VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Greta Rakauskienė

VIDULĄSTELINIO KALCIO KONCENTRACIJOS REGULIAVIMAS VYKDANT MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ CHONDROGENINĘ DIFERENCIACIJĄ

THE EFFECTS OF INTRACELLULAR CALCIUM REGULATION DURING CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos magistrantūros studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017
Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2020

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas _____
(Parašas)
dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)
_____
(Data)

Greta Rakauskienė

VIDULĄSTELINIO KALCIO KONCENTRACIJOS REGULIAVIMAS VYKDANT MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ CHONDROGENINĘ DIFERENCIACIJĄ

THE EFFECTS OF INTRACELLULAR CALCIUM REGULATION DURING CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos magistrantūros studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017
Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovės

dr. Eiva Bernotienė _____ 2020-05-29
(Pedag. vardas, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Ilona Uzielienė _____ 2020-05-29
(Pedag. vardas, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

BD darbas peržiūrėtas lietuvių kalbos
konsultantės dr. Vaidos Buivydienės _____
(Pedag. vardas, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Vilnius, 2020

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijų studijų kryptis
Bioinžinerijos magistrantūros studijų programa,
valstybinis kodas 6211FX017

Katedros vedėjas
(Parašas)
dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)
(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO UŽDUOTIS

.....Nr. .....
Vilnius

Studentei Gretai Rakauskienei
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: Viduląstelinio kalcio koncentracijos reguliavimas vykdant mezenchiminių kamieninių ląstelių chondrogeninę diferenciaciją

patvirtinta 2020 m. balandžio 27 d. dekano potvarkiu Nr. 126fm
Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2020 m. gegužės 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

1. Palyginti žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių, išskirtų iš kaulų čiulpų ir menstruacijų kraujo, bei chondrocitų, išskirtų iš sąnario kremzlės, fenotipą;
2. Įvertinti kalcio kanalų reguliatorių įtaką KČMKL ir chondrocitų proliferacijai;
3. Palyginti skirtingų kalcio kanalų reguliatorių įtaką viduląstelinio kalcio kiekiui KČMKL, MenMKL ir chondrocituose;
4. Įvertinti KČMKL, MenMKL ir chondrocitų chondrogeninės diferenciacijos priklausomybę nuo kalcio kanalų reguliatorių;
5. Įvertinti mechaninio spaudimo bei įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų reguliatorių nifedipino ir BayK8644 įtaką KČMKL, MenMKL ir chondrocitų chondrogeninės diferenciacijos pajėgumui chondroitino sulfato-tiramino hidrogeliuose;
6. Įvertinti įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų reguliatorių nifedipino ir BayK8644 bei mechaninio spaudimo įtaką chondrogenezę nusakančių genų raiškai žmogaus sąnario kremzlės eksplantuose.
7. Nustatyti kalcio kanalų reguliatorių nifedipino ir BayK8644 įtaką azoto oksido aktyvumui KČMKL ir chondrocituose;

Vadovės
.....
(Parašas)
dr. Eiva Bernotienė
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)
.....
(Parašas)
Ilona Uzielienė
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau
.....
(Parašas)
Greta Rakauskienė
(Vardas, pavardė)
2020-05-20

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos magistro baigiamasis darbas

Pavadinimas	**Viduląstelinio kalcio koncentracijos reguliavimas vykdant mezenchiminių kamieninių ląstelių chondrogeninę diferenciaciją**
Autorius	**Greta Rakauskienė**
Vadovas	**Eiva Bernotienė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Žmogaus sąnario kremzlė pasižymi silpnu gebėjimu regeneruoti po kremzlinio audinio pažeidimų ir tai lemia sąnario degeneracinių ligų, tokių kaip osteoartritas, pradžią. Šiuo metu potencialiausiu būdu regeneruoti pažeistą kremzlinį audinį yra laikoma mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) terapija. Tyrimuose dažniausiai naudojamos kaulų čiulpų MKL (KČMKL), tačiau dėl skausmingos invazinės jų išgavimo procedūros yra ieškoma alternatyvų, tokių kaip menstruacijų kraujo MKL (MenMKL). Vykstant MKL diferenciacijoms, svarbų vaidmenį atlieka viduląstelinio kalcio jonai [Ca2+], kurie į ląstelę gali patekti per įvairius [Ca2+] kanalus ar iš endoplazminių saugyklų. Šio darbo tikslas yra įvertinti skirtingų [Ca2+] kanalų reguliatorių įtaką KČMKL, MenMKL ir chondrocitų chondrogeninei diferenciacijai. Įvertinus visų tiriamų ląstelių fenotipą, atliekami jų gebėjimo proliferuoti tyrimai, ląsteles veikus įtampos valdomų [Ca2+] kanalų (ĮVKK) aktyvikliais bei slopikliais. Viduląstelinio [Ca2+] kiekis yra įvertinamas fluorescenciniu mikroskopu ir tėkmės citometru. Chondrogeninė diferenciacija įvertinama ląstelių sferas dažant safraninu-O, o chondroitino sulfato-tiramino hidrogeliuose vykdyta diferenciacija – žymint II tipo kolageno antikūnais. Gauti rezultatai parodė, kad skirtingų [Ca2+] kanalų reguliatoriai turi įtakos KČMKL, MenMKL ir chondrocitų viduląstelinio [Ca2+] kiekiui bei ląstelių gebėjimui proliferuoti. Ląstelių chondrogeninės diferenciacijos analizės rezultatai rodo, kad MenMKL geba stipriausiai gaminti chondrogeninei diferenciacijai būdingą užląstelinį užpildą, veikiant kalcio kanalų slopikliais kartu su TGF-β3, o KČMKL – aktyvikliu BayK8644. Mechaninis hidrogelių ir kremzlės eksplantų spaudimas paskatino užląstelinio užpildo gamybą. Todėl manoma, kad viduląstelinio kalcio koncentracijos pasikeitimas, vykstantis per įvairius kalcio kanalus, yra tiesiogiai susijęs su ląstelių diferenciacijos mechanizmų atsakais.

Darbą sudaro: įvadas, 3 skyriai, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 48 p. teksto, 16 paveikslų, 5 lentelės, 56 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: Chondrogeninė diferenciacija, įtampos valdomi kalcio kanalai, mezenchiminės kamieninės ląstelės, osteoartritas, viduląstelinis kalcis

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

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

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Mater's Graduation Thesis

Title	**The Effects of Intracellular Calcium Regulation During Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells**
Author	**Greta Rakauskienė**
Academic supervisor	**Eiva Bernotienė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Human articular cartilage has a weak ability to regenerate in case of damage, caused by trauma or degenerative joint disease (e.g., osteoarthritis, OA). Today there is no efficient and long-lasting solution discovered for OA treatment. One of the way to regenerate damaged cartilage is by using mesenchymal stem cells (MSCs). Bone marrow MSCs (BMMSCs) is a classical MSC source, however, due to invasive procedure, other sources, such as menstrual blood-derived MSCs (MenMSCs), seems an attractive alternative. Intracellular calcium [Ca2+] is known to have influence in MSCs differentiation, however, their role in stem cell chondrogenic differentiation are not elucidated. [Ca2+] can enter cells through many calcium specific channels or endoplasmic reticulum stores. The aim of this study was to evaluate association of intracellular calcium levels and different intracellular [Ca2+] channels regulation during BMMSCs, MenMSCs and chondrocytes chondrogenic differentiation. Cells were morphologicaly evaluated and incubated with different [Ca2+] channels regulators. Intracellular calcium was measured by fluorescence microscopy and flow cytometry. BMMSCs, MenMSCs and chondrocytes chondrogenic differentiation was estimated by Safranin-O staining and Collagen II antibodies. Results suggest that different [Ca2+] channels regulators contributed in the change of intracellular [Ca2+] concentration in all cells, and has influence on their proliferation capacity. During chondrogenic differentiation, MenMSCs possessed the strongest response to [Ca2+] channels antagonists, according to extracellular matrix protein synthesis. Mechanical compressure of chondroitin sulfate-tyramine hydrogels and human articular cartilage explants enhanced production of extracellural matrix proteins. These results demonstrate that intracellular [Ca2+] regulation through different [Ca2+] channels may play a role in regulation of chondrogenic differentiation.

Structure: introduction, 3 chapters, conclusions, references.

Thesis consists of 48 p. of text, 16 figures, 5 tables, 56 bibliographical entries.

Keywords: Chondrogenic differentiation, intracellular calcium, mesenchymal stem cells, osteoarthritis, voltage-gated calcium channels

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

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Greta Rakauskienė, 20144989
(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas
(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-18
(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2020 m. gegužės 27 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Viduląstelinio kalcio koncentracijos reguliavimas vykdant mezenchiminių kamieninių ląstelių chondrogeninę diferenciaciją“ patvirtintas 2020 m. balandžio 27 d. dekano potvarkiu Nr. 126fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Parenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: daktaras Eiva Bernotienė, Ilona Uzielienė. Mano darbo vadovas daktaras Eiva Bernotienė.

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

(Parašas)

Greta Rakauskiene
(Vardas ir pavardė)

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS *9*

LENTELIŲ SĄRAŠAS *10*

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS *11*

ĮVADAS *13*

1. LITERATŪROS APŽVALGA *15*

1.1 Kamieninės ląstelės **15**

1.2 Mezenchiminės kamieninės ląstelės **16**

1.2.1 Mezenchiminių kamieninių ląstelių šaltiniai 17

1.2.1.1 Kaulų čiulpų MKL 17

1.2.1.2 Menstruacijų kraujo MKL 18

1.2.2 Kamieninės ląstelės regeneracinėje medicinoje 18

1.3 Žmogaus sąnario kremzlė **20**

1.3.1 Osteoartritas 22

1.3.2 Mechaninio spaudimo įtaka kremzlei 22

1.4 Viduląstelinio kalcio jonai **24**

1.4.1 Kalcio kanalai 24

1.4.1.1 Kalcio kanalų reguliatoriai 26

1.5 Hidrogelių panaudojimas chondrogeninei diferenciacijai **26**

1.5.1 Chondroitino sulfato hidrogeliai 28

2. Tyrimo metodai *30*

2.1 Reagentai ir prietaisai **30**

2.2 Ląstelių išskyrimas **32**

2.2.1 Menstruacijų kraujo MKL išskyrimas 32

2.2.2 Kaulų čiulpų MKL išskyrimas 33

2.2.3 Chondrocitų ir eksplantų išskyrimas iš kremzlės audinio 33

2.3 Ląstelių kultivavimas ir paruošimas tyrimams **34**

2.4 Proliferacijos tyrimas, naudojant kalcio kanalų reguliatorius **35**

2.5 Viduląstelinio kalcio tyrimas, naudojant skirtingus kalcio kanalų reguliatorius **35**

2.5.1 Viduląstelinio kalcio įvertinimas fluorescenciniu mikroskopu 35

2.5.2 Viduląstelinio kalcio įvertinimas tėkmės citometru 36

2.6 Chondrogeninė diferenciacija **37**

2.6.1 Chondrogeninė diferenciacija CS-Tyr/želatinos karkasuose 38

2.6.2 Kokybinis diferenciacijos įvertinimas 39

2.6.2.1 RNR išskyrimas 40

2.7 Mechaninis kremzlės eksplantų ir hidrogelių spaudimas **40**

2.8 Azoto oksido aktyvumo matavimas **41**

3. Rezultatai ir jų aptarimas *42*

3.1 Ląstelių kultivavimas **42**

3.2 KČMKL ir chondrocitų proliferacinis pajėgumas **43**

3.3 Viduląstelinio kalcio kiekio analizė **44**

3.3.1 Kalcio kanalų reguliatorių įtakos viduląsteliniam kalciui vertinimas fluorescenciniu mikroskopu 44

3.3.2 Kalcio kanalų reguliatorių įtakos viduląstelinio kalcio koncentracijai vertinimas tėkmės citometru 45

3.4 Chondrogeninės diferenciacijos vertinimas **47**

3.5 Kalcio kanalų reguliatorių ir mechaninio spaudimo poveikis chondrogeninei diferenciacijai CS-Tyr/želatinos karkasuose 48

3.6 Kalcio kanalų reguliatorių ir mechaninio spaudimo poveikis žmogaus kremzlės eksplantams 49

3.7 Azoto oksido aktyvumo tyrimas 51

IŠVADOS 53

LITERATŪROS SĄRAŠAS 54

PRIEDAI 60

REZULTATŲ SKLAIDA 60

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Sveikos sąnario kremzlės struktūra 21
2 pav. ĮVKK struktūra su skirtingais subvienetais 26
3 pav. Chondrogeninės diferenciacijos mėginių schema 38
4 pav. CS-Tyr hidrogelio schematinis reakcijos mechanizmas 39
5 pav. CS-Tyr/želatinos hidrogeliai kartu su KČMKL po 21 dieną trukusios chondrogeninės diferenciacijos 39
6 pav. Ląstelių kultivavimas monosluoksnio kultūroje 42
7 pav. Kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių (KČMKL) proliferacija 1, 3, 5, 8 ir 12 dieną 43
8 pav. Chondrocitų proliferacija 1, 5, 8 ir 12 dieną 44
9 pav. Kalcio kanalų reguliatorių įtakos viduląsteliniam kalciui vertinimas fluorescenciniu mikroskopu 45
10 pav. Vidutinio Cal-520 fluorescencijos intensyvumo matavimas tėkmės citometru 47
11 pav. Histologinis chondrogeninės diferenciacijos vertinimas, dažant safraninu-O 48
12 pav. Kalcio kanalų reguliatorių ir mechaninio spaudimo įtaka chondrocitų, KČMKL ir MenMKL chondrogeninei diferenciacijai CS-Tyr/želatinos hidrogeliuose 49
13 pav. Kremzlės eksplantai veikti nifedipinu (10 μM) ir BayK8644 (10 μM) bei mechaniniu spaudimu 50
14 pav. Kremzlės eksplantų genų raiškos analizė 51
15 pav. Azoto oksido aktyvumas chondrocituose ir KČMKL 51
16 pav. Chondrocitų ir KČMKL negyvų ląstelių populiacijos 52

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Darbe naudoti reagentai. 30
2 lentelė. Darbe naudoti kalcio kanalų reguliatoriai ir naudojamos koncentracijos 31
3 lentelė. Darbe naudoti prietaisai. 31
4 lentelė. Naudojami kalcio kanalų reguliatoriai 36
5 lentelė. Chondrogeninės terpės sudedamosios dalys. 37

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

7-AAD – 7-amino-aktinomicinas D

Ca^{2+} – dvivalentis kalcio jonai

CCK-8 – komercinis ląstelių skaičiavimo rinkinys-8

CDE – cigarečių dūmų ekstraktas

CO_2 – anglies dioksidas

CS – chondroitino sulfatas

CS-Tyr – chondroitino sulfatas konjunguotas su tiraminu

DHP – 1,4-dihidropiridinai

DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė

DMSO – dimetilsulfoksidas

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodimido hidrochloridas

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

EKL – embrioninės kamieninės ląstelės

ET – endoplazminis tinklas

FBS – fetalinio jaučio serumas;

FGF – fibroblastų augimo veiksnys

GAG – gliukozaminoglikanai

H_2O_2 – vandenilio peroksidas

HKL – hematopoetinės kamieninės ląstelės

HRP – krienų peroksidazė

HVA – aktyvuojami aukštos įtampos

IGF – insulino augimo veiksnys

IL-1 – interleukinas-1

IMC – Inovatyvios medicinos centras

ĮVKK – įtampos valdomi kalcio kanalai

KČ – kaulų čiulpai

KČMKL – kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės

KL – kamieninės ląstelės

LVA – aktyvuojami žemos įtampos

MAPK – mitogenais aktyvinamų baltymų kinazė

MenMKL – menstruacijų kraujo mezenchiminės kamieninės ląstelės

MFI – vidutinis fluorescencijos intensyvumas

MHC – audinio suderinamumo kompleksas

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

NAD – nikotinamido adenino dinukleotidas

NADH – nikotinamido adenino dinukleotidas

NADHP – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

NADP – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

NHS – N-hidroksisukcinimidas

NO – azoto oksidas

OA – osteoartritas

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas

PEG – polietilenglikolis

PG – proteoglikanai

PKC – baltymo kinazė C

poly-HEMA – poli-(2-hidroksietilmetakrilatas)

PS – penicilinas ir streptomicinas;

PVA – polivinilalkoholis

RNR – ribonukleino rūgštis

TGF-β – transformuojantis augimo veiknsys β

Tyr – tiraminas

TNF- α – auglių nekrozės veiksnys-α

TRP – laikino potencialo receptorius

TRPV4 – laikinojo potencialo receptorius, V subšeima, 4 narys

ĮVADAS

Žmogaus sąnario kremzlės audinys pasižymi silpnu gebėjimu regeneruoti po audinio sužeidimo, kas lemia sąnario kremzlės degeneracinių ligų, tokių kaip osteoartritas (OA) pradžią ir progresiją (Mobasheri et al., 2019). Iki šiol nėra sukurta ilgalaikių vaistų ar terapijų gydyti OA, o kamieninės ląstelės (KL) susilaukia vis daugiau dėmesio audinių inžinerijoje, dėl gebėjimo diferencijuoti į kremzlinį audinį. Mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) šiuo metu yra plačiausiai naudojama priemonė bandant atkurti kremzlės audinį. Klasikiniu MKL, skirtu kremzlės regeneracijai, šaltiniu yra laikomi kaulų čiulpai, kadangi šios ląstelės dalyvauja pradinėse organizmo vystymosi stadijose susidarant kremzliniam audiniui bei yra labiausiai ištirtos siekiant regeneruoti kremzlę (Musumeci et al., 2014; Kassem, 2004). Tačiau dėl sudėtingo ir invazinio kaulų čiulpų išskyrimo ir eilės nesėkmingų bandymų panaudoti kaulų čiulpų MKL (KČMKL) kremzlės regeneracinėms terapijoms, ieškoma ir alternatyvių šaltinių MKL išskyrimui. Menstruacijų kraujo MKL (MenMKL) pritraukė didelį mokslininkų susidomėjimą dėl jų plataus diferenciacijos potencialo (Meng et al., 2007). Taip pat jos yra itin lengvai išgaunamos, nereikalauja jokių invazinių chirurginių procedūrų ir, svarbiausia, tos pačios donorės mėginius galima surinkti pakartotinai, palengvinant autologines transplantacijas ir padidinant jų sėkmės tikimybę. Dėl šių privalumų MenMKL gali tapti potencialiu regeneracinės medicinos įrankiu, tačiau jos vis dar yra naujos regeneracinės medicinos srityje ir jų chondrogeninės diferenciacijos pajėgumas nėra pakankamai ištirtas.

Chondrogeninė MKL diferenciacija yra sudėtingas, daugiapakopis procesas, kur ypatingai didelis dėmesys yra nukreiptas į molekulinių mechanizmų, kontroliuojančių MKL diferenciaciją valdymą. Viduląsteliniai kalcio jonai [Ca^{2+}] išlieka vienu svarbiausių veiksnių kontroliuojančių sėkmingą chondrogeninės diferenciacijos eigą. Kadangi [Ca^{2+}] kiekis pastoviai kinta esant išoriniam stimului, pavyzdžiui mechaniniam spaudimui, įtampos valdomi L-tipo kalcio kanalai (ĮVKK) pritraukė nemažai dėmesio kaip vienas pagrindinių viduląstelinio kalcio koncentraciją didinančių kanalų (Matta and Zakany, 2013). Tačiau į citozolį [Ca^{2+}] gali patekti ir iš endoplazminiame tinkle esančių saugyklų, kuriose yra kaupiami [Ca^{2+}] ir panaudojami esant nepakankamam [Ca^{2+}] padavimui iš išorės (Ye, 2010). Todėl [Ca^{2+}] pralaidumo per ĮVKK ir iš endoplazminio tinklo saugyklų tyrimai, bei diferenciacijos metu viduląstelinių mechanizmų priklausomybė nuo [Ca^{2+}] koncentracijos yra viena iš potencialių sričių norint plačiau suprasti MKL diferenciacijos pajėgumą. Papildomai, svarbu pabrėžti, kad pagrindiniai ĮVKK slopikliai priklauso 1,4-dihidropiridino grupės junginiams, kurie yra plačiai vartojami kaip antihipertenziniai vaistai, mažinantys kraujo spaudimą (Rahman, Kopec, Anis, Cibere ir Goldsmith, 2013). Nifedipinas ir isradipinas yra klasikiniai antihipertenziniai vaistai vartojami sergančiųjų širdies-kraujagyslių ligomis (Welzel ir Burger, 1990). Todėl šių vaistų vartojimas gali

turėti papildomą poveikį diferencijuojančioms ląstelėms bei sąnario kremzlės chondrocitų funkcijoms. Šiame darbe buvo naudojami ĮVKK slopikliai – nifedipinas, isradipinas, oksalatas (SR 33805), priešingu veikimo mechanizmu pasižymintys ĮVKK aktyvatoriai – BayK8644 ir FPL64176, palyginimui panaudotas reikšmingo chondrogeninei diferenciacijai TRPV4 kalcio kanalo (McNulty, Leddy, Liedtke and Guilak, 2015) slopiklis GSK2193874 bei endoplazminio tinklo [Ca^{2+}] saugyklų kanalų slopiklis ryanodinas, toliau vadinami kaip kalcio kanalų reguliatoriai. Taip pat kalcio kanalams įtakos turi mechaninis spaudimas, kurį paprastai patiria ir sąnario kremzlės audinys. Siekiant atkurti kremzlės audinio struktūrą yra naudojami įvairūs kremzlės užląstelinio užpildo baltymų (pvz. chondroitino sulfato) ląsteles įkapsuliuojantys karkasai, kurie paskatina ląstelių chondrogeninę diferenciaciją tridimensinėje erdvėje (Varghese 2008; Henrotin, Mathy, Sanchez and Lambert, 2010).

Darbo tikslas – įvertinti kalcio kanalų reguliatorių bei mechaninio spaudimo poveikį viduląstelinio kalcio koncentracijai bei jų įtaką chondrogeninei diferenciacijai žmogaus mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse ir kremzlės chondrocituose.

Atsižvelgiant į ateities perspektyvas, suplanuoti uždaviniai:

1. Palyginti žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių, išskirtų iš kaulų čiulpų ir menstruacijų kraujo, bei chondrocitų, išskirtų iš sąnario kremzlės, fenotipą;
2. Įvertinti kalcio kanalų reguliatorių įtaką KČMKL ir chondrocitų proliferacijai;
3. Palyginti skirtingų kalcio kanalų reguliatorių įtaką viduląstelinio kalcio kiekiui KČMKL, MenMKL ir chondrocituose;
4. Įvertinti KČMKL, MenMKL ir chondrocitų chondrogeninės diferenciacijos priklausomybę nuo kalcio kanalų reguliatorių;
5. Įvertinti mechaninio spaudimo bei įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų reguliatorių nifedipino ir BayK8644 įtaką KČMKL, MenMKL ir chondrocitų chondrogeninės diferenciacijos pajėgumui chondroitino sulfato-tiramino hidrogeliuose;
6. Įvertinti įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų reguliatorių nifedipino ir BayK8644 bei mechaninio spaudimo įtaką chondrogenezę nusakančių genų raiškai žmogaus sąnario kremzlės eksplantuose.
7. Nustatyti kalcio kanalų reguliatorių nifedipino ir BayK8644 įtaką azoto oksido aktyvumui KČMKL ir chondrocituose;

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Kamieninės ląstelės

Kamieninės ląstelės (KL) yra nediferencijuotos, nespecializuotos ląstelės, gebančios atsinaujinti, neribotai daugintis ir diferencijuotis į įvairius ląstelių tipus. Tai yra viena pagrindinių ląstelių grupių subrendusiame organizme, galinti diferencijuotis į daugiau nei 200 skirtingų ląstelių tipų (Rajabzadeh, Fathi ir Farahzadi 2019; Madonna, 2016). KL yra reikalingos embrioninio vystymosi metu, jų dėka išsivysto įvairūs audiniai ir organai, taip pat KL yra svarbios suaugusio žmogaus organizmui, jo audiniams ir organams palaikyti (Zenke, 2017).

KL, priklausomai nuo jų diferenciacijų pajėgumų yra skirstomos į kelis ląstelių tipus – totipotentines, pluripotentines, multipotentines, oligopotentines ir unipotentines KL (Bacakova et al., 2018).

Totipotentinės KL, tokios kaip apvaisintas oocitas, vadinamas zigota, gali diferencijuoti į bet kurį ląstelių tipą randamą organizme (Madonna, 2016). Jos gali sudaryti tris pradinius embriono gemalinius lapelius bei embriono išsivystyme dalyvaujančius audinius, tokius kaip placenta (Rajabzadeh et al., 2019; Zenke, 2017).

Pluripotentinės KL gali diferencijuoti į beveik visus ląstelių tipus. Geriausias šių ląstelių pavyzdys yra embrioninės KL (EKL). EKL yra atsinaujinančios ląstelės, išskirtos iš vidinės blastocistos ląstelių masės. Dėl didelio diferenciacijos ir proliferacijos pajėgumo šios ląstelės yra daug žadančios ląstelių terapijoje ir regeneracinėje medicinoje, tačiau mokslinius tyrimus riboja etiniai klausimai (Bacakova et al., 2018; Rajabzadeh et al., 2019).

Multipotentinės KL turi daug mažesnį proliferacinį pajėgumą nei dvi prieš tai aprašytos grupės. Šioms ląstelėms priklauso mezenchiminės KL (MKL) ir hematopoetinės KL (HKL), jos gali diferencijuoti į ribotą kiekį ląstelių tipų. HKL randamos kaulų čiulpuose ir gali diferencijuoti į kraujo ląsteles per visą žmogaus ar gyvūno gyvenimo laikotarpį. Šios ląstelės yra svarbios, nes gali papildyti trūkstamus ar dingusius hematopoetinės ir imunologinės sistemos komponentus. MKL gali diferencijuoti į ribotą kiekį ląstelių tipų, geba atsinaujinti ir randamos daugelyje skirtingų audinių ir organų tokių kaip riebalinis audinys, kaulų čiulpai, oda, periferinis kraujas, virkštelės kraujas, kepenys, plaučiai ir kiti (Bacakova et al., 2018). MKL gali diferencijuoti į kaulo, raumenų, riebalų ir kai kuriuos kitus jungiamuosius audinius (Madonna, 2016; Mirzaei et al. 2018). Jos yra plačiai naudojamos ląstelių terapijoje, transplantuojant ląsteles (Augello ir De Bari, 2010; Rajabzadeh et al., 2019).

Oligopotentinės KL pasižymi dar silpnesniu diferenciaciniu pajėgumu, geba diferencijuoti tik į du ląstelių tipus (Bacakova et al., 2018).

Unipotentinės KL lyginant su jau minėtomis KL susilaukia mažiausiai dėmesio. Šios ląstelės gali diferencijuoti tik į vieną ląstelių tipą, pavyzdžiui raumenų KL. Suaugusio žmogaus kūne šios ląstelės turi mažiausią diferenciacijos pajėgumą, lyginant su kitomis KL (Rajabzadeh et al., 2019)

Dalinai diferencijavusios ląstelės yra vadinamos ląstelėmis pradininkėmis. Jos atsiranda kai KL pradeda diferencijuoti tam tikra kryptimi, bei turi pereiti kelis diferenciacijos etapus kol tampa visiškai diferencijuota ląstele (Madonna, 2016).

1.2 Mezenchiminės kamieninės ląstelės

Po audinio sužeidimo ląstelių išskiriami biologiniai signalai stimuliuoja MKL, kurios aktyvuojasi ir dalinasi simetriškai arba asimetriškai bei migruoja į sužeidimo vietas regeneruoti pažeistą audinį. MKL geba atsinaujinti ir diferencijuoti į labiau specializuotas ląsteles, tokias kaip osteoblastai, chondrocitai ir adipocitai (Chen, Qu, ir Xiang, 2019). MKL naudojamos įvairiose klinikinėse studijose regeneruojant kaulų ir kremzlių defektus (Lin et al., 2019). Ląstelėmis paremtoje kremzlės regeneracijoje, MKL sulaukę ypatingai daug dėmesio dėl savo gana lengvo prieinamumo, izoliacijos ir padauginimo (Lo Monaco et al., 2018). Chondrogenine kryptimi diferencijuotos MKL sekretuoja proteoglikanus (PG), glikozaminoglikanus (GAG) ir kolagenus (kurių didžiąją dalį sudaro II tipo kolagenas), kurie yra esminiai kremzlės audinio komponentai. Pagrindiniai augimo veiksniai svarbūs kremzlės regeneracijai yra sekretuojami MKL bei priklauso TGF-β šeimai (Lo Monaco et al., 2018; Mirzaei et al. 2018). MKL tinkamos alogeniniam panaudojimui dėl išgaunamo gana didelio ląstelių skaičiaus ir jų imunoreguliatorinių savybių (Mirzaei et al. 2018).

MKL pasižymi imunosupresija, jos gali prislopinti tam tikras imuninių ląstelių, tokių kaip T, B ir NK ląstelių funkcijas – proliferaciją, tirpių veiksnių (citokinų) gamybą ir ląstelinį citotoksiškumą. MKL siekiama panaudoti klinikinėse studijose dėl negaminamo, ar labai mažais kiekiais gaminamo, audinio suderinamumo komplekso (***angl***. *major histocompatibility complex*, MHC) I klasės antigenų ir labai silpnai gaminamų II klasės MHC antigenų, nepriklausomai nuo MKL šaltinių (Klingemann et al., 2008; Hass, Kasper, Böhm ir Jacobs, 2011). Imuninio atsako reguliavimas gali sumažinti kremzlės irimą, sergant tokiomis ligomis, kurių metu nekontroliuojamas imuninis atsakas yra žalingas (Lo Monaco et al., 2018; Mirzaei et al., 2018).

Siekiant pritaikyti MKL audinių regeneracijai, svarbu gebėti nukreipti jas į pažeidimo vietą, toks procesas vadinamas „*homing*“. Pažeisto audinio ląstelės gamina signalinės molekulės, kurios aktyvuoja MKL, dėl ko padidėja CD44 paviršiaus žymens raiška MKL paviršiuje. Nustatyta, kad suleidus MKL, išskirtų iš vyresnio žmogaus, į kraujagyslę, mažesnis kiekis ląstelių pasiekė pažeidimo vietą, lyginant su iš jauno žmogaus išskirtomis MKL. Taip pat, *in vitro* padauginus pelių KČMKL, jos prarado gebėjimą migruoti į sužeidimo vietą. Visų pasažų iš jauno žmogaus išskirtos MKL pasižymėjo geresnėmis galimybėmis migruoti į pažeidimo vietą, lyginant su iš

vyresnio žmogaus išskirtomis MKL. Manoma, kad MKL senėjimas turi teigiamą poveikį adipogenezei, bet neigiamą poveikį osteogenezei, kas lemia sumažėjusias kaulų formavimosi galimybes. Tai patvirtinta ir *in vivo* tyrimai, kurių metu nustatyta, kad senstant, kaulų čiulpuose buvo rąstas padidėjęs riebalinio audinio kiekis (Lin et al., 2019).

1.2.1 Mezenchiminių kamieninių ląstelių šaltiniai

MKL išskyrimo būdas, kultivavimas ir dalis savybių priklauso nuo jų šaltinio. MKL ląstelių ir jų šaltinių įvairovė ir galimybė plačiai panaudoti, skatina įvairius tyrimus susijusius su MKL. Jų savybės, tokios kaip beribis atsinaujinimas ir diferenciacinis pajėgumas yra ypatingai svarbūs regeneracinėje medicinoje, tačiau optimalus ląstelių šaltinis vis dar nerastas (Rajabzadeh et al., 2019; Ren et al., 2016).

Žmogaus MKL pirmą kartą identifikuotos kaulų čiulpuose ir nors KČMKL yra laikomos MKL standartu bei yra labiausiai ištirtos, invazinė bei skausminga procedūra jas išskiriant, kartu su mažu išskiriamų ląstelių kiekiu išlieka didžiausiais jų trūkumais. Dėl to naujų MKL šaltinių paieška yra vis dar aktuali (Chen et al., 2019). Vėliau atrasti ir kiti MKL šaltiniai, tokie kaip riebalinis audinys, placenta, virkštelė, danties pulpa, periferinis ar menstruacijų kraujas (Hass et al., 2011; Chen et al., 2019; Ren et al., 2016). Ląstelės, išskirtos iš šių audinių gamina panašius paviršiaus žymenis, tačiau turi ir tam tikrų skirtumų. Pavyzdžiui, MKL išskirtos iš žmogaus riebalinio audinio bei odos, žymiai skyrėsi gebėjimu diferencijuoti adipogenine ir osteogenine kryptimi (Mirzaei et al. 2018). Manoma, kad MKL supanti aplinka, audiniai, vadinamoji ląstelių niša, yra labai svarbus veiksnys lemiantis MKL savybes. MKL nišą sudaro jas supančios kitos ląstelės, užląstelinis užpildas, kraujagyslių tinklas bei biocheminiai ir fiziniai veiksniai. Esant normalioms sąlygoms, niša palaiko MKL ramioje būsenoje bei neleidžia joms išsieikvoti. Esant stimuliacijai dėl sužeidimo ar kitų signalų, nišos pokyčiai aktyvuoja MKL ir paskatina jų proliferaciją, diferenciaciją ir migraciją. Šios aktyvuotos ląstelės gali dalintis į dukterines MKL arba pradėti diferencijuoti tam tikra kryptimi (Lin et al., 2019).

1.2.1.1 Kaulų čiulpų MKL

KČMKL yra vienos svarbiausių MKL, naudojamų įvairių ligų terapijoje bei audinių regeneracijoje. Nustatyta, kad KČMKL negamina HKL būdingų paviršiaus žymenų, tokių kaip CD34, CD14, CD45, CD11 bet gamina MKL būdingus žymenis CD105, CD73, CD44, CD90, CD71 (Mirzaei et al. 2018; Pontikoglou et al., 2011).

KČMKL vis dar yra labiausiai tiriamos MKL bei laikomos „auksiniu“ standartu. KČMKL yra išskiriamos iš vidinės kaulo dalies – kaulų čiulpų. Išskyrimas reikalauja KČ biopsijos, kuri yra skausminga ir gana sudėtinga procedūra. Taip pat, KČMKL turi tendenciją prarasti savo proliferacinį pajėgumą priklausomai nuo donoro amžiaus. Pastebėtas žymus diferenciacinio pajėgumo susilpnėjimas kuomet donoras yra vyresnis nei 20 metų amžiaus (Klingemann et al.,

2008; Pontikoglou et al., 2011). Išskiriamų KČMKL kiekis yra nepastovus, manoma, kad iš visų išskiriamų ląstelių tipų, KČMKL sudaro tik 0,001-0,001 % ląstelių. (Hass et al., 2011; Augello ir De Bari, 2010; Lin et al., 2019).

1.2.1.2 Menstruacijų kraujo MKL

Iš pradžių MenMKL buvo apibūdintos kaip endometriumą regeneruojančios ląstelės. Vėliau, pastebėjus tokius privalumus kaip neinvazinis jų išgavimas, didelis proliferacinis pajėgumas, žemas imunogeniškumas, MenMKL pradėta tirti labiau. MenMKL, išskirtos iš jaunų ir sveikų moterų, geba dalintis kas 20 valandų, kas yra dvigubai greičiau nei KČMKL (vidutiniškai kas 40-45 val.). MenMKL siejamos su gimdos gleivinės atsinaujinimu kiekvieno ciklo metu (Rossignoli et al., 2013). Svarbu, kad MenMKL galima surinkti daug kartų iš tos pačios donorės, tai garantuoja didelius mažo pasažo ląstelių kiekius. Net didėjant pasažų skaičiui, MenMKL proliferacijos greitis nemažėja (Alcayaga-Miranda et al., 2015). Taip pat, jos pasižymi panašiu fenotipu ir savybėmis kaip ir KČMKL, įskaitant klasikinę trijų krypčių diferenciaciją ir paviršiaus žymenų raišką (Chen et al., 2019). MenMKL gamina tokius paviršiaus žymenis kaip CD9, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, MHC I, OCT-4, CD166, CXCR4. Iš paminėtų paviršiaus žymenų CD29, CD73, CD90, CD105 yra priskiriami MKL. MenMKL taip pat negamina HKL būdingų žymenų bei HLA-DR (Alcayaga-Miranda et al., 2015).

MenMKL yra plačiai tiriamos priešklinikinėse studijose ir daugelyje jų parodė teigiamą poveikį siekiant išvengti ar kontroliuoti įvairias ligas, tokias kaip kepenų ligos, diabetas, insultas, Diušeno raumenų distrofija, kiaušidžių ligos, miokardo infarktas, Ašermano sindromas, Alzheimerio liga, ūmios plaučių ligos, odos žaizdos, endometriozė bei neurodegeneracinės ligos. MenMKL gebėjimas diferencijuoti į skirtingų tipų specializuotas ląsteles leidžia jas panaudoti įvairių audinių regeneracijai. Dėl gerų imunosupresinių savybių MenMKL galima suleisti intraveniškai, taip pat jos geba migruoti į uždegimo ar sužeidimo vietas. Nors vis daugėja tyrimų su MenMKL, vis dar nėra nustatyta kiek ilgai jos gali išgyventi svetimame kūne, taip pat nežinomas jų ilgalaikis patikimumas (Chen et al., 2019).

1.2.2 Kamieninės ląstelės regeneracinėje medicinoje

Poreikis atstatyti ar pakeisti pažeistą audinį nuolatos auga dėl nuo amžiaus priklausomų ir kitų degeneracinių ligų, auglių ar traumų. Siekiant regeneruoti audinį yra tiriamos įvairios ląstelės. Diferencijuotos tam tikro audinio ląstelės jau turi tinkamą fenotipą bei geba atlikti norimas biologines funkcijas tokias kaip užląstelinio užpildo gamyba, tam tikrų signalinių molekulių sekrecija bei tinkamai sąveikauti su šalia esančiomis ląstelėmis ir audiniais. Tačiau jau diferencijuotų ląstelių panaudojimas audinių regeneracijoje yra dažnai ribotas dėl silpnesnio proliferacinio pajėgumo ir dediferenciacijos pasėkmių dauginant *in vitro*. Dėl to KL laikomos

turinčiomis daugiau privalumų nei diferencijuotos ląstelės, jos turi didesnį proliferacinį pajėgumą bei išlaiko savo fenotipą gausinant vienasluoksnio kultūroje (Bacakova et al., 2018).

Daugiau nei 60 metų pagrindinė KL terapijos kryptis buvo HKL panaudojimas įvairiems genetiniams ir hematologiniams sutrikimams gydyti (Rajabzadeh et al., 2019). Tačiau KL panaudojimas audinių inžinerijoje susilaukia vis daugiau dėmesio. Viena pagrindinių regeneracinės medicinos ir audinių inžinerijos krypčių yra paveldėtų, po traumos atsiradusių ar degeneracinio kaulo, sąnario ar kremzlės pažeidimų gydymas (Klingemann, Matzilevich ir Marchand, 2008). MKL terapija yra puiki alternatyva su daug žadančiais terapiniais privalumais, atkuriant pažeistos kremzlės struktūrą ir funkcijas. Terapijoje MKL dažniausiai naudojamos dviem būdais. Pirmasis – šviežiai išskirtos MKL gali būti transplantuojamos tiesiai į pažeistą audinį, kur *in vivo* diferencijuoja, tampa reikiamo audinio ląstelėmis ir parakriniškai skatina aplinkines ląsteles gaminti užląstelinio užpildo baltymus. Antras – išskyrus MKL, su jomis atliekamos tam tikros manipuliacijos *in vitro* ir tik tuomet implantuojamos. Daugelyje atvejų MKL yra dalinai diferencijuojamos, siekiant paskatinti tam audiniui būdingą diferenciaciją. Siekiant į pažeidimo vietą pristatyti KL yra naudojamos tiesioginės injekcijos. Pagrindinis tiesioginių injekcijų privalumas yra procedūros paprastumas, tačiau ši procedūra yra naudinga tik pradinėse kremzlės pažeidimo stadijose, kadangi injekcijos metu sušvirkštos ląstelės gali neišsilaikyti pažeidimo vietoje žmogui judant (Lo Monaco et al., 2018). Be tiesioginės MKL injekcijos, tiriami būdai ląsteles pristatyti į pažeidimo vietą naudojant suyrančius karkasus (Lin, Sohn, Shen, Langhans ir Tuan 2019). Į sąnarį suleidus MKL pastebėtas simptominis pagerėjimas, kuris, manoma, yra susijęs su teigiamu MKL poveikiu gydant osteoartritą (OA) (Klingemann et al., 2008).

Siekiant atkurti kremzlės audinį yra atliekami įvairūs priešklinikiniai tyrimai, patvirtinantys, kad ląstelių terapija gali padėti regeneruoti kremzlės audinio pažeidimus. Tam tikros pluripotentinės ir multipotentinės KL populiacijos yra laikomos galimomis kandidatėmis KL paremtoje kremzlinio audinio regeneracijoje. EKL, kaip pluripotentinės ląstelės, pasižymi didesniu diferenciaciniu ir proliferaciniu pajėgumu nei MKL, todėl manoma, kad EKL panaudojimas audinių inžinerijoje būtų tinkamesnis. Tačiau MKL, priešingai nei EKL, nekelia papildomų etinių klausimų ar imunologinių problemų, kadangi gali būti išgaunamos iš recipiento. Vienas iš EKL minusų regeneracinėje medicinoje yra tai, kad recipientas dažnai turi vartoti imunosupresantus, nes EKL dažniausiai būna alogeninės. Alogeninėmis vadinamos ląstelės, kai recipientas ir donoras yra skirtingi žmonės, o autogeninėmis ląstelėmis – kai donoras ir recipientas yra vienas žmogus. Nekontroliuojamos EKL diferenciacijos taip pat gali sukelti įvairių problemų. Transplantuotos EKL gali formuoti teratomas (Madonna, 2016). Iš multipotentinių KL populiacijų, vienas dažniausiai naudojamų šaltinių yra KČMKL, kurios tirtos įvairiuose mažų ir didelių gyvūnų modeliuose (Lo Monaco et al., 2018). Į kremzlę panašaus audinio susiformavimas

buvo pastebėtas paveikus šunų kremzlės defektą autologinėmis KČMKL, o į žiurkės kelį persodinus didelio tankumo KČMKL ir fibrino agregatus pastebėtas visiškas išgijimas (Lin et al., 2019; Pontikoglou, Deschaseaux, Sensebé ir Papadaki 2011).

Nors teigiama, kad KČMKL turi privalumų regeneneruojant kremzlę, sudėtinga procedūra jas išgaunant skatina ieškoti alternatyvių KL šaltinių. Dideli kiekiai riebalinio audinio MKL gali būti lengvai išgaunami po riebalų nusiurbimo operacijos. Atlikti tyrimai parodė sėkmingą kremzlės formavimąsi po riebalinio audinio MKL injekcijos į kelio sąnarį triušiams. Tačiau, riebalinio audinio MKL, lyginant su KČMKL turi žymiai mažesnį osteogeninės ir chondrogeninės diferenciacijų potencialą *in vitro* ir *in vivo* (Lo Monaco et al., 2018). Svarbu pažymėti, kad dauguma moksliniuose tyrimuose naudojamų MKL yra išskiriamos iš pooperacinių pažeistų ar nereikalingų audinių, iš pacientų, kurie dažniausiai serga kaulų ar sąnarių ligomis tokiomis kaip OA. Vis dar nežinoma kokią įtaką tam tikros ligos turi MKL savybėms, dėl to labai svarbu atskirti eksperimentus atliktus su sveiko paciento MKL nuo sergančiojo MKL (Lin et al., 2019).

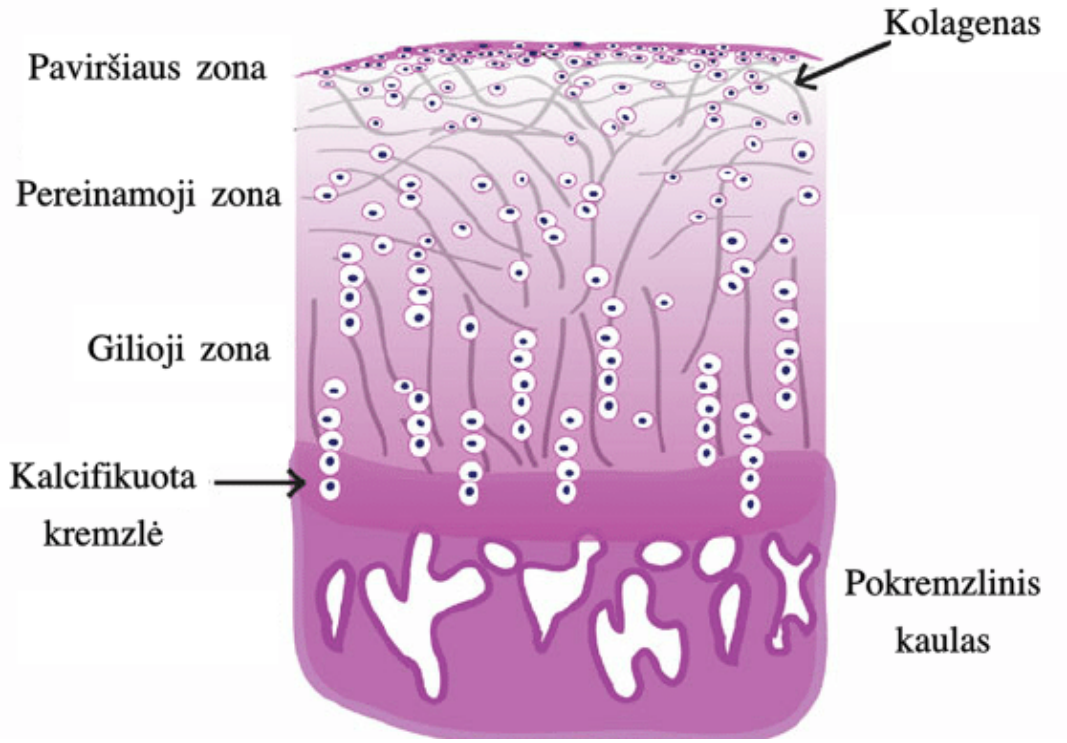
Nepaisant daug žadančio chondrogeninės diferenciacijos potencialo *in vitro*, MKL pritaikymas kremzlės regeneracijoje vis dar turi keletą sunkumų. Auginimo terpės papildymas įvairiais augimo veiksniais, didelių ir pasikartojančių dozių naudojimas, žymiai padidina KL terapijos kainą bei gali sukelti šalutinių poveikių (Lo Monaco et al., 2018; Mirzaei et al. 2018).

1.3 Žmogaus sąnario kremzlė

Sąnario kremzlė yra unikalus daugiafunkcinis audinys, puikiai prisitaikęs atlaikyti mechaninį spaudimą (Akkiraju ir Nohe, 2015). Sąnario kremzlė atlieka vienas svarbiausių sąnario funkcijų bei yra esminė kūno judėjime. Suaugusiųjų sąnario kremzlės sudarytos iš sudėtingo, daugiasluoksnio audinio, kurį sudaro 95% užląstelinio užpildo ir tik 5% pavieniai chondrocitai (Decker, Koyama ir Pacifici, 2016; Musumeci, 2016). Užląstelinis užpildas sudarytas iš II tipo kolageno ir PG (Lee, Grad, Wimmer ir Alini, 2006). Kolagenai yra dažniausios makromolekulės užląsteliniame užpilde, sudarančios net 60% kremzlės sauso svorio. PG, antra pagal dydį grupė makromolekulių, yra stipriai glikozilinti baltymų monomerai, atsparūs spaudimo jėgoms dėl sąjungos su vandeniu (Lo Monaco et al., 2018; Akkiraju ir Nohe, 2015; Musumeci, 2016). Kartu, šios makromolekulės sukuria pagrindines ir fundamentalias biomechanines sąnario kremzlės savybes – stangrumą ir smūginį tąsumą (Decker et al., 2016). Nepaisant, kad chondrocitai sudaro tik 5% kremzlės audinio, jie yra būtini kremzlės funkcijai ir homeostazei (Akkiraju ir Nohe, 2015). Šios ląstelės yra jautrios mechaniniam poveikiui ir atsakingos už užląstelinio užpildo gamybą, tačiau jo kaitos laikas nėra tikslus ir aiškus. PG kaita užima maždaug 25 metus, o kolageno puslaikis svyruoja tarp kelių dešimtmečių iki 400 metų (Akkiraju ir Nohe, 2015). Kremzlės audinys neturi kraujagyslių, kas iš dalies paaiškina silpną gebėjimą regeneruoti esant sužeidimui.

Dėl kraujagyslių trūkumo chondrocitai yra priklausomi nuo maistinių medžiagų ir metabolitų difuzijos nuo sąnario paviršiaus (Lo Monaco et al., 2018; Akkiraju ir Nohe, 2015; Lee et al., 2006).

Mechaninis poveikis stimuliuoja sąnario kremzlės chondrocitus ir indukuoja užląstelinio užpildo molekulių gamybą, taip palaikant audinio vientisumą. Mechaniniai signalai reguliuoja biocheminį aktyvumą, kurio metu ląstelės fizinius stimulus paverčia elektriniais atsakais, šis reiškinys vadinamas mechanotransdukcija. Kremzlės spaudimas sukelia sudėtingus pokyčius audinyje, tokius kaip užpildo ir ląstelių deformacija, hidrostatinis ir osmotinis slėgis, skysčių judėjimas, jonų koncentracija. Į šiuos pokyčius reaguoja mechanoreceptoriai, tokie kaip mechaniniam poveikiui jautrūs jonų kanalai ir integrinai, esantys ląstelių paviršiuje. Chondrocitų membranose esantys kanalai ir jų funkcijos nėra pilnai ištirti, kadangi daugelis kanalų atlieka daugiau nei vieną funkciją ir tai labai apsunkina mokslininkų darbą (Mobasheri et al., 2019). Šių mechanoreceptorių aktyvavimas pradeda viduląstelinę signalinimo kaskadą, kuri lemia naujo audinio ar jo komponentų gamybą (Musumeci, 2016).



1 pav. Sveikos sąnario kremzlės struktūra.

Sąnario kremzlės audinys yra daugiasluoksnis, jį sudaro paviršiaus, pereinamoji ir gilioji zonos. 1 pav. pavaizduota sveikos sąnario kremzlės struktūra ir jai būdingas chondrocitų išsidėstymas (Gadjanski, Spiller ir Vunjak-Novakovic, 2012). Suaugusio žmogaus sąnario kremzlės paviršiaus zoną sudaro tankus užląstelinis užpildas ir išilgėję maži chondrocitai, kurie gamina lubrikantus ir suteikia audiniui labai svarbų atsparumą trinčiai. Pereinamoje kremzlės zonoje chondrocitai yra apvalūs ir didesni nei paviršiaus zonoje. Šioje zonoje chondrocitai gamina, kaupia ir palaiko visas kremzlės užpildui būdingas molekules, įskaitant II tipo kolageną ir

agrekaną, taip užtikrina audiniui būtiną biomechaninį atsparumą. Giliausiame sluoksnyje chondrocitai dažniausiai yra dar didesni nei viduriniajame, taip pat prisideda prie užpildo gamybos bei yra atsakingi už sąveikas su pokremzliniu kaulu (Decker et al., 2016). Giliosios zonos chondrocitai yra galutinai diferencijavę ir aktyviai gamina X tipo kolageną (Akkiraju ir Nohe, 2015). Senstant, chondrocitų kiekis viršutiniame kremzlės sluoksnyje mažėja, atitinkamai didėjant jų kiekiui giliausiame kremzlės sluoksnyje. Dėl to mažėja užpildo hidratacija, padidėja stingumas. Tokie pokyčiai senstant gali prisidėti prie degeneracinių ligų, tokių kaip OA, atsiradimo (Akkiraju ir Nohe, 2015).

1.3.1 Osteoartritas

Pasikartojantys kremzlės sužeidimai gali sukelti vietinius defektus ar chronišką degeneraciją. Galimi daliniai arba pilno kremzlės sluoksnio defektai. Galiausiai kremzlės defektai sukelia su judėjimu susijusį skausmą, patinimą, dažniausiai sumažina galimybę judėti ir progresuoja į OA (Lo Monaco et al., 2018; Lee et al., 2006). OA yra sudėtinga liga, apimanti visus sąnario audinius (Gratal et al., 2019). Ją dažniausiai lemia sąnario sužeidimas, nutukimas bei senyvas amžius. OA pagrindiniai simptomai yra chroniškas skausmas, sąnario nestabilumas, nepaslankumas (Chen et al., 2017; Peters, Akhtar, Comerford ir Bates, 2018).

OA sąnario kremzlėje esantys chondrocitai gamina įvairius uždegiminius veiksnius, tokius kaip interleukinas-1 (IL-1), auglių nekrozės veiksnys-α (TNF- α), prostaglandinai ir azoto oksidas (NO). NO stabdo kremzlės audiniui svarbių proteoglikanų ir kolageno sintezę, aktyvuoja metaloproteinazes bei chondrocitų apoptozę (Abramson, 2008; Uzieliene et al., 2019).

Šiuo metu nėra vaistų, kurie efektyviai gydytų kremzlės defektus. Siekiant išvengti kremzlės sužeidimo progresijos į OA gali būti pritaikyta ląstelių terapija. Ląstelių terapijoje gali būti naudojamos vienos ląstelės, tiek chondrocitai, tiek MKL, kokultūros ar kombinacija su įvairiais karkasais ir augimo veiksniais. Nors MKL ir chondrocitai yra tinkamos ląstelės terapijai, tačiau vis dar reikalingas jų optimizavimas. Naudojant chondrocitus, reikalingas jų padauginimas *in vitro*, kadangi iš audinio išgaunamų chondrocitų kiekis yra per mažas transplantacijai (Vinod, Kachroo, Sathishkumar ir Boopalan, 2018). Tačiau tai dažniausiai nežada ilgalaikių klinikinių sprendimų (Lo Monaco et al., 2018). Šiuo metu be skausmo valdymo ir paskutinių stadijų chirurginių intervencijų, vis dar nerasta efektyvių terapijų gydyti OA (Chen et al., 2017).

1.3.2 Mechaninio spaudimo įtaka kremzlei

Mechanobiologija yra auganti mokslo sritis, jungianti biologiją ir inžineriją, kuri tiria biomechaniką ir judėjimo įtaką ląstelių morfologijai ir funkcijoms. Pagrindinis tiriamasis yra mechanotransdukcija, molekulinis mechanizmas, kuriuo ląstelės reaguoja į mechaninį poveikį. Sąnario kremzlės vystymasis *in vivo* yra veikiamas mechaninio poveikio. Supratus MKL skatinimą diferencijuoti chondrogenine kryptimi mechaninio poveikio pagalba stipriai palengvėtų

audinių inžinierių darbas, kurių tikslas yra sukurti funkcionalią kremzlę su tinkamomis mechaninėmis savybėmis (Musumeci, 2016).

Sąnario kremzlė nuolatos patiria mechaninį spaudimą. Žmogaus klubo sąnarys stovėjimo metu patiria 1 MPa spaudimą, vaikštant apie 0.1-4 MPa bei iki 20 MPa stojantis nuo kėdės ar šokinėjant. Mechaninis poveikis turi įtakos daugeliui fizikinių ir biocheminių poveikių kremzlės audiniui, įskaitant kremzlės deformaciją, hidrostatinį spaudimą, osmotinį spaudimą, maistinių medžiagų ir jonų koncentracijų gradientus bei pH pokyčius (Lee et al., 2006). Dinaminio spaudimo įtaka gali veikti per įvairius veiksnius, tokius kaip skysčių tėkmė, audinio ir ląstelių deformacija ir hidrostatinis spaudimas. Audiniuose, spaudimo sukeltas skysčių judėjimas gali stimuliuoti maistinių medžiagų ir augimo veiksnių pernešimą (Dolzani et al., 2019; Liu et al., 2016). Tuo metu, kai kremzlė yra spaudžiama, susidaro pasipriešinimas skysčių judėjimui, dėl ko susidaro hidrostatinis slėgis. Mechaninė stimuliacija geba aktyvuoti įvairius ląstelės membranoje esančius jonų kanalus ir nešiklius. Chondrocitų mechanotransdukcija prasideda sąveikaujant ląstelės membranai ir užląsteliniam užpildui (Dolzani et al., 2019). Pastebėta, kad mechaninis spaudimas paveikia chondrocitų membranoje esančius jonų kanalus, kurie mechaninį signalą verčia įvairiais cheminiais signalais ir gali paveikti chondrocitų diferenciaciją, proliferaciją ir užląstelinio užpildo gamybą (Liu et al., 2016). Pavyzdžiui, pastebimas kalcio jonų [Ca^{2+}] padidėjimas po ląstelės deformavimo, trinties ar hidrostatinio spaudimo. Taip pat, esant nifedipinui, specifiniam kalcio kanalų inhibitoriui, sulėtėja spaudimo sukelta proliferacija ir chondrocitų brendimas (Lee et al., 2006).

Mechaninis spaudimas be abejonės yra vienas svarbiausių veiksnių sąnario kremzlės audinio inžinerijoje. Nustatyta, kad dinaminis spaudimas (0.5-1 MPa), fiziologiniu dažnumu (0.01-1 Hz) gali stimuliuoti kolageno, PG ir fibronektino biosintezę. Taip pat pastebėta, kad mechaninis poveikis pagerina užląstelinio užpildo gamybą naudojant karkasuose išsėtus chondrocitus. Naudojant chondrocitus ir agarozės gelį, bei dinaminį spaudimą (3% apkrova, 0.01-1 Hz per 10 valandų) PG sintezė padidėjo 6-25%. Naudojant 15% apkrovą, 1 Hz dažnį, giliojoje zonoj esančių chondrocitų GAG sintezė padidėjo 50%, bei 40% padidėjo pereinamosios zonos chondrocitų proliferacijos pajėgumas. Pastebėtas 2 kartų padidėjimas PG ir 3 kartų kolageno gamyboje naudojant agarozės gelio konstruktus bei protarpinius spaudimus (apie 10% apkrova 1 Hz dažniu, 3 ciklai per dieną, 5 dienas per savaitę) keturias savaites. Manoma, kad ilgalaikėms kultūroms reikalingas labai mažas stimuliacijos kiekis norint pastebėti reikšmingą pokytį jų biocheminėse ir biomechaninėse savybėse. Chondrocitais užsėti peptidų geliai, mechaniškai veikti kas antrą dieną (45 min, 2.5% apkrova, 1 Hz dažnumu, 4 kartus per dieną) turėjo 22% daugiau GAG, lyginant su mechaniškai neveiktomis kontrolėmis po 39 dienų. Taip pat, naudojant chondrocitais užsėtus kalcio fosfato karkasus, buvo nustatyta, kad užtenka vos 6 minučių 5% apkrovos, 1 Hz dažniu per

dieną, kad 40% padidėtų kolageno ir 30% PG kiekis po keturių savaičių. Hidrostatinis spaudimas (5 MPa) chondrocitams, išsėtiems agarozės gelyje 4 kartus padidino agrekano ir 50% II tipo kolageno mRNR kiekius bei paskatino PG gamybą (Lee et al., 2006).

Mechaninis spaudimas taip pat gali turėti neigiamą įtaką ir prisidėti prie kremzlės audinio degeneracijos, ypač sergant OA (Liu et al., 2016).

1.4 Viduląstelinio kalcio jonai

Viduląstelinio [Ca^{2+}] osciliacijos yra vienas iš molekulinių chondrocitų atsakymų į mechaninį poveikį, įskaitant spaudimą, skysčių tėkmę, hidrostatinį spaudimą, elektrinį veikimą. [Ca^{2+}] yra ypatingi, kadangi jie gali ne tik keisti membranos potencialą, bet ir atlikti signalinių molekulių darbą (Tan et al., 2019). Membranos potencialas yra elektrinio potencialo skirtumas tarp ląstelės vidaus ir išorės. Užląstelinio [Ca^{2+}] koncentracija yra tūkstančiais kartų didesnė nei viduląstelinio [Ca^{2+}] koncentracija fiziologinėmis sąlygomis. Ląstelės geba keisti savo membranos potencialą reguliuojant jonų kanalus ir pompas (Atsuta, Tomizawa, Levin ir Tabin, 2019). [Ca^{2+}], kaip signalinė molekulė, geba aktyvuoti kelis signalinius kelius, tokius kaip kalmodulino/kalcineurino ir PKC/MAPK, bei yra svarbus įvairioms biologinėms ląstelių funkcijoms, tokioms kaip adhezija, metabolizmas, sekrecija, proliferacija ir apoptozė (Atsuta et al., 2019; Lv et al., 2018).

Pastebėta teigiama koreliacija tarp [Ca^{2+}] signalinimo ir užląstelinio užpildo sintezės esant mechaniniam spaudimui. Manoma, kad [Ca^{2+}] osciliacijų manipuliacijos gali turėti įtakos užląstelinio užpildo gamybai bei OA vystymuisi. Viena iš chondrocitų disfunkcijos priežasčių gali būti padidėjęs [Ca^{2+}] signalinimas sergant OA, todėl [Ca^{2+}] kanalų inhibicija būtų vienas iš terapijos būdų prieš OA. Viduląstelinis chondrocitų, išskirtų iš OA kremzlės audinio, pH ir [Ca^{2+}] atsakas į mechaninį poveikį yra kitoks nei chondrocitų, išskirtų iš sveikos kremzlės (Mobasheri et al., 2019).

Sergant OA, kalcio fosfato kristalai kaupiasi kremzlės audinyje bei gali turėti įtakos viduląstelinio [Ca^{2+}] kiekiui ir osciliacijoms chondrocituose, kurie yra valdomi įvairiais kalcio kanalais. Taip pat, kitų jonų (ne [Ca^{2+}]) moduliacijos gali turėti įtakos viduląstelinio [Ca^{2+}] kiekiui bei prisidėti prie OA vystymosi (Mobasheri et al., 2019).

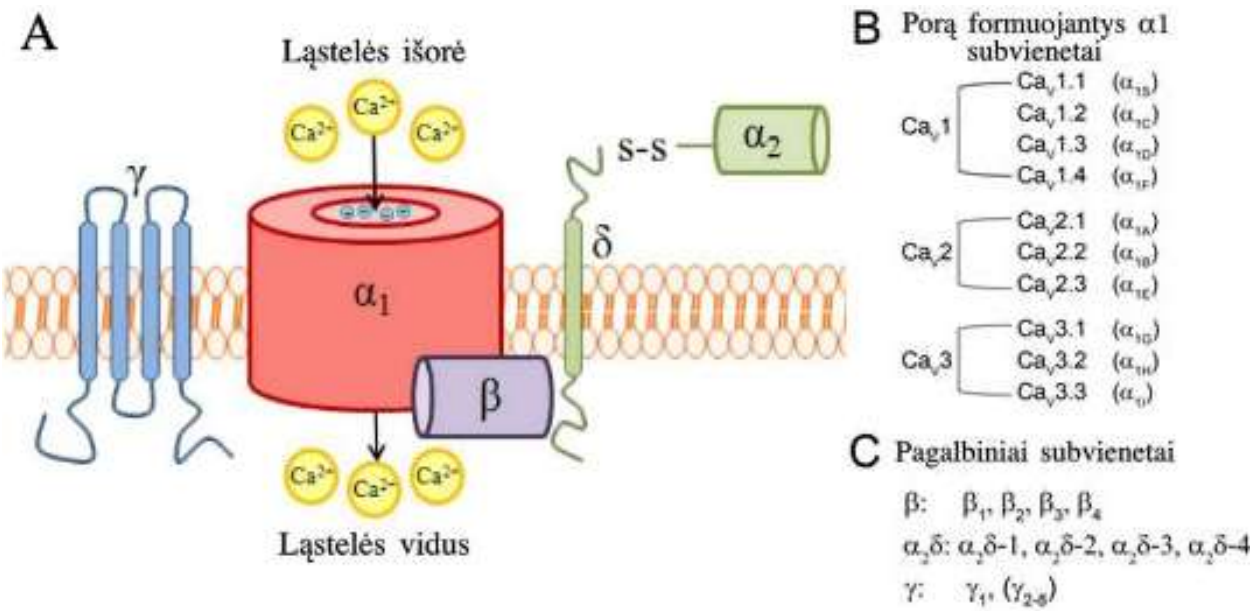
1.4.1 Kalcio kanalai

[Ca^{2+}] į ląstelės citozolį patenka dviem keliais – iš užląstelinės aplinkos ir iš viduląstelinių [Ca^{2+}] saugyklų, tokių kaip endoplazminis tinklas (ET) (Soldatov, 2012). Skirtingi chondrocitų membranoje esantys [Ca^{2+}] kanalai, tokie kaip laikino potencialo receptoriai (***angl***. *transient receptor potential*, TRP), mechaniniam poveikiui jautrūs kanalai ir įtampos valdomi kalcio kanalai (ĮVKK), gali būti aktyvuoti įvairių fizinių stimuliacijų ir paskatinti užląstelinio [Ca^{2+}] įtekėjimą į ląstelę per milisekundes. Osmotinis slėgis gali paskatinti [Ca^{2+}] įtekėjimą į chondrocitus per TRP kanalus. Manoma, kad TRP yra susiję su OA, ištirti sąnario kremzlės chondrocitai iš OA sergančio

paciento kelio sąnario, turėjo įvairius TRP jonų kanalus. TRPV4 (vienas iš TRP kanalų, priklauso V subšeimai, 4 narys) yra svarbus chondrocitų mechanotransdukcijos kelių komponentas bei skatina ankstyvojo chondrogenezės geno Sox9 gamybą (Mobasheri et al., 2019). Katijonų koncentracijos pokytis gali paskatinti [Ca^{2+}] ar kitų jonų kanalų, esančių plazminėje membranoje atsidarymą. Visi šie mechano-elektrocheminiai stimulai gali būti atsakingi už [Ca^{2+}] signalinimą kremzlės audinyje. Taip pat, mechaninis poveikis skatina laisvo [Ca^{2+}] konvekciją ir difuziją užląsteliniame užpilde. Dėl neigiamo krūvio užląsteliniame užpilde, [Ca^{2+}] gali būti kaupiamas kremzlės audinyje (Lv et al., 2018).

Vykstant MKL chondrogeninei diferenciacijai, [Ca^{2+}] atlieka labai svarbų vaidmenį reguliuojant ląstelių funkcijas. Nors [Ca^{2+}] gali patekti į ląstelių vidų dėka įvairių kalciui specifinių nešiklių, ĮVKK sukėlė daug susidomėjimo dėl jų sąryšio su mechaniniu poveikiu (Bernotiene et al., 2019). ĮVKK atidarymas lemia [Ca^{2+}] antplūdį į ląstelių vidų pagal elektrocheminį gradientą. Tai sužadina daug nuo [Ca^{2+}] priklausomų procesų, tokių kaip genų transkripcija, neurotransmiterių atpalaidavimas bei nuo kalcio priklausomų fermentų aktyvacija. Kadangi ĮVKK yra pagrindiniai [Ca^{2+}] patekimo šaltiniai, daroma prielaida, kad jie dalyvauja genų reguliacijoje. Kita vertus, ilgalaikis didelis [Ca^{2+}] kiekis yra nuodingas ląstelėms. Siekiant apsaugoti ląsteles nuo [Ca^{2+}] pertekliaus esant ilgalaikei membranos depoliarizacijai, ĮVKK turi inaktyvacijos mechanizmus (Simms ir Zamponi, 2014).

ĮVKK yra skirstomi į dvi pagrindines kategorijas – aktyvuojamus aukštos įtampos (***angl.*** *high voltage-activated,* HVA), kurie atsidaro esant didelei membranos depoliarizacijai ir aktyvuojamus žemos įtampos (***angl***. *low loltage-activated*, LVA), kurie atsidaro esant mažesniems įtampos pokyčiams. 2 pav. pavaizduota ĮVKK struktūra su jai priklausančiais subvienetais (Hannon ir Atchison, 2013). HVA kanalai sudaryti iš baltymų kompleksų bei skirtingų subvienetų. CaVα1 subvienetas yra pagrindinis, porą formuojantis bei lemiantis [Ca^{2+}] kanalo subtipą (Tan et al., 2019). Egzistuoja trys pagrindinės CaVα1 subvieneto šeimos (CaV1, CaV2, CaV3), kiekviena turi po keletą narių, kurie pasižymi skirtingomis savybėmis ir yra randami skirtinguose audiniuose ir ląstelėse. CaV1 kanalų šeima koduoja įvairius L-tipo kanalus. L-tipo kalcio kanalai buvo pirmieji nustatyti ĮVKK, reguliuojantys genų transkripciją, o jų agonistai ir antagonistai atitinkamai skatina ir slopina tam tikrų genų transkripciją (Simms ir Zamponi, 2014). L-tipo ĮVKK taip pat rasti skirtingų rūšių ir šaltinių MKL. Funkcionalūs šio tipo kanalai yra gaminami maždaug 15 % nediferencijuotų KČMKL, o [Ca^{2+}] pateikimas pro ĮVKK turi įtakos KČMKL savybėms (Tan et al., 2019).



2 pav. ĮVKK struktūra su skirtingais subvienetais. A – kanalo ir jo subvienetų išsidėstymas ląstelės membranoje. B – porą formuojančių $\alpha 1$ subvienetų skirstymas. C – pagalbinių subvienetų skirstymas.

1.4.1.1 Kalcio kanalų reguliatoriai

1,4-dihidropiridinų (DHP), tokių kaip verapamilis, nifedipinas ir kt. atradimas ir panaudojimas kaip vaistų, mažinančių kraujospūdį, buvo svarbus žingsnis medicinoje. Nustatyta, kad jie blokuoja širdies ir kraujagyslių kalcio kanalus, kartu atrastas ir terminas kalcio kanalų antagonistas (Dolphin, 2018). Jų dėka galima reguliuoti viduląstelinio [Ca^{2+}] kiekį bei ląstelių funkcijas. Kadangi padidėjęs kraujospūdis dažniausiai pasireiškia kartu su OA, šių vaistų vartojimas taip pat gali turėti įtakos ir OA (Bernotiene et al., 2019). Manoma, kad tam tikri [Ca^{2+}] kanalų antagonistai gali turėti teigiamą šalutinį poveikį gydant OA (Mobasheri et al., 2019). Taip pat svarbu, kad [Ca^{2+}] įtekėjimas į ląstelės vidų gali būti paskatintas sintetiniais ĮVKK agonistais BayK8644 ir FPL64176 (Tan et al., 2019). Tiek kalcio kanalų agonistai, tiek antagonistai leido mokslininkams tirti kalcio kanalų funkcijas įvairiuose audiniuose (Dolphin, 2018).

Tai, kad nifedipinas slopina ankstyvąjį kremzlės žymenį Sox9 leidžia manyti, kad L-tipo ĮVKK yra svarbūs ankstyvosiose chondrogenezės stadijose (Tan et al., 2019). Vėlesnėmis stadijomis nifedipinas turėjo silpnesnį poveikį [Ca^{2+}] kiekiui bei chondrogenezei. Manoma, kad kiti [Ca^{2+}] kanalai gali būti atsakingi už [Ca^{2+}] patekimą vėlesnėmis chondrogeninės diferenciacijos stadijomis (Atsuta et al., 2019; Simms ir Zamponi, 2014). Tiriant žiurkių KČMKL ir ĮVKK įtaką jų proliferacijai, pastebėta, kad kanalų blokavimas nifedipinu sulėtino KČMKL proliferaciją (Tan et al., 2019). Taip pat nustayta, kad nifedipinas skatina NO aktyvumą KČMKL ir chondrocituose, kuris turi įtakos OA kremzlės audiniui bei užląstelinio užpildo gamybai (Uzielienė et al., 2019).

1.5 Hidrogelių panaudojimas chondrogeninei diferenciacijai

Tradiciškai, audinių inžinerija susideda iš trijų pagrindinių komponentų – karkasų, ląstelių ir signalinių veiksnių. Signalinius veiksnius sudaro įvairūs citokinai, augimo veiksniai ir kitos

reguliatorinės molekulės, kurios reguliuoja ląstelių metabolizmą, tačiau tokiems spaudimą patiriantiems audiniams, kaip sąnario kremzlė, mechaninis poveikis taip pat svarbus norint palaikyti funkcionalų audinį (Lee et al., 2006). Dažnai karkasai gali atlikti ląstelių pernešimo darbą, tarnauti kaip įvairių veiksnių saugykla, kaip užpildas ar kaip audinio pavyzdys vykdant audinio regeneraciją. Idealus karkasas, naudojamas audinių inžinerijoje turi nebūti nuodingas audiniui, į kurį yra įterpiamas, turi palaikyti normalų ląstelių aktyvumą, leisti ląstelėms proliferuoti, gaminti užląstelinį užpildą, jei reikia, leisti formuotis kraujagyslėms po kelių savaičių nuo jo įtvirtinimo bei turėti tinkamas mechanines savybes, porų dydį ir pasižymėti biodegradacija *in vivo* (Lin et al., 2019).

Karkasas tarnauja kaip laikinas užląstelinis užpildas, kol ląstelės subręsta ir pagamina savo užpildą, kuris pakeičia karkasą. Tarp daug sukurtų karkasų, hidrogeliai susilaukė daugiausia dėmesio dėl jų universalumo ir struktūrinių panašumų į užląstelinį užpildą, tokių kaip didelis vandens kiekis, gebėjimas suirti, tinkamas porų dydis ir biosuderinamumas. Siekiant sumažinti nepatogumus implantuojant karkasus į pažeidimo vietą, atrasti suleidžiami hidrogeliai. Šie karkasai gali būti užpildyti chondrocitais ar MKL (Li et al., 2019). Nors chondrocitais hidrogelyje pagrįsta audinių inžinerija yra daug žadanti, iškyla keletas jos apribojimų. Pirmasis, chondrocitų surinkimas turi būti atliekamas iš sveikos kremzlės audinio bei ilgą laiką kultivuojamas *in vitro*. Antra, autologinė chondrocitų terapija yra beveik neefektyvi vyresnio amžiaus pacientams dėl mažo chondrocitų bioaktyvumo ir proliferacinio pajėgumo (Li et al., 2019). Chondrogeninės diferenciacijos pajėgumas ir užląstelinio užpildo baltymų gamyba gali būti paskatinti naudojant MKL ir biomedžiagas 3D karkasuose. 3D sistema šiuo metu yra plačiausiai naudojama vykdant MKL chondrogenezę, taip pat naudojamos kokultūros kartu su chondrocitais. Dažnai papildomai naudojami augimo veiksniai, tokie kaip insulino augimo veiksnys (IGF), fibroblastų augimo veiksnių (FGF) ar transformuojančių augimo veiksnių β (TGF- β) šeimos nariai (Lo Monaco et al., 2018; Mirzaei et al. 2018).

Ląstelės gali būti maišomos su didele įvairove natūralių ir sintetinių biomedžiagų, siekiant palaikyti ir paskatinti kremzlės regeneraciją. Tyrimai su MKL karkasuose regeneruojant kremzlės audinį yra atliekami ir *in vivo*. Iš daugelio skirtingų karkasų, dažniausiai naudojami hidrogeliai, kurių jungiamoji medžiaga brinksta vandenyje.

Hidrogeliai susilaukė daug dėmesio dėl jų galimybės homogeniškai paskirstyti ląsteles 3D aplinkoj bei reikalingų minimalių invazinių procedūrų. Suleidžiami hidrogeliai gali būti suleidžiami į pažeidimo vietą neinvaziniu ar mažai invaziniu būdu. Jie geba ne tik įkapsuliuoti ląsteles, bet ir pernešti bioaktyvias molekules, atsiradusias dėl mechaninio stimulo. Hidrogeliai gali būti naudojami vaistų pristatymui į reikiamas vietas, žaizdų gydymui ir audinių inžinerijai (Li et al., 2019). Natūralūs hidrogeliai dažniausiai sudaryti iš polisacharidų tokių kaip chitozanas,

hialurono rūgštis, alginatas ir agarozė yra tiriami siekiant pritaikyti kremzlės regeneracijoje. Hialurono rūgšties hidrogeliai su MKL šiuo metu yra vieni iš labiausiai tiriamų kremzlės regeneracijai. Lyginant alginato, hialurono rūgšties ir chitozano hidrogelius sumaišytus su virkštelės kraujo MKL, hidrogelis iš hialurono rūgšties parodė geriausius rezultatus, vertinant tiek mikroskopiškai, tiek histologiškai, atkuriant kremzlę žiurkėse. Kolagenas, randamas natūralioje sąnario kremzlėje, plačiai naudojamas prieškliniKiniuose tyrimuose su gyvūnais kaip MKL karkasas. Kolageno ir KČMKL mišinys visiškai išgydė pažeistą kremzlės audinį kiaulės modelyje (Lo Monaco et al., 2018; Augello ir De Bari, 2010).

Silpnos natūralių hidrogelių mechaninės savybės yra vienas iš pagrindinių jų trukumų, todėl jie reikalauja tolimesnių modifikacijų ar kombinacijų su kitais natūraliais ar sintetiniais polimerais. Privalumų įžvelgiama ir sintetinių polimerų pagrindu pagamintuose karkasuose, tokių kaip reguliuojama degradacija ir geros mechanofizikinės savybės. Sintetiniai karkasai taip pat turi minusų, iš kurių vienas pagrindinių – galimybė iššaukti imuninį atsaką. Taip pat sintetinės biomedžiagos neturi biologinio aktyvumo. Dėl to manoma, kad geriau maišyti sintetinį polimerą su natūraliu, taip pagerinant jo biologinį aktyvumą (Lo Monaco et al., 2018).

Pastebėta, kad karkaso kietumas turi įtakos valdant MKL diferenciacijas. Naudojant labai minkštus, kolagenu dengtus poliakrilamido gelius (elastingumas nuo 0.1 iki 1 kPa), bei mechanines savybes palaikant panašias į būdingas smegenų audiniui, KČMKL diferencijavo į neuronus. Naudojant kietesnius gelius (elastingumas nuo 8 iki 17 kPa), atvaizduojant raumeninį audinį, ląstelės tapo miogeninėmis, o naudojant kiečiausią karkasą (elastingumas nuo 25 iki 40 kPa), ląstelės diferenciavo į osteoblastus. Panašūs rezultatai gauti ir naudojant žmogaus virkštelės MKL kultivuotų ant kolagenu dengtų, įvairaus kietumo poliakrilamido gelių. Substrato kietumas taip pat yra svarbus diferencijuojant riebalinio audinio MKL į adipocitus ir osteoblastus. Naudojant polidimetilsiloksano substratus, minkštesnė matrica palaikė adipogeninę ląstelių diferenciaciją, o kietesnė buvo tinkamesnė osteogeninei diferenciacijai. Naudojant hialuronano hidrogelio substratus, karkaso kietumas taip pat turėjo įtakos riebalinio audinio MKL chondrogeniniam pajėgumui (Bacakova et al., 2018).

1.5.1 Chondroitino sulfato hidrogeliai

Tinkamų medžiagų ir hidrogelio gamybos pasirinkimas yra vienas svarbiausių žingsnių audinių inžinerijoje. Hidrogelio gamybai gali būti naudojamos įvairios, tiek natūralios, tiek sintetinės medžiagos, tokios kaip chitozanas, kolagenas, želatina, alginatas, hialurono rūgštis, heparinas, chondroitino sulfatas, polietilenglikolis (PEG) ir polivinilalkoholis (PVA). Suleidžiamo hidrogelio gamybai gali būti naudojami fiziniai ir cheminiai metodai. Fiziniu metodu hidrogeliai susiformuoja dėl silpnų antrinių jėgų, cheminiu metodu – dėl susirišimo kovalentiškai.

Chondroitino sulfatas (CS) yra anijoninis sulfatuotas GAG (linijinis polisacharidas), sudarytas iš grandinės disacharidų vienetų (N-acetilgalaktozamino ir gliukurono rūgšties). Jis yra vienas pagrindinių kremzlės komponentų ir yra natūraliai randamas jungiamuosiuose audiniuose ir kauluose. Pagrindinės CS teigiamos savybės yra integracija į šeimininko audinį, chondrocitų fenotipo reguliacija, skysčių sulaikymas, antiuždegiminis poveikis bei gebėjimas gydyti žaizdas. CS yra tinkama terpė vykdyti biologines funkcijas, tokias kaip viduląstelinis signalinimas. Tačiau jo gebėjimas tirpti vandenyje apriboja CS panaudojimą, todėl CS dažniausiai surišamas kovalentiškai ar maišomas su kitais polimerais, siekiant padidinti jo stabilumą. Dažniausiai hidrogeliai chemiškai surišami naudojant įvairius fermentus, tokie hidrogeliai pasižymi greitu stingimu ir specifiškumu.

Cheminis surišimas naudojant fermentus pritraukė mokslininkų dėmesį dėl gebėjimo susiformuoti esant normalioms fiziologinėms sąlygoms bei ganėtinai mažo citotoksiškumo, lyginant su kitais cheminio surišimo metodais. Keletas skirtingų fermentų, tokių kaip transgliutaminazė, tirozinazė, fosfatazė, termolizinas, β-laktamazė, peroksidazė, buvo tirti šiuo tikslu. Krienų peroksidazė (***angl***. *horse radish peroxidase,* HRP), viena iš peroksidazių, katalizuoja fenolio ir anilino konjungaciją, esant vandenilio peroksidui. HRP, kartu su vandenilio peroksidu, oksiduoja hidroksifenilo grupes, esančias tiramine ir tirozine. Jos prisitvirtina prie natūralių polimerų, tokių kaip dekstrinas, chitozanas, hialurono rūgštis „stuburo“. Tokie hidrogeliai taip pat gali susirišti su kremzlės audiniu (Singh, Moses, Bhardwaj ir Mandal, 2018).

Hidrogeliai gali prisidėti prie ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos valdymo. Chondrocitai juose geba daugintis ir gaminti kremzlės audiniui būdingus baltymus ar genus, išlaikant ląstelių morfologiją ir fenotipą. CS pagrindu sukurti hidrogeliai gali ilgą laiką išlaikyti chondrocitus gyvybingus ir palaikyti jų morfologiją *in vitro*. Vykdant chondrogenezę *in vitro* CS hidrogelių kultūroje, sėkmingai formavosi kremzlės užląstelinis užpildas, kartu su II tipo kolagenu ir agrekanu, kurie homogeniškai pasiskirstė per visą hidrogelį (Li et al., 2019).

2. Tyrimo metodai

2.1 Reagentai ir prietaisai

1 lentelė. Darbe naudoti reagentai.

Reagento pavadinimas	Gamintojas
DMEM	BIOCHROM AG
FBS	BIOCHROM AG
PS	Merck&Co
Fikolio tirpalas	Sigma-Aldrich
Pronazės tirpalas	Sigma-Aldrich
II tipo kolagenazė	Sigma-Aldrich
FGF-2	Applied Biological Materials
0,25% tripsino/EDTA tirpalas	Gibco by Life Technologies
ITS	Gibco by Life Technologies
PBS	Sigma-Aldrich
Deksametazonas	Sigma-Aldrich
L-askorbo rūgšties fosfatas	Sigma-Aldrich
BayK8644	Sigma-Aldrich
Nifedipinas	Sigma-Aldrich
Oksalatas SR 33805	Alomone
Isradipinas	Alomone
FPL64176	Alomone
Ryanodinas	Sigma-Aldrich
GSK 2193874	Sigma-Aldrich
Jonomicinas	Santa Cruz Biotechnology Sigma-Aldrich
Poly-HEMA	Sigma-Aldrich
Chondroitin-4-sulfato-tiramino junginys	Projekto partnerių gamybos
Želatina	Sigma-Aldrich
HRP	Sigma-Aldrich
Vandenilio peroksidas	Eurovaistinė
Formalino tirpalas	Sigma-Aldrich
Safraninas-O	Sigma-Aldrich
TGF-β3	Miltenyi Biotec
CCK-8	Dojindo
CASY®ton	INNOVATIS
CASY®clean	INNOVATIS
Cal-520	Chem Cruz
DMSO	Carl ROTH

L-prolinas	Carl ROTH
Etanolis 75%	Vilniaus degtinė
II tipo kolageno antikūnai	Abcam
Muse azoto oksido rinkinys	Merck&Co
CDE	Murphy Pharmaceuticals
Lizės buferis Qiagen	Thermo Fisher
MaximaStrand rinkinys	Thermo Fisher

2 lentelė. Darbe naudoti kalcio kanalų reguliatoriai ir naudojamos koncentracijos

Įtaka kalcio kanalams	**Pavadinimas**	**Koncentracija**
Atidaro įtampos valdomus L-tipo kalcio kanalus	FPL64176	10 μM
Prailgina įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų aktyviąją būseną	BayK8644	10 μM
Slopina įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų CaV1.2 subvienetą	Nifedipinas	10 μM
Slopina įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų CaV1.2 ir 1.3 subvienetus	Isradipinas	5 μM
Slopina TRPV4 kalcio kanalus	GSK 2193874	10 μM
Slopina įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų CaV1.2 subvienetą	Oksalatas (SR 33805)	10 μM
Slopina rianodinui jautrius kalcio kanalus endoplazminiame tinkle	Ryanodinas	1 μM

3 lentelė. Darbe naudoti prietaisai

Prietaisas	**Prietaiso pavadinimas**	**Gamintojas, šalis**
Automatinis ląstelių skaičiuotuvas	CASY©-TT	INNOVATIS, Šveicarija
Šviesinis mikroskopas	Eclipse TS 100	Nikon, Japonija
Ląstelių fotoaparatas	Digital Sight DS-U3	Nikon, Japonija
Fluorescentinis mikroskopas	Eclipse TE2000-U	Nikon, Japonija
Spektrofotometras	FACS Aria	Becton Dickinson, Amerika
Tėkmės citometras	Calibur	Becton Dickinson, Amerika
Tėkmės citometras	FACS Aria II	Becton Dickinson, Amerika
Tėkmės citometras	MUSE	Merck&Co, Vokietija
Maišytuvas	MS2 Minishaker	IKA, Vokietija
Ląstelių auginimo inkubatorius	MCO- 18M	Sanyo, Japonija
Centrifuga	MPW- 380	MPW MED. INSTRUMENTS, Lenkija;

Centrifuga	3-16P Sigma	SciQuip, Jungtinė Karalystė
Vandens vonelė	SV 1422	Memmert, Vokietija
Mikrotomas	Leica	Leica Biosystems, Vokietija
Laminarinis oro srauto boksas	Biowizard	Kojair, Suomija

Darbe naudoti reagentai ir jų gamintojai pateikiami 1 lentelėje, kalcio kanalų reguliatoriai, jų įtaka skirtingiems [Ca^{2+}] kanalams ir naudojamos koncentracijos – 2 lentelėje, o informacija apie darbe naudotus prietaisus ir jų gamintojus pateikiama 3 lentelėje.

2.2 Ląstelių išskyrimas

Ląstelės buvo išskirtos iš trijų skirtingų žmonių audinių – kaulų čiulpų (n=5), menstruacijų kraujo (n=8) ir kremzlės (n=5). Visoms su žmonių audiniais atliekamoms procedūroms yra gautas Bioetikos komiteto leidimas Nr. 158200-14-741-257. Menstruacijų kraujo savanorės, taip pat pooperacinių medžiagų (kraujo čiulpų ir sąnario kremzlės likučių) donorai sutiko dalyvauti tyrime ir yra pasirašę „Informuoto asmens sutikimo formas".

2.2.1 Menstruacijų kraujo MKL išskyrimas

Menstruacinis kraujas yra donorės surenkamas į specialią silikoninę taurelę. Kraujas renkamas antrą menstruacijų ciklo dieną, kai kraujavimas yra gausiausias. Kraujas iš taurelės surenkamas steriliu švirkštu ir kuo skubiau gabenamas į laboratoriją ląstelių išskyrimui.

Priklausomai nuo gauto kraujo kiekio, jis yra išskirstomas lygiomis dalimis į atskirus mėgintuvėlius ir papildomas 1:1 fosfatiniu buferiniu tirpalu (PBS) ir 1 % antibiotikų (penicilinu ir streptomicinu, PS), taip praskiedžiant tirštą kraują ir apsaugant nuo bakterijų. Kraujo tirpalas atsargiai perkeliamas į mėgintuvėlį su 1:1 fikolio gradientiniu tirpalu, nesumaišant fazių. Mėgintuvėliuose fikolio tirpalas yra apatinėje fazėje, o kraujas viršutinėje. Kraujo-fikolio tirpalas centrifuguojamas 400 *g* 30-40 minučių, kol išsiskirsto fazės. Apatinėje fazėje nusėda eritrocitai, virš jų fikolio tirpalas, tarp fikolio tirpalo ir plazmos susikaupia nedidelis ląstelių sluoksnis, kuris yra atsargiai surenkamas į naują mėgintuvėlį. Surinktos ląstelės du kartus perplaunamos PBS +1 % PS tirpalu, nucentrifuguojant 400 *g* 10 minučių. Po centrifugavimo supernatantas yra pašalinamas, įpilama 1-5 mL kultivavimo terpės, kurią sudaro Dulbecco modifikuota Eagle terpė (DMEM) su 1 g/L gliukozės, 10 % fetalinio jaučio serumo (FBS) ir 1 % PS, ląstelės gerai suspenduojamos. Pridedamos kultivavimo terpės kiekis priklauso nuo gauto ląstelių nuosėdų sluoksnio, kuris yra įvertinamas po paskutinio plovimo ir centrifugavimo. Paruošiami kultivavimo indai, pripildomi kultivavimo terpės su padidintu kiekiu PS (2 %). Ląstelės yra perkeliamos į kultivavimo indus (apytiksliai 10 mL pradinio kraujo tūrio yra panaudojami keturi 75 cm^3 kultivavimo flakonai) ir paliekamos inkubatoriuje, palaikančiame +37 ºC temperatūrą, 5 % CO_2 koncentraciją bei 95±5 % drėgmės, toliau šios sąlygos vadinamos standartinėmis ląstelių

kultivavimo sąlygomis. Kitą diena MenMKL prisitvirtina prie kultivavimo indo dugno, kultivavimo terpė yra keičiama, taip pašalinant likusias kraujo ląsteles.

2.2.2 Kaulų čiulpų MKL išskyrimas

Žmogaus KČ yra tiesiogiai gaunami iš operacinės, po atliktų chirurginių procedūrų. KČ yra mechaniškai pašalinami iš gauto kaulo dalies, naudojant sterilų skalpelį. Gauta KČ masė yra praplaunama ir skiedžiama PBS su 2 % PS tirpalu, kurio yra pridedamas pakankamas kiekis, siekiant apsemti visą KČ masę. Toliau praskiesti KČ yra atsargiai perkeliami į fikolio gradientinį tirpalą ir centrifuguojama, kaip aprašyta 2.2.1. skyriuje. Surinkta monobranduolių ląstelių fazė du kartus praplaunama PBS + 1 % PS tirpalu, centrifuguojant 400 *g* 10 minučių. Po centrifugavimo supernatantas yra pašalinamas, pridedama 1 mL kultivavimo terpės, ląstelės gerai suspenduojamos. Paruošiami kultivavimo indai, pripildomi kultivavimo terpės su padidintu kiekiu PS (2 %). Ląstelės inkubuojamos inkubatoriuje, standartinėmis kultivavimo sąlygomis. KČMKL prisitvirtina prie kultivavimo indo dugno, o kitos monobranduolės ląstelės lieka terpėje bei yra pašalinamos terpės keitimo metu.

2.2.3 Chondrocitų ir eksplantų išskyrimas iš kremzlės audinio

Žmogaus sąnario kremzlės yra gaunamos kaip pooperacinis audinys po OA sergančių žmonių sąnario operacijos. Laboratorijoje kremzlė su kaulu yra perkeliami į sterilias Petri lėkšteles ir naudojant sterilų skalpelį kremzlės audinys yra pašalinamas nuo kaulo (siekiama, kad visi atpjautos kremzlės gabalai būtų vienodo dydžio ir storio). Toks kremzlės audinys gali būti panaudojamas eksplantų išpjovimui naudojant sterilią biopsijos adatą (3 mm skersmens) arba toliau smulkinamas iki 1-3 mm dydžio gabaliukus. Susmulkinta sausa masė yra pasveriama (nuo kremzlės svorio priklauso naudojamų fermentų kiekis), papildoma DMEM (1 g/L gliukozės) su 2 % PS, kad pilnai apsemtų gabuliukus ir inkubuojama per naktį. Kitą dieną kremzlės masė yra praplaunama PBS ir valandą inkubuojama pronazės tirpale (26,5 U/ml) inkubatoriuje, standartinėmis sąlygomis. Vėliau kremzlės gabalėliai du kartus praplaunami PBS, skalpeliu susmulkinami iki vientisos masės ir perkeliami į naują 50 mL mėgintuvėlį su II tipo kolagenazės tirpalu (545 U/mL). Apytiksliai 1 g sausos kremzlės naudojama 10 mL kolagenazės tirpalo. Kremzlės ir kologenazės mišinys dedamas inkubuoti 3-4 valandas, 37 °C temperatūroje, pastoviai purtant. Po inkubacijos apvirškintas mišinys yra du kartus filtruojamas naudojant 100 µm ir 70 µm porų dydžio filtrus. Fermentinis kolagenazės aktyvumas sustabdomas pridedant dvigubai didesnį tūrį pilnos kultivavimo terpės. Ląstelių filtratas yra centrifuguojamas 5 min, 400 *g,* supernatantas pašalinamas, o ląstelių nuosėdos suspenduojamos kultivavimo terpėje. Ląstelės yra suskaičiuojamos (žiūrėti 2.3 skyrių) ir priklausomai nuo ląstelių kiekio išsėjamos į kultivavimo flakonus (apytiksliai 400 tūkst. ląstelių yra išsėjamos viename 75 cm^3 kultivavimo flakone). Išsėti chondrocitai yra inkubuojami inkubatoriuje, standartinėmis kultivavimo sąlygomis.

2.3 Ląstelių kultivavimas ir paruošimas tyrimams

Mezenchiminės kamieninės ląstelės ir chondrocitai auginami specialiuose laboratoriniuose induose, kurie yra laikomi inkubatoriuje, palaikančiame standartines sąlygas. Ląstelės auginamos kultivavimo terpėje, kaip aprašyta ląstelių skyrimo skyriuose. Visoms ląstelėms terpė keičiama du kartus per savaitę. Prieš kiekvieną MKL terpės keitimą ji yra papildoma 1 ng/mL augimo veiksnio FGF-2 (***angl.*** *fibroblast growth factor 2*), kuris palaiko MKL kamieniškumą, neleidžiant joms savaime diferencijuoti. Visi darbai su ląstelėmis atliekami steriliame laminare.

Kai ląstelės beveik pilnai padengia kultivavimo indo dugną (pasiekia 80 % konfluenciją), jos yra nukabinamos nuo plastikinio paviršiaus naudojant fermento tripsino tirpalą. Tai atliekama pašalinant kultivavimo terpę, du kartus praplaunant ląsteles PBS. Tada ant ląstelių be jokios terpės užpilamas tripsino-EDTA tirpalas ir kultivavimo indas perkeliamas į inkubatorių, palaikantį standartines kultivavimo sąlygas. Praėjus kelioms minutėms, ląstelių atkibimas yra įvertinamas stebint jas mikroskopu. Įsitikinus, kad ląstelės atkibo, pridedama kultivavimo terpės santykiu 1:1, taip nuslopinant tripsino poveikį ir ląstelės su terpe yra perkeliamos į mėgintuvėlį. Tada ląstelių suspensija centrifuguojama kambario temperatūroje, 5 min 600 *g*, o pašalinus supernatantą, ląstelės pakartotinai suspenduojamos kultivavimo terpėje ir skaičiuojamos automatiniu ląstelių skaičiuotuvu (CASY©-TT, INNOVATIS) arba FAST-READ plokštele (kitaip vadinamu hemocitometru). Skaičiuojant automatiniu skaičiuotuvu, 10 µL atkabintų ląstelių yra perkeliama į specialų CASY mėgintuvėlį su 10 mL elektrolitinio CASY tirpalo. Ląstelės gerai išmaišomos ir statomos į CASY©-TT aparatą. Šis aparatas turi elektrolito pripildytą matavimo porą su pastoviu krūviu. Ląsteles siurbiant pro porą, jos išstumia elektrolitinį tirpalą ir sukuria elektrinius impulsus, kurie yra matuojami ir priklauso nuo ląstelės dydžio. Taip yra nustatomas ląstelių dydis ir jų kiekis, esantis elektrolito tirpale. Matavimai atliekami 3 kartus ir išvedamas vidurkis. Naudojant FAST-READ plokštelę 7 µL atkabintų ląstelių yra perkeliami į specialų hemocitometro šulinėlį. Kiekvienas šulinėlis turi 10 kvadratų, kurių kiekvienas padalintas dar į 16 kvadratėlių. Stebint pro mikroskopą, suskaičiuojamas ląstelių kiekis esantis bent 3 kvadratuose (iš viso 48 kvadratėliai) ir išvedamas vidurkis. Ląstelių kiekis nustatomas naudojant šią formulę:

$$\text{Ląstelių kiekis 1 µL terpės} = \frac{\text{suskaičiuotas ląstelių vidurkis} \times 10}{\text{koncentracijos faktorius}},$$

kur koncentracijos faktorius, jei ląstelės skaičiuojamos neskiestos iš pradinio tirpalo, lygus 1. Jei ląstelės buvo praskiestos 10 kartų – faktorius lygus 0,1. Vieno kvadrato (1 mm × 1 mm) tūris lygus 0,1 µL, dėl to, norint suskaičiuoti, kiek ląstelių yra 1 µL, formulėje skaitiklyje dauginama iš 10. Norint apsskaičiuoti ląstelių kiekį 1 mL, gautas skaičius dauginamas iš 1000. Tokiu būdu ląstelės yra paruošiamos tolimesniems tyrimams.

2.4 Proliferacijos tyrimas, naudojant kalcio kanalų reguliatorius

Proliferacijos pajėgumas yra tiriamas naudojant specialų, komercinį ląstelių skaičiavimo rinkinį-8 (***angl***. *Cell Counting Kit-8*, CCK-8). Šiuo rinkiniu galima nustatyti ląstelių gyvybingumą joms proliferuojant ar tam tikrų preparatų citotoksiškumą, atliekant labai jautrų spalvinį testą. Mišinio sudėtyje yra tirpi tetrazolio druska, kuri yra redukuojama dehidrogenazių aktyvumo (NAD ir NADP virsta į NADH ir NADHP, kurie veikia kaip redukuojatys agentai) ląstelėje, tampa formazano dažu ir pakeičia spalvą iš gelsvos į oražinę (kartu pakeičiat ir kultivavimo terpės spalvą iš rožinės į oranžinę). Susidariusio formazano kiekis yra tiesiogiai proporcingas gyvų ląstelių kiekiui. Svarbu tai, kad CCK-8 yra kur kas jautresnis tirpalas ląstelių gyvybingumui nustatyti nei kiti, kuriuose yra tetrazolio druskos, tokie kaip MTT, XTT, MTS ar WST-1. Taip pat, priešingai nei anksčiau paminėti tirpalai, CCK-8 nėra nuodingas ląstelėms, tai yra, atlikus tyrimą bei užpylus kultivavimo terpę, ląsteles galima toliau auginti.

Siekiant nustatyti KČMKL ir chondrocitų proliferacijos pajėgumą, naudojant skirtingus kalcio kanalų reguliatorius, atkabintos ir suskaičiuotos ląstelės yra išsėjamos į atskiras 12 šulinėlių plokšteles, po 20 tūkstančių ląstelių į kiekvieną šulinėlį. 2 ląstelių šulinėliai užpilami kultivavimo DMEM terpe, papildyta kalcio kanalų reguliatorių tirpikliu DMSO (1 µL/mL) – šie šulinėliai yra kontroliniai. Kiti šulinėliai (po 2 su kiekvienu veiksniu) yra papildomi nifedipinu (10 µM), oksalatu (SR 33805) (10 µM), isradipinu (5 µM), BayK8644 (10 µM) ir FPL64176 (10 µM), siekiant nustatyti jų įtaką ląstelių proliferacijai. Sekančią dieną po išsėjimo, kai ląstelės jau yra prisitvirtinusios prie šulinėlių dugno ir pradėjusios dalintis, proliferacinė terpė yra pašalinama. Kiekvienas šulinėlis yra užpilamas proliferacinio mišinio, kurį sudaro 480 µL proliferacinės DMEM terpės ir 20 µL CCK-8 tirpalo. Plokštelė yra inkubuojama inkubatoriuje, standartinėmis kultivavimo sąlygomis, 90 minučių. Po inkubacijos, terpė yra surenkama po 100 µL, išskirstoma į 96 šulinėlių plokštelę ir spektrofotometru matuojama sugertis ties 450 nm bangos ilgiu. Eksperimentas yra kartojamas 1, 3, 5, 8 bei 12 dieną po išsėjimo.

2.5 Viduląstelinio kalcio tyrimas, naudojant skirtingus kalcio kanalų reguliatorius

2.5.1 Viduląstelinio kalcio įvertinimas fluorescenciniu mikroskopu

KČMKL, MenMKL ir chondrocitai yra išsėjami į atskiras 12 šulinėlių plokšteles po 20 tūkst. ląstelių/šulinėliui ir auginami vienasluoksnėje kultūroje kol pasiekia 70 % konfluenciją. Tada kultivavimo terpė yra pakeičiama šviežia terpe, papildyta kalcio kanalų reguliatoriais. Ląstelės šulinėliuose padalinamos į 6 grupes (po du šulinėlius grupei): kontrolė (kultivavimo terpė papildyta kalcio kanalų reguliatorių tirpikliu DMSO (1 µL/mL), nifedipinas (10 µM), BayK8644 (10 µM), ryanodinas (10 µM), isradipinas (5 µM) ir kalcio kanalo TRPV4 slopiklis GSK 2193874 (10 µM). Ląstelės su visais veiksniais kultivuojamos 72 valandas inkubatoriuje, standartinėmis

sąlygomis. Po 72 valandų terpė su veiksniais yra pašalinama ir šulinėliai papildomi nauja terpe su kalciui specifiniu fluorescuojančiu dažu Cal-520 (1 µM). Cal-520 geba patekti į ląstelės vidų pro plazminę membraną, nepažeisdamas ląstelės. Susirišęs su kalcio jonais, Cal-520 yra sužadinamas naudojant 488 nm bangos ilgio šviesą, šviesos emisija stebima ties 514 nm bangos ilgiu. Ląstelės laikomos inkubatoriuje, +37 ºC temperatūroje, 1 val. Po inkubacijos terpė su dažu yra pašalinama, ląstelės kelis kartus yra praplaunamos PBS bei užpilamos kultivavimo terpe. Taip paruošta plokštelė yra fotografuojama naudojant fluorescencinį mikroskopą EVOS.

2.5.2 Viduląstelinio kalcio įvertinimas tėkmės citometru

Chondrocitai, KČMKL ir MenMKL yra kultivuojamos kultivavimo induose kol pasiekia apie 80 % konfluenciją. Tada ląstelės yra atkabinamos, skaičiuojamos ir paskirstomos į tėkmės citometrijai pritaikytus mėgintuvėlius po 100 000 ląstelių, terpė papildoma atitinkamais kalcio kanalų reguliatoriais ir Cal-520 dažu bei inkubuojamos +37 ºC temperatūroje 1 valandą. Šiame eksperimente buvo naudojami kalcio kanalų agonistai FPL64176 ir BayK8644 bei antagonistai nifedipinas, isradipinas, GSK 2193874 ir oksalatas (SR 33805). Eksperimentinės grupės, veiksniai ir jų koncentracijos pateiktos 4 lentelėje. Kontrolinę grupę sudaro ląstelės kultivavimo terpėje, papildyta kalcio kanalų reguliatorių tirpikliu DMSO (1 µL/mL). Po 1 valandos terpės su dažu yra pašalinamos, ląstelės užpilamos ir suspenduojamos PBS bei centrifuguojamos 600 *g* 5 minutes. PBS atsargiai pašalinamas ir užpilama 400 µL kultivavimo terpė su atitinkamais kalcio kanalų reguliatoriais. Ląstelės gerai suspenduojamos ir analizuojamos naudojant tėkmės citometrą (Calibur). Matavimo metu [Ca^{2+}] koncentracijos pokytis stebimas laike, o praėjus apytiksliai 90 sek į matuojamą mėgintuvėlį pridedamas jonomicinas (1 µM). Rezultatų analizė atliekama naudojant programinę įrangą FlowJo.

4 lentelė. Naudojami kalcio kanalų reguliatoriai.

Nr.	Reguliatoriai	Koncentracija
1.	Kontrolė (DMSO)	1 µL/mL
2.	FPL64176	10 µM
3.	BayK8644	10 µM
4.	FPL64176 + BayK8644	10 µM + 10 µM
5.	Nifedipinas	10 µM
6.	Isradipinas	5 µM
7.	GSK 2193874	10 µM
8.	Oksalatas (SR 33805)	10 µM
9.	Visi antagonistai	10 µM + 5 µM + 1 µM + 10 µM

2.6 Chondrogeninė diferenciacija

Chondrogeninė diferenciacija vykdoma 15 mL mėgintuvėliuose bei 96 šulinėlių apvaliadugnėje plokštelėje, kuri dieną prieš yra padengiama poli-(2-hidroksietilmetakrilatu) (poly-HEMA) tiraplu (30 mg/mL), pagal gamintojo rekomendacijas. Poly-HEMA neleidžia ląstelėms tvirtintis prie plokštelės šulinėlio dugno, todėl ląstelės po centrifugavimo sukimba į vientisą nuosėdų sluoksnį ir lieka šulinėlio dugne.

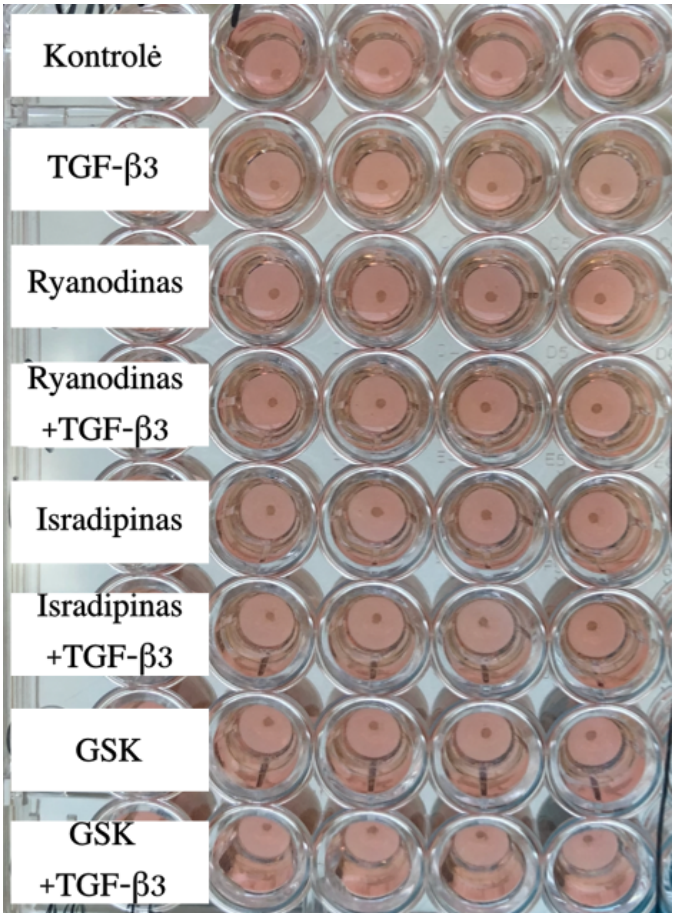
Chondrogeninei diferenciacijai paruoštos ląstelės (atkabintos ir suskaičiuotos) perkeliamos į mėgintuvėlius ar 96 šulinėlių plokšteles po 250 tūkstančių į 1 mėgintuvėlį ar šulinėlį. Mėgintuvėliai ir 96 šulinėlių plokštelė yra centrifuguojami 5 min, 600 *g*. Supernatantas yra atsargiai pašalinamas, neišmaišant susidariusių ląstelių nuosėdų, užpilama chondrogeninė terpė (žr. 5 lentelę) bei įmaišomi eksperimente naudojami kalcio kanalų reguliatoriai. Chondrogeninėje diferenciacijoje naudoti kalcio kanalų reguliatoriai – nifedipinas, BayK8644, ryanodinas, isradipinas bei GSK, taip pat juos maišant su augimo veiksniu TGF-β3. Kaip chondrogeninės diferenciacijos kontrolė naudojamos ląstelės užpiltos tik chondrogenine terpe, taip pat vieną ląstelių grupę užpilant chondrogenine terpe kartu su augimo veiksniu TGF-β3. Pavyzdinė tyrimo schema pateikiama 3 pav. Kiekvienai tiriamąjai grupei buvo ruošiamos trys nepriklausomos pozicijos. Jau po kelių dienų stebimas pasikeitimas – ląstelės formuoja chondrogeninei diferenciacijai būdingą ląstelių sferą.

5 lentelė. Chondrogeninės terpės sudedamosios dalys.

Sudėtis	**Sėjamų ląstelių tankis**
DMEM 4,5 g gliukozės	250 tūkst. ląstelių
ITS 1%	
Deksametazonas 5 µg	
L - askorbo rūgšties fosfatas 50 µg/ml	
Prolinas 1%	
PS 1%	
TGF-β3 10 ng/ml	
Nifedipinas 10 µM	
BayK8644 10 µM	
Ryanodinas 1 µM	
Isradipinas 5 µM	
GSK 2193874 10 µM	

Ląstelės diferencijuoja 21 dieną, chondrogeninę terpę keičiant tris kartus per savaitę. Toliau yra atliekama kokybinė analizė – įvertinamas ląstelių gebėjimas diferencijuoti chondrogenine kryptimi pagal susidariusių kremzliniam audiniui būdingų užląstelinio užpildo baltymų kiekį

histologiniu metodu, pažymint ląstelių sferų pjūvius proteoglikanų dažu safraninu-O (žiūrėti 2.6.2 skyrių).

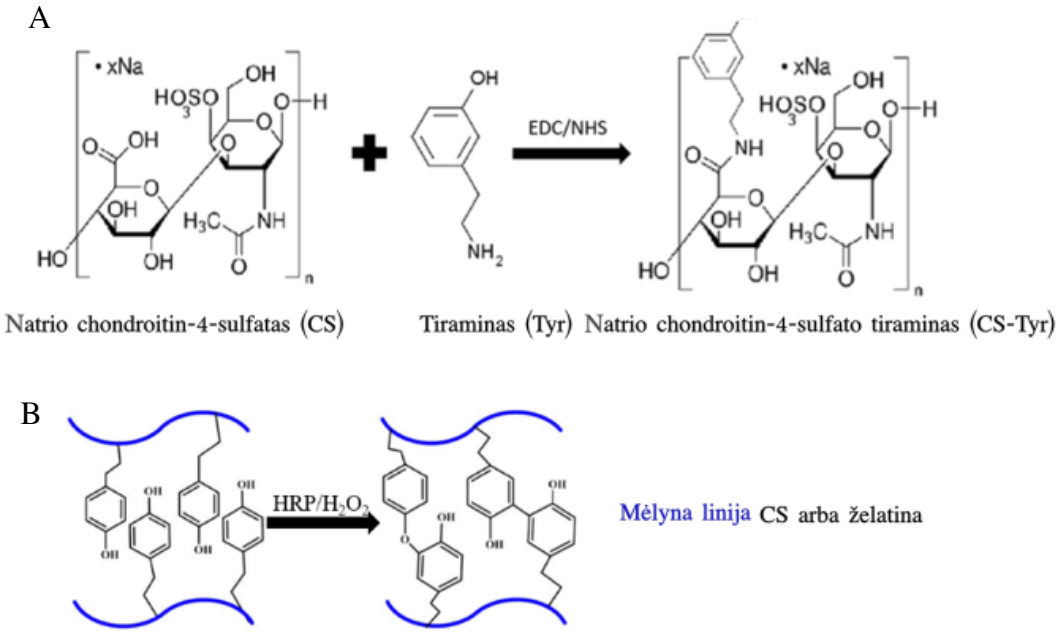


3 pav. Chondrogeninės diferenciacijos mėginių schema

2.6.1 Chondrogeninė diferenciacija CS-Tyr/želatinos karkasuose

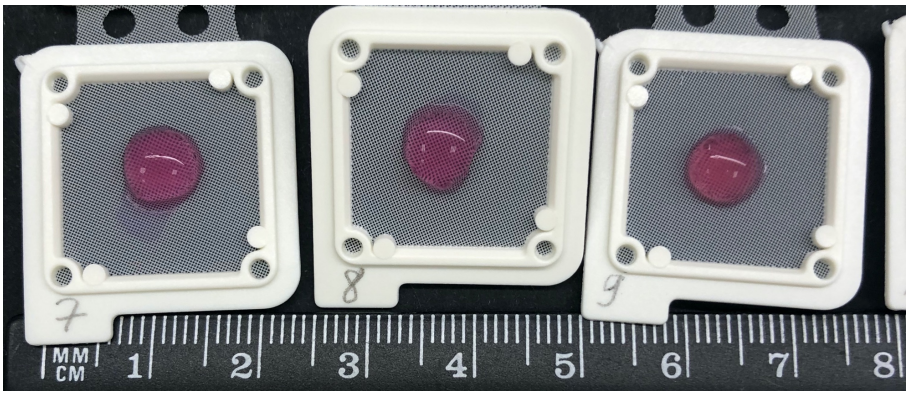
Formuojant CS-Tyr/želatinos karkasus naudojamos medžiagos – natrio chondroitin-4-sulfatas (CS), tiraminas (Tyr), želatina, krienų peroksidazė (HRP), vandenilio peroksidas (H_2O_2). Hidrogelio formavimui naudojama 0,5 mL 4 % želatinos ir 4 mM H_2O_2 mišinio ir 0,5 mL 8 % CS-Tyr ir 0,4 U/mL HRP mišinio. Galutinė karkaso sudėtis turi susidėti iš 4 % CS-Tyr, 2 % želatinos, 2 mM H_2O_2 ir 0,2 mM U/mL HRP. CS-Tyr mišinys yra gaminamas ir pristatomas projekto partnerių. Visos naudojamos medžiagos yra skiedžiamos PBS, išlaikant pH 7,4. CS-Tyr hidrogelio schematinis reakcijos mechanizmas pateikiamas 4 pav.

Hidrogelio formavimas prasideda nuo anksčiau paminėtų medžiagų sumaišymo. Maišymo metu svarbu išvengti susidarančių oro burbuliukų. Stingimo laikas priklauso nuo naudojamų medžiagų koncentracijų. Naudojant protokole pateiktas koncentracijas stingimas turėtų užtrukti apie 10 minučių. Siekiant įkapsuliuoti ląsteles, nuo kultivavimo indo dugno pakeltos, nucentrifuguotos ląstelės užpilamos CS-Tyr ir HRP mišiniu, prieš tai visiškai pašalinus supernatantą, bei gerai sumaišomos siekiant, kad pasiskirstytų per visą mišinį. Vėliau maišoma su želatina ir H_2O_2 bei formuojami reikiamo dydžio hidrogeliai (5 pav.). Sustingę hidrogeliai yra užpilami chondrogenine terpe su reikiamais veiksniais ir diferencijuojami 21 dieną.



4 pav. CS-Tyr hidrogelio schematinis reakcijos mechanizmas. A – CS-Tyr molekulinė struktūra. B – CS-Tyr/želatinos hidrogelio reakcijos mechanizmas. EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodimido hidrochloridas; NHS – N-hidroksisukcinimidas; EDC/NHS dalyvauja kovalentinio surišimo reakcijoje.

Tyrimo metu visi hidrogeliai skiriami į dvi tyrimo grupes – paskutinę diferenciacijos savaitę mechaniškai spaudžiamus, naudojant „FlexCell FX-500", bei nespaudžiamus (žiūrėti 2.7 skyrių). Abi grupes sudaro kontrolinė grupė, karkasai su ląstelėmis, užpilti tik chondrogenine terpe su DMSO (1 µL/mL), taip pat grupė su augimo veiksniu TGF-β3, ĮVKK agonistu BayK8644 (10 µM) bei antagonistu nifedipinu (10 µM). Viena eksperimentinė grupė su kalcio kanalų reguliatoriais taip pat papildoma augimo veiksniu TGF-β3 (10 ng/ml). Chondrogeninė ląstelių diferenciacija CS-Tyr/želatinos hidrogeliuose yra įvertinama kokybiškai, atliekant imunohistocheminę analizę pažymint II tipo kolageno antikūnais (žiūrėti 2.6.2 skyrių).



5 pav. CS-Tyr/želatinos hidrogeliai kartu su KČMKL po 21 dieną trukusios chondrogeninės diferenciacijos, paruošti histologiniam fiksavimui.

2.6.2 Kokybinis diferenciacijos įvertinimas

Chondrogeninę diferenciaciją vertinama kokybiškai, surenkamos ir buferiniame formalino tirpale fiksuojamos susidariusios ląstelių sferos bei CS-Tyr/želatinos karkasai. Toliau užfiksuoti mėginiai yra įliejami į parafiną ir atliekamas jų pjaustymas (3 µm pjūviai mikrotomu (Leica)).

Pjūviai yra fiksuojami ant histologinio objektinio stikliuko ir nudažomi safraninu-O bei pažymimi kolageno II antikūnais. Nudažytų bei pažymėtų pjūvių segmentai yra įvertinami ir palyginami mikroskopu.

2.6.2.1 RNR išskyrimas

Kremzlės eksplantai buvo sutrinti skystame azote naudojant grūstuvę. Susidarę kremzlės milteliai perkeliami į mėgintuvėlį su 1 mL komercinio lizės buferio (Qiagen). Mėginiai su daug nuosėdų yra praskiedžiami. Centrifuguojama 12000 *g* 5-10 min, 4 ºC temperatūroje, supernatantai perkeliami į naują mėgintuvėlį ir sumaišomi su chloroformu (50 mg kremzlės – 0,1 mL chloroformo), 15 sek maišyti ranka ir paliekama kambario temperatūroje 3-10 min. Toliau centrifuguojama 12000 *g*, 15 min, 4 ºC temperatūroje, RNR lieka viršutinėje vandeninėje fazėje, kuri yra atsargiai perkeliama į naują mėgintuvėlį. RNR sumaišomas su izopropanoliu (50 mg kremzlės – 0,25 mL izopropanolio), gerai sumaišoma ir paliekama kambario temperatūroje 10 min. Centrifuguojama 12000 *g*, 10 min, 4 ºC temperatūroje, RNR iškrenta į nuosėdas, supernatantas pašalinamas. Nuosėdos praplaunamos 75 % etanoliu (50 mg kremzlės – 0,5 mL etanolio), gerai sumaišoma, centrifuguojama 7500 *g*, 8 min, 4 ºC temperatūroje, praplovimas pakartojamas dar 1-2 kartus. Supernatantas pašalinamas ir mėgintuvėlis paliekamas atvirai, kad išgaruotų likęs etanolis (apie 10 min). RNR nuosėdos suspenduojamos steriliame vandenyje (0,1 mL), inkubuojama 55-60 ºC temperatūroje, 10-15 min, kol ištirpsta RNR. Toliau, naudojant komercinį MaximaStrand rikinį, gaminama kopijinė DNR ir tiriama I ir II tipo kolageno, Sox9 bei CaV1.2 genų raiška.

2.7 Mechaninis kremzlės eksplantų ir hidrogelių spaudimas

Siekiant sukelti mechaninį spaudimą yra naudojamas „Flexcell FX-5000“ prietaisas. „Flexcell FX-5000“ yra kompiuterizuota, slėgiu valdoma sistema, kuria galima sukurti norimą statinį ar kintamos trukmės spaudimą. Sistemos naudojamas vakuuminis slėgis deformuoja specialią 6 šulinėlių plokštelę minkštu dugnu. Audinio pavyzdys arba 3D ląstelių kultūra yra spaudžiama tarp stūmoklio (pritvirtinto ant minkšto dugno) ir stacionarios plokštelės taip sukuriant mechaninį spaudimą mėginiui.

Biopsijos adatos dėka gauti kremzlės eksplantai yra įdedami, o CS-Tyr/želatinos hidrogeliai su ląstelėmis suformuojami specialiose 6 šulinėlių plokštelėse, užpilami chondrogenine terpe su atitinkamais veiksniais (žiūrėti 2.6.1 skyrių), įtvirtinami specialiais įtvarais ir veikiami mechaninio spaudimo 1 val. per dieną naudojant 30 kPa slėgį ir 1 Hz dažnį kremzlės eksplantams ir 15 kPa, 1 Hz dažnį CS-Tyr hidrogeliams. Spaudimo parametrai buvo parinkti atsižvelgiant į literatūroje pateikiamus pavyzdžius (Thorpe et al., 2008; Steinmetz and Bryant, 2011)

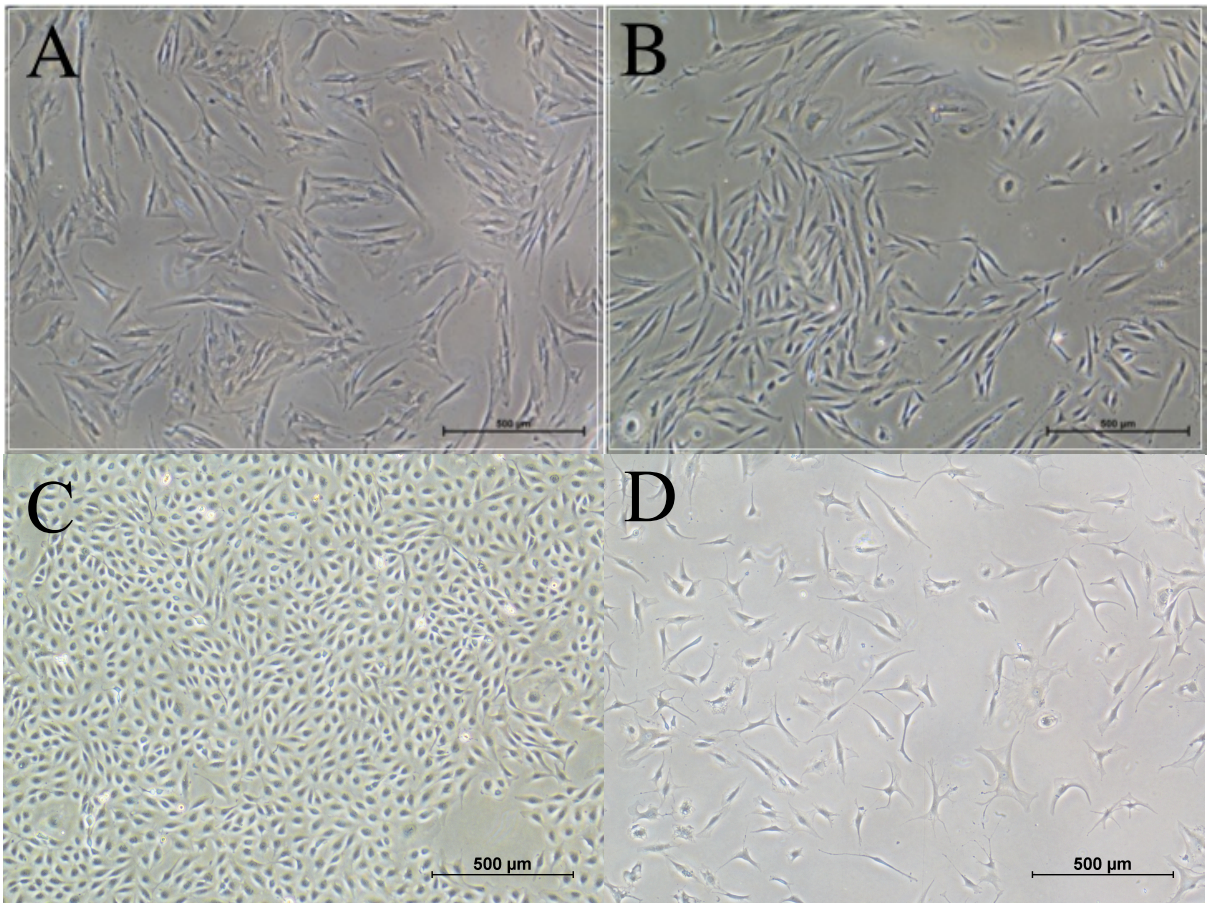
Mechaninio spaudimo įtaka kremzlės eksplantams gali būti vertinama tiek kokybiškai (žiūrėti 2.6.2 skyrių), tiek kiekybiškai (atliekant genų ekspresijos analizę, žiūrėti 2.6.2.1 skyrių).

2.8 Azoto oksido aktyvumo matavimas

Viduląstelinio azoto oksido aktyvumas buvo nustatomas chondrocituose ir KČMKL, 24 valandas veiktuose su 1 μL/mL DMSO (kontrolė, nifedipino ir BayK8644 tirpiklis), 10 μM nifedipino, 10 μM BayK8644 ir 1 μL/mL cigarečių dūmų ekstrakto (CDE) (teigiama kontrolė). Sekančią dieną ląstelės buvo atkabintos nuo dugno ir išmatuotas jų azoto oksido aktyvumas naudojant „MUSE“ tėkmės citometrą ir azoto oksido rinkinį. Dėka šio rinkinio galima nustatyti viduląstelinius azoto oksido aktyvumo pakitimus ir ląstelės membranos pralaidumą ar ląstelės mirtį. Rinkinys susideda iš „Muse Nitric Oxide“ reagento ir negyvų ląstelių dažo 7-AAD. „Muse Nitric Oxide“ yra pro ląstelių membraną patenkantis reagentas, kuris sukuria stipriai fluorescuojantį produktą po NO oksidacijos ląstelės viduje. Šis reagentas yra nenuodingas ir nėra priklausomas nuo ląstelinių esterazių, yra fotostabilus. Negyvų ląstelių žymuo (7-AAD) padeda jas atskirti nuo gyvų ląstelių populiacijos. Į 10 μL ląstelių mišinio dedama 100 μL „Muse Nitric Oxide“ reagento, inkubuojama 30 min, 37 ºC temperatūroje, po inkubacijos mišinys papildomas 90 μL 7-AAD negyvų ląstelių žymens, gerai suspenduojama ir matuojama „MUSE“ tėkmės citometru.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Ląstelių kultivavimas



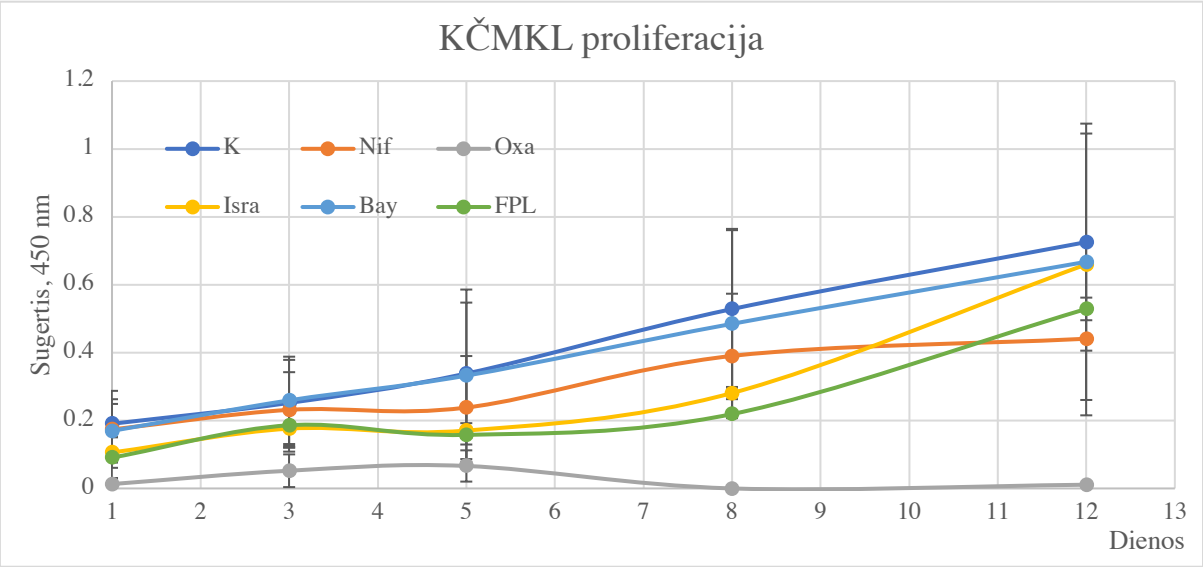
6 pav. Ląstelių kultivavimas monosluoksnio kultūroje, DMEM auginimo terpėje. A – kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės (2 pasažo), B – menstruacijų kraujo mezenchiminės kamieninės ląstelės (2 pasažo), C – šviežiai išskirti chondrocitai (0 pasažo), D – fibroblastų morfologijos chondrocitai (3 pasažo). x40 padidinimas.

KČMKL ir MenMKL augant, jos atitiko MKL keliamus reikalavimus, greitai prilipo prie kultivavimo indo dugno, buvo spindulinės formos ir morfologiškai panašios (6 pav. A ir B) (Gu et al., 2016). Siekiant patvirtinti, kad šios ląstelės atitinka MKL būdingą fenotipą, buvo atlikta paviršiaus žymenų analizė ir adipogeninė bei osteogeninė diferenciacijos (rezultatai buvo pateikti bakalauro baigiamajame darbe). KČMKL ir MenMKL gamino MKL būdingus paviršiaus žymenis CD90, CD73, CD105, CD44 bei negamino HKL būdingų paviršiaus žymenų CD45, CD14, CD34. Abi ląstelių linijos sėkmingai diferencijavo adipogenine ir osteogenine kryptimis. Kultivuojant šviežiai išskirtus žmogaus sąnario kremzlės chondrocitus 2D vienasluoksnyje ląstelių morfologija bėgant laikui (apytiksliai nuo 3 pasažo) keičiasi iš apskritos, kuri būdinga sveikos kremzlės chondrocitams, į labiau išsitempusią, fibroblastų morfologiją dėl fibroblastams būdingų adhezinių baltymų gamybos (6 pav. C ir D). Atsirandantis chondrocitų fenotipinis nestabilumas vadinamas dediferenciacija ir yra viena pagrindinių problemų kuriant osteoartrito ir pažeistų kremzlių gydymo strategijas (Yoon et al., 2002). Visuose tyrimuose buvo naudojamos daugiausiai 3 kartus persėtos (3 pasažo) ląstelės.

3.2 KČMKL ir chondrocitų proliferacinis pajėgumas

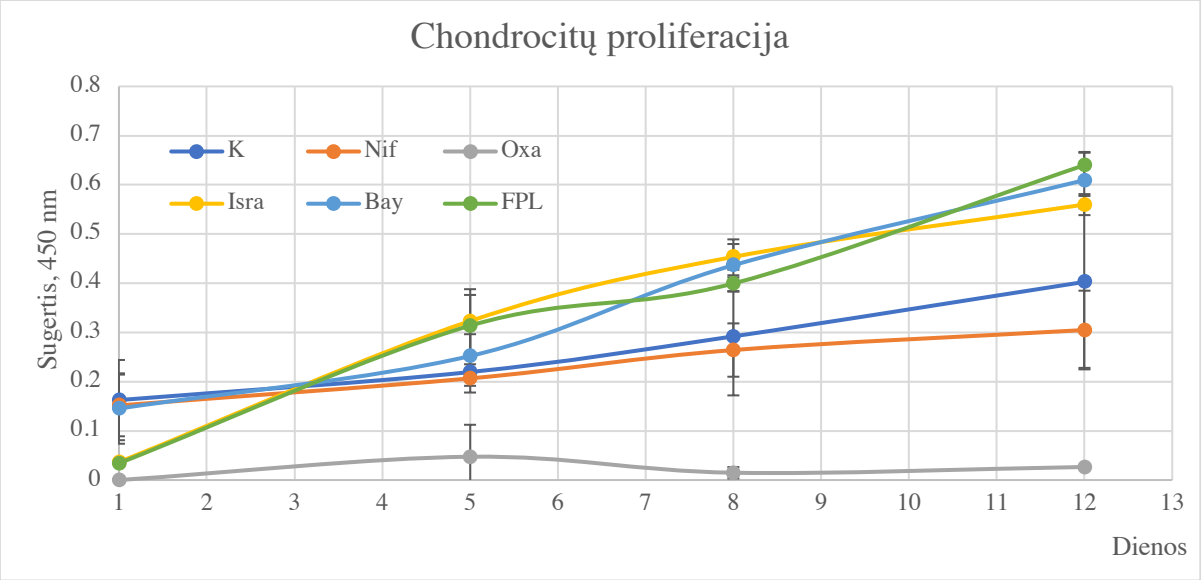
Tyrimas atliekamas kaip nurodyta 2.4 skyriuje, ląstelių proliferacinis pajėgumas buvo palygintas į terpę pridėjus [Ca^{2+}] kalcio kanalų reguliatorius – ĮVKK antagonistus nifedipiną, oksalatą (SR 33805), isradipiną bei agonistus BayK8644 ir FPL64176. Gauti rezultatai buvo susisteminti išvedant vidurkius ir nustatant standartinius nuokrypius naudojant programinę įrangą MS Excel. [Ca^{2+}] kanalų reguliatorių įtaka ląstelių proliferaciniam pajėgumui nustatyta ir pavaizduota 7 ir 8 pav., kuriuose yra palyginama KČMKL ir chondrocitų terpių, inkubuotų su CCK-8, sugertis ties 450 nm ilgio bangomis, matuota spektrofotometru.

KČMKL stimuliuotų su visais veiksniais, išskyrus oksalatą, sugertis buvo didesnė nei chondrocitų, kas parodo didesnį KČMKL proliferacinį pajėgumą. Pastebėtas oksalato citotoksiškumas tiek KČMKL, tiek chondrocitams, 8 proliferacijos dieną visos ląstelės išmirė. KČMKL proliferacija buvo didžiausias nenaudojant jokių kalcio kanalų reguliatorių (kontrolinėje grupėje), taip pat nedaug mažesnis naudojant L-tipo ĮVKK agonistą BayK8644. L-tipo ĮVKK antagonistai nifedipinas ir isradipinas KČMKL veikė panašiai, jų surinktų terpių sugertis rodo, kad proliferacijos greitis kultivuojant kinta, kai veikiant isradipinu, didėjo nuo 5 proliferacijos dienos, veikiant nifedipinu nuo 5 dienos terpės sugertis didėjo, o nuo 8 dienos nebekito. Įdomu tai, kad FPL paveiktų KČMKL terpės sugertis ilgą laiką buvo mažiausia, tačiau gale tyrimo pralenkė nifedipinu veiktų KČMKL terpių sugertį.



7 pav. Kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių (KČMKL) proliferacija 1, 3, 5, 8 ir 12 dieną. Išmatuotas KČMKL, paveiktų kalcio kanalų reguliatoriais nifedipinu (Nif, 10 µM), oksalatu (SR 33805) (Oxa, 10 µM), isradipinu (Isra, 10 µM), BayK8644 (Bay, 10 µM) ir FPL64176 (10 µM), proliferacijos pajėgumas, naudojant komercinį ląstelių proliferacijos rinkinį-8 (CCK-8), sugertį matuojant spektrofotometru ties 450 nm bangos ilgiu.

Chondrocitų, veiktų su isradipinu, FPL ir BayK8644, terpių sugertis nuo 3 proliferacijos dienos buvo didžiausios, priešingai nei KČMKL veiktų su isradipinu ir FPL. Pastebėtas nedidelis, beveik tiesinis kontrolinių chondrocitų bei veiktų nifedipinu, ląstelių skaičiaus augimas viso tyrimo metu. Pastebėta, kad KČMKL ir chondrocitų, veiktų ĮVKK agonistais proliferacinis pajėgumas buvo didesnis nei veiktų antagonistais, kas leidžia manyti, kad šių ląstelių proliferacijai gali turėti reikšmės viduląstelinių kalcio jonų kiekis.



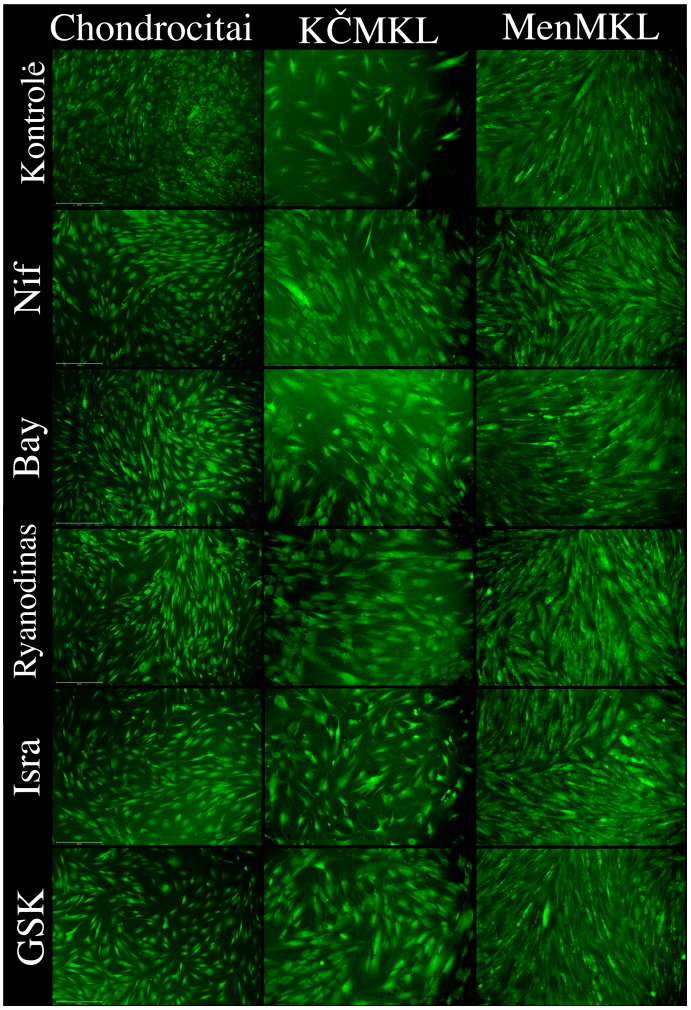
8 pav. Chondrocitų proliferacija 1, 5, 8 ir 12 dieną. Išmatuotas chondrocitų, paveiktų kalcio kanalų reguliatoriais nifedipinu (Nif, 10 µM), oksalatu (SR 33805) (Oxa, 10 µM), isradipinu (Isra, 10 µM), BayK8644 (Bay, 10 µM) ir FPL64176 (10 µM), proliferacijos pajėgumas, naudojant komercinį ląstelių proliferacijos rinkinį-8 (CCK-8), sugertį matuojant spektrofotometru ties 450 nm bangos ilgiu.

3.3 Viduląstelinio kalcio kiekio analizė

3.3.1 Kalcio kanalų reguliatorių įtakos viduląsteliniam kalciui vertinimas fluorescenciniu mikroskopu

Siekiant įvertinti kalcio kanalų reguliatorių įtaką [Ca^{2+}] kiekiui, ląstelės buvo 72 valandas inkubuojamos su skirtingais [Ca^{2+}] kanalų reguliatoriais, o po inkubacijos buvo pažymėtos [Ca^{2+}] specifiniu fluorescuojančiu dažu Cal-520, kaip aprašyta skyriuje 2.5.2. Ląstelės buvo tiriamos fluorescenciniu mikroskopu ir pastebėta, kad paveikus skirtingais [Ca^{2+}] kanalų reguliatoriais viduląstelinio kalcio dažo Cal-520 švytėjimo intensyvumas skyrėsi nedaug, lyginant su kontrole, tačiau iš populiacijos galima išskirti ląsteles, kurios švytėjo stipriau (9 pav.). Iš visų analizuojamų chondrocitų ir MenMKL populiacijų, kiek labiau švytėjo pavienės ląstelės paveiktos ĮVKK agonistu BayK8644 ir endoplazminio tinklo [Ca^{2+}] kanalų slopikliu ryanodinu, o KČMKL veiktos BayK8644. Manoma, kad viduląstelinio kalcio koncentracija padidėjo, nes BayK8644 yra ĮVKK agonistas, kuris prailgina įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų aktyviąją būseną (Lebrut and Atwater, 1985). Ryanodinui blokuojant endoplazminio tinklo kanalus, ląstelės dalinai praranda galimybę kaupti visuląstelinį kalcį endoplazminio tinklo rezervuare (kišenėse), todėl jo padaugėja

citoplazmoje. Nifedipinu paveikus chondrocitus, KČMKL ir MenMKL pastebėtas kiek silpnesnis Cal-520 signalas nei kontrolinėse ląstelėse. Isradipinu veiktos KČMKL ir MenMKL švytėjo sąlyginai stipriau nei chondrocitai. Tiek isradipinas, tiek nifedipinas priklauso tai pačiai 1,4-dihidropiridino junginių grupei ir pasižymi panašiu veikimo mechanizmu. Jie abu slopina L-tipo ĮVKK pralaidumo poros subvienetą CaV1.2 (Striessnig, Ortner and Pinggera, 2015; Cipriani et al., 2016), todėl buvo tikėtasi, kad šių veiksnių poveikis bus panašus ir viduląstelinio kalcio dažo švytėjimas bus blankesnis, lyginant su kontrole. Be to, itin ryškiai švytėjo MenMKL ir KČMKL, paveiktos TRVP4 kanalo slopikliu GSK. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad ĮVKK ir TRPV4 slopikliai ir aktyvatoriai skirtingai paveikė [Ca^{2+}] kiekį skirtingų tipų ląstelėse.



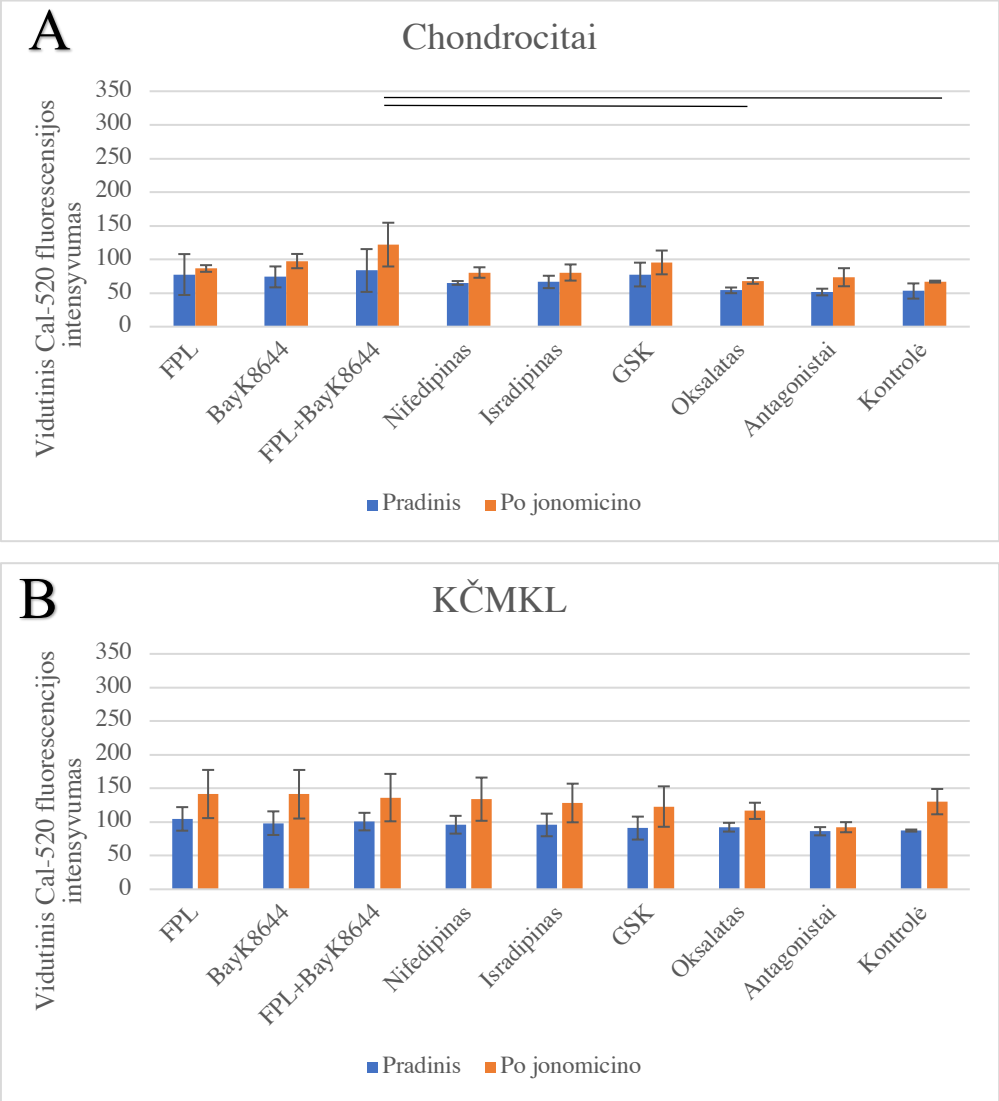
9 pav. Kalcio kanalų reguliatorių įtakos viduląsteliniam kalciui vertinimas fluorescenciniu mikroskopu. Vertinamas MenMKL, KČMKL ir chondrocitų [Ca2+] švytėjimas, 72 val. veikiant kalcio kanalų reguliatoriais nifedipinu (Nif, 10 μM), BayK8644 (Bay, 10 μM), ryanodinu (1 μM), isradipinu (Isra, 5 μM) ir GSK 2193874 (10 μM), pažymint ląsteles kalciui specifiniu fluorescenciniu dažu Cal-520 (1 μM). Analizė atlikta panaudojant fluorescencinį mikroskopą EVOS. Padidinimas x100.

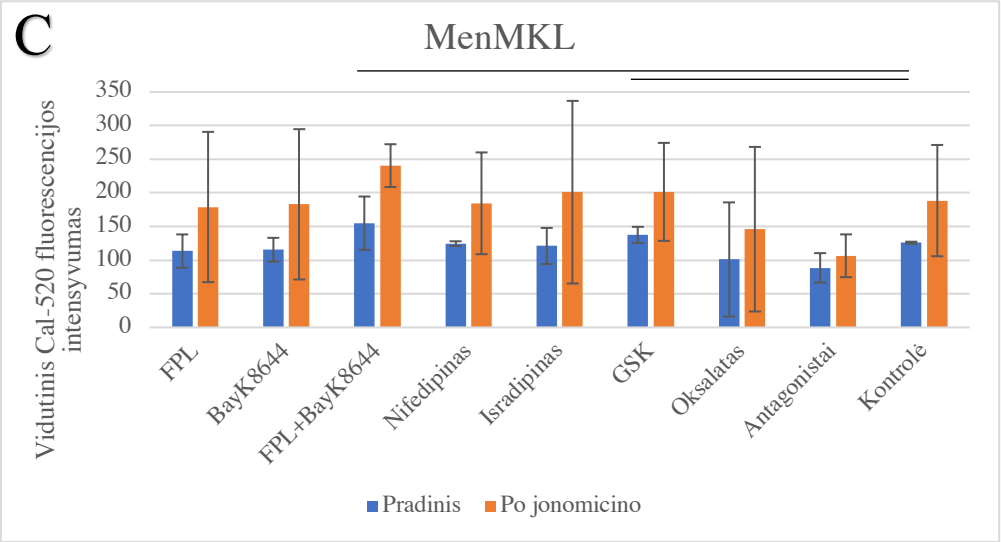
3.3.2 Kalcio kanalų reguliatorių įtakos viduląstelinio kalcio koncentracijai vertinimas tėkmės citometru

Siekiant tiksliau nustatyti [Ca^{2+}] koncentracijų skirtumus tarp skirtingų ląstelių bei jas veikiant skirtingais ĮVKK reguliatoriais buvo naudojamas fluorescencinis dažas Cal-520 ir Calibur tėkmės citometras. Šiame tyrime buvo papildomai panaudotas [Ca^{2+}] kanalų agonistas FPL64176

(10 µM) ir natūralus ĮVKK slopiklis oksalatas (SR 33805) (10 µM). Matavimo metu [Ca^{2+}] koncentracijos pokytis buvo stebimas laike, o praėjus 90 sek. į matuojamą mėginį buvo pridedamas jonomicinas (1 µM), kuris išlaisvina visą [Ca^{2+}] iš endoplazminio tinklo kišenių, taip pat padidina jo pralaidumą iš išorės, leidžiant ląstelėms pasiekti maksimalų leidžiamą [Ca^{2+}] kiekį.

Lyginant chondrocitų, KČMKL ir MenMKL bendrą vidutinį Cal-520 fluorescencijos intensyvumą, pastebėta, kad MenMKL švytėjimo intensyvumas buvo stipriausias, o chondrocitų fluorescencinis intensyvumas buvo silpniausias (10 pav.). Manoma, kad MenMKL sukaupė daugiausia [Ca^{2+}], tuo tarpu chondrocitai - mažiausia. Dėl to daroma prielaida, kad MenMKL, KČMKL ir chondrocitai turi skirtingus [Ca^{2+}] kiekio reguliacinius mechanizmus. BayK8644 ir FPL64176 reikšmingai padidino [Ca^{2+}] koncentraciją MenMKL prieš jonomicino pridėjimą, o chondrocituose po jonomicino pridėjimo. Be to, MenMKL viduląstelinio laisvo [Ca^{2+}] kiekį taip pat padidino ir slopiklis GSK 2193874, o visi slopikliai kartu jį sumažino. Chondrocituose [Ca^{2+}] koncentraciją reikšmingai sumažino slopiklis oksalatas po jonomicino pridėjimo, o KČMKL nepasižymėjo reikšmingais skirtumais, lyginant duomenis, gautus ląsteles veikus įvairiais [Ca^{2+}] kanalų reguliatoriais.





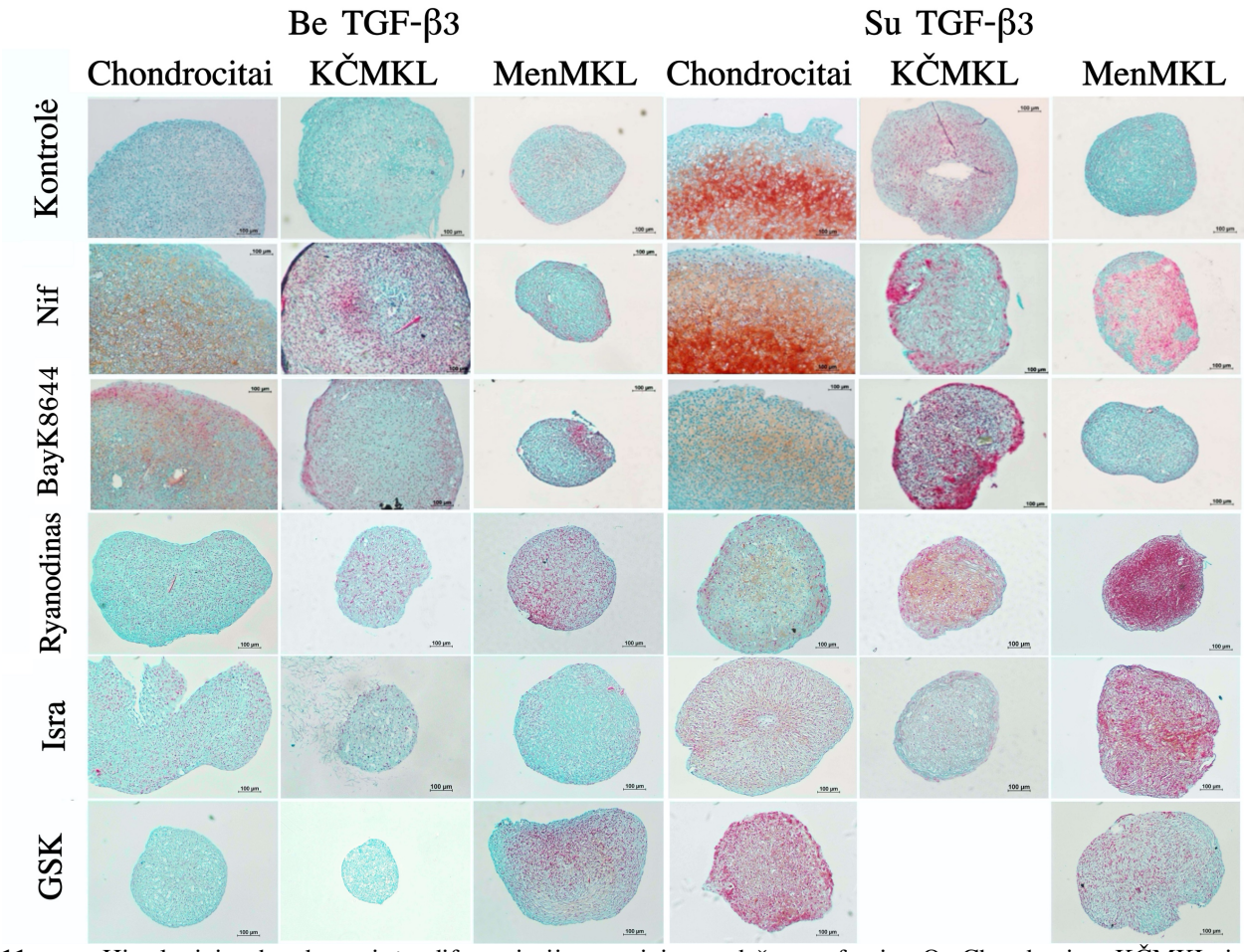
10 pav. Vidutinio Cal-520 fluorescencijos intensyvumo matavimas. A – chondrocitų, B – KČMKL, C – MenMKL vidutinis Cal-520 fluorescencijos intensyvumas, 1 val. veiktų skirtingais kalcio kanalų reguliatoriais (nifedipinu (10 μM); BayK8644 (10 μM); isradipinu (5 μM); GSK 2193874 (10 μM); FPL64176 (10 μM); oksalatu (SR 33805) (10 μM); BayK8644 (10 μM) + FPL64176 (10 μM); nifedipinu (10 μM) + isradipinu (5 μM) + GSK 2193874 (10 μM) + oksalatu (SR 33805) (10 μM) (antagonistai). Viduląstelinio kalcio kitimai ląstelėse buvo stebimi naudojant tėkmės citometrą, prieš sužadinimą jonomicinu (1 µM) ir po. Horizontalės – p reikšmė < 0,05.

3.4 Chondrogeninės diferenciacijos vertinimas

Siekiant įvertinti [Ca^{2+}] kanalų reguliatorių įtaką chondrogeninei KČMKL, MenMKL ir chondrocitų diferenciacijai, ĮVKK reguliatoriai (aktyvatorius BayK8644 ir slopikliai – nifedipinas, ryanodinas, isradipinas ir GSK) buvo dedami į ląstelių diferenciacinę terpę, kaip aprašyta 2.6 skyriuje. Ląstelės buvo diferencijuojamos naudojant vien tik ĮVKK reguliatorius arba reguliatorius kartu su klasikiniu chondrogenezę stimuliuojančiu augimo veiksniu TGF-β3 (Yu et al., 2012). Susiformavusios ląstelių sferos buvo fiksuojamos, pjaustomos mikrotomu „Leica“ ir dažomos safraninu-O.

MenMKL chondrogeninės diferenciacijos priklausomybė nuo [Ca^{2+}] kanalų reguliatorių buvo stipriausia. MenMKL veikiant kalcio kanalų slopikliais isradipinu, ryanodinu ir nifedipinu, diferenciacijos pajėgumas išaugo, tuo tarpu aktyvatorius BayK8644 ir TRPV4 slopiklis GSK parodė silpniausią užląstelinio užpildo baltymų kaupimo rezultatą. KČMKL, atvirkščiai, stipriausią chondrogenezės atsaką parodė pridedant aktyvatorių BayK8644, o nesant augimo veiksnio TGF-β3, diferenciaciją stipriausiai stimuliavo slopiklis nifedipinas. Chondrocitai formavo didžiausias ląstelių sferas iš visų ląstelių, o didžiausias proteoglikanų kiekis pastebėtas chondrocitus stimuliuojant su tik TGF-β3, TGF-β3 ir nifedipinu, taip pat TGF-β3 ir GSK (11 pav.).

Pastebėjus, kad skirtingų kanalų reguliatoriai skirtingai paveikė MenMKL, KČMKL, ir chondrocitų užląstelinio užpildo gamybą, daroma prielaida, kad viduląstelinio [Ca^{2+}] koncentracijos valdymas yra svarbus chondrogeninės diferenciacijos reguliavimui.



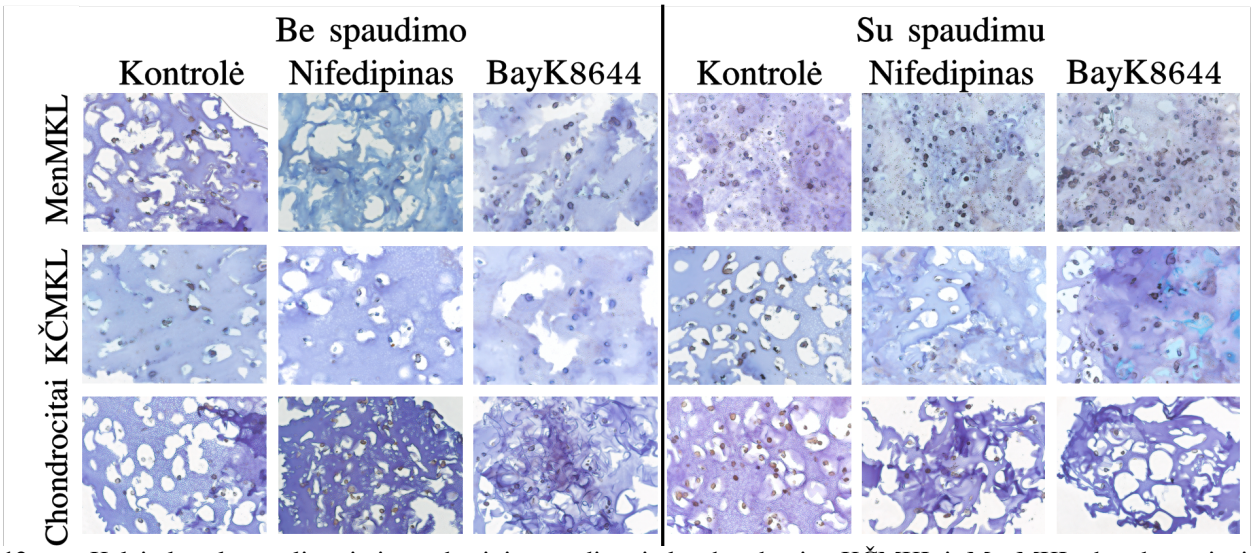
11 pav. Histologinis chondrogeninės diferenciacijos vertinimas, dažant safraninu-O. Chondrocitų, KČMKL ir MenMKL chondrogeninė diferenciacija vykdyta 21 dieną (100x padidinimas). Kontrolė – ląstelės diferencijuotos chondrogeninėje terpėje be TGF-β3. Ląstelės visą diferenciacijos laiką veiktos kalcio kanalų reguliatoriais nifedipinu (Nif, 10 µM), BayK8644 (10 µM), ryanodinu (1 µM), isradipinu (Isra, 5 µM) ir GSK (10 µM), taip pat reguliatoriais kartu su augimo veiksniu TGF-β3 (10 µM).

3.5 Kalcio kanalų reguliatorių ir mechaninio spaudimo poveikis chondrogeninei diferenciacijai CS-Tyr/želatinos karkasuose

Chondrogeninė MenMKL, KČMKL ir chondrocitų diferenciacija taip pat buvo vykdoma CS-Tyr/želatinos hidrogeliuose, naudojant ĮVKK agonistą BayK8644 (10 µM) ir antagonistą nifedipiną (10 µM), taip pat vieną eksperimentinę grupę veikiant mechanine spaudimo jėga, naudojant „FlexCell FX-500" prietaisą (žiūrėti 2.6.1 skyrių). Diferenciacija buvo vertinama II tipo antikūnais pažymint karkasų su ląstelėmis histologinius pjūvius (12 pav.). CS-Tyr/želatinos hidrogelis po histologinio fiksavimo praranda dalį savo drėgmės, todėl vietose sutrūkinėja.

Pastebėta, kad mechaninis spaudimas paskatino II tipo kolageno gamybą visose ląstelėse, kas pastebima patamsėjusioje spalvoje aplink ląsteles, tačiau panašu, kad diferenciacijos trukmė buvo per maža, kad jis pasklistų hidrogelyje (12 pav.). Mechaniškai nespaustos kontrolinės MenMKL bei MenMKL, veiktos ĮVKK aktyvikliu BayK8644 buvo sukaupę II tipo kolageno, kurio gamybą mechaninis spaudimas dar padidino. Taip pat, II tipo kolagenas pastebėtas ir mechaniniu spaudimu ir ĮVKK antagonistu nifedipinu veiktose MenMKL. Daugiausia II tipo

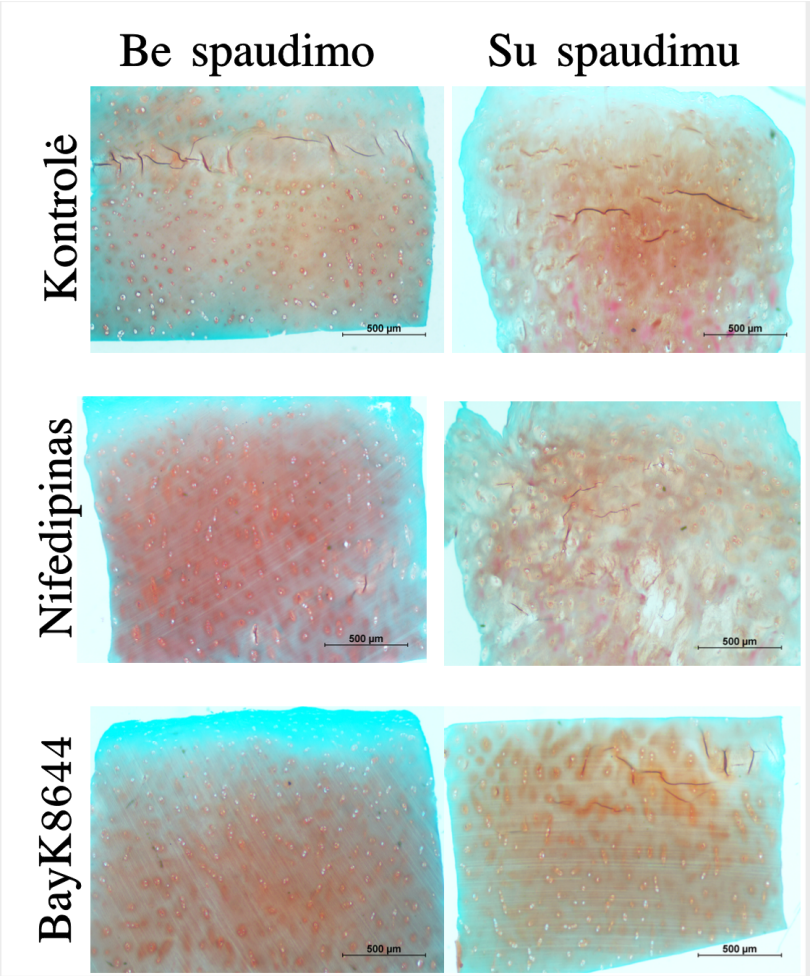
kolageno KČMKL pastebėta kontrolinėse ir BayK8644 veiktose ląstelėse po mechaninio spaudimo. Prieš mechaninį spaudimą, daugiausia II tipo kolageno sukaupę buvo chondrocitai, veikti antagonistu nifedipinu. Po mechaninio spaudimo, II tipo kolageno gamyba buvo stipriausia kontroliniuose bei inkubuotuose su nifedipinu chondrocituose.



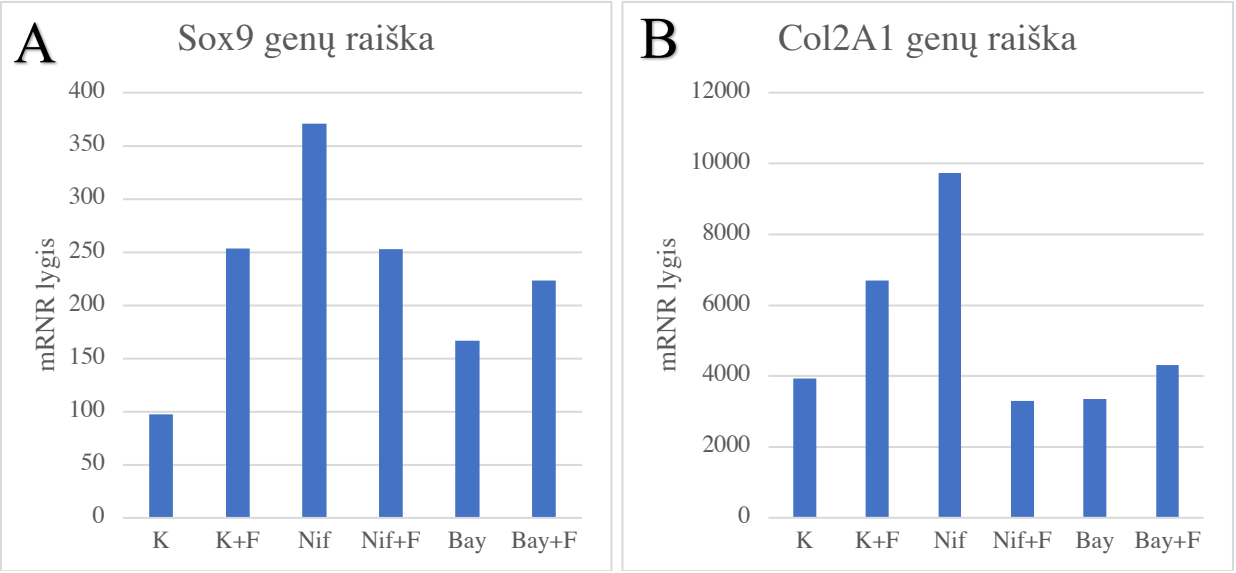
12 pav. Kalcio kanalų reguliatorių ir mechaninio spaudimo įtaka chondrocitų, KČMKL ir MenMKL chondrogeninei diferenciacijai CS-Tyr/želatinos hidrogeliuose po 21 dienos, įvertinta histologiškai, žymint II tipo kolageno antikūnais. Kontrolė – ląstelės CS-Tyr hidrogeliuose chondrogeninėje terpėje. Ląstelės visą laiką veiktos kalcio kanalų reguliatoriais nifedipinu (10 μM) bei BayK8644 (10 μM) bei paskutinę diferenciacijos savaitę naudojant mechaninį spaudimą. x400 padidinimas.

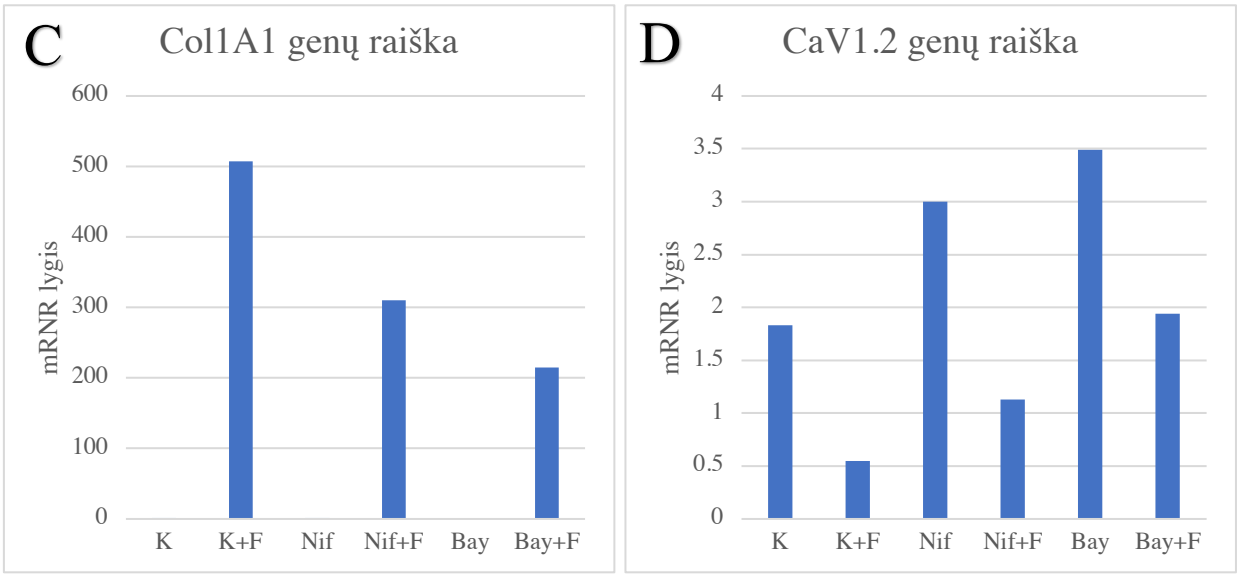
3.6 Kalcio kanalų reguliatorių ir mechaninio spaudimo poveikis žmogaus kremzlės eksplantams

Žmogaus sąnario kremzlės eksplantai, išspausti naudojant biopsinę adatą iš chirurginių operacijų metu pašalintos žmogaus sąnario kremzlės likučių, buvo inkubuoti chondrogeninėje terpėje (kontrolė), chondrogeninėje terpėje su nifedipinu arba BayK8644. Be to, dalis eksplantų buvo veikiami mechaniniu spaudimu. Po 14 dienų eksplantai buvo užfiksuoti, pjaustomi histologiškai bei dažomi safraninu-O. Mechaniškai nespaustuose bei nifedipinu veiktuose kremzlės eksplantuose pastebėta daugiausiai proteoglikanų, o kontroliniuose – mažiausiai (13 pav.). Priešingai, mechaniškai spaustuose kontroliniuose eksplantuose, paveikus BayK8644 stebėta daugiausiai proteoglikanų, o nifedipinu – mažiausiai. Taip pat buvo tirta kremzlės eksplantų genų raiška (14 pav.). Nifedipinas stimuliavo Sox9, II tipo kolageno ir CaV1.2 genų raišką kremzlės eksplantuose be mechaninio poveikio, lyginant su kontrole (14 pav. A, B, D). Mechaninis spaudimas padidino I tipo kolageno raišką visuose tirtuose kremzlės eksplantuose (tiek su nifedipinu ir BayK8644, tiek be jų) (14 pav. C). Mechaninis spaudimas kartu su nifedipinu sumažino II tipo kolageno ir Cav1.2 genų raišką (14 pav. B, D).



13 pav. Kremzlės eksplantai veikti nifedipinu (10 µM) ir BayK8644 (10 µM) bei mechaniniu spaudimu. Histologiniai pjūviai dažyti Safraninu-O. x40 padidinimas

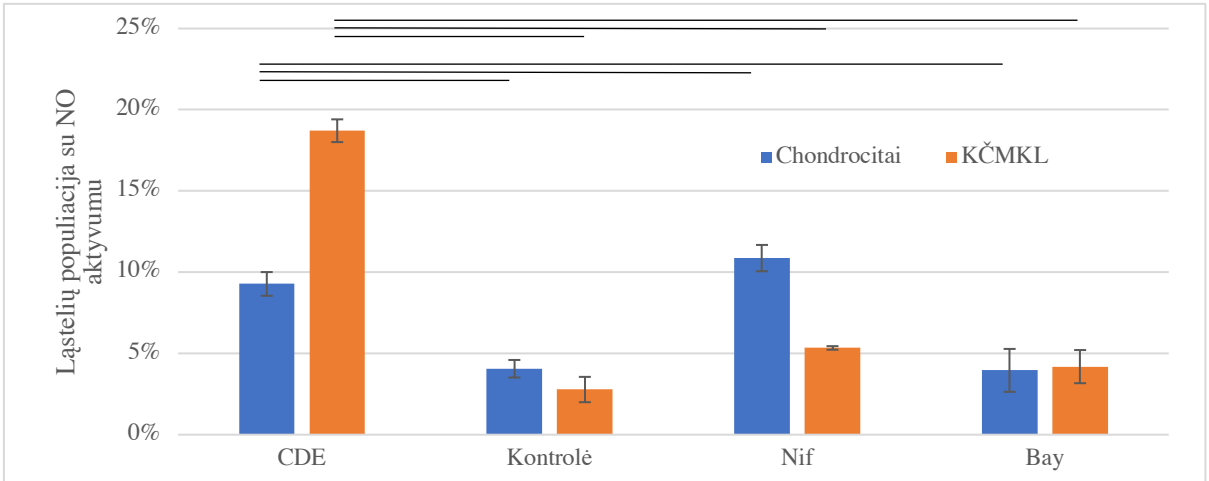




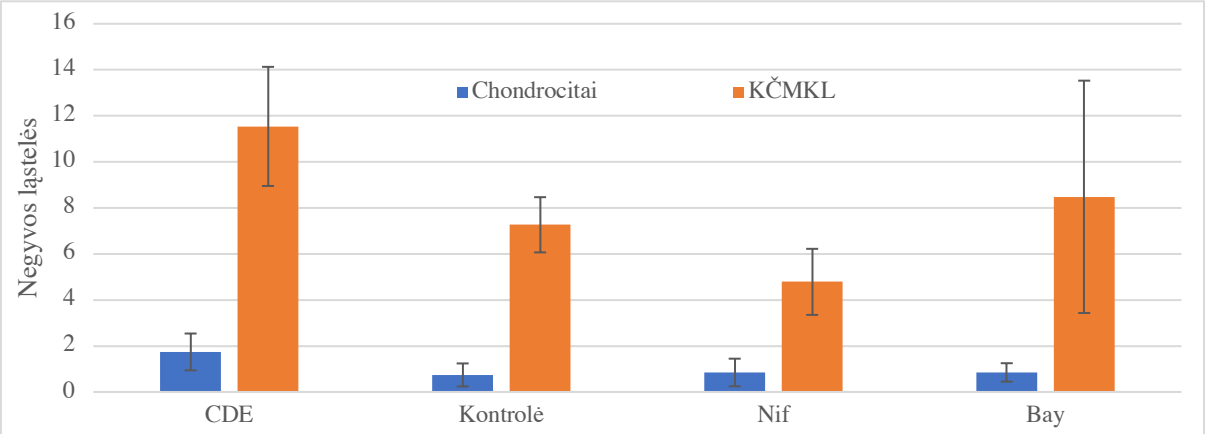
14 pav. Kremzlės eksplantų genų raiškos analizė, juos veikus nifedipinu (Nif, 10 µM) ir BayK8644 (Bay, 10 µM) bei naudojant mechaninį spaudimą (+F). A – Sox9 genų raiškos rezultatai, B – II tipo kolageno genų raiškos rezultatai, C – I tipo kolageno genų raiškos rezultatai, D – įtampos valdomų kalcio kanalų α subvieneto CaV1.2 genų raiškos rezultatai. Išmatuota naudojant tikro laiko PGR. Kontrolinė grupė (K) – eksplantai neveikti jokiais veiksniais.

3.7 Azoto oksido aktyvumo tyrimas

Viduląstelinio azoto oksido aktyvumas chondrocituose ir KČMKL buvo nustatomas jas 24 valandas inkubuojant su nifedipinu (10 µM), BayK8644 (10 µM) ir cigarečių dūmų ekstraktu (1 µl/ml, CDE) (teigiama kontrolė). NO aktyvumas buvo matuojamas MUSE citometru, naudojant komercinį MUSE azoto oksido aktyvumo nustatymo rinkinį. NO aktyvumas MKL padidėja pridėjus CDE, todėl jis buvo pasirinktas kaip teigiama kontrolė. Nifedipinas reikšmingai padidino NO aktyvumą chondrocituose ir KČMKL, lyginant su kontrolėmis (15 pav.). BayK8644 neturėjo reikšmingos įtakos nei vienam ląstelių tipui. Taip pat, tėkmės citometru išmatuotas negyvų ląstelių kiekis populiacijoje (16 pav.). Gyvybingumas sumažėjo po ląstelių inkubacijos su CDE ir BayK8644 bei padidėjo po poveikio nifedipinu, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis.



15 pav. Azoto oksido aktyvumas chondrocituose ir KČMKL. Ląstelės 24 valandas veiktos cigarečių dūmų ekstraktu (CDE) (1 µg/mL), nifedipinu (Nif) (10 µM) ir BayK8644 (10 µM) (BayK). Horizontalės žymi $p<0,05$.



16 pav. Chondrocitų ir KČMKL negyvų ląstelių populiacijos po 24 valandas trukusio veikimo su cigarečių dūmų ekstraktu (CDE) (1 µg/mL), nifedipinu (Nif) (10 µM) ir BayK8644 (10 µM) (BayK). Naudota 7-AAD negyvų ląstelių žymuo ir tėkmės citometrija.

IŠVADOS

1. Vienasluoksnyje kultivuotos žmogaus kaulų čiulpų ir menstruacijų kraujo MKL buvo morfologiškai panašios, spindulinės formos, atitiko MKL keliamus reikalavimus, o šviežiai išskirti chondrocitai buvo apskritos formos, tačiau augant vienasluoksnio kultūroje įgavo fibroblastams būdingą formą.
2. Kalcio kanalų reguliatoriai skirtingai veikia tirtų ląstelių proliferaciją: agonistai BayK8644 ir FPL64176 skatino chondrocitų proliferaciją, o antagonistai nifedipinas ir oksalatas (SR 33805) ją slopino. Tiek agonistai, tiek antagonistai mažino KČMKL proliferacijos intensyvumą.
3. Skirtingi kalcio kanalų reguliatoriai turėjo ne vienodą įtaką kalcio koncentracijai skirtingų tipų ląstelėse. KČMKL, iš visų ląstelių tipų, buvo silpniausiai veikiamos kalcio kanalų reguliatorių. MenMKL nustatyta didžiausia viduląstelinio kalcio jonų koncentracija, bei stipriausias atsakas į kalcio kanalų reguliatorius; tuo tarpu chondrocituose kalcio koncentracija buvo mažiausia, tačiau didėjo veikiant agonistų kompleksui.
4. Vykdant chondrogeninę MenMKL, KČMKL, ir chondrocitų stimuliaciją, nustatytas skirtingas kalcio kanalų reguliatorių poveikis. MenMKL chondrogenezės pajėgumas išaugo, veikiant kalcio kanalų slopikliais kartu su TGF-β3, o KČMKL naudojant aktyvatorių BayK8644 su TGF-β3. Nesant augimo veiksnio TGF-β3, diferenciaciją šiose ląstelėse stipriausiai stimuliavo ĮVKK slopiklis nifedipinas. Chondrocituose didžiausias proteoglikanų kiekis nustatytas stimuliuojant su TGF-β3 ir nifedipinu. Apie kitų slopiklių ir aktyviklių poveikį spręsti sudėtinga, kadangi dėl pandemijos nepavyko ištirti visų suplanuotų mėginių.
5. Mechaninis spaudimas paskatino II tipo kolageno gamybą visuose tirtuose hidrogeliuose.
6. Tiek slopiklis nifedipinas, tiek mechaninis spaudimas stimuliavo II tipo kolageno ir Sox9 genų raišką žmogaus sąnario kremzlės eksplantuose, tačiau sinergistinio poveikio nebuvo. Mechaninis spaudimas slopino CaV1.2 geno raišką, tačiau padidino I tipo kolageno geno raišką visuose eksplantuose.
7. ĮVKK slopiklis nifedipinas padidino NO aktyvumą KČMKL ir chondrocituose, o agonistas BayK8644 neturėjo reikšmingos įtakos.

Šio darbo metu gauti rezultatai yra svarbūs norint įvertinti MKL panaudojimo galimybę kremzlės audinio terapijai, prieš tai šias ląsteles diferencijuojant *in vitro* sąlygomis. Taip pat, šie rezultatai prisideda prie viduląstelinio kalcio jonų valdomų chondrogeninės diferenciacijos molekulinių mechanizmų išaiškinimo ir papildo esančias žinias apie MenMKL, KČMKL ir chondrocitų reguliacinių mechanizmų skirtumus, naudojant įvairius kalcio kanalų slopiklius ir aktyviklius.

Greta Rakauskienė

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abramson, S. B. (2008). Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage*, *16*(SUPPL. 2). https://doi.org/10.1016/S1063-4584(08)60008-4
2. Akkiraju, H. & Nohe, A. (2015). Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *Journal of Developmental Biology*, *3*(4), 177–192. https://doi.org/10.3390/jdb3040177
3. Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Luz-Crawford, P., Aguila-Díaz, C., Fernandez, A., Figueroa, F. E. & Khoury, M. (2015). Characterization of menstrual stem cells: Angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, *6*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0013-5
4. Atsuta, Y., Tomizawa, R. R., Levin, M. & Tabin, C. J. (2019). L-type voltage-gated Ca2+ channel CaV1.2 regulates chondrogenesis during limb development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(43), 21592–21601. https://doi.org/10.1073/pnas.1908981116
5. Augello, A. & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*, *21*(10), 1226–1238. https://doi.org/10.1089/hum.2010.173
6. Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H. & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, *36*(4), 1111–1126. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011
7. Bernotiene, E., Uzielienė, I., Urbonaite, G., Gudiskyte, G., Denkovskij, J., Alaburda, A., Kvederas, G., Bagdonas E. & Mobasheri, A. (2019). The role of voltage-operated calcium channels in chondrogenic properties of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, *27*(2019), S202–S203. https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.02.313
8. Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L. & Im, H. J. (2017). Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Research*, *5*(August 2016). https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44
9. Chen, L., Qu, J. & Xiang, C. (2019). The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1105-9

10. Cipriani, A., Saunders, K., Attenburrow, M. J., Stefaniak, J., Panchal, P., Stockton, S., Lane, T. A., Tunbridge, E. M., Geddes, J. R. & Harrison, P. J. (2016). A systematic review of calcium channel antagonists in bipolar disorder and some considerations for their future development. *Molecular psychiatry*, *21*(10), 1324–1332. https://doi.org/10.1038/mp.2016.86
11. Decker, R. S., Koyama, E. & Pacifici, M. (2016). Articular cartilage: structural and developmental intricacies and questions. *Current Osteoporosis Reports, 13*(6), 407–414. https://doi.org/10.1007/s11914-015-0290-z.Articular
12. Dolphin, A. C. (2018). Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain and Neuroscience Advances*, *2*, 239821281879480. https://doi.org/10.1177/2398212818794805
13. Dolzani, P., Assirelli, E., Pulsatelli, L., Meliconi, R., Mariani, E. & Neri, S. (2019). Ex vivo physiological compression of human osteoarthritis cartilage modulates cellular and matrix components. *PLoS ONE*, *14*(9), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222947
14. Gadjanski, I., Spiller, K., & Vunjak-Novakovic, G. (2012). Time-Dependent Processes in Stem Cell-Based Tissue Engineering of Articular Cartilage. *Stem Cell Reviews and Reports*, *8*(3), 863–881. https://doi.org/10.1007/s12015-011-9328-5
15. Gratal, P., Mediero, A., Sánchez-Pernaute, O., Prieto-Potin, I., Lamuedra, A., Herrero-Beaumont, G. & Largo, R. (2019). Chondrocyte enlargement is a marker of osteoarthritis severity. *Osteoarthritis and Cartilage*, *27*(8), 1229–1234. https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.04.013
16. Gu, Y., Li, T., Ding, Y., Sun, L., Tu, T., Zhu, W., Hu, J. & Sun, X. (2016). Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. Molecular Medicine Reports, 13, 5207-5215. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5169
17. Hannon, H. E. & Atchison, W. D. (2013). Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. *Marine Drugs*, *11*(3), 680–699. https://doi.org/10.3390/md11030680
18. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, *9*(1), 12. https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12
19. Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, C., & Lambert, C. (2010). Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic*

advances in musculoskeletal disease, *2*(6), 335–348. https://doi.org/10.1177/1759720X10383076

20. Ye B. (2010). Ca2+ oscillations and its transporters in mesenchymal stem cells. *Physiological research*, *59*(3), 323–329
21. Yoon, Y. M., Kim, S. J., Oh, C. D., Ju, J. W., Song, W. K., Yoo, Y. J., Huh, T. L. & Chun, J. S. (2002). Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, *277*(10), 8412–8420. https://doi.org/10.1074/jbc.M110608200
22. Kassem M. (2004). Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning and stem cells*, *6*(4), 369–374. https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.369
23. Klingemann, H., Matzilevich, D. & Marchand, J. (2008). Mesenchymal stem cells - Sources and clinical applications. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *35*(4), 272–277. https://doi.org/10.1159/000142333
24. Lebrun, P. & Atwater, I. (1985). Effects of the calcium channel agonist, BAY K 8644, on electrical activity in mouse pancreatic B-cells. *Biophysical journal*, *48*(6), 919–930. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83855-8
25. Lee, C., Grad, S., Wimmer, M. & Alini, M. (2006). The Influence of Mechanical Stimuli on Articular Cartilage Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering*, *2*(2), 1–32. Prieiga per internetą: http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol2/abstracts/alini_0102.pdf
26. Li, J., Chen, G., Xu, X., Abdou, P., Jiang, Q., Shi, D. & Gu, Z. (2019). Advances of injectable hydrogel-based scaffolds for cartilage regeneration. *Regenerative Biomaterials*, *6*(3), 129–140. https://doi.org/10.1093/rb/rbz022
27. Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T. & Tuan, R. S. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, *203*, 96–110. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026
28. Liu, Q., Hu, X., Zhang, X., Duan, X., Yang, P., Zhao, F. & Ao, Y. (2016). Effects of mechanical stress on chondrocyte phenotype and chondrocyte extracellular matrix expression. *Scientific Reports*, *6*(November), 1–8. https://doi.org/10.1038/srep37268
29. Lo Monaco, M., Merckx, G., Ratajczak, J., Gervois, P., Hilkens, P., Clegg, P., Bronckaers, A., Vandeweerd, J. M. & Lambrichts, I. (2018). Stem Cells for Cartilage Repair: Preclinical Studies and Insights in Translational Animal Models and Outcome Measures. *Stem Cells International*, *2018*, 9079538. https://doi.org/10.1155/2018/9079538

30. Lv, M., Zhou, Y., Chen, X., Han, L., Wang, L. & Lu, L. (2018). Calcium Signaling of in situ Chondrocytes in Articular Cartilage under Compressive Loading: Roles of Calcium Sources and Cell Membrane Ion Channels. *Journal of Orthopaedic Research*. 2018 February; 36(2): 730–738. doi:10.1002/jor.23768
31. Madonna, R. (2016). Biology and Function of Stem Cells, 3–7. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25427-2_1
32. Matta, C. & Zakany, R. (2013). Calcium signalling in chondrogenesis: implications for cartilage repair. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, *5*, 305–324. https://doi.org/10.2741/s374
33. McNulty, A. L., Leddy, H. A., Liedtke, W. & Guilak, F. (2015). TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, *388*(4), 437–450. https://doi.org/10.1007/s00210-014-1078-x
34. Meng, X., Ichim, T. E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K. W., Thébaud, B. & Riordan, N. H. (2007). Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, *5*(1), 57. https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57
35. Mirzaei, H., Sahebkar, A., Sichani, L. S., Moridikia, A., Nazari, S., Nahand, J. S., Salehi, H., Stenvang, J., Masoudifar, A., Mirzaei, H. R. & Jaafari, M. R. (2018). Therapeutic application of multipotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(4), 2815–2823. https://doi.org/10.1002/jcp.25990
36. Mobasheri, A., Matta, C., Uzielienè, I., Budd, E., Martín-Vasallo, P. & Bernotiene, E. (2019). The chondrocyte channelome: A narrative review. *Joint Bone Spine*, *86*(1), 29–35. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.01.012
37. Musumeci, G. (2016). The effect of mechanical loading on articular cartilage. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, *1*(2), 154–161. https://doi.org/10.3390/jfmk1020154
38. Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Leonardi, R., Trovato, F. M., Szychlinska, M. A., Di Giunta, A., Loreto, C., & Castorina, S. (2014). New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. *World journal of orthopedics*, *5*(2), 80–88. https://doi.org/10.5312/wjo.v5.i2.80
39. Peters, A. E., Akhtar, R., Comerford, E. J. & Bates, K. T. (2018). The effect of ageing and osteoarthritis on the mechanical properties of cartilage and bone in the human knee joint. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24258-6
40. Pontikoglou, C., Deschaseaux, F., Sensebé, L. & Papadaki, H. A. (2011). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and

Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Reviews and Reports*, *7*(3), 569–589. https://doi.org/10.1007/s12015-011-9228-8

41. Rahman, M. M., Kopec, J. A., Anis, A. H., Cibere, J. & Goldsmith, C. H. (2013). Risk of cardiovascular disease in patients with osteoarthritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis care & research*, *65*(12), 1951–1958. https://doi.org/10.1002/acr.22092
42. Rajabzadeh, N., Fathi, E. & Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investigation*, *6*(July). https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04
43. Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N. & Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/3516574
44. Rossignoli, F., Caselli, A., Grisendi, G., Piccinno, S., Burns, J. S., Murgia, A., Veronesi, E., Loschi, P., Masini, C., Conte, P., Paolucci, P., Horwiz, E. M. & Dominici, M. (2013). Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *BioMed Research International*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/901821
45. Simms, B. A. & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, *82*(1), 24–45. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016
46. Singh, Y. P., Moses, J. C., Bhardwaj, N. & Mandal, B. B. (2018). Injectable hydrogels: A new paradigm for osteochondral tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*(35), 5499–5529. https://doi.org/10.1039/c8tb01430b
47. Soldatov, N. M. (2012). Molecular Determinants of Ca v 1.2 Calcium Channel Inactivation. *ISRN Molecular Biology*, *2012*(Figure 1), 1–10. https://doi.org/10.5402/2012/691341
48. Steinmetz, N. J., & Bryant, S. J. (2011). The effects of intermittent dynamic loading on chondrogenic and osteogenic differentiation of human marrow stromal cells encapsulated in RGD-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Acta Biomaterialia, 7(11), 3829–3840*.doi:10.1016/j.actbio.2011.06.031
49. Striessnig, J., Ortner, N. J. & Pinggera, A. (2015). Pharmacology of L-type Calcium Channels: Novel Drugs for Old Targets?. *Current molecular pharmacology*, *8*(2), 110–122. https://doi.org/10.2174/1874467208666150507105845
50. Tan, Y., Fei, D., He, X., Dai, J., Xu, R., Xu, X., Wu, J. & Li, B. (2019). L-type voltage-gated calcium channels in stem cells and tissue engineering. *Cell Proliferation*, *52*(4), 1–11. https://doi.org/10.1111/cpr.12623

51. Thorpe, S. D., Buckley, C. T., Vinardell, T., O'Brien, F. J., Campbell, V. A., & Kelly, D. J. (2008). Dynamic compression can inhibit chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 377(2), 458–462*.doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.154
52. Uzieliene, I., Bernotiene, E., Rakauskiene, G., Denkovskij, J., Bagdonas, E., Mackiewicz, Z., Porvaneckas, N., Kvederas, G. & Mobasheri, A. (2019). The Antihypertensive Drug Nifedipine Modulates the Metabolism of Chondrocytes and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(November), 1–11. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00756
53. Varghese, S., Hwang, N. S., Canver, A. C., Theprungsirikul, P., Lin, D. W. & Elisseeff, J. (2008). Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Matrix Biology*, 27(1), 12–21*.doi:10.1016/j.matbio.2007.07.002
54. Vinod, E., Kachroo, U. & Sathishkumar, S. (2018). In vitro characterization of human articular chondrocytes and chondroprogenitors derived from normal and osteoarthritic knee joints. *BioRxiv*, 440107. https://doi.org/10.1101/440107
55. Welzel, D. & Burger, K. J. (1990). The calcium antagonist isradipine in the therapy of hypertension. A double-blind crossover comparison with nifedipine. *Drugs*, *40 Suppl 2*, 60–64. https://doi.org/10.2165/00003495-199000402-00015
56. Zenke, M. (2017). Stem cells: from biomedical research towards clinical applications. *Journal of Molecular Medicine*, *95*(7), 683–685. https://doi.org/10.1007/s00109-017-1548-y

PRIEDAI

REZULTATŲ SKLAIDA

DATA	DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE
2018.10.01-2019.05.31	Aukšto lygio ES fondų finansuojamas projektas „Mechanotransdukciniai L tipo kalcio kanalai, kaip terapinis taikinys, veikiantis osteoartritinės kremzlės metabolinius procesus“, Nr. 09.3.3-LMT-K-712-01-0157.
2019.10.01-2019.12.31	Latvijos-Lietuvos-Kinijos Lietuvos mokslo tarybos projektas „Development of injectable biomimetic hydrogels for engineering of cartilage tissue“, P-LLT-18-21.
2019.10.14–2020.04.30	ES fondų finansuojamas projektas „Viduląstelinio kalcio koncentracijos pokyčio įtaka žmogaus menstruacijų kraujo kamieninių ląstelių pajėgumui diferencijuoti į kremzlinį audinį“, Nr. 09.3.3-LMT-K-712, pagal priemonę „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“ veiklą „Studentų gebėjimų vykdyti MTEP veiklą ugdymas“.

DATA	KONFERENCIJOS
2018 birželio 18-22 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „ISSCR 2018“, Melburne, Australijoje. Stendinio pranešimo pavadinimas: " Voltage-Operated Calcium Channels as Modulators of Chondrogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells“. Autoriai: E.Bernotienė, I.Uzielienė, G.Urbonaitė, Z. Mackevič, A. Mobasheri
2019 vasario 27-28 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje

	konferencijoje „COINS 2019“, Vilniuje. Stendinio pranešimo pavadinimas: „Chondrocyte Cultures and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Chondroitin-Sulphate-Based Three-Dimensional Scaffolds“. Autoriai: G. Gudiškytė, I. Uzielienė, G. Urbonaitė, E. Bagdonas, D. Bironaitė, W. Tsai, A. Sobolev, P. Dimitrijevs, Z. Mackevicz, G. Kvederas, N. Porvaneckas, E. Bernotienė
2019 vasario 27-28 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „COINS 2019“, Vilniuje. Stendinio pranešimo pavadinimas: „Regulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Chondrogenic Differentiation Potential via Voltage-Operated Calcium Channels“. Autoriai: G. Urbonaitė, I. Uzielienė, G. Gudiškytė, A. Mobasheri, E. Sadauskaitė, J. Denkovskij, E. Bagdonas, G. Kvederas, N. Porvaneckas, E. Bernotienė
2019 m. kovo 5-7 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „WORLD HEALTHCARE CONGRESS EUROPE 2019“, Mančesteryje (Didžioji Britanija). Stendinio pranešimo pavadinimas: „Antihypertensive L-type Calcium Channel Blockers as Modulators of Metabolism and Function in Osteoarthritic Cartilage“. Autoriai: E. Bernotienė, I. Uzielienė, G. Urbonaitė, G. Gudiškytė, E. Bagdonas, J. Denkovskij, N. Porvaneckas, D. Bironaitė, R. Mikšiūnas, G. Kvederas, A. Mobasheri
2019 m. gegužės 2-5 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „OARSI 2019 congress“, Toronte, Kanadoje. Stendinio pranešimo pavadinimas: „The

	Role of Voltage-Operated Calcium Channels in Chondrogenic Properties of Human Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes“. Autoriai: E. Bernotienė, I. Uzielienė, G. Urbonaitė, G. Gudiškytė, J. Denkovskij, A. Alaburda, G. Kvederas, E. Bagdonas, A. Mobasheri
2019 m. birželio 26-29	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „ISSCR 2019 congress“, Los Andžele, JAV. Stendinio pranešimo pavadinimas: „ Regulation of Intracellular Calcium Concentration in Human Mesenchymal Stem Cells During Chondrogenic Differentiation“. Autoriai: I. Uzielienė, G. Urbonaitė, G. Gudiškytė, E. Bagdonas, E. Sadauskaitė, Z. Mackevicz, A. Mobasheri, E. Bernotienė
2019 m. birželio 26-29	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „ISSCR 2019 congress“, Los Andžele, JAV. Stendinio pranešimo pavadinimas: „Modulation of Cartilage Responses and Chondrogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells via Mechanotransductive L-type Calcium Channels“. Autoriai: E. Bernotienė, I. Uzielienė, G. Urbonaitė, G. Gudiškytė, E. Sadauskaitė, J. Denkovskij, V. Aleksiuk, G. Kvederas, N. Porvaneckas, E. Bagdonas, A. Alaburda, A. Mobasheri
2019 m. spalio 24 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti žodiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „Riga Technical University 60th International Scientific Conference Materials Science and Applied Chemistry“, Rygoje, Latvijoje. Žodinio pranešimo pavadinimas: „The Needs and Challenges to Reproduce Mechanical properties of Articular Carrtilage“.

	Autoriai: E. Bernotienė, I. Uzielienė, G. Urbonaitė, G. Gudiškytė, J. Denkovskij, E. Bagdonas, A. Soboļevs, W. Tsai
2020 m. sausio 3 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai buvo pateikti žodiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „VitaScientia2020“, Vilniuje. Žodinio pranešimo pavadinimas: „The Role of Antihypertensive Drug Nifedipine in Metabolic Pathways of Human Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes“. Autoriai: I. Uzielienė, E. Bernotienė, G. Rakauskienė, J. Denkovskij, E. Bagdonas, Z. Mackiewicz, N. Porvaneckas, G. Kvederas, A. Mobasheri
2020 m. kovo 17-20 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai turėjo būti pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „OpenReadings2020“, Vilniuje, tačiau dėl COVID19 pandemijos konferencija buvo atšaukta. Abstraktas yra priimtas. Stendinio pranešimo pavadinimas: „The Intracellular Calcium Concentration In Human Mesenchymal Stem Cells As A Potential Target For Improvement Of Chondrogenic Differentiation“. Autoriai: G. Rakauskienė, E. Sadauskaitė, E. Bernotienė, E. Bagdonas, A. Mobasheri, N. Porvaneckas, G. Kvederas, I. Uzielienė
2020 m. kovo 17-20 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai turėjo būti pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „OpenReadings2020“, Vilniuje, tačiau dėl COVID19 pandemijos konferencija buvo atšaukta. Abstraktas yra priimtas. Stendinio pranešimo pavadinimas: „The Expression Of L-Type Voltage-Operated Calcium Channel Subunit Cav1.2 In Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation“.

	Autoriai: E. Sadauskaitė, I. Uzielienė, G. Rakauskienė, R. Mikšiūnas, E. Bagdonas, D. Bironaitė, A. Mobasheri, N. Porvaneckas, G. Kvederas, E. Bernotienė
2020 m. balandžio 30 d. – gegužės 3 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai turėjo būti pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „OARSI2020“, Vienoje, Austrija, tačiau dėl COVID19 pandemijos konferencija buvo atšaukta. Abstraktas yra priimtas. Stendinio pranešimo pavadinimas: „Intracellular Calcium Levels In Human Mesenchymal Stem Cells Isolated From Bone Marrow And Menstrual Blood As A Modulator Of Chondrogenic Differentiation“. Autoriai: I. Uzielienė, E. Bernotienė, G. Rakauskienė, E. Sadauskaitė, E. Bagdonas, A. Alaburda, G. Kvederas, A. Mobasheri
2020 m. balandžio 30 d. – gegužės 3 d.	Baigiamojo magistro darbo rezultatai turėjo būti pateikti stendiniame pranešime, tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „OARSI2020“, Vienoje, Austrija, tačiau dėl COVID19 pandemijos konferencija buvo atšaukta. Abstraktas yra priimtas. Stendinio pranešimo pavadinimas: „Expression Of Voltage-Operated Calcium Channel Subunit Cav1.2. In Human Mesenchymal Stem Cells During Chond-Rogenic Differentiation“. Autoriai: E. Bernotienė, I. Uzielienė, E. Sadauskaitė, G. Rakauskienė, E. Bagdonas, V. Aleksiuk, J. Raudoniūtė, G. Kvederas

DATA	**PUBLIKACIJOS**
2018 m. rugpjūčio 24 d. priimtas **2018 m. spalio 21 d. publikuotas**	**The Potential of Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair and Regeneration: Novel Aspects** Autoriai: I. Uzielienė, G. Urbonaitė, Ž. Tachtamiševaitė, A. Mobasheri, E. Bernotienė

	Žurnalas: Stem Cells International IF (2018): 3.850
2019 m. spalio 18 d. priimtas **2019 m. lapkričio 8 d. publikuotas**	**The Antihypertensive Drug Nifedipine Modulates the Metabolism of Chondrocytes and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells** Autoriai: I. Uzielienė, E. Bernotienė, G. Rakauskienė, J. Denkovskij, E. Bagdonas, Z. Mackiewicz, N. Porvaneckas, G. Kvederas, A. Mobasheri Žurnalas: Frontiers IF (2019): 3.634