



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Jaroslav Burinskij

**ENDOTELINIŲ LĄSTELIŲ PIRMTAKIŲ, GAUTŲ IŠ SKIRTINGŲ
ŠALTINIŲ, SAVYBIŲ PALYGINIMAS
ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS DERIVED FROM DIFFERENT
SOURCES: COMPARISON OF FEATURES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologija studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2014

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Vardas, Pavardė)

(Data)

Jaroslav Burinskij

**ENDOTELINIŲ LĄSTELIŲ PIRMTAKIŲ, GAUTŲ IŠ SKIRTINGŲ
ŠALTINIŲ, SAVYBIŲ PALYGINIMAS**
**ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS DERIVED FROM DIFFERENT
SOURCES: COMPARISON OF FEATURES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologija studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

dr. Daiva Baltriukienė

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



(Parašas)

2014-06-04

(Data)

Konsultantas

dr. Evaldas Liutkevičius

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



(Parašas)

2014-06-06

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

doc. dr. Angelė Kaulakienė

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



(Parašas)

2014-06-06

(Data)

Vilnius, 2014

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos baigiamasis darbas
Pavadinimas: **Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, savybių palyginimas**

Autorius: **Jaroslav Burinskij**

Vadovas: **dr. Daiva Baltriukienė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Endotelinės ląstelės pirmtakės – nedidelė ląstelių populiacija, esanti žinduolių organizme, svarbi kraujagyslių atstatymo ir formavimo procesuose. Įvykus kraujagyslių pažeidimai, pažeidimo vietoje inicijuojami uždegiminiai procesai, kurių metu susidaro reaktyvios deguonies formos, neigiamai veikiančios endotelinių ląstelių funkcijas. Siekiant išsiaiškinti oksidacinio streso poveikį minėtoms ląstelėms, buvo lyginamos skirtingų šaltinių – kraujagyslių kilmės ir virkštelės kraujo endotelinės ląstelės, jų savybės bei atsakas į oksidacinį stresą. Buvo įvertintas šių ląstelių proliferacinis potencialas bei miogenine, adipogenine ir osteogenine kryptimis diferenciacijos galimybės. Vertinant oksidacinio streso įtaką endotelinių ląstelių pirmtakių funkcijoms, nustatytas neigiamas jo poveikis abiejų ląstelių linijų gebėjimui migruoti ir atstatyti pažeidą. PI3K/Akt signalinis kelias yra vienas pagrindinių signalinių kelių, atsakingų už ląstelės išgyvenimą nepalankiomis sąlygomis. Darbo metu nustatyta, kad padidinta Akt raiška pagerino kraujagyslių kilmės endotelinių ląstelių pirmtakių migracines savybes, tačiau neturėjo įtakos jų sąveikai su mikrosubstratais oksidacinio streso metu.

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

Darbo apimtis: 47 p. teksto be priedų, 24 iliustr., 2 lent., 61 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: endotelinės ląstelės pirmtakės; oksidacinis stresas; proliferacija; diferenciacija; Akt kinazė; mikrosubstratai; migracija.

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

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

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Final Thesis 4
Title: **Endothelial progenitor cells derived from different sources: comparison of features**

Author: **Jaroslav Burinskij**

Academic supervisor: **dr. Daiva Baltriukienė**

Thesis language

☒ X Lithuanian
☐ Foreign (English)

Annotation

Endothelial progenitor cells (EPC) is a small population of cells found in the mammals. They play an important role in the blood vessel regeneration and maintenance. However, inflammation caused by vascular injury results in the production of reactive oxygen species which have negative effect on EPC functions. To evaluate the impact of oxidative stress on EPCs, blood vessel-associated and umbilical cord-derived endothelial progenitor cell lines were established. The proliferation potential and differentiation towards myogenic, adipogenic and osteogenic lineages were compared. The data obtained showed the decreased migration rate of cells exposed to the oxidative stress. As PI3K/Akt signaling pathway promote cell survival under adverse circumstances, we have established genetically modified EPC cells overexpressing Akt. Increased expression of Akt improved EPC migration but did not affect their interaction with micropatterns under oxidative stress.

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

The thesis contains 47 p. text without appendixes, 24 pictures, 2 tables, 61 references.

Keywords: endothelial progenitor cells; oxidative stress; proliferation; differentiation; Akt kinase; microsubstrate; migration.

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

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Jaroslav Burinskij, 20083888

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-12

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2014 m. birželio 3 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, savybių palyginimas“ patvirtintas 2013 m. spalio 24 d. dekanų potvarkiu Nr. 361fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: dr. Evaldas Liutkevičius. 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).

(Parašas)

Jaroslav Burinskij

(Vardas ir Pavardė)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologija studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.

Vilnius

Studentui (ei) Jaroslav Burinskij

Baigiamojo darbo (projekto) tema: Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, savybių palyginimas

patvirtinta 2013 m. spalio 24 d. dekanu potvarkiu Nr. 361fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2014 m. birželio 2 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

- Gauti ir charakterizuoti kraujagyslių kilmės bei virkštelės kraujo endotelines ląsteles pirmtakes;
- Įvertinti gautų ląstelių diferenciacijos potencialą miogeninę, osteogeninę ir adipogeninę linkmę;
- Palyginti skirtingos kilmės endotelinių ląstelių pirmtakių migracijos potencialą oksidacinio streso sąlygomis;
- Gauti genetiškai modifikuotas endotelines ląsteles pirmtakes su padidinta Akt raiška ir įvertinti šių ląstelių migraciją bei jų sąveiką su mikrosubstratais oksidacinio streso metu.

Baigiamojo magistro darbo (projekto) konsultantai: dr. Evaldas Liutkevičius

Vadovas: dr. Daiva Baltriukienė



(Parašas)

Užduotį gavau: Jaroslav Burinskij



(Vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Turinys

IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1. Endotelinės ląstelės pirmtakės	11
1.2. EPC paviršiaus žymenys	13
1.3. Ląstelių adhezija	14
1.3.1. Ląstelės adhezijos molekulės.....	14
1.3.2. Ląstelių adhezijos molekulių vaidmuo ląstelių diferenciacijoje ir proliferacijoje ..	16
1.4. Ląstelės migracija	18
1.4.1. Migracijos ciklas	18
1.4.2. Lamelipodijų ir filopodijų struktūra	18
1.5. EPC mobilizacija ir migracija	19
1.6. Diferenciacija.....	21
1.6.1. Miogeninė diferenciacija	22
1.6.2. Osteogeninė diferenciacija	22
1.6.3. Adipogeninė diferenciacija.....	22
1.7. Proliferacija.....	23
1.8. Oksidacinis stresas	24
1.8.1. Ląstelių apsaugos mechanizmai oksidacinio streso metu	24
1.8.1.1. Antioksidaciniai fermentai.....	24
1.8.1.2. Molekulių gaudyklės arba mažos molekulinės masės laisvųjų radikalų gaudyklės	25
1.8.1.3. Mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės (MAPK)	25
1.8.1.4. PI3K/Akt signalinė kaskada.....	26
1.8.2. Oksidacinio streso poveikis endotelinėms ląstelėms pirmtakėms	27
1.8.3. Vandenilio peroksido produkcija ir metabolizmas	28
1.8.4. Vandenilio peroksido poveikis endotelinėms ląstelėms	28
2. MEDŽIAGOS. METODAI. APARATŪRA.....	30
2.1. Medžiagos.....	30
2.2. Aparatūra	30
2.3. Tyrimų metodai.....	31
2.3.1. Ląstelių išskyrimas	31
2.3.1.1. Vienbranduolių ląstelių išskyrimas iš virkštelės kraujo ir kaulų čiulpų	31
2.3.1.2. Magnetinis EPC ląstelių išskyrimo metodas	31
2.3.2. EPC ląstelių išskyrimas iš kraujagyslių.....	32
2.3.3. Ląstelių auginimas <i>in vitro</i>	32
2.3.4. EPC ląstelių charakterizavimas tėkmės citometrijos metodu.....	32
2.3.5. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo vertinimas	32
2.3.6. Ląstelių dydžio vertinimas.....	33
2.3.7. Ląstelių proliferacijos vertinimas	33
2.3.8. Ląstelių diferenciacijos indukcija ir vertinimas	33
2.3.8.1. Miogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas	33
2.3.8.2. Osteogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas	34
2.3.8.3. Adipogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas.....	34
2.3.9. Ląstelių migracijos vertinimas	34
2.3.10. Ląstelių su padidinta Akt raiška gavimas	35
2.3.11. Baltymų elektroforezė ir imunoblotingas	35
2.3.11.1. Ląstelių lizavimas.....	35
2.3.11.2. Baltymų elektroforezė	35
2.3.11.3. Imunoblotingas.....	36
2.3.12. Imunofluocitochemija	36

2.3.13.	Mikrosubstratų paruošimas	37
2.3.14.	Ląstelių sąveikos su mikrosubstratais vertinimas	37
2.3.15.	Statistinė duomenų analizė	37
3.	DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	38
3.1.	Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, charakterizavimas	38
3.2.	Diferenciacijos potencialo palyginimas	41
3.2.1.	Diferenciacija riebalinio audinio formavimosi kryptimi	41
3.2.2.	Diferenciacija kaulinio audinio formavimosi kryptimi	43
3.2.3.	Diferenciacija raumeninio audinio formavimo kryptimi	44
3.3.	Oksidacinio streso poveikio endotelinių ląstelių pirmtakių migracijai tyrimas	45
3.3.1.	PKEL ir VKEL ląstelių migracija	45
3.3.2.	Akt vaidmuo ląstelių migracijos metu, veikiant oksidaciniam stresui	48
3.4.	Endotelinių ląstelių pirmtakių sąveikos su mikropaviršiais tyrimas	50
3.4.1.	Akt vaidmuo PKEL ląstelių sąveikos su mikrosubstratais metu	52
3.5.	Rezultatų aptarimas	54
	IŠVADOS	57
	LITERATŪRA	58
	PRIEDAI	64
	Padėka	68

IVADAS

Endotelinės ląstelės pirmtakės (EPC, angl. *endothelial progenitor cells*) - tai nedidelė kaulų čiulpuose, virkštelės ir periferiniame kraujyje bei kraujagyslėse esanti ląstelių populiacija. Pastaraisiais metais tokios ląstelės jau yra aptiktos ir kituose audiniuose bei organuose, pavyzdžiui, plaučiuose, blužnyje ir kt. Įvykus endotelio pažeidimams arba sergant išemija, ateroskleroze, hipertenzija, šios ląstelės dalyvauja kraujagyslių audinio atstatyme. Būtent ši EPC savybė lėmė tyrėjų susidomėjimą jomis. Šiuo metu jau yra sukaupta duomenų apie galimą EPC terapinį panaudojimą širdies ir kraujagyslių ligų gydymui. Be to EPC gali būti naudojamos ir kaip biožymenys, vertinant širdies ir kraujagyslių ligų riziką bei vystymąsi. Be širdies ligų gydymo, EPC gali būti panaudojamos ir kitose srityse. Viena jų – medicininių įrankių (pvz., stentų) gamyba. Nustatyta, kad stentus padengus CD34 antikūnais yra pritraukiamos EPC, kurios dalyvauja atstatant endotelio funkcijas. Chandrasekhar ir kt. (2011) nustatė, kad kraujagyslių kilmės EPC gali stimuliuoti kaulinio audinio regeneraciją, aktyvindamos angiogenezę ir osteogenezę.

EPC pasižymi didesniu atsparumu oksidaciniam stresui. Tai padidina jų išgyvenimo galimybes uždegiminiame židinyje ir lemia gebėjimą efektyviai dalyvauti pažeisto kraujagyslių audinio atstatyme. Tačiau reaktyvių deguonies darinių (ROS, angl. *reactive oxygen species*), susidarančių uždegiminiame židinyje poveikis visgi neigiamai veikia EPC funkcijas ir mobilizaciją, taip pat gali skatinti ląstelių žūtį apoptozės būdu. Remiantis literatūros šaltiniais galima teigti, kad skirtingų linijų EPC gali skirtingai reaguoti į oksidacinį stresą. Pavyzdžiui, nustatyta, kad cirkuliuojančios periferiniame kraujyje EPC yra jautresnės ROS poveikiui už virkštelės kraujo EPC [Case et al., 2008].

Ląstelėms atsakant į stresą – aktyvinami įvairūs signaliniai keliai, reguliuojantys ląstelės išgyvenimą ar žūtį. PI3K/Akt signalinis kelias yra vienas pagrindinių signalinių kelių, atsakingu už ląstelės išgyvenimą nepalankiomis sąlygomis. Be to, šis signalinis kelias reguliuoja ląstelės adhezijos, proliferacijos, migracijos, diferenciacijos procesus ypatingai svarbius audinių regeneracijos metu. Tikėtina, kad šių signalinių molekulių raiškos padidinimas gali pagerinti EPC funkcinės savybės.

Darbo tikslas – palyginti skirtingų šaltinių endotelinių ląstelių pirmtakių savybes.

Darbo uždaviniai:

- Gauti ir charakterizuoti kraujagyslių kilmės bei virkštelės kraujo endotelines ląsteles pirmtakes;
- Įvertinti gautų ląstelių diferenciacijos potencialą miogenine, osteogenine ir

adipogenine linkme;

- Palyginti skirtingos kilmės endotelinių ląstelių pirmtakių migracijos potencialą oksidacinio streso sąlygomis;
- Gauti genetiškai modifikuotas endotelines ląsteles pirmtakes su padidinta Akt raiška ir įvertinti šių ląstelių migraciją bei jų sąveiką su mikrosubstratais oksidacinio streso metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Endotelinės ląstelės pirmtakės

Endotelinės ląstelės sudaro vientisą sluoksnį – endotelį, kuris dengia vidinį kraujagyslių ir limfmazgių paviršių, pastoviai kontaktuojantį su kraujyje/limfoje cirkuliuojančiomis ląstelėmis [Félétou, 2011]. Endotelinės ląstelės svarbios kraujagyslių homeostazėje ir įvairių ligų raidoje. Apie kraujagyslių atsinaujinimą buvo žinoma, tačiau tik pritaikius naujausias technologijas pavyko identifikuoti nepilnos diferenciacijos endotelines ląsteles pirmtakes (EPC, angl. *endothelial progenitor cells*) dalyvaujančias šiame procese [Hirschi et al., 2008].

Paprastai organizme nepilnos diferenciacijos ląstelės yra ramybės būsenos ir glūdi specialiose kamieninių ląstelių nišose. Gavusi signalą, tokia nepilnos diferenciacijos ląstelė, prieš virsdama pilnai diferencijuota ląstele, duoda pradžią vienai arba daugiau nepilnos diferenciacijos ląstelėms, t.y. kamieninėms ląstelėms yra būdingą „savęs atgaminimą“. Tokios ląstelės geba daugintis ir palaikyti savo populiacijos dydį [Schattelman et al., 2007].

Pirmą kartą EPC, išskirtas iš periferinio kraujo, 1997 m. aprašė Asahara su kolegomis. Gana greitai buvo parodytas terapinis šių ląstelių potencialas. Tai suteikė postūmį intensyviems tokių ląstelių tyrimams [Félétou, 2011]. Netrukus buvo įrodyta, kad EPC gali būti išskiriamos ne tik iš periferinio kraujo. Šiuo metu pagrindiniai tokių ląstelių šaltiniai yra virkštelės kraujas, periferinis kraujas ir kaulų čiulpai (KČ) [Dzau et al., 2005].

Yra išskiriamos dvi endotelių ląstelių grupės: hematopoetinės ir nehematopoetinės kilmės EPC. Hematopoetinės kilmės endotelinės ląstelės yra kilusios iš kaulų čiulpų hemangioblastų pirmtakų. Jos pasižymi hematopoetinėms ląstelėms būdingu fenotipu ir paviršiniais žymenimis, todėl jas yra sunku atskirti nuo hematopoetinių ląstelių. Cirkuliojančios periferiniame kraujyje endotelinės ląstelės pirmtakės yra giminingos hematopoetinėms EPC, todėl tokių ląstelių charakterizavimas ir identifikavimas taip pat yra panašus [Asahara et al., 2011].

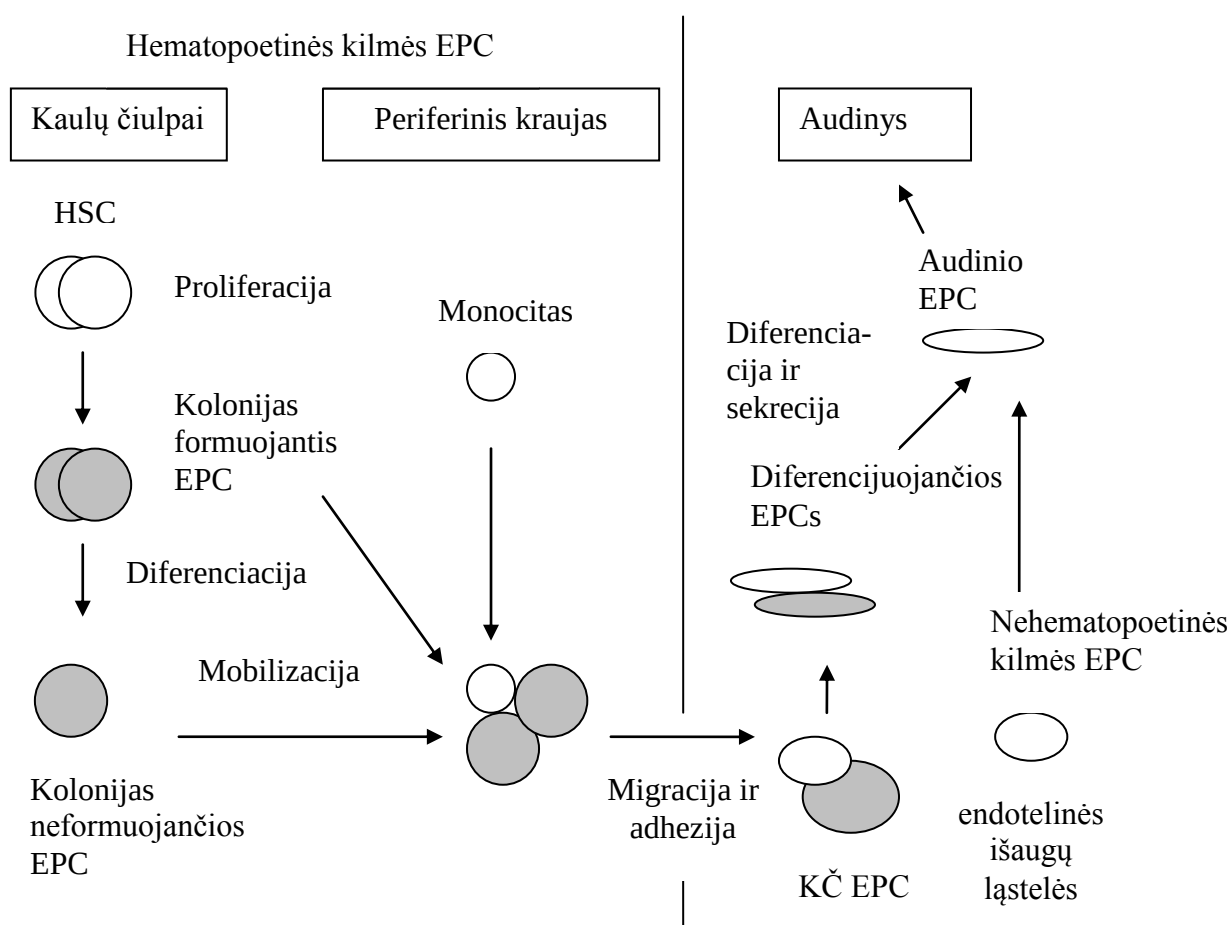
Nehematopoetinės kilmės endotelinų ląstelių pirmtakių prigimtis bei jų ekspresuojami paviršiaus žymenys gali radikaliai skirtis nuo hematopoetinės kilmės EPC. Pavyzdžiui, KČ mezenchiminės ląstelės pirmtakės sugeba išvystyti EPC ląstelėms būdingą fenotipą arba endotelinės išaugų ląstelės (EOC, angl. *endothelial outgrowth cells*), kurios buvo aptiktos tiriant endotelinų ląstelių kolonijas formuojančius vienetus [Dzau et al., 2005; Asahara et al., 2011] (1 pav.).

2003 m. Oswald kartu su kolegomis bandė diferencijuoti KČ mezenchimines ląsteles pirmtakes į endotelines ląsteles *in vitro*. Buvo nustatyta, kad mezenchiminės ląstelės neturėjo hematopoetinėms ir endotelinėms ląstelėms būdingų žymenų, bet auginant šias ląsteles specialioje terpėje pavyko jas priversti ekspresuoti svarbiausius EPC žymenis vWF (Von

Willebrand'o faktorius) ir KDR (kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptorius, dar žinomas kaip VEGFR) [Oswald et al., 2004]. 2008 m. Au ir kt. parodė KČ mezenchiminių ląstelių terapinį potencialą kraujagyslių regeneracijos procese.

EOC buvo nustatytos Yoder ir kt. 2007 m. Tyrėjai parodė, kad periferiniame kraujyje esančios ląstelės turi labiau nutolusios kilmės fenotipą negu hematopoetinės ląstelės. Tokios ląstelės sugeba formuoti EPC būdingas vamzdelių formos struktūras [Asahara et al., 2011; Yoder et al., 2007].

2005 m. Ingram'as ir kt. nustatė, kad kraujagyslių senelėse yra endotelinių ląstelių, sugebančių proliferuoti iki 40 pasažo ir galinčių dalyvauti kraujagyslių vientisumo palaikyme bei regeneracijoje [Ingram et al., 2005]. 2007 metais Aicher'is su kolegomis bandė nustatyti kitą nei KČ ląstelių pirmtakių šaltinį. Pritaikę parabiozės modelį (susiuvant dviejų vienos rūšies gyvūnų kraujagysles arba organus), jie sukėlė kepenų ckit⁺ (Kit ligandas, SCF angl. *stem cell factor*)/CD45⁻ ląstelių pirmtakių mobilizaciją. Išskyrė jas ir įrodė, kad esant galūnių išeminei ligai, ląstelės dalyvauja naujų kraujagyslių formavimasi [Asahara et al., 2011, Aicher et al., 2007].



1.1. pav. Hematopoetinės ir nehematopoetinės kilmės EPC kinetika žinduolių organizme. HSC-hematopoetinės kamieninės ląstelės; EPC-endotelinės ląstelės pirmtakės; KČ-kaulų čiulpai [Asahara et al., 2011].

1.2. EPC paviršiaus žymenys

CD34 yra būdingas endotelinų pirmtakių ir hematopoetinių ląstelių žymuo, kurio raiška būdinga fibroblastams, daugeliui epitelinių ir kai kurioms vežinėms ląstelėms. KDR (žmonių), Flk-1 (pelių) arba kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptoriaus (VEGFR) dažnai ekspresuojamas kraujodaros, endotelinų ir širdies audinio ląstelių. CD133 (prominin-1, AC133) aptinkamas neuroepitelinių, hematopoetinių ir kai kurių vežinių ląstelių paviršiuje. CD133 ir CD34 yra žymenys, būdingi hematopoetinėms ląstelėms, jų raiška labai priklauso nuo diferenciacijos lygio. Ląstelės, ekspresuojančios CD34, KDR ir CD133 paviršiaus žymenis, pasižymi progenitorinėmis savybėmis. Mažėjant CD133 ekspresijai, ląstelė su CD34/KDR fenotipu tampa labiau diferencijuota [Hirschi et al., 2008].

Ląstelėms, ekspresuojančioms CD34/KDR, būdinga kraujagyslių endotelio kadherinų (E-, N-, VE-kadherinai), E- selektino, CXCR4 (C-X-C chemokino receptoriaus 4), CD31 (trombocitų-endotelinų ląstelių adhezijos molekulė, PECAM-1) žymenų raiška. Tačiau jos neekspresuoja mieloidinių ląstelių paviršiaus žymenų CD15 arba CD14 [Hirschi et al., 2008].

Kiti svarbūs EPC žymenys būtų: vWF ir eNOS (endotelio azoto oksido sintazė). vWF yra EPC. Endotelinų ląstelių paviršiaus glikoproteinas atsakingas už homeostazę. Jo praradimas sukelia daugybę sutrikimų, pvz., Heyde'o (aortos vožtuvų stenozė, susijusi su virškinimo trakto kraujavimu) ir Maschcowitz'iaus (kraujo koaguliacija, susidarant mažiems trombam, galintiems sukelti organų pažaidas).

eNOS būdingas endotelinų ląstelių fermentas, atsakingas už NO sintezę, svarbus palaikant kraujagyslių tonusą, slopinant kraujagyslių lygiųjų raumenų susitraukimą ir trombocitų agregaciją [Hirschi et al., 2008].

1 lentelėje pateikiami žymenys, būdingi skirtingos EPC populiacijoms.

1 lentelė. Skirtingos kilmės endotelinų ląstelių pirmtakų ekspresuojami žymenis [Asahara et al., 2011]

Endotelinų ląstelių pirmtakų kilme	Ekspresuojami žymenys
Kolonijas formuojantis vienetas	CD34 ^{+/+} , CD133 ⁺ , VEGFR2 ⁺ , CD45 ^{+/+} , CD14 ^{+/+} , CD115 ⁺ , CD31 ⁺ , eNOS ⁺ , vWF ⁺
Cirkuliuojančios hematopoetinės ląstelės	CD34 ^{+/+} , CD133 ⁺ , VEGFR2 ⁺ , CD45 ^{+/+} , CD14 ^{+/+} , CD115 ⁺ , CD31 ⁺ , eNOS ⁺ , vWF ⁺
Endotelinės kolonijas formuojančios ląstelės	CD34 ^{+/+} , CD133 ⁻ , VEGFR2 ⁺ , CD45 ⁻ , CD14 ⁻ , CD115 ⁻ , CD31 ⁺ , eNOS ⁺ , vWF ⁺

1.3. Ląstelių adhezija

Ląstelės turi savybę sudaryti ryšius su kitomis, kaimyninėmis ląstelėmis bei su užląstelinio substratu. Ši ląstelių savybė vadinama adhezija. Tam, kad ląstelės sugebėtų sudaryti tarpusavyje šiuos ryšius, joms reikalingi transmembraniniai baltymai t.y. ląstelės adhezijos molekulės (CAMs, angl. *Cell Adhesion Molecules*). Skiriamos dvi CAMs grupės: ląstelė-ląstelė ir ląstelė-tarpląstelinis užpildas, kurios dalyvauja sąveikoje. Kai kurių CAMs veikimui yra būtini Ca^{2+} jonai, kurie yra atsakingi už specifinę ląstelė-ląstelė sąveiką audinyje [Alberts et al., 2002].

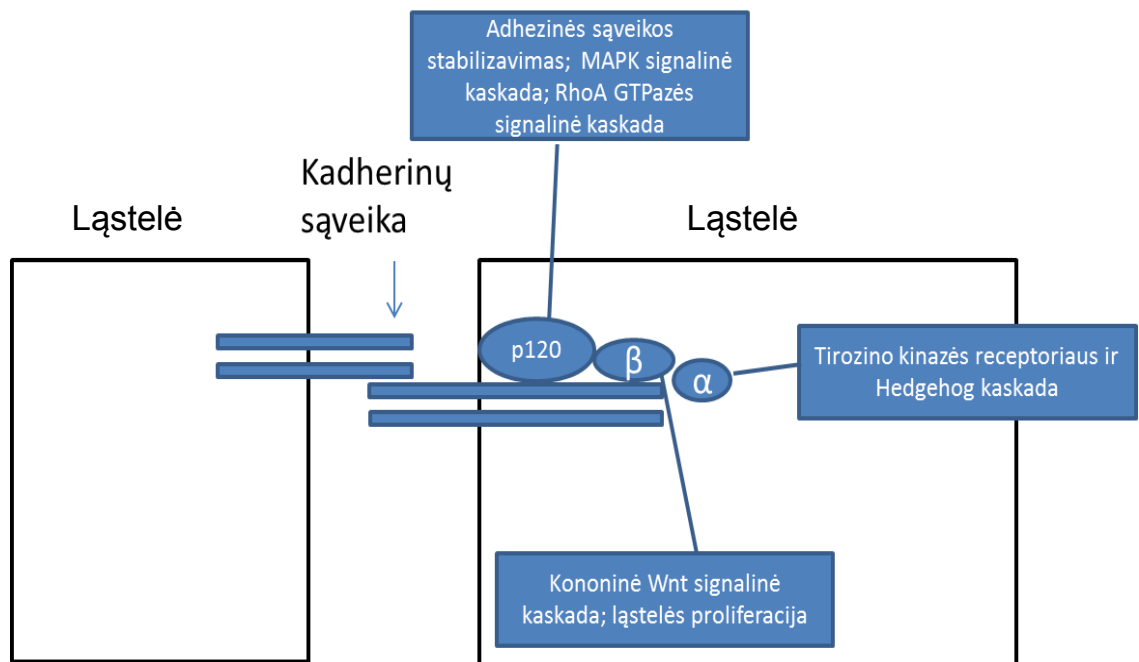
1.3.1. Ląstelės adhezijos molekulės

Ląstelės adhezijos molekulės galima suskirstyti į keturias baltymų šeimas: imunoglobulinų superšeimą, integrinai, kadherinai ir selektinai. Nors CAMs priklauso skirtingoms baltymų šeimoms, jas galima klasifikuoti ir pagal Ca^{2+} jonus: ar jos yra priklausomos ar ne.

Nuo Ca^{2+} jonų priklausomos CAMs

Kadherinai - dideli transmembraniniai baltymai, kurių veikimui reikalingi Ca^{2+} jonai, kurie atsakingi už tarpląstelinę sąveiką audinyje ir svarbūs audinio diferenciacijoje [Alberts et al., 2002; Lodish et al., 2000]. Ankstyvos diferenciacijos metu dažniausiai ekspresuojami E-, P- ir N-kadherinai. E-kadherinas yra būdingas daugeliui epitelinių ląstelių, N-kadherinas - nervinėms, raumeninėms ir lęšiuko ląstelėms, o P-kadherinas - placentos ir epidermio ląstelėms [Lodish et al., 2000].

Kiekvienas kadherinas priklauso I tipo integraliesiems membranos glikoproteinams. Kadherinų N-galas išsikišęs į ekstraląstelinę ertmę (turi pasikartojantį regioną svarbų tarpląstelinei sąveikai), o C-galas nukreiptas į ląstelės citoplazmą. Kadherinai yra netiesiogiai sujungti su aktino citoskeletu per baltymus kateninus - p120 ir beta-kateninus. p120 kateninas atsakingas už adhezinės sąveikos palaikymą/stabilizavimą šalia plazminės membranos, o beta-kateninas sąveikauja su alfa-kateninu, kuris, savo ruožtu sudaro jungtį su forminu, susietu su aktino filamentu (2 pav.). Tikslus mechanizmas, kuris sujungia aktino citoskeletą su kadherino-katenino kompleksu nėra žinomas. Ši sąveika labai svarbi tarpląstelinei sąveikai [Lodish et al., 2000; Vasioukhin et al., 2001; Li et al., 2012; Stepniak et al., 2009]. E-kadherinas yra vienas iš labiausiai ištirtų kadherinų. Tai vienas pirmųjų kadherinų, ekspresuojamų žinduolių vystimosi metu [Alberts et al., 2002]. E-kadherino vaidmuo adhezijos procese priklauso nuo aktino citoskeleto ir judinamojo neraumeninio miozino. Sąveikaujant kadherinui su alfa-kateninu, beta-kateninas aktyvina Wnt signalinio kelio, atsakingo už ląstelės formos pokyčius, migraciją, proliferaciją ir ląstelės išlikimą [Li et al., 2012; Marthiens et al., 2010].



1.2. pav. Kadherino-katenino kompleksas ir jų sąsaja su signaliniais keliais (α , β ir p120 — kateninai) [Stepniak et al., 2009].

Selektinai - tai nuo Ca^{2+} jonų priklausomi ląstelės paviršiaus baltymai. Jie dalyvauja tarpląstelinėje sąveikoje kraujotakos sistemos. Tai karbohidratams selektyvūs baltymai. Šiuo metu žinomi trys pagrindiniai selektinai: L-selektinas, būdingas baltiesiems kraujo kūneliams, P-selektinas - trombocitams ir endotelinėms ląstelėms, esančioms šalia uždegimo židinio, o E-selektinas - sužadintoms endotelinėms ląstelėms. Kiekvienas selektinas yra transmembraninis baltymas, turintis konservatyvų domeną jungiantį oligosacharidą ar kitą ląstelę. Šie baltymai atlieka svarbų vaidmenį ląstelių migracijoje: per kraujagysles į kaimyninį audinį bei uždegiminio proceso metu [Lodish et al., 2000].

Integrinai yra heterodimerai sudaryti iš α ir β subvienetų. Yra žinoma mažiausiai 24 žinduolių integrinų heterodimerai sudaryti iš 18 α ir 8 β subvienetų. Integrinai yra ekspresuojami daugelio ląstelių. Ląstelės dažniausiai turi ne vieną, o kelis integrinus, užtikrinančius sąveiką su skirtingais paviršiais [Lodish et al., 2000; Caiado et al., 2012]. Integrinų raiška priklauso nuo ląstelės tipo. Pavyzdžiui, EPC ekspresuoja $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ ir $\beta 7$ integrinų subvienetus. Kai kurie subvienetai yra ekspresuojami tik specifiniu metu, atsižvelgiant į EPC būseną (ląstelės mobilizacija, migracija, diferenciacija ir invazija į audinį yra lydimas substrato/ECM sąveikos kaitos) [Caiado et al., 2012].

Nuo Ca^{2+} jonų nepriklausomos CAMs

Kadherinų, selektinų ir integrinų veikimas priklauso nuo Ca^{2+} jonų. Kai kurių integrinų funkcionalumui užtikrinti reikalingi Mg^{2+} jonai. Ląstelių adhezijos procese dalyvauja ir molekulės, kurių veiksmingumui užtikrinti Ca^{2+} jonai nereikalingi. Šiai grupei priskiriami

immunoglobulinų (Ig) superšeimai priklausantys baltymai. Tokie baltymai turi vieną arba daugiau į Ig panašių duomenų. Šių baltymų pavyzdžiu gali būti nervų ląstelių adhezijos molekulė (N-CAM), kurios raiška būdinga įvairioms ląstelėms ir daugumai nervinių ląstelių. N-CAM molekulė yra labiausiai paplitusi nuo Ca^{2+} jonų nepriklausoma molekulė, užtikrinanti tarpląstelinę sąveiką. Manoma, kad jai, kaip ir kadherinams, būdinga homofilinė sąveika [Alberts et al., 2002; Lodish et al., 2000].

Kai kurioms Ig šeimos adhezijos molekulėms yra būdinga ir heterofilinė sąveika. Pavyzdžiui, endotelinių ląstelių ekspresuojama tarpląstelinė adhezijos molekulė ICAM (angl. *Intercellular adhesion molecule*) jungdamasi su kraujo ląstelių integriniais suteikia joms galimybę migruoti iš kraujotakos sistemos į audinį [Alberts et al., 2002; Lodish et al., 2000].

1.3.2. Ląstelių adhezijos molekulių vaidmuo ląstelių diferenciacijoje ir proliferacijoje

E-kadherinas atlieka reikšmingą vaidmenį ankstyvos embriogenezės metu. Jis dalyvauja kompaktinės ir gerai organizuotos struktūros kūrime. Remiantis Larue ir kt. duomenimis, mutantinės pelės, ekspresuojančios mažus E-kadherino kiekius embriogenezės metu, blastocistos stadijoje nesugeba suformuoti ertmių ir trofoblastinio epitelio. Išsivysčius gastrulei, E-kadherino kiekis sumažėja. Šis sumažėjimas būdingas epiteliniam-mezenchiminiam virsmui. E-kadherino transkripcijos slopinimą reguliuoja p38 MAPK ir EPB41L5-kadherino-katenino kompleksas. EPB41L5 sąveikauja su p120-kateninu ir neleidžia prisijungti kadherinui. E-kadherino sumažėjimas siejamas ir su padidėjusia N-kadherino ekspresija [Stepniak et al., 2009].

N-kadherinas yra naudojamas kaip žymuo mezenchiminės ir neuroepitelinės ESC diferenciacijos tyrimuose [Li et al., 2012]. Skatinant nervinę ESC diferenciaciją, pakinta ląstelių morfologija ir susidaro kompaktiška rozetės struktūra, kuriai būdinga nervinių ląstelių pirmtakių specifinių žymenų (Pax6 ir Sox2) raiška. N-kadherinas yra charakteringas primityvios neuroepitelinės rozetės struktūros žymuo. Analogiška šių žymenų raiška stebima ir embriono vystimosi metu, formuojantis nerviniam vamzdeliui. Mažėjant E-kadherino raiškai aktyvinama N-kadherino ekspresija. Panašus kadherinų raiškos pokytis yra stebimas epitelinio-mezenchiminio virsmo metu, diferencijuojant žmogaus embrionines kamienines ląsteles [Li et al., 2012; Marthiens et al., 2010].

N-kadherinas yra svarbus ir kraujagyslių formavimui embriogenezės metu. Endotelinėse ląstelėse N-kadherinas atsakingas už VE-kadherino ekspresiją. Luo ir Radice nustatė, kad N-kadherino raiškos slopinimas endotelinėse ląstelėse yra lydimas nuo VE-kadherino priklausomos tarpląstelinės sąveikos susilpnėjimo. Taip pat buvo pastebėta, kad N-kadherino deficitas

teigiamai veikia ląstelių judrumą, tačiau turi neigiamą poveikį jų proliferacijai [Luo et al., 2005].

VE-kadherinas yra svarbus kraujotakos sistemos vystymuisi. Jis atlieka tiek mechaninę, tiek ir signalo perdavimo funkcijas. Endotelinės ląstelės su sumažinta VE-kadherino raiška nesugeba atstatyti ir suformuoti naujų kraujagyslių jų vystimosi metu. Pastebėta, kad VE-kadherino deficitas neigiamai veikia signalo perdavimą kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptoriaus-2/fosfatidilinozitol 3 kinazės (VEGFR-2-PI3K) ir VEGFR-2-MAPK keliais. Tai slopina ląstelės proliferaciją ir skatina jos žūtį apoptozės būdu [Stepniak et al., 2009].

VE-kadherinas reguliuoja klaidino-5, dalyvaujančio tampriųjų jungčių endotelinų ląstelių sudaryme, raišką. Dar vienas svarbus VE-kadherino taikinytis yra TGF- β . Manoma, kad VE-kadherino ir TGF- β funkcinis ryšys yra svarbus stuburinių morfogenezėje [Stepniak et al., 2009].

PECAM-1/CD31 priskiriamas Ig superšeimai, yra būdingas endotelinėms, trombocitų, monocitų ir neutrofilų ląstelėms. Yra lokalizuotas ląstelė-ląstelė adhezijos vietose ir atlieka svarbų vaidmenį, palaikant homofilinę sąveiką tarp ląstelių bei endotelinų ląstelių judėjime. Prisideda prie signalo perdavimo tiesiogiai sąveikaujant CD31 baltymo viduląsteliniai uodegai su β -kateninų ir SH2 duomeno fosfataze, taip reguliuodamas nuo β -katenino priklausomas signalines kaskadas.

Embriono vystimosi metu ląstelės, ekspresuojančios CD31, CD34, VEGFR2 ir VE-kadheriną, turi galimybę toliau vystytis hematopoetine arba endoteline linkme. *In vivo* tyrimai parodė, kad šios kraujodaros ląstelės pasižymi hematopoetinių progenitorinių ląstelių savybėmis [Li et al., 2012; 25].

Intergrinai. Igreja ir kt. atliko genų ekspresijos tyrimus EPC diferenciacijos metu ir pastebėjo trumpalaikę, griežtai reguliuojamą endotelio diferenciaciją, kuri gali būti suskirstyta į tris nuoseklius etapus [Igreja et al., 2008]:

- intergrinų sąveika su specifiniais ECM baltymais;
- augimo faktorių skatinama proliferacija ir ląstelės išgyvenamumas;
- funkcinų savybių vystymasis.

EPC sukibimas su ECM yra svarbi pakopa diferenciacijos metu. Sąveikaujant ląstelei su substratu, užtikrinama išgyvenimo ir dauginimosi galimybė. Be to, intergrinų-ECM sąveika reikalinga parakrininių EPC išskiriamų veiksnių sintezei. Integrinų raiška EPC diferenciacijos metu pastoviai kinta: nediferencijuotos EPC ekspresuoja $\alpha 9$ intergriną, tuo tarpu $\beta 5$ ir $\beta 7$ raiška išryškėja diferencijuotose ląstelėse. EPC diferenciacijos eigoje ekspresuojami intergrinai $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv . Kiti nekintantys intergrinų subvienetai yra atsakingi už EPC sąveiką su fibronektinu (FN). Ši sąveika labai reikšminga diferenciacijos metu. 1997 m. Asahara su kolegomis įrodė, kad EPC ir

FN adhezija yra daug stipresnė nei EPC ir kalogeno. Wijelath ir kt. pademonstravo, kad FN- $\alpha 5\beta$ sąveika skatina nuo VEGF priklausomą, EPC virsmą į subrendusią endotelinę ląstelę. Tačiau tikslus FN ir VEGF sąveikos mechanizmas, reguliuojantis EPC diferenciaciją, nėra žinomas [Asahara et al., 2011; Caiado et al., 2012; Wijelath et al., 2004].

1.4. Ląstelės migracija

Ląstelės migracija - tai sudėtingas, tačiau gerai koordinuojamas procesas, sujungiantis ląstelės paviršiaus receptorius, signalines molekules ir citoskeleto elementus. Visas šis kompleksas, atsakingas už ląstelės judėjimą, gali būti vadinamas ląstelės migrosoma. Principiniai migracijos mechanizmai skirtingose ląstelėse yra panašūs [Entschladen et al., 2009].

1.4.1. Migracijos ciklas

Ląstelės migracija gali būti suvokiama kaip pasikartojantis procesas. Pradinis atsakas į migraciją skatinantį veiksnį yra ląstelės poliarizacija ir plačių lamelipodijų ar smailių filopodijų susidarymas judėjimo krypties link. Lamelipodijų ir filopodijų susidarymą nulemia aktino polimerizacija. Procesas stabilizuojamas ląstelei prilipus prie ECM arba gretimos ląstelės. Tokios adhezijos vietos tarnauja traukos/atramos taškais ląstelei judant, o judėjimo pabaigoje adhezijos taškai suardomi. Taigi, ląstelės migracijos procesą galima apibrėžti keliais etapais: pradinis atsakas ir poliarizacija; lamelipodijų ir filopodijų susidarymas; ir adhezijos suardymas judėjimo ciklo pabaigoje [Ridley et al., 2003].

1.4.2. Lamelipodijų ir filopodijų struktūra

Lamelipodijose ir filopodijose aktino filamentai yra skirtingai organizuoti: lamelipodijose sudaro išsišakojusią dendritinę struktūrą, o filopodijose išsidėstę ilgais lygiagrečiais pluoštais.

Lamelipodijų susidarymo metu aktino polimerizacija vyksta dalyvaujant Arp2/3 (svarbus aktino citoskeleto reguliacijoje) kompleksui, kuris jungiasi prie aktino filamentų šono arba galo. Aktinas pradeda šakotis, taip sudarydamas dendritinę struktūrą. Arp2/3 aktyvacija priklauso nuo WASP/WAVE šeimos baltymų, atsakingų už signalo perdavimą nuo paviršiaus receptoriaus link aktino citoskeleto [Ridley et al., 2003].

Aktino polimerizacijos greitis ir organizacija priklauso nuo prie aktino prisijungiančių baltymų. Pavyzdžiui, profilinas, prisijungdamas prie aktino monomero, nukreipia jį į polimerizacijos vietą. Senų gijų ardyme dalyvauja ADF/kofilinų šeimos baltymai. Dendritinę struktūrą palaiko kontraktinas, stabilizuodamas aktino filamentų atšakas. Filaminas A ir α -aktininas stabilizuoja visą aktino tinklą sudarydami pintą struktūrą [Ridley et al., 2003].

Filopodijos susidaro aktino filamentui ilgėjant. Ilgo ir neišsišakojusio filamento organizacija tiesiogiai priklauso nuo jo elongacijos. Šiuo atveju, formai ir judėjimui palaikyti svarbūs Ena/VASP baltymai, kurie atsakingi už filamento elongaciją. Filamento ilgėjimui reikšmingas fascino baltymas, kuris svarbus citoskeleto reguliacijoje - palaiko ląstelės adheziją ir judėjimą [Ridley et al., 2003].

GTP sujungiantys baltymai atlieka reikšmingą vaidmenį adhezijos reguliavimui bei lamelipodijų ir filopodijų susidarymo reguliacijoje. Jų aktyvumas reguliuojamas prijungiant GTP arba GDP. Aktyvi forma, surišusi GTP, sąveikauja su savo baltymais taikiniai - baltymų kinazėmis, lipidus modifikuojančiais fermentais ir Arp2/3 komplekso aktyvatoriais. Lamelipodijų ir filopodijų formavimo reguliacijoje dalyvauja Rho šeimos baltymai: Rac, Cdc42 ir RhoG. Cdc42 ir Rac taikiniai, atsakingi už aktino polimerizaciją. Jie priklauso WASP/WAVE šeimos baltymams [Ridley et al., 2003; Krylyshkina et al., 2002].

Eden ir kt. nustatė mechanizmą, kuriuo Rac stimuliuoja lamelipodijų susidarymą aktyvuodama WAVE baltymus. Rac neturi tiesioginio poveikio aktino nukleacijai. Veikiant kartu su NCK (baltymas, lokalizuotas citoplazmoje ir turintis Src SH2 ir SH3 homologinius domenų; atliekantis signalo perdavimo adaptorinio baltymo tarp tirozino kinazės receptoriaus ir recepto (pvz., Ras) funkciją) panaikina WAVE komplekso trans-inhibiciją. Dėl to susidaro aktyvi forma, kuri, asocijuota su HSPC300 ir IRSp53, skatina Arp2/3 komplekso aktyvaciją ir aktino polimerizaciją [Ridley et al., 2003; Krylyshkina et al., 2002; Eden et al., 2004; Cernuda-Morollo'n et al., 2006].

Cdc42 taikiny yra WASP baltymai, svarbūs filopodijų formavime [Cernuda-Morollo'n et al., 2006].

1.5. EPC mobilizacija ir migracija

EPC mobilizacija prasideda specialioje kamieninių ląstelių nišoje, esančioje kaulų čiulpuose. Čia taip pat aptinkama fibroblastų, osteoblastų ir endotelinių ląstelių. BMSC (kaulų čiulpų kamieninės ląstelės, angl. *bone marrow stem cells*) dėl citokinų veiklos praranda ryšį su KČ stromos ląstelėmis [Urbich et al., 2004; Hristov et al., 2004].

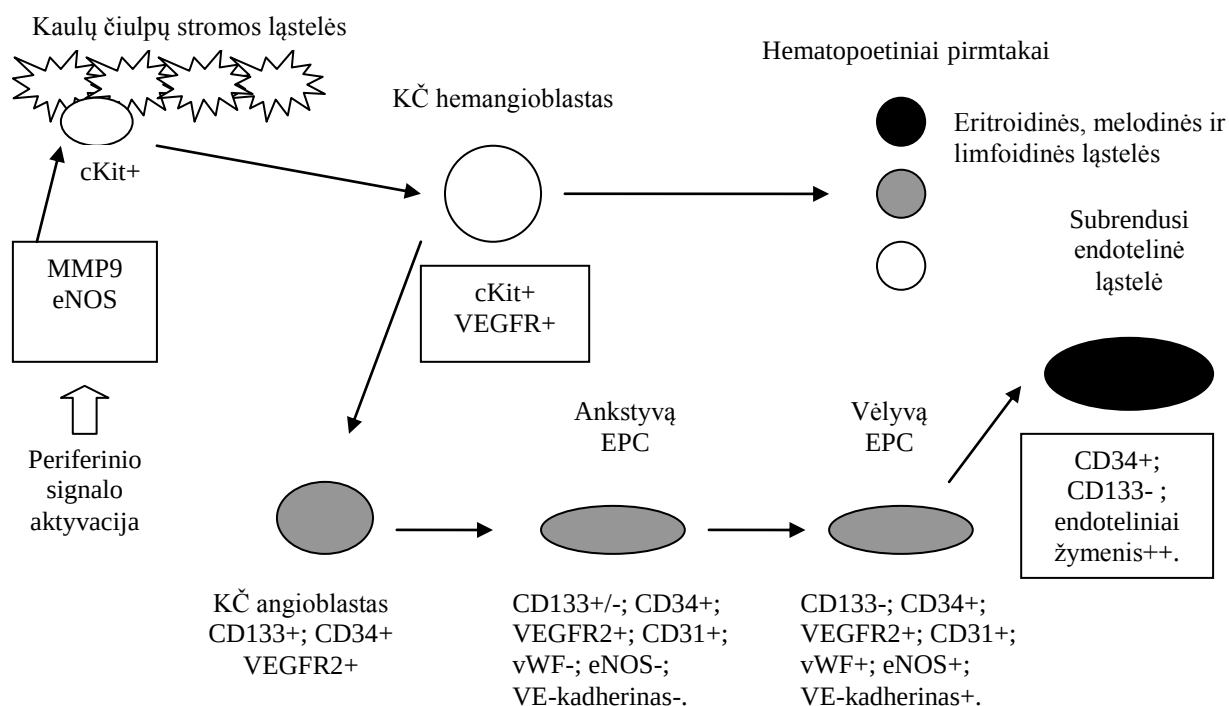
BMSC mobilizacijai svarbi elastazių, katepsino G ir matrikso metalproteinazių (MMP) aktyvacija. Šie fermentai yra atsakingi už adhezinės sąveikos suardymą tarp KČ stromos ir kamieninių ląstelių. Išemija veikia kaip pozityvus signalas skatinantis EPC mobilizaciją iš KČ. Manoma, kad jos poveikis yra svarbus VEGF arba SDF-1 (angl. *stromal cell-derived factor 1*) kiekio padidėjimui cirkuliuojančiame kraujyje. Toliau indukuojama BMSC ląstelių mobilizacija MMP-9. MMP-9 yra matrikso metalproteinazė, atsakinga už transmembraninio SCF arba Kit-

ligando atpalaidavimą (3 pav.) [Urbich et al., 2004; Hristov et al., 2004; Tilling et al., 2009; Tousoulis et al., 2008].

EPC mobilizacija gali būti stimuliuojama veikiant citokinais, kurie skatina CD34⁺ ląstelių migraciją į periferinį kraują. Pavyzdžiui, granulocitų kolonijas stimuliuojančiu faktoriumi (G-CSF, angl. *granulocyte-colony stimulating factor*) arba granulocitų monocitų kolonijas stimuliuojančiu faktoriumi (GM-CSF, angl. *granulocyte monocyte-colony stimulating factor*), kurie jau plačiai naudojami hematologijoje (veikiama norint išgauti hematopoetines ląsteles iš periferinio kraujo) [Urbich et al., 2004].

Kitas svarbus mobilizaciją skatinantis baltymas yra statinas, kuris yra HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzimas A) reduktazės inhibitorius. Manoma, kad nuo statino priklauso ląstelių išgyvenamumas ir funkcinų savybių pagerėjimas yra tiesiogiai susijęs su jo indukuojama PI3K/Akt signaline kaskada [Urbich et al., 2004].

eNOS ekspresija stromos KČ ląstelių taip pat daro didelę įtaką EPC mobilizacijai. Remiantis Aicher ir kt. duomenimis, mažas fermento kiekis sumažina MMP-9 aktyvumą. Manoma, kad eNOS turi tiesioginę įtaką signalinės PI3K/Akt kaskados aktyvacijai [Aicher et al., 2003; Tilling et al., 2009].



1.3. pav. EPC mobilizacija [Hristov et al., 2004].

EPC migracija link audinio gana sudėtinis procesas. Migracijos metu aktyvuojama daugelis signalinių kelių, stimuliuojamų citokinų ir augimo faktorių. Ląstelės pradeda ekspresuoti adhezinės molekules, reikalingas ląstelių sąveikai su substratu bei migracijai. Kaip ir

mobilizacijoje, VEGF ir SDF-1 ir jo receptoriaus CXCR4 ekspresija vaidina svarbų vaidmenį EPC migracijoje [Tousoulis et al., 2008].

Įvykus kraujagyslių pažeidai, VEGF kiekis kraujyje sparčiai išauga, todėl yra skatinama EPC mobilizacija ir jų migracija į audinį. Veikiant uždegiminiams citokinams, endotelinės ląstelės pažeidimo vietoje yra sužadintoje būsenoje, dėl to padidėja adhezinių molekulių kiekis ląstelės paviršiuje (ICAM, VCAM, E-selektinas). Tuomet yra svarbūs $\beta 2$ ir $\alpha 4\beta 1$ integrinai, kurie tiesiogiai dalyvauja ląstelės judant link uždegimo/pažeidimo židinio. ICAMs ekspresija sužadintose endotelinėse ląstelėse reikalinga limfocitų transendotelinei migracijai tarp skirtingų audinių ir kraujagyslių [Tilling et al., 2009; Tousoulis et al., 2008].

Interleukino 8 (IL-8) vaidmuo EPC migracijoje yra tiesiogiai susijęs su mobilizacija. Didėsnis jo kiekis teigiamai veikia ląstelių mobilizaciją ir tolimesnę jų migraciją link kraujagyslių pažeidimo vietos. Kocher ir kt. pastebėjo, kad miokardo infarkto metu padidėjusi IL-8 koncentracija kraujyje skatina CD34+/CD133+ ląstelių skaičiaus padidėjimą [Tousoulis et al., 2008; Kocher et al., 2006].

Yra išskiriamos dvi signalinės kaskados, kurios tiesiogiai veikia EPC mobilizaciją (: PI3K-Akt) ir migraciją (MAPK-ERK). Akt šeima turi tris kuoduojamus genus ir priklauso serino/treonino baltymų kinazių šeimai. Akt yra susieta su ląstelės išgyvenamumu ir stimuliuoja endotelio NO sintezę. Akt turi domeną jungiantį fosfoinozitolį ir yra aktyvuojama fosfoinozitol-3-kinazių šeimos narių, kurie priklauso nuo G baltymų jungiančių receptorių, pavyzdžiui, CXCR4 [Tilling et al., 2009; Tousoulis et al., 2008; Kocher et al., 2006].

Akt, fosforilindama eNOS, ją taip pat aktyvuoja. Dėl to yra stimuliuojama NO sintezė endotelinėse ląstelėse bei skatinamas jų augimas ir migracija. Mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės taip pat yra serino/treonino specifiniai baltymai, kurie dalyvauja fosforilinime ir signalo perdavime. Manoma, kad Akt ir MAPK keliai yra tiesiogiai susiję su SDF-1 ir yra stimuliuojama EPC migracija [Tilling et al., 2009].

1.6. Diferenciacija

Ląstelių diferenciacija - tai procesas, kurio metu nespecializuota (kamieninė) ląstelė tampa specializuota, t.y. ji įgauna papildomų funkcinių savybių, būdingų audinio subrendusiai ląstelei. Šio proceso metu pasikeičia genų raiška. Vieni genai yra nuslopinami, kiti tampa aktyvūs. Taip ląstelė subrandina būdingą fenotipą ir savitas funkcijas. Embriogenezės metu šis procesas vaidina itin svarbų vaidmenį. Susidarius gemaliniams lapeliams, yra aptinkama nepilnos diferenciacijos ląstelių, kurios palaiko proliferacijos aktyvumą, bet neišvysto funkcinių savybių būdingų subrendusiai audinio ląstelei [Keller, 2005].

Kamieninės ląstelės *in vitro* sąlygomis gali diferencijuoti į visiškai arba dalinai specializuotas ląsteles. Toks procesas vadinamas valdomąja diferencijacija. Šio proceso metu, naudojant sukurtus protokolus, yra galimybė kamieninėms ląstelėms diferencijuoti į skirtingų audinių ląsteles [Keller, 2005].

1.6.1. Miogeninė diferencijacija

Raumeninis audinys yra galutinis miogeninės diferenciacijos produktas. Funkcinis vienetas yra daugiabranduoliai mioblastai. Embriogenezės metu mioblastai pastoviai proliferuoja esant pakankamam kiekiui fibroblastų augimo faktoriaus (FGF, angl. *fibroblast growth factor*). Sumažėjus FGF, ląstelės pradeda migruoti ir sekretuoti fibronektiną. Mioblastai juda link audinio ir įsiterpia į jį. Pasiekus audinį, prasideda ląstelių susilieėjimas (šiam procesui svarbūs Ca^{2+} jonai). Tarpininkaujant meltrin metaloproteinazei stimuliuojama α aktino genų ekspresija.

Miogeninė diferencijacija yra reguliuojama miogeninių reguliatorinių faktorių (MRFs, angl. *myogenic regulatory factors*) - Myf5, MyoD, miogenino ir MRF4 (visi faktoriai dalyvauja embriogenezės vystimosi metu ir yra svarbūs miogeninės diferenciacijos dalyviai). MyoD ir Myf5 apsprendžia mezodermos diferenciaciją į griaučių miogeninių linijų ląsteles, o miogeninas ir MRF4 regulioja ląstelių susilieėjimą ir galutinę diferenciaciją [Gang et al., 2004].

1.6.2. Osteogeninė diferencijacija

Kamieninių arba progenitorinių ląstelių diferencijacija į kaulinio audinio ląstelės. Kaulinės diferenciacijos metu diferencijuojamos ląstelės linkusios kaupti kalcį. Markeriai, kurie yra ekspresuojami kaulinės diferenciacijos metu yra transkripcijos faktoriai (RUNX, ATF4, Osterix). Šiems faktoriams priklauso ir medžiagos, dalyvaujančios tarpląstelinio matrikso mineralizacijos procese (I tipo kolagenas, osteokalcinas, osteopontinas, BSP-kaulų sialoproteinas) [Sottile et al., 2003].

1.6.3. Adipogeninė diferenciacija

Adipogeninės diferenciacijos metu ląstelėse aptinkamos sferinės formos lipidų sankaupos kartu su riebalinio audinio ląstelėms būdingu morfologinių bei biocheminių charakteristikų pasireiškimu. Diferenciacija gali būti skatinama pridėjus deksametazono, kuris aktyvuoja glikokortikoido receptoriaus signalinę kaskadą arba IBMX (3 izobutil-1-metilksantinas), kuris veikia nuo cAMP priklausomų baltymų kinazės signalinę kaskadą [Niemelä et al., 2008].

Adipogeninę diferenciaciją reguliuoja keletas transkripcijos faktorių. CCAAT/enhanceri sujungiantis baltymas α (C/EBP- α) ir PPAR- γ (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor* γ) yra aktyvuojami adipogeninės diferenciacijos metu ir dalyvauja ląstelių augimo slopinime (augimo stabdymas yra svarbus adipogeninei diferenciacijai). Šie faktoriai veikia kartu ir

stimuliuoja vienas kito veikimą. PPAR- γ stabdo ląstelės ciklą ir sukelia adipocitams specifinių genų ekspresiją. PPAR- γ geno promotorius turi specifinę C/EBP- α jungimosi seką [Niemelä et al., 2008].

1.7. Proliferacija

Ląstelės ciklas sudaro du gana skirtingi procesai. Vienas jų yra apvaisinimas, kitas – kai ląstelės proliferacija yra aktyvuojama augimo faktorių. Proliferacija - tai procesas, kurio metu viena ląstelė pasidalija į dvi dukterines ląsteles. Tokiu būdu užtikrinamas ląstelių populiacijos didėjimas arba palaikymas. Vykstant ląstelės diferenciacijai, jos dauginimosi potencialas dažniausiai sumažėja, o kartais net prarandama dauginimosi funkcija. Kitos ląstelės dalijasi per visą savo gyvavimo laikotarpį, taip palaikydamos ląstelių skaičių audinyje [Berridge, 2012; Cooper, 2000].

Proliferacija yra valdoma daugelio augimo faktorių ir priklauso nuo jų aktyvuojamų signalinių kaskadų [Cooper, 2000]:

- Smad signalinis kelias, tarpininkaujant TGF- β (transformuojantis augimo faktorius β), stabdo ląstelių proliferaciją. Viena iš Smad funkcijų yra nuo ciklino priklausomos kinazės inhibitoriaus ekspresijos stimuliavimas, dėl kurio ir inhibuojamas ląstelių dauginimasis.
- *Hedgehog* signalinė kaskada aktyvuoja cinko pirštelių transkripcijos aktyvatorių GLI1, kuris skatina daugelio genų, reikalingų tolimesniam signalo perdavimui, raišką. Kaskada aktyviai veikia daugelyje suvėžėjusių ląstelių.
- Kanoninis Wnt/ β -katenino kelias aktyvuojamamas β -katenino translokacijos į branduolį, kur suaktyvinami genai, atsakingi už ląstelės proliferaciją.
- Mitogeno aktyvuoti baltymų kanazių signaliniai keliai svarbūs ląstelės proliferacijos valdyme. Tirozino kinazės receptoriaus aktyvacija skatina ERK fosforilinimą, kuris toliau branduolyje fosforilina CREB (ciklinio AMP atsako elementą sujungiantį baltymą, angl. *cyclic AMP response element-binding protein*). Fosforilintas CREB jungiasi su transkripcijos koaktyvatoriumi p300, acetilinančiu šalia esančius histonus. Tai leidžia vykti transkripcijai.
- PI3 kinazė veikia ir regulioja ląstelių proliferaciją. Jos produktai (PDK1/2 ir Akt) patekę į branduolį inaktyvuoja FOXO transkripcijos faktorius. Nuo FOXO priklausomos kaskados nariai inhibuoja proliferacijai reikalingus baltymus. PDK1/2 veikia per S6K (ribosomų S6 baltymų kinazė) skatindama baltymų sintezę. Akt turi sąsają su TOR (rapamicino taikynys) kaskada, kontroliojančia baltymų gamybą

ląstelėje. Baltymų sintezės kontrolė ląstelėje yra pagrindinis PI3K vaidmuo ląstelės augime.

1.8. Oksidacinis stresas

Organizmai, gyvenantys aerobinėje aplinkoje pastoviai susiduria su aktyviomis deguonies formomis (ROS, angl. *reactive oxygen species*). ROS – tai dalinai redukuoti deguonies metabolitai, chemiškai aktyvesni už molekulinį deguonį. Tokių metabolitų šaltinis gali būti įvairus. Vienas jų - mitochondrijų kvėpavimo grandinės šalutiniai produktai. ATP gamybos procese nedidelis kiekis laisvų elektronų gali sureaguoti su laisvu molekulinio deguonimi ir tokiu būdu gali susidaryti reaktyvi deguonies forma. Kiti ROS šaltiniai: NADH/NADPH oksidazė; ksantino oksidoreduktazės ir eNOS. Augimo faktorių poveikis skatina ROS gamybą, kuri priklauso nuo padidėjusio NADH/NADPH oksidazės aktyvumo. Skiriamos dvi ksantino oksidoreduktazių formos. Tai molibdeną turintys fermentai, kurie katalizuoja ksantino konversiją į hipoksantiną ir šlapimo rūgštį. Toliau ksantino dehidrogenazei, redukuojant NAD^+ oksidazę, perduodamas elektronas molekuliniam deguoniui ir susidaro vandenilio peroksidas. Citochromo p450 reduktazė katalizuoja elektronų transportą tarp NADPH ir hemo grupės. Esant kofaktoriams, L-argininui arba tetrahidrobiopterinui susidaro azoto monoksidas (NO). Pakeitus arba pašalinus vieną iš substratų, gali susidaryti nespecifiniai produktai, pavyzdžiui: vandenilio peroksidas [Martindale et al., 2002; Mildažienė ir kt. 2004; Watson et al., 2008].

1.8.1. Ląstelių apsaugos mechanizmai oksidacinio streso metu

Maži ROS kiekiai atlieka svarbų vaidmenį ląstelės savybių pasireiškinge, bet esant didelėms koncentracijoms gali įvykti DNR, baltymų ir lipidų pažeidimai. Ląstelės evoliucijos metu vyksta daugybė reakcijų, mažinančių ROS ir oksidacinius pažeidimus. ROS perteklių ląstelėse gali sumažinti fermentai ir molekulių gaudyklės [Martindale et al., 2002; Mildažienė et al., 2004].

1.8.1.1. Antioksidaciniai fermentai

Superoksido dismutazės (SOD) yra pirmoji gynybos linija šalinanti ROS ir verčianti juos į mažiau aktyvią formą. Aktyviajame centre yra metalas, kuris gali skirtis priklausomai nuo ląstelės kilmės ir fermento lokalizavimo vietos. Skirtingos SOD formos nustatomos pagal jautrumą slopikliams [Mildažienė et al., 2004].

Peroksisomų katalazės sunaudoja susidariusį H_2O_2 oksidazių katalizuojamose reakcijose ir neleidžia jam pereiti į citoplazmą [Mildažienė et al., 2004].

Glutathiono peroksidazė (GSHPX) yra H_2O_2 šalinantis fermentas. Jis yra ypatingas tuo, kad

turi neįprastą selenocisteino aminorūgštį, kurioje vietoj -SH yra -SeH grupė. GSHPX fermentą papildo glutationo reduktazė, svarbi glutationo redukuotos formos atstatymui (NADPH naudojamas kaip katalizuojamos reakcijos reduktorius). Santykis tarp redukuotos ir oksiduotos glutationo formos parodo antioksidantų ir prooksidantų pusiausvyrą ląstelėse [Mildažienė et al., 2004].

1.8.1.2. Molekulių gaudyklės arba mažos molekulinės masės laisvųjų radikalų gaudyklės

Tokoferoliai (vitaminas E ir jo dariniai) yra svarbios ROS gaudyklės, lokalizuotos biologinėse membranose ir stabdančios lipidų peroksidacijos reakcijas [Mildažienė et al., 2004].

L-askorbo rūgštis (vitaminas C) yra pagrindinis tarpląstelinis antioksidantas. Reaguoja su ROS greičiau negu kitos biomolekulės. Dalyvauja tokoferolių redukuotos formos atstatyme. Askorbo rūgštis veikia vandeninėje terpėje oksiduodamasi iki monodehidroaskorbo arba dehidroaskorbo rūgšties ir yra atstatoma redukuojant dehidroaskorbo reduktazei, kuri naudoja redukuotą glutationą [Mildažienė et al., 2004].

Šlapimo rūgštis sudaro chelatinčius junginius jungdama pereinamuosius metalus ir stabdo jų kanalizuojamas ROS susidarymo reakcijas [Mildažienė et al., 2004].

Oksidacinės pažaidos ląstelės lygyje apima spektrą funkcinių pokyčių, tokių kaip proliferacijos bei ląstelės augimo skatinimą arba slopinimą, senėjimą ir ląstelės mirtį. Skirtingo tipo ląstelių atsakas į oksidacinį stresą priklauso nuo poveikio laikotarpio ir kiekio, kuris gali nežymiai kisti. Nepaisant ROS poveikio, ląstelės likimą lemia oksidacinio streso metu aktyvuojamos viduląstelinės signalo perdavimo kaskados ir jų generuojamas atsakas. Kai kurie signaliniai keliai skatina ląstelių išgyvenamumą, kiti - ląstelės žūtį, treči - priklausomai nuo sąlygų gali skatinti tiek mirtį, tiek išgyvenamumą [Martindale et al., 2002].

1.8.1.3. Mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės (MAPK)

MAPK - tai didžiulė serino/treonino kinazių šeima, susijusi su plačiu ląstelės atsakų spektru: proliferacija, diferenciacija, adaptacija prie stresinės būsenos ir apoptozė. Atsižvelgus į funkcinius skirtumus, skiriamos trys pagrindinės MAPK šeimos: tarpląstelinį signalą reguliuojančios kinazės (ERK); c-Jun N-galo kinazės ir p38 MAP kinazės. Šios kinazės reguliuoja platų spektrą baltymų ir transkripcijos faktorių, keičiančių genų raišką ląstelėje [Martindale et al., 2002].

Visi MAPK šeimos nariai yra aktyvuojami, ląstelei reaguojant į oksidacinį poveikį. ERK tiesiogiai siejamas su ląstelių proliferacija, o JNK ir p38 daugiau susiję su ląstelės atsaku į stresą. Xia ir kt. dirbdami su ląstelėmis, kurios turėjo nuslopintą ERK, bet pastovią JNK ekspresiją,

parodė, kad JNK yra tiesiogiai susijusi su indukuojama ląstelės apoptoze. ERK ir JNK skirtumas ląstelėje apsprendžia ar ji žus, ar išgyvens. Tyrimai atlikti su p38 MAPK oksidacinio streso metu parodė dvejopus rezultatus, t.y., buvo skatinama ląstelių apoptozė ir išgyvenamumas priklausė nuo poveikio stiprumo [Martindale et al., 2002].

1.8.1.4. PI3K/Akt signalinė kaskada

Akt arba baltymų kinazė B, yra seriną/treoniną fosforiliantis fermentas, kuris, kaip ir ERK, įsijungia ląstelei atsakant į augimo veiksnių stimuliaciją. Fosfatidilinozitol-3- kinazė (PI3K), fosforilindama savo substratą Akt, verčia ją lokalizuotis prie ląstelės plazminės membranos, kur yra fosforilinama PDK-1 (3'-fosfoinozitol-priklausoma kinazė-1) [Martindale et al., 2002].

PI3K aktyvuoja tirozino kinazę arba G baltymo jungiančius receptorių. Pirminė PI3K funkcija yra fosfatidilinozitol lipidų fosforilinimas. Produktai (fosfatidilinozitol-4,5-bifosfatas (PIP2) ir fosfatidilinozitol -3,4,5-trifosfatas (PIP3)) yra svarbios antrinės signalinės molekulės, reguliuojančios įvairius signalinius baltymus. Jungdamosi prie baltymų, turinčių PH domeną (120 a.r. domenas, randamas daugelyje baltymų, kurių funkcija yra viduląstelinio signalo perdavimas arba citoskeleto sudedamoji dalis) skatina jų translokaciją [West et al., 2002].

Akt yra svarbus efektorinis baltymas, aktyvuojamas PI3K. Akt aktyvaciją indukuoja PI3K produktai. PIP2 ir PIP3 jungiasi prie Akt PH domeno, taip skatinami kinazę lokalizuotis prie plazminės membranos. Tam, kad Akt būtų aktyvuota, turi būti fosforilinami T308 (fosforilina PDK-1, kurio aktyvumas yra reguliuojamas PI3 kinazės) ir S473 (fosforilinimo mechanizmas kol kas nėra žinomas) [West et al., 2002].

Akt aktyvacija per tirozino kinazę ir G baltymą jungiančius receptorių gali skatinti daugelis veiksnių, sukeliančių ląstelės stresinę būseną. Tokie veiksniai gali būti: UV, išemija, šiluminis šokas, hipoksija, hipoglikemija ir oksidacinis stresas. Toks atsakas gali būti aiškinamas kaip apsauginis mechanizmas nuo ląstelės žūties [West et al., 2002].

Sonoda ir kt. 1999 metais parodė, kad PI3K/Akt aktyvacija yra svarbi ląstelės gyvybingumui palaikyti oksidacinio streso metu. Ląstelės paveiktos PI3K inhibitoriumi nesugebėjo aktyvuoti Akt, todėl buvo skatinama oksidacinio streso nulemta jų mirtis. Manoma, kad PI3K/Akt kaskados antiapoptozinės savybės pasireiškia per apoptozės supresorių aktyvinimą ar apoptozės iniciatorių slopinimą, pavyzdžiui, BAD (Bcl-2 asocijuotas mirties promotorinis baltymas, dalyvaujantis apoptozės iniciacijoje), kaspazė 9 (fermentas, dalyvaujantis apoptozėje, svarbus citochromo c išlaisvinime), GSK3 (angl. *Glycogen synthase kinase 3*, fosforilindamas savo substratą inhibuoja tolimesnį signalo perdavimą) ir kt. [Martindale et al., 2002].

PI3K/Akt gali būti aktyvuojama tarpląstelinių signalų, integrinams sąveikaujant su substratu. Vienas galimų mechanizmų - integrinų skatinama PI3K aktyvacija per FAK (angl. *Focal adhesion kinase*). PI3K reguliavimo subvienetas p85 per SH2 domeną jungiasi prie FAK Tyr397 ir jį fosforilina. FAK aktyvacija skatina ląstelių judėjimą ir yra svarbi vėžio supresoriaus p53 reguliavime [Zeller, 2012].

1.8.2. Oksidacinio streso poveikis endotelinėms ląstelėms pirmtakėms

Oksidacinio streso poveikis endotelinėms ląstelėms, esant širdies ir kraujagyslių susirgimams, yra plačiai aprašytas. Dėl padidėjusio reaktyvių deguonies formų kiekio sukeliama biologinių struktūrų pažeidimai, kurie yra tiesiogiai susiję su kraujagyslių disfunkcija. Oksidacinis stresas neigiamai veikia EPC mobilizaciją ir kitas fiziologiškai svarbias funkcijas, pasižymi citotoksiniu poveikiu kraujagyslių endoteliui ir padidina superoksido kiekį. Dėl to sumažėja EPC kiekis kraujyje [Lin et al., 2012].

Veikiant ROS, indukuojama EPC žūtis apoptozės būdu. Tyrimai su modeliniais gyvūnais parodė, kad miokardo infarkto metu padidėjusi ROS gamyba lemia EPC kiekio sumažėjimą periferiniame kraujyje. Panaudojus statiną, buvo normalizuotas ROS kiekis, padidėjo VEGF baltymo kiekis KČ, nuo Akt priklausomas fosforilinimas ir eNOS aktyvumas. Šie pakitimai paskatino EPC mobilizaciją ir jų kiekio padidėjimą periferiniame kraujyje [Tousoulis et al., 2008; Lin et al., 2012].

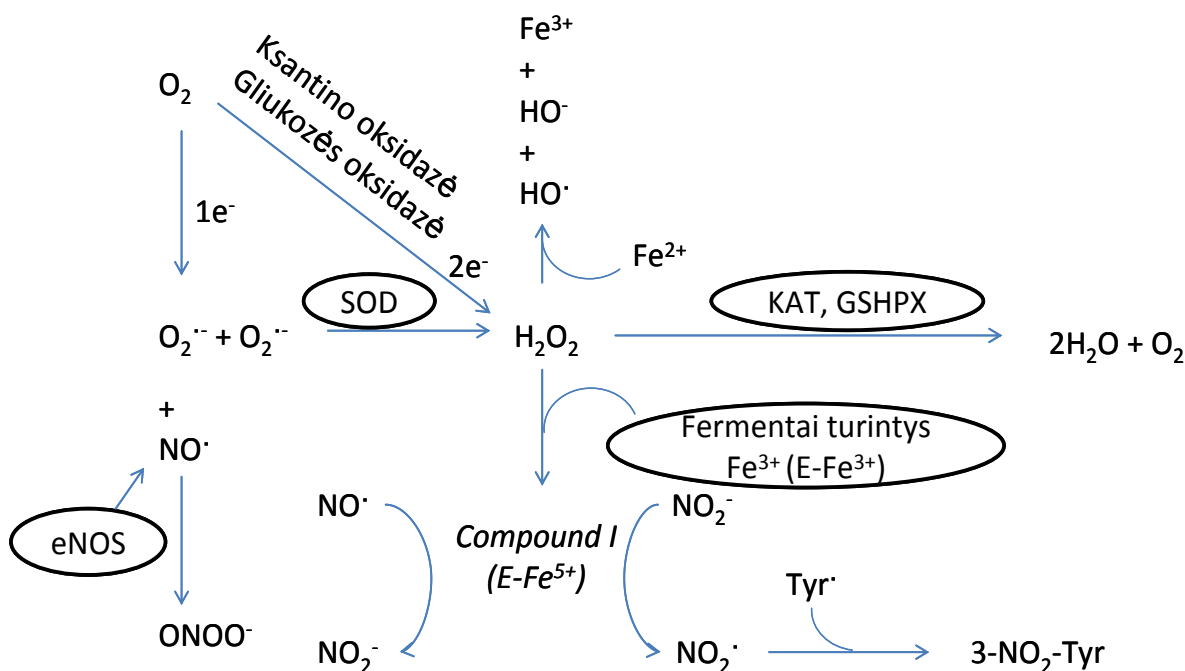
EPC būdinga didesnė nei diferencijuotoms endotelinėms ląstelėms, superoksido dismutazės raiška. Tai lemia šių ląstelių atsparumą oksidaciniam stresui ir palaiko funkcionalumą [Lin et al., 2012].

Oksidacinis stresas, sukliamas oksiduotų mažo tankio lipoproteinų (LDL, angl. *low-density lipoprotein*), lemia aterosklerozės vystimąsi. Oksiduoti LDL skatina EPC senėjimą ir eNOS inhibiciją. Rosso ir kt. nustatė, kad oksiduoti LDL sukelia EPC disfunkciją, dalyvaujant p53 signalo perdavimui. Priešingai negu LDL, didelio tankio lipoproteinai (HDL, angl. *high-density lipoprotein*) pasižymi antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis bei teigiamai veikia EPC fiziologiją [Tousoulis et al., 2008; Rosso et al., 2006].

Kraujagyslių biologijoje, ląstelės apsisaugo nuo oksidacinio streso naudodamos endogeninius antioksidantus, kurie palaiko ir apsaugo ląsteles tiesiogiai sugaudydami ROS ir taip sumažindami jų žalingą poveikį. Palyginus su diferencijuotomis endotelinėmis ląstelėmis, EPC ekspresuoja didesnį kiekį antioksidacinių fermentų [Lin et al., 2012]. Galima būtų teigti, kad tai padaro jas atsparesnes oksidacinio streso poveikiui.

1.8.3. Vandenilio peroksido produkcija ir metabolizmas

Žinduolių ląstelėse pagrindiniai ROS gamybos šaltiniai yra mitochondrijų elektronų pernašos grandinė, cytochromas P450, ksantino oksidazė, NAD(P)H oksidazė ir azoto oksido sintazė. Šios sistemos katalizuoja molekulinio deguonies vieno elektrono redukciją. Susidaręs $O_2^{\bullet-}$ inaktyvuoja $NO^{\bullet}$ ir susidaro peroksinitritas ($ONOO^-$). Tam tikras kiekis $O_2^{\bullet-}$ yra spontaniškai paverčiamas arba katalizuojamas superoksido dismutazės į H_2O_2 . $NO^{\bullet}$ praradimas gali skatinti tiesioginį virsmą į vandenilio peroksidą (4 pav.) [Cai, 2005].



1.4. pav. H_2O_2 generavimas ir metabolizmas ląstelėse [Cai, 2005].

Ksantino ir gliukozės oksidazių fermentinės reakcijos metu perduodami 2 elektronai molekuliniam deguoniui gali tiesiogiai produkuoti vandenilio peroksidą. Esant sunkiesiems metalams, H_2O_2 gali suformuoti reaktyvų hidroksi radikalą. Produkuojamas padidintomis koncentracijomis, H_2O_2 pradeda tiesiogiai oksiduoti baltymus ir lipidus, bei sukelia DNR pažaidas [40].

1.8.4. Vandenilio peroksido poveikis endotelinėms ląstelėms

H_2O_2 stimuliuoja endotelinių ląstelių augimą. Žinoma, kad padidinta antioksidacinių fermentų ekspresija inhibuoja ląstelių proliferaciją. Endotelinėse ląstelėse H_2O_2 aktyvuoja p90RSK, kuris yra svarbus EKR. Tai pat yra skatinama VEGF ekspresija ir sekrecija, dalyvaujant PKC ir NF κ B [Cai, 2005].

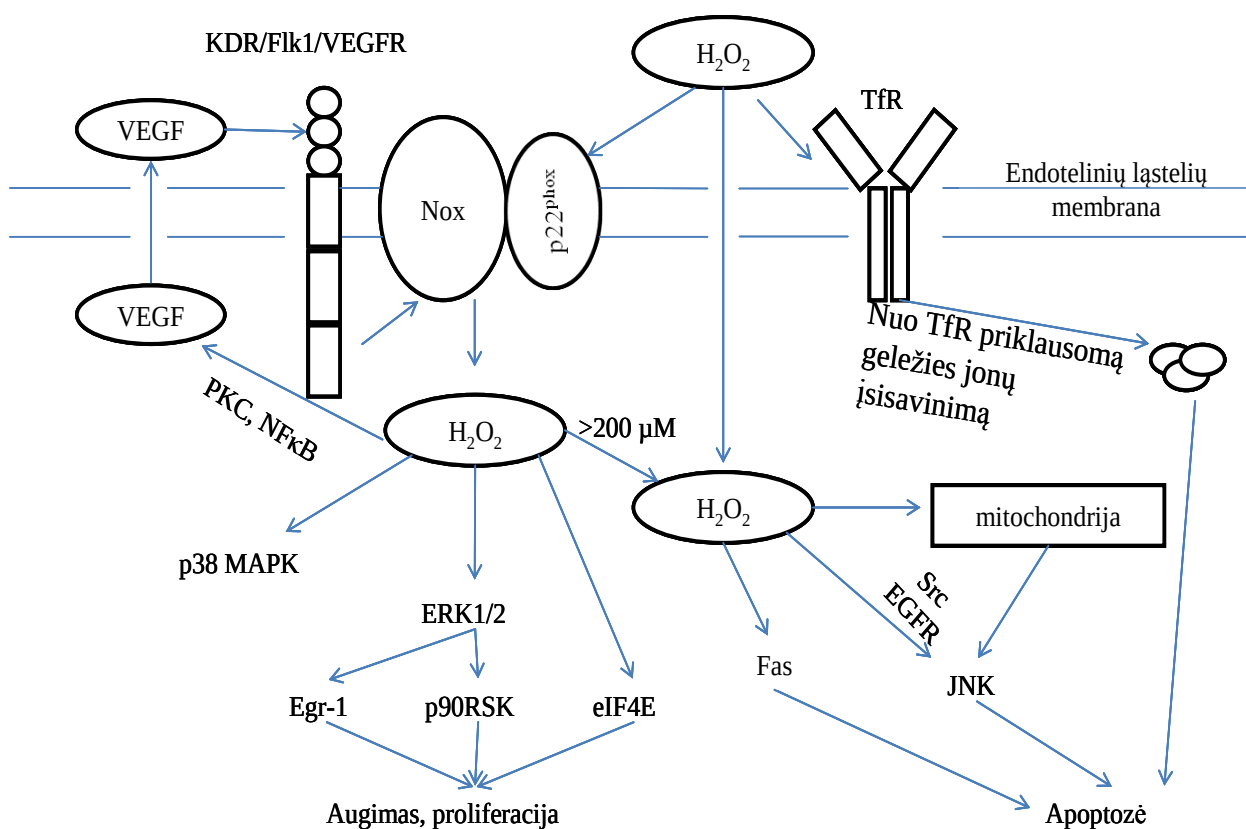
Didesnės negu 200 μ M vandenilio peroksido koncentracijos gali pasižymėti detaliu poveikiu endotelinėms ląstelėms ir skatinti jų apoptozę. Oksiduoti LDL aktyvina JNK ir inicijuoja vandenilio peroksido sukelimą ląstelių žūtį (5 pav.). Greičiausiai mitochondrijų

elektronų pernašos grandinės reakcijų metu susidarę ROS dalyvauja ląstelių žūties reguliacijoje. [Cai, 2005].

Citoskeleto reorganizacija endotelinėse ląstelėse gali būti kontroliuojama H_2O_2 poveikių. Vandenilio peroksidu sužadintose ląstelėse p38 MAP kinazė fosforilina HSP27 (aktiną jungiantis baltymas) ir, tokiu būdu, skatina citoskeleto reorganizaciją. Taip pat H_2O_2 stimuliuoja stresinių aktino gijų formavimąsi, dalyvaujant p38/HSP27 ir ERK 1/2 [Cai, 2005].

Vandenilio peroksidas stimuliuoja eNOS NO^* gamybą per PI3K/Akt ir ERK1/2 signalines kaskadas. Kada eNOS produktas yra $O_2^{\bullet-}$, endotelis naudoja H_2O_2 kaip NO^* analogą [Cai, 2005].

Uždegimo proceso metu H_2O_2 (50-100 μM) padidina paviršiaus adhezinių molekulių ekspresiją. Vandenilio peroksidas aktyvuodamas NF κ B skatina nuo TNF α priklausomą ICAM-1 ir VCAM-1 indukciją. Endotelinų trombocitų aktyvinančio faktoriaus ir P-selektino ekspresija gali taip pat būti indukuojama H_2O_2 . Visos šios molekulės skatina neutrofilų sąveiką su endoteliu [Cai, 2005].



1.5. pav. Vandenilio peroksido stimuliuojami endotelinų ląstelių signaliniai keliai [Cai, 2005].

2. MEDŽIAGOS. METODAI. APARATŪRA

2.1. Medžiagos

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

Ląstelių išskyrimui buvo naudojami: Ficoll-Paque PLUS (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*); CD133 MicroBead rinkinys (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*); tėkmės citometrijai naudoti monokloniniai antikūnai anti-CD133/2 konjuguoti su PE (fikoeritrinas) ir kontrolė pelių IgG2b konjuguoti su PE (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*); CellFix (*Becton Dickinson, JK*).

Etanolis 96,3%; MTT (3-(4,5- dimetiltiazol- 2 – yl) – 2,5- difeniltetrazolio bromidas (*Sigma-Aldrich*); 0,4% tripano mėlio tirpalas (*Sigma-Aldrich*); akridino oranžas (AO, *Molecular Probes*); etidžio bromidas (EB, *Molecular probes*); DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); vandenilio peroksidas 30% (*Sigma-Aldrich*); Triton X-100 reagentas (*Applichem*); Tween-20 tirpalas; pirminiai antikūnai prieš vinkuliną (*Millipore*); pirminiai antikūnai prieš p-FAK (*BD Transduction Laboratories*); antriniai antikūnai prieš peles IgG konjuguoti su AlexaFluor 488 fluoroforą (*Invitrogen*).

Ląstelių diferenciacijai buvo naudojami: alizarinas S (*Sigma-Aldrich*); Oil Red O (*Sigma-Aldrich*); Arklio serumas (*Gibco*); β-glicerofosfatas (*Sigma-Aldrich*); deksametazonas (*Sigma-Aldrich*); askorbino rūgštis (*Sigma-Aldrich*); linoline rūgštis (*Sigma-Aldrich*); Dulbecco modifikuota terpė (DMEM, *Gibco*).

Ląstelių transfekcijai naudoti reagentai: LIPOFECTAMINETM 2000 (*Life technologies*) ir OPTI-MEM (*Invitrogen*).

Darbe buvo naudojami ląstelių augimo flakonai; pipetės; 6, 12, 24, 96 duobučių plokštelės; 15 ir 50 mL konusiniai propileniniai mėgintuvėliai.

2.2. Aparatūra

Termostatas palaikantis 37 ° C temperatūrą ir 5% CO₂ (*Thermofisher Scientific*); laminaras (*Thermofisher Scientific*); invertuotas mikroskopas *Olympus CKX41*; fluorescencinis mikroskopas *Olympus IX51*; ląstelių vizualizavimo ir anlizavimo prietaisas *Cell-IQ (CM Technologies)*; centrifūga (*Thermofisher Scientific*), spektrofotometras (*Thermofisher Scientific*);

purtyklė (*Eppendorf Thermomix Comfort*); magnetinių dalelių separatorius *KingFisher* mL (*Thermo Scientific*); *FACSCalibur* (*Becton Dickinson, JAV*).

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Ląstelių išskyrimas

2.3.1.1. Vienbranduolių ląstelių išskirimas iš virkštelės kraujo ir kaulų čiulpų

Darbai su žmogaus virkštelės audiniu buvo atliekami vadovaujantis Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto pagal leidimą atlikti biomedicininį tyrimą Nr. 158200-13-681-222. EPC buvo išskiriamos, išfrakcionuojant virkštelės kraujo vienbranduolines ląsteles, tankio gradientu (1,077 g/ml) su Ficoll-Paque PLUS. Virkštelės kraujas pirmiausia buvo praskiestas su PBS, turinčiu 0,5% FBS ir 2 mM EDTA, santykiu 1:1. Laikantis sterilumo, 3 mL Ficoll-Paque PLUS supilta į 15 mL konusinius polipropileningus mėgintuvėlius su kamšteliais. Per mėgintuvėlio sienelę, atsargiai, kad nesumaišyti su Ficoll-Paque PLUS užnešta 4 mL skiesto kraujo. Centrifuguojama 400 x g 40 min. Vieno branduolio ląstelių frakcija pernešta į kitą 15 mL konusinį mėgintuvėlį ir užpilta 3 tūriais PBS, vėliau atsargiai sumaišyta. Centrifuguojama 100 x g 10 min, supernatantas buvo nupiltas. Nuosėdos buvo sumaišomos ir užpiltos 6 mL PBS ir vėl centrifuguojamos 100 x g 10 min. Nupylus supernatantą, ant nuosėdų užpilta DMEM terpės be serumo.

Vienbranduolių ląstelių išskirimas iš KČ buvo atliekamas pagal aukščiau aprašyta metodiką.

2.3.1.2. Magnetinis EPC ląstelių išskirimo metodas

EPC buvo išskiriamos iš vienbranduolių ląstelių frakcijos, gautos iš virkštelės kraujo. Buvo išskiriama subpopuliacija, turinti CD133 žymenį. Tam buvo naudojamas CD133 *MicroBead* rinkinys. Visos procedūros buvo atliekamos pagal gamintojo siūlomas rekomendacijas. Ląstelių išskirimui buvo imama 10^8 vienbranduolių virkštelės kraujo ląstelių. Reikiamas kiekis buvo suspenduotas su 300 µL PBS, 100 µL FcR blokuojančio buferio ir 100 µL CD133 *MicroBeads* (anti-CD133 monokloniniai antikūnai, konjuguoti su magnetinėmis dalelėmis); suspensija gerai išmaišyta ir palikta inkubuotis 30 min. 4-8 ° C temperatūroje. Po inkubavimo buvo pašalinami neprisirišę antikūnai, pridėjus į suspensiją 2 mL PBS ir nucentrifugavus 3000 aps./min 10 min. Nuosėdos, suspenduotos 500 µL PBS, toliau buvo frakcionuojamos *KingFisher* mL magnetinių dalelių separatoriumi. Atskyrimui buvo sukurta penkių etapų programa: A- ląstelės, 300µl buferio (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA), 100 µl FcR blokatoriaus ir 100 µl CD133 *MicroBeads*;

B, C, D - praplovimo buferis (PBS, 2mM EDTA, 0,5 % BSA), E – 200 µl atskyrimo terpės IMDM.

2.3.2. EPC ląstelių išskyrimas iš kraujagyslių

Endotelinės ląstelės pirmtakės buvo išskiriamos iš žiurkių plaučio kamieno. Eksperimentai su laboratoriniais gyvūnais buvo atlikti vadovaujantis LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimu naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam darbui Nr. 0212, 2011-02-04. Žiurkei atlikus eutanaziją, paimtas nedidelis kraujagyslės audinio fragmentas. Audinio fragmentas buvo inkubuojamas tripsino/kolagenazės tirpale. Išskirtos ląstelės užpilamos IMDM terpe ir laikomos termostate. Endotelinės ląstelės suformuoja monosluoksnį dviejų savaičių bėgyje ir toliau kultūra persėjama iki 2 kartų per savaitę.

2.3.3. Ląstelių auginimas *in vitro*

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

2.3.4. EPC ląstelių charakterizavimas tėkmės citometrijos metodu

Skirtingų šaltinių EPC ląstelėse buvo nustatomas specifinio endotelinėms ląstelėms CD133 paviršiaus baltymo buvimas. Buvo naudojami pelių monokloniniai antikūnai anti-CD133/2 konjuguoti su PE ir izotipinė nespecifinio rišimosi kontrolė — pelių IgG2B konjuguoti su PE. Ląstelės buvo paruošiamos pagal gamintojo rekomenduojamas metodikas. Paruošiami du bandiniai, kuriuose naudojama $10^6 - 10^7$ ląstelių suspenduotų 100 µL buferio (PBS, 2mM EDTA, 0,5 % BSA) ir pridėjus 10 µL monokloninių antikūnų arba izotipinę kontrolę. Suspensija išmaišoma ir inkubuojama 10 min. tamsoje 4-8 °C temperatūroje. Po inkubavimo pašalinami neprisirišę antikūnai, pridėjus į suspensiją 2 mL PBS, ir centrifuguojama 3000 aps./min 10 min. Nupilus supernatantą, ląstelės suspenduojamos 0,5 mL CellFix tirpalo ir matuojamos tėkmės citometru *FACSCalibur*. Analizei iš kiekvieno mėginio buvo renkama po 300 000 ląstelių ir duomenys buvo apdorojami *CELLQuest* programa.

2.3.5. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo vertinimas

Ląstelės buvo skaičiuojamos hemocitometru (Goriajevo kamera) ir šviesinio mikroskopo pagalba. Prieš tai ląstelių monosluoksnis suardomas ir suspenduojamos augimo terpėje. Paimamas nedidelis kiekis suspensijos.

Ląstelių koncentracija buvo apskaičiuojama pagal formulę:

$$LS = (N \times D \times 1000) : 0,9,$$

kur LS - ląstelių skaičius/mL; N – ląstelių skaičius kameroje; D – skiedimas.

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

$$LG \text{ (proc.)} = (G:N) \times 100,$$

kur G – gyvos ląstelės, N – bendras ląstelių skaičius.

2.3.6. Ląstelių dydžio vertinimas

Paruošiama ląstelių suspensija 3×10^4 ląst./mL tankio ir išsėjama į 6 šulinėlių plokštelę po 3mL. Ląstelės laikomos termostate vieną parą. Po 24 val. pašalinama augimo terpė, praplaunamos ląstelės PBS ir dažoma AO/EB tirpalu. Toliau ląsteles analizuojamos fluorescenciniu mikroskopu. Ląstelių didžiai nustatomi *Q-CAPTURE PRO 7* programa.

2.3.7. Ląstelių proliferacijos vertinimas

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

Paruošta ląstelių suspensija 3×10^4 ląst./mL tankio ir išsiejama į 24 šulinėlių plokštelę. Auginama termostate 37 °C temperatūroje, esant 5% CO₂. Atliekami 4 matavimai kas 24 valandas. Pašalinama augimo terpė ir užpilama po 500 µL MTT tirpalu (1 mg/mL). Inkubuojame termostate 1 valandą. Susidariusios nuosėdos tirpinamos 96,3% etanolyje: po 500 µL/šulinėliui prieš tai pašalinus MTT tirpalą. Optinis tankis (OT) matuojamas spektrofotometriškai (prie 570 nm bangos ilgiu) yra proporcingas gyvų ląstelių skaičiui. Gauti rezultatai išreiškiami santykinio ląstelių skaičiumi, t.y santykis išmatuoto OT tiriamuoju laikotarpiu su OT gautu proliferacijos vertinimo pradžioje.

2.3.8. Ląstelių diferenciacijos indukcija ir vertinimas

2.3.8.1. Miogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas

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

Diferenciacija vertinama ląstelės nudažius AO tirpalu. Vėliau analizuojama fluorescentiniu mikroskopu.

2.3.8.2. Osteogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas

Ląstelės išsėjamos į 24 šulinėlių plokštelę, tankis $3-4 \times 10^4$ ląst./mL. Ląstelės diferencijuojamos susidarius 80-90% monosluoksniui. Paruošiama diferenciacijos terpė: IMDM su antibiotikais (penicilinas 100 U/mL ir streptomicinas 100 µg/mL) ir pridedama 5×10^{-8} M deksametazono, 5 µg/mL askorbino rūgšties ir 10 mM β-glicerofosfato. Pašalinama augimo terpė, ląstelės praplaunamos PBS ir užpilama diferenciacijos terpė. Diferencijuojama 2 savaites, keičiant diferenciacijos terpę kas 3-4 dienas.

Diferenciacija vertinama ląstelės dažant 2% alizarino S tirpalu, paruoštu distiliuotame vandenyje. Diferenciacijos terpė nusiurbama ir ląstelės praplaunamos PBS. Ląstelės fiksuojamos 4% praformaldehidu (PFA) 10-15 min. kambario temperatūroje. Plaunama PBS. Pašalinus fosfatinį buferį, dažoma 5 min. kambario temperatūroje. Praplaunama distiliuotu vandeniu 4 kartus. Analizuojama invertuotu mikroskopu.

2.3.8.3. Adipogeninės diferenciacijos indukcija ir vertinimas

Ląstelės išsėjamos į 24 šulinėlių plokštelę, tankis yra $3-4 \times 10^4$ ląst./mL. Ląstelės diferencijuojamos susidarius 80-90% monosluoksniui. Paruošiama diferenciacijos terpė: DMEM su antibiotikais (penicilinas 100 U/mL ir streptomicinas 100 µg/mL) ir pridedama 100 nM γ-linolinės rūgšties. Pašalinama augimo terpė, ląstelės praplaunamos PBS ir užpilama diferenciacijos terpė. Diferencijuojama 1-2 savaites, keičiant diferenciacijos terpę kas 3-4 dienas.

Diferenciacija vertinama dažant Oil Red O dažu. Paruoštas 0,5% Oil Red O tirpalas izopropanoliuje praskiedžiamas 10 kartų distiliuotu vandeniu. Diferenciacijos terpė nusiurbama ir ląstelės praplaunamos PBS. Ląstelės fiksuojamos 4% praformaldehido (PFA) tirpalu 10-15 min. kambario temperatūroje. Plaunama PBS. Pašalinus fosfatinį buferį, užpilamas dažas ir inkubuojama 30-60 min. kambario temperatūroje. Praplaunama distiliuotu vandeniu 3 kartus. Analizuojama invertuotu mikroskopu.

2.3.9. Ląstelių migracijos vertinimas

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

Paruošta ląstelių suspensija: virkštelės kraujo endotelinių ląstelių (VKEL) tankis 10^5 ląst./mL; plaučio kamieno endotelinių ląstelių (PKEL) tankis 7×10^4 ląst./mL (PKEL su padidinta

Akt raiška ir vektorinės ląstelės išsiejamos 7×10^4 ląst./mL tankiu). Auginamos 16-24 valandas. Susidarius monosluoksniui, padaroma žaizda, pipetės galu perbraukiant ląstelių monosluoksnį. Pašalinama augimo terpė, ląstelės atsargiai praplaunamos fosfatinio buferiu ir įpilama šviežios augimo terpės. Ląstelės veikiamos didėjančiomis H_2O_2 koncentracijomis (300 μ M, 400 μ M, 500 μ M). Migracija įvertinama ląstelių vizualizavimo ir analizavimo prietaisu *Cell-IQ* (prietaisas turi įrengtą kamerą, palaikančią 37 °C temperatūrą; CO_2 padavimo sistemą; šviesinį, fluorescentinį mikroskopą ir fotokamerą). Gauti duomenys analizuojami *Cell-IQ Analyser* programa.

2.3.10. Ląstelių su padidinta Akt raiška gavimas

Dieną prieš transfekciją ląstelės išsėjamos į 24 šulinėlių plokštelę po 5×10^4 ląstelių/šulinėlyje IMDM terpėje su 10 % serumo, be antibiotikų. Kiekvienai transfekcijai 0,5 μ g DNR praskiedžiama 25 μ l OPTI-MEM (Invitrogen) terpės be serumo. Atskirai 25 μ l terpės be serumo praskiedžiama 2 μ l lipofektamino reagento ir inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje. Praskiesti DNR ir lipofektamino reagentas sumaišomi, inkubuojami 40 min. kambario temperatūroje, kad susiformuotų DNR-lipofektamino kompleksai. Į mišinį įpilama 150 μ l OPTI-MEM terpės be serumo. Iš šulinėlių su ląstelėmis išsiurbiamas auginimo terpė, įpilama 200 μ l IMDM terpės be serumo ir užpilamas transfekcijos mišinys. Inkubuojama 6 val., 37°C temperatūroje. Tada užpilama 400 μ l IMDM terpės su dvigubu serumo kiekiu. Praėjus trims paroms po transfekcijos, ląstelės persėjamos IMDM terpėje su 10 % FBS ir 150 μ g/ml genocidino. Auginamos genocidinui atsparių ląstelių kolonijos.

2.3.11. Baltymų elektroforezė ir imunoblotingas

2.3.11.1. Ląstelių lizavimas

Paruošiama ląstelių suspensija 3×10^5 ląst./mL ir išsėjama į augimo flakoną, laikoma termostate. Po paros ląstelės lizuojamos (10mM TrisHCl pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 proc. Triton X-100) (10^6 ląstelių naudojama 250 μ L lizės buferio) prieš tai pridėjus 20 μ g/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 (pH 7,2). Lizuojamos ląstelės laikomos ledo 20 min. Lizuotų ląstelių suspensija perkeliama į ependorfinius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 0-4° C temperatūroje, 20000 x g 15 min.. Supernatantas sumaišomas su buferiu lygiomis dalimis. Inkubuojama 5 min verdančiame vandenyje, kad denatūruotų baltymai.

Buferis: 25% 1M TrisHCl pH 6,8; 40% glicerolio; 8% SDS; 4% merkaptioetanolio; 1% bromfenolio mėlio dažo.

2.3.11.2. Baltymų elektroforezė

Reikalingi tirpalai:

- Akrilamido/Bis-akrilamido tirpalas 30% akrilamido; 0,8% bis-akrilamido;

- TrisHCl/SDS tirpalas: 1,5 M TrisHCl, pH 8,8; 0,4% SDS;
- TrisHCl/SDS tirpalas: 0,5 M TrisHCl, pH 6,8; 0,4% SDS;
- 10% (NH₄)₂S₂O₈ (AP) – 1 mL;
- Forezės buferis: 25 mM Tris; 0,2 M glicinas; 0,1 proc. SDS;
- Pernašos buferis: 10 mM Tris pH 8,3; 90 mM glicino; 0,05 proc. SDS; 10 proc. metanolio.
- 12% skiriamasis gelis: akrilamido tirpalas – 4 mL; TrisHCl/SDS, pH 8,8 – 2,7 mL; H₂O – 3,2 mL; AP – 100 µL; TEMED – 15,6 µL.
- 4% koncentruojamasis gelis: akrilamido tirpalas 0,8 mL; TrisHCl/SDS pH 6,8 – 1,3 mL; H₂O – 2,9 mL; AP – 48 µL; TEMED – 14 µL.

Pradžioje polimerinamas skiriamasis gelis. Sustingus geliams, įpilame forezės buferio. Į takelius įnešame po 50 µL ląstelių lizato. Paleidžiame elektros srovę. Kai bromfenolio mėlio dažas pasiekia skiriamojo gelio pabaigą, išjungiamo srovę.

2.3.11.3. Imunoblotingas

Baltymai iš poliakrilamido gelio pernešami ant PVDF membranos (membrana 15 s. inkubuojama metanolyje, paskui 2 min. vandenyje). Prieš naudojimą laikoma pernešimo buferyje. Naudojamas pusiau šlapias pernešimas, srovė 5 mA/cm². Pernešimo trukmė – 15 min.

Plovimo tirpalas: 150 mM NaCl; 10 mM TrisHCl pH 7,5; 0,02-0,05% Tween-20; ruošiamas dejonizuotame vandenyje.

Po pernešimo membranos inkubojamos 1 val. blokavimo tirpale (1% neriebaus pieno milteliai; 0,05% Tween 20; 0,01% NaN₃). Po inkubavimo plaunama du kartus plovimo tirpalu. Veikiama pirminiais antikūnais ir inkubuojama kambario temperatūroje 1 val. Po to, nusiurbus priminius antikūnus, plaunama plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Užnešami antriniai antikūnai, konjuguotus 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.

2.3.12. Imunofluocitochemija

Ląstelės fiksuojamos 4% paformaldehido tirpalu, paruoštu fostiniame buferiniame tirpale 10-15 min kambario temperatūroje. Pašalinus PFA plaunama 3 kartus po 5 min. 0,2% Triton X-100 tirpalu, paruoštu fostiniame buferiniame tirpale. Blokuojama PBS su 3% jaučio serumo albuminu ir 10% FBS 1 val. kambario temperatūroje. Pašalinus blokavimo tirpalą, inkubuojame su pirminiais antikūnais prieš vinkuliną (skiedžiama blokavimo tirpale 1:200) arba p-FAK (skiedžiama blokavimo tirpale 1:500) 1 val. kambario temperatūroje. Po valandos inkubavimo

antikūnai nusiurbiami ir ląstelės plaunamos PBS su 0,05% Tween-20 tirpalu 3 kartus po 5 min. Toliau inkubuojame su antriniais antikūnais prieš pelių Fab su konjuguota fluorescentine žyme (AlexaFluor 488) 1 val. kambario temperatūroje (mėginiai laikomi tamsoje). Antriniai antikūnai ruošiami PBS ir skiedžiami 1:400. Po inkubavimo antikūnai pašalinami ir praplaunama 3 kartus PBS po 5 min.. Inkubuojama su 5 µg/mL DAPI 5 min ir vėl praplaunama su PBS 3 kartus po 5 min.. Mėginiai iki analizės laikomi PBS ir analizuojami fluorescentiniu mikroskopu.

2.3.13. Mikrosubstratų paruošimas

Mikrosubstratai buvo pagaminti Fizinių ir technologinių mokslų centre. Darbui su ląstelėmis mikrosubstratai buvo laikomi PBS, pridėjus antibiotikų (penicilino 200 U/mL ir streptomicino 200 µg/mL). Laikomi 4 °C temperatūroje mažiausiai 24 valandas.

2.3.14. Ląstelių sąveikos su mikrosubstratais vertinimas

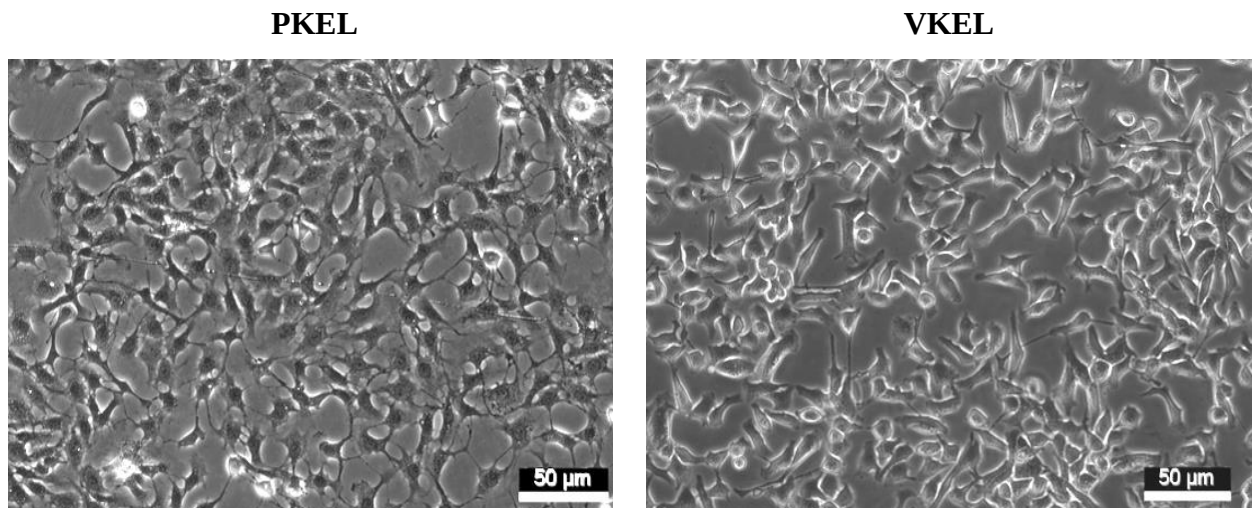
Pašalinamas antibiotikų tirpalas ir praplaunama PBS. Ant substratų užpilama ląstelių suspensija, kurios tankis neviršija 2×10^4 ląst./mL. Sąveikai su substratais įvertinti PKEL su padidinta Akt raiška ir vektorinės ląstelės buvo veikiamos skirtingai - suformuotos 4 tyriamų objektų grupės - kontrolinė grupė; purtyta 600 rpm 15 min. grupė; H₂O₂ paveikta grupė bei purtyta grupė esant H₂O₂ poveikiui. Ląstelės ant mikrosubstratų laikomos termostate palaikančiame 37 °C temperatūrą ir 5% CO₂. Atliekama imunofluorescentinė mėginių analizė (žiureti 2.3.11.). Ląstelių sąveika su substratu analizuojama fluorescentiniu mikroskopu.

2.3.15. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis Microsoft Office Excel 2003 programa. Duomenys pateikti kaip vidurkis $\pm$ SN, reikšmės ir paklaidos buvo skaičiuojamos iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų.

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Pastarąjį dešimtmetį ypatingas dėmesys skiriamas nepilnos diferenciacijos ląstelėms ir jų inicijuojamiems regeneracijos procesams. Todėl ypatingai svarbu išsiaiškinti molekulinis mechanizmus, reguliuojančius šių ląstelių adheziją, proliferaciją, diferenciacijos potencialą, procesus, kurie užtikrina transplantuojamų ląstelių išgyvenamumą ir integraciją patologiniame židinyje. Endotelinės ląstelės pirmtakės dalyvauja kraujagyslių atstatyme, todėl jos turi perspektyvą širdies ir kraujagyslių ligų gydyme. Šiuo metu EPC skirstomos į dvi grupes pagal kilmę. Tai hematopoetinės ir nehematopoetinės kilmės EPC. Šio darbo metu buvo lyginamos šių dviejų grupių ląstelių funkcinės savybės. Tuo tikslu buvo parinktos metodikos šių ląstelių išskyrimui ir gautos dvi pirminės ląstelių linijos. Tai žiurkės plaučių kamieno kilmės endotelinės ląstelės pirmtakės (PKEL) bei žmogaus virkštelės kraujo endotelinės ląstelės pirmtakės (VKEL). 3.1. paveiksle pateikiamas šių ląstelių monosluoksniu vaizdas.



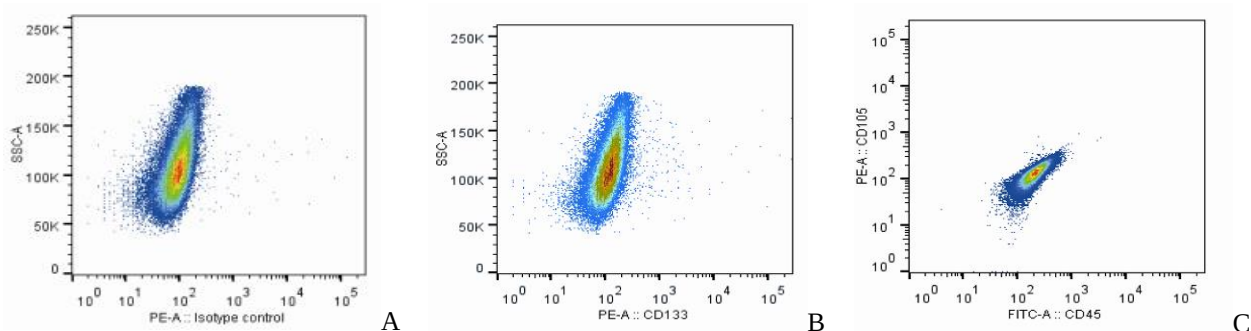
3.1. pav. Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, monosluoksniu vaizdas.

Vizualiai įvertinę tiriamų ląstelių morfologiją, pastebėjome skirtumus. Tolesniuose tyrimuose gautos pirminių ląstelių linijos buvo detalčiau charakterizuojamos.

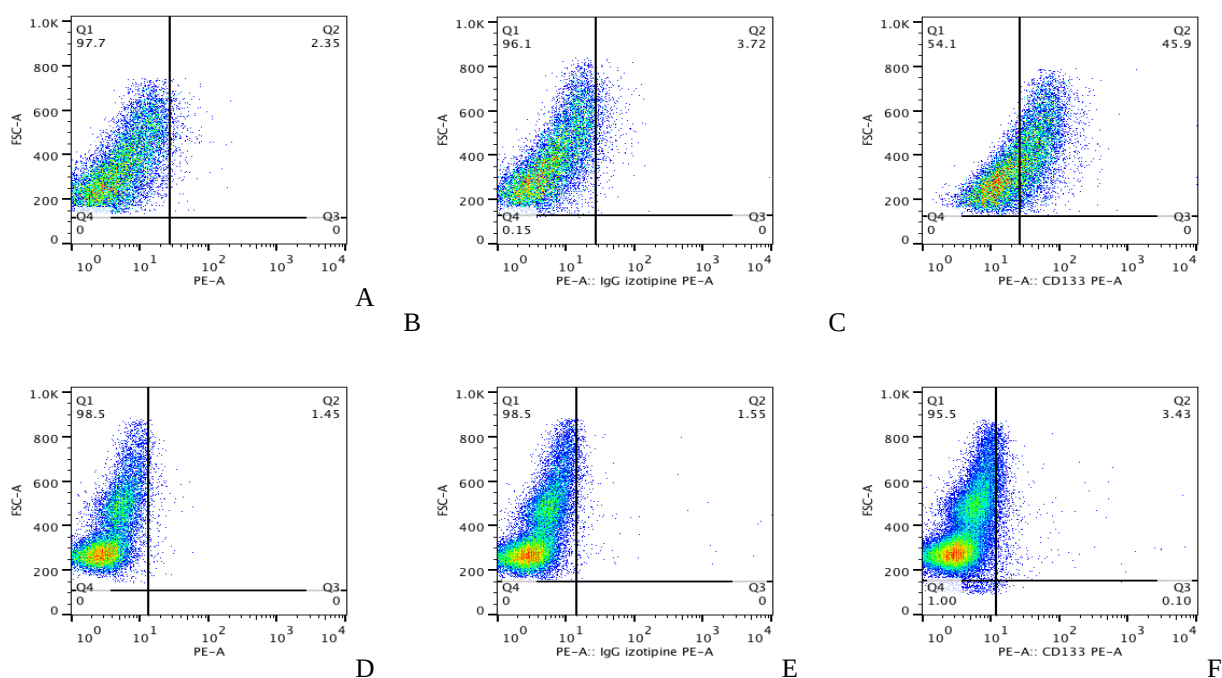
3.1. Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, charakterizavimas

Paviršiaus žymenų analizė. Iki šiol laikoma, kad būdingiausi EPC žymenys yra CD34⁺ ir VEGFR-2. EPC taip pat ekspresuoja nesubrendusių ląstelių markerį CD133. Nors šis žymuo nėra unikalus EPC, tačiau laikomas vienu būdingiausiu, o jo raiška priklauso nuo EPC diferenciacijos stadijos. Todėl pirmiausia atlikome gautų dviejų EPC ląstelių liniją

charakterizavimą tėkmės citometrijos būdu pagal CD133 paviršiaus markerį (3.2 ir 3.3. pav.). Gauti duomenys parodė, kad virkštelės kraujotakines endotelines ląsteles po 14 dienų kultivavimo turėjo išreikštą šio žymens ekspresiją (45% ląstelių). Kultivuojant šias ląsteles *in vitro* iki 13 dienų pasažo, šio žymens stipriai sumažėjo (3,43% ląstelių). Tuo tarpu plaučio kamieno endotelinėse ląstelėse CD133 paviršiaus raiška nebuvo stipriai išreikšta.



3.2. pav. Žiurkių PKEL charakterizavimas pagal CD133, CD45 ir CD105 paviršiaus žymenis. A - Izotipinė kontrolė; B - CD133 raiška; C - CD105 ir CD45 raiška.

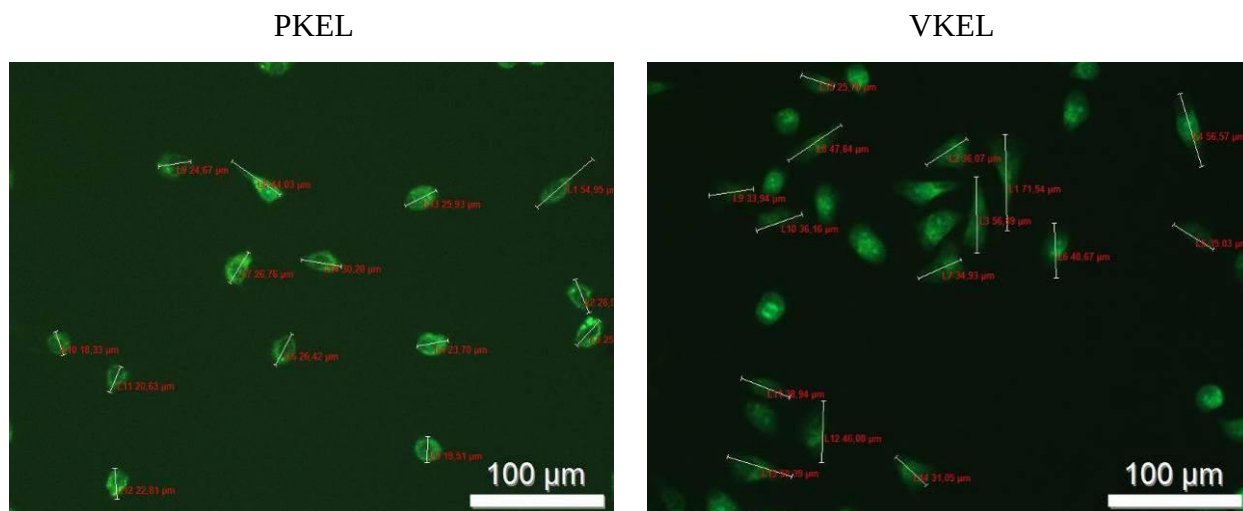


3.3 pav. VKEL charakterizavimas pagal CD133 paviršiaus žymenį. A – C -VKEL kultivuotos 14 dienų: A - kontrolė, B - izotipinė kontrolė, C - CD133 raiška ląstelėse. D – F - VKEL kultivuotos iki 13 pasažo: D - kontrolė, E - izotipinė kontrolė, F - CD133 raiška ląstelėse.

Ląstelių dydžio palyginimas. Įvertinus tiriamų ląstelių morfologiją, buvo pastebėti skirtumai. Todėl toliau buvo palygintas ir nustatytas tiriamų ląstelių dydis, kuris svarbus ir tolimesniuose tyrimuose. Gauti rezultatai pateikiami 3.4. paveiksle bei 3.1 lentelėje. Skirtingų šaltinių

endotelinių ląstelių pirmtakų dydžiai skyrėsi net iki pusantro karto. VKEL, kaip ir PKEL, pasižymėjo plačia dydžio variacija. VKEL vidutinis dydis buvo žymiai mažesnis, negu PKEL.

Taigi, iš skirtingų šaltinių gautos ląstelės skiriasi ne tik morfologiškai, bet ir pagal paviršiaus žymenų raišką bei dydį.



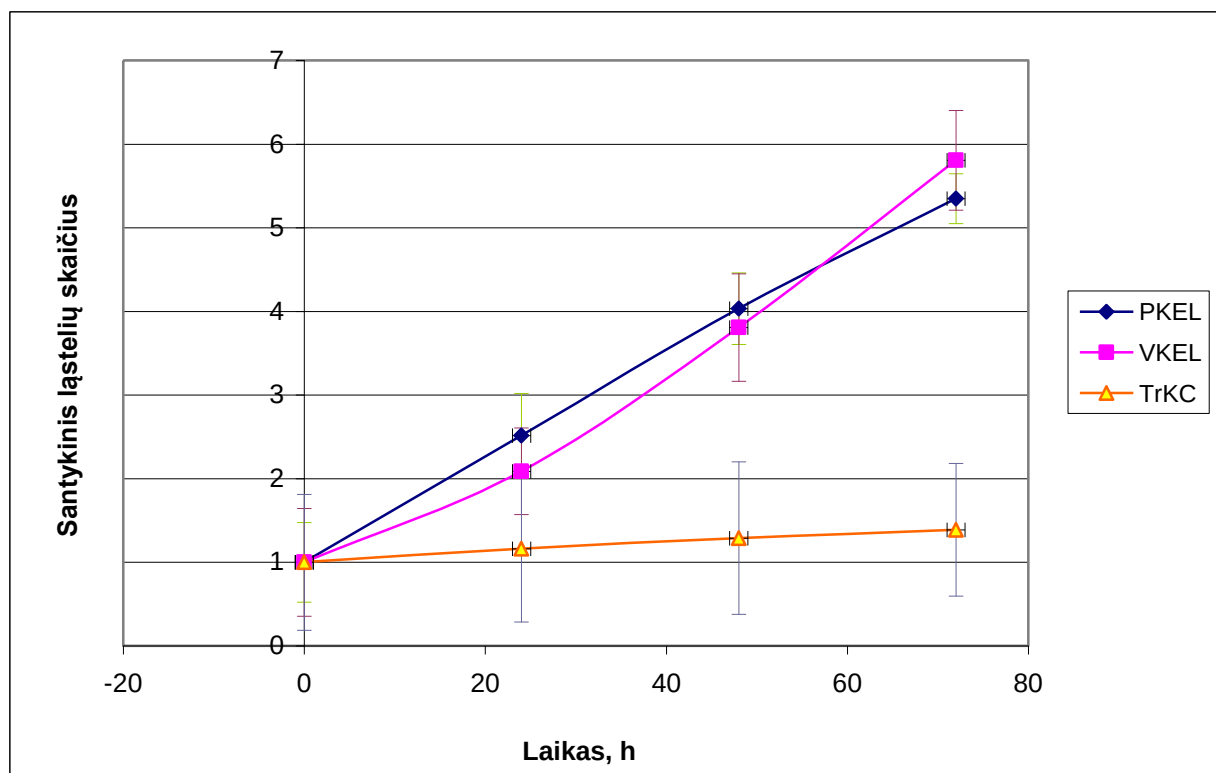
3.4 pav. PKEL ir VKEL ląstelių dydžio palyginimas. Nuotraukos gautos fluorescentiniu mikroskopu.

3.1. lentelė. PKEL ir VKEL ląstelių skaitiniai dydžiai ir jų standartinė paklaida. Skaitiniai ląstelių dydžiai gauti apdorojus nuotraukas Q-CAPTURE PRO 7 programa.

Ląstelės	Ląstelių skaitinis dydis, μm
Plaučio kamieno endotelinės ląstelės	29 ± 9
Virkštelės kraujo endotelinės ląstelės	43 ± 14

Ląstelių proliferacijos palyginimas. Aukštas ląstelių proliferacinis potencialas yra viena iš kamieninių ląstelių savybių. Būtent tokiu proliferaciniu potencialu pasižymi PKE ląstelės, kurios kultūroje jau yra palaikomos daugiau nei 100 pasažų. Tai parodo šių ląstelių nepilną direnciaciją, nepaisant to, kad jos neekspresuoja CD133 – vieno pagrindinių EPC ląstelių žymenų. Iš kitos pusės šioms ląstelėms yra būdinga CD45 (hematopoetinių ląstelių) žymens raiška. Taigi, šioje darbo dalyje lyginome PKEL ir VKEL dauginimosi greitį. Šioje serijoje eksperimentų buvo panaudota dar viena - trečio šaltinio EPC piminė ląstelių linija. Tai iš triušio kaulų čiulpų gautos EPC (TrKC).

Iš 3.5 paveiksle patektų proliferacijos palyginimo rezultatų matoma, kad PKEL ir VKEL linijų ląstelės dauginosi panašiu intensyvumu – pirmasis populiacijos padvigubėjimo laikas registruotas 16 ir 22 val. atitinkamai PKE ir VKEL ląstelėms. Antrą kartą šių ląstelių populiacija padvigubėjo 48 ir 50 tyrimo valandą. Šiuo atveju taip pat kiek greičiau dauginosi PKEL ląstelės.



3.4 pav. Endotelinų ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, proliferacijos palyginimas. Ląstelių proliferacija vertinta MTT metodu (žr. Medžiagų. Metodų. Aparatūros sk.). Gauti rezultatai išreikšti santykiniais ląstelių skaičiumi t.y. santykiu optinio tankio, proporcingo ląstelių skaičiui, tiriamuoju laikotarpiu su optiniu tankiu pradiniu laikotarpiu (24 val. po ląstelių išsėjimo). Pateikiamas mažiausiai 6 nepriklausomų eksperimentų (PKEL ir VKEL atveju) vidurkis. TrKC proliferacija vertinta tirmis nepriklausomais eksperimentais. Čia: TrKC-triušių kaulų čiulpų endotelinės ląstelės.

Trečioji tirta ląstelių linija TrKC dauginosi labai lėtai ir visą jų stebėjimo laikotarpį ląstelių populiacijos dydis nepadvigubėjo. Todėl šios linijos buvo atsisakyta tolesniuose tyrimuose.

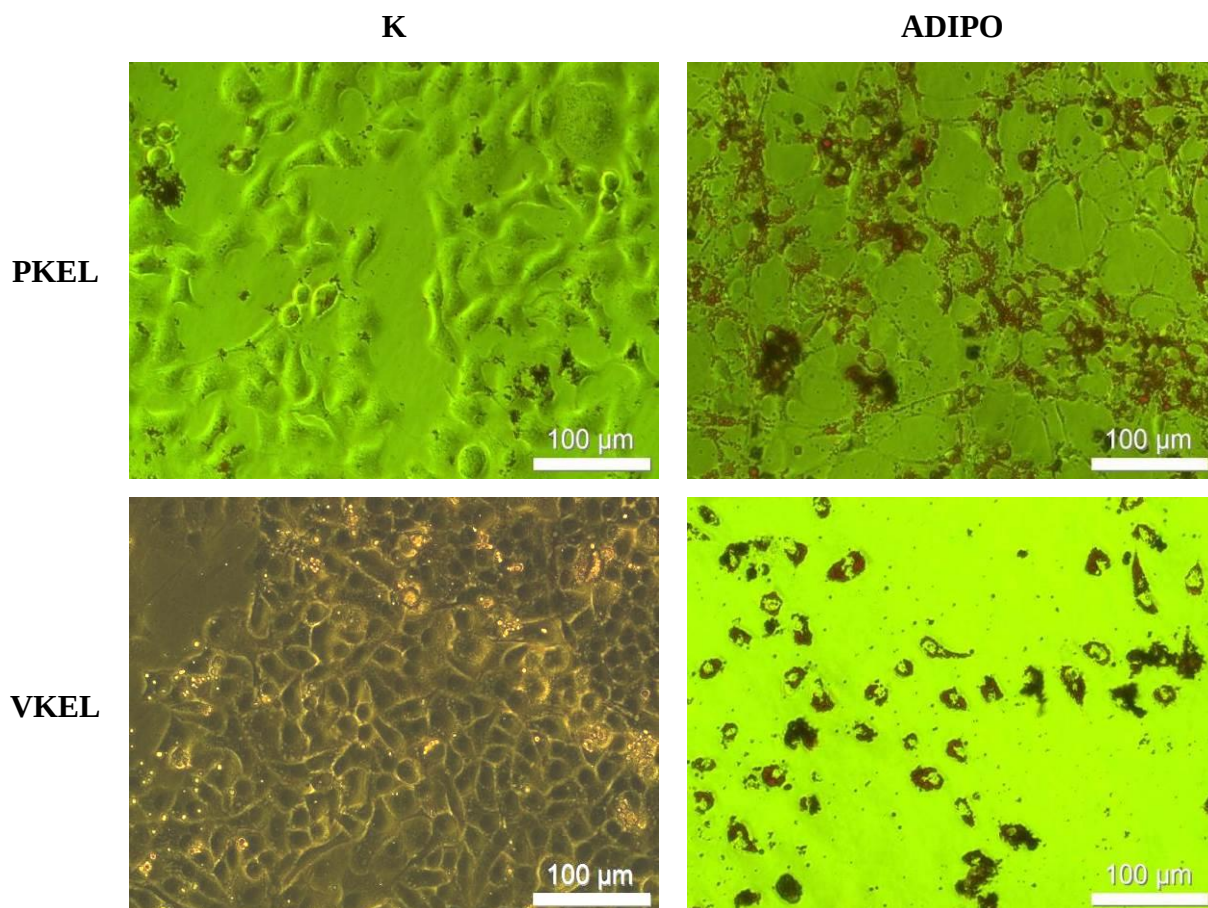
3.2. Diferenciacijos potencialo palyginimas

Nors cirkuliuojančios EPC jau atrastos daugiau nei prieš 15 metų, tačiau nepakanka duomenų apie tai, ar mobilizuotos EPC negrįžtamai diferencijuojamos tik į endotelio ląsteles, ar išlaiko ir nesubrendusių kamieninių ląstelių savybes – t.y. gebėjimą diferencijuotis į kitų audinių, pavyzdžiui, riebalinio, kaulinio, raumeninio, kremzlinio ir kt., ląsteles. Todėl šioje darbo dalyje vertinau gautų pirminių PKE ir VKE ląstelių diferenciacijos potencialą. Tuo tikslu, tiriamose ląstelių populiacijoje indukavau ląstelių diferenciaciją adipogenine, osteogenine ir miogenine kryptimis.

3.2.1. Diferenciacija riebalinio audinio formavimosi kryptimi

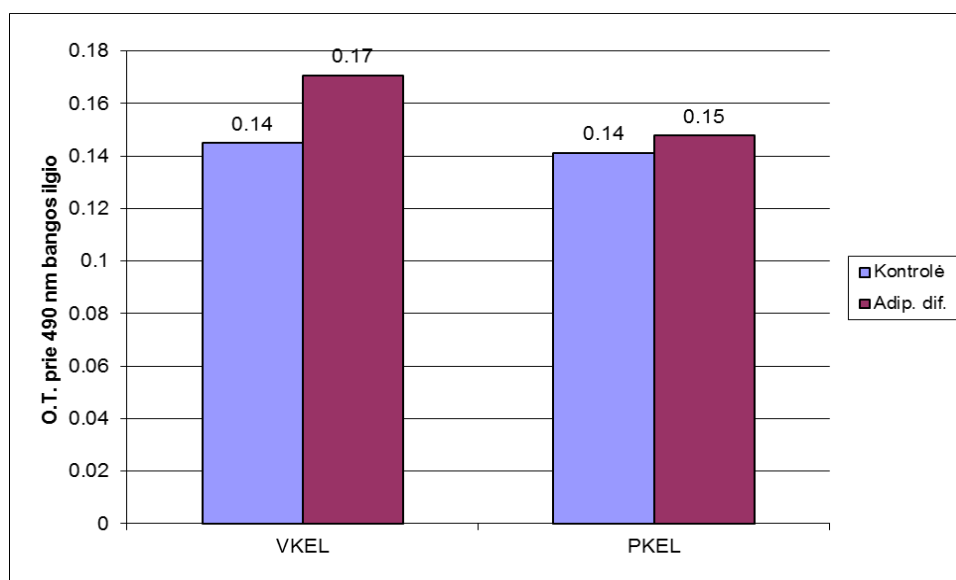
VKEL ir PKEL ląstelės buvo diferencijuojamos riebalinio audinio formavimosi kryptimi dvi savaites, keičiant diferenciacijos terpę kas keturias dienas. Kokybiškai diferenciacija buvo

įvertinta dažant ląsteles Oil Red O dažu. Rezultatai pateikti 3.6 paveiksle. Pagal paveiksle gautus rezultatus matyti, kad VKE ir PKE ląstelėms, kuriose 2 savaites buvo indukuojama diferenciacija adipogenine linkme, susiformavo riebalų sandaupos būdingos adipocitams. Nudažius kontrolinius mėginius augintus terpėje be diferenciaciją sukeliančių veiksnių, rezultatas buvo neigiamas.



3.6. pav. Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, diferenciacijos adipogenine kryptimi palyginimas. Ląstelių diferenciacija buvo indukuojama kaip aprašyta Medžiagų. Metodų. Aparatūros sk.). Kokybinis diferenciacijos vertinimas atliktas dažant ląsteles Oil Red O dažu.

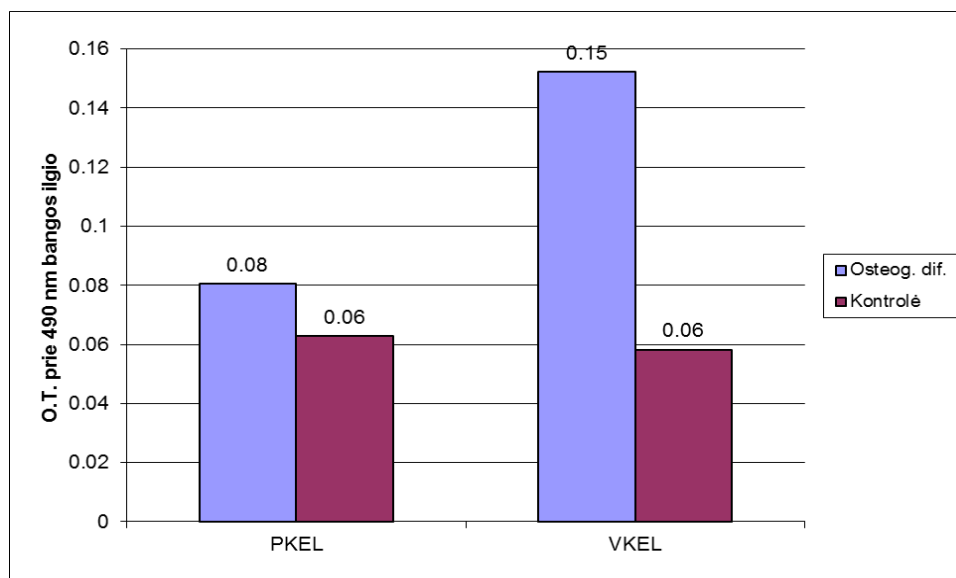
Kokybinio vertinimo rezultatus patvirtino, kiekybinis adipogeninės diferenciacijos vertinimas – abi tirtos ląstelių linijos diferencijavosi adipogenine linkme, tačiau skirtingu laipsniu (3.7. pav.). PKEL ląstelių populiacijoje diferenciacija riebalinio audinio linkme vyko silpniau.



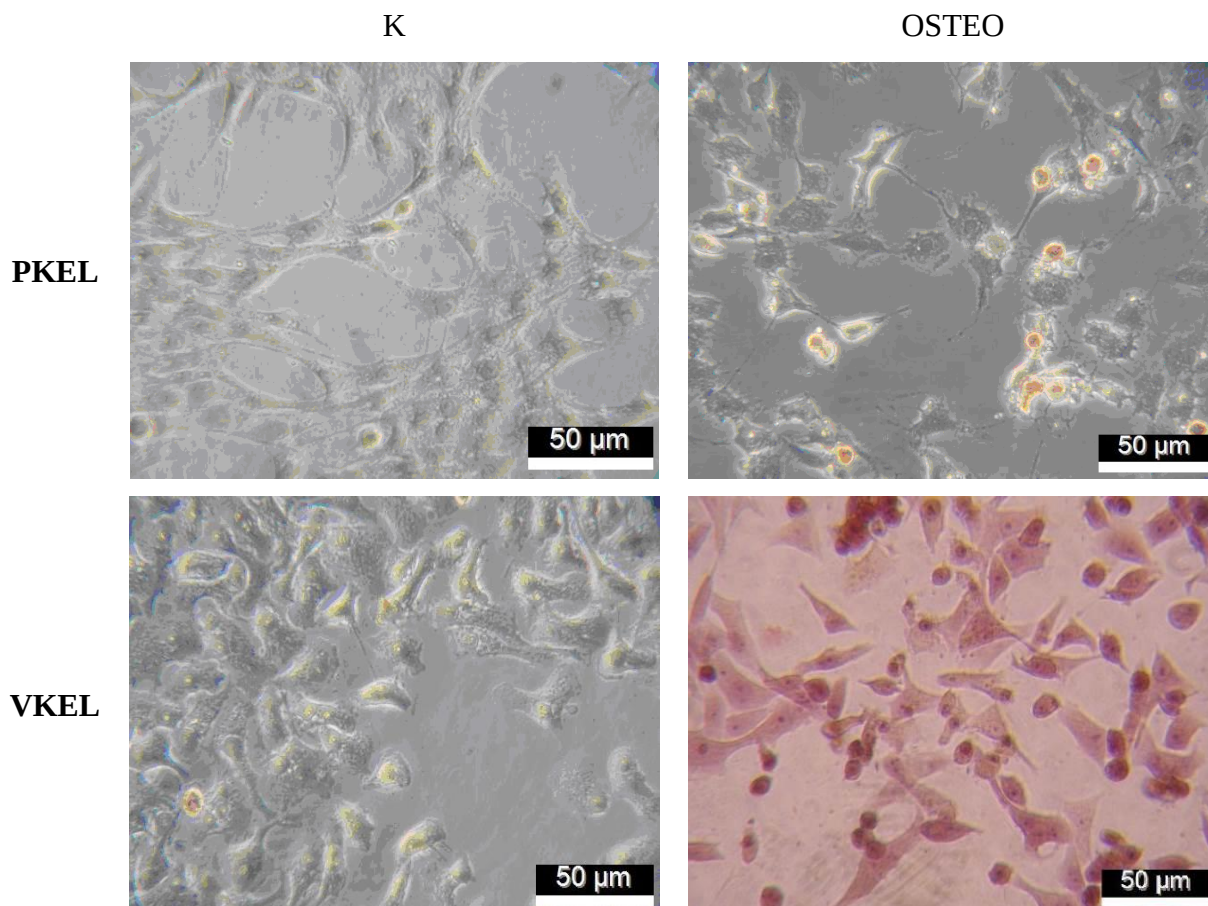
3.7 pav. Kokybinis endotelinųjų ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, diferenciacijos adipogenine kryptimi vertinimas. Adipogeninė diferenciacija buvo vertinama kiekybiškai, ištirtinus Oil Red O dažą izopropanolyje ir gauto tirpalo sugertį matuojant 490 nm bangos ilgyje.

3.2.2. Diferenciacija kaulinio audinio formavimosi kryptimi

Analogiški eksperimentai atlikti siekiant įvertinti tiramų ląstelių gebėjimą diferencijuotis į kaulinio audinio ląsteles. Šiuo atveju vėlgi geriau diferenciovosi osteogenine kryptimi EPC ląstelės gautos iš virkštelės kraujo (3.8 ir 3.9. pav.). PKEL diferenciacija osteogenine linkme buvo nežymi.



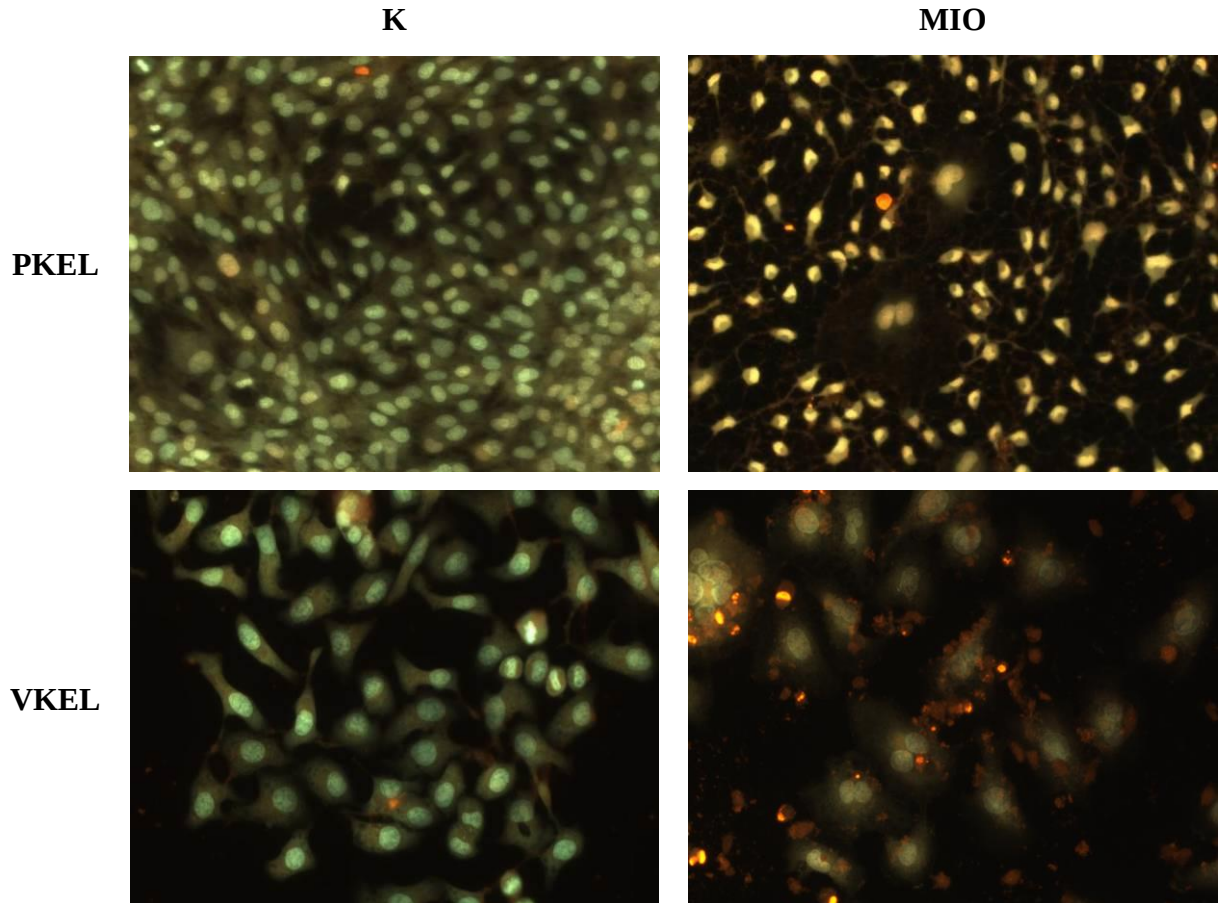
3.8. pav. Kokybinis endotelinųjų ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, diferenciacijos osteogenine kryptimi vertinimas. Osteogeninė diferenciacija buvo vertinama kiekybiškai, ištirtinus Alizarino S dažą perchloro rūgštyje ir gauto tirpalo sugertį matuojant 490 nm bangos ilgyje.



3.9. pav. Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, diferenciacijos osteogenine kryptimi palyginimas. Ląstelių diferenciacija buvo indukuojama kaip aprašyta Medžiagų. Metodų. Aparatūros sk.). Kokybinis diferenciacijos vertinimas atliktas dažant ląsteles Alizarino S dažu.

3.2.3. Diferenciacija raumeninio audinio formavimo kryptimi

Raumenine kryptimi VKEL ir PKEL ląstelės buvo diferencijuojamos dvi savaites. Žymių morfologinių pokyčių viso diferenciacijos laikotarpio metu nebuvo pastebėta. Diferencijuotos ir kontrolinės ląstelės buvo dažomos akridino oranžo dažu, kuris leidžia vizualizuoti ląstelių branduolius (3.10 pav.). Būtent branduolių skaičius ląstelėje yra vienas iš miogeninės diferenciacijos bruožų. Įvertinus ląstelių susiliejo indeksus, t.y. ląstelių, turinčių du ir daugiau branduolių, su visų ląstelių skaičiumi, nustatėme, kad ir šiuo atveju efektyviau miogenine linkme diferenciuojosi VKE ląstelės. Nustatyti ląstelių susiliejo indeksai: VKEL - 33,3% ir PKEL - 16,48%.



3.10. pav. Endotelinių ląstelių pirmtakių, gautų iš skirtingų šaltinių, diferenciacijos miogenine kryptimi palyginimas. Ląstelių diferenciacija buvo indukuojama kaip aprašyta Medžiagų. Metodų. Aparatūros sk.). Kokybinis diferenciacijos vertinimas atliktas dažant ląsteles akridino oranžo dažu.

3.3. Oksidacinio streso poveikio endotelinių ląstelių pirmtakių migracijai tyrimas

3.3.1. PKEL ir VKEL ląstelių migracija

Žinoma, kad oksidacinis stresas gali silpninti EPC ląstelių migracines galimybes. Ląstelių migracija – procesas svarbus šių ląstelių mobilizacijai į pažeistą audinį, siekiant atstatyti jo funkcijas. Todėl šioje darbo dalyje lyginome PKEL ir VKEL ląstelių migracinę potencialą oksidacinio streso sąlygomis. Tuo tikslu, tiriamos ląstelės buvo veikiamos vandenilio peroksido – oksidacinio streso imitatoriaus, skirtingomis koncentracijomis ir vertinamas PKEL ir VKEL gebėjimas atstatyti monosluoksniu pažaidą. Ląstelių judėjimas buvo sekamas naudojant ląstelių vizualizavimo ir analizavimo prietaisą *Cell-IQ*. Gauti duomenys buvo apdorojami *Cell-IQ Analyser* programa ir MS Excel 2003.

Iš 3.11 paveiksle pateikiamų duomenų matyti, kad 300 μM vandenilio peroksido koncentracija stabdė PKEL ląstelių migraciją. Žaizdos atstatymas užtruko beveik 50 val. t.y. beveik 2 kartus ilgiau nei kontrolinių ląstelių. Esant 400 μM vandenilio peroksido

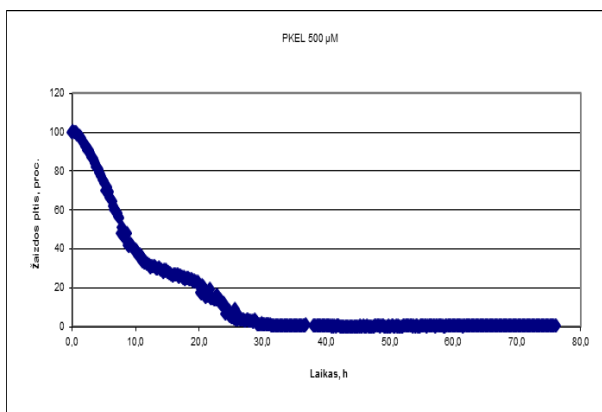
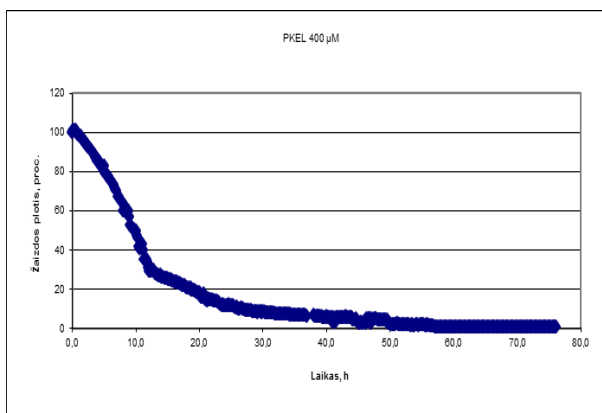
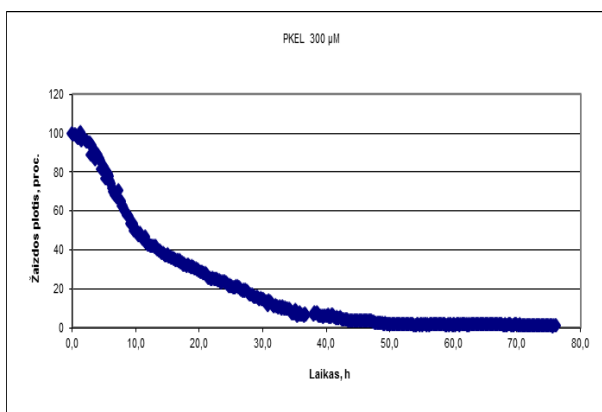
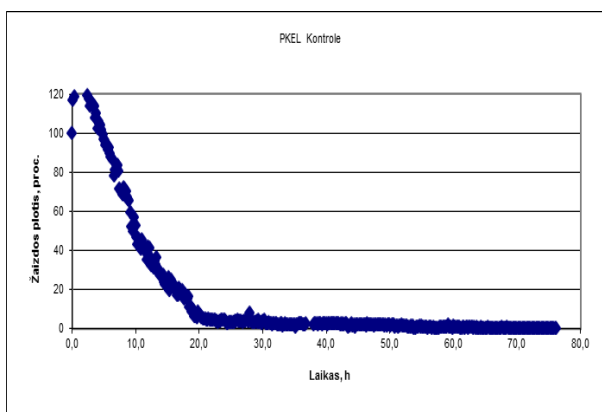
koncentracijai, žaizdos gijimo laikotarpis pailgėjo dar apie 10 valandų lyginant su 300 μM vandenilio peroksido koncentracija. Įdomūs rezultatai gauti paveikus ląsteles 500 μM koncentracijos vandenilio peroksidu. Šiuo atveju ląstelės migravo gerokai intensyviau ir žaizda užgijo per 30 valandų.

VKEL palyginus su PKEL nepasižymėjo dideliu judrumu. Kontrolinių mėginių pilnas žaizdos užgijimas buvo pasiektas tik po 48 valandų, tai dvigubai viršija PKEL kontrolinės populiacijos migracijos laiką.

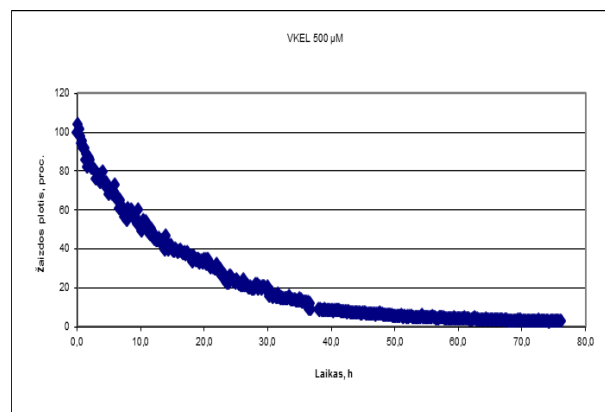
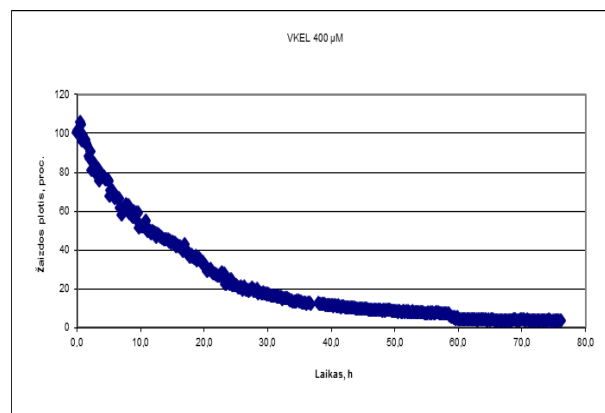
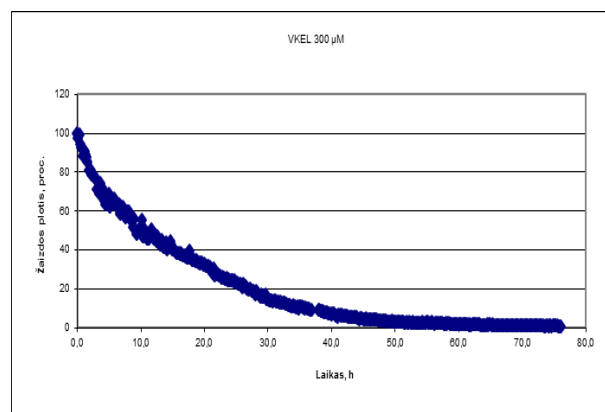
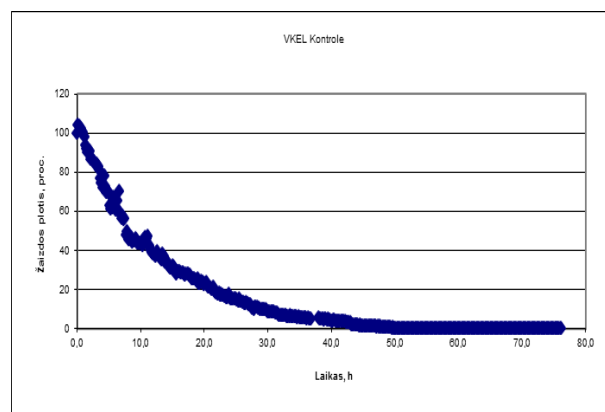
Vandenilio peroksido koncentracijos poveikis turėjo tiesioginę įtaką ląstelių migracijai. 300 μM koncentracijos H_2O_2 paveiktos ląstelės išlaikė panašų judėjimo tempą ir žaizdos plotą padengė per 50 val.. Tai palyginama su kontroline populiacija. H_2O_2 tirpalai, turintys 400 μM ir 500 μM koncentraciją, pasižymėjo VKEL migraciją stabdančiu poveikiu. Šiuo atveju pilnas žaizdos užgijimas nebuvo pasiektas.

Taigi, visos tirtos vandenilio peroksido koncentracijos stabdė PKEL ir VKEL ląstelių gebėjimą migruoti ir atstatyti pažeidą. Tačiau lyginant oksidacinio streso poveikį PKEL ir VKEL ląstelėms, matome, kad VKE ląstelės migravo gerokai lėčiau už PKE ląsteles.

PKEL



VKEL



3.11. pav. PKEL ir VKEL ląstelių žaidos gijimo dinamika oksidacinio streso sąlygomis. Parinktos vandenilio peroksido koncentracijos: 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M. Ląstelių migracija analizuota *Cell-IQ*, rezultatai apduoroti *Cell-IQ Analyser* ir MS Excel 2003 programomis.

3.3.2. Akt vaidmuo ląstelių migracijos metu, veikiant oksidaciniam stresui

PI3K/Akt signalinis kelias yra svarbus ląstelių išgyvenimui. Akt kinazė dalyvauja reguliuojant ląstelių adheziją, proliferaciją, migraciją. Atlikus tyrimą, gauta, kad PKEL ląstelės turi padidintą Akt raišką. Šių ląstelių gavimui naudojama pEGFP-Akt plazmidė. Transfekuotas ląsteles atrinkus, naudojant geniticiną, padidinta Akt raiška buvo patvirtinta *Western blot* metodu (3.12 pav.).



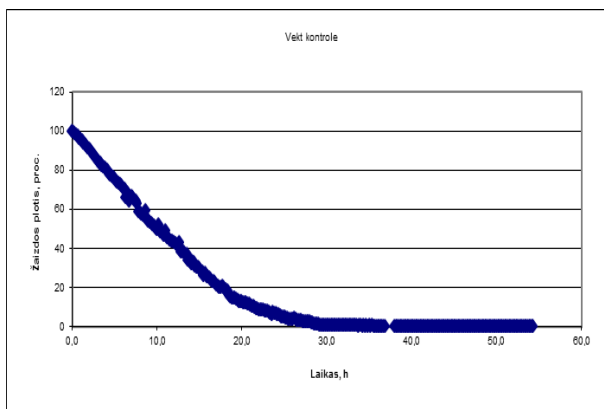
Kontrolė EGFP-Akt

3.12 pav. Akt baltymo raiška genetiškai modifikuotose ir kontrolinėse PKEL ląstelėse.

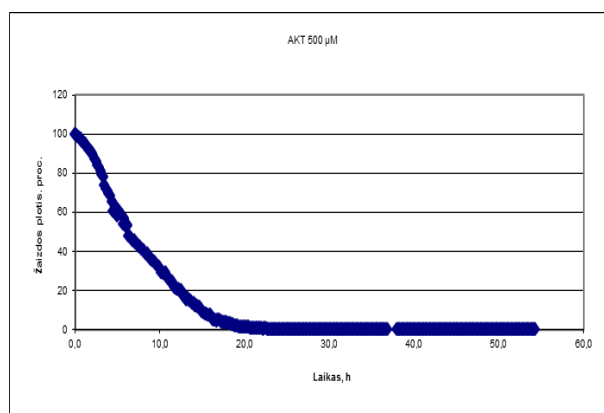
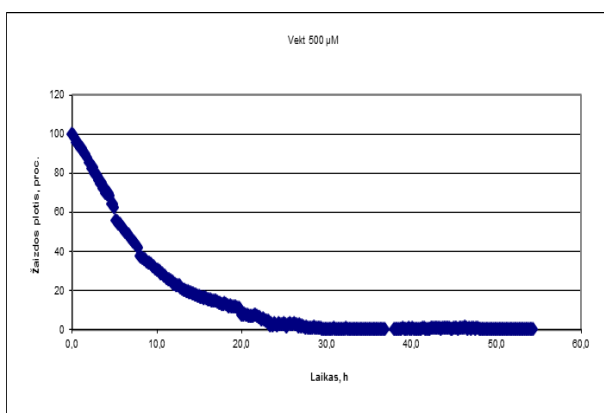
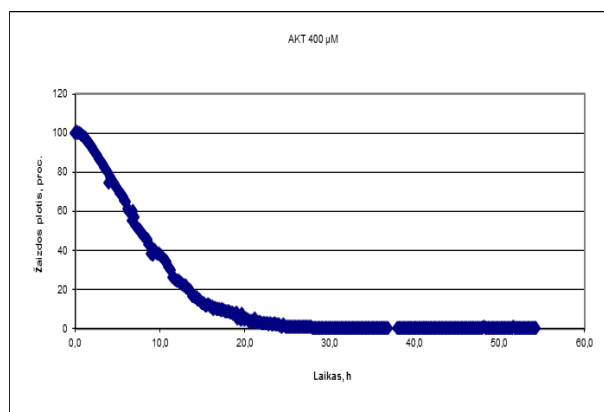
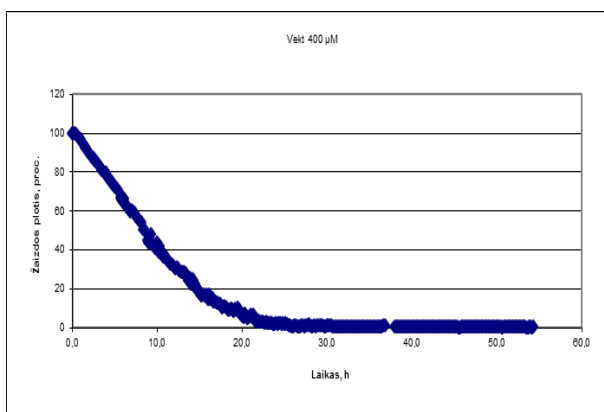
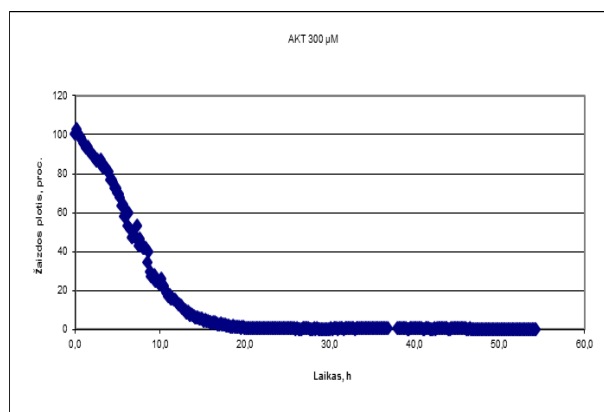
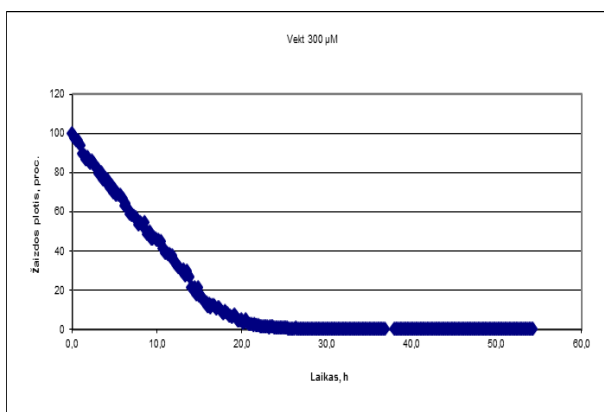
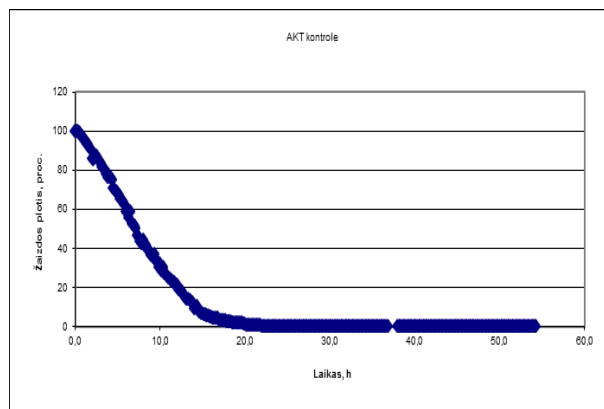
Toliau buvo lygintas kontrolinių PKEL bei PKEL su padidinta Akt raiška migracinis potencialas oksidacinio streso sąlygomis. Tiriamos ląstelės veiktos didėjančiomis vandenilio peroksido koncentracijomis. Paveiksle 3.13 pateikti duomenys rodo, kad PKEL-Akt ląstelių migracija su mažiausia vandenilio peroksido koncentracija beveik neturėjo jokio poveikio: ląstelės žaizda atsistatė per tą patį laiką kaip ir kontrolinė populiacija. Ląstelių kontrolinė populiacija nebuvo veikta vandenilio peroksidu. Paveikus 300 μ M koncentracijos vandenilio peroksido tirpalu, žaizda atsistatė net greičiau nei kontrolinių ląstelių.

Įvedus tuščią plazmidę į kontrolines ląsteles (vektorinės PKEL) ir atlikus tyrimus, gautas labai įdomus rezultatas. Šios ląstelės žaizdą atstatė lėčiau nei ląstelės su įvesta Akt kinaze, tačiau vandenilio peroksido poveikis beveik neturėjo jokios įtakos šių ląstelių migracijai. Tikėtina, kad pati transfekcijos procedūra aktyvino tam tikras signalines molekules, kurios padidino tiriamų ląstelių atsparumą oksidaciniam stresui. Tiriant Akt kinazės vaidmenį PKEL ląstelių išgyvenamumui, buvo gauta, kad ląstelės su padidinta Akt raiška yra gerokai atsparesnės oksidacinio streso poveikiui [Mackevič, 2013].

Vekt



Akt



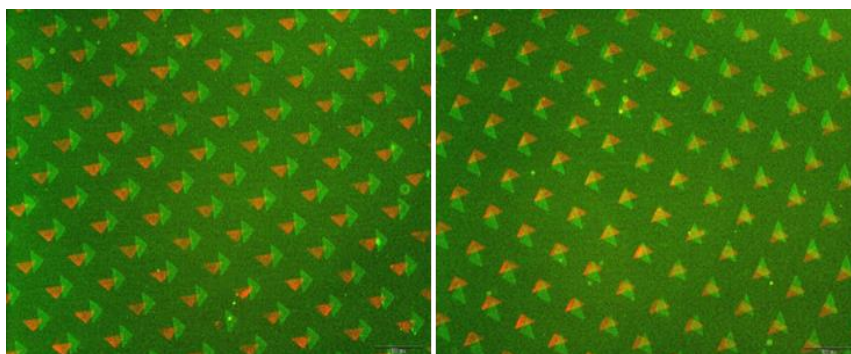
3.13. pav. PKEL(Vekt.) ir ląstelių su padidinta Akt raiška (Akt) žaidos gijimo dinamika oksidacinio streso sąlygomis. Parinktos vandenilio peroksido koncentracijos: 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M. Ląstelių migracija analizuota *Cell-IQ*, rezultatai apduoroti *Cell-IQ Analyser* ir MS Excel 2003 programomis.

3.4. Endotelinių ląstelių pirmatakių sąveikos su mikropaviršiais tyrimas

Paskutinėje darbo dalyje buvo atliekami tiriamų ląstelių sąveikos su mikrosubstratais tyrimai. Mikrosubstratai buvo pagaminti Fizinių ir technologinių mokslų centre, Nanoinžininerijos skyriuje. Darbe naudoti mikrosubstratai, pagaminti iš tarpląstelinio užpildo baltymų - kolageno (Col) ir fibronektino (Fn). Šie baltymai svarbūs moduluojant tokias svarbias audinių regeneracijai savybes kaip adhezija ir migracija. Šio savybės vėliau užtikrina ląstelių proliferaciją bei integraciją pažeistame audinyje.

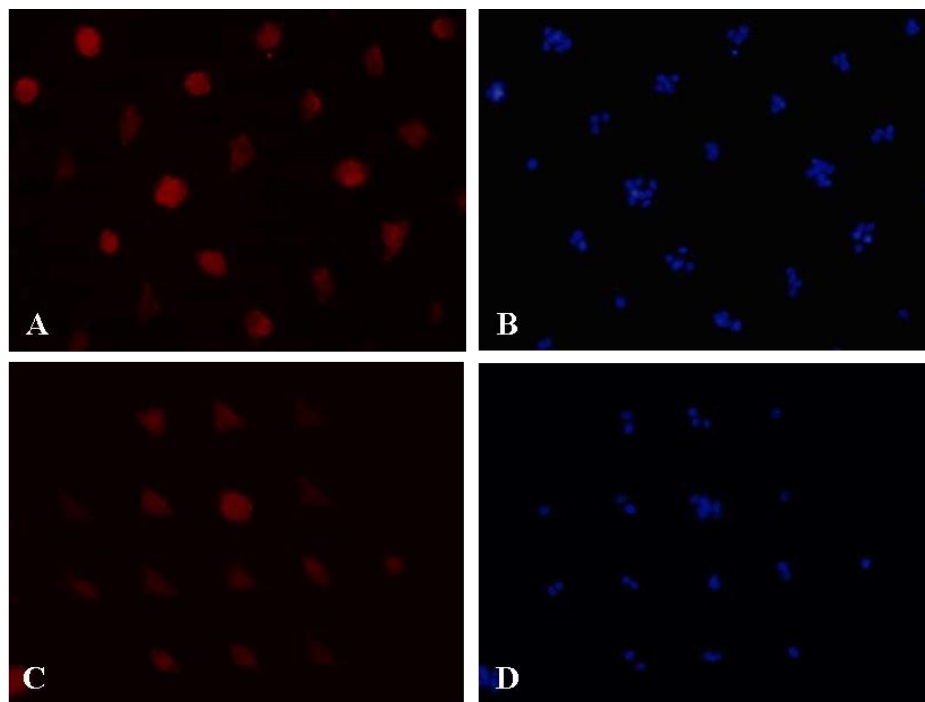
Pradiniai PKEL ląstelių sąveikos su mikrosubstratais, pagamintais iš FN, tyrimai buvo atlikti 2013 m. Tyrimai parodė, kad PKEL ląstelės sugeba tvarkingai organizuotis ant fibronektino mikrosubstratų ir po tam tikro laiko pradeda formuoti tiltelius tarp gretimų juostelių [Mackevič, 2013].

Šiame darbe toliau buvo tiriamos mikrostruktūros, suformuotos iš Fn ir Col (3.14 pav.).



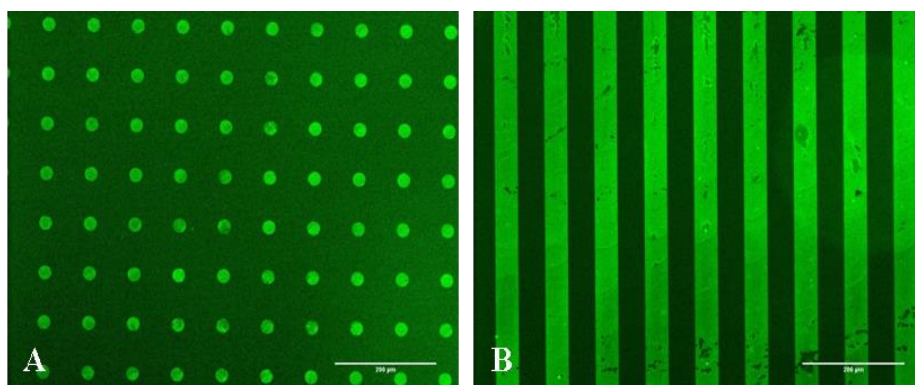
3.14. pav. Fn-Col mikrostruktūros žymėtos HyLite488 ir TR.

Mėginiai buvo užsėti PKE ląstelėmis ir po 24 val. vertinta vinkulino organizacija bei adhezijos stiprumas (3.15 pav.). Po purtymo vinkulino organizacija nekito, tačiau kokybiškai vertinant buvo mažiau ląstelių (3.15 pav. C ir D). Tiriant PKE ląstelių adheziją ant Fn matricų, ląstelių skaičius nesumažėjo. Tikėtina, kad PKEL sąveika su Col buvo silpnesnė.



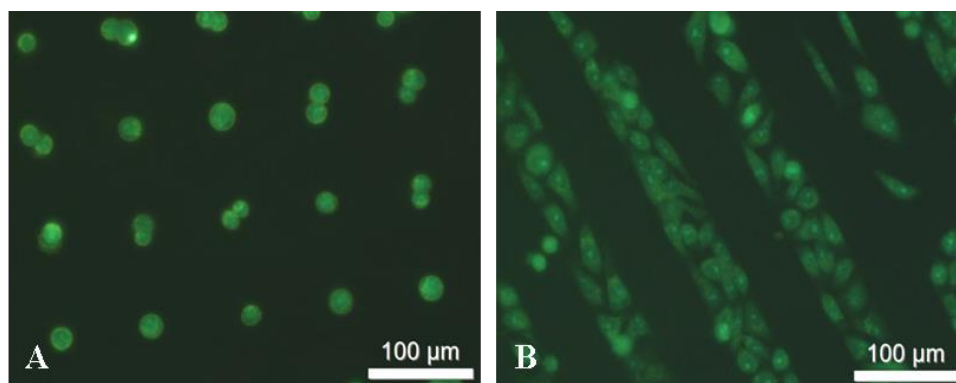
3.15 pav. PKEL ląstelių sąveika su Fn-Col mikrosubstratais. A, B – ląstelės nepurtytos. C, D – ląstelės purtytos. Vizualizacijai naudoti antikūnai prieš vinkuliną konjuguoti su Cy3 (kairėje), papildomai ląstelės vaizdintos jų branduolius pažymėjus DAPI (dešinėje).

Toliau buvo tiriama VKEL sąveika su Fn mikrosubstratais. Tuo tikslu naudoti dviejų tipų Fn mikrosubstratų matricos, pažymėti HiLyte488: 30 μm taškai su 60 μm tarpais tarp jų individualių ląstelių adhezijai ir 50 μm linijos 50 μm tarpais tarp jų (3.16 pav.).



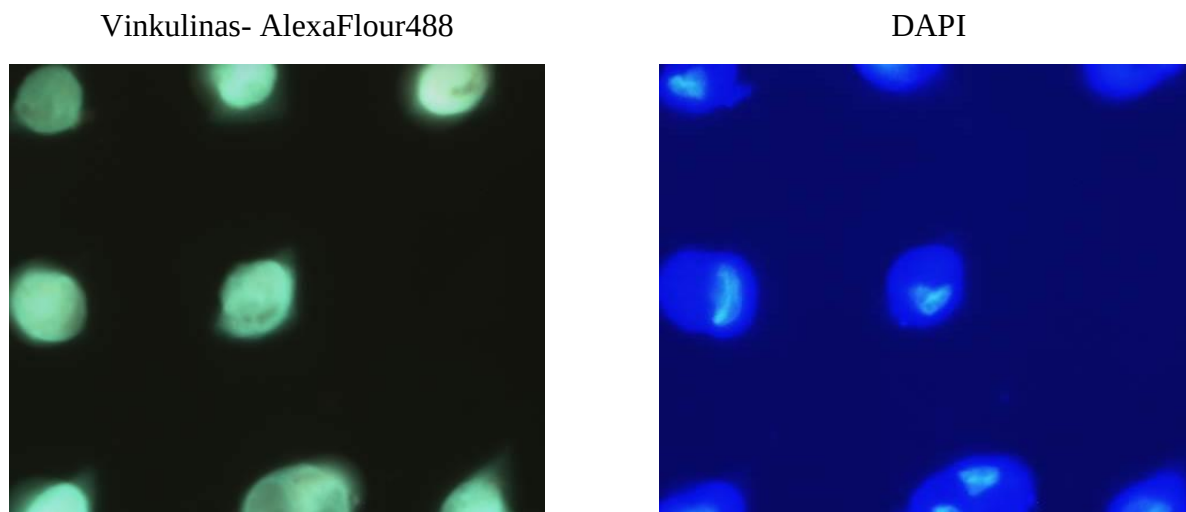
3.16 pav. Fn mikrosubstratai, pažymėti HiLyte488, ląstelių adhezijos tyrimams. A - 30 μm taškai su 60 μm tarpais tarp jų individualių ląstelių adhezijai. B - 50 μm linijos 50 μm tarpais tarp jų.

VKE ląstelių sąveika su Fn matricomis vertinta po 24 val. Gauti rezultatai rodo, kad virkštelės kraujo kilmės endotelinės ląstelės organizuojasi ant fibronektino matricų kitaip nei anksčiau tirtos endotelinės ląstelės (3.17 pav.). Šiuo atveju, ant Fn linijų užsėtos ląstelės išsidėsto pakankamai netvarkingai, joms nėra būdinga verpstės forma, kuri būdinga su kraujagyslių sienelėmis susijusioms EPC, augančioms ant analogiškų Fn struktūrų [Mackevič, 2013].



3.17. pav. VKE ląstelės ant fibronektino matricių. A – ląstelės augančios ant 30 μm Fn taškų. B – Ant 50 μm linijų augančios ląstelės. Ląstelės dažytos AO/EB.

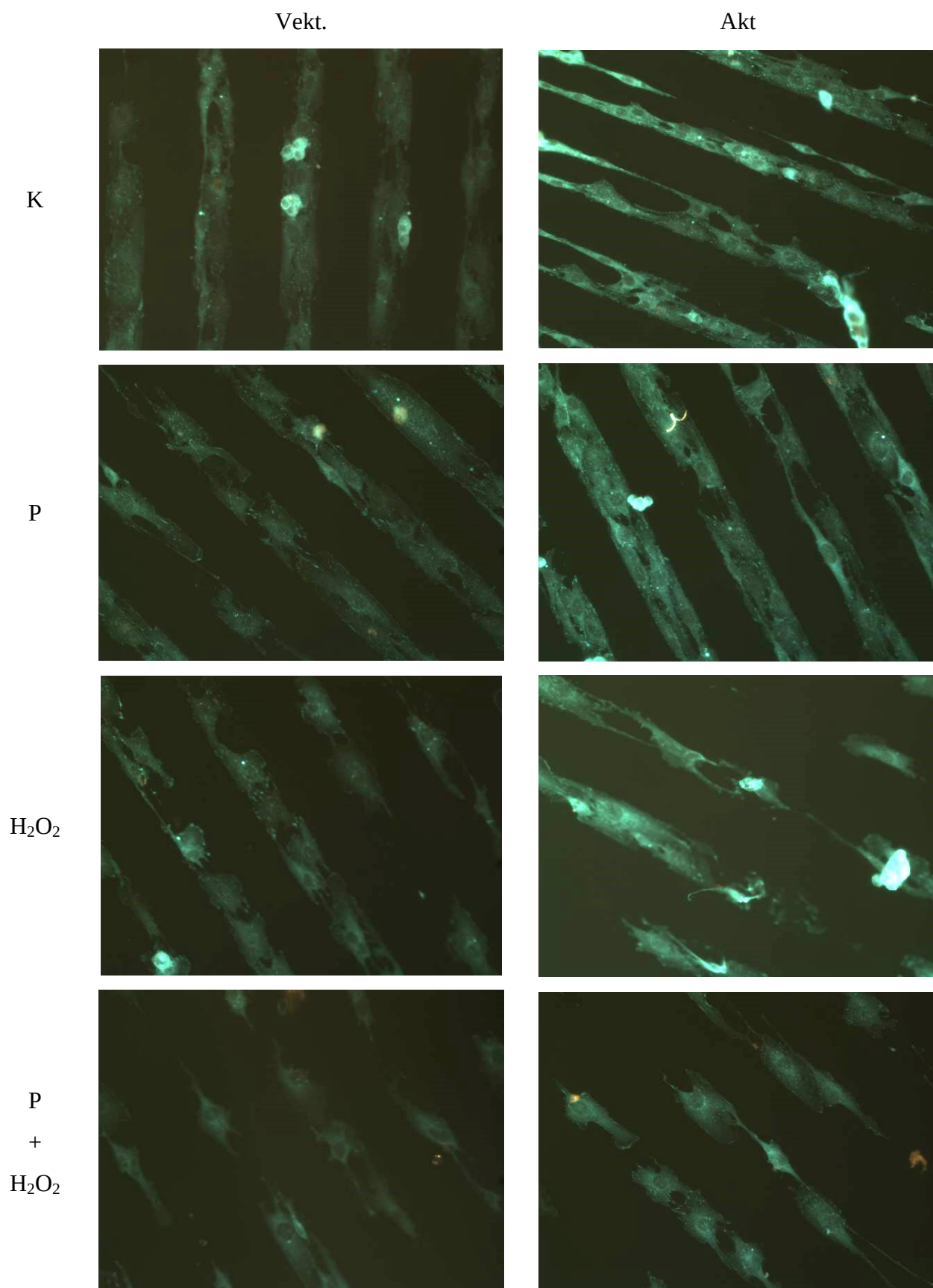
Analogiški tyrimai buvo atlikti su trečia tirta ląstelių linija TrKC. Vertinta šios linijos ląstelių sąveika su 30 μm Fn taškais. Gauti rezultatai rodo gana tvarkingą triušio kaulų čiulpų ląstelių išdėstymą ant tiriamų Fn mikrosubstratų (3.18 pav.).



3.18. pav. TrKC ląstelės ant fibronektino matricių. A – vinkulino raiška, ląstelėse augančiose ant 30 μm Fn taškų. B – DAPI dažyti ląstelių branduoliai..

3.4.1. Akt vaidmuo PKEL ląstelių sąveikos su mikrosubstratais metu.

Toliau buvo tiriama, ar padidinta Akt raiška gali turėti įtakos sąveikos su mikrosubstratais stiprumui oksidacinio streso metu. Tuo tikslu, kontrolinės ir ląstelės su padidinta Akt raiška auginamos ant juostomis orientuotų kolageno ir fibronektino mikrosubstratų. Ląstelės purtomos ir veikiamos vandenilio peroksido koncentracija, kuri neindukavo ląstelių žūties, tačiau stabdė jų dauginimąsi.



3.19 pav. PKEL su padidinta Akt raiška sąveika su mikrosubstratais. Vizualizuota vinkulino raiška. Čia: K – kontrolinės, neveiktos vandenilio peroksido bei nepurtytos ląstelės, P – purtytos ląstelės; H₂O₂ – ląstelės, veikto 100 μM vandenilio peroksido koncentracija, P + H₂O₂ – atitinkamai purtytos ir veiktos vandenilio peroksido ląstelės. Analizuota fluorescentinių mikroskopu Olympus IX51.

PKEL su padidinta Akt raiška ir kontrolinės ląstelės buvo išsėjamos ant fibronektino-kolagino dengtų mikrosubstratų. Ląstelėms prilipus prie paviršiaus, jos buvo veikiamos vandenilio peroksidu. Mechanškai purtomos ir ne, siekiant įvertinti jų adhezijos stiprumą oksidacinio streso sąlygomis.

Gauti rezultatai rodo, kad tiek kontrolinės PKEL ląstelės, tiek Akt transfekuotos ląstelės organizavosi išilgai fibronektino - kolageno mikropaviršių. Purtymas neturėjo didelės įtakos ląstelių adhezijai ir vizualiai nekeitė jų skaičiaus.

3.5. Rezultatų aptarimas

Baigiamajame magistro darbe buvo lyginta skirtingų šaltinių endotelinių ląstelių pirmtakių funkcinės savybės. Tyrimams buvo naudojamos ląstelės išskirtos iš kraujagyslių, virkštelės kraujo (izoliuota CD133⁺ ląstelių populiacija) ir kaulų čiulpų. Ląstelių charakterizavimas atliktas pagal CD133 (būdingas endotelinių ląstelių pirmtakių paviršiaus baltymas) žymenį. Tyrimų metu buvo stebimas žymus šio žymens raiškos mažėjimas virkštelės kraujo endotelinėse ląstelėse jų kultivavimo iki 13 pasažo metu. CD133 markerio praradimas yra siejamas su ląstelės diferenciacija ir progenitorinių savybių praradimu [Zhang et al., 2012]. Kraujagyslių kilmės ląstelėse CD133 žymens raiška buvo nedidelė. Tai galima sieti su ląstelių diferenciacijos lygiu, nes staigūs fenotipiniai pasikeitimai prasideda ląstelėms patekus į kraujotaką ir įsiterpus į kraujagysles (subrendusioms endotelinėms ląstelėms CD133 žymuo nėra būdingas). Tačiau literatūroje yra ir priešingų duomenų. Ranjan ir kt., tirdami kraujagyslių endotelines ląsteles pirmtakes, registravo panašų CD133 žymens raiškos lygį, kurį mes nustatėme VKEL. Šiuo atveju CD133 raiška taip pat mažėjo kultivavimo metu [Ranjan et al., 2009]. Mano tyrimų atveju, PKE ląstelės buvo charakterizuojamos apie 30 pasažų. Tikėtina, kad ką tik išskirtoms iš organizmo PKEL ląstelėms šio žymens raiška buvo būdinga. Iš kitos pusės, nepilną šių ląstelių diferenciaciją patvirtina jų proliferacinis potencialas. Tai buvo vertinama tolesnėje darbo dalyje. Šiuo atveju buvo lyginama visų trijų gautų linijų dauginimosi intensyvumas. Rezultatai parodė, kad tiek PKEL, tiek VKEL dauginosi panašiu greičiu. Literatūroje yra duomenų, kad virkštelės kraujo endotelinės ląstelės pasižymi dideliu proliferaciniu pajėgumu. Tai atitinka mano gautus rezultatus. Tiriant iš kaulų čiulpų išskirtas ląstelės, nustatėme, kad jų dauginimasis kultūroje yra labai lėtas. Tyrimo laikotarpiu nebuvo gautas populiacijos padvigubėjimas. Šie rezultatai iš dalies atitinka Zhang ir kt. gautus rezultatus. Tyrimo pradžioje buvo stebimas labai lėtas ląstelių dauginimasis, vėliau ląstelių proliferacija labai pagreitėjo [Ingram et al., 2005; Zhang et al., 2012; Wu et al., 2004]. Proliferacijos vertinimas buvo baigtas 72 tyrimo valandą. Ilgiau stebėti proliferaciją nebuvo tikslinga dėl intensyvaus PKEL ir VKEL ląstelių dauginimosi. Joms

sudarius monosluoksnį, atsiranda kontaktinis dauginimosi stabdymas ir ląstelių skaičius nedidėja, o jų metabolizmas lėtėja.

Toliau buvo vertinamas VKEL ir PKEL ląstelių diferenciacijos potencialas adipogenine, osteogenine ir miogenine linkme. Literatūros šaltiniuose rasta, kad endotelinės ląstelės pirmtakės išsivysto iš angioblastų, kurių kilmė mezodermos gemalinis lapelis. Iš šio gemalinio lapelio vystosi ir adipogeninės, osteogeninės bei miogeninės ląstelės. Taigi galima teigti, kad EPC turėtų turėti potencialą diferencijuotis į ląsteles kilusias iš bendro pirmtako [Minasi et al., 2002]. Be to, yra atlikta darbų tiriant kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciaciją (šiose ląstelėse aptinkama ir EPC būdingų žymenų - CD34 ir CD133) į kaulines, raumenines ir riebalines ląsteles. Į atskirą grupę galima būtų išskirti miogenines endotelines ląsteles, esančias griaučių raumenyse. Yra parodytas šių ląstelių potencialas diferencijuoti į osteogeninės ir miogeninės kilmės ląsteles [Gang et al., 2004; Zheng et al., 2013; Granéli et al., 2014; Chen et al., 2012]. Palyginus mano tiriamų PKE ir VKE ląstelių diferenciacijos potencialą miogenine, osteogenine ir adipogenine linkme, nustaciau, kad abi tirtos linijos diferencijavosi minėtomis kryptimis, tačiau skirtingu laipsniu. VKEL ląstelėse miogeninė, adipogeninė ir osteogeninė diferenciacija buvo išreikšta labiau.

Trečiasis darbo etapas buvo skirtas tiriamų ląstelių migracijos potencialo oksidacinio streso metu vertinimui. Oksidacinio streso imitatoriumi naudotas vandenilio peroksidas. Gauti rezultatai parodė, kad oksidacinis stresas turi neigiamą poveikį PKEL ir VKEL ląstelių judėjimui. Wu ir kt., tirdami oksidacinio streso poveikį iPSC (indukuotom pluripotentinėms kamieninėms ląstelėms) ląstelių savybėms, parodė, kad nedidelės vandenilio peroksido koncentracijos neigiamai veikia ląstelių migraciją. Didesnės vandenilio peroksido koncentracijos jau veikia ne tik migraciją, bet ir ląstelių adheziją, gyvybingumą ir proliferaciją. Todėl sumažėjus ląstelių populiacijai, prireikia daugiau laiko atstyti ją ir žaizdos plotą [Wu et al., 2013; Tepper et al., 2002; Lamers et al., 2011]. Įdomu tai, kad PKEL ląstelių migracija esant aukščiausiai parinktai H_2O_2 koncentracijai (500 μM) buvo pakankamai greita ir lėmė greitą žaizdos gijimą.

Yra žinoma, kad oksidacinio streso metų aktyvuojama PI3K/Akt signalinė kaskada, kuri yra atsakinga už ląstelių žūties procesų slopinimą. Taip pat PI3K/Akt atlieka svarbų vaidmenį ląstelių adhezijoje ir judėjime [Tepper et al., 2002; Thomas et al., 2001; Kawasaki et al., 2003]. Todėl buvo atlikti migracijos tyrimai gavus genetiškai modifikuotas PKE ląsteles su padidinta Akt raiška. Gauti rezultatai parodė, kad ši signalinė molekulė yra svarbi ląstelių migracijai oksidacinio streso metu. Didėjančios H_2O_2 koncentracijos neturėjo žymaus poveikio PKEL ląstelių su padidinta Akt raiška judėjimui. Šiuos duomenis iš dalies patvirtina Kawasaki ir kt. rezultatai. Šie tyrėjai analizavo nuo NO priklausomą PI3K/Akt vaidmenį ląstelių proliferacijai ir

migracijai. Buvo nustatyta, kad PI3K/Akt signalinio kelio slopinimas neigiamai veikia ląstelių migraciją [Kawasaki et al., 2003].

Toliau buvo įvertintas PI3K/Akt signalinės kaskados vaidmuo ląstelių adhezijos procesui oksidacinio streso sąlygomis. Tuo tikslu buvo tiriamas PKEL ląstelių, su padidinta Akt raiška, sąveika su fibronektino-kolageno mikrosubstratais. Yra žinoma, kad endotelinių ląstelių sąveika su fibronektinu yra daug stipresnė negu su kolagenu. Mano atveju, ryškesnių skirtumų negauta. Be to, padidinta Akt raiška neturėjo didesnės įtakos nei ląstelių adhezijos su mikrosubstratais stiprumui, nei ląstelių organizacijai oksidacinio streso metu.

IŠVADOS

- Endotelinės ląstelės pirmtakės, gautos iš skirtingų šaltinių, skyrėsi CD133 žymens raiška. Kraujagyslių kilmės endotelinėse ląstelėse ši raiška nebuvo stipriai išreikšta, tuo tarpu virkštelės kraujyje endotelinėse ląstelėse net 45% populiacijos turėjo šį žymenį, tačiau auginimo sąlygos lėmė CD133 raiškos mažėjimą. Dauginimosi potencialas abiejų šaltinių ląstelių buvo panašus.
- Virkštelės kraujyje endotelinės ląstelės pirmtakės geriau nei kraujagyslių kilmės endotelinės ląstelės diferencijavosi kaulinio, riebalinio, bei raumeninio audinio linkme.
- Vandenilio peroksidas stabdė abiejų ląstelių linijų gebėjimą migruoti ir atstatyti pažaidą. Tačiau oksidacinis stresas didesnę įtaką turėjo virkštelės kraujyje endotelinėms ląstelėms pirmtakėms. Jos migravo lėčiau už kraujagyslių kilmės endotelines ląsteles pirmtakes.
- Padidinta Akt raiška pagerino kraujagyslių kilmės endotelinių ląstelių pirmtakių migracines savybes oksidacinio streso metu, tačiau neturėjo įtakos jų sąveikai su mikrosubstratais.



LITERATŪRA

1. Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S.. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 9: 1370-1376.
2. Aicher, A., Rentsch, M., Sasaki, K-I., Ellwart, J. W., Fändrich, F., Siebert, R., Cooke, J. P., Dimmeler, S. and Heeschen, C.. 2007. Nonbone Marrow-Derived Circulating Progenitor Cells Contribute to Postnatal Neovascularization Following Tissue Ischemia. *Circ Res*, 100:581-589.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
4. Asahara T., Kawamoto, A. and Masuda, H.. 2011. Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. *Stem Cells*, 29:1650–1655.
5. Au, P., Tam, J., Fukumura, D. and Jain, R. K.. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*, 111: 4551-4558.
6. Berridge, M. J.. Cell cycle and proliferation. Cell Signaling Biology. Portland Press Limited, 2012. 42p.
7. Cai, H.. 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*, 68: 26–36.
8. Caiado, F. and Dias, S.. 2012. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5:4.
9. Case, J., Ingram, D. A. and Haneline, L. S.. 2008. Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cell Function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(11): 2008 1895-1907.
10. Cernuda-Morollo'n, E. and Ridley, A. J.. 2006. Rho GTPases and Leukocyte Adhesion Receptor Expression and Function in Endothelial Cells. *Circ Res.*, 98: 757-767.
11. Chandrasekhar, K.S., Zhou, H., Zeng, P., Alge, D., Li, W., Finney, B.A., Yoder, M. C. and Li, J.. 2011. Blood vessel wall-derived endothelial colony-forming cells enhance fracture repair and bone regeneration. *Calcif Tissue Int.* 89(5):347-57.
12. Chen, Ch., Corselli, M., P'eaault, B. and Huard, J.. 2012. Human Blood-Vessel-Derived StemCells for Tissue Repair and Regeneration. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012:597439.
13. Cooper, G.M.. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Cell Proliferation in Development and Differentiation.

14. Dzau, V. J., Gneccchi, M., Pachori, A. S., Morello, F. and Melo, L. G.. 2005. Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases. *Hypertension*, 46:7-18.
15. Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. and Kirschner, M. W.. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 418: 790-793.
16. Entschladen, F. and Zänker, K.S.. Cell Migration: Signalling and Mechanisms. Volume 2. Karger Medical and Scientific Publishers, 2009. 184p.
17. Félétou, M. The Endothelium. Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2011.
18. Gang, E., Jeong, J., Hong, S., Hwang, S., Kim, S., Yang, I., Ahn, Ch., Han, H. and Kim, H.. 2004. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*, 22(4): 617–624.
19. Granéli, C., Thorfve A., Ruetschi, U., Brisby, H., Thomsen, P., Lindahl, A. and Karlsson, C.. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Research*, 12(1):153-165.
20. Hirschi, K. K., Ingram D. A. and Yoder M. C.. 2008. Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:1584-1595.
21. Hristov, M. and Weber, C.. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*, 8(4): 498-508.
22. Igreja, C., Fragoso, R., Caiado, F., Clode, N., Henriques, A., Camargo, L., Reis, E. and Dias, S.. 2008. Detailed molecular characterization of cord blood–derived endothelial progenitors. *Exp Hematol*, 36(2):193-203.
23. Ingram, D. A., Mead, L. E., Moore, D.I B., Woodard, W., Fenoglio, A. and Yoder, M. C.. 2005. Vessel wall–derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*, 105: 2783-2786.
24. Yoder, M. C., Mead, L. E., Prater, D., Krier, T. R., Mroueh, K. N., Li, F., Krasich, R., Temm, C. J., Prchal, J. T. and Ingram, D. A.. 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 109: 1801-1809.
25. Kawasaki K., Smith Jr, R., Hsieh, Ch., Sun, J., Chao, J. and Liao, J.. 2003. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase Akt Pathway Mediates Nitric Oxide-

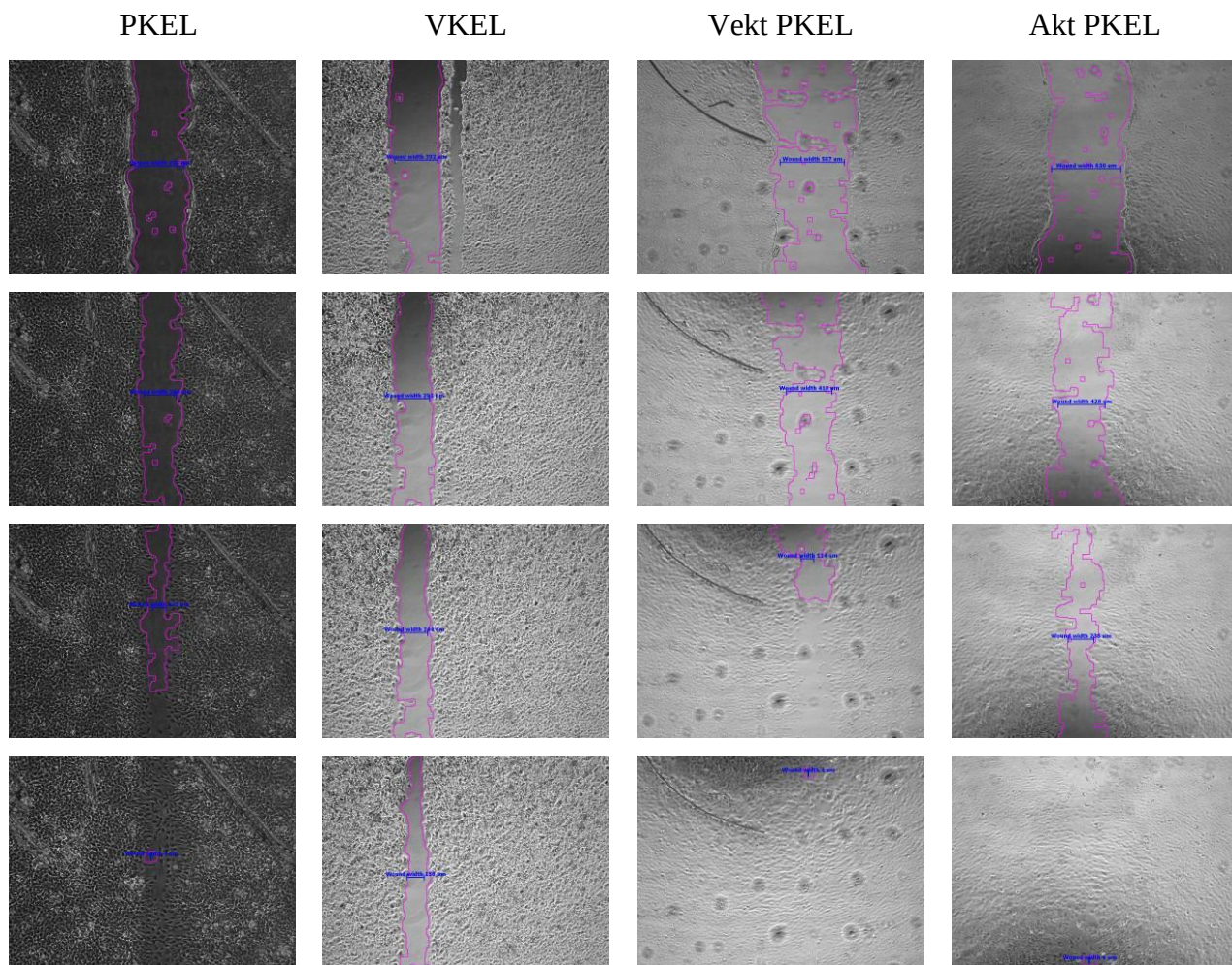
- Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *Mol. Cell. Biol*, 23(16): 5726-5737.
26. Keller, G.. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, 19: 1129-1155.
 27. Kocher, A.A., Schuster, M.D., Bonaros, N., Lietz, K., Xiang, G., Martens, T.P., Kurlansky, P.A., Sondermeijer, H., Witkowski, P., Boyle, A., Homma, S., Wang, S.F. and Itescu, S.. 2006. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines. *J Mol Cell Cardiol*, 40(4): 455–464.
 28. Krylyshkina, K.O. and Small, J. V.. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34: 746–761.
 29. Lamers, M. L., Almeida, M., Vicente-Manzanares, M., Horwitz, A. F. and Santos, M F.. 2011. High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. *PLoS One*, 6(8): e22865.
 30. Li, L., Bennett, S. and Wang, L.. 2012. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr*, 6(1): 59–70.
 31. Lin, C., Lin, F-Y., Huang, P., Chen, Y., Chen, W., Chen, H., Huang, Y., Liao, W., Huang, H., Liu, P. and Chen, Y. H.. 2012. Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen species and Inflammation. *BioMed Research International*, 2013:1-10.
 32. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L. et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.
 33. Luo, Y. and Radice, G.. 2005. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cel Biol*, 169(1): 29-34.
 34. Mackevič, J.. Endotelinų ląstelių-pirmtakių funkcinių savybių tyrimai. Baigiamasis magistro darbas. 2013.55p..
 35. Marthiens, V., Kazanis, I., Moss, L., Long, K. and Constant, C.. 2010. . Adhesion molecules in the stem cell niche – more than just staying in shape? *J Cell Science*, 123: 1613-1622.
 36. Martindale, J. L. and Holbrook, N. J.. 2002. Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *J Cel Physiol*, 192:1–15.
 37. Mildažienė, V., Jarmalaitė, S. ir Daugelavičius, R.. Ląstelės biologija. Kaunas, 2004. 382p.

38. Minasi, M. G., Riminucci, M., Angelis, L., Borello, U., Berarducci B., Innocenzi A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., Maria, R., Boratto, R., Jaffredo, T., Broccoli, V., Bianco, P. and Cossu, G.. 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, 129:2773-2783.
39. Niemelä, S., Miettinen, S., Sarkanen, J.R. and Ashammakhi, N.. 2008. Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. *Topics in Tissue Engineering*, 4: 1-26.
40. Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldman, S., Ehninger, G., Bornhauser M. and Werner, C.. 2004. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells*, 22:377-384.
41. Ranjan, K., Kumar, U., Hardikar, A. A., Poddar, P., Nair, P. D. and Hardikar, A. A.. 2009. Human Blood Vessel–Derived Endothelial Progenitors for Endothelialization of Small Diameter Vascular Prosthesis. *PLoS ONE* 4(11): e7718. doi:10.1371/journal.pone.0007718
42. Ridley, M. S., Burridge, K., Firtel, R., Ginsberg, M., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A.. 2003. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, 302: 1704-1709.
43. Rosso, A., Balsamo, A., Gambino, R., et al.. 2006. p53 mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem*, 281:4339–47.
44. Schatteman, G. C., Dunnwald M. and Jiao Ch.. 2007. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H1–H18.
45. Sottile, V., Thomson, A. and McWhir, J.. 2003. In Vitro Osteogenic Differentiation of Human ES Cells. *Cloning and Stem Cells*, 5(2): 149-155.
46. Stepniak, E., Radice, G. L. and Vasioukhin V.. Adhesive and Signaling Functions of Cadherins and Catenins in Vertebrate Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002949.
47. Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., et al.. 2002. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 106(22): 2781–2786.
48. Thomas, Sh. R., Chen, K. and Keaney Jr, J. F.. 2001. Hydrogen Peroxide Activates Endothelial Nitric-oxide Synthase through Coordinated Phosphorylation and Dephosphorylation via a Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 6017-6024.

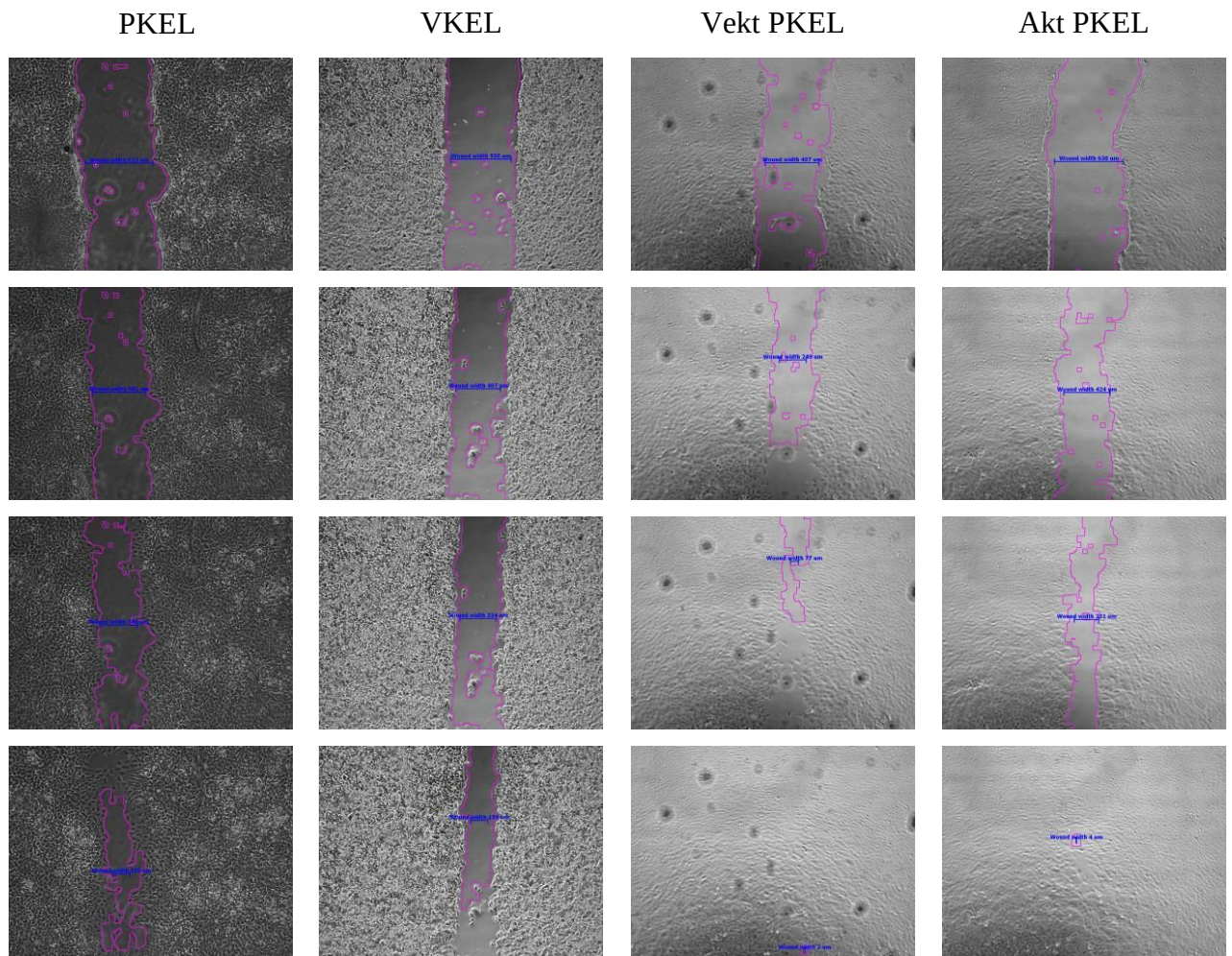
49. Tilling, L., Chowienczyk, P. and Clapp, B.. 2009. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*, 68(4): 484–492.
50. Tousoulis, D., Andreou, I., Antoniadis, C., Tentolouris, C. and Stefanadis, C.. 2008. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, 201: 236–247.
51. Urbich, C. and Dimmeler, S.. 2004. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res*, 95: 343-353.
52. Vasioukhin, V. and Fuchs, E.. 2001. Actin dynamics and cell–cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol*, 13:76–84.
53. Watson, T., Goon, P. K. Y. and Lip, G. Y. H.. 2008. Endothelial Progenitor Cells, Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 1079–1088.
54. West, K. A., Castillo, S. S. and Dennis, P. A.. 2002. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Upd*, 5(6): 234–248.
55. Wijelath, E., Rahman, S., Murray, J., Patel, Y., Savidge, G. and Sobel, M.I.. 2004. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34+ cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg*, 39(3): 655-60.
56. Wu, H., Riha, G. M., Yang, H., Li, M., Yao, Q. and Chen, Ch.. 2004. Differentiation and Proliferation of Endothelial Progenitor Cells from Canine Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Surgical Research*, 126: 193–198.
57. Wu, Y., Zhang, X., Kang, X., Li, N., Wang, R., Hu, T., Xiang, M., Wang, X., Yuan, W., Chen, A., Meng, D. and Chen, S.. 2013. Oxidative stress inhibits adhesion and transendothelial migration, and induces apoptosis and senescence of induced pluripotent stem cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40: 626–634. doi:10.1111/1440-1681.12141.
58. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E.. 1995. Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science*, 270: 1326-1331.
59. Zeller, K. S.. 2012. Integrin signaling in cell adhesion and mechanotransduction: regulation of PI3K, Akt and ROS. Acta Universitatis Upsaliensis. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation from Faculty of Medicine*. 46p.
60. Zhang, H., Xiang, P., Wang, H-Y., Lu, Y.-Y., Luo, Y-L. and Jiang, H.. 2012. The characteristics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and their effect on glioma. *Cancer Cell International* , 12:32.

61. Zheng, B., Li, G., Chen, W., Deasy, B., Pollett, J., Sun, B., Drowley, L., Gharaibeh, B., Usas, A., Péault, B. and Huard, J.. 2013. Human myogenic endothelial cells exhibit chondrogenic and osteogenic potentials at the clonal level. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(7): 1089-1095.

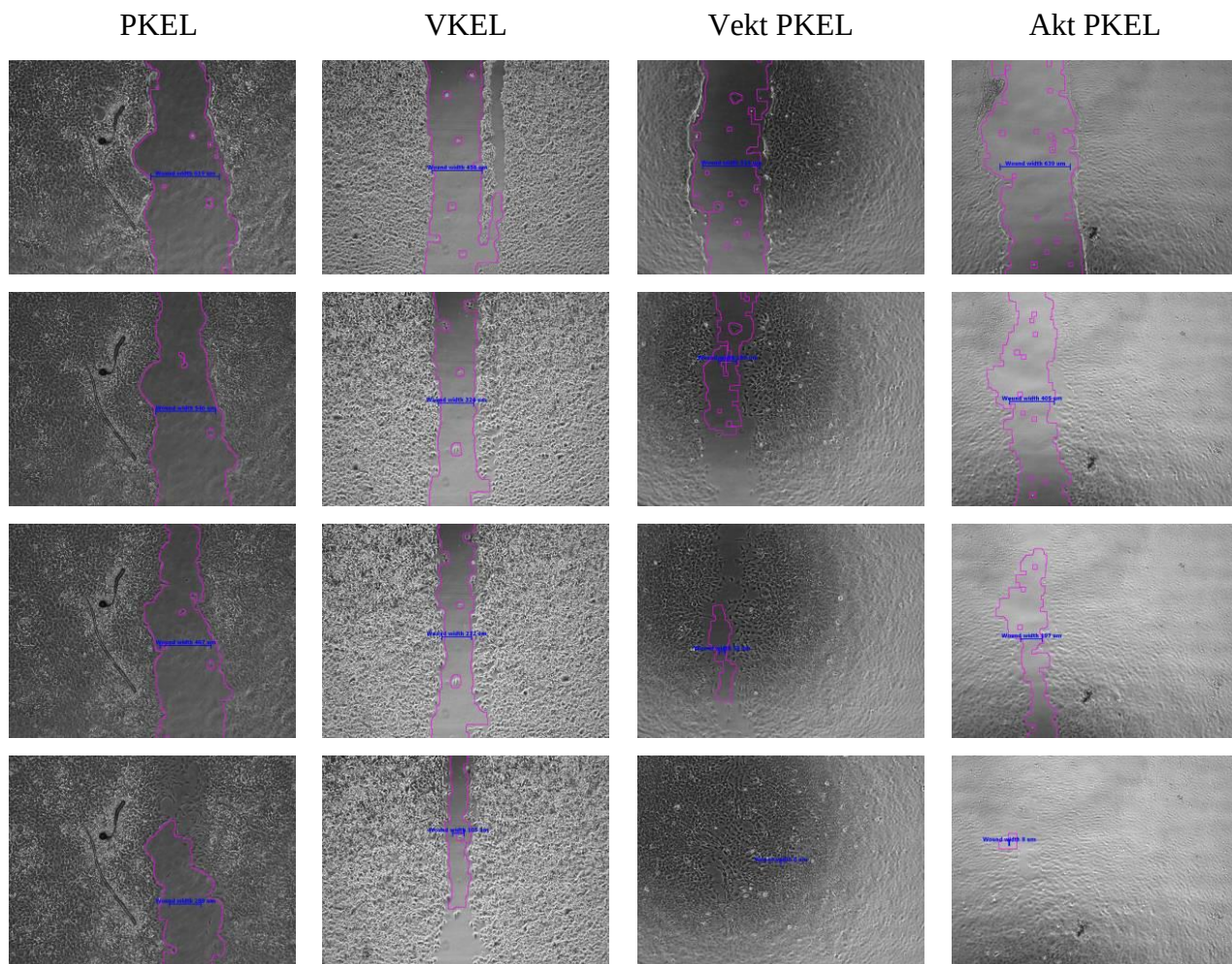
PRIEDAI



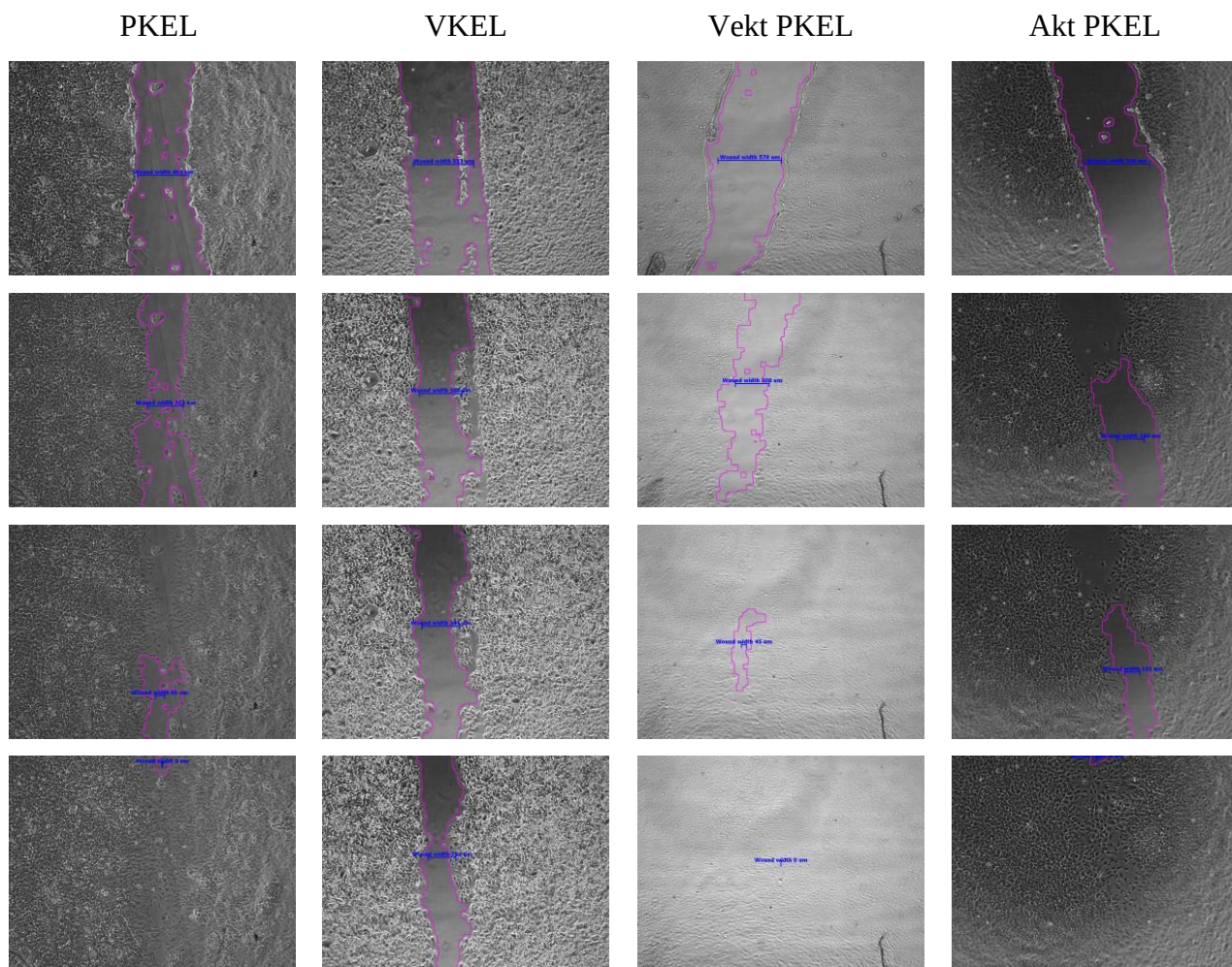
P-1. pav. Skirtingų šaltinių endotelinų ląstelių linijų kontrolinių grupių žaizdos nuotraukos po 0, 6, 12, 24 valandų. Analizė atlikta Cell-IQ prietaisu.



P-2. pav. Skirtingų šaltinių endotelinių ląstelių linijų paveiktų 300 μ M H₂O₂ žaizdos nuotraukos po 0, 6, 12, 24 valandų. Analizė atlikta Cell-IQ prietaisu.



P-3. pav. Skirtingų šaltinių endotelinių ląstelių linijų paveiktų 400 μ M H₂O₂ žaizdos nuotraukos po 0, 6, 12, 24 valandų. Analizė atlikta Cell-IQ prietaisu.



P-4. pav. Skirtingų šaltinių endotelinių ląstelių linijų paveiktų 500 μ M H_2O_2 žaizdos nuotraukos po 0, 6, 12, 24 valandų. Analizė atlikta Cell-IQ prietaisu.

Padėka

Darbas atliktas remiant ES Struktūrinės paramos projektu (kodas VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005) “Biokatalizatorių, rekombinantinių baltymų ir ląstelių technologijos”.

Esu dėkingas savo darbo vadovei dr. Daivai Baltriukienei ir konsultantui dr. Evaldui Liutkevičiui už pagalbą ruošiant baigiamąjį darbą. Dr. Virginijai Bukelskienei, Evaldui Balčiūnui, Egidijui Šimoliūnui, Mildai Pečiukaitytei, Adui Darinskui ir Rasai Jarašienei dėkoju už bendradarbiavimą.