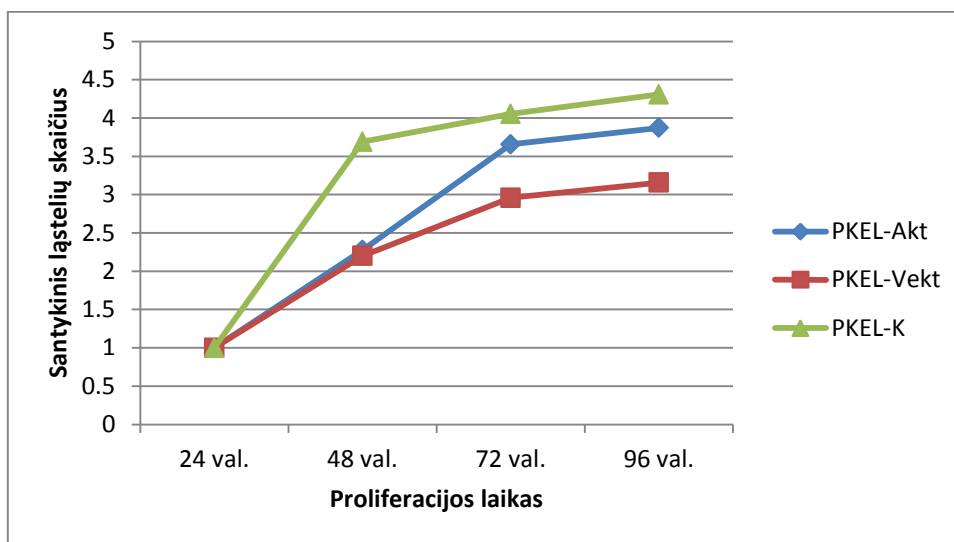
Toliau Akt kinazės vaidmenį tyrėme gavę genetiškai modifikuotas Akt atžvilgiu ELP ląsteles - ląsteles su padidinta Akt raiška. Kiti autoriai yra parodę, kad toks Akt raiškos modifikavimas padidina ląstelių didesnę atsparumą stresiniam poveikiui (Wang ir kt. 2000).

Tuo tikslu gavome dvi genetiškai modifikuotas ląstelių linijas. Akt raiškos padidinimui naudota plazmidė pBabe-puro-Akt, palyginimui gauta ląstelių linija panaudojus plazminę pBabe-puro-Vekt.). Abi šios plazminės turėjo atsparumą puromicinui, kurio pagalba buvo atrinktos transfekuotos ląstelės (Burgering & Coffey, 1995; von Gise et al., 2001). Akt kinazės raiškos lygis kontrolinėse ir genetiškai modifikuotose ląstelėse pateikiamas 17 paveiksle.



17 pav. Akt baltymo lygis genetiškai modifikuotose ELP ląstelėse ir kontrolinėse ELP ląstelėse.

Gavę šias modifikuotas ląstelių linijas, pirmiausia palyginome jų proliferacinį aktyvumą. Palyginimui naudojome pirmines, genetiškai niekaip nekeistas ląsteles. Gauti duomenys pateikiami 18 paveiksle.

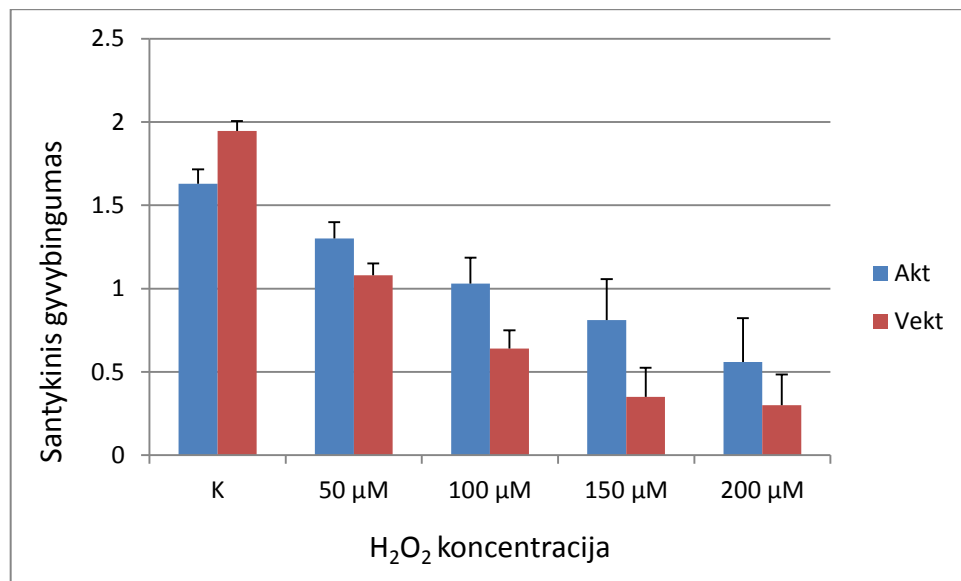


18 pav. Genetiškai modifikuotų ir kontrolinių ląstelių proliferacinio aktyvumo palyginimas MTT metodu. Ląstelių santykinis skaičius buvo vertinamas santykį ląstelių po 24, 48, 72 ir 96 val. jų dauginimosi su ląstelių skaičiumi tyrimo pradžioje, 24 val. po ląstelių išsėjimo.

Gauti rezultatai parodė, kad greičiausiai dauginosi netransfekuotos ELP ląstelės. Jau po 48 valandų jos suformavo pilną monosluoksnį. Lyginant genetiškai modifikuotų ląstelių dauginimąsi, matome, kad padidinta Akt raiška lemia geresnę šių ląstelių proliferaciją, nei genetiškai modifikuotų ląstelių, kurių Akt raiška nekito.

3.3.3. H₂O₂ poveikio ląstelėms su padidinta Akt raiška tyrimas

Toliau tirdami Akt vaidmenį oksidacinio streso sąlygomis, gautas genetiškai modifikuotas veikėme skirtingomis H₂O₂ koncentracijomis. Iš 19 paveiksle pateiktų duomenų matome, kad visais atvejais ląstelės, kuriose buvo padidinta Akt raiška, buvo atsparesnės H₂O₂ poveikiui. Ši tendencija buvo stebima, net ir esant mažiausiai tiriamosios medžiagos koncentracijai - 50 μM, kuomet ELP ląstelės dar nežuvo, o tik buvo stabdomas jų dauginimasis.



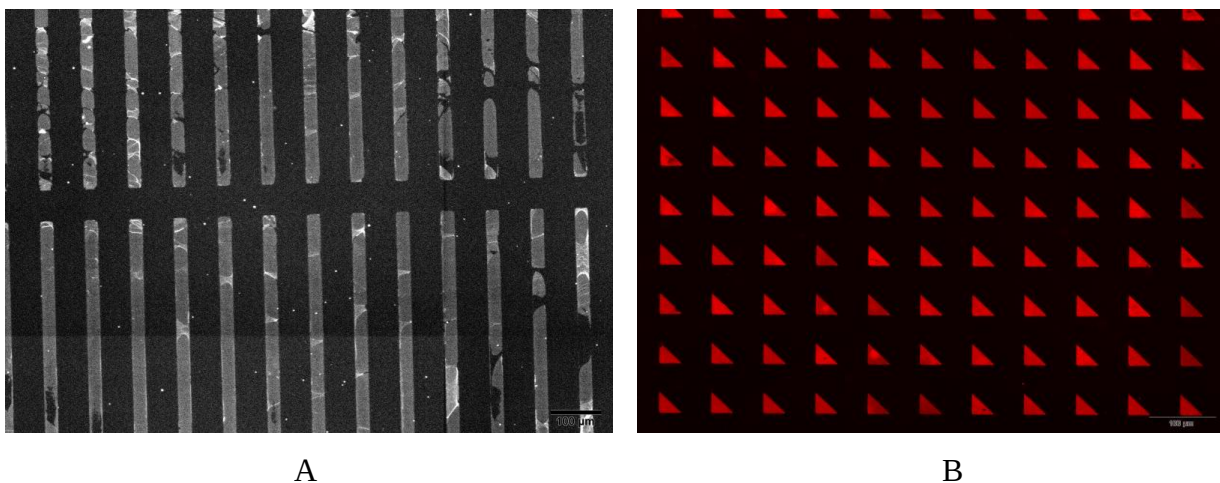
19 pav. Genetiškai modifikuotų Akt atžvilgiu ELP ląstelių jautrumo H₂O₂ poveikiui tyrimas. Duomenys išreikšti santykinio gyvybingumu t.y. ląstelių skaičiumi nustatyta po 24 val. poveikio su ląstelių skaičiumi poveikio pradžioje.

Apibendrinę šiuos bei su PI3K/Akt signalinio kelio slopikliais gautus duomenis, galime teigti, kad Akt signalinė molekulė yra svarbi ELP ląstelių išgyvenimui oksidacinio streso sąlygomis, todėl jos raiškos padidėjimas, pvz. farmakologinėmis priemonėmis, gali pagerinti širdies ir kraujagyslių ligų gydymo prognozę.

3.4. ELP ląstelių sąveika su mikrosubstratais

Šioje darbo dalyje buvo tiriama ELP ląstelių sąveika su mikrosubstratais pagamintais Dip-Pen nanolitografijos technologijos būdu. Šie mikrosubstratai buvo gauti iš Fizinių ir technologinių mokslų centro, Nanoinžinerijos skyriaus.

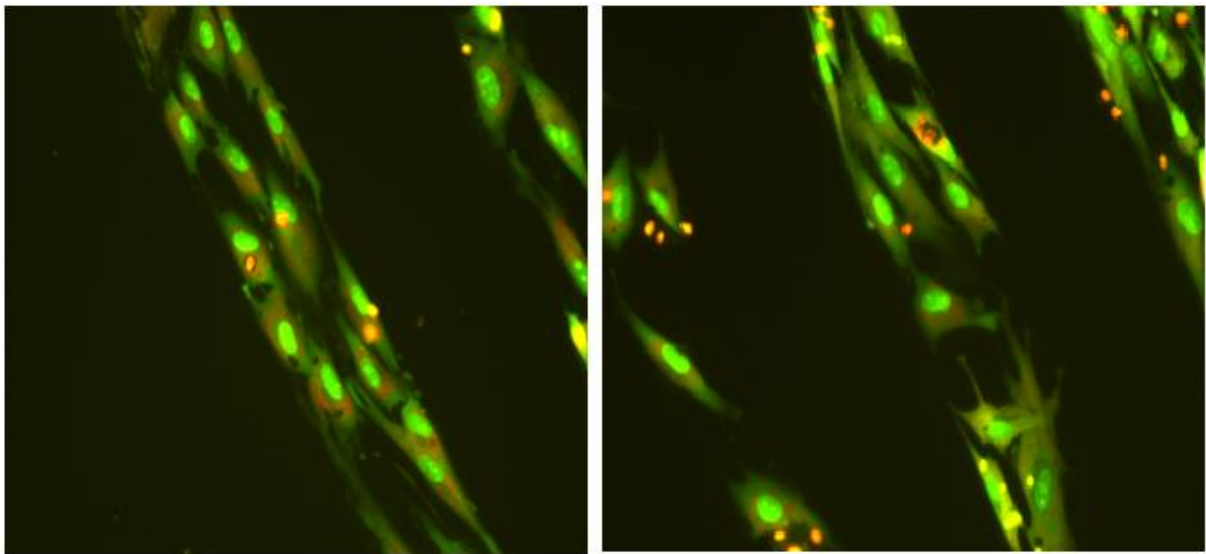
Pastaruoju metu tokie mikrosubstratai yra dažnai naudojami moksliniuose tyrimuose, norint ištirti įvairių ląstelių funkcines ir struktūrines savybes. Tai yra puikus įrankis, nes mikrosubstratus galima formuoti, naudojant įvairius baltymus, kurie yra svarbūs ląstelių funkcijoms – adhezijai, proliferacijai, diferenciacijai. Mūsų tyrimuose buvo naudojami mikrosubstratai su iš TU komponento fibronektino (toliau tekste: Fn) sudarytomis juostomis ir salelėmis (20 pav.). Literatūros duomenimis, mikrosubstratų linijų dydis veikia endotelinių ląstelių išsidėstymą ir orientaciją. Mažinant linijų plotį, didėja tvarkingai išsidėsčiusių ląstelių kiekis (Jang ir kt., 2010).



20 pav. Fn mikrosubstratai: A - Fn orientuotas juostomis, Fn juostų plotis 30 μm , tarpai tarp juostų 60 μm , fotografuota elektroniniu skenuojančiu mikroskopu; B - Fn salelės. Fn salelių štapavimo plotis 10x10 mm. Fn dažytas Texas Red. Fotografuota fluorescentiniu mikroskopu.

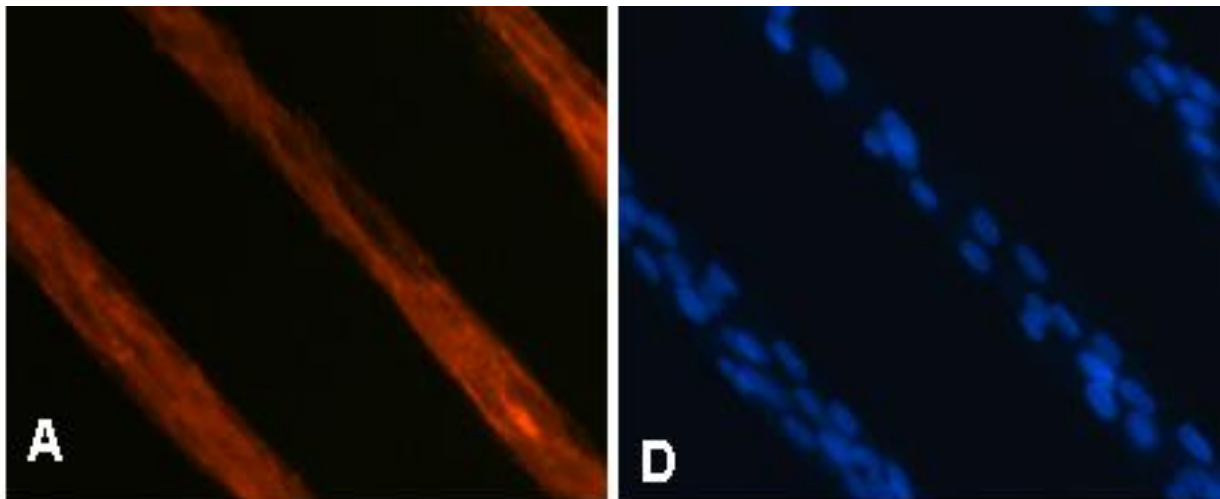
3.4.1. ELP ląstelių sąveika su linijas sudarančiais mikrosubstratais.

Mikrosubstratų padengimas TU komponentais pagerina ląstelių adheziją prie substrato, leidžia įvertinti ląstelių išsidėstymą bei viduląstelių citoskeleto baltymų organizaciją. 21 paveiksle pateikiamas ELP ląstelių išsidėstymas ant iš juostų sudaryto Fn mikrosubstrato. Vertinta AO/EB dažų mišiniu, kuris leidžia ne tik matyti ant mikrosubstrato augančias ląstelės, bet ir įvertinti jų gyvybingumą. Mūsų tyrimai parodė, kad ląstelės organizavosi tvarkingai ant Fn juostų, ten kur ląstelės buvo nustolusios viena nuo kitos, jos ištempdavo citoskeletą, tam kad būtų sudaryti ryšiai tarp ląstelių. Be to, Fn mikrosubstratai niekaip neveikė tiriamų ląstelių gyvybingumo.



21 pav. ELP sąveika su Fn linijų mikrosubstratais. Vizualizacijai naudotas AO/EB dažų mišinys. Nuotraukos darytos fluorescentiniu mikroskopu Olympus IX51.

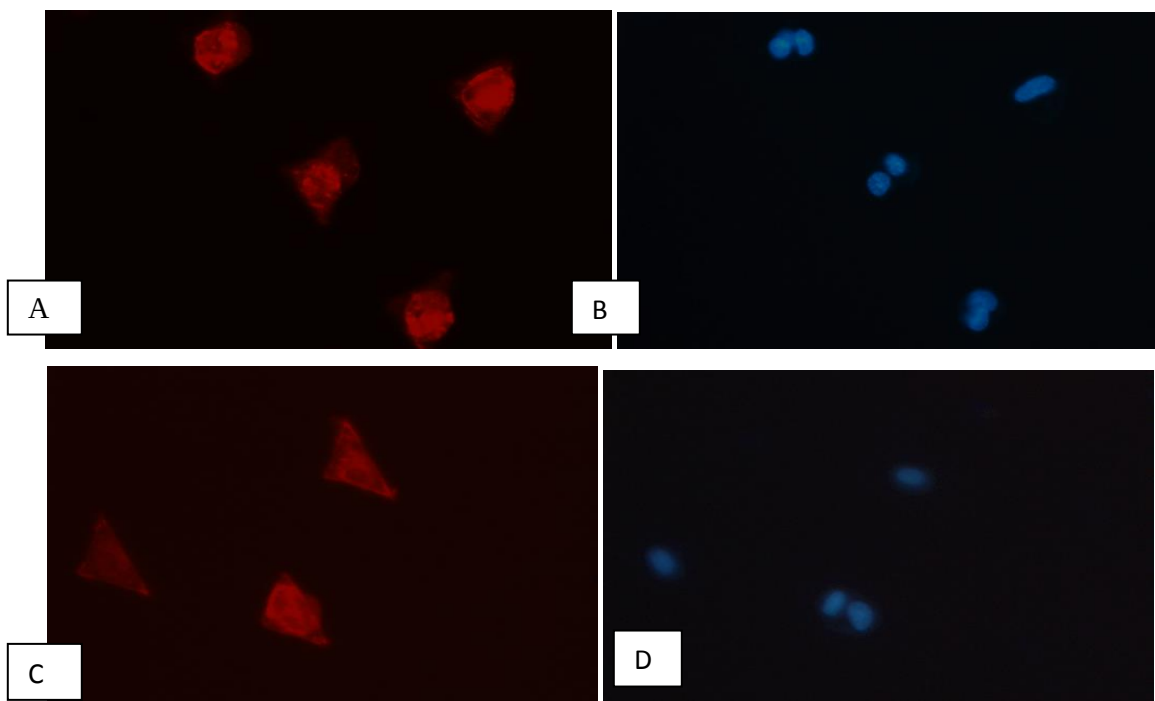
Toliau vertiname kaip ELP sąveikia su Fn mikrosubstratu veikia viduląstelinio baltymo – vinkulino organizaciją (22 pav.). Iš gautų vaizdų matome, kad tiriamas citoskeleto baltymas organizuojasi išilgai visos ląstelės. Be to, po ilgesnio tyrimo laiko (48-72 val.) pastebėjome, kad ant tokių substratų augančios ląstelės, nelikus joms vietos ant Fn juostų, pradeda formuoti tiltelius tarp gretimų juostelių (duomenys nepateikiami).



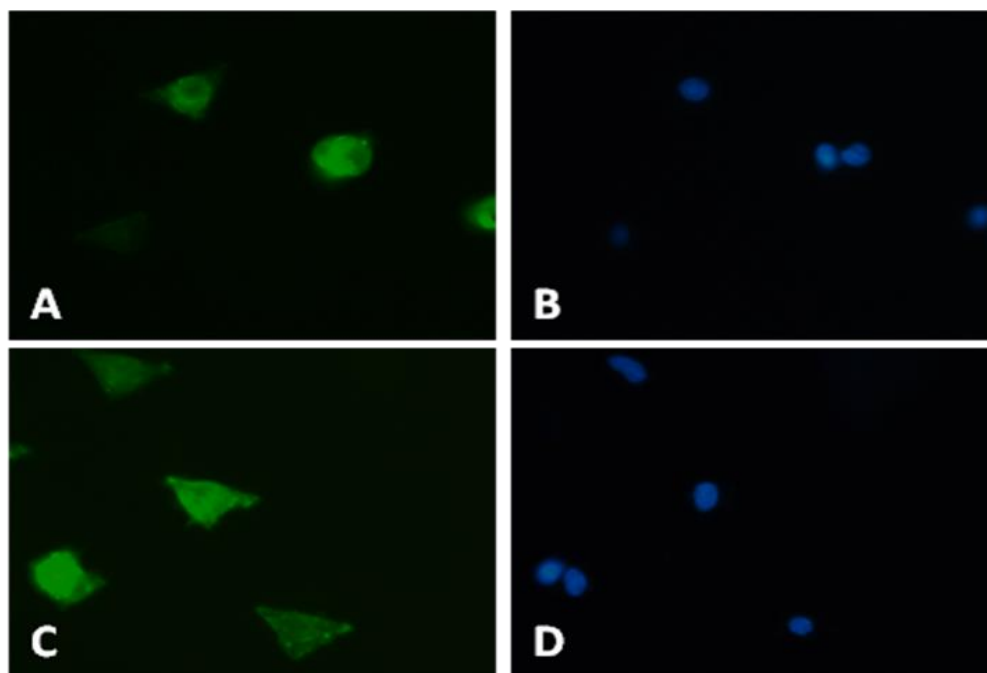
22 pav. Vinkulino raiška ELP ląstelėse (A), augančiose ant Fn mikrosubstratų. B – DAPI dažyti ląstelių branduoliai. Analizuota imunofluorocitocheminiu metodu. Nuotraukos darytos fluorescentiniu mikroskopu Olympus IX51.

3.4.2. Oksidacinio streso poveikis ELP ląstelių sąveikai su saleles sudarančiais mikrosubstratais.

Literatūroje yra aprašyta nemažai eksperimentų, kuriuose buvo tirta ląstelių sąveika su įvairios formos mikrosubstratais. Šiame darbe mes trikampio formos Fn saleles naudojome oksidacinio streso poveikiui ELP ląstelių sąveikai su mikrosubstratais įvertinti. ELP ląstelių sąveika buvo tiriama ant mikrosubstratų prilipusias ląsteles purtant. Purtymai buvo atlikti esant terpėje H_2O_2 ir be jo. Šiuo atveju buvo naudota tokia H_2O_2 koncentracija, kuri stabdė ląstelių dauginimąsi, bet neindukavo jų žūties t.y. $50 \mu M$. Gauti duomenys pateikiami 23 ir 24 paveiksluose.



23 pav. ELP ląstelių sąveika su Fn salelių mikrosubstratais prieš purtymą. A, B – ląstelės neveiktos H_2O_2 . C, D – ląstelės veiktos $50 \mu M$ H_2O_2 . Vizualizacijai naudoti antikūnai prieš vinkuliną konjuguoti su Cy3, papildomai ląstelės vaizdintos jų branduolius pažymėjus DAPI. Fotografuota fluorescenciniu mikroskopu Olympus IX51.



24 pav. ELP ląstelių sąveika su Fn salelių mikrosubstratais po purtymo. A, B – ląstelės neveiktos H_2O_2 . C, D – ląstelės veiktos $50 \mu M H_2O_2$. Vizualizacijai naudoti antikūnai prieš vinkuliną konjuguoti su Cy3, papildomai ląstelės vaizdintos jų branduolius pažymėjus DAPI. Fotografuota fluorescenciniu mikroskopu Olympus IX51.

Įdomu tai, kad kokybiškai vertinant purtymas neveikė ELP ląstelių adhezijos ant Fn mikrosubstratų. Tam įtakos neturėjo ir vandenilio peroksidas, tačiau H_2O_2 paskatino ląstelės citoskeleto baltymo vinkulino tvarkingą organizaciją (23 ir 24 pav., C). Purtymas šiai vinkulino organizacijai jokios įtakos neturėjo.

3.5. Rezultatų apibendrinimas

Paskutinį dešimtmetį ypatingai daug tyrimų atlikta tiriant endotelinų ląstelių-pirmtakių biologiją, jų gebėjimus atstatyti pažeistus audinius, sergant širdies ir kraujagyslių ligomis. Dauguma šių tyrimų atlikta pasitelkus *in vitro* oksidacinio streso modelius, naudojant skirtingus oksidacinio streso iniciatorius, nes būtent oksidacinis stresas kyla uždegimo metu. Jis yra pagrindinė endotelinų ląstelių-pirmtakių žūties priežastis.

Šiame darbe buvo tiriamos kraujagyslių kilmės endotelinės ląstelės-pirmtakės, išskirtos iš žiurkės plautinio kamieno. Tyrimų eigoje, mes jas charakterizavome, įvertinome proliferacinį aktyvumą. Įdomu tai, kad mūsų gauta ELP kultūra yra ilgalaikė, o jos proliferacinis potencialas nemažėja.

Norėdami suprasti, kaip uždegiminiai procesai ir jų pasėkoje susidaręs oksidacinis stresas, veikia ELP proliferaciją ir žūtį, tyrėme šių ląstelių atsparumą įvairioms vandenilio peroksido koncentracijoms. Nustatėme, kad 50 μM H_2O_2 stabdė ELP ląstelių proliferaciją, o koncentracijos nuo 100 μM inicijavo jų žūtį. Žūties pobūdis buvo vertinamas diferencijuotai dažant ląsteles AO/EB. Mūsų tyrimai parodė, kad ELP žūties rūšis priklauso nuo H_2O_2 poveikio laiko. Ilgesnis poveikis skatino ELP žūtį nekrozės būdu ir greitą žuvusių ląstelių suirimą. Trumpesnis 3 ir 6 val. H_2O_2 poveikis lėmė ląstelių žūtį apoptozės būdu. Šie duomenys koreliavo su Akt kinazės fosforilinimo/aktyvinimo duomenis.

Siekiant įvertinti PI3K/Akt signalinio kelio vaidmenį ELP ląstelėse oksidacinio streso metu gavome genetiškai modifikuotas ląstelių linijas su padidinta Akt baltymo raiška. Papildomi tyrimai buvo atlikti naudojant minėto signalinio kelio inhibitorius. Duomenys gauti šių tyrimų metu leidžia daryti išvadą, kad Akt signalinė molekulė yra labai svarbi ELP išgyvenimui oksidacinio streso sąlygomis.

Pastaruoju metu vis intensyviau ląstelių funkcinės ir struktūrinės savybės tiriamos panaudojant įvairius mikrosubstratus. Šiame darbe mes tyrėme, kaip veikia ELP ląstelių adheziją ir atsparumą oksidaciniam stresui jų sąveika su mikrosubstratais, pagamintais iš tarpląstelinio užpildo baltymo – fibronektino. Mūsų gauti duomenys parodė, kad ląstelės puikiai limpa prie Fn mikrosubstrato, ši sąveika neveikia jų gyvybingumo. Be to, šios sąveikos stiprumui H_2O_2 koncentracija, stabdanti ląstelių dauginimąsi, įtakos neturėjo. Pastebėta, kad švelnus oksidacinis stresas paskatino tvarkingą baltymo vinkulino organizaciją. Tikėtina, kad ELP ląstelių sąveika su tarpląstelinio užpildo baltymais galėtų pagerinti šių ląstelių išgyvenimo galimybes organizme oksidacinio streso sąlygomis.

IŠVADOS

- 50 μM H_2O_2 koncentracija stabdo endotelinių ląstelių-pirmtakių proliferaciją, o 100 μM koncentracija ne tik slopina ląstelių dauginimąsi, bet ir skatina jų žūtį, tačiau ląstelių žūties pobūdis priklauso nuo vandenilio peroksido poveikio trukmės.
- Trumpalaikis Akt baltymo aktyvinimo/fosforilavimo sumažėjimas koreliuoja su endotelinių ląstelių žūtimi apoptozės būdu.
- Akt kelio specifiniai inhibitoriai slopina endotelinių ląstelių-pirmtakių proliferaciją ir skatina jų žūtį oksidacinio streso metu. Genetiškai modifikuotos ląstelės su padidinta Akt raiška atsparesnės vandenilio peroksido poveikiui. Taigi, Akt kinazė yra svarbi endotelinių ląstelių išgyvenimui oksidacinio streso sąlygomis.
- Vandenilio peroksidas didina baltymo vinkulino organizaciją endotelinėse ląstelėse-pirmtakėse, augančiose ant fibronektino mikrosubstratų.

Julija Mackevič

.....

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alon T., Hemo I., Itin A., Peter J., Stone J., Keshet E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*.1: 1024–1028.
2. Anderson E.J., Hinds M. 2011. Endothelial cell micropatterning: methods, effects and applications. *Ann Biomed Eng*. 9: 2329-2345.
3. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., Van der Zee R., Li T., Witzenbitcheler B., Schatteman G., Isner J.M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967.
4. Brodbeck D., Cron P., Hemmings B.A. 1999. A human protein kinase B γ with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*. 274: 9133–136.
5. Brooks P.C., Clark R.A., Chersesh D.A. 1994. Requirement of vascular integrin for angiogenesis. *Science*. 264: 569–571.
6. Brown M. R., Miller F. J., Li W. G., Ellingson A. N., Mozena J. D., Chatterjee P., Engelhardt J. F., Zwacka R. M., Oberley L. W., Fang X., Spector A. A., Weintraub N. L. 1999. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85: 524-33.
7. Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857–868.
8. Cai H., Griendling K. K., Harrison D. G. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Tr Pharm Scien* 24: 471-8.
9. Cai H., Harrison D. G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844.
10. Cai H., Li Z., Davis M. E., Kanner W., Harrison D. G., Dudley S. C. Jr. 2003. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharm* 63: 325-31.
11. Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389–395.

12. Chua C.C., Hamdy R.C., Chua B.H. 1999. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 25:891–7.
13. Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 2905–2927.
14. Davis M. E., Grumbach I. M., Fukai T., Cutchins A., Harrison D. G. 2004. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 279: 163-8.
15. Di Canio, C., Lamponi S., Barbucci R. 2010. Spiral and square microstructured surfaces: the effect of the decreasing size of photo-immobilized hyaluronan domains on cell growth. *J. Biomed. Mater. Res.* 92: 276–284.
16. Dike L. E., Chen C. S., Mrksich M., Tien J., Whitesides G. M., Ingber D. E. 1999. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35: 441–448.
17. Dimmeler S., Assmus B., Hermann C., Haendeler J., Zeiher A.M. 1998. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res.* 83 :334–341.
18. Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10: 262–267.
19. Eliceiri B.P. 2001. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res.* 89: 1104–1110.
20. Flusberg, D. A., Numaguchi Y., Ingber D. E. 2001. Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 12: 3087–3094.
21. Franke T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R., Tsichlis P.N. 1995. The protein kinase encoded by the Akt protooncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* 81: 727–736.
22. Garcia J.G., Liu F., Verin A.D., Birukova A., Dechert M.A., Gerthoffer W.T., Bamberg J.R., English D. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest.* 108: 689–701.
23. Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway: requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 273: 30336–30343.

24. Giancotti F.G., Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science*. 285: 1028–1032.
25. Griffith T. M. 2002. Endothelial control of vascular tone by nitric oxide and gap junctions: a haemodynamic perspective. *Biol* 39: 307-18.
26. Gulden C. U., Aubin H., Ahari A.F., Bae H., Nichol J.W., Khademhosseini A. 2010. Surface-modified hyaluronic acid hydrogels to capture endothelial progenitor cells. *Soft Matter*. 21:20- 42.
27. Hafezi-Moghadam A., Simoncini T., Yang E., Limbourg F.P., Plumier J.C., Rebsamen M.C., Hsieh C.M., Chui D.S., Thomas K.L., Prorock A.J., Laubach V.E., Moskowitz M.A., French B.A., Ley K., Liao J.K. 2002. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 8: 473–479.
28. Halliwell, B., Clement M. V., Long L. H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486: 10-3.
29. Harraz M., Jiao C., Hanlon H.D., HArdley R.S., Schateman G.C. 2001. CD 34- blood – derived human endothelial cells progenetors. *Stem cells* 10: 304-312.
30. Harrison D., Griendling K. K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H. 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91: 7-11.
31. Heissing B., Hattori k., Dias S., Friedrich M., Ferris B., Hackett N. R., Crystal R. G., Besmer P., Lyden D., Moore M.A., Werb Z., Rafii S. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 109: 625-637.
32. Higuchi M., Masuyama N., Fukui Y., Suzuki A., Gotoh Y. 2001. Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor–stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells. *Curr Biol*. 11: 1958–1962.
33. Hristov M., Erl W., Weber P.C. 2003. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arter. Thromb. And Vasc. Biol*. 23: 1185-1189.
34. 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.
35. Hung Y. C., Sava V. M., Blagodarsky V. A., Hong M. Y., Huang G. S. 2003. Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury. *Lif Scien*. 72: 1061–1071.
36. Hwang J., Saha A., Boo Y. C., Sorescu G. P., McNally J. S., Holland S. M., Dikalov S., Giddens D., Griendling K. K., Harrison D. G., Jo H. 2003. Oscillatory shear stress stimulates

endothelial production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J Biol Chem* 278: 47291-8.

37. Yamaguchi K., Higashiura K., Ura N., Murakami H., Hyakukoku M., Furuhashi M., Shimamoto K. 2003. The effect of tumor necrosis factor- α on tissue specificity and selectivity to insulin signaling. *Hypertens Res* 26: 389-96.

Yang B., Tin O., Rizzo V. 2006. Lipid rafts mediate H₂O₂ prosurvival effects in cultured endothelial cells. *Faseb J* 20: 1501-1503.

38. Yao E. H., Yu Y., Fukuda N. 2006. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotech.* 7: 101–108.

39. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-parada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweys J., Kearney J., Buck D.W. 1997. AC133 , A novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012.

40. Jang K., Sato K., Tanaka Y., Xu Y., Sato M., Nakajima T., Mawatari K., Konno T., Ishihara K., Kitamori T. 2010. An efficient surface modification using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine to control cell attachment via photochemical reaction in a microchannel. *Lab Chip* 10: 1937–1945.

41. Jiang, X., Takayama S., Qian X., Ostuni E., Wu H., Bowden N., LeDuc P., Ingber D. E., Whitesides G. M. 2002. Controlling mammalian cell spreading and cytoskeletal arrangement with conveniently fabricated continuous wavy features on poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* 18:3273–3280.

42. Kam, L., Boxer S. G. 2001. Cell adhesion to protein-micropatterned-supported lipid bilayer membranes. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 487–495.

43. Kao S. T., Yeh C. C., Hsieh C. C. 2001. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G₀/G₁ arrest. *Lif Scienc.* 69: 1485–1496.

44. Klotz L.O., Schieke S.M., Sies H., Holbrook N.J. 2000. Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem J* 352 : 219–225.

45. Kofron, C. M., Hoffman-Kim D. 2009. Optimization by response surface methodology of confluent and aligned cellular monolayers for nerve guidance. *Cell. Mol. Bioeng.* 2: 554–572.

46. Kolka C., Mamda H., Takahashi T., Gordon R., Tepper O., Gravereaux E., Pieczek A., Iwaguro H., Hayashi S.T., Isner J.M., Asahara T. 2000. Vascular endothelial growth factors 165

- gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ. Res.* Vol: 1198-1202.
47. Kwon T., Kwon D.Y., Chun J., Kim J.H., Kang S.S. 2000. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem.* 275: 423–428.
 48. Landmesser U., Dikalov S., Price S. R., McCann L., Fukai T., Holland S. M., Mitch W. E., Harrison D. G. 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111: 1201-9.
 49. Lassegue B., Clempus R. E. 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: 277-97.
 50. Lauffenburger D.A., Horwitz A.F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84: 359–369.
 51. Li W. G., Miller F. J., Zhang H. J., Spitz D. R., Oberley L. W., Weintraub N. L. 2001. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 276: 29251-6.
 52. Li Z., Jiang H., Xie W., Zhang Z., Smrcka A.V., Wu D. 2000. Roles of PLC- β_2 and - β_3 and PI3K in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science.* 287:1046–1049.
 53. Liu J. T., Chen Y. L., Chen W. C. 2012. Role of pigment epithelium-derived factor in stem/progenitor cell-associated neovascularization. *J Biom Biotech* 2012:871-892.
 54. Martindale J. L., Holbrook N. J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192: 1–15.
 55. Meili R., Ellsworth C., Lee S., Reddy T.B., Ma H., Firtel R.A. 1999. Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium. *EMBO J.* 18: 2092–2105.
 56. Mercille S., Massie B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient – deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotech. and bioeng.* 9: 1140 – 1154.
 57. Muller S., Konig I., Meyer W., Kojda G. 2004. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. *J Am Coll Cardiol* **44**: 624-31.
 58. Muth C.M., Glenz I., Klaus M., Radermacher P., Speit G., Leveroe X. 2004. Influence of an orally effective SOD on hyperbaric oxygen – related cell damages. *Free radical Res.* 3: 927-938.
 59. Nishikawa S. I. 2001. A complex linkage in the developmental pathway of endothelial and hemopoietic cells. *Curr. Opin Cell. Biol.* 13: 673-678.

60. Niwa K., Inanami O., Yamamori T., Ohta T., Hamasu T., Karino T., Kuwabara M. 2002. Roles of protein kinase C delta in the accumulation of P53 and the induction of apoptosis in H₂O₂-treated bovine endothelial cells. *Free Radic Res* 36: 1147-53.
61. Quirici N., Soligo D., Caneva L., Servida F., Bosolasco P., Delilors G.L. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ cell. *Br. J. Haematol* 115: 186-194.
62. Ruiz-Gines J.A., Lopez-Ongil S., Gonzalez-Rubio M., Gonzalez- Santiago L., Rodriguez-Puyol M., Rodriguez-Puyol D. 2000. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 35:109– 13.
63. Schatteman G. C., Hanlon H. D., Jiao C., Dodds S. G., Christy B. A. 2000. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Investig.* 106: 571–578.
64. Schmeisser A., Gerlichs R.D., Zhang H., Schafi S., Graffy C., Ludwig J., strasser R.H. Daniel W.G. 2001. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord – like structures and matrigel under angionic condition. *Cardiovasc. Res.* 40: 671-680.
65. Seglen P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. in cell biol.* 13: 29 – 83.
66. Shah O.J., Anthony J.C., Kimball S.R., Jefferson L.S. 2000. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am J Physiol.* 279: 715–729.
67. Shiojima I., Walsh K. 2002. Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243-1250.
68. Sonoda Y., Watanabe S., Matsumoto Y., Aizu-Yokota E., Kasahara T. 1999. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem* 274: 10566–10570.
69. Thomas S. R., Chen K., Keaney J. F. 2002. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 277: 6017-24.
70. Thum T., Fraccarollo D., Galuppo P. 2006. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 70: 50–60.
71. Torsney E., Hu Y., Xu Q. 2005. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. *Tr in Cardiovasc. Med.* 15: 64–68.
72. Tousoulis D., Andreou I., Antoniadis C., Tentolouris C., Stefanadis C. 2008. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atheroscl.* 201: 236–247.

73. Uttayarat, P., Toworfe G. K., Dietrich F., Lelkes P. I., Composto R. J. 2005. Topographic guidance of endothelial cells on silicone surfaces with micro- to nanogrooves: orientation of actin filaments and focal adhesions. *J. Biomed. Mater. Res.* 75: 668–680.
74. Vartanian K. B., Kirkpatrick S. J., McCarty O. J., Vu T. Q., Hanson S. R., Hinds M. T. 2009. Distinct extracellular matrix microenvironments of progenitor and carotid endothelial cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 91:528–539,.
75. Wang X., McCullough K. D., Franke T. F., Holbrook, N. J. 2000. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* 275: 14624–14631
76. Wang X., Martindale J.L., Holbrook N.J. 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275: 39435–39443.
77. Wolin M. S., Gupte S. A., Oeckler R. A. 2002. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 39: 191-207.
78. Wu, C. C., Li Y. S., Haga J. H., Kaunas R., Chiu J. J., Su F. C., Usami S., and Chien S. 2007. Directional shear flow and Rho activation prevent the endothelial cell apoptosis induced by micropatterned anisotropic geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1254–1259.
79. Zanetti M., Katusic Z. S., O'Brien T. 2002. Adenoviral-mediated overexpression of catalase inhibits endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2620-6.

PADĖKA

Noriu padėkoti visiems Vilniaus Universiteto, Biochemijos instituto, Biologinių modelių skyriaus bei jungtinės VGTU ir VU Ląstelių technologijos laboratorijos darbuotojams, o ypatingai dr. Virginijai Bukelskienei ir Evaldui Balčiūnui už begalinę pagalbą įsisavinant darbo metodus ir gerus patarimus.

Labiausiai norėčiau padėkoti savo magistrinio darbo vadovei dr. Daivai Baltriukienei už didžiausią pagalbą planuojant eksperimentus ir ruošiant baigiamąjį darbą, išsakytas vertingas pastabas, patarimus, palaikymą ir motyvaciją.

Darbas parengtas, dalyvaujant projekte pagal 2007–2013 m. žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos 3 prioriteto „Tyrėjų gebėjimų stiprinimas“ VP1-3.1-ŠMM-08-K priemonę „Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros veiklą vykdymas pagal Nacionalinių kompleksinių programų tematikas“ „**Biokatalizatorių, rekombinantinių baltymų ir ląstelių technologijos**“ Nr. VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-001.