

Laboratorinė medicina.
2010, t. 12, Nr. 1(45), p. 20–24.

Augimo faktorių poveikis pelių miogeninių ląstelių proliferacijai ir paviršinių žymenų ekspresijai

Radvilė Malickaitė^{1,2}
Laimutė Jurgauskienė^{1,2}
Jolanta Bukauskaitė³

Santrauka

Šio darbo tikslas buvo įvertinti, kiek ir kaip miokardo infarkto zonoje susidarantis uždegimo veiksnys navikų nekrozės faktorius (TNF- α) ir augimo faktoriai, potencialūs farmakoterapiniai veiksniai, – granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF) ir kamieninių ląstelių augimo faktorius (SCF) veikia greitai besidauginančių ląstelių ciklą ir paviršinių žymenų, svarbių diferenciacijai ir tarpląsteliniam ryšiams, ekspresiją.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Miogeninių ląstelių kultūros buvo gautos iš pelių kojų skersaruožio raumens audinio. Ląstelių proliferacinis aktyvumas naudojant 5-bromdeoksiuridiną ir paviršinių žymenų ekspresija veikiant TNF- α , G-CSF, SCF ir G-CSF/SCF deriniu buvo įvertinti tėkmės citometru.

Rezultatai. Nustatyta, kad didelė (100 ng/ml) uždegimo židiniui būdingo citokino TNF- α koncentracija slopino proliferacinį pelės miogeninių ląstelių aktyvumą, o didelės (100 ng/ml) potencialiai farmakoterapinių citokinių SCF ir G-CSF dozės nesukėlė reikšmingo poveikio ląstelių proliferacijai. Endotelio ląstelių pirmtakams būdingų žymenų CD31 ir CD146 tiriamosios ląstelės neekspresavo. Paviršiaus adhezijos receptoriaus CD44, dalyvaujančio ląstelės ir ląstelės, ląstelės ir matrikso sąveikoje, – ląstelių judėjime, ekspresija nekito. Adhezijos receptorių CD81 (TAPA-1) ir CD9 ekspresija dėl TNF- α poveikio slopinama, o augimo faktorių SCF ir SCF/G-CSF derinys ją aktyvina, kaip ir transmembraninio tirozino kinazės receptoriaus SCF ligando CD117.

Išvados. Didelė uždegimo židiniui būdingo citokino TNF- α koncentracija slopina proliferacinį pelės miogeninių ląstelių aktyvumą ir slopina adhezijos receptorių CD81 (TAPA-1) ir CD9 ekspresiją. Nors potencialiai farmakoterapinių citokinių SCF (100 ng/ml) ir G-CSF (100 ng/ml) poveikis ląstelių ciklui minimalus, šių augimo faktorių derinys (kiekvieno po 100 ng/ml) reikšmingai aktyvina transmembraninio tirozino kinazės receptoriaus SCF ligando CD117 ekspresiją kamieninių ląstelių paviršiuje. Augimo faktoriai gali apsaugoti regeneracijai naudojamas ląsteles nuo neigiamo uždegimui palankių citokinių poveikio.

Reikšminiai žodžiai: kamieninės ląstelės, citokinai, adhezijos receptoriai.

ĮVADAS

Pastaruoju metu pasaulio mokslininkai ir gydytojai itin domisi kamieninė-

mis ląstelėmis. Nors teigiama, kad potencialios žmogaus kamieninių ląstelių naudojimo galimybės įvairių patologinių būklių korekcijai yra beveik

¹Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Širdies ir kraujagyslių ligų klinikos Širdies chirurgijos centras
Clinic of Cardiovascular Diseases
Heart Surgery Centre at the Faculty of Medicine, Vilnius University

²Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės diagnostikos centro Klinikinės imunologijos laboratorija
The Laboratory of Clinical immunology, Center of Laboratory Diagnostics, Vilnius University Hospital "Santariškių Clinics"

³Biochemijos instituto Vystymosi biologijos skyrius
The Department of developmental Biology, Institute of Biochemistry

Autorius kontaktams:

Radvilė Malickaitė
Vilniaus universiteto
Širdies chirurgijos centras
Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius
Tel. +370 5 2365186
El. paštas: radvile.malickaite@santa.lt

neribotos, paskelbti klinikinių tyrimų rezultatai taikant kamieninių ląstelių terapiją širdies nepakankamumui gydyti parodė, kad daugeliu atvejų terapinis kamieninių ląstelių poveikis nebuvo toks geras, kaip tikėtasi iš tyrimų su eksperimentiniais modeliais [1–8]. Siekiant išsiaiškinti mechanizmus, kaip suaugusiojo organizme pažeistos ląstelės yra pakeičiamos naujomis sveikomis ląstelėmis, ir pritaikyti kamienines ląsteles audinių regeneracijai, reikia papildomų žinių apie ląstelių diferenciacijos mechanizmus, ląstelių tarpusavio sąveiką, integravimosi į pataloginį židinių ypatumus, žūties molekulinis mechanizmus, šių procesų reguliaciją ir kitas fundamentalias biomedicinos mokslų problemas.

Miokardo regeneracijai taikytos įvairios kilmės kamieninės ląstelės: mioblastai (iš skersaruožio griaučių raumens išskiriamos kamieninės ląstelės), kaulų čiulpai ir iš periferinio kraujo išskiriamos kraujodaros kamieninės ląstelės, vaisiaus kardiomiocitai ir embrioninės kamieninės ląstelės, endotelio ląstelės pirmtakai [6]. Klinikiniais tyrimais buvo įrodytas sąlyginis kamieninių ląstelių implantavimo į pažeistą miokardą procedūros saugumas ūminiu ir ilgalaikiu stebėjimo (iki 4 metų) laikotarpiu [1–5]. Deja, paaiškėjo, kad ilgalaikis poveikis nėra pakankamas, kairiojo skilvelio išvaromosios frakcijos pokytis nereikšmingas [7, 8].

Regeneracijos tikslu naudojamos kamieninės ląstelės, suleistos į audinių pažeidimo zoną, patenka į uždegimo mikroaplinką. Vienas miokardo infarkto zonoje susidaranciu citokinu – navikų nekrozės faktorius (TNF- α). Kamieninėms ląstelėms apsaugoti nuo žalajamojo uždegimo faktorių poveikio galima naudoti kitus citokinus, pavyzdžiui, augimo faktorius. Žinoma, kad ankstyvoje poinfarktinėje stadijoje, kol dar nežuvo kardiomiocitai, farmakoterapija gali sumažinti žūvančių audinio ląstelių skaičių ir galutinę poinfarktinio rando zoną [9–14]. Persodinamų kamieninių ląstelių kultūros papildymas augimo faktoriais, citokiniais ar kitais vaistinėmis preparatais taip pat gali keisti šių ląstelių dauginimosi ir diferenciacijos ypatumus integruojantis į pataloginį židinį.

DARBO TIKSLAS

Šio darbo tikslas – įvertinti, kiek ir kaip miokardo infarkto zonoje susidarantis uždegimo veiksnys navikų nekrozės faktorius (TNF- α) ir augimo faktoriai, potencialūs farmakoterapi-

niai veiksniai – granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF) ir kamieninių ląstelių augimo faktorius (SCF) veikia greitai besidauginančių ląstelių ciklą ir paviršinių žymenų, svarbių diferenciacijai bei tarpląsteliniam ryšiams, ekspresiją.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Miogeninių ląstelių išskyrimas ir palaikymas *in vitro*

Tyrimams naudojome miogeninių ląstelių kultūras, gautas iš jaunu, 2–4 savaičių, pelių kojų griaučių raumens audinio. Ši darbo dalis atlikta laikantis Humaniško elgesio su eksperimentiniais gyvūnais chartijos reikalavimų ir gavus LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimą Nr. 0171 (2007-10-31) naudoti laboratorinius gyvūnus Biochemijos instituto mokslo tiriamajam projektui. Pelei atlikus eutanaziją iš užpakalinės kojos šlaunies raumens steriliai paimtas 0,5 × 0,5 cm audinio gabalėlis merkiamas į pernašos terpę (ląstelių augimo terpė be serumo, su 200 U/ml penicilino ir 200 g/ml streptomocino). Laminarijame bokse nuplovus pernašos terpę, audinys nedelsiant smulkinamas mechaniniu būdu. Užpylus 1–5 ml 0,25 % tripsino, magnetine maišykle maišoma apie 10 min. Gauta suspensija praskiedžiama augimo terpė su serumu ir centrifuguojama 10 min. 1500 aps./min. greičiu. Nuosėdos dar kartą plaunamos centrifuguojant. Surinktos ląstelės sėjamos į kultivavimo indus Iscovo modifikuotoje Dalbeko terpėje (IMDM), praturtintoje 20 % fetalinio veršelių serumo (FVS), 5 ng/ml bazinio fibroblastų augimo faktoriaus (bFGF) ir antibiotikų – penicilino (100 U/ml) ir streptomocino (100 g/ml).

Iš maždaug po 2 savaičių susidariusio kamieninių ląstelių monosluoksnio buvo gauta pirminė miogeninių ląstelių kultūra, kuri vėliau persėta 1–2 kartus per savaitę. Persėti skirtų ląstelių monosluoksnis flakonėlyje apžiūrimas inversiniu mikroskopu ir atsižvelgiama į terpės spalvą (augant ląstelėms terpė rūgštėja, todėl indikatorius fenolio raudonasis keičia spalvą iš rausvos į geltoną), terpės drumstumą (gali sukelti nuslenkančios nuo substrato ląstelės arba infekcija). Persėjant augimo terpė nupilama, ląstelių monosluoksnis plaunamas fosfatinium buferiniu tirpalu be $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM

NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl) arba augimo terpė be serumo ir disperguojamas EDTA ir 0,25 % tripsino mišiniu (*Biological Industries*), paruoštu santykiu 9:1. Flakonėlyje paliekama 0,5 ml tirpalo, inkubuojama termostate 37 C 2–10 min. Kai ląstelės disperguoja (supvalėja, plaukioja suspensijoje), suspenduojamos pastovios kultūros augimo terpėje: IMDM terpėje, kurioje yra 10 % FVS, antibiotikų ir 2–5 ng/ml bFGF (pagal ląstelių dauginimosi intensyvumą). Ląstelės skaičiuojamos Gorajevio kameroje naudojant šviesinį mikroskopą; reikiamo tankio suspensija sėjama į naujus kultivavimo indus arba naudojama tyrimams.

Pelės miogeninių ląstelių paruošimas tėkmės citometriniams proliferacinio aktyvumo tyrimui

Proliferacinis aktyvumas tirtas naudojant BrdU Flow Kit (BD *Biosciences*, San Diego): taikant 5-bromdeoksiuridiną (BrdU), 10 l 1 mM vienkartiniam Dalbeko fosfatinium druskintame buferiniame tirpale (DPBS, Sigma) vienam kultivavimo terpės mililitrui. Tyrimui naudota ląstelių koncentracija 1–2 × 10⁶ ml, inkubacijos laikas – 24 val. 37 C CO₂ inkubatoriuje. Po inkubacijos ląstelių monosluoksnis skaidytas EDTA ir 0,25 % tripsino mišiniu, ląstelės plautos 5 ml augimo terpė RPMI-1640 centrifuguojant 10 min. 1500 aps./min. greičiu, antram plovimui naudotas fosfatinis druskintas buferinis tirpalas (PBS). Prieš dažymą monokloniniais antikūnais buvo tiriamas ląstelių gyvybingumas dažant ląsteles tripano mėlynuoju. Tiriamųjų ląstelių membrana fiksuota ir jos pralaidumas padidintas naudojant BD Cytotfix/Cytoperm™ buferinį tirpalą (inkubacija 30 min. kambario temperatūroje). Po inkubacijos ląstelės plautos 1 ml vienkartinium Perm/Wash™ buferiniu tirpalu, centrifuguojant jas 5 minutes 1100 aps./min. greičiu. Vėliau ląstelių membrana veikta BD Cytoperm Plus™ buferiniu tirpalu 10 min. ant ledo šaldytuve, po inkubacijos pakartotinai plautos Perm/Wash™ buferiniu tirpalu. Ląstelės fiksuotos BD Cytotfix/Cytoperm™ buferiniu tirpalu 5 min. kambario temperatūroje ir vėl plautos Perm/Wash™ buferiniu tirpalu.

Įterpto BrdU kiekiui nustatyti ląstelės inkubuotos su DNaze (1 val. 37 C temperatūroje), dažytos anti-BrdU FITC konjuguotu monokloniniu antikūnu (20 min. kambario temperatūroje), plautos PBS centrifuguojant 5 min. 1100 aps./min. greičiu. Taip pa-

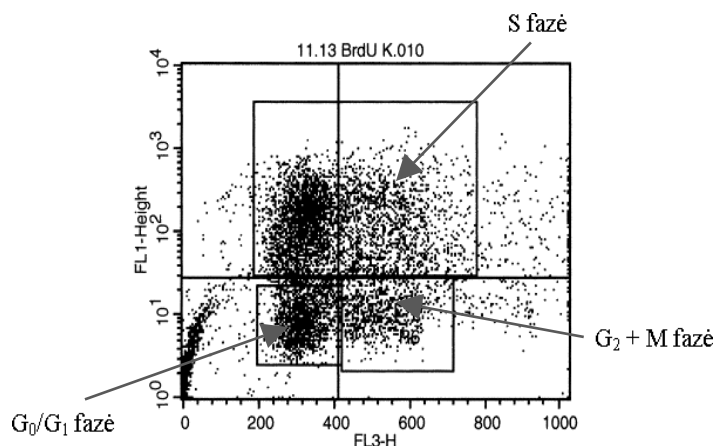
ruoštos ląstelės analizuotos tėkmės citometru *FACSCalibur*, renkant ne didesni nei 400 numatytą slenkstį perėjusių įvykių per sekundę greičiu. Proliferacinis aktyvumas vertintas pagal BrdU įterpimą į DNR, skaičiuotas G_0/G_1 , S ir $G_2 + M$ fazėse esančių ląstelių procentas (1 pav.).

Citokinių poveikio proliferaciniam aktyvumui pagal BrdU įterpimą į DNR tyrimas

Kartu su BrdU įterpimo tyrimu tiriamosios ląstelės kultivavimo indelyje veiktos uždegimo židiniui būdingu citokiniu TNF- (Invitrogen) arba augimo faktoriais – granulocitų kolonijas stimuliuojančiu faktoriu (G-CSF, Invitrogen) ir/arba kamieninių ląstelių faktoriu (SCF, Invitrogen).

Duomenų apie tai, kokiomis proporcijomis išskiriami augimo faktoriai *in vivo* esant miokardo infarktui ir ankstyvuoju laikotarpiu po jo, nėra. Žinoma, kad TNF- yra uždegimui palankus, citotoksinį atsaką ir apoptozę medijuojantis citokinas, bet jis pasižymi ir augimą bei diferenciaciją moduluojančiomis savybėmis, pavyzdžiui, nustatytas skatinamasis poveikis palydovinių ląstelių aktyvacijai. Manoma, kad poveikis priklauso nuo aplinkoje esančių augimo faktorių (pvz., jei TNF- veikia kartu su IL-3 ir G-CSF, skatinamas kraujodaros kamieninių ląstelių augimas, o jei kartu su G-CSF ir SCF – jų augimas slopinamas). Klinikiniais tyrimais nustatyta, kad po infarktinis gydymas G-CSF pagreitina išeminės zonos gijimą, manoma, dėl to, kad į uždegimo židinį pritraukiami makrofagai ir didėja matriks metaloproteinazių ekspresija [14]. Yra duomenų, kad G-CSF, aktyvuodamas Janus kinazės (Jak) transduktoriaus ir transkripcijos aktyvatoriaus (Stat) kelia, apsaugo kardiomiocitus ir endotelio ląsteles nuo apoptozės. Literatūros duomenimis, G-CSF kartu su SCF mažina pelių miokardo infarkto modelyje indukuojamų aritmijų po infarktiname miokarde dažnį, galbūt didindami koneksino 43 ekspresiją ir arteriogenezę [9, 15].

Norėdami nustatyti, koks yra įvairių TNF-, G-CSF ir SCF dozių poveikis *in vitro* miogeninėms ląstelėms, iš pradžių pasirinkome monoterapiją mažomis (5 ng/ml) ir atitinkamai didelėmis (100 ng/ml) augimo faktorių dozėmis. Kadangi mažų dozių poveikio nebuvo (nesiskyrė nuo kontrolės), tolesniems tyrimams naudotos 100 ng/ml citokinių koncentracijos.



1 pav. Miogeninių ląstelių proliferacinio aktyvumo tėkmės citometrinių tyrimas
Fig. 1. Miogenic cell proliferation assay using flow cytometry

Miogeninių ląstelių paviršinių žymenų ekspresijos nustatymas

Tiriamajai ląstelių populiacijai ivertinti buvo iširta jų paviršinių žymenų ekspresija [16–19]. Pasirinkti šie žymenys:

- tetraspaninų šeimos adhezijos receptoriai CD81 (TAPA-1) ir CD9 (manoma, kad jų didžioji užląstelinė kilpa jungiasi su heterodimerinių integrinų subvienetu, receptoriai svarbūs adhezijai ir ląstelių judėjimui, CD9 indukuoja mitogenezę ir kinazių aktyvumą);

- daugiavandinė ląstelės paviršiaus adhezijos molekulė CD44, svarbi ląstelės ir ląstelės, ląstelės ir matriks sąveikai, ląstelių judėjimui, grįžimui (angl. *homing*) į limfinius mazgus, chemokinių bei augimo faktorių pernašai į ląsteles, augimo signalų perdavimui sukeltant proliferaciją ar apoptozę;

- transmembraninis tirozino kinazės receptoriaus, kamieninių ląstelių faktoriaus (SCF) ligandas CD117 (c-kit);

- imunoglobulinų superšeimos receptoriai: perduodant signalą dalyvaujantis glikoproteinas CD90 (Thy-1), endotelio žymenys – trombocitų/endotelio adhezijos molekulė CD31 (anti-PECAM-1), dalyvaujanti ląstelei migruojant pro kraujagyslių endotelį ir tarpusavyje sąveikaujant endotelio ląstelėms, vykstant angiogenezei, uždegimui, ir ląstelės ir endotelio sąveikai svarbus receptoriaus CD146.

Fluorescencijos ribai tarp teigiamai ir neigiamai nusidažiusių ląstelių nustatyti ir galimam nespecifiniam švytėjimui atmesti ruoštas mėginys su izotipine kontrole, pelės monokloniniu antikūnu prieš IgG1, kapa, klonas MOPC-21. Taikyta tiesioginė imunof-

luorescencija, 100 l ląstelių suspensijos (koncentracija 4×10^6 ląstelių/ml) inkubuojant su 20 l reagento (FITC arba PE konjuguoto monokloninio antikūno) prieš ląstelės paviršiaus membranos žymenį. Inkubuota kambario temperatūroje tamsoje ne mažiau kaip 30 min., po inkubacijos ląstelės du kartus plautos dviem PBS mililitrais ir analizuotos tėkmės citometru taikant *CellQuest* programą.

Statistinė analizė

Tyrimų rezultatai statistiškai apdoroti naudojant SPSS 13 programą. Duomenys pateikiami apskaičiuotus aritmetinį vidurkį ir standartinį nuokrypį. Skirtumas tarp grupių ivertintas Stjudento testu, rezultatai buvo laikomi reikšmingais, kai $p < 0,05$.

REZULTATAI IR APTARIMAS

Pelės miogeninių ląstelių gyvybingumas

Pradedant tyrimą iš Biochemijos instituto gautų ląstelių gyvybingumas dažant tripano mėlynuoju siekė iki 95%. Po inkubacijos su uždegimui palankiais (TNF-) ir potencialiai ląstelės nuo žūties apsaugančiais (G-CSF ir SCF) citokinais geriausias ląstelių gyvybingumas nustatytas po inkubacijos su G-CSF ($85,7 \pm 8,0\%$ vs. $76,0 \pm 8,6\%$ kontrolinėse kultūrose, $p = 0,07$; šešių tyrimų rezultatų duomenys).

Citokinių poveikio pelės miogeninių ląstelių proliferaciniam aktyvumui pagal BrdU įterpimą į DNR tyrimas

BrdU įterpimas į miogenines ląsteles 24 val. veikiant 100 ng/ml TNF- ma-

žėja (daugiau ląstelių lieka G₀/G₁ fazės, 46,4 ± 6,1 % vs. 33,5 ± 11,5 % kontrolinių, p = 0,05, nedaug ląstelių perėina į S fazę, 20,8 ± 8,9 % vs. 37,5 ± 11,4 % kontrolinių, p = 0,02). Farmakoterapinių citokinių G-CSF (100 ng/ml) ir SCF (100 ng/ml) galimas poveikis proliferaciniam miogeninių ląstelių aktyvumui minimalus.

Farmakoterapinių veiksnių įtaka tarpląstelinėje sąveikoje dalyvaujančių paviršiaus žymenų ekspresijai

Endotelio ląstelių pirmtakams būdingų žymenų – trombocitų/endotelio adhezijos molekulės CD31 (anti-PECAM-1) ir sąveikos su endotelio ląstelėmis receptoriaus CD146 – mūsų tirtos pelės miogeninės ląstelės beveik neekspresavo nei kontrolinėje, nei citokinių paveiktose kultūrose (ekspresijos ribos 0,5–2%). Manome kad tai yra geras miogeninių ląstelių kultūros grynumo žymuo.

Daugiafunkcinę ląstelės paviršiaus adhezijos molekulę CD44, dalyvaujančią ląstelių tarpusavio sąveikoje, ląstelių sąveikoje su matriksu, taip pat ląstelių judėjime ir chemokinių bei augimo faktorių pernašoje į ląsteles, ekspresavo beveik visos tirtos ląstelės, šią ekspresiją menkai veikė tyrimui naudoti citokinai.

Adhezijos receptoriaus CD81 (TAPA-1) ir CD9 kontrolinėje kultūroje ekspresavo daugiau negu 70 % visų tirtų ląstelių. Citokinių poveikio suvestinė pateikiama 2 pav.: ekspresija kontrolinėje kultūroje prilyginę 0, matome, kad veikiant TNF- α abiejų receptorių ekspresija silpnėjo – CD81 vidutiniškai 3,5 %, o CD9 15,5 %. Augimo faktoriai, ypač SCF ir SCF derinys su G-CSF, adhezijos receptorių ekspresiją aktyvino – atitinkamai iki 94 % ir 74 % po 24 val. inkubacijos su 100 ng/ml G-CSF, iki 95 % ir 80 % po 24 val. inkubacijos su 100 ng/ml SCF, iki 84 % ir 82 % po 24 val. inkubacijos su G-CSF ir SCF (abiejų po 100 ng/ml). Literatūroje skelbta, kad transmembraninius proteinus CD9 ir CD81 ekspresuoja tiek pelės griaučių raumens ląstelės, tiek miogeninių linijų ląstelės. Miogeninės diferenciacijos metu šių proteinų ekspresija didėja, o taikant antikūnus prieš CD9 ir CD81 lėtėja mioblastų susilieėjimas ir miotubulių susidarymas [17], taigi, abu proteinau yra svarbūs miogeninių ląstelių diferenciacijai. Nustatytas teigiamas augimo faktorių poveikis šių adhezijos molekulių ekspresijai gali būti susijęs su didesnėmis galimybėmis migruoti į miokardo pažeidimo židinį.

1 lentelė. Miogeninių ląstelių gyvybingumas dėl citokinių poveikio
Table 1. Influence of cytokines on myogenic cell viability

Lastelės	Gyvybingumas po 24 val. inkubacijos, %
Kontrolinės	76,0 ± 8,6
TNF- α , 100 ng/ml	73,6 ± 16,2
G-CSF, 100 ng/ml	85,7 ± 8,0*
SCF, 100 ng/ml	78,8 ± 14,5

*p = 0,07 lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis.

2 lentelė. Tiriamųjų ląstelių ciklo kitimas (BrdU įterpimas) pagal citokinių poveikį
Table 2. Cell cycle (BrdU incorporation) under the influence of cytokines

Lastelės	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ +M (%)
Kontrolinės	33,5 ± 11,5	37,5 ± 11,4	11,5 ± 4,1
TNF- α , 100 ng/ml	46,4 ± 6,1*	20,8 ± 8,9**	16,7 ± 9,0
G-CSF, 100 ng/ml	33,0 ± 14,5	40,4 ± 23,7	6,6 ± 4,1
SCF, 100 ng/ml	40,0 ± 11,6	36,0 ± 15,8	10,1 ± 2,8

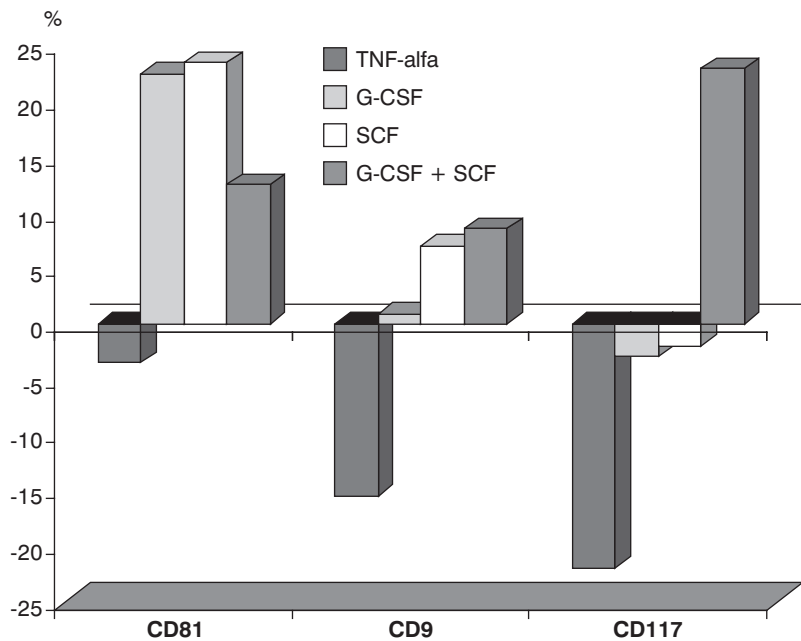
* p = 0,05 lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis

** p = 0,02 lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis

Miogeninių pirmtakų žymuo [19] transmembraninis tirozino kinazės receptoriaus CD117 (c-kit) taip pat aktyviai ekspresuojamas tiriamųjų kamieninių ląstelių paviršiuje (72 % kontrolinių ląstelių). TNF- α ekspresiją slopina (iki 50 % ląstelių). Pažymėtina, kad pavieniai augimo faktoriai ekspresijos neveikė (69 % po inkubacijos su G-CSF ir 70 % – su SCF), bet atsakas (iki 95 %) veikiant augimo faktorių deriniui buvo ryškus (2 pav.).

Perduodant signalą dalyvaujantį receptorių CD90 (Thy-1) ekspresuoja pusė kontrolinių ląstelių; šią ekspresiją slopinamai veikia tik TNF- α (ekspresija mažėja 13 %), augimo faktoriai reikšmingo poveikio neturi.

Ankstyvoje poinfarktinėje stadijoje, kol dar nežuvo kardiomiocitai, taikoma farmakoterapija gali sumažinti žūvančių audinio ląstelių skaičių ir galutinę poinfarktinio rando zoną. Persodinamų kamieninių ląstelių kultūros papildymas augimo faktoriais, citokiniais ar kitais vaistinėmis preparatais gali keisti šių ląstelių dauginimosi bei diferenciacijos integruojantis į patologinį židinį ypatumus. Atlikus tyrimą gautos žinios apie kamieninių ląstelių, taikomų eksperimentinei ar klinicinei miokardo ir kraujagyslių endotelio regeneracijai, funkcines savybes padės tobulinti ląstelinės terapijos metodus, derinant šią terapiją su farmakologiniais veiksniais.



2 pav. Citokinių poveikis pelės miogeninių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijai

Fig. 2. Influence of cytokines on myogenic mouse stem cells surface molecules expression

IŠVADOS

Didelė (100 ng/ml) uždegimo židiniui būdingo citokino TNF- koncentracija slopina proliferacinį pelės miogeninių ląstelių aktyvumą ir adhezijos receptorių CD81 (TAPA-1) ir CD9 ekspresiją. Nors farmakoterapinių citokinių SCF (100 ng/ml) ir G-CSF (100 ng/ml) galimas poveikis ląstelių ciklui minimalus, šių augimo faktorių derinys (kiekvieno po 100 ng/ml) reikšmingai aktyvina transmembraninio tirozino kinazės receptoriaus, SCF ligando CD117 ekspresiją kamieninių ląstelių paviršiuje. Augimo faktoriai gali apsaugoti regeneracijai naudojamas ląsteles nuo neigiamo uždegimui palankių citokinių poveikio. ◆

Šis darbas atliktas vykdant Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo remiamą projektą „Fundamentiniai kamieninių ląstelių funkcionavimo mechanizmų tyrimai. Citoterapija 2“, registracijos Nr. C-07023, sutarties Nr. C-04/2007.

Gauta: 2010 02 19
Priimta spaudai: 2010 03 31

LITERATŪRA

- Menasche P, Hagene A, Scorsin M, Puozet B, Desnos M, Dubos D, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case. Arch Mal Coeur Vaiss 2001; 94(3): 180–2.
- Menasche P, Hagene AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post infarction LV dysfunction. J Am Coll Cardiol 2003; 41(7): 1078–83.
- Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. Eur Heart J 2003; 24(22): 2012–20.
- Menasche P. Myoblast transfer in heart failure. Surg Clin N Am 2004; 84: 125–39.
- Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischaemic cardiomyopathy: four-year follow-up. Circulation 2005; 112(12): 1748–55.
- Davani S, Deschaseaux F, Chalmers D, Tiberghien P, Kantelip JP. Can stem cells mend broken heart? Cardiovascular Research 2005; 65: 305–16.
- Steendijk P, Smits PC, Valgimigli M, van der Giessen WJ, Onderwater EE, Serruys PW. Intramyocardial injection of skeletal myoblasts: long-term follow-up with pressure-volume loops. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006; 3 (Suppl 1): S94–100.
- Menasche P, Desnos M, Hagene AH. Routine delivery of mioblasts during coronary artery bypass surgery: why not? Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006; 3 (Suppl. 1): S90–3.
- Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Huang Y, Stein AB, Hunt G, et al. Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function. Circulation Research 2006; 98: 1098–105.
- Barile L, Chimenti I, Gaetani R, Forte E, Miraldi F, Frati G, et al. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2007; 3 (Suppl 1): S9–14.
- Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2007; 4 (Suppl 1): S52–9.
- Nienaber CA, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Freund M, Ince H. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on mobilization of bone-marrow-derived stem cells after myocardial infarction in humans. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006; 3 (Suppl 1): S73–7.
- Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Esaki M, Maruyama R, et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. Laboratory investigation 2006; 86: 32–44.
- Ince H, Nienaber ChA. Granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction: future perspectives after FIRSTLINE-AMI and REVIVAL-2. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006; 3 (Suppl 1): S114–8.
- Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner RA. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. J Am Coll Cardiol 2005; 46: 1662–9.
- Tachibana I, Hemler ME. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. The Journal of Cell Biology 1999; 146(4): 893–904.
- Hakomori S. Glycosynaptic microdomain controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. FEBS Lett 2009; doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.065.
- Nykanen AI, Raisky O, Hollmen M, Krebs R, Tikkanen JM, Wu Y, et al. Interplay between inflammation and angiogenesis in cardiac allografts – therapeutic applications for VEGFR-1 and -2 inhibitors. J Heart Lung Transplant 2006; 25 (2S): S89–90.
- Steele A, Jones OY, Gok F, Marikar Y, Steele P, Chamizo W, et al. Stem-like cells traffic from heart ex vivo, expands in vitro, and can be transplanted in vivo. J Heart Lung Transplant 2005; 24: 1930–9.

Summary

IMPACT OF GROWTH FACTORS ON MIOGENIC MOUSE CELLS PROLIFERATION AND SURFACE MARKERS EXPRESSION

Radvilė Malickaitė, Laimutė Jurgauskienė, Jolanta Bukauskaitė

Background. Acute myocardial infarction is accompanied by increased levels of proinflammatory cytokines, including TNF-. We aimed to analyze alternations in myogenic mouse stem cells proliferation as well as the surface expression of adhesion molecules and receptors, involved in cell differentiation and trans-endothelial migration.

Material and methods. Skeletal muscle derived myogenic cell lines were isolated from 2–4 week old mouse leg musculus. Cell proliferation was assessed by flow cytometry using BrdU Flow Kit (BD Biosciences, San Diego). Influence of cytokines of pharmacological potential TNF-, G-CSF, SCF and G-CSF/SCF combination on myogenic mouse stem cells proliferation as well as surface molecules expression has been investigated.

Results. High (100 ng/ml) concentrations of TNF- inhibited cells proliferation; no stimulation of cell cycle has been noticed while using growth factors (G-CSF, SCF and G-CSF/SCF combination). Endothelial progenitor cell markers CD31 and CD146 were not expressed. Neither TNF-, no G-CSF, SCF nor G-CSF/SCF combination has influenced the expression of adhesion molecule CD44. Expression of CD81 (TAPA-1) and CD9 were inhibited using TNF-, and induced only by G-CSF/SCF combination. SCF ligand CD117 expression was found to be twice as high after the incubation with growth factors combination in comparison with controls.

Conclusions. It was shown, that high concentrations of proinflammatory cytokine TNF- suppress myogenic stem cell proliferation, as well as adhesion receptors CD81 (TAPA-1) and CD9 expression. No significant effect of SCF (100 ng/ml) or G-CSF (100 ng/ml) on cell proliferation was established. The G-CSF/SCF combination (100 ng/ml each) activates trans-membrane protein with tyrosine kinase capacity SCF ligand CD117 expression on myoblast cell line.

Keywords: stem cell, cytokines, adhesion molecules.