

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

**Eglė Pavydė**

**RAUMENINIŲ KAMIENINIŲ  
LĄSTELIŲ PRITAIKYMAS  
EKSPERIMENTINIO ŪMINIO  
INKSTŲ PAŽEIDIMO GYDYMUI**

Daktaro disertacija  
Gamtos mokslai,  
biologija (N 010)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos fakulteto Fiziologijos ir farmakologijos institute.

**Disertacija ginama eksternu.**

**Mokslinis konsultantas**

prof. dr. Romaldas Mačiulaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

**Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:**

**Pirmininkė**

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

**Nariai:**

prof. dr. Inga Arūnė Bumblytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

doc. dr. Vacis Tatarūnas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

dr. Daiva Bironaitė (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Oliver Planz (Tiubingeno Eberhardo Karlo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija bus ginama viešame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. kovo 27 d. 13 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro A-203 auditorijoje.

Adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lietuva

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

**Eglė Pavydė**

**APPLICATION OF MUSCLE STEM  
CELLS FOR THE TREATMENT OF  
EXPERIMENTAL ACUTE KIDNEY  
INJURY**

Doctoral Dissertation  
Natural Sciences,  
Biology (N 010)

Kaunas, 2025

A dissertation has been prepared at the Institute of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences.

**The dissertation is defended extramurally.**

### **Scientific Consultant**

Prof. Dr. Romaldas Mačiulaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

**The dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:**

### **Chairperson**

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

### **Members:**

Prof. Dr. Inga Arūnė Bumblytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Assoc. Prof. Dr. Vacis Tatarūnas (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Dr. Daiva Bironaitė (Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Oliver Planz (Eberhard Karls University of Tübingen (Germany), Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on March 27<sup>th</sup>, 2025, at 13 PM in the Auditorium A-203 of the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies of the Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

# TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	10
Darbo tikslas .....	11
Darbo uždaviniai.....	11
Darbo aktualumas ir naujumas.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Ūminis inkstų pažeidimas .....	14
1.1.1. Ūminio inkstų pažeidimo epidemiologija ir rizikos veiksniai .....	15
1.1.2. Ūminis inkstų pažeidimas ir pakaitinė inkstų terapija .....	16
1.2. Morfolginiai pokyčiai ir inkstų regeneraciniai procesai po ūminio inkstų pažeidimo.....	17
1.2.1. Inkstų pirmtakinių ląstelių taikymas inkstų regeneracijai eksperimentiniuose ikiklinikiniuose tyrimuose.....	18
1.2.2. Autokriniiniai, parakrininiai ir endokriniiniai augimo veiksniai.....	19
1.3. Mezenchiminės kamieninės ląstelės .....	19
1.3.1. Mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmas regeneraciniuose procesuose po ūminio inkstų pažeidimo .....	20
1.3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui ikiklinikiniuose tyrimuose.....	20
1.3.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui klinikiniuose tyrimuose.....	23
1.4. Raumeninės ląstelės .....	23
1.4.1. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės.....	24
1.4.2. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimas .....	25
1.4.3. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių privalumai ir jų taikymo galimybės .....	25
2. METODIKA .....	27
2.1. Tyrimų etika ir laboratoriniai gyvūnai .....	27
2.2. Kamieninių ląstelių išskyrimas .....	27
2.2.1. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimas .....	27
2.2.2. Kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas.....	29
2.3. Kamieninių ląstelių charakterizavimas .....	30
2.3.1. Populiacijos padvigubėjimo laiko vertinimas .....	30
2.3.2. Ląstelių charakterizavimas imunofluorescencijos metodu .....	30
2.3.3. Ląstelių charakterizavimas tėkmės citometrijos metodu .....	31
2.3.4. Ląstelių charakterizavimas realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu .....	31
2.3.5. Multipotentinė diferenciacija .....	32

2.4. Kamieninių ląstelių terapijos taikymas eksperimentiniame nefrotoksiškumo modelyje <i>in vivo</i> .....	34
2.4.1. Eksperimentinis nefrotoksiškumo modelis <i>in vivo</i> .....	34
2.4.2. Kamieninių ląstelių dozės parinkimas.....	36
2.4.3. Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių paruošimas injekcijoms.....	36
2.4.4. Paros diurezės nustatymas.....	37
2.4.5. Kreatinino koncentracijos nustatymas ir kreatinino klirenso apskaičiavimas .....	37
2.4.6. Inkstų pažeidimo žymenų KIM-1 ir NGAL nustatymas .....	37
2.4.7. Inkstų histologijos vertinimas .....	38
2.4.8. Inkstų apoptozės vertinimas .....	38
2.4.9. Ląstelių žymėjimas fluorescuojančiais membraniniais dažais PKH26 ir jų migracijos vertinimas.....	39
2.5. Imties sudarymas ir statistinė duomenų analizė.....	40
2.5.1. Gyvūnų imties sudarymas .....	40
2.5.2. Statistinė duomenų analizė.....	40
3. REZULTATAI.....	41
3.1. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių charakteristikos .....	41
3.1.1. Morfologija.....	41
3.1.2. Populiacijos padvigubėjimo laikas.....	43
3.1.3. Imunofenotipas.....	44
3.1.4. SOX2, OCT4 ir NANOG genų raiška.....	47
3.1.5. Multipotentinės diferenciacijos potencialas .....	47
3.2. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių palyginimas ūminio inkstų pažeidimo modelyje <i>in vivo</i> .....	49
3.2.1. Paros diurezės įvertinimas.....	49
3.2.2. Šlapimo ir kraujo biocheminių rodiklių pokyčių įvertinimas .....	50
3.2.3. KIM-1 ir NGAL koncentracijos pokyčių įvertinimas .....	53
3.2.4. Inkstų histologijos pokyčių įvertinimas .....	55
3.2.5. Inkstų apoptozės įvertinimas.....	58
3.2.6. Ląstelių farmakokinetikos įvertinimas.....	60
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	62
4.1. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių charakteristikos .....	63
4.2. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijų taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui .....	64
4.3. Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių pagrindu veikimo mechanizmas.....	67

4.4. Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių pagrindu citokinetikos ypatumai .....	68
4.5. Atliktų tyrimų privalumai ir trūkumai .....	68
IŠVADOS .....	70
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS .....	71
SUMMARY .....	72
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	91
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	102
CURRICULUM VITAE .....	105
PADĖKA .....	107

## SANTRUMPOS

ANOVA	(angl. <i>analysis of variance</i> ) variacijų analizė
BM-MSCs	(angl. <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i> ) kaulų čiulpų kamieninės ląstelės
BMP-2	(angl. <i>Bone Morphogenetic Protein-2</i> ) kaulų morfogeninis baltymas-2
BMP-4	(angl. <i>Bone Morphogenetic Protein-4</i> ) kaulų morfogeninis baltymas-4
BSA	(angl. <i>Bovine Serum Albumin</i> ) jaučio serumo albuminas
C <sub>Cr</sub>	Kreatinino klirensas (ml/min.)
CEE	(angl. <i>Chick Embryo Extract</i> ) viščiuko embriono ekstraktas
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindolo dihydrochlorido hidratas
DMEM	(angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) Dulbecco modifikuota Eagle terpė
DNR	deoksiribonukleorūgštis
EDTA	(angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ) etilenediamintetraacto rūgštis
EGF	(angl. <i>epidermal growth factor</i> ) epidermio augimo veiksnys
ELISA	(angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ) imunosorbento analizė
FACS	(angl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> ) ląstelių rūšiavimas fluorescencijos metodu
FBS	(angl. <i>Fetal Bovine Serum</i> ) fetalinis jaučio serumas
FITC	(angl. <i>anti-fluorescein isothiocyanate</i> ) antifluoresceino izotiocianatas
GFG	glomerulų filtracijos greitis (ml/min.)
GM	Gentamicinas
HBSS	(angl. <i>Hank's Buffered Salt Solution</i> ) Hanko buferinis druskos tirpalas
HGF	(angl. <i>hepatocyte growth factor</i> ) hepatocitų augimo veiksnys
HS	(angl. <i>Horse Serum</i> ) arklio serumas
i. m.	(angl. <i>intramuscular</i> ) į raumenis
i. p.	(angl. <i>intraperitoneal</i> ) į pilvo ertmę
i. v.	(angl. <i>intravenous</i> ) į veną
IGF-1	(angl. <i>Insulin-like growth factor 1</i> ) į insuliną panašus augimo veiksnys 1
IL-6	interleukinas-6
IL-22	interleukinas-22
LIL	lėtinė inkstų liga
KIM-1	(angl. <i>Kidney Injury Molecule-1</i> ) inkstų pažeidimo molekulė
MDSPCs	(angl. <i>muscle-derived stem/progenitor cells</i> ) raumeninės kilmės kamieninės ląstelės
MSCs	(angl. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> ) mezenchiminės kamieninės ląstelės
NGAL	(angl. <i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> ) su neutrofilų gelatinaze susijęs lipokalinas
NRV	nepageidaujama reakcija į vaistą
PBS	(angl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) fosfatinis buferinis tirpalas
PE	(angl. <i>anti-phycoerythrin</i> ) antifikoeritinas
PGR	(angl. <i>polymerase chain reaction</i> ) polimerazės grandininė reakcija
RPM	angl. <i>rotation per minute</i> ) apsisukimai per minutę
s. c.	(angl. <i>subcutaneous</i> ) į poodį
S <sub>Cr</sub>	Kreatinino koncentracija kraujo serume (μmol/l)
SN	(angl. <i>standard deviation</i> ) standartinis nuokrypis
TUNEL	(angl. <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> )
U <sub>Cr</sub>	Kreatinino koncentracija šlapime (μmol/l)
ŪIFN	ūminis inkstų funkcijos nepakankamumas



ŪIL ūminė inkstų liga  
ŪIP ūminis inkstų pažeidimas  
VEGF (angl. *Vascular endothelial growth factor*) kraujagyslių endotelio augimo veiksnys  
vs. (lot. *versus*) lyginant su

## ĮVADAS

Ūminis inkstų pažeidimas (ŪIP) – tai dažnas ir grėsmingas polietiologinis klinikinis sindromas, pasireiškiantis staigiu svarbiausių inkstų funkcijų sutrikimu. ŪIP nustatomas maždaug 10–15 proc. pacientų, patekusių į liginę, o intensyviosios terapijos skyriuose jo dažnis gali siekti daugiau nei 50 proc. [1]. Mirštamumas dėl ŪIP skirtingų autorių duomenimis gali svyruoti nuo 10 iki 65 proc. [2–8]. Šiuo metu pakaitinė inkstų terapija (hemodializė, peritoninė dializė, hemofiltracija, hemodiafiltracija arba inkstų transplantacija) yra vienintelis gydymo pasirinkimas pacientams, kuriems diagnozuotas ŪIP ir (ar) lėtinė inkstų liga. Dėl šios priežasties nuolat ieškoma naujų, inovatyvių būdų šioms rimtoms sveikatos problemoms spręsti.

Pastaraisiais metais daug dėmesio buvo skiriama tyrimams, kuriuose mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo taikomos ŪIP gydymui [9]. Mezenchiminės kamieninės ląstelės – nediferencijuotos, savaime atsinaujinančios suaugusio organizmo kamieninės ląstelės, kilusios iš mezodermos – embriono vidurinio gemalinio sluoksnio [10, 11]. Šios multipotentinės ląstelės yra plačiai paplitusios organizme, gali būti gana lengvai išskirtos iš skirtingų audinių, tokių kaip kaulų čiulpai, riebalai, skersaruožiai griaučių raumens, virkštelės kraujas, periosteumas, plaučių, sėklidžių audinių, dermio [12–22]. Mezenchiminės kamieninės ląstelės geba diferencijuotis į riebalines, kremzlės, kaulo, skersaruožių griaučių ir lygiųjų raumenų, širdies raumens, inkstų, nervinio audinio ląsteles [14, 19–21, 23–25]. Ankstesni tyrimai parodė, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės skatina regeneracinius procesus, sukeliančius inkstų audinių bei funkcijos atsistatymą ŪIP modeliuose *in vivo* [26–29]. Toks teigiamas terapinis poveikis greičiausiai pasireiškia dėl šių ląstelių antioksidacinių, priešuždegiminių ir nuo apoptozės saugančių savybių [26, 28, 30, 31].

Kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės – vienas plačiausiai tyrinėtų mezenchiminių ląstelių tipų, taikomų inkstų regeneracijos tikslais [32]. Daugelis mokslinių darbų pademonstravo šių ląstelių terapijos efektyvumą ŪIP gydymui skirtinguose gyvūnų modeliuose [33–38]. Kelios mokslininkų grupės aprašė kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių gebėjimą migruoti į pažeidimo vietą, inkorporuotis į inkstų audinius ir diferencijuoti į skirtingas inkstų ląstelių linijas [39, 40]. Tačiau naujausių tyrimų duomenys leidžia manyti, kad pagrindinis šių kamieninių ląstelių terapijos poveikis pasireiškia per parakrininį ir (ar) endokrininį kelią, išsiskiriant specifiniams augimo veiksniams [18–20]. Tikėtina, kad mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmas yra sudėtingas ir apima daugiau nei vieną galimą poveikį.

Vienas iš galimų mezenchiminių kamieninių ląstelių šaltinių yra griaučių skersaruožiai raumenys [13, 41, 42]. Nustatyta, kad suaugusio organizmo skersaruožiuose raumenyse randamos raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymi dideliu proliferacijos potencialu, geba atsinaujinti ir yra multipotentinės, t. y. gali virsti skirtingų tipų ląstelėmis ir regeneruoti įvairius audinius [43–46]. Manoma, kad audinių regeneracija iš dalies yra susijusi su šių mezenchiminių ląstelių padidintu atsparumu stresui ir parakrininiu efektu. Ląstelių išskiriami humoraliniai veiksniai sukelia organizmo kamieninių ląstelių migraciją į pažeidimo vietą, stimuliuoja angiogenezę ir reguliuoja imuninį atsaką. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių terapija taikyta įvairiuose ikiklinikiniuose modeliuose siekiant įvertinti jų poveikį tokioms būklėms kaip raumenų distrofija, širdies ligos, diabetas, osteoartritas, periferinio nervo pažeidimas [45–52]. Iki šiol nebuvo vertintas šių ląstelių terapinis poveikis ŪIP atveju. Įvertinus raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių charakteristikas ir savybes, iškelta hipotezė, kad šios ląstelės gali būti alternatyvus šaltinis kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms inkstų regeneracijos srityje.

### **Darbo tikslas**

Šio darbo tikslas – sukurti eksperimentinį ūminio inkstų pažeidimo gydymą panaudojant raumeninės kilmės kamienines pirmtakines ląsteles, įvertinti jų citokinetiką ir efektyvumą ūminio inkstų pažeidimo modelyje.

### **Darbo uždaviniai**

1. Išskirti, kultivuoti, išsamiai charakterizuoti ir palyginti raumeninės kilmės kamienines pirmtakines ląsteles ir kaulų čiulpų mezenchimines kamienines ląsteles, įvertinant kamieninių ląstelių morfologiją, proliferacijos potencialą, fenotipą, genų ekspresiją ir multipotentiškumą.
2. Įvertinti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių poveikį pažeisto inksto regeneracijai po gentamicino sukulto ūminio inkstų pažeidimo.
3. Palyginti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapinio efektyvumo skirtumus eksperimentinio ūminio inkstų pažeidimo modelyje.
4. Įvertinti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių citokinetikos ypatumus.

## Darbo aktualumas ir naujumas

Nepaisant inovacijų medicinos srityje ir gerėjančios sveikatos priežiūros visame pasaulyje, ŪIP dažnis kiekvienais metais vis auga. Tai lemia senėjanti visuomenė, didėjantis lėtinių ligų pasireiškimo dažnio augimas. Dažniausiomis ŪIP pasireiškimo priežastimis ligoninėse yra įvardijama sumažėjusi inkstų perfuzija, septinis šokas, kontrastinių medžiagų naudojimas, nefrotoksinų vaistų vartojimas, didelės chirurginės intervencijos ir kt. [5, 6, 53–55]. Nors supratimas ir žinios apie ŪIP rizikos veiksnius, ligos priežastis ir patofiziologiją plečiasi, gerėja ŪIP diagnostika, prevencijos ir gydymo galimybių vis dar trūksta [56].

Naujausi įrodymai rodo, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės naudingos inkstų regeneracijai, dėl išskiriamų parakrininių faktorių ir ekstraląstelių pūslelių į recipiento inkstų ląsteles. Dėl šių savybių jos laikomos perspektyviu ŪIP gydymo metodu [57]. Ikiklinikiniai tyrimai rodo, kad mezenchiminių kamieninių ląstelių terapija teigiamai veikia inkstų regeneraciją per įvairius mechanizmus, sukeldama priešūždegiminį, antiapoptotinį, oksidacinį stresą slopinantį, antifibrotinį, imunomoduliacinį ir proangiogeninį poveikį inkstų audiniams [58].

Vienas iš neatsakytų klausimų susijusių su mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijos taikymu ŪIP gydymui yra tinkamiausio ląstelių šaltinio pasirinkimas. Mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti išskirtos iš tokių audinių kaip kaulų čiulpai, riebalai, griaučių skersaruožiai raumenys, periosteumas, virkštelės kraujas [12–22]. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės išskirtos iš griaučių skersaruožių raumenų yra multipotentinės, pasižymi ilgai išliekančiu proliferacijos potencialu, dideliu atsinaujinimo pajėgumu ir skatina endogeninį audinių atsistatymą, išskirdamos trofinius veiksnius. Iš griaučių raumenų išskirtos ląstelės buvo panaudotos tokių audinių kaip raumenys, kaulai, kremzlės, raiščiai, periferiniai nervai, regeneracijai [43, 59–62]. Šis ląstelių tipas atitinka daugelį Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos keliamų reikalavimų multipotentinėms mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, todėl jis pasirinktas šiam tyrimui [63].

Pirmajame *in vitro* tyrimų etape siekėme išskirti, kultivuoti ir išsamiai charakterizuoti raumeninės kilmės kamienines pirmtakines ląsteles bei palyginti jas su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, atsižvelgiant į jų morfologiją, proliferacijos potencialą, paviršiaus žymenų fenotipą, genų ekspresiją ir multipotentiškumą. Kadangi kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės iki šiol buvo bene plačiausiai taikytą kamieninių ląstelių terapija ŪIP ikiklinikiniuose tyrimuose, siekėme nustatyti, ar mūsų pasirinktos raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės galėtų būti tinkama alternatyva ŪIP gydymui remiantis šių ląstelių savybėmis.

Antrajame *in vivo* tyrimų etape siekėme išsiaiškinti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių terapijos poveikį pažeisto inksto regeneracijai po gentamicino sukkelto ūminio inkstų pažeidimo. Nors iš griausių skersaruožių raumenų išskirtų kamieninių ląstelių terapija plačiai tyrinėta eksperimentiniuose tyrimuose, tačiau iki šiol raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės nebuvo panaudotos ūminio inkstų pažeidimo gydymui.

Trečiajame *in vivo* tyrimų etape norėjome palyginti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijos efektyvumo skirtumus ūminio inkstų pažeidimo modelyje, bei įvertinti ir palyginti šių ląstelių citokinetikos ypatumus.

Mūsų žiniomis, mes buvome pirmoji mokslininkų grupė įrodžiusi, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės yra alternatyvus mezenchiminių kamieninių ląstelių šaltinis ūminio inkstų pažeidimo gydymui, turintis keletą pranašumų, lyginant su kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis, įskaitant skeleto raumenų audinio gausą ir prieinamumą ląstelių išskyrimui, palyginti lengvus ląstelių izoliavimo ir padauginimo būdus ir, svarbiausia, didesnę proliferacijos greitį, leidžiantį gauti reikiamą ląstelių kiekį per trumpesnę laiką [64, 65].

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Ūminis inkstų pažeidimas

Ūminės inkstų ligos ir sutrikimai (ŪIL) apima inkstų funkcijos ir struktūros sutrikimus, trunkančius mažiau nei 3 mėnesius. ŪIP apibrėžiamas kaip ŪIL pogrupis, kuris dėl įvairių priežasčių išsivysto per septynias dienas [66]. ŪIP – tai grįžtamasis polietiologinis klinikinis sindromas, pasireiškiantis staigiu svarbiausių inkstų funkcijų sutrikimu ir charakterizuojamas padidėjusia kreatinino ir azotinių medžiagų koncentracija kraujyje bei inkstų negebėjimu reguliuoti skysčių ir elektrolitų homeostazę. Dėl hipoksinių sąlygų, didelių metabolizmo poreikių, dažno toksinių medžiagų poveikio, inkstai patiria nuolatinę padidėjusią riziką susirgti ŪIP.

Anksčiau ŪIP vadintas ūminiu inkstų nepakankamumu, tačiau po daugelio išsamių patofiziologinių tyrimų nustatyta, kad išeminiai ir hipoksiniai procesai inkstuose atsiranda gerokai anksčiau nei kraujyje padidėja kreatinino koncentracija [67]. Pasireiškus ŪIP aktyvuojama renino-angiotenzino-aldosterono sistema, inkstų simpatinė nervų sistema, kanalėlių-glomerulų atgalinis ryšys. Šie kraujotakos pokyčiai sukelia inkstų kraujagyslių susiaurėjimą ir padidina arginino vazopresino išsiskyrimą, kuris sukelia vandens susilaikymą organizme.

ŪIP yra apibūdinamas kaip ūminė kanalėlių nekrozė, inkstų funkcijos sutrikimas, metabolinių produktų kaupimasis organizme, galintis sukelti rimtas komplikacijas ir kitų gyvybiškai svarbių organų nepakankamumą [68]. Kaip minėta, dėl ŪIP sutrinka organizmo homeostazė, paros diurezė sumažėja iki mažiau nei 0,5 ml/kg/val. per bent šešias valandas. Organizme ima kauptis azotinės medžiagos, kreatinino koncentracija kraujo serume padidėja daugiau nei 1,5 karto, sutrinka vandens, elektrolitų, rūgščių ir šarmų pusiausvyra, pasireiškia ūmi ureminė intoksikacija.

2012 m. tarptautinė inkstų ligų ekspertų grupė KDIGO (angl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) paskelbė ūminio inkstų pažeidimo klasifikacijos ir gydymo gaires [69]. Gairės buvo parengtos remiantis įrodymais, gautais iki 2011 m. vasario mėn. Nuo tada atsirado naujų įrodymų, kurie turi svarbių pasekmių klinicinei ŪIP diagnostikai ir gydymo strategijoms. 2019 m. balandžio mėn. KDIGO surengė konferenciją „Ūmus inkstų pažeidimas“, kurios tikslai buvo nustatyti geriausią praktiką ir neaiškumus, susijusius su ŪIP gydymu, peržiūrėti pagrindinę aktualią literatūrą, paskelbtą nuo 2012 m. KDIGO ŪIP gairių, spręsti nuolatinis ginčytinus klausimus, nustatyti naujas temas ar problemas, kurios turi būti peržiūrėtos kitai KDIGO ŪIP gairių redakcijai ir apibūdinti tyrimus, reikalingus ŪIP valdymui tobu-

linti. Konferencijos išvados buvo publikuotos ir patikslinta ūminio inkstų pažeidimo, lėtinės inkstų ligos ir ūminių inkstų ligų klasifikacija, pateikta 1.1.1 lentelėje [66].

**1.1.1 lentelė. Ūminio inkstų pažeidimo, lėtinės inkstų ligos ir ūminės inkstų ligos klasifikacija [66]**

Būklė	Funkciniai kriterijai	Struktūriniai kriterijai
Norma	Glomerulų filtracijos greitis $\geq 60$ ml/min. $1,73 \text{ m}^2$ , stabilus kreatinino kiekis kraujyje be ŪIP, LIL ar ŪIL	Jokių kriterijų
Ūminis inkstų pažeidimas	Kreatinino padidėjimas kraujo serume $\geq 50$ proc. per 7 dienas <i>ARBA</i> Kreatinino padidėjimas kraujo serume $\geq 0,3$ mg/dl ( $\geq 26,5$ $\mu\text{mol/l}$ ) per 48 valandas, <i>ARBA</i> Oligurija	Jokių kriterijų
Ūminė inkstų liga	Ūminis inkstų pažeidimas <i>ARBA</i> Glomerulų filtracijos greitis $< 60$ ml/min. $1,73 \text{ m}^2$ $< 3$ mėn. <i>ARBA</i> Glomerulų filtracijos greičio sumažėjimas $\geq 35$ proc. arba kreatinino padidėjimas kraujo serume $> 50$ proc., kai $< 3$ mėn.	Inkstų pažeidimas $< 3$ mėn.
Lėtinė inkstų liga	Glomerulų filtracijos greitis $< 60$ ml/min. $1,73 \text{ m}^2$ $> 3$ mėn.	Inkstų pažeidimas $> 3$ mėn.

Literatūroje ŪIP apibrėžimas būna grindžiamas arba anksčiau apibrėžtais rizikos, inkstų pažeidimo, nepakankamumo, praradimo, galutinės stadijos inkstų ligos kriterijais (angl. *RIFLE – Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, and End-stage kidney disease*) arba ūminio inkstų pažeidimo tinklo kriterijais (angl. *AKIN – Acute Kidney Injury Network*) [70–73].

**1.1.1. Ūminio inkstų pažeidimo epidemiologija ir rizikos veiksniai**

ŪIP yra dažnas ir grėsmingas sveikatos sutrikimas. ŪIP taip pat yra viena dažniausiai pasireiškiančių ir viena dažniausiai mirtį sukeliančių nepageidaujamų reakcijų į vaistus. ŪIP dažnai lydi sunkios širdies ir kraujagyslių, kvėpavimo, virškinimo, nervų sistemos komplikacijos, infekcijos. Literatūros duomenimis visuomenėje įgytas ŪIP pasireiškia 1–3 proc. bendrosios populiacijos [74, 75], ligoninėje įgytas ŪIP yra nustatomas 5–30 proc. hospitalizuotų pacientų [1, 74, 76]. Tuo tarpu pacientams, gydomiems intensyvios terapijos skyriuose, ŪIP dažnis yra dar didesnis, priklauso nuo šalies ir gydy-

mo įstaigos bei, kai kurių autorių duomenimis, gali sudaryti net du trečdalius intensyviosios terapijos pacientų [6, 53, 54].

ŪIP pasireiškimo atvejų skaičius visame pasaulyje auga dėl didėjančio lėtinių ligų tokių kaip diabetas ar širdies bei kraujagyslių ligos, paplitimo didėjimo, didėjančio kontrastinių medžiagų naudojimo medicinoje, ilgėjančios gyvenimo trukmės. Dažniausios ligininėse pasireiškiančio ŪIP priežastys – sumažėjusi inkstų perfuzija, septinis šokas, kontrastinių medžiagų naudojimas, nefrotoksinių vaistų vartojimas, didelės chirurginės intervencijos ir kt. [5, 6, 53–55].

ŪIP pasireiškimo dažnio didėjimas taip pat stebimas ir Lietuvoje. Remiantis Skarupskienės I. *et al.* Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligininėje Kauno klinikose atlikto tyrimo duomenimis, ŪIP pasireiškimo dažnis per 12 metų išaugo beveik keturis kartus [5]. ŪIP pasireiškimas buvo statistiškai reikšmingai didesnis tarp vyrų ir vyresnio amžiaus pacientų. Per 12 metų ligininėje diagnozuotų ŪIP atvejų beveik pusė pacientų (44 proc.) mirė, o mažiau nei dešimtadalis (8,1 proc.) liko priklausomi nuo dializės.

Mirštamumo rodikliai nuo ŪIP skirtingų autorių duomenimis gali svyruoti tarp 10 ir 65 proc. [2–8]. Kaip ir ŪIP pasireiškimo, taip ir mirštamumo rodikliai yra didesni pacientams, gydomiems intensyvios terapijos skyriuose. Remiantis ankstesnių studijų rezultatais, tokiems pacientams mirties rizika dėl ŪIP yra 3–5 kartus didesnė nei hospitalizuotiems pacientams, kuriems nereikalinga intensyvi terapija [53, 74]. Pagrindiniai mirštamumo rizikos veiksniai – septinis ir kardiogeninis šokas, trečioji ŪIP stadija, hepatorenalinis sindromas, vazopresorių skyrimas, mechaninė ventiliacija, vyresnis amžius ir kt. [5, 6, 53, 77].

### **1.1.2. Ūminis inkstų pažeidimas ir pakaitinė inkstų terapija**

ŪIP išgyvenusiems pacientams galimos baigtys yra visiškas inkstų funkcijos atsistatymas, dalinis inkstų funkcijos atsistatymas arba lėtinė inkstų liga (LIL), kuriai kontroliuoti reikalinga pakaitinė inkstų terapija (dializės ir (ar) inkstų transplantacijos). Kadangi šiuo metu nėra jokių specifinių efektyvių vaistų ar kitų priemonių ŪIP gydymui, pakaitinė inkstų terapija yra pagrindinis taikomas gydymo metodas arba palaikomoji terapija [54]. Pakaitinė inkstų terapija yra taikoma 5–15 proc. pacientų gydomų intensyviosios terapijos skyriuose, o tokių pacientų mirštamumas gali siekti 40–60 proc. [53, 78, 79]. Taip pat ši terapija yra susijusi su labai dažnu nepageidaujamų reakcijų, tokių kaip hipotenzija, hipotermija, aritmijos, anemija, trombocitopenija, pasireiškimu [80].

Nors technologijos sparčiai tobulėja ir pasiekta reikšmingų teigiamų pokyčių taikant pakaitinę inkstų terapiją kritinės būklės pacientams, kuriems



pasireiškė ŪIP, išlieka keletas svarbių neišspręstų problemų, susijusių su šia terapija. Reikalingi tolimesni tyrimai siekiant optimizuoti pakaitinės inkstų terapijos intensyvumą, parinkti tinkamiausią šios terapijos būdą (nenutrūkstama, pertraukiama, ilgalaikė mažo efektyvumo dializė) atsižvelgiant į paciento charakteristikas, tiksliai apibrėžti kriterijus, kada ją reikia pradėti ir kada nutraukti [54, 79].

Svarbu paminėti, kad dializė tik palaiko paciento gyvybines funkcijas, tačiau nepašalina inkstų nepakankamumo ir pažeidimo priežasčių. Inkstų transplantacija taip pat išsprendžia problemą tik iš dalies, kadangi pacientai operacijos laukia 2–3 metus, po operacijos yra transplanto atmetimo rizika, pacientas po transplantacijos visą gyvenimą privalo vartoti imunosupresantus. Šiuo metu pakaitinė inkstų terapija yra vienintelis gydymo pasirinkimas pacientams, sergantiems LIL, todėl ieškoma naujų būdų šiai rimtai sveikatos problemai spręsti.

## **1.2. Morfolginiai pokyčiai ir inkstų regeneraciniai procesai po ūminio inkstų pažeidimo**

ŪIP pasireiškęs dėl išeminių ir toksinių veiksnių organizme sukelia inkstų disfunkciją ir epitelinių kanalėlių ląstelių praradimą. Po inkstų pažeidimo atsiranda struktūriniai ir biocheminiai pokyčiai, kurie sukelia vazokonstrikciją, kanalėlių ląstelių atsiskyrimą ir kanalėlių obstrukciją. Morfolginiai inkstų pokyčiai, kurie atsiranda dėl inkstų pažeidimo, yra apibūdinami kaip ląstelių poliškumo ir citoskeleto vientisumo praradimas, šepetinio krašto praradimas, epitelio ląstelių barjero suirimas ir tvirtųjų jungčių sunykimas, kuris vėliau sukelia kanalėlių ląstelių apoptozę ir (arba) nekrozę [81, 82].

Inkstai pasižymi ypač didelėmis regeneracinėmis galimybėmis, kurios yra žinomos jau daugiau kaip 60 metų ir šiuo metu inkstų regeneraciją pagrinde yra siejama su inkstuose nuolat esančiomis pirmtakėmis ląstelėmis. Šios suaugusio organizmo inkstų pirmtakinės ląstelės (angl. *adult renal progenitor cells – ARPCs*) yra ypač svarbios normaliai inkstų ląstelių apykaitai ir ciklui, bei pažeisto inksto regeneraciniam procesams [83, 84].

Kitas svarbus inkstų atsistatymo po pažeidimo veiksnys yra autokriniiniai, parakrininiai ir (ar) endokriniiniai augimo veiksniai. Jie skatina inkstų ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, todėl yra būtini inkstų regeneracijai po išeminio ar toksinio pažeidimo. Inkstų kamieninės ląstelės ir augimo veiksniai, dalyvaujantys inkstų atkūrimo, toliau bus detalčiai aptarti 2.2.1 ir 2.2.2 skyriuose.

### 1.2.1. Inkstų pirmtakinių ląstelių taikymas inkstų regeneracijai eksperimentiniuose ikiklinikiniuose tyrimuose

Kaip minėta, suaugusio organizmo inkstų pirmtakinės ląstelės, yra nuolat esančios inkstų audiniuose. Tai įrodo eksperimentai *in vitro*, kurių metu suaugusio organizmo inkstų pirmtakinės ląstelės buvo sėkmingai išskirtos iš inkstų audinių [85–88]. Suaugusio organizmo inkstų pirmtakinės ląstelės, išskirtos iš skirtingų inksto segmentų pasižymi labai panašiomis bendra biologine savybių raiška. Šios pirmtakinės ląstelės yra charakterizuojamos pagal tokius žymenis kaip CD24 (karščiui atsparus antigenas), CD133 (promininas-1), transkripcijos veiksnys Pax2. Nustatyta, kad suaugusio organizmo inkstų pirmtakinės ląstelės taip pat pasižymi mezenchiminių kamieninių ląstelių žymenų tokių kaip CD29 (integrinas  $\beta$ -1), CD90 (Thy-1), CD44 (ląstelių adhezijos molekulė), CD73 (5'-nukleotidazė) raiška bei neigiama hematopoetinių kamieninių ląstelių žymenų CD34 (hematopoetinių ląstelių pirmtakių antigenas) ir CD45 (baltymų tirozino fosfatas) raiška [85, 89].

Suaugusio organizmo inkstų pirmtakinės ląstelės turi gebėjimą diferencijuotis į skirtingas ląstelių linijas, tokias kaip inkstų kanalėlių epitelio ląstelės, osteogeninės ląstelės, adipocitai, bei pasižymi gebėjimu pakeisti pažeistas audinių ląsteles [85, 89]. Nepaisant šių suaugusio organizmo inkstų pirmtakinių ląstelių savybių, jų veikimo mechanizmas inkstų regeneracijos procesuose išlieka diskutuotinas ir iki šiol nėra išsiaiškinta, ar inkstų atsistatymas vyksta dėl šių ląstelių diferenciacijos, ar teigiamas efektas pasiekiamas dėl parakrininio poveikio, kurį sukelia kamieninės ląstelės.

Eksperimentinių tyrimų rezultatai pademonstravo inkstų pirmtakinių ląstelių (angl. *renal progenitor-like cells*) ir inkstų kamieninių pirmtakinių ląstelių (angl. *renal stem/progenitor cells*) teigiamą poveikį inkstų regeneracijai [85, 90]. Kaip galimus suaugusio organizmo inkstų pirmtakinių ląstelių veikimo mechanizmus mokslininkai nurodo atsparumą apoptotiniams dirgikliams, sustiprėjusį normalių angiogenezės procesų išsaugojimą, inkorporaciją į pažeistus inksto audinius ir diferenciaciją į kanalėlių epitelio ląsteles. Šie anksčiau paminėti poveikiai lemia inksto infarkto zonos sumažėjimą, mažesnę nekrotinį pažeidimą, mažesnę audinių fibrozę bei kreatinino ir šlapalo azoto koncentracijos kraujo plazmoje mažėjimą, kas lemia ilgesnį eksperimentinių gyvūnų išgyvenamumą ir mažesnę mirštamumo dažnį po pažeidimo [85, 90].

Alternatyvus regeneracijos kelias yra kamieninių ląstelių, kilusių ne iš inkstų audinių, migracija ir inkorporacija į pažeistus audinius. Vienus iš pirmųjų įrodymų, kad atsistatymas gali būti nulemtas išorinių, t. y. ne inkstuose reziduojančių kamieninių ląstelių, publikavo Gupta S. *et al.* (2002 m.) [91]. Analogiškus rezultatus paskelbė ir kitos mokslininkų grupės [92, 93], tačiau

tiksli išorinių kamieninių ląstelių migracijos ir inkorporavimosi pažeidimo vietoje įtaka inksto regeneracijai išlieka diskutuotina [94–96].

### **1.2.2. Autokrininiai, parakrininiai ir endokrininiai augimo veiksniai**

Tarp galimų inkstų regeneracijos veikimo mechanizmų įvardijama ir padidėjusi inkstų kanalėlių trofinių veiksnių gamyba. Kaip minėta anksčiau, autokrininiai, parakrininiai ir endokrininiai augimo veiksniai skatina ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, todėl atlieka svarbų vaidmenį inkstų regeneraciniuose procesuose po išeminio ar toksinio inkstų pažeidimo. Tarp tokių citokinių, chemokinių ir mediatorių įvardijami epiderminis augimo veiksnys (angl. *epidermal growth factor* – *EGF*), hepatocitinis augimo veiksnys (angl. *hepatocyte growth factor* – *HGF*), fibroblastinis augimo veiksnys 2 (angl. *fibroblast growth factor 2* – *FGF2*), interleukinas-22 (IL-22), ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė (angl. *extracellular signal-regulated kinase*), ir kiti [97–101].

### **1.3. Mezenchiminės kamieninės ląstelės**

Mezenchiminės kamieninės ląstelės (angl. *mesenchymal stem cells* – *MSCs*), taip pat žinomos kaip mezenchiminės stromos ląstelės (angl. *mesenchymal stromal cells*) – tai ląstelių linija, kilusi iš mezodermos gemalinio sluoksnio. Šios nediferencijuotos suaugusio organizmo ląstelės pasižymi gebėjimu atsinaujinti, dideliu proliferacijos potencialu, multipotentiškumu, tai yra gebėjimu diferencijuotis į skirtingas ląstelių linijas [11, 102]. Šios multipotentinės kamieninės ląstelės yra plačiai pasklidusios visame organizme ir gali būti lengvai išskiriamos iš skirtingų audinių, tokių kaip kaulų čiulpai, riebalai, griaučių skersaruožiai raumenys, periosteumas, virkštelės kraujas [12–22].

Mezenchiminės kamieninės ląstelės geba diferencijuotis mezenchiminiu ir ne mezenchiminiu būdu ir virsti į riebalines, kremzlės, kaulo, skersaruožių griaučių ir lygiųjų raumenų, širdies raumens, inkstų, nervinio audinio ląsteles [14, 18–21, 23, 24, 103, 104]. Mezenchiminės kamieninės ląstelės yra plačiai naudojamos eksperimentiniuose tyrimuose dėl jau minėtų palankių charakteristikų (sąlyginai lengvas išskyrimas, multipotentiškumas, didelis proliferacijos potencialas ir kt.), galimybės panaudoti jas taikant tiek autologinę, tiek alogeninę kamieninių ląstelių terapiją bei daug žadančių atradimų regeneracinėje medicinoje.

### **1.3.1. Mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmas regeneraciniuose procesuose po ūminio inkstų pažeidimo**

Daugelis anksčiau publikuotų mokslinių tyrimų pademonstravo, kad mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmas, dėl kurio pasiekiamas funkcinis ir morfologinis inkstų atsistatymas po pažeidimo, apima apsaugą nuo ląstelių apoptozės, padidėjusią augimo veiksmų gamybą, oksidacinio streso ir uždegiminių procesų slopinimą [28, 30, 31, 33, 34, 37, 105–109]. Nustatyta, kad inkstų kanalėlių ląstelių proliferacijos padidėjimas yra veikiamas per endokrininį ir (ar) parakrininį kelią, dalyvaujant inksto pirmakėms ląstelėms. Taip pat endokrininiu ir (ar) parakrininiu keliu gali vykti esamų diferencijuotų inkstų audinių ląstelių dediferenciacija, proliferacija ir rediferenciacija [110].

Skirtingos mokslininkų grupės taip pat pademonstravo, kad galima tiesioginė mezenchiminių kamieninių ląstelių inkorporacija į pažeistus inksto audinius ir diferenciacija į inkstų ląsteles [35, 110]. Tačiau svarbu paminėti, kad nustatytas diferencijavusių ląstelių skaičius inksto audiniuose buvo gana mažas, dėl to iki šiol diskutuojama, ar tiesioginis inkorporavimasis į inkstą ir diferenciacija į specifines inksto ląsteles gali būti laikomas pagrindiniu mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmu.

Tikėtina, kad mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmas yra sudėtingas ir apima kelis poveikio mechanizmus. Westenfelder C. ir Tögel F. E. detaliai aprašė šį procesą. Mezenchiminės kamieninės ląstelės migruoja ir prasiskverbia į inksto audinį, patenka į inksto pažeidimo vietą ir laikinai prisitvirtina prie glomerulų ir prie iš glomerulų išeinančių kapiliarų. Sekretuojami augimo veiksniai ir citokinai patenka į pažeistus proksimalinius inkstų kanalėlius vykstant filtracijai per glomerulų pamatinę membraną. Šie augimo veiksniai taip pat patenka į iš glomerulų išeinančius kapiliarus ir pasiekia proksimalinių inkstų kanalėlių ląsteles iš bazolateralinės pusės. Gyvybingose kanalėlių ląstelėse aktyvuojama augimo veiksmų receptorių raiška. Prikibusios mezenchiminės kamieninės ląstelės veikia per parakrininį mechanizmą, jų taikinyis yra glomerulų, smulkiųjų kraujagyslių endotelio ir uždegiminės ląstelės. Ryšiai tarp mezenchiminių kamieninių ląstelių ir gretimų inkstų ląstelių bei uždegiminių ląstelių sukelia teigiamus genų ekspresijos pokyčius, kurie slopina ląstelių apoptozę ir uždegiminius procesus [111].

### **1.3.2. Mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui ikiklinikiniuose tyrimuose**

Kaip aptarta anksčiau, ŪIP pasireiškimas sukelia didelį pavojų žmogaus gyvybinėms funkcijoms ir gali baigtis mirtimi ar proceso perėjimu į LIL, todėl nuolat ieškoma naujų, inovatyvių būdų ir metodų ŪIP gydymui ir LIL

prevencijai. Per pastaruosius dešimtmečius, vis didėjantis mokslininkų dėmesys tenka kamieninių ląstelių terapijai, kuri galėtų tapti efektyvia ŪIP gydymo strategija.

Mezenchiminės kamieninės ląstelės yra vienas labiausiai tyrinėjamų ląstelių tipų, kaip potenciali terapija ŪIP gydymui eksperimentinėse studijose *in vivo*. Toks didelis susidomėjimas mezenchiminių ląstelių linijomis gali būti paaiškinamas tuo, kad kaip ir inkstai, jos yra kilę iš mezodermos gemalinio lapelio.

Ankstesni tyrimai pademonstravo iš kaulų čiulpų [26–28, 33–37], riebalų [29, 105–107, 112–115] ir virkštelės kraujyje [108, 109, 116–119] išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių efektyvumą ŪIP gydymui įvairiuose eksperimentinių gyvūnų modeliuose *in vivo*. ŪIP buvo sukeltas naudojant nefrotoksikantus, tokius kaip gentamicinas, cisplatina, folio rūgštis, taip pat taikant išemijos-reperfuzijos, rabdomiolizės, nudegimo ar sepsio sukeltus ŪIP modelius. 1.3.2.1 lentelėje pateikiama šių eksperimentinių tyrimų apžvalga.

**1.3.2.1 lentelė. Mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui skirtinguose gyvūnų modeliuose**

Modelis	Gyvūnų rūšis/linija	Siūlomas veikimo mechanizmas	Šaltinis
<b><i>Kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės</i></b>			
Gentamicino sukeltas ŪIP	Wistar žiurkės	Parakrininis poveikis greičiausiai pasireiškiantis per RNR, kurias perneša mikrovėzikulės	Reis LA <i>et al.</i> , 2012 [33]
Cisplatinos sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Ląstelių apoptozės inhibavimas	Qi S <i>et al.</i> , 2013 [34]
Išemijos-reperfuzijos sukeltas ŪIP	Albino žiurkės	Migracija į pažeistą audinį ir diferenciacija	Sadek EM <i>et al.</i> , 2013 [35]
Rabdomiolizės sukeltas ŪIP	C57BL/6 pelės	Parakrininis apsauginis poveikis, sumažėjusi su uždegimu susijusių molekulių raiška	Ni W <i>et al.</i> , 2021 [37]
Sepsio sukeltas ŪIP	C57BL/6 pelės	Apsauginis poveikis per Gal-9/Tim-3 parakrininį kelią	Luo C <i>et al.</i> , 2023 [36]
Sepsio sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Mitofagijos skatinimas, apoptozės ir piroptozės slopinimas	Guo J <i>et al.</i> , 2021 [38]

### 1.3.2.1 lentelės tęsinys

Modelis	Gyvūnų rūšis/linija	Siūlomas veikimo mechanizmas	Šaltinis
<b><i>Riebalinės kilmės mezenchiminės kamieninės ląstelės</i></b>			
Cisplatinos sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Antiapoptotinis poveikis	Yao W <i>et al.</i> , 2015 [112]
Folio rūgštis sukeltas ŪIP	FVB pelės	Uždegimo moduliavimas ir ląstelių ciklo reguliavimas	Burgos-Silva M <i>et al.</i> , 2015 [105]
Cisplatinos sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Oksidacinio streso ir uždegiminių reakcijų supresija	Chen YT <i>et al.</i> , 2011 [106]
Cisplatinos sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Parakrininis apsauginis poveikis, antiapoptotinis poveikis, sumažėjusi su uždegimu susijusių molekulių raiška	Kim JH <i>et al.</i> , 2012 [107]
Išemijos-reperfuzijos sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Inkstų ląstelių apoptozės slopinimas, uždegiminių reakcijų supresija	Zhang JB <i>et al.</i> , 2017 [115]
Išemijos-reperfuzijos sukeltas ŪIP	Sprague-Dawley žiurkės	Oksidacinio streso ir uždegiminių reakcijų supresija	Sheashaa H <i>et al.</i> , 2016 [120]
<b><i>Virkštelės kraujo mezenchiminės kamieninės ląstelės</i></b>			
Išemijos-reperfuzijos sukeltas ŪIP	C57BL/6 pelės	Humoralinis poveikis, padidėjusi VEGF sekrecija	Jang HR <i>et al.</i> , 2014 [108]
Nudegimo sukeltas ŪIP	Žiurkės	Inkstų ląstelių apoptozės slopinimas	Lu G <i>et al.</i> , 2013 [109]
Cisplatinos sukeltas ŪIP	Imunodeficitinės NOD/SCID pelės	Pažeistų inkstų kanalėlių ląstelių metabolinis perprogramavimas	Perico L <i>et al.</i> , 2017 [117]
Išemijos-reperfuzijos sukeltas ŪIP	Wistar žiurkės	Oksidacinio streso supresija	Fahmy SR <i>et al.</i> , 2017 [118]

Kai kurios studijos nepatvirtino teigiamo mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikio inkstų regeneracijai po ŪIP [110, 121]. Šie prieštaringi duomenys nėra netikėti, kadangi tokie rezultatai galėjo būti gauti dėl netikslaus ląstelių kultūros identifikavimo, charakterizavimo ar netinkamos dozės parinkimo.

### 1.3.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui klinikiniuose tyrimuose

Nepaisant ikiklinikinių tyrimų metu gautų tvirtų įrodymų dėl mezenchiminių kamieninių ląstelių terapinio poveikio gydant ŪIP, iki šiol yra atliekami ar jau atlikta nedaug I ir II fazės klinikinių tyrimų [122–124]. *ClinicalTrials.gov* duomenų bazėje šiuo metu registruoti šeši klinikiniai tyrimai. Šie klinikiniai tyrimai yra orientuoti į ŪIP gydymą ir daugiausia dėmesio skiria kamieninių ląstelių terapijos saugumui ir veiksmingumui įvertinti po širdies operacijų, vėžiu ir COVID-19 sergantiems pacientams bei asmenims, kuriems atliekama nuolatinė pakaitinė inkstų terapija. 1.3.3.1 lentelėje pateikiama klinikinių tyrimų, vertinančių kamieninių ląstelių terapijos veiksmingumą gydant ŪIP, apžvalga.

#### 1.3.3.1 lentelė. Mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui klinikiniuose tyrimuose

Klinikinio tyrimo registracijos numeris	Tyrimo pavadinimas	Indikacija
NCT00733876	Alogeninių multipotentinių stromos ląstelių terapija ūminiam inkstų pažeidimui po širdies operacijos	Ūmi inkstų kanalėlių nekrozė
NCT01275612	Mezenchiminės kamieninės ląstelės esant cisplatinos sukeltam ūminiam inkstų nepakankamumui pacientams, sergantiems solidinių organų vėžiu	Solidinis vėžys, ŪIP
NCT01602328	Tyrimas, skirtas įvertinti AC607 saugumą ir veiksmingumą gydant inkstų pažeidimą pacientams, kuriems atlikta širdies operacija	ŪIP
NCT03015623	Ląstelių terapijos tyrimas pacientams, sergantiems ūminiu inkstų pažeidimu, kuriems taikoma nuolatinė pakaitinė inkstų terapija	ŪIP
NCT04445220	Ląstelių terapijos tyrimas COVID-19 pacientams, sergantiems ūminiu inkstų pažeidimu ir kuriems taikoma pakaitinė inkstų terapija	COVID-19, ŪIP
NCT04194671	Klinikinis mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijos tyrimas gydant sunkų ūminį inkstų pažeidimą	ŪIP

## 1.4. Raumeninės ląstelės

Griaučių skersaruožiai raumenys sudaro 40–50 proc. suaugusio žmogaus organizmo kūno masės ir yra svarbus šaltinis siekiant išskirti skirtingų tipų raumeninės kilmės ląstelių linijas. Kūdikų raumenų augimas po gimimo ir suaugusiųjų griaučių skersaruožių raumenų regeneracinis potencialas dau-

giausia siejamas su satelitinėmis ląstelėmis, dar kitaip vadinamomis raumeninėmis ląstelėmis arba raumenų pirmtakinėmis ląstelėmis [125–127].

Raumeniniame audinyje esančios šios ląstelės pasižymi multipotentiškumu ir geba diferencijuotis į skirtingas ląstelių linijas, tačiau jų paviršiaus žymenų fenotipas rodo ribotą diferenciaciją bei priklausomybę raumenų ląstelių linijai. Svarbu paminėti, kad be satelitinių ląstelių, kelios kitos kamieninių ląstelių linijos pasižymėjo miogeniškumo potencialu. Tai tokios papildomos ląstelių populiacijos, tokios kaip raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės ir mezangioblastai [128, 129].

Kitas raumeninėms ląstelėms artimas tipas – pericitai. Tai miogeniniai prekursoriai, kurie skiriasi nuo satelitinių ląstelių, nes yra glaudžiai susiję su raumenų kapiliarų sienelėmis [130]. Nepaisant daugelio skirtingų raumeninių ląstelių populiacijų, jų taikymas ŪIP gydymui labai ribotas – iki šiol jis minimas tik viename moksliniame straipsnyje [121].

#### **1.4.1. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės**

Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės (angl. *skeletal muscle-derived stem/progenitor cells – MDSPCs*) yra mezenchiminių kamieninių ląstelių linija, galbūt kilusi iš satelitinių raumenų ląstelių [59, 60]. Šios ląstelės yra multipotentinės, pasižymi ilgai išliekančiu proliferacijos potencialu, dideliu atsinaujinimo pajėgumu ir sukelia endogeninį audinių atsistatymą išskirdamos trofinius veiksnius [43, 59–61]. Šis ląstelių tipas atitinka daugelį Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos (angl. *International Society for Cellular Therapy*) kriterijų, skirtų multipotentinėms mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms [63]. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymi CD90 teigiama raiška ir mažesne nei 1 proc. CD45 ir CD34 raiška, geba diferencijuoti osteogenine, chondrogenine ir adipogenine kryptimis.

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių gebėjimas atstatyti ir regeneruoti daugelį skirtingų audinių po pažeidimo ar audinius pažeidžiančių ligų buvo įrodytas ikiklinikiniais tyrimais. Iš griaučių raumenų išskirtos ląstelės, įskaitant raumeninės kilmės kamienines pirmtakines ląsteles, buvo panaudotos skirtingų audinių, tokių kaip raumenys, kaulai, kremzlės, raiščiai, periferiniai nervai, regeneracijai, bei ieškant inovatyvių gydymo būdų tokioms ligoms kaip įvairios raumenų distrofijos, su amžiumi susijusios degeneracinės būklės, stazinis širdies nepakankamumas, šlapimo pūslės disfunkcija [43, 59–62].



Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės taip pat buvo panaudotos kaip genų nešikliai tokiems augimo veiksniams kaip BMP2, BMP4, VEGF [62]. Svarbu paminėti ir tai, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės dalyvauja audinių regeneracijoje ne tik per diferenciaciją į specifinių ląstelių tipus. Nustatyta, kad ši ląstelių populiacija skatina endogeninių audinių atsistatymą per parakrininį mechanizmą, išskirdama angiotrofinius, neurotrofinius ir kitus augimo veiksnius [61].

#### **1.4.2. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimas**

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimui naudojamos įvairios metodikos, pagrįstos ląstelių adhezijos, proliferacijos bei paviršiaus žymenų profilio skirtumais. Šie metodai apima gradientų frakcionavimą, serijinį kultūrų persėjimą, užšaldymo-atšildymo metodą, magnetinį rūšiavimą ir fluorescencinės aktyviosios ląstelių rūšiavimo technologiją (angl. *fluorescence-activated cell sorting* – FACS).

Šiuo metu vienas dažniausiai naudojamų ir tiksliausių raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimo būdų – M. Lavasani *et al.* sukurta metodika (angl. *pre-plate technique*) [13]. Šis išskyrimo metodas leidžia atskirti skirtingas raumeninių ląstelių populiacijas pagal jų adhezijos skirtumus. Paskutinę, šeštąją išskyrimo metu gautą frakciją sudaro lėtai prie I tipo kolagenu dengto paviršiaus prisitvirtinančios ląstelės, vadinamos raumeninės kilmės kamieninėmis pirmtakinėmis ląstelėmis. Ši metodika buvo naudojama ląstelių išskyrimui šiame darbe, o detaliau aptarta 3.2.1 skyriuje.

#### **1.4.3. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių privalumai ir jų taikymo galimybės**

Kaip minėta anksčiau, suaugusio organizmo kamieninės ląstelės buvo sėkmingai išskirtos iš tokių audinių kaip kaulų čiulpai, raumenys, riebalai, oda, bei kiti audiniai [12–22]. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymi keliais privalumais palyginti su kitomis suaugusio organizmo kamieninėmis ląstelėmis. Visų pirma, griaučių raumenų biopsija yra pakankamai nesudėtinga procedūra, palyginti su, pavyzdžiui, kaulų čiulpų biopsija. Nedidelis biopsijos mėginys gali užtikrinti pakankamą ląstelių skaičių gydymui [61]. Funkcionuojančios raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės gali būti dauginamos tik *ex vivo* [43]. Ši savybė sumažina reikalingą raumens biopsijos kiekį ir suteikia galimybę taikyti pacientui ląstelių terapiją pakartotinai, be poreikio pakartotinai atlikti biopsiją.

Taip pat svarbu paminėti, kad iš vyresnių organizmų išskirtos raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, nepaisant sumažėjusio jų regeneracinio potencialo, gali būti atnaujintos ir veikti panašiai kaip iš jaunų organizmų išskirtos ląstelės [131]. Tai reiškia, kad net vyresnio amžiaus pacientai galėtų būti tinkamais kandidatais autologinei kamieninių ląstelių terapijai.

## 2. METODIKA

### 2.1. Tyrimų etika ir laboratoriniai gyvūnai

Ekspertimentai su laboratoriniais gyvūnais atlikti vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymu (Žin., 1997, Nr. 108-2728; 2012, Nr. 122-6126), Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (Žin., 2007, Nr. 49-1883, Nr. 49-1884) bei „Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais“ patvirtintais 2012 m. spalio 31 d. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymu Nr. B1-866.

Prieš atliekant tyrimus, Vilniaus universitete Gamtos mokslų fakultete Biochemijos institute išklaustyta Neurobiologijos magistro studijų programos kursas „Laboratorinių gyvūnų mokslas“. Įgytas FELASA reikalavimus atitinkantis C kategorijos pažymėjimas darbui su laboratoriniais gyvūnais (pažymėjimo Nr. 237, išduotas 2013 m. vasario 7 d.). Tyrimų procedūroms atlikti gauti Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimai (leidimo Nr. 0191 ir Nr. G2-21).

Tyrimams atlikti pasirinktos *Wistar* veislės žiurkės. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimui naudoti 2–3 savaičių amžiaus žiurkių patinėliai, kurių svoris buvo 20–40 g. Ekspertimentams *in vivo* naudotos 8–12 savaičių amžiaus žiurkių patelės, kurių svoris buvo 150–250 g.

### 2.2. Kamieninių ląstelių išskyrimas

#### 2.2.1. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimas

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių išskyrimas atliktas naudojant M. Lavasani metodiką [13]. Žiurkės naujagimiui buvo atliekama eutanazija kaklo slankstelių dislokacija, paimami dvigalvio (lot. *musculus gastrocnemius*) ir plekšninio (lot. *musculus soleus*) raumenų audinio gabalėliai iš abiejų užpakalinių galūnių, ir perkeliama į sterilų mėgintuvėlį, pripildytą Hanco buferinio druskos tirpalu (angl. *Hank's Buffered Salt Solution*; HBSS; Invitrogen).

Laminare (Esco LA2-4A1, Esco, Jungtinė Karalystė) audinio bioptatai buvo perkeliama į Petri lėkštelę ir mechaniškai smulkinama steriliais įrankiais. Susmulkinta raumenų masė buvo perplaunama HBSS tirpalu tris kartus.

Susmulkintas raumuo buvo perkeliamas į mėgintuvėlį ir centrifuguojamas  $930 \times g$ ,  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, 5 min. (centrifuga Eppendorf 5702R, Eppendorf AG, Vokietija). Po centrifugavimo HBSS tirpalas buvo nusiurbiamas, ląstelės resuspenduojamos HBSS tirpalu ir dar kartą centrifuguojamos. Po trijų praplovimų, ląstelės buvo atskiriamos fermentais.

Fermentinis virškinimas buvo pradedamas 0,2 proc. XI tipo kolagenazės tirpalu (Sigma-Aldrich), inkubuojama 60 min., po to 2,4 U/ml dispazės tirpalu (Invitrogen), inkubuojama 45 min., galiausiai 0,1 proc. tripsino-EDTA tirpalu (Invitrogen), inkubuojama 30 min. Po kiekvieno inkubacijos periodo ląstelių suspensija buvo centrifuguojama  $2630 \times g$  5 min., kambario temperatūroje, nusiurbiamas fermento tirpalas, užpilamas kitas fermentas ir resuspenduojama. Ląstelės inkubuotos  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, aplinkos dujų sudėtis – 5 proc.  $\text{CO}_2$  ir 95 proc. oro ( $\text{CO}_2$  inkubatorius Esco, CCL-170B-8, Esco, Jungtinė Karalystė).

Po fermentinio virškinimo ląstelių suspensija buvo filtruojama pro sterilų  $70\text{ }\mu\text{m}$  dydžio porų filtrą (Becton Dickinson) ir persėjama į pirmąjį flakoną (žymima pp1), dengtą I tipo veršelio odos kolagenu (Sigma-Aldrich). Ląstelių kultūra pp1 inkubuota 2 val., supernatantas su neprikibusiomis ląstelėmis persėjamas į kitą flakoną (žymima pp2) ir inkubuojamas 18 val. Pastaroji procedūra kartota kas 24 val., kol gauta pp6 ląstelių kultūra. Išskirtą pp6 ląstelių kultūrą sudaro lėčiausiai prikimbančios raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės.

Ląstelių proliferacijai buvo naudojama Dulbecco modifikuota Eagle terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; DMEM; Invitrogen) su dideliu gliukozės kiekiu ( $4500\text{ mg/l}$ ), praturtinta 10 proc. fetalinio jaučio serumu (angl. *Fetal Bovine Serum*; FBS; Invitrogen), 10 proc. arklio serumu (angl. *Horse Serum*; HS; Invitrogen), 1 proc. antibiotikų tirpalu sudarytu iš  $100\text{ U/ml}$  penicilino ir  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  streptomicino (Invitrogen) ir 0,5 proc. viščiuko embriono ekstraktu (angl. *Chick Embryo Extract*; CEE; Accurate Chemical Co.).

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių pp6 kultūra auginta 9–12 dienų, terpė buvo keičiama kas 2–3 dienas. Ląstelių susiliejimui (angl. *confluence*) pasiekus 40–50 proc., ląstelės buvo inkubuojamos 2 ml 0,25 proc. tripsino-EDTA tirpalu 2 min. kambario temperatūroje ir padalijamos į du naujus flakonus, siekiant nuolat palaikyti reikiamą ląstelių tankį. Terpė buvo keičiama kas 3 dienas. Pasiekus reikiamą ląstelių skaičių, ląstelės buvo užšaldomos po 1 mln. HBSS ir dimetilsulfoksido tirpale santykiu 1:10 ir laikomos  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

### 2.2.2. Kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas

Kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių (angl. *bone marrow mesenchymal stem cells – BM-MSCs*) išskyrimas buvo atliekamas pagal M. Soleimani metodiką [16]. Po žiurkės patinėlio eutanazijos kaklo slankstelių dislokacija buvo atliekamas pjūvis aplink užpakalines galūnes, oda nuimama traukiant link pėdos ir nupjaunama ties čiurna. Tuomet atsargiai nupjaunamos užpakalinės galūnės, kad nebūtų pažeistas šlaunikaulis ir neatvertos kaulų čiulpų ertmės. Galūnės patalpinamos į DMEM terpę praturtintą 1 proc. antibiotikų tirpalu (100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino).

Laminare nuo galūnių kaulų pašalinami raumenys ir jungiamasis audinys. Blauzdikaulių ir šlaunikaulių galai buvo nukerpami prie kaulų čiulpų ertmės galo. Kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo surenkamos naudojant 27G adatą, pritvirtintą prie 10 ml švirkšto, pripildyto DMEM terpės, praturtintos 15 proc. FBS tirpalu, 2 mg L-glutamino, 1 proc. antibiotikų tirpalu (100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) bei 3,7 mg/l NaHCO<sub>3</sub>. Tuomet kaulo galas buvo nukreipiamas į Petri lėkštelę, o terpė perleidžiama per kaulų čiulpų ertmes. Procedūra kartojama iš abiejų kaulo galų tol, kol kaulų čiulpų ertmėje nebelieka rausvos spalvos.

Ląstelių suspensija buvo filtruojama pro 70 µm dydžio porų filtrą. Kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo sėjamos į nedengtus flakonus, užtikrinant  $2,5 \times 10^8$  ląstelių/ml tankį. Ląstelės buvo inkubuojamos 37 °C temperatūroje, aplinkos dujų sudėtis – 5 proc. CO<sub>2</sub> ir 95 proc. oro. Ląstelių kultūra buvo inkubuojama 18 val. Terpė su neprikibusiomis ląstelėmis buvo nusiurbama, tada užpilama 1,5 ml šviežios terpės ir inkubuojama 8 val. Pastaroji procedūra buvo kartojama kas 8 val., 72 valandų laikotarpiu. Gautą kultūrą sudaro kaulų čiulpų kilmės mezenchiminės kamieninės ląstelės.

Kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių kultūra buvo perplauinama fosfatiniu buferiniu tirpalu (angl. *Phosphate Buffered Saline; PBS; Sigma-Aldrich*), terpė keičiama kas 3–4 dienas. Po 2 savaičių kultūra buvo perplauinama PBS tirpalu, o ląstelės inkubuojamos 2 ml 0,25 proc. tripsino-EDTA tirpalu 2 min. kambario temperatūroje, tada padalijamos į 2 naujus flakonus, siekiant palaikyti reikiamą tankį. Terpė keičiama kas 3 dienas. Paprastai ląstelių pasažas atliekamas kas 7 dienas. Pasiekus reikiamą ląstelių skaičių, ląstelės buvo užšaldomos po 1 mln. HBSS ir dimetilsulfoksido tirpalų terpėje (santykiu 1:10) ir laikomos –80 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

## 2.3. Kamieninių ląstelių charakterizavimas

### 2.3.1. Populiacijos padvigubėjimo laiko vertinimas

Populiacijos padvigubėjimo laikas – tai ląstelių kultūros parametras, rodantis, per kiek laiko ląstelių populiacija padvigubėja. Šis parametras svarbus tiek eksperimentiniu, tiek klinikiu požiūriu, nes leidžia įvertinti ląstelių kultūros proliferacijos potencialą ir prognozuoti laiką, per kurį bus pasiektas reikiamas ląstelių skaičius. Siekiant įvertinti bei palyginti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių bei kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių proliferaciją *in vitro*, atlikti populiacijos padvigubėjimo laiko tyrimai.

Abiejų tipų ląstelės buvo pasėtos į šešių šulinėlių lėkšteles, kai ląstelių tankis buvo  $9,5 \times 10^4$  ląstelių/šulinėlyje ( $10^4$  ląstelių/cm<sup>2</sup>). Kiekvienos ląstelių kultūros ląstelės buvo tiriamos triguba kontrole, t. y. vienu metu tiriant po tris šulinėlius kiekvienai ląstelių kultūrai. Ląstelių skaičiaus nustatymas buvo atliekamas šešis kartus (3–8 pasažai) 72 val. intervalais, apskaičiuojant trijų mėginių vidurkį. Ląstelės buvo skaičiuojamos naudojant rankinį Neubauerio hemocitometrą (Neubauer improved, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Vokietija). Populiacijos padvigubėjimo laiko apskaičiavimas atliktas remiantis toliau pateiktomis formulėmis [132]:

$$PDT = \frac{CT}{PDN} \qquad PDN = \frac{\log N}{N_0 \times 3,31}$$

kur: CT – ląstelių kultivavimo laikas tarp pasažų;

PDN – populiacijos padvigubėjimų skaičius;

N – ląstelių skaičius kultivavimo periodo pabaigoje;

N<sub>0</sub> – ląstelių skaičius kultivavimo periodo pradžioje.

### 2.3.2. Ląstelių charakterizavimas imunofluorescencijos metodu

Ląstelių charakterizavimas imunofluorescencijos metodu atliktas remiantis G. Li publikuota metodika [133]. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės ir kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo tiriamos 4–5 pasažuose, siekiant įvertinti CD34, CD45, CD90, c-kit ir Desmin žymenų raišką. Tirtos trijų skirtingų ląstelių išskyrimų populiacijos, siekiant patikrinti procedūros atkuriamumą ir populiacijų fenotipo vienodumą.

Visi antikūnai naudoti imunofluorescenciniam dažymui įsigyti iš gamintojo Abcam, išskyrus žymenį Desmin, kuris įsigytas iš Sigma-Aldrich. Abiejų tipų ląstelės buvo sėjamos į 24 šulinėlių lėkšteles, esant ląstelių tankiui  $5 \times 10^4$  ląstelių/šulinėlyje. Prieš dažymą, ląstelės buvo fiksuojamos 15 min. kambario temperatūroje, naudojant 2 proc. formaldehido tirpalą (Sigma-Aldrich; 10 proc. formalino tirpalas, praskiestas PBS tirpalu). Po fiksavimo ląstelės blokuoja-

mos 10 proc. arklio serumu arba 10 proc. ožkos serumu 60 min. siekiant padidinti ląstelių membranos laidumą ir užblokuoti nespecifines baltymų sąveikas.

Pirminių ir antrinių antikūnų koncentracija inkubacijai parinkta pagal gamintojo rekomendacijas. Po blokavimo ląstelės buvo inkubuojamos su pirminiais antikūnais PBS tirpale ir paliekamos 4 °C temperatūroje per naktį. Inkubacija antriniu antikūnu truko 60 min. kambario temperatūroje. Po antrinės inkubacijos žymenims CD34, c-kit ir Desmin žymenims atlikta inkubacija Strepatvidin-Cy3 (Sigma-Aldrich) santykiu 1:400 PBS tirpale 15 min. kambario temperatūroje. Ląstelių branduoliai buvo dažomi 4,6-diamidino-2-fenilindolo dihidrochlorido hidratu (DAPI; Sigma-Aldrich) 1:10000 PBS tirpale 10 min. kambario temperatūroje. Po kiekvieno žingsnio ląstelės buvo plaunamos PBS tirpalu. Nudažius ląstelių kultūras, jos buvo tiriamos invertiniu fluorescentiniu mikroskopu (Olympus IX73, Olympus, Japonija).

### **2.3.3. Ląstelių charakterizavimas tėkmės citometrijos metodu**

Imunofenotipavimas tėkmės citometrijos metodu buvo atliekamas pagal F. C. Lewis aprašytą metodiką [134]. Naudoti CD34, CD45, CD90, c-kit (CD117) antikūnių tirpalai, praskiesti santykiu 1:10. Kaip ir imunofluorescencijos tyrimuose, tirtos trijų skirtingų ląstelių išskyrimų populiacijos.

Visų antikūnų inkubavimas atliktas naudojant terpę sudarytą iš 0,5 proc. jaučio serumo albumino (angl. *Bovine Serum Albumin*; BSA; Sigma-Aldrich), 0,4 proc. EDTA-PBS be  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Mg}^{2+}$ . Prieš antikūnių inkubaciją, ląstelės blokuojamos 10 proc. asilo serumu (angl. *Donkey Serum*; Santa Cruz Biotech), 15 min. 4 °C temperatūroje. Antikūnai buvo konjuguoti FITC (angl. *anti-fluorescein isothiocyanate*) arba PE (angl. *anti-phycoerythrin*), o nežymėti antikūnai aptinkami naudojant atitinkamą FITC arba PE konjuguotą antrinį antikūnį. Visų antikūnų inkubacija buvo atliekama 15 min. 4 °C temperatūroje, po to tris kartus plaunama inkubavimo terpe. Kiekvienam antikūnui buvo naudojama atitinkama izotipo kontrolė. Analizė atlikta naudojant *FACSCalibur* tėkmės citometrą (BD Biosciences, Singapūras) ir *CellQuest* programinę įrangą (BD Biosciences).

### **2.3.4. Ląstelių charakterizavimas realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu**

Ląstelių charakterizavimas realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos (angl. *real-time polymerase chain reaction*; RT-PCR) metodu buvo atliekamas siekiant nustatyti OCT4, SOX2 ir NANOG genų raišką. Iš kamieninių ląstelių buvo išskiriama genomine DNR naudojant ISOLATE II Genomic DNA Kit rinkinį (Bioline, Jungtinė Karalystė). Eliucijai buvo naudojama

60–100 µl vandens. Paruošiamas realaus laiko PGR mišinys iš Bioline SensiMix II Probe rinkinio 2x mišinio (Bioline), pradmenų (200 nM galutinė kiekvieno pradmens koncentracija) ir zondų (100 nM galutinė kiekvieno zondo koncentracija). Vienos reakcijos galutinis tūris 15 µl.

Visos reakcijos buvo atliekamos dviem egzemplioriais (dublikatuose). Fluorescencija nuskaitoma žalios ir geltonos spalvos kanaluose. Gauti rezultatai buvo įvertinami naudojant  $2^{-ddCt}$  analizės metodą. Apskaičiuojamas santykinis žymens kiekis mėginiuose. Analizei naudoti nukleotidų sekų pradmenys pateikti 2.3.4.1 lentelėje.

**2.3.4.1 lentelė.** Nukleotidų sekų pradmenys naudoti kamieninių ląstelių charakterizavimui realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu

Genas	Nukleotido sekos pradmuo	Pradmens ilgis (bp)	Atkaitinimo temperatūra (°C)
β-Actin	5'-GCACMATGAAGATCAAGATCATTGCTCC-3' (forward)	118	60
	5'-TCRTACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3' (reverse)		
OCT4	5'-GGCCCCTGCTGGAGAAGTG-3' (forward)	120	60
	5'-CACGGTTCTCAATGCTAGTCCGC-3' (reverse)		
SOX2	5'-TCAGCGCCCTGCAGTACAAC-3' (forward)	140	60
	5'-GGCCTCGGACTTGACCACAG-3' (reverse)		
NANOG	5'-GGTTGAAGACTAGCAACGGTCTGACT-3' (forward)	81	60
	5'-AGCCCTGAGAATAGCTGCAATGG-3' (reverse)		

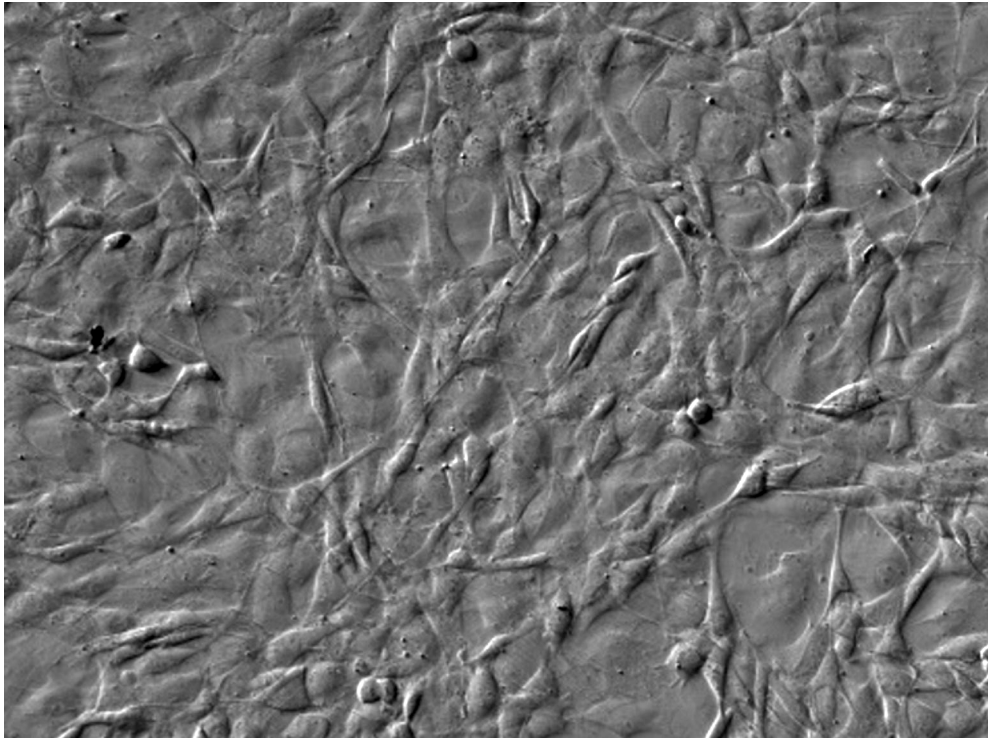
### 2.3.5. Multipotentinė diferenciacija

Siekiant įrodyti abiejų tipų kamieninių ląstelių multipotentiškumą, t. y. gebėjimą diferencijuotis į skirtingų tipų ląsteles buvo atliekami ląstelių diferenciacijos tyrimai. MDSPC ir BM-MSC ląstelėms in vitro buvo taikoma miogeninė, adipogeninė, chondrogeninė ir osteogeninė diferenciacija pagal X. Gao aprašytą metodiką [135].

Miogeninei diferenciacijai  $6 \times 10^4$  ląstelių buvo sėjama į 12 šulinėlių lėkšteles, dengtas kolagenu, ir paliekama 24 val. kol pasiekiamas 100 proc. ląstelių susilieėjimas (2.3.5.1 pav.). Naudojama terpė, į kurią įeina DMEM tirpalas su dideliu gliukozės kiekiu, praturtintas 2 proc. FBS tirpalo ir 1 proc. penicilino/streptomicino tirpalo. Terpė keičiama 2–3 kartus per savaitę, ląste-



lės stebimos 2 savaites. Miogeninė diferenciacija patvirtinama Desmino imunofluorescencija, kaip aprašyta 2.3.2 skyriuje.



2.3.5.1 pav. 100 proc. ląstelių susiliejimas

Adipogeninei diferenciacijai buvo naudojama  $2 \times 10^6$  ląstelių, kurios sėjamos į 6 šulinėlių lėkšteles ir paliekamos 24 val. kol pasiekiamas 100 proc. ląstelių susiliejimas. Naudojamas adipogeninės diferenciacijos rinkinys (hMSC Adipogenic BulletKit; Lonza). Ląstelės buvo veikiamos 3 dienas adipogeninės indukcijos terpe, po to 2 dienas adipogeninės priežiūros terpe. Toks terpių keitimo režimas buvo kartojamas 3 kartus. Adipogeninė diferenciacija patvirtinama *Oil Red O* dažymu.

Chondrogeninei diferenciacijai buvo naudotas chondrogeninės diferenciacijos rinkinys (hMSC Chondrogenic BulletKit; Lonza). Naudojama  $2,5 \times 10^5$  ląstelių, perkeltų į 15 ml mėgintuvėlius, jos centrifuguotos  $800 \times g$  5 min. Po centrifugavimo ląstelės resuspenduotos bazine chondrogenine terpe ir dar kartą centrifuguotos. Po to ląstelės resuspenduotos chondrogenine terpe, praturtinta papildais ir augimo veiksniais, ir centrifuguotos  $500 \times g$  5 min.

Po kelių dienų ląstelės atsiskiria nuo mėgintuvėlio dugno ir suformuoja 3D rutulio formos struktūrą. Diferenciacija trunka 21 dieną, terpė keičiama 3 kartus per savaitę. Po diferenciacijos susiformavusios struktūros buvo

talpinamos į NEG50 šaldymo terpę (Richard-Allan Scientific), užšaldomos – 80 °C temperatūroje (šaldytuvas 6483 GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Vokietija), ir vėliau pjaustomos 8 µm storio pjūviais šaldomuoju kriotomu. Chondrogeninė diferenciacija buvo patvirtinama *Alcian blue* dažymu.

Osteogeninei diferenciacijai buvo naudotas osteogeninės diferenciacijos rinkinys (hMSC Osteogenic BulletKit; Lonza). Naudojama  $2,5 \times 10^5$  ląstelių, perkeltų į 15 ml mėgintuvėlius, jos centrifuguotos  $800 \times g$  5 min., resuspenduotos osteogenine terpe ir vėl centrifuguotos  $500 \times g$  5 min. Diferenciacija trunka 4 savaites, terpė keičiama 3 kartus per savaitę. Po diferenciacijos susiformavusios struktūros šaldomos ir pjaustomos kaip aprašyta anksčiau. Osteogeninė diferenciacija patvirtinta *Von Kossa* dažymu.

## 2.4. Kamieninių ląstelių terapijos taikymas eksperimentiniame nefrotoksiškumo modelyje *in vivo*

### 2.4.1. Eksperimentinis nefrotoksiškumo modelis *in vivo*

Eksperimentams *in vivo* naudotos 8–12 savaičių amžiaus *Wistar* linijos žiurkių patelės, kurių pradinis svoris buvo 150–250 g. Gyvūnai buvo įsigyti iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Vivariumo. Gyvūnai eksperimento metu laikyti individualiuose metaboliniuose narvuose (Techniplast, Italija), pavaizduotuose 2.4.1.1 pav.



2.4.1.1 pav. Metaboliniai narvai, kuriuose buvo laikomi laboratoriniai gyvūnai eksperimento metu

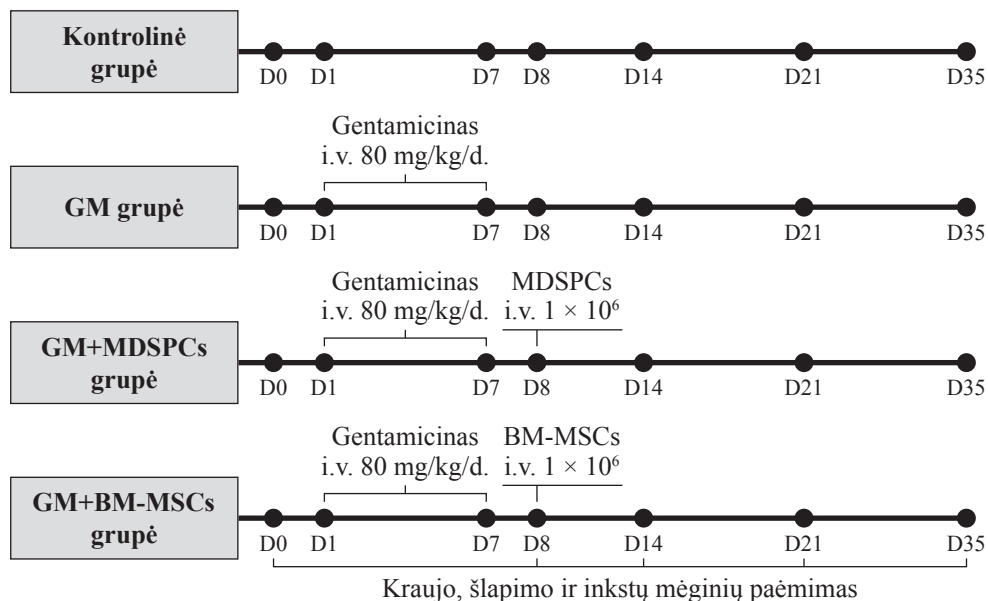
Gyvūnų laikymo patalpose buvo palaikoma pastovi temperatūra ( $24,0 \pm 1,0$  °C) ir santykinė oro drėgmė (50–55 proc.). Paros apšvietimo ciklas (šviesa/tamsa) buvo keičiamas kas 12 val. Laboratoriniai gyvūnai buvo šeriami graužikams skirtu pašaru ir nuolat gavo geriamojo vandens *ad libitum*.

Kiekvieno gyvūno kasdieniam stebėjimui buvo sudarytas protokolas, kuriame buvo fiksuojamas gyvūno identifikacijos numeris, lytis, amžius, svoris, eksperimentinė grupė, eksperimento pradžios data ir, jei taikyta, gentamicino chlorido injekcinio tirpalo tūris (ml). Adaptacijos periodas prieš eksperimentą truko 2 paras.

Prieš eksperimentus žiurkės atsitiktinai suskirstytos į keturias grupes:

1. **Kontrolinė grupė** – sveiki gyvūnai;
2. **GM grupė** – ūminio inkstų pažeidimo grupė;
3. **GM+MDSPCs grupė** – ūminio inkstų pažeidimo grupė, kuriai buvo skiriamos raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės;
4. **GM+BM-MSCs grupė** – ūminio inkstų pažeidimo grupė, kuriai buvo skiriamos kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės.

Vieno eksperimento metu į kiekvieną grupę įtraukti 6 gyvūnai. Eksperimentai kartoti 3 kartus. Reikiamos tiriamųjų imties apskaičiavimui naudoti statistiniai metodai aprašyti 3.5 skyriuje. Eksperimentinio modelio grafinė schema pateikta 2.4.1.2 pav.



2.4.1.2 pav. Eksperimentinio modelio schema

GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupių žiurkėms kasdien 7 dienas iš eilės buvo leidžiamas gentamicino chlorido injekcinis tirpalas (Gentamicin Krka, 80 mg/2 ml, 2 ml, injekcinis/infuzinis tirpalas, N10, KRKA) 80 mg/kg kūno svorio i.p. Ši dozė yra toksišė ir sukelia ŪIP. Nefrotoksikanto dozės parinkimas atliktas remiantis anksčiau atliktais eksperimentais [64, 136].

Praėjus 24 valandoms po paskutinės gentamicino injekcijos GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupių gyvūnams buvo suleista atitinkamai raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių suspensija. Žiurkėms buvo skiriamos vienkartinės kamieninių ląstelių injekcijos sisteminiu būdu į uodegos veną (lot. *vena caudalis*). Vienkartinė dozė –  $1 \times 10^6$  ląstelių/500  $\mu$ l terpės be serumo gyvūnui. Kontrolinės grupės žiurkės buvo laikomos tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamieji gyvūnai visą eksperimento laikotarpį. Joms nebuvo skiriama nei gentamicino, nei kamieninių ląstelių injekcijų.

Dozės parinkimas pagrįstas 2.4.2 skyriuje. Kraujo, šlapimo bei inkstų mėginiai buvo paimami siekiant įvertinti funkcinį ir morfologinį inkstų pažeidimą bei atsistatymą skirtingais eksperimento etapais.

#### **2.4.2. Kamieninių ląstelių dozės parinkimas**

Eksperimentinių kamieninių ląstelių terapijų dozės parinkimas atliktas remiantis literatūros duomenimis, siekiant mažinti naudojamų bandomųjų gyvūnų skaičių ir laikantis 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) principų. Terapinės eksperimentinių kamieninių ląstelių terapijų dozės ŪIP modeliuose, remiantis įvairių autorių duomenimis, svyruoja nuo  $0,5 \times 10^6$  iki  $5 \times 10^6$  ląstelių vienam gyvūnui [34, 107, 137, 138].

Išanalizavus naujausią literatūrą, nuspręsta pasirinkti vienkartinę kamieninių ląstelių dozę –  $1 \times 10^6$  ląstelių vienam gyvūnui, kuri dažniausiai naudojama ikiklinikiniuose tyrimuose. Šios dozės parinkimą nulėmė dvi pagrindinės priežastys: jos veiksmingumas anksčiau publikuotuose tyrimuose gydant ūminį inkstų pažeidimą ir optimalus ląstelių kiekis tiek jų paruošimui, tiek saugojimui ir suleidimui. Ši dozė leidžia greitai išskirti reikiamą ląstelių kiekį, patogiai šaldyti (vieną dozę viename kriomėgintuvėlyje) ir sumažina reikalingo terpės tūrio kiekį paruošimui bei injekcijai.

#### **2.4.3. Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių paruošimas injekcijoms**

Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių paruošimas injekcijoms buvo vykdomas trimis etapais. Iš pradžių ląstelės buvo suskaičiuojamos naudojant Neubauer hemocitometro kamerą, vėliau visos ląstelės buvo ženklina- mos fluorescuojančiais membraniniais PKH26 dažais ląstelių migracijai į

pažeistus inkstų audinius stebėti, kaip aptarta 3.4.9 skyriuje. Pažymėtos ląstelės buvo resuspenduotos reikiamame DMEM terpės be serumo tūryje, padalintos į dozes ( $1 \times 10^6$  ląstelių 500  $\mu$ l terpės) ir laikomos ant ledo iki suleidimo.

#### 2.4.4. Paros diurezės nustatymas

Žiurkių paros diurezė (ml/24 val.) buvo matuojama kasdien nuo 1 iki 8 eksperimento dienos, vėliau – 14, 21, 28 ir 35 dieną. Paros diurezė buvo matuojama tuo pačiu metu – 8 val. ryte, surenkant paros šlapimo mėginius ir matuojant jų tūrį graduotu matavimo cilindru.

#### 2.4.5. Kreatinino koncentracijos nustatymas ir kreatinino klirenso apskaičiavimas

Kreatinino koncentracijos nustatymas šlapime ir kraujo serume atliktas visose eksperimentinėse grupėse tuo pačiu metu (po adaptacijos, vėliau 8, 14, 21, 28, 35 dieną). Šlapimo mėginiai buvo surenkami į sterilius vienkartinius plastikinius mėgintuvėlius. Kraujo mėginiai paimti iš uodegos venos (lot. *v. caudalis*) į vienkartinius sterilius plastikinius centrifuginius mėgintuvėlius be antikoagulantų. Kraujo mėginiai centrifuguoti 10 min., esant 1000 aps./min. greičiui, siekiant išvengti hemolizės. Šlapimo ir kraujo serumo mėginiai iki pristatymo į laboratoriją buvo laikomi  $-20$  °C temperatūroje. Kreatinino koncentracijos nustatymas šlapime ir kraujo serume atliktas naudojant automatinį biocheminį analizatorių „COBAS INTEGRA 400 plus“ (Tegimenta Ltd Roche, Šveicarija).

Apskaičiuotas 24 val. endogeninio kreatinino klirensas renkant žiurkių paros šlapimą pagal formulę:

$$C_{Cr} = \frac{U_{Cr} \times V_{U/24 \text{ val.}}}{S_{Cr} \times 24 \times 60}$$

kur:  $C_{Cr}$  – kreatinino klirensas (ml/min.);

$U_{Cr}$  – kreatinino koncentracija šlapime ( $\mu$ mol/l);

$V_{U/24h}$  – šlapimo kiekis (ml/24 val.);

$S_{Cr}$  – kreatinino koncentracija kraujo serume ( $\mu$ mol/l).

#### 2.4.6. Inkstų pažeidimo žymenų KIM-1 ir NGAL nustatymas

Siekiant įvertinti inkstų pažeidimą skirtinguose eksperimento taškuose, žiurkių šlapime buvo tiriama KIM-1 ir NGAL žymenų koncentracija ELISA (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metodu. Rinkiniai reikalingi tyrimui buvo įsigyti iš Abcam. Tyrimai buvo atliekami vadovaujantis gamintojo protokolu.

Į kiekvieną 96 šulinėlių plokštelės šulinėlį buvo įpilta po 100 µl paruoštų standartų ir atskiestų mėginių, po to inkubuota 37 °C temperatūroje 90 min. Po inkubacijos šulinėliai ištuštinami vengiant išdžiūvimo. Tuomet į kiekvieną šulinėlį įpilama 100 µl KIM-1 antikūno prieš žiurkę ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 60 min. Plaunama PBS tirpalu (300 µl), po 1 min., 3 kartus. Tuomet į kiekvieną šulinėlį pridedama 100 µl Avidin-Biotin-Peroksidazės kompleksinio tirpalo ir inkubuojama 37 °C 30 min. Plaunama 300 µl PBS tirpalu po 1–2 min. 5 kartus. Plovimo tirpalas pašalinamas ir į kiekvieną šulinėlį pridedama 90 µl TMB spalvą išryškinančio reagento ir inkubuojama 37 °C 25–30 min. tamsoje. Reakcija stabdoma pridedant 100 µl TMB Stop tirpalo. Galiausiai tirpalas akimirksniu pakeičia spalvą iš mėlsvos į geltoną.

Plokštelės buvo nuskaitytos naudojant mikroplokštelių skaitytuvą „Tecan“ (Tecan Trading AG, Šveicarija), nustatant absorbciją esant 450 nm bangos ilgiui per 30 min. po reakcijos stabdymo. Duomenys apdoroti Magellan duomenų analizės programine įranga.

#### 2.4.7. Inkstų histologijos vertinimas

Laboratoriniams gyvūnams atlikta eutanazija CO<sub>2</sub> dujomis, sukeltas asfiksiją. Po laparotomijos inkstų mėginiai buvo fiksuoti 10 proc. formalino tirpalu (santykiu 1:20) ir per 24 val. pristatyti į laboratoriją. Inkstų mėginiai buvo įlieti į parafino blokus, o vėliau supjaustyti 5 µm storio pjūviais. Inkstų mėginių dažymas buvo atliktas hematoksilino ir eozino dažymo metodu.

Inkstų histologiniai pokyčiai vertinami pagal anksčiau aprašytą skalę [34, 106]. Apskaičiuojama kanalėlių ląstelių nekrozė, šepetinio krašto praradimas, kanalėlių išsiplėtimas, ląstelių infiltracija: 0, nėra; 1, ≤ 10 proc.; 2, 11–25 proc.; 3, 26–45 proc.; 4, 46–75 proc.; ir 5, > 76 proc. Vertinama 10 nepersidengiančių histologinio vaizdo laukų. Inkstų pažeidimo procentinė išraiška buvo apskaičiuojama remiantis formule:

$$\text{Inkstų pažeidimo balas (proc.)} = \frac{\text{Pažeistų kanalėlių skaičius}}{\text{Visų kanalėlių skaičius}} \times 100$$

#### 2.4.8. Inkstų apoptozės vertinimas

Po eutanazijos, dalis laboratorinių žiurkių inkstų mėginių buvo užšaldomi –80 °C temperatūroje. Apoptozei tirti inkstų audiniai buvo supjaustyti į 5 µm storio pjūvius. Apoptozė buvo vertinama TUNEL metodu (angl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling*), vadovaujantis gamintojo instrukcijomis (Molecular Probes Inc., JAV).

Iš pradžių pjūviai buvo inkubuojami 3 proc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirpale PBS 10 min., po to tris kartus plaunami PBS tirpalu (po 2 min.). Vėliau mėginiai inkubuoti TdT reakcijos buferyje 10 min., po to inkubuoti TUNEL reakcijos tirpale, kuriame buvo terminalinė deoksinukleotidilo transferazė (TdT). TdT tirpalas užlašintas ant inkstų mėginių, uždengtas dengiamuoju stikleliu ir inkubuotas drėgnoje kameroje 37 °C temperatūroje 60 min. Reakcija stabdyta specialiu buferiniu tirpalu, po to mėginiai inkubuoti 10 min. ir tris kartus plauti PBS tirpalu (po 2 min.). Tuomet inkstų mėginiai inkubuoti su Streptavidin-HRP tirpalu PBS 20 min. kambario temperatūroje, po to tris kartus plauti PBS tirpalu (po 2 min.). Galiausiai mėginiai inkubuoti DAB tirpale 1–2 min., po to plauti vandeniu. Po reakcijos mėginiai dažyti Gill hematoksilinu 30 sek., plauti vandeniu 5 min., dehidratuoti 95 proc. etanoliumi 5 min., 100 proc. etanoliumi du kartus po 5 min., skaidrinti ksilenu du kartus po 5 min.

Apoptozė inkstų audiniuose vertinta šviesinės mikroskopijos metodu. Apoptotinėmis buvo laikomos tos ląstelės, kurių branduoliai TUNEL reakcijos metu įgavo tamsiai violetinę arba juodą spalvą. TUNEL reakcijai teigiamos kanalėlių epitelio apoptotinės ląstelės inkstų žievėje buvo skaičiuojamos 10 nepersidengiančių laukų kiekviename pjūvyje (X400 didinimas). Apoptozė buvo kiekybiškai įvertinta naudojant TUNEL reakcijai teigiamų ląstelių procentinę išraišką. Visų ląstelių skaičius viename matymo lauke buvo laikomas standartu.

Procentinė apoptozės išraiška buvo apskaičiuojama remiantis šia formule:

$$\text{Apoptozė (proc.)} = \frac{\text{Apoptotinių ląstelių skaičius}}{\text{Visų ląstelių skaičius}} \times 100$$

#### **2.4.9. Ląstelių žymėjimas fluorescuojančiais membraniniais dažais PKH26 ir jų migracijos vertinimas**

Ląstelių žymėjimas fluorescuojančiais membraniniais dažais PKH26 buvo atliekamas vadovaujantis gamintojo instrukcija (Sigma-Aldrich Co. LLC. JAV). Procedūra buvo atliekama kambario temperatūroje (20–25 °C). Ląstelės buvo tris kartus plaunamos terpe be serumo, po to centrifuguojamos (400 × g, 5 min.), supernatantas atsargiai pašalinamas, paliekant ne daugiau kaip 25 μl. Po to, ląstelės resuspenduojamos reikiamu tūriu Diluent C, įpilama šviežiai paruoštų PKH26 dažų, pipetuojant gerai sumaišoma ir inkubuojama 1–5 min. Dažymas nutraukiamas įpilant atitinkamą baltymų tirpalo (1 proc. BSA) tūrį, po to inkubuojama 1 min. Ląstelės tris kartus plaunamos pilnai komplektuota terpe, tarp praplovimų centrifuguojamos (400 × g, 5 min., 20–25 °C). Po paskutinio praplovimo ląstelių gyvybingumas ir fluorescencijos intensyvumas vertinti naudojant fluorescencinį mikroskopą.

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių migracija ir įsijungimas į pažeistus inkstų audinius vertinti 9, 14, 21 ir 35 eksperimento dienomis. Po laboratorinių gyvūnų eutanazijos paimti inkstų mėginiai ir užšaldyti –80 °C temperatūroje. Vėliau inkstų mėginiai supjaustyti į 5 μm storio pjūvius, o ląstelių branduoliai dažyti DAPI dažais. Pjūvių analizė atlikta fluorescentiniu invertuotu mikroskopu Olympus IX73 naudojant QCapture Pro 7 programinę įrangą.

## **2.5. Imties sudarymas ir statistinė duomenų analizė**

### **2.5.1. Gyvūnų imties sudarymas**

Gyvūnų imties sudarymui naudotas „išteklių lygties“ (angl. *resource equation*) metodas. Remiantis šiuo metodu, apskaičiuojama E reikšmė, t. y. tiriamųjų skaičius grupėje, kuri turi būti intervale 10–20. Jei E reikšmė mažesnė nei 10, gyvūnų skaičius laikomas per mažu, jei didesnė nei 20 – per dideliu. Kadangi pagal eksperimentinį modelį buvo sudaryta viena kontrolinė ir trys tiriamosios grupės, todėl minimali grupės imtis turėjo būti ne mažesnė kaip 5 gyvūnai.

Reikalinga tiriamųjų imtis apskaičiuota remiantis formule [139]:

$$E = (\text{Gyvūnų skaičius grupėje} \times \text{Grupių skaičius}) - \text{Grupių skaičius}$$

### **2.5.2. Statistinė duomenų analizė**

Aprašomoji ir lyginamoji statistinė analizė atlikta naudojant statistinės analizės programą SPSS Statistics 17.0. Apskaičiuoti iš anksto parinktų kintamųjų dažniai ir sudarytos kryžminės lentelės, atliktas  $\chi^2$  testas, o skirtumams tarp grupių lyginti taikyta vienfaktorė ANOVA su Tukey HSD post hoc kriterijumi. Apskaičiuoti kiekvieno fiziologinio, biocheminio ir glomerulų filtracijos greičio parametro vidurkiai bei standartiniai nuokrypiai (SD). Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, jei patikimumo koeficientas  $p < 0,05$ .



## 3. REZULTATAI

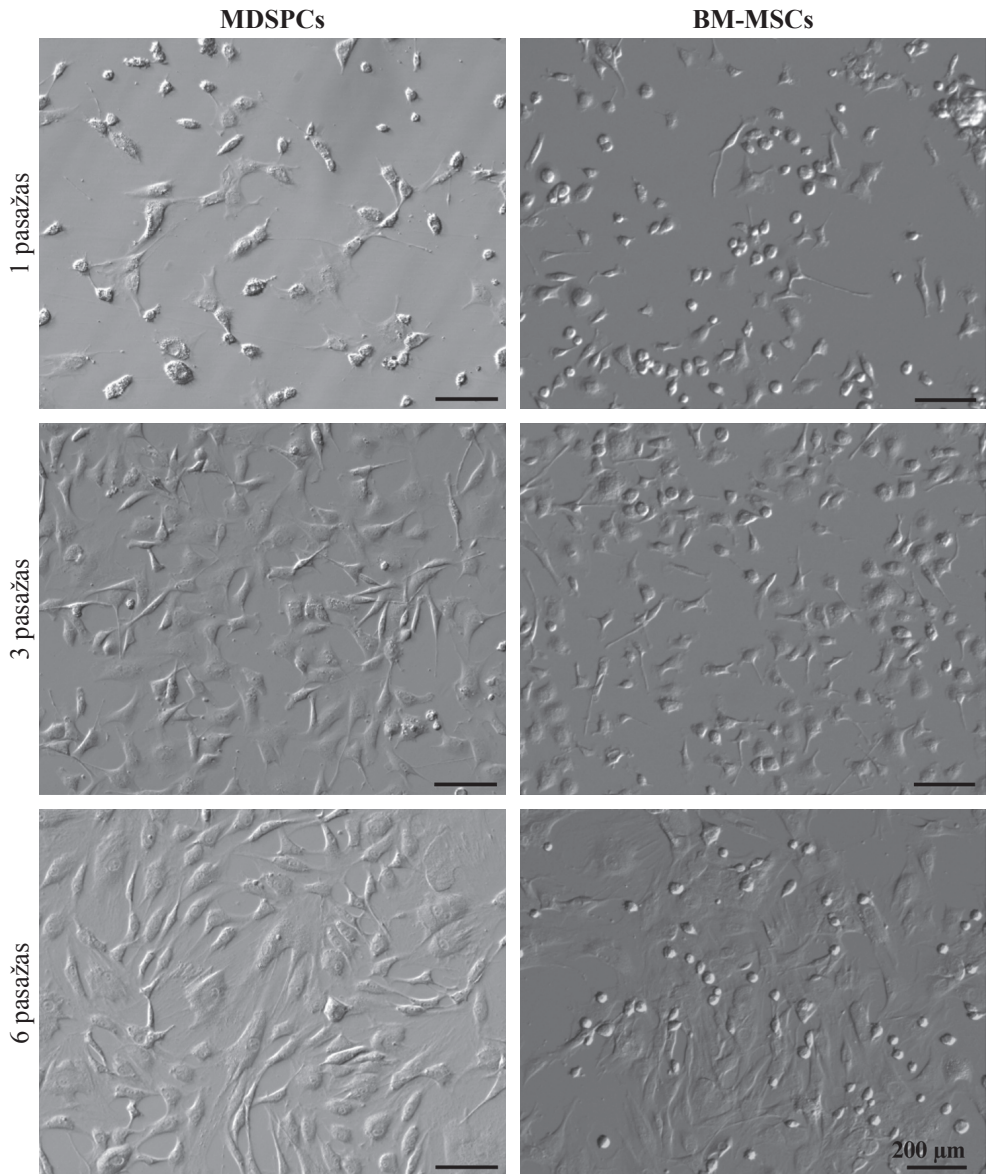
### 3.1. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių charakteristikos

#### 3.1.1. Morfologija

Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės morfologiškai yra apvalios, verpstės arba trikampio formos. Kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės morfologiškai yra apvalios arba verpstės formos. Ląstelių morfolginiai požymiai skirtinguose pasažuose pateikti 3.1.1.1 pav. [64].

Tiek raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių, tiek kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas kartotas 3 kartus. Statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant skirtingų ląstelių tipų savybes tarp skirtingų išskyrimų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Atlikus abiejų ląstelių tipų krišaldymą (po  $1 \times 10^6$  ląstelių 1 ml šaldymo terpės) ir atšildžius ląstelių kultūras po 30, 60 ir 90 dienų ląstelių gyvybingumas nekito. Vidutiniškai 90 proc. ląstelių išliko gyvybingos po atšildymo ir pasižymėjo dideliu proliferacijos potencialu.

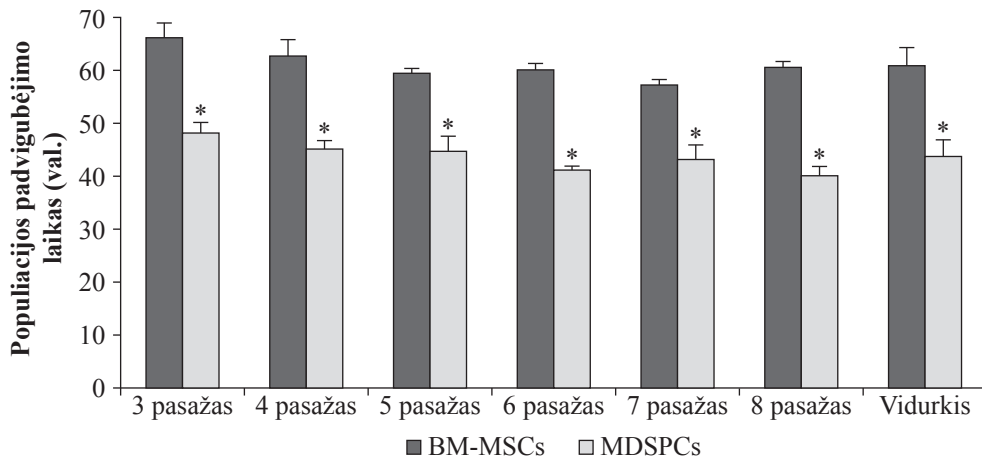


**3.1.1.1 pav.** Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių morfologija [64]

Mikroskopinės nuotraukos iliustruoja raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių morfologiją pirmojo (1 pasažas), trečiojo (3 pasažas) ir šeštojo (6 pasažas) pasažų metu. Pastebima, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pradinėse kultivavimo stadijose yra mažesnio dydžio ir nevienodos formos, tačiau didėjant pasažų skaičiui jos tampa verpstiškesnės ir labiau homogenizuotos. kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės išlaiko savo morfologinius bruožus ankstyvuosiuose pasažuose, tačiau vėlesniuose etapuose taip pat stebimas verpstiškesnių ląstelių dominavimas. Mastelio juosta – 200 μm.

### 3.1.2. Populiacijos padvigubėjimo laikas

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laikas skirtingų pasažų metu yra pateiktas 3.1.2.1 paveiksle [64].



**3.1.2.1 pav.** Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laikas (\* $p < 0,05$ ) [64]

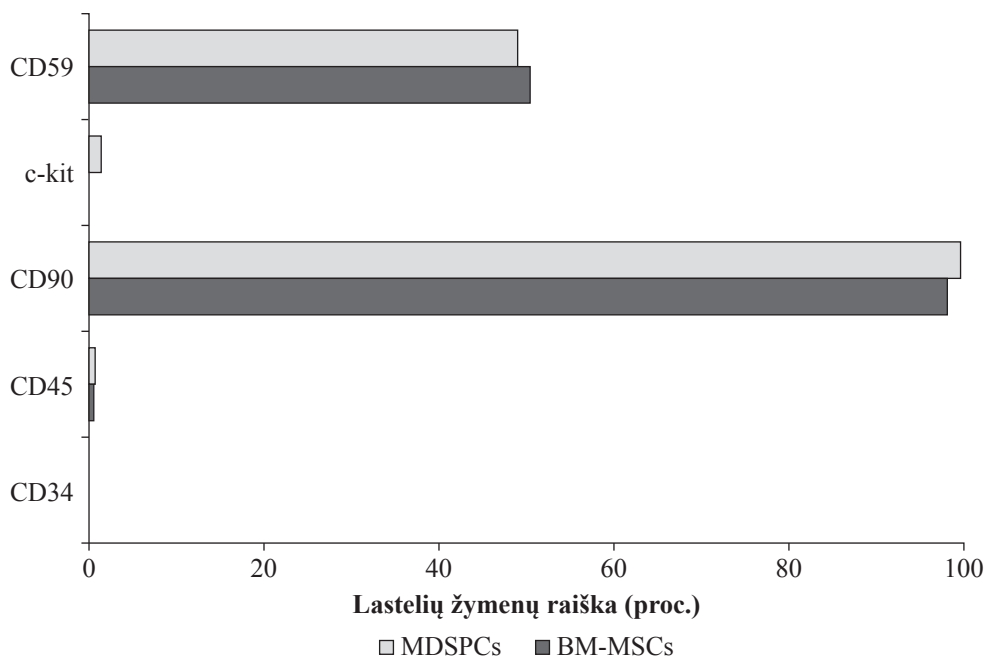
Grafikas atspindi raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laiką (valandomis) nuo trečiojo iki aštuntojo pasažo bei jų vidutinę vertę. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymi reikšmingai trumpesniu populiacijos padvigubėjimo laiku lyginant su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis visose analizuotose pasažų stadijose. Tai rodo spartesnę raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių proliferacijos tempą, kuris išlieka stabilus per kelis pasažus. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laiko vidurkis buvo  $43,64 \pm 3,10$  val., kai tuo tarpu kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laiko vidurkis buvo  $60,78 \pm 3,34$  val. Šis kiek daugiau nei 17 val. skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,001$ ).

Šių tyrimų rezultatai rodo, kad reikiamas raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių skaičius terapiniais tikslais gali būti pasiektas reikšmingai greičiau, lyginant su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis.

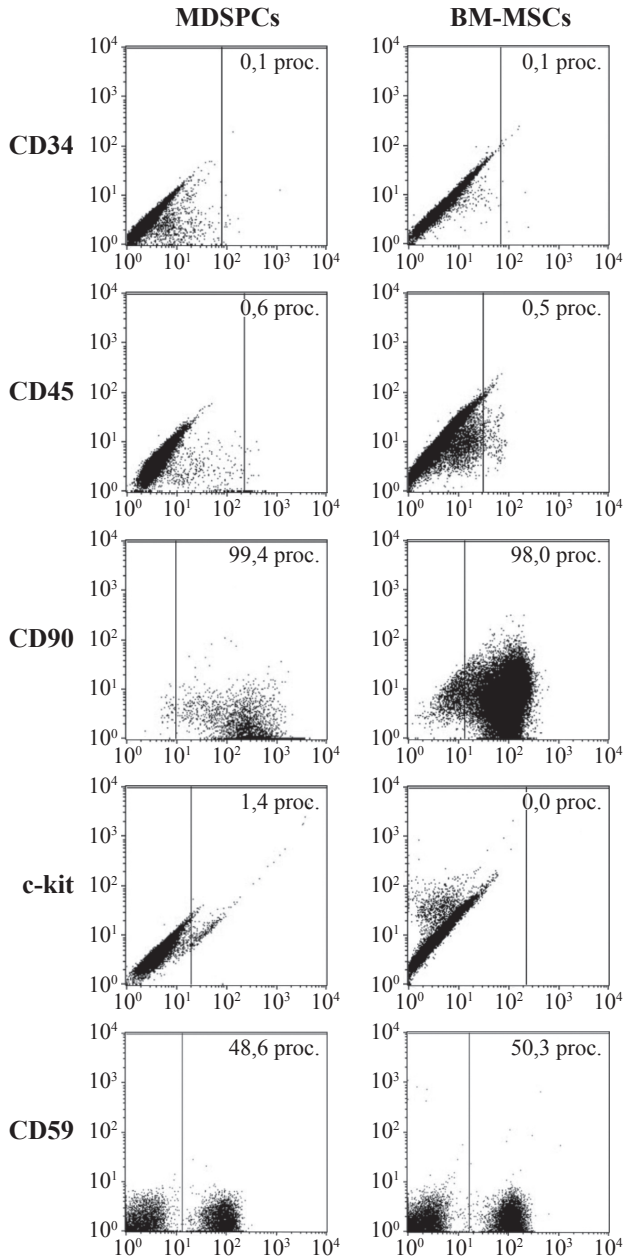
### 3.1.3. Imunofenotipas

Atlikus tėkmės citometrijos ir imunofluorescencijos tyrimus nustatyta, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės ir kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymėjo stipria mezenchiminių žymenų CD59 ir CD90 raiška. Abu ląstelių tipai nepasižymėjo hematopoetinių ir endotelinių žymenų CD45 ir CD34 raiška. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės taip pat pasižymėjo teigiama desmino raiška, rodančia ląstelių kilmę iš griaučių raumenų ir silpna c-kit raiška, rodančia ląstelių kamieniškumą. Tėkmės citometrijos ir imunofluorescencijos tyrimų rezultatai pateikti 3.1.3.1–3.1.3.3 pav. [64].



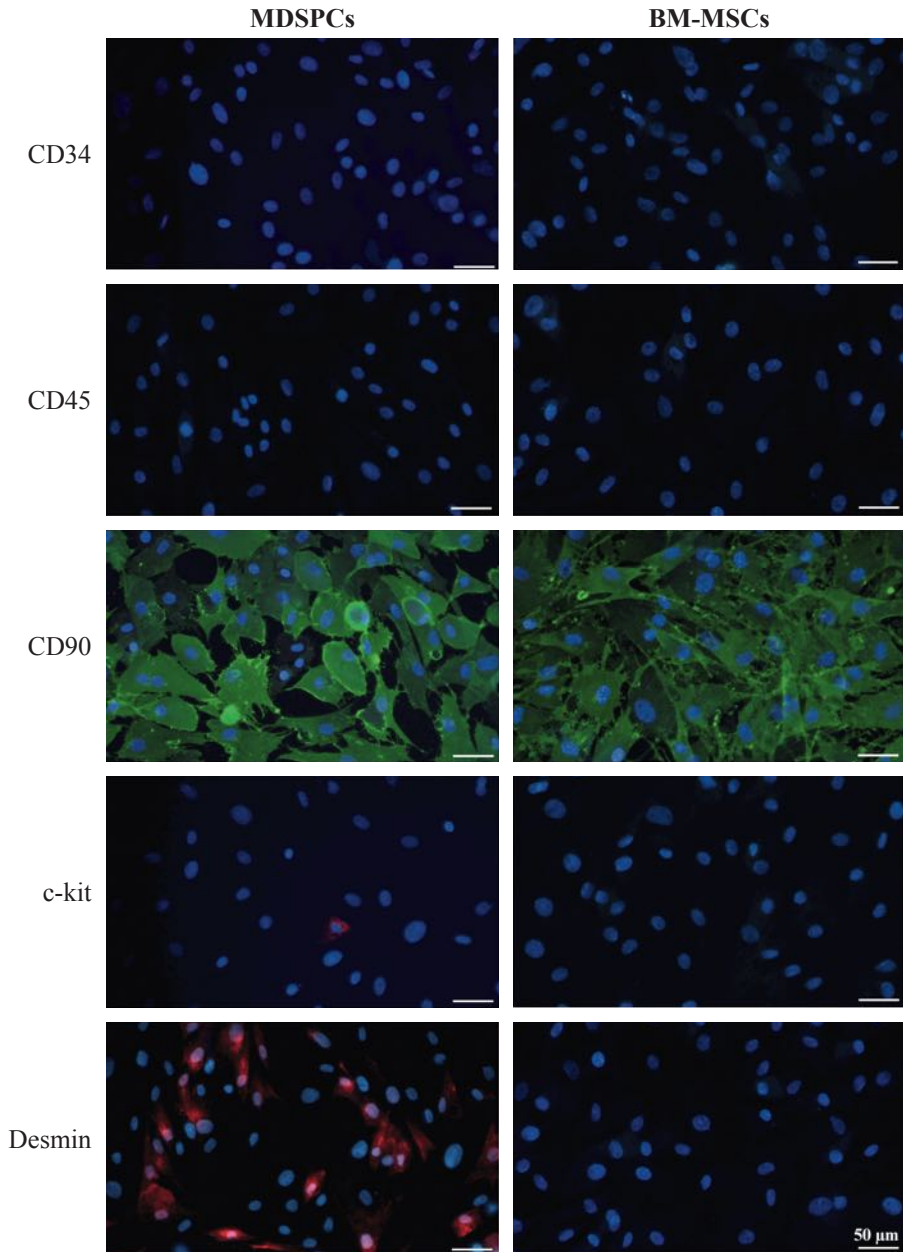
**3.1.3.1 pav.** Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių imunofenotipo kiekybinė analizė [64]

Paveiksle pateikta paviršinių žymenų (CD34, CD45, CD90, c-kit, CD59) kiekybinė analizė, išreikšta procentais. Abiejų ląstelių tipų populiacijos pasižymėjo stipria CD90 žymens raiška (> 98 proc.), kas būdinga mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms. Hematopoetiniai žymenys CD34 ir CD45 buvo minimaliai ekspresuojami (< 1 proc.), rodant gryną mezenchiminį fenotipą. CD59 ekspresija buvo panaši tiek raumeninės kilmės kamieninėse pirmtakinėse ląstelėse, tiek kaulų čiulpų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse (~50 proc.). Tuo tarpu c-kit (CD117) žymens raiška buvo aptikta tik raumeninės kilmės kamieninėse pirmtakinėse ląstelėse (1,4 proc.), bet ne kaulų čiulpų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse kas rodo tam tikrus šių ląstelių kilmės ar savybių skirtumus.



**3.1.3.2 pav.** Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių imunofenotipas įvertintas tėkmės citometrijos metodu [64]

Paveiksle pateikti tėkmės citometrijos analizės taškiniai grafikai, rodantys įvairių paviršinių žymenų (CD34, CD45, CD90, c-kit, CD59) raišką raumeninės kilmės kamieninėse pirmtakinėse ląstelėse ir kaulų čiulpų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse.

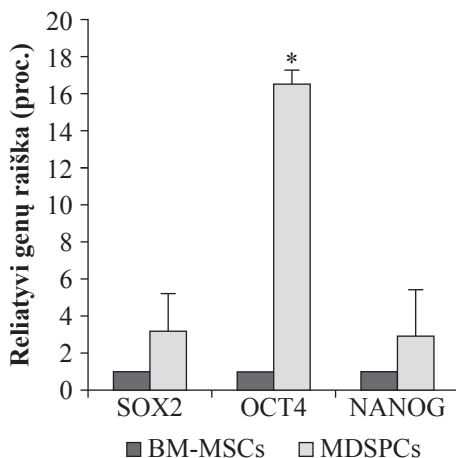


**3.1.3.3 pav.** Raumeninės kilmės kamieninių pirtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių imunofenotipas įvertinas imunofluorescencijos metodu [64]

Branduoliai dažyti DAPI (mėlynai), specifiniai baltymai žymėti fluorescenciniais antikūnais (žaliai arba raudonai). Abiejų tipų ląstelės išreiškia ryškią CD90 fluorescenciją (žalia spalva). c-kit ir Desmin raiška nustatyta tik raumeninės kilmės kamieninėse pirtakinėse ląstelėse. Hematopoetiniai žymenys CD34 ir CD45 nenustatyti. Mastelio juosta – 50 μm.

### 3.1.4. SOX2, OCT4 ir NANOG genų raiška

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių genų raiškos rezultatai pateikti 3.1.4.1 pav. [64]. Atlikus realaus laiko PGR nustatyta, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesne OCT4 geno raiška ( $p = 0,037$ ), bei didesne NANOG ir SOX2 genų raiška lyginant su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas.

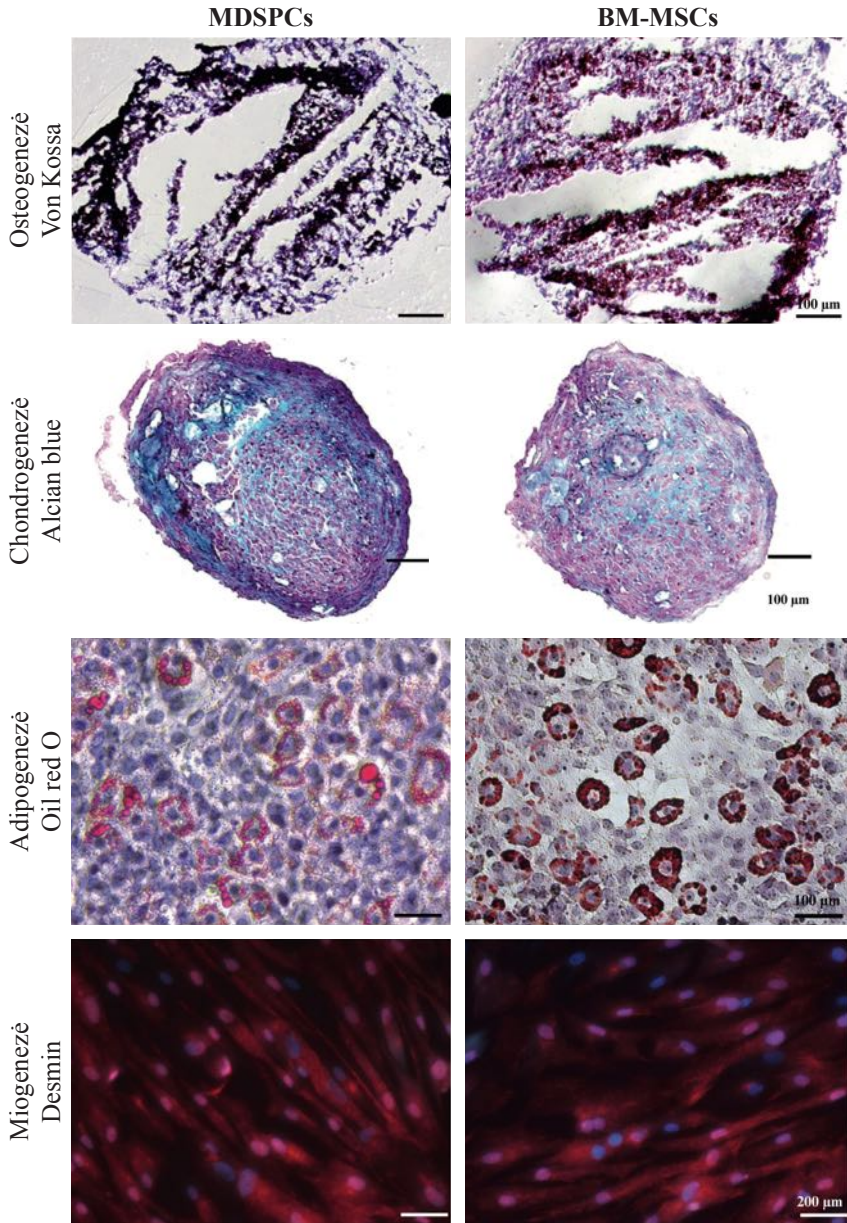


#### 3.1.4.1 pav. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių genų raiška (\* $p < 0,05$ ) [64]

Grafike pavaizduota pluripotencijos žymenų SOX2, OCT4 ir NANOG genų raiška kaulų čiulpų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse (tamsiai pilki stulpeliai) ir raumeninės kilmės kamieninėse pirmtakinėse ląstelėse (šviesiai pilki stulpeliai). Duomenys pateikiami procentine išraiška, normalizuota pagal endogeninius kontrolinius genus. Rezultatai rodo, kad OCT4 geno raiška raumeninės kilmės kamieninėse pirmtakinėse ląstelėse buvo reikšmingai didesnė nei kaulų čiulpų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Tuo tarpu SOX2 ir NANOG raiškos lygiai abiejose ląstelių populiacijose buvo žemi ir statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

### 3.1.5. Multipotentinės diferenciacijos potencialas

Atlikus multipotentinės diferenciacijos eksperimentus nustatyta, kad tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės geba diferencijuoti osteogenine, chondrogenine, adipogenine bei miogenine kryptimis. Diferenciacijos rezultatai pateikti 3.1.5.1 pav. [64].



**3.1.5.1 pav.** Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciacija [64]

Osteogenezė. Mineralizuota matrica vertinta Von Kossa dažymu. Juodos nuosėdos rodo kauliniam audiniui būdingą kalcio kaupimąsi. Chondrogenezė. Kremzlės audinyje besikaupiantys gliukozaminoglikanai vizualizuoti Alcian Blue dažymu (mėlyna spalva). Adipogenezė patvirtinta Oil Red O dažymu (raudoni lipidų intarpai). Miogenezė patvirtinta Desmin dažymu (raudona fluorescencija), branduoliai dažyti DAPI (mėlyna spalva). Mastelio juostos: 100 μm (osteogenezė, chondrogenezė, adipogenezė), 200 μm (miogenezė).



Osteogeninė diferenciacija patvirtinta von Kossa dažymu, kurio metu suformuoto 3D kaulo darinio kalcifikatai (kalcio druskos) nusidažė ruda arba juoda spalvomis. Chondrogeninė diferenciacija patvirtinta Alcian blue dažymu, kurio metu rūgštiniai polisacharidai, tokie kaip glikozaminoglikanai, nusidažė mėlyna spalva. Adipogeninė diferenciacija patvirtinta Oil red O dažymu, kurio metu trigliceridai ir riebalai nusidažė raudona spalva.

Miogeninė diferenciacija buvo vertinta remiantis imunofluorescencijos metodu, naudojant antikūną Desminą. Susiformavusių miogeninių ląstelių membranos pasižymėjo raudonos spalvos fluorescencija. Taip pat stebint ląstelių miogeninės diferenciacijos kultūra šviesiniu mikroskopu paskutinę eksperimento dieną buvo stebimos ilgos daugiabranduolės ląstelės, pasižyminčios kontraktiškumu.

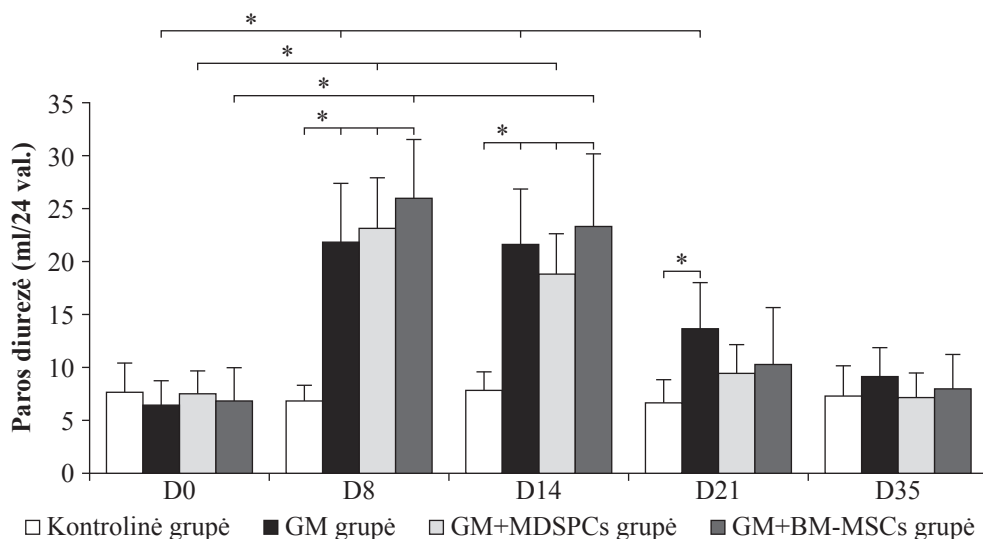
## **3.2. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių palyginimas ūminio inkstų pažeidimo modelyje *in vivo***

### **3.2.1. Paros diurezės įvertinimas**

Kaip minėta, eksperimentams *in vivo* naudotos 8–12 savaičių amžiaus Wistar linijos žiurkių patelės. Paros diurezės vidurkis 0 eksperimento dieną buvo  $7,1 \pm 2,6$  ml/24 val. (ribos 3,0–12,0). Paros diurezės rezultatai skirtinguose eksperimento taškuose pateikti 3.2.1.1 pav.

Nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų 0 eksperimento dieną lyginant paros diurezės vidurkį tarp grupių ( $p > 0,05$ ) bei lyginant skirtingus eksperimentus ( $p > 0,05$ ). Taip pat nenustatyta jokių statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių vertinant gyvūnų paros diurezės vidurkį 0, 8, 14, 21 ir 35 eksperimento dienomis, lyginant GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupių gyvūnų rezultatus.

Kaip parodyta 3.2.1.1 pav., toksinės gentamicino injekcijos sukėlė ūminį inkstų pažeidimą, kurį atspindi poliurija, pasireiškusį GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupių gyvūnams jau 8 eksperimento dieną (paros diurezė padidėjusi vidutiniškai 3,3 karto), ir išliekanti iki 21 eksperimento dienos. Šie paros diurezės pokyčiai GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse buvo statistiškai reikšmingi ( $p < 0,05$ ) 8 ir 14 eksperimento dienomis, lyginant su kontroline grupe, kurios gyvūnams nebuvo skiriamos gentamicino injekcijos.



**3.2.1.1 pav.** Vidutiniai paros diurezės pokyčiai eksperimento metu (\* $p < 0,05$ )

Paveikslas vaizduoja paros diurezės (ml/24 val.) dinamiką skirtinguose eksperimento taškuose (D0, D8, D14, D21, D35). Rezultatai rodo, kad 8 ir 14 dieną diurezė buvo statistiškai reikšmingai didesnė GM, GM+MDSPC ir GM+BM-MSC grupėse, lyginant su kontroline grupe, dėl gentamicino sukulto ŪIP. 21 dieną GM grupėje diurezė išliko statistiškai reikšmingai didesnė nei kontrolinėje grupėje. Tai rodo, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakės ląstelės ir kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės statistiškai reikšmingai pagreitino inkstų regeneraciją ir funkcijos atsistatymą. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

### 3.2.2. Šlapimo ir kraujo biocheminių rodiklių pokyčių įvertinimas

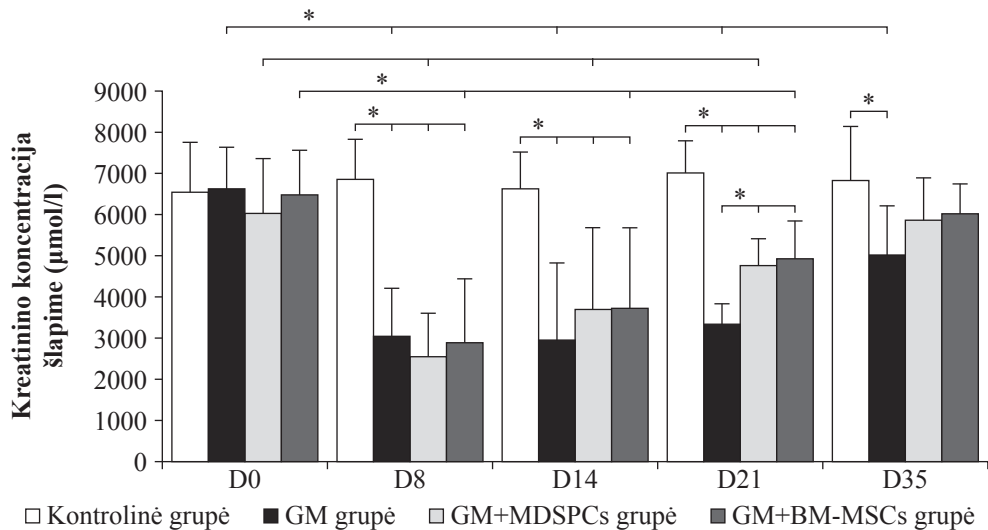
Kreatinino koncentracijos žiurkių šlapime vidurkis eksperimento pradžioje buvo  $6421,6 \pm 1150,2 \mu\text{mol/l}$ . Kreatinino koncentracijos pokyčiai eksperimentų metu pateikti 3.2.2.1 pav.

Nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių vertinant kreatinino koncentraciją šlapime 0 eksperimento dieną ( $p > 0,05$ ). Jau 8 eksperimento dieną buvo stebimi ryškūs kreatinino koncentracijos šlapime pokyčiai, t. y. kreatinino koncentracija šlapime sumažėjo vidutiniškai 2,3 karto [65].

Lyginant GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupes su kontroline grupe nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai 8, 14 ir 21 eksperimento dienomis ( $p < 0,05$ ), atspindintys toksinių gentamicino injekcijų sukeltą ūminį inkstų pažeidimą. Taip pat svarbu paminėti, kad nors 21 dieną GM+MDSPCs ( $4763,2 \pm 644,9 \mu\text{mol/l}$ ) ir GM+BM-MSCs ( $4933,2 \pm 905,6 \mu\text{mol/l}$ ) grupių rodikliai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinės grupės ( $7021,7 \pm 772,6 \mu\text{mol/l}$ ),

tačiau jie taip pat buvo ir statistiškai reikšmingai geresni ( $p < 0,05$ ), lyginant su GM grupe ( $3333,8 \pm 502,0$ ) [65].

Eksperimento pabaigoje, vertinant kreatinino koncentraciją šlapime nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp kontrolinės, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupių ( $p < 0,05$ ), tačiau šis rodiklis GM grupėje statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinės grupės gyvūnų ( $p < 0,05$ ).



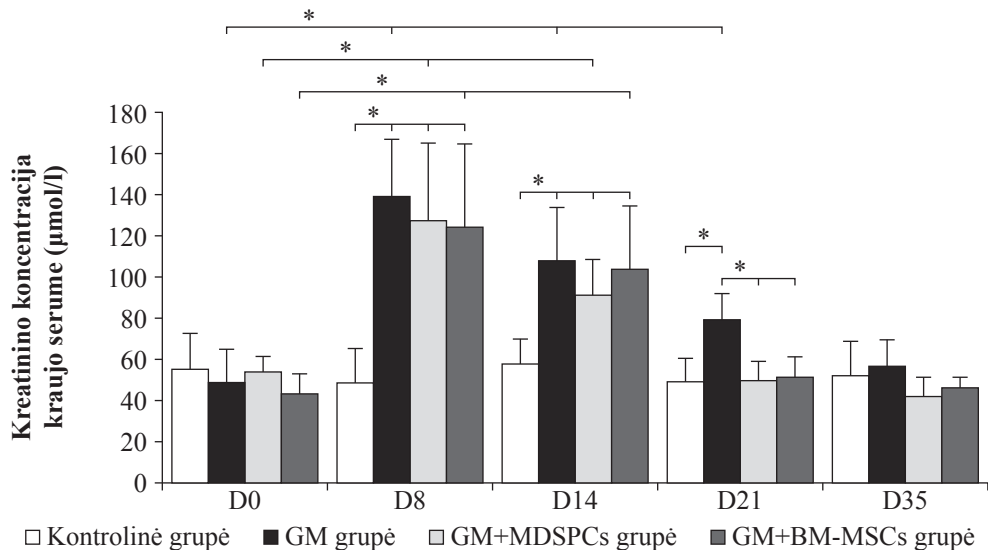
**3.2.2.1 pav.** Vidutiniai kreatinino koncentracijos pokyčiai šlapime eksperimento metu ( $*p < 0,05$ ) [65]

Paveiksle vaizduojama kreatinino koncentracijos šlapime ( $\mu\text{mol/l}$ ) dinamika skirtinguose eksperimento taškuose (D0, D8, D14, D21, D35). Eksperimento pradžioje kreatinino koncentracijos reikšmės tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. 8 ir 14 dienomis kreatinino koncentracija žymiai sumažėjo GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse, palyginti su kontroline grupe. 21 ir 35 dienomis GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse kreatinino koncentracija išliko reikšmingai didesnė nei GM grupėje, tačiau vis dar reikšmingai mažesnė nei kontrolinėje grupėje. Šie rezultatai rodo, kad gentamicino sukeltas ŪIP sumažino kreatinino ekskreciją su šlapimu, tačiau raumeninės kilmės kamieninės pirmtakės ląstelės ir kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės statistiškai reikšmingai pagreitino inkstų regeneraciją ir kreatinino koncentracijos atsistatymą. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

Kreatinino koncentracijos žiurkių kraujo serume vidurkis eksperimento pradžioje buvo  $50,3 \pm 12,6 \mu\text{mol/l}$ . Nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių vertinant kreatinino koncentraciją kraujo serume 0 ir 35 eksperimento dienomis ( $p > 0,05$ ) [65].

Kaip parodyta 3.2.2.2 pav., GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse kreatinino koncentracija kraujo serume padidėjo vidutiniškai 2,7 karto

lyginant su kontroline grupe. Šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ) ir išliko iki 14 eksperimento dienos.

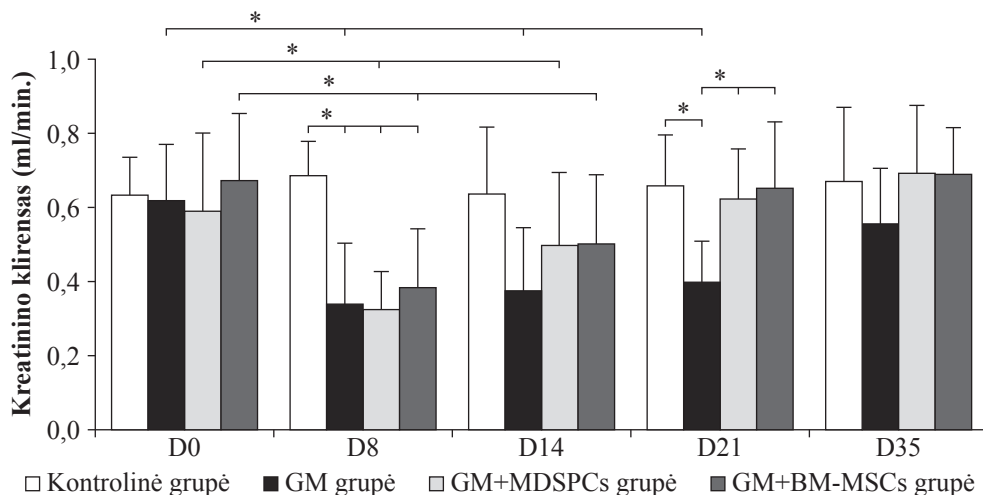


**3.2.2.2 pav.** Vidutiniai kreatinino koncentracijos pokyčiai kraujo serume eksperimento metu ( $*p < 0,05$ ) [65]

Paveiksle vaizduojama kreatinino koncentracijos kraujo serume ( $\mu\text{mol/l}$ ) dinamika skirtinguose eksperimento taškuose (D0, D8, D14, D21, D35). Eksperimento pradžioje kreatinino koncentracijos reikšmės tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. 8 dieną GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse kreatinino koncentracija kraujo serume reikšmingai padidėjo, palyginti su kontroline grupe. 14 ir 21 dienomis GM grupėje kreatinino koncentracija išliko reikšmingai aukštesnė nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse, o 35 dieną visose grupėse kreatinino koncentracija grįžo į kontrolinius lygius. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

GM grupės žiurkių kreatinino koncentracija kraujo serume 21 eksperimento dieną statistiškai reikšmingai skyrėsi tiek nuo kontrolinės grupės, tiek nuo GM+MDSPCs bei GM+BM-MSCs grupių gyvūnų ( $p < 0,05$ ). Šis rodiklis 21 eksperimento dieną kontrolinėje, GM+MDSPCs bei GM+BM-MSCs grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p < 0,05$ ) [65]. Analogiški rezultatai gauti ir vertinant išvestinį rodiklį – kreatinino klirensą, kaip parodyta 3.2.2.3 pav.

Po gentamicino sukulto ŪIP, kreatinino klirensas statistiškai reikšmingai sumažėjo jau 8 eksperimento dieną GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse lyginant su kontroline grupe ( $p < 0,05$ ), o jo atsistatymas ląstelių terapijos grupėse buvo stebimas 21 dieną. Tuo tarpu GM grupėje šis rodiklis pasiekė normos ribas tik 35 eksperimento dieną.



**3.2.2.3 pav. Vidutiniai kreatinino klirenso pokyčiai eksperimento metu**  
*(\* $p < 0,05$ ) [65]*

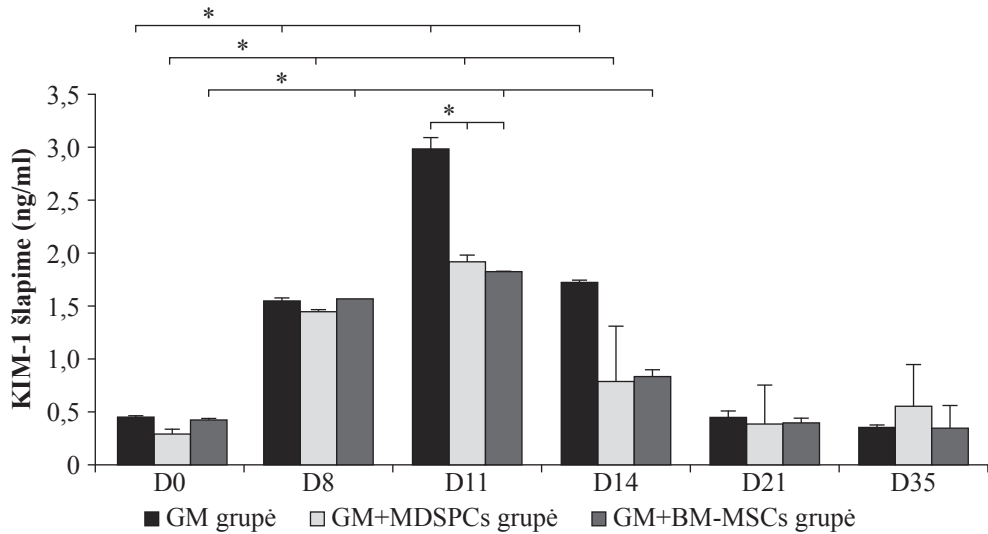
Paveiksle pavaizduota kreatinino klirenso (ml/min.) dinamika skirtinguose eksperimento taškuose (D0, D8, D14, D21, D35). Eksperimento pradžioje kreatinino klirenso reikšmės tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. 8 dieną GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse kreatinino klirensas reikšmingai sumažėjo, palyginti su kontroline grupe. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakės ląstelės ir kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pagreitino kreatinino klirenso atsistatymą jau 14 eksperimento dieną, o GM grupėje jo reikšmės išliko žemos. 21 dieną GM grupėje kreatinino klirensas vis dar buvo reikšmingai mažesnis nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse. 35 dieną visose grupėse kreatinino klirenso rodikliai grįžo į normos ribas ir statistiškai reikšmingai tarp grupių nesiskyrė. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

Statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupes nenustatyta ( $p > 0,05$ ). Tai rodo, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės geba paspartinti biocheminių kraujo ir šlapimo rodiklių bei inkstų funkcijos atsistatymą po ŪIP [65].

**3.2.3. KIM-1 ir NGAL koncentracijos pokyčių įvertinimas**

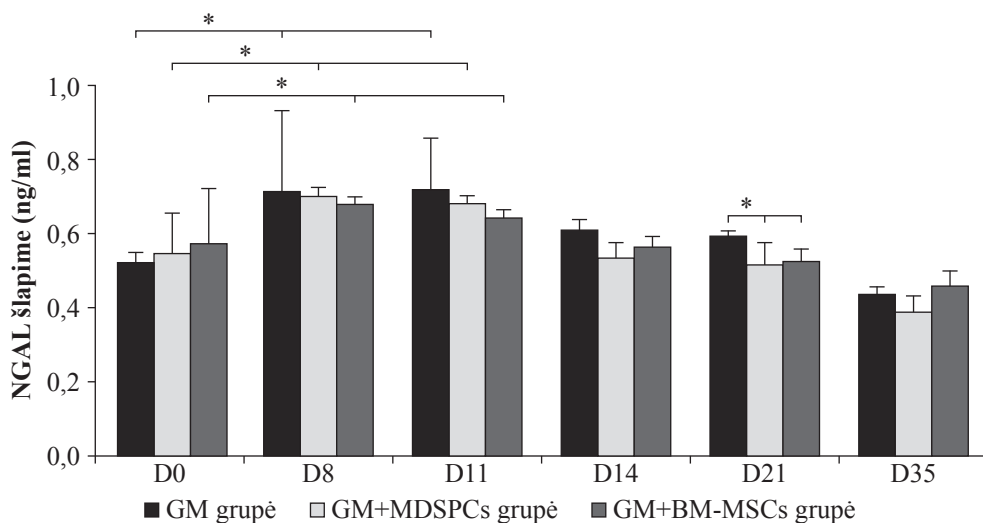
Imunofermentinė KIM-1 ir NGAL analizė šlapime ELISA metodu parodė statistiškai reikšmingą šių žymenų padidėjimą žiurkių šlapime, pasireiškus gentamicino sukeltam ŪIP ( $p < 0,05$ ). Reikšmingas šių šlapimo baltymų padidėjimas buvo stebimas GM, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse 8 eksperimento dieną.

Kaip parodyta 3.2.3.1 ir 3.2.3.2 pav., tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės turėjo teigiamą poveikį inkstų funkciniam atsistatymui, remiantis statistiškai reikšmingai mažesne KIM-1 žymens sekrecija 14 dieną ( $p < 0,05$ ) NGAL žymens sekrecija 21 dieną ( $p < 0,05$ ), lyginant su GM grupe, kuriai joks gydymas taikomas nebuvo. Statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupes visuose eksperimento taškuose nenustatyta ( $p > 0,05$ ) [65].



**3.2.3.1 pav.** Vidutiniai KIM-1 biožymens koncentracijos pokyčiai šlapime eksperimento metu ( $*p < 0,05$ ) [65]

Paveiksle vaizduojama inkstų pažeidimo žymens KIM-1 koncentracijos šlapime (ng/ml) dinamika skirtinguose eksperimento taškuose (D0, D8, D11, D14, D21, D35). 8 dieną GM grupėje KIM-1 koncentracija šlapime reikšmingai padidėjo, o 11 dieną pasiekė maksimalų lygį, kuris buvo reikšmingai didesnis nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse. 14 dieną KIM-1 koncentracija GM grupėje išliko aukštesnė nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse, tačiau reikšmingai nesiskyrė. D21 ir D35 dienomis KIM-1 koncentracija visose grupėse sumažėjo ir reikšmingai nesiskyrė. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).



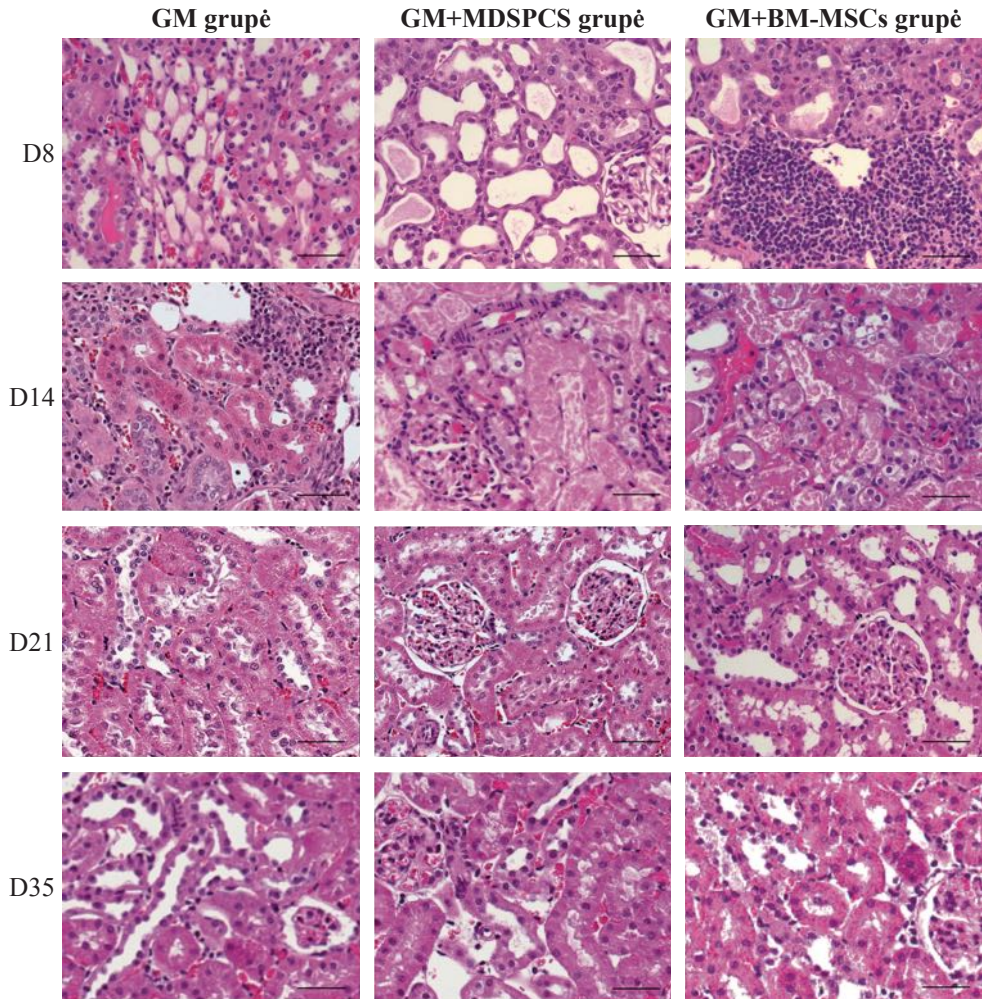
**3.2.3.2 pav.** Vidutiniai NGAL biožymens koncentracijos pokyčiai šlapime eksperimento metu (\* $p < 0,05$ ) [65]

Paveiksle vaizduojama inkstų pažeidimo žymens NGAL koncentracijos šlapime (ng/ml) dinamika skirtinguose eksperimento taškuose (D0, D8, D11, D14, D21, D35). Eksperimento pradžioje (D0) NGAL koncentracija tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. 8 dieną visose tiriamosiose grupėse NGAL koncentracija padidėjo. D11 ir D14 dienomis NGAL koncentracija išliko padidėjusi, tačiau reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta. 21 dieną GM grupėje NGAL koncentracija buvo statistiškai reikšmingai didesnė nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse. 35 dieną NGAL koncentracija tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

### 3.2.4. Inkstų histologijos pokyčių įvertinimas

Gentamicino injekcijos 80 mg/kg 7 dienas iš eilės sukėlė tipinį aminoglikozido sukeltą ūminį inkstų pažeidimą, kuris pasireiškė kaip proksimalinių inkstų kanalėlių nekrozė, šepetinio krašto išnykimas kanalėliuose ir kanalėlių išsiplėtimas (3.2.4.1 pav., GM, GM+MDSPCs, GM+BM-MSCs grupės, 8, 14 dienos).

Pirmosiomis savaitėmis po gentamicino sukulto ŪIP (D8 ir D14) visose grupėse stebimi ryškūs degeneraciniai pokyčiai. GM grupėje matomas didelis inkstų kanalėlių pažeidimas – epitelinių ląstelių vakuolizacija, nekrozė ir reikšminga uždegiminė infiltracija. Glomerulų struktūra sutrikusi, kraujagyslių stazė rodo sutrikusį kraujotakos procesą. GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse taip pat matomi pažeidimai, tačiau šiose grupėse kanalėlių struktūra geriau išsaugota, uždegimas mažiau intensyvus, o epitelinės ląstelės rodo pirmuosius regeneracijos požymius.



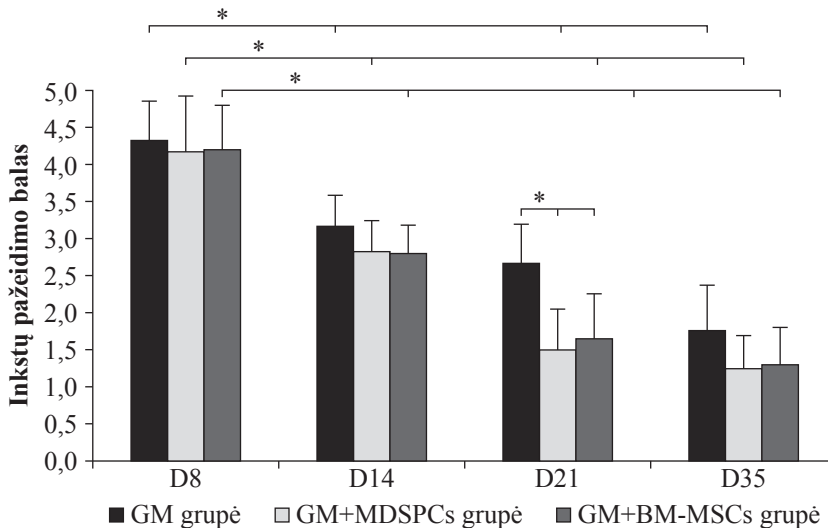
### 3.2.4.1 pav. Inkstų morfologijos pokyčiai eksperimento metu [65]

Audiniai dažyti hematoksilinu ir eozinu (H&E). **D8.** Visose grupėse pastebima ryški tubulinė degeneracija, epitelinių ląstelių vakuolizacija ir nekrozė, uždegiminė infiltracija, kraujagyslių stazė. Pastebimas edeminis audinio patinimas, uždegiminė infiltracija. **D14.** Visose grupėse pastebimi didelės apimties nekroziniai pažeidimai, uždegiminė infiltracija aplink kanalėlius, sutrikusi glomerulų struktūra. **D21.** GM grupė: Tubuliniai pažeidimai ir uždegiminė infiltracija išlieka, stebima dalinė regeneracija. GM+MDSPCs grupė: Ženkliai mažesni uždegimo požymiai, aiškesnė kanalėlių struktūra. Glomerulai beveik normalios struktūros. GM+BM-MSCs grupė: Regeneracija pažengusi, inkstų kanalėliai atrodo sveikesni. Matoma minimaliai uždegiminių pokyčių. **D35.** GM grupė: Inkstų struktūra pagerėjusi, tačiau kai dar stebimi degeneraciniai pokyčiai. Mažiau uždegiminių ląstelių. GM+MDSPCs grupė: Kanalėliai beveik normalios struktūros, uždegiminė infiltracija minimali. GM+BM-MSCs grupė: Inkstų struktūra beveik visiškai atstatyta, uždegimo beveik nelikę. Mastelio juosta – 50 μm.



Eksperimento pabaigoje (D35) GM grupėje vis dar matomi uždegiminiai židiniai ir dalinė kanalėlių atrofija, tačiau regeneracijos požymiai yra minimalūs. Priešingai, GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse inkstų audinys atrodo beveik visiškai atstatytas – inkstų kanalėlių struktūra yra normali, glomerulai aiškiai suformuoti, o uždegiminiai infiltratai ženkliai sumažėję.

Toksinį gentamicino poveikį atspindi ir inkstų pažeidimo balas (3.2.4.2 pav.). Tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės (inkstų pažeidimo balas  $1,50 \pm 0,55$ ), tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės (inkstų pažeidimo balas  $1,65 \pm 0,60$ ) reikšmingai pagreitino inkstų morfologijos atsistatymą jau 21 eksperimento dieną, praėjus 14 dienų po kamieninių ląstelių terapijos, lyginant su inkstų pažeidimo grupe (inkstų pažeidimo balas  $2,67 \pm 0,52$ ), kuriai joks gydymas nebuvo taikytas ( $p < 0,05$  lyginant GM+MDSPCs ir GM grupes,  $p < 0,05$  lyginant GM+BM-MSCs ir GM grupes,  $p > 0,05$  lyginant GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupes) [65].



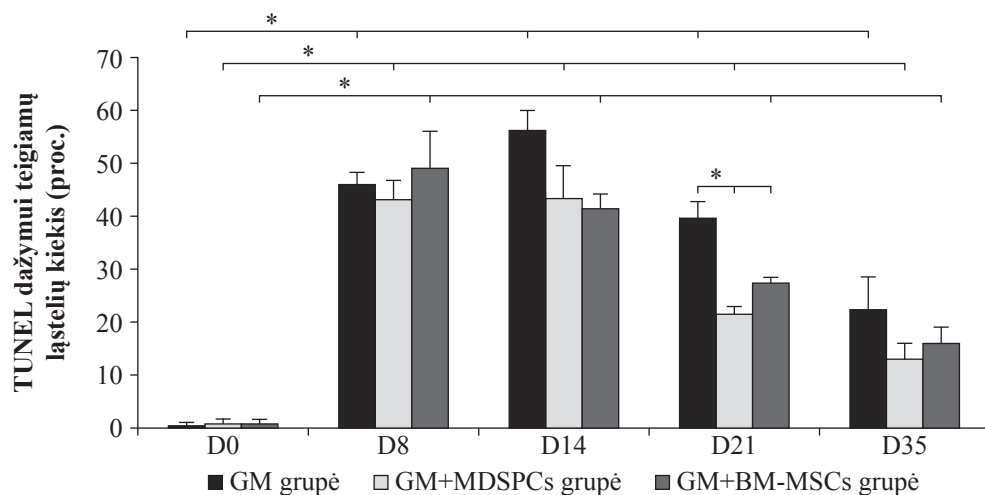
**3.2.4.2 pav.** *Inkstų pažeidimo balo pokyčiai eksperimento metu (\* $p < 0,05$ ) [65]*

Paveiksle vaizduojamas histologiškai įvertintas inkstų pažeidimo balas skirtinguose eksperimento taškuose (D8, D14, D21, D35). 8 dieną visose grupėse buvo nustatytas didžiausias inkstų pažeidimo balas, tačiau tarp grupių reikšmingų skirtumų nenustatyta. 14 dieną pažeidimo balas sumažėjo visose grupėse, tačiau reikšmingų skirtumų tarp eksperimentinių grupių taip pat nepastebėta. 21 dieną GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse inkstų pažeidimo balas buvo reikšmingai mažesnis nei GM grupėje. 35 dieną visose grupėse pažeidimo balai toliau mažėjo ir reikšmingai nesiskyrė. Paklaidos juostos rodo standartinį nuokrypį (SD).

### 3.2.5. Inkstų apoptozės įvertinimas

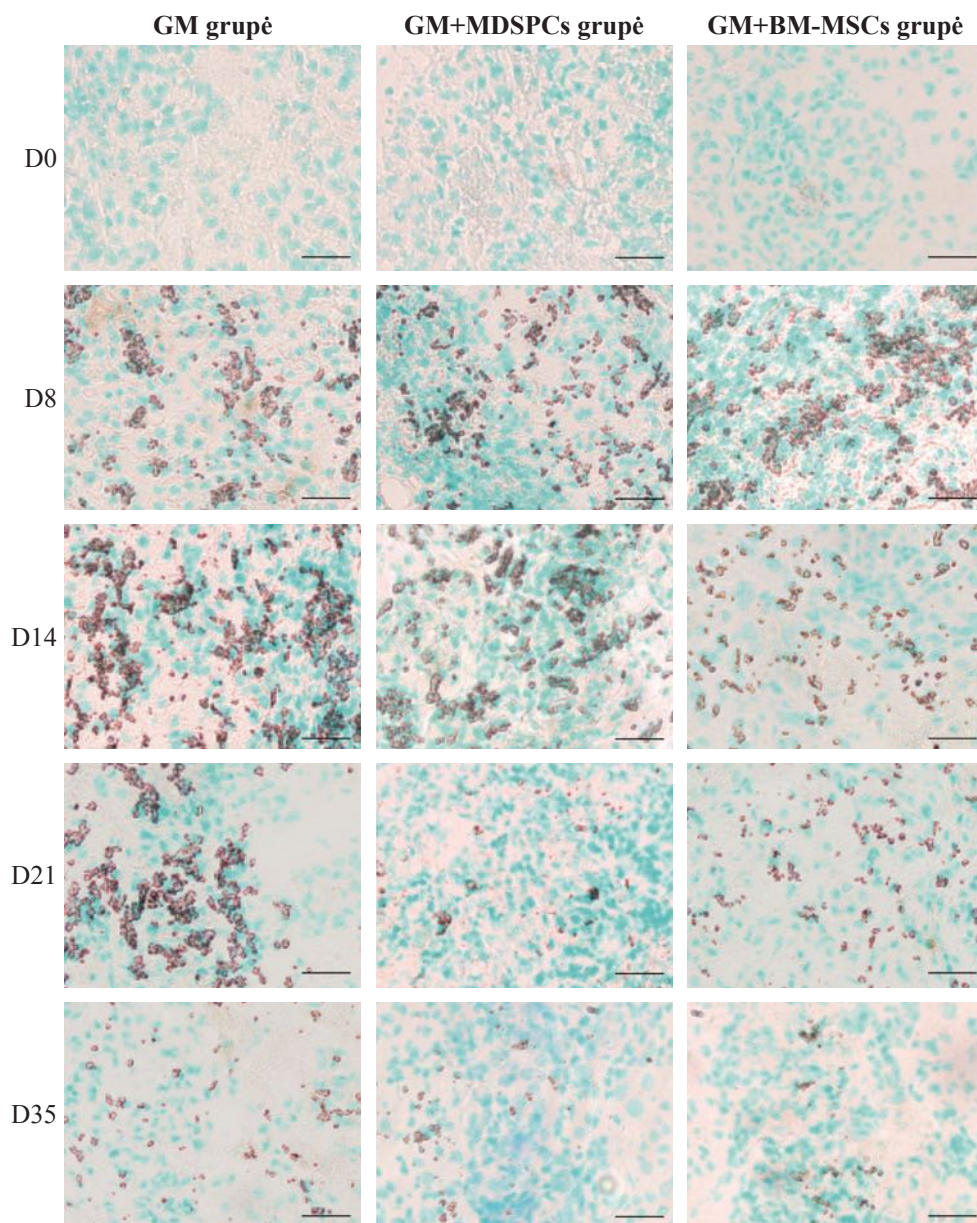
Gentamicino injekcijos 80 mg/kg 7 dienas iš eilės sukėlė ŪIP ir kanalėlių epitelio ląstelių apoptozę inkstų žievėje. Toksinių gentamicino dozių poveikį atspindi apoptozės balas (3.2.5.1 pav.) ir TUNEL dažymui teigiamos ląstelės inkstų audiniuose (3.2.5.2 pav.). Tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymėjo statistiškai reikšmingu antiapoptotiniu poveikiu. Tai atspindi TUNEL dažymui teigiamų ląstelių procentinė išraiška 21 eksperimento dieną, praėjus 14 dienų po kamieninių ląstelių terapijos (GM+MDSPCs grupėje –  $21,53 \pm 1,34$  proc., GM+BM-MSCs grupėje –  $27,35 \pm 0,97$  proc., GM grupėje –  $39,66 \pm 3,14$  proc.;  $p < 0,05$  lyginant GM+MDSPCs ir GM grupes,  $p < 0,05$  lyginant GM+BM-MSCs ir GM grupes,  $p > 0,05$  lyginant GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupes).

Nors apoptozės pasireiškimas mažėjo visose grupėse iki eksperimento pabaigos, tačiau GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse jis buvo statistiškai reikšmingai mažesnis jau 21 eksperimento dieną lyginant su GM grupe ( $p < 0,05$  lyginant GM+MDSPCs ir GM grupes;  $p < 0,05$  lyginant GM+BM-MSCs ir GM grupes) [65]. Tai rodo, kad abiejų tipų kamieninės ląstelės pagreitino inkstų funkcijos atsistatymą po inkstų pažeidimo gentamicino injekcijomis, lyginant su GM grupe, kur joks gydymas nebuvo taikomas.



3.2.5.1 pav. Apoptotinių ląstelių kiekio pokyčiai ( $*p < 0,05$ ) [65]

8 ir 14 dienomis visose grupėse apoptozė pasiekė aukščiausią lygį (~40–60 proc. TUNEL teigiamų ląstelių). Tai rodo aktyvų ląstelių žūties procesą dėl gentamicino sukkelto ŪIP. 21 dieną apoptozės lygis GM grupėje pradėjo mažėti, tačiau vis dar buvo reikšmingai didesnis nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse. 35 dieną visose grupėse apoptozė sumažėjo ir tarp grupių reikšmingai nesiskyrė. Paklaidos juostos rodo standartinę nuokrypį (SD).



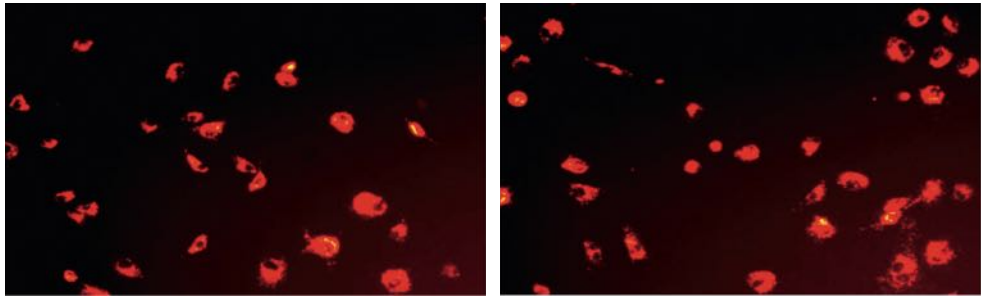
**3.2.5.2 pav. Inkstų apoptozės pasireiškimo pokyčiai eksperimento metu [65]**

0 diena – apoptozės nėra. 8 ir 14 dienomis visose grupėse stebėtas didelis TUNEL teigiamų ląstelių skaičius, ypač inkstų kanalėlių epitelyje. Tai rodo aktyvius apoptozės procesus. 21 dieną GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse pastebėtas reikšmingas apoptozės sumažėjimas lyginant su GM grupe, tačiau audiniuose dar išliko pavieniai TUNEL teigiami branduoliai. GM grupėje apoptotinių ląstelių skaičius 35 dieną sumažėjo, bet buvo didesnis nei GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse, nors šis skirtumas nebuvo reikšmingas. Mastelio juosta 100  $\mu\text{m}$ .

Kaip nurodoma daugelyje anksčiau publikuotų mokslinių tyrimų, anti-apoptotinis poveikis yra laikomas vienu svarbiausių mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmų, kuris toliau apžvelgtas 5 skyriuje.

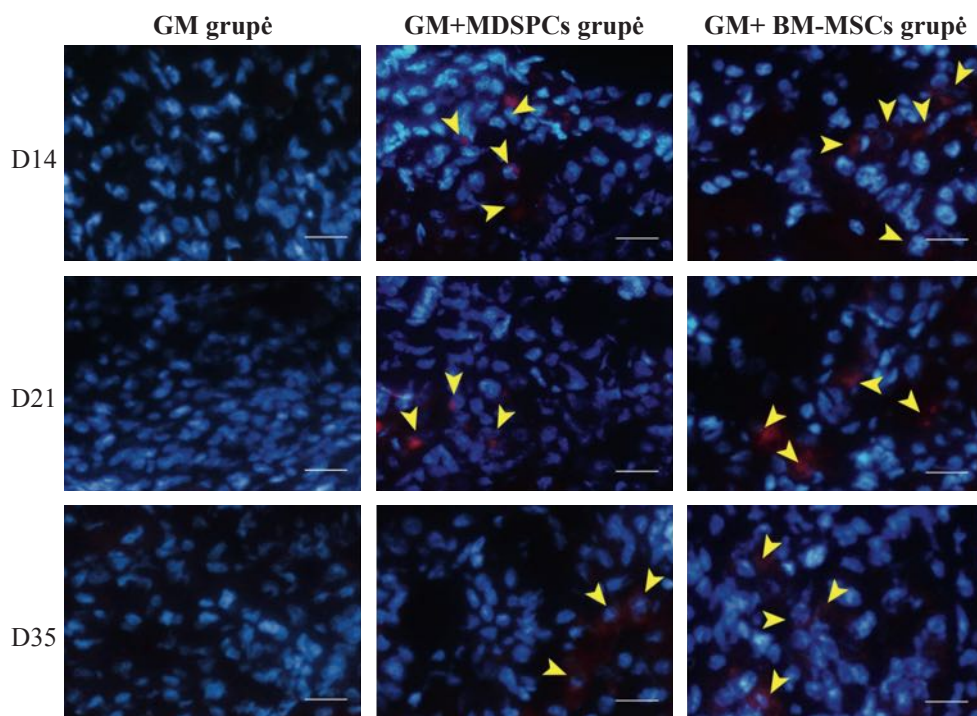
### **3.2.6. Ląstelių farmakokinetikos įvertinimas**

Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių migracija į pažeistą inksto audinį buvo nustatoma pažymint ląsteles PKH-26 fluorescuojančiais membraniniais dažais. PKH26 žymėtos ląstelės parodytos 3.2.6.1 pav.



*3.2.6.1 pav. PKH26 fluorescuojančiais dažais žymėtos ląstelės in vitro, prieš ląstelių injekciją*

Nustatyta, kad tiek PKH-26 žymėtos raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek žymėtos kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės geba migruoti į pažeistus inkstų audinius ir nedidelis jų kiekis yra aptinkamas inksto žievėje (kaip parodyta geltonomis rodyklėmis 3.2.6.2 pav. GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupės) [65]. GM grupė naudota kaip neigiama kontrolė. Šioje grupėje 14, 21 ir 35 eksperimento dienomis inkstų audiniuose PKH-26 teigiamų ląstelių neaptikta.



**3.2.6.2 pav.** PKH-26 žymėtos kamieninės ląstelės inkstų audiniuose [65]

Paveiksle pavaizduotas PKH-26 fluorescenciniu dažu (raudona spalva) pažymėtų kamieninių ląstelių išsidėstymas inkstų audiniuose skirtinguose eksperimento taškuose (D14, D21, D35). Branduoliai dažyti DAPI (mėlyna spalva). PKH-26 teigiamas ląsteles žymi geltonos rodyklės. 14 dieną PKH-26 žymėtų ląstelių nerasta GM grupėje, tačiau GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse matomi pirmieji kamieninių ląstelių integracijos požymiai. 35 dieną PKH-26 teigiamų ląstelių skaičius kiek sumažėjo, tačiau jos vis dar buvo aptinkamos GM+MDSPCs ir GM+BM-MSCs grupėse. Tai rodo jų ilgalaikį išlikimą inkstų audiniuose ir galimą parakrininį poveikį audinių regeneracijai. Mastelio juosta – 50 μm.

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Ūminis inkstų pažeidimas – globali problema, kurios dažnis kasmet auga dėl demografinio senėjimo, lėtinių ligų, tokių kaip cukrinis diabetas ir hipertenzija, paplitimo, taip pat dėl didelio nefrotoksinių vaistų vartojimo [1, 140]. Pasaulinės sveikatos organizacijos 2019 metų duomenimis, inkstų ligos buvo dešimta pagal dažnumą mirties priežastis pasaulyje, sukeliančios 1,3 milijono mirčių per metus [141]. Šis skaičius toliau didėja, atspindėdamas ne tik didesnę inkstų pažeidimo paplitimą, bet ir ribotus gydymo būdus, kurie dažniausiai apsiriboja simptominiu gydymu ar dialize. ŪIP yra susijęs su didele rizika šiai būklei pereiti į lėtinę inkstų ligą (LIL), kuri dar labiau didina pacientų mirtingumą [142]. Remiantis moksliniais tyrimais, kasmet 13 milijonų žmonių patiria ŪIP, iš kurių 1,7 milijono miršta dėl tiesioginio ar netiesioginio poveikio, t. y. ligos komplikacijų [143].

Pastaruosius du dešimtmečius mokslininkai stengėsi surasti naujų būdų ŪIP gydymui ir LIL prevencijai, įskaitant inovatyvius metodus, naudojant kamienines ląsteles ar ląstelių komponentus, dėl jų gebėjimo moduluoti uždegimą, skatinti angiogenezę ir atkurti pažeistus audinius [9]. Bene didžiausias dėmesys regeneracinėje medicinoje iki šiol buvo skiriamas kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms [26–28, 33–37]. Šio tipo kamieninės ląstelės gali slopinti inkstų pažeidimą veikdamos į įgimtos imuninės sistemos reguliaciją, skatindamos inkstų regeneraciją ir užkirsdamos kelią inkstų audinių fibrozei [144]. Būtent dėl šios priežasties, disertaciniame darbe palyginimui su raumeninės kilmės kamieninėmis pirmtakinėmis ląstelėmis buvo pasirinktos plačiausiai inkstų regeneracijos srityje ištyrinėtos kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės.

Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės yra mezenchiminių kamieninių ląstelių linija, pasižyminti multipotentiškumu, ilgai išliekančiu proliferacijos potencialu, dideliu atsinaujinimo pajėgumu ir sukeliančiu endogeninių audinių atsistatymą [43, 59–61]. Iš griaučių raumenų išskirtos kamieninės ląstelės, buvo naudojamos raumenų, kaulų, kremzlės, raiščių, periferinių nervų ir kitų audinių regeneracijai ikiklinikiniuose tyrimuose [43, 59–62]. Dėl daug žadančių duomenų, mūsų eksperimentuose nuspręsta pritaikyti šį ląstelių tipą ŪIP gydymui ir inkstų regeneracijai ir kaip minėta anksčiau, palyginti jas su plačiai ištyrinėtomis kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis.

Disertacinio darbo *in vitro* tyrimų rezultatai parodė, kad tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymi labai panašiu imunofenotipu, genų ekspresija ir multipotentinės diferenciacijos potencialu. Raumeninės kilmės kamieninių

pirmtakinių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laikas buvo statistiškai reikšmingai trumpesnis nei kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių [64]. Tai rodo, jog iš griaučių skersaruožio raumens audinio išskirtų ląstelių proliferacijos greitis yra didesnis ir suteikia šioms ląstelėms pranašumą prieš iš kaulų čiulpų išskirtas kamienines ląsteles, nes reikšmingai didesnis ląstelių skaičius gali būti gaunamas per trumpesnę laiką.

Tyrimai *in vivo* atskleidė, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės reikšmingai pagreitina inkstų regeneraciją ir funkcinį atsistatymą po gentamicino sukkelto inkstų pažeidimo. Taip pat nustatyta, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės yra lygiavertės labiau ištyrinėtoms, kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms vertinant efektyvumą ir turi net tam tikrų privalumų klinikiu požiūriu (proliferacijos greitis, raumenų audinio prieinamumas ir kiekis). Ląstelių migracijos tyrimai parodė, kad abiejų tipų kamieninės ląstelės geba migruoti į pažeistus inkstų audinius, ir dalis jų inkorporuojasi inksto žievinėje dalyje [65].

#### **4.1. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių charakteristikos**

Disertacijos tyrimų rezultatai *in vitro* neprieštaruoja anksčiau atliktiems moksliniams tyrimams, vertinusiems raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių charakteristikas. Kaip aprašyta anksčiau, tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymėjo stipria CD90 žymens raiška, tačiau buvo neigiamos CD34 ir CD45 žymenims [11, 145, 146]. Ši savybė atitinka tarptautinius kriterijus, aprašytus Dominici *et al.* [147]. CD90 raiška dažnai laikoma mezenchiminių kamieninių ląstelių funkcijos ir regeneracinio potencialo žymeniu [148]. Valdivia *et al.* nustatė, kad CD90 padeda ląstelėms prisitvirtinti prie ekstraląstelinės matricos ir skatina jų migraciją į pažeistus audinius [149].

CD45 ir CD34 žymenų nebuvimas patvirtina, kad šios ląstelės nėra hematopoetinės kilmės. Kaip ir mūsų tyrime, taip ir ankstesniuose eksperimentuose nustatyta, kad tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminė kamieninės ląstelės geba diferencijuotis adipogenine, chondrogenine, osteogenine bei miogenine kryptimis *in vitro* [11, 145, 146].

Vienas svarbiausių raumeninės kilmės ir kaulų čiulpų kamieninių ląstelių skirtumų – jų proliferacijos greitis. Peng *et al.* atliktas tyrimas lygino mezenchiminių kamieninių ląstelių, išskirtų iš skirtingų šaltinių proliferacijos greitį. Šios grupės nustatytas kaulų čiulpų kamieninių ląstelių populiacijos padvigu-

bėjimo greitis atitiko mūsų tyrimų rezultatus (~61 val.) [150]. Įdomu, kad kai kuriuose tyrimuose nustatytas raumeninės kilmės kamieninių pirtakinių ląstelių proliferacijos greitis buvo net didesnis, nei mūsų atliktuose eksperimentuose, tačiau tam įtakos galėjo turėti skirtingas audinio donoro amžius<sup>09</sup> biopsijos paėmimo metu bei skirtinga kamieninių ląstelių išskyrimo metodika [151, 152].

Mūsų tyrimų rezultatai neprieštarauja anksčiau publikuotiems moksliniams darbams, kuriuose aprašoma, jog raumeninės kilmės kamieninių pirtakinių ląstelių populiacijos padvigubėjimo laikas yra statistiškai reikšmingai trumpesnis, lyginant su kaulų čiulpų raumeninėmis kamieninėmis ląstelėmis [145, 151]. Šie duomenys yra itin svarbūs tolimesniems ikiklinikiniams ir klinikiniams tyrimams ir tinkamiausios kamieninių ląstelių terapijos parinkimui klinikinėje praktikoje, nes reikiamas kamieninių ląstelių kiekis reikalingas gydymo tikslais gali būti gaunamas per reikšmingai trumpesnę laiką panaudojant raumeninės kilmės kamienines pirtakines ląsteles.

#### **4.2. Raumeninės kilmės kamieninių pirtakinių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijų taikymas ūminio inkstų pažeidimo gydymui**

Tyrimų *in vivo* metu buvo siekiama įvertinti raumeninės kilmės kamieninių pirtakinių ląstelių terapinį poveikį ŪIP gydymui bei palyginti su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis eksperimentiniame nefrotoksiškumo modelyje. Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad skiriant raumeninės kilmės kamieninių pirtakinių ląstelių terapiją laboratoriniams gyvūnams gentamicino sukulto ŪIP modelyje pasiekiamas greitas ir reikšmingas inkstų funkcijos pagerėjimas bei stebimas morfologinis inkstų atsistatymas.

Atsižvelgiant į tyrimų rezultatus daroma prielaida, kad tokį terapinį efektą nulėmė šių ląstelių gebėjimas migruoti į pažeidimo vietą, inkorporuotis į inksto žievės audinius ir sukelti antiapoptotinį poveikį. Antiapoptotinis mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikis gydant ŪIP aprašytas ne viename ankstesniame tyrime [31, 33, 34, 38, 115]. Taip pat nustatyta, kad raumeninės kilmės kamieninės pirtakinės ląstelės efektyvumo požiūriu yra lygiavertės kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapiniam poveikiui, nes nenustatyta jokių statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant šių skirtingų kamieninių ląstelių grupių rezultatus nei viename eksperimento taške [64, 65].

Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad raumeninės kilmės kamieninės pirtakinės ląstelės ir kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės reikšmingai sumažino kreatinino koncentraciją kraujo serume ir pagerino kreatinino klirensą ŪIP modelyje. Nustatyta, kad kaulų čiulpų mezenchiminės kamie-



ninės ląstelės veikia parakrininiu būdu, išskirdamos priešuždegiminius ir angiogeninius citokinus, tokius kaip VEGF, HGF ir IL-10, kurie mažina uždegimą ir skatina kraujotaką pažeistuose audiniuose [153]. Ankstesni tyrimai taip pat parodė, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės reguliuoja imuninį aktyvumą ir padidina šeiminko ląstelių augimo ir diferenciacijos potencialą per tiesioginį ląstelių kontaktą ir parakrininius mechanizmus, taip skatindamos pažeistų audinių regeneraciją [154].

Iki šiol nebuvo publikuota tyrimų, kurie vertintų raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių, išskirtų naudojant M. Lavasani metodiką [13], terapiją ŪIP gydymui. Nors Arriero *et al.* paskelbė mokslinį darbą, kuriame nebuvo nustatytas teigiamas iš griaučių raumens išskirtų kamieninių ląstelių terapijos poveikis ŪIP gydymui [121], tačiau tyrimo autoriai aiškiai pažymėjo kamieninių ląstelių išskyrimo metodikos ir jų fenotipo skirtumus lyginant su M. Lavasani atliktais tyrimais. Arriero mokslininkų grupė tyrimams naudojo raumeninės kilmės ląsteles, kurios pasižymėjo neigiama c-kit raiška ir silpna CD34 raiška, kai tuo tarpu šiame darbe išskirtos kamieninės ląstelės pasižymėjo neigiama CD34 raiška ir silpna c-kit ekspresija. Taip pat svarbu pažymėti, kad Arriero ir bendraautorių darbe buvo naudojamas inkstų išemijos pažeidimo modelis, tuo tarpu šiuose tyrimuose inkstų pažeidimas buvo sukeliamas toksinėmis gentamicino injekcijomis.

Kitas svarbus aspektas – naudota ląstelių dozė. Kamieninių ląstelių dozė gyvūnui disertacijos tyrimuose buvo naudojama 5 kartus didesnė nei anksčiau publikuotame tyrime ( $1 \times 10^6$  lyginant su  $2 \times 10^5$  ląstelių gyvūnui). Kaip jau minėta anksčiau, Arriero ir bendraautoriai nenustatė jokio teigiamo poveikio inkstų regeneracijai po nediferencijuotų kamieninių ląstelių terapijos, nors mūsų tyrimai atkleidė reikšmingą tokios terapijos įtaką inkstų funkcijos atsištamui ir regeneracijai. Šie skirtumai patvirtina ankstesnių tyrimų rezultatus ir parodo, kad griaučių raumu yra skirtingų ląstelių tipų šaltinis ir išskyrimo procedūra bei jos sąlygos yra svarbūs veiksniai siekiant išskirti reikiamo tipo kamienines ląsteles iš skersaruožių raumens audinių [61].

Svarbus iki šiol neišspręstas ir mokslinėje literatūroje plačiai diskutuojamas klausimas yra tinkamiausios ir efektyviausios kamieninių ląstelių terapijos parinkimas skirtinguose modeliuose ŪIP gydymui. Ankstesni tyrimai pademonstravo iš kaulų čiulpų [26–28, 33–37], riebalų [29, 105–107, 112–115] ir virkštelės kraujo [108, 109, 116–119] išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių efektyvumą ŪIP gydymui įvairiuose eksperimentinių gyvūnų modeliuose *in vivo*. Reikia pažymėti, kad ŪIP buvo sukeliamas skirtingomis nefrotoksinėmis medžiagomis, tokiomis kaip gentamicinas, cisplatina, folio rūgštis, taip pat taikant išemijos-reperfuzijos, rbdomiolizės, nudegimo ar sepsio sukulto ŪIP modelius, taigi ir ŪIP patogenezė buvo kiek skirtinga.

Gerai žinoma, kad kreatinino koncentracijos padidėjimas yra svarbus ŪIP rodiklis [155–157]. Mūsų tyrimuose nustatytas ryškus kreatinino koncentracijos šlapime sumažėjimas ir kreatinino koncentracijos kraujo serume padidėjimas po 8 eksperimento dienų atspindi tipinį gentamicino sukeltą inkstų pažeidimą, kaip aprašyta kitų autorių [33, 158, 159]. ŪIP charakteristikos plačiai aprašytos mokslinėje literatūroje, kur nurodoma, kad kreatinino koncentracijos pokyčiai koreliuoja su histologiniu inkstų pažeidimu [160].

Kaip minėta, mūsų atlikti tyrimai leido palyginti mezenchimines kamienines ląsteles išskirtas iš griaučių skersaruožių raumenų ir kaulų čiulpų. Tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės reikšmingai pagreitino inkstų funkcijos atsistatymą remiantis statistiškai reikšmingai sumažėjusia kreatinino koncentracija kraujo serume, padidėjusia kreatinino koncentracija šlapime ir kreatinino klirensu, praėjus 2 savaitėms po kamieninių ląstelių terapijos, lyginant su inkstų pažeidimo grupe, kuriai joks gydymas taikytas nebuvo. Analogiški tyrimų rezultatai publikuoti kitų mokslininkų grupių, kurios taikė kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapiją ŪIP gydymui ir inkstų regeneracijai eksperimentiniuose modeliuose *in vivo* [33, 35, 36, 38].

Nepaisant pažangos standartizuojant ŪIP kriterijus, jo apibrėžimas tebėra pagrįstas kreatinino kiekio serume ir šlapimo išsiskyrimo pokyčiais, kurie konkrečiai neatspindi kanalėlių funkcijos ar pažeidimo ir turi tam tikrų apribojimų diagnozuojant ŪIP [155]. Siekiant kuo anksčiau nustatyti inkstų funkcijos sutrikimus, naudojami nauji, tikslesni biožymenys, skirti prognozuoti ŪIP atsiradimą ir vystymąsi. Inkstų kanalėlių pažeidimo metu kraujo ir šlapimo biožymenys išsiskiria įvairiais mechanizmais. Inkstų pažeidimo molekulė-1 (KIM-1) išsiskiria iš proksimalinio kanalėlio, o su neutrofilų želatinaze susijęs lipokalinas (NGAL) išsiskiria iš distalinio kanalėlio. Transmembrinis glikoproteinas KIM-1 yra gerai ištyrinėtas ir patvirtintas ŪIP biožymuo [156]. NGAL yra pagrindinis polipeptidas, randamas kraujyje ir šlapime ŪIP vystymosi metu po išeminio ar toksinio inkstų pažeidimo [157]. Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad tiek raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių, tiek kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių skyrimas nulėmė statistiškai reikšmingą inkstų pažeidimo biožymenų KIM-1 bei NGAL sekrecijos sumažėjimą bei inkstų morfologijos atsistatymą.

Atliekant tyrimus, nenustatyta nei raumeninės kilmės, nei kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijos pranašumų vertinant funkcinius, biocheminius ir morfologinius inkstų pokyčius, todėl galima teigti, kad šios dvi kamieninių ląstelių terapijos turėtų būti laikomos lygiavertėmis ŪIP gydymui. Žvelgiant iš klinikinio panaudojimo perspektyvos, daugiau pranašumų visgi turi raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės. Kaip

minėta anksčiau, raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymi trumpesniu populiacijos padvigubėjimo laiku, todėl reikalingas ląstelių skaičius terapiniais tikslais gali būti pasiektas per trumpesnę laiką [64]. Taip pat pakankamai svarbus yra ir biopsijos paėmimo aspektas. Griaucių raumenų biopsija yra mažiau invazyvi ir mažiau skausminga, dėl to galėtų būti geriau toleruojama pacientų.

### **4.3. Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių pagrindu veikimo mechanizmas**

Tikslus kamieninių ląstelių terapijos veikimo mechanizmo nustatymas yra vienas didžiausių iššūkių regeneracinėje medicinoje, dėl kurio iki šiol neprieita bendro sutarimo. Mokslininkų nuomone, galimi du pagrindiniai veikimo mechanizmai: tiesioginis ląstelių poveikis, joms inkorporuojantis į pažeistus audinius ir diferencijuojantis į specializuotas audinių ląstelės [35, 39], bei netiesioginis, parakrininis/endokrininis poveikis, priklausantis nuo ląstelių sekretuojamų humoralinių veiksnių [33, 34, 39, 137]. Trofiniai veiksniai, kurie galimai dalyvauja inkstų regeneracijos procese, yra kraujagyslių endotelio augimo faktorius, fibroblastų augimo faktorius-2, į insuliną panašus augimo faktorius-1, hepatocitų augimo faktorius ir kt. [26, 28, 108].

Inkstų kanalėlių ląstelių apoptozė yra būdingas gentamicino sukeltos ŪIP požymis, dėl kurio sutrinka inkstų funkcija. Apoptozė vaidina svarbų vaidmenį organizmo audinių vystymesi ir homeostazėje, taip pat ir inkstų atsistatyme po ŪIP [161, 162]. Kitų autorių tyrimai rodo, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės išskirtos iš skirtingų audinių geba veikti per antiapoptotinę kelią ir tokiu būdu skatinti inkstų regeneraciją [31, 33, 34, 38, 115]. Analogiški rezultatai pademonstruoti ir panaudojant raumeninės kilmės kamienines pirmtakines ląsteles kitų organų ar audinių regeneracijai [163–165].

Mūsų tyrimų rezultatai neprieštarauja ankstesnių mokslinių publikacijų duomenims. Tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymėjo antiapoptotiniu poveikiu. Tai atspindi TUNEL dažymui teigiamų ląstelių procentinė išraiška 21 eksperimento dieną. Nors apoptozės pasireiškimas mažėjo visose tiriamosiose grupėse iki eksperimento pabaigos, tačiau kamieninių ląstelių terapijos grupėse jis buvo statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su inkstų pažeidimo grupe [65]. Tai reiškia, kad tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės statistiškai reikšmingai pagreitino inkstų regeneracinius procesus po ŪIP.

Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad tiek raumeninės kilmės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės geba migruoti į pažeidimo vietą

po sisteminės injekcijos. Nedidelė dalis jų aptiktos inkstų žievinėje dalyje ir praėjus 4 savaitėms nuo ląstelių terapijos skyrimo [65]. Šie rezultatai yra analogiški anksčiau atliktoms studijoms, kurios parodė mezenchiminių kamieninių ląstelių gebėjimą diferencijuotis į specializuotas inkstų ląsteles *in vivo* [35, 39].

Svarbu paminėti, kad net ir nedidelis ląstelių kiekis, kuris buvo aptiktas pažeistuose inkstų audiniuose, nulėmė reikšmingą funkcinę ir morfologinę inkstų atsistatymą, todėl negalima atmesti prielaidos, kad mezenchiminių kamieninių ląstelių veikimo mechanizmas yra kompleksinis. Šią prielaidą dar labiau sustiprina ir anksčiau aptarti antiapoptotinio mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikio rezultatai, bei kitų tyrėjų publikacijos, pagrindžiančios netiesioginę kamieninių ląstelių terapijos poveikį [33, 34, 137].

#### **4.4. Eksperimentinių terapijų kamieninių ląstelių pagrindu citokinetikos ypatumai**

Siekiant geriau suprasti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių citokinetikos ypatumus ir galimą veikimo mechanizmą regeneruojant pažeistus inkstų audinius, prieš injekcijas ląstelės buvo pažymimos membrininiais fluorescuojančiais PKH-26 dažais ir sekamas jų judėjimas *in vivo* skirtinguose eksperimento taškuose. Rezultatai parodė, kad tik nedidelis ląstelių skaičius buvo stebimas inkstų žievinėje dalyje, tačiau net ir šis sąlyginai nedidelis ląstelių kiekis buvo aptinkamas inkstuose iki pat eksperimento pabaigos, t. y. praėjus mėnesiui po kamieninių ląstelių injekcijos [65].

Nors ankstesnės studijos pademonstravo mezenchiminių kamieninių ląstelių gebėjimą diferencijuotis į inkstų epitelio ląsteles [39] ar mesangialines ląsteles [25], naujausi įrodymai rodo, kad jų diferenciacijos galimybės yra ribotos, kadangi jos nesidiferencijuoja į inkstų parenchimos ląsteles *in vivo*. Dėl šios priežasties labiau tikėtinas veikimo mechanizmas yra kompleksinis ir siejamas su ląstelių išskiriamų parakrinių veiksnių poveikiu [36–38, 105, 107, 108].

#### **4.5. Atliktų tyrimų privalumai ir trūkumai**

Mūsų tyrimai atskleidė reikšmingos naujos informacijos taikant raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių terapiją ŪIP gydymui. Visų pirma, nors iš skersaruožių griaučių raumenų ir iš kaulų čiulpų išskirtos kamieninės ląstelės plačiai tyrinėtos *in vitro*, tačiau iki šiol nebuvo publikuota palyginamųjų straipsnių, vertinusių šiuos ląstelių tipus, išskirtus iš žiurkės audinių. Antra, mūsų žiniomis, mes buvome pirmoji mokslininkų grupė

įrodžiusi, kad raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės yra alternatyvus mezenchiminių kamieninių ląstelių šaltinis ŪIP gydymui, turintis keletą pranašumų, lyginant su kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis, įskaitant skeleto raumenų audinio gausą ir prieinamumą ląstelių išskyrimui, palyginti lengvus ląstelių izoliavimo ir padauginimo būdus ir, svarbiausia, didesnę proliferacijos greitį [64, 65]. Dėl šių priežasčių raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių terapija gali būti laikoma potencialia kandidate ŪIP gydymui ir prevencijai, ir turėtų būti toliau tyrinėjama ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose.

Be mūsų tyrimų naujumo ir teigiamų rezultatų, liko neatsakytų klausimų, į kuriuos turėtų būti nukreipti tolimesni tyrimai. Raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių terapijos veikimo mechanizmas ir jo kompleksškumas turėtų būti plačiau analizuojamas įtraukiant kitus galimus veikimo kelius, tokius kaip oksidacinio streso ir uždegiminių reakcijų supresija, taip pat citokinų, chemokininų ir mediatorių sekrecija. Šie galimi mechanizmai tyrinėti ir patvirtinti taikant kaulų čiulpų mezenchimines kamienines ląsteles ŪIP nefrotoksiškumo modeliuose *in vivo* [36, 37].

Taip pat, būtina atlikti tolesnius tyrimus, siekiant nustatyti tinkamiausią kamieninių ląstelių terapijos skyrimo būdą (intraveninė injekcija, intraparenchiminė injekcija ar kt.), bei palyginti galimus skirtumus. Tuo pačiu, svarbu plačiau nustatyti bei parinkti optimalią ląstelių terapijos dozę. Savo tyrimuose dozės parinkimą atlikome remdamiesi anksčiau publikuotų studijų duomenimis [34, 107, 137, 138]. Tačiau svarbu įvertinti, kaip keičiasi kamieninių ląstelių terapijos efektyvumas skiriant skirtingas dozes bei taikant skirtingą terapijos režimą, pvz., pakartotines kamieninių ląstelių injekcijas.

## IŠVADOS

- 1.1. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės bei kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo tipinės morfologijos ir pasižymėjo mezenchiminių žymenų CD59 ir CD90 raiška ir nepasižymėjo hematopoetinių ir endotelinių žymenų CD45 ir CD34 raiška. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės taip pat pasižymėjo teigiama desmino raiška, ir silpna c-kit raiška.
- 1.2. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymi statistiškai reikšmingai trumpesniu populiacijos padvigubėjimo laiku lyginant su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis.
- 1.3. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesne regeneracijos OCT4 geno raiška lyginant su kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis.
- 1.4. Tiek raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės, tiek kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės yra multipotentinės, nes yra osteogeninės, chondrogeninės, adipogeninės ir miogeninės.
2. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės pagreitina funkcinį ir morfologinį inkstų atsistatymą, nes sukelia statistiškai reikšmingus kraujo serumo ir šlapimo kreatinino koncentracijų ir kreatinino klirenso, inkstų morfologijos ir pažeidimo balo, bei apoptozės pasireiškimo pokyčius 21 eksperimento dieną, ir inkstų pažeidimo žymenų pokyčius šlapime – KIM-1 11 eksperimento dieną, NGAL – 21 eksperimento dieną.
3. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės yra lygiavertės kaulų čiulpų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms vertinant jų efektyvumą, dėl to jų terapija gali būti laikoma potencialia kandidate ūminio inkstų pažeidimo gydymui.
4. Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės geba migruoti į pažeistus inkstų audinius po sisteminės injekcijos ir nedidelė jų dalis inkorporuojasi inkstų žievinėje dalyje bei išlieka inkstų parenchimoje per visą eksperimento laikotarpį – 35 dienas.

## PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Raumeninės kilmės kamieninės pirmtakinės ląstelės turi potencialo inkstų regeneracijos srityje. Tolimesniais tyrimais turėtų būti siekiama:

1. Nustatyti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių galimus veikimo mechanizmus ir detaliau ištirti šių ląstelių inkorporavimąsi į pažeistus inksto audinius;
2. Ištirti šių kamieninių ląstelių farmakokinetikos skirtumus vietinių ir sisteminių injekcijų atvejais;
3. Išsiaiškinti terapinio poveikio skirtumus taikant vienkartinę ir kartotines raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių injekcijas;
4. Įvertinti terapinio poveikio skirtumus taikant kamienines ląsteles derinyje su antioksidacinį poveikį turinčiomis veikliosiomis medžiagomis, siekiant pagerinti ląstelių išgyvenamumą po sisteminės injekcijos.
5. Patvirtinti raumeninės kilmės kamieninių pirmtakinių ląstelių apsauginį poveikį lėtinio inkstų funkcijos nepakankamumo vystymuisi po ūminio inkstų pažeidimo.

# SUMMARY

## INTRODUCTION

In recent years, a promising approach to manage acute kidney injury (AKI) is the use of mesenchymal stem cells (MSCs), also known as mesenchymal stromal cells. MSCs are undifferentiated, self-renewable, adult stem cells of mesodermal origin. These multipotent stem cells are broadly distributed in the body, can be easily isolated from various tissues, such as bone-marrow, fat, muscle, umbilical cord blood, and have the capacity to differentiate into both mesenchymal and non-mesenchymal lineages [12–22]. MSCs have been reported to promote regenerative responses, leading to tissue repair and improved renal function in animal models of renal damage such as cisplatin, gentamicin, mercuric chloride, folic acid, intramuscular glycerol or ischemia-reperfusion induced AKI [27–30, 87, 105, 108].

One of the most thoroughly investigated type of MSCs in renal regeneration is bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Many studies have demonstrated the efficacy of BM-MSCs in the treatment of AKI in different animal models [33–38]. It was shown, that BM-MSCs are capable of direct incorporation and differentiation into different renal cell types [39]. BM-MSCs were also reported to suppress apoptosis, inflammation, oxidative stress and to increase production of growth factors [33, 34, 36–38]. The combination of these effects results in functional and morphological renal recovery, defined by decreased kidney necrosis and fibrosis, decreased peak plasma creatinine and serum urea nitrogen, prolonged survival and reduced mortality of animals in experimental studies.

MSCs derived from the postnatal skeletal muscle using pre-plate isolation technique are known as the skeletal muscle-derived stem/progenitor cells (MDSPCs) [13, 42]. These slowly adhering cells are supposedly resided in the perivascular niche. MDSPCs are characterized by multipotency, long-term proliferation and self-renewal capacities [43, 59, 60]. The most important properties of MDSPCs include their resistance to oxidative and inflammatory stress, induction of neovascularisation and stimulation of regeneration of various tissues, such as bone, cartilage, skeletal and cardiac muscles. Taking into account the above-mentioned properties of MDSPCs, it was hypothesized that this stem cell type might be an alternative to BM-MSCs for kidney regeneration.



## THE AIM AND OBJECTIVES OF THE STUDY

### The aim of the study

To develop an experimental treatment for acute kidney injury using muscle-derived stem/progenitor cells, to evaluate their cytokinetic properties and effectiveness in an acute kidney injury model *in vivo*.

### The objectives of the study

1. To isolate, culture, thoroughly characterize, and compare muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells by assessing stem cell morphology, proliferation potential, phenotype, gene expression, and multipotency.
2. To assess the therapeutic effect of muscle-derived stem/progenitor cells experimental therapy for kidney regeneration after acute kidney injury in gentamicin induced nephrotoxicity model *in vivo*.
3. To compare efficacy of muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells based experimental therapies in acute kidney injury model *in vivo*.
4. To assess and compare pharmacokinetics of muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells.

## SCIENTIFIC NOVELTY OF THE STUDY

Despite innovations in the field of medicine and improvements in health care worldwide, the incidence of AKI continues to increase every year. This is caused by an aging population and an increase in the incidence of chronic diseases. The most common causes of acute renal failure in hospitals include decreased renal perfusion, septic shock, use of contrast agents, use of drugs with nephrotoxic effects, major surgical interventions, etc. [5, 6, 53–55]. Although the understanding and knowledge of the risk factors, causes and pathophysiology of AKI are expanding, the diagnosis of AKI is improving, and the options for prevention and treatment are still limited [56].

Recent evidence suggests that mesenchymal stem cells are beneficial for renal regeneration by secreting paracrine factors and extracellular vesicles into recipient kidney cells and are considered a promising cell therapy for CKD [57]. Preclinical studies show that mesenchymal stem cell therapy has a positive effect on renal regeneration through various mechanisms, inducing anti-inflammatory, anti-apoptotic, oxidative stress-reducing, anti-fibrotic, immunomodulatory and pro-angiogenic effects on renal tissues [58].

One of the unanswered questions related to the application of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of CKD is the selection of the most appropriate cell source. Mesenchymal stem cells can be isolated from tissues such as bone marrow, fat, skeletal striated muscle, periosteum, umbilical cord blood [12–22]. Muscle-derived stem/progenitor cells isolated from skeletal striated muscles are multipotent, have long-lasting proliferation potential, high regenerative capacity and cause endogenous tissue repair by releasing trophic factors. Cells isolated from skeletal muscle have been used to regenerate tissues such as muscle, bone, cartilage, ligaments, and peripheral nerves [43, 59–62]. This cell type fulfils many of the requirements of the International Society for Cell Therapy for multipotent mesenchymal stem cells and was therefore chosen in our studies [63].

In the first phase of *in vitro* studies, we aimed to isolate, culture and comprehensively characterize muscle-derived stem/progenitor cells and compare them with bone marrow mesenchymal stem cells in terms of their morphology, proliferative potential, surface marker phenotype, gene expression and multipotency. Since bone marrow mesenchymal stem cells have been perhaps the most widely used stem cell therapy in preclinical studies of AKI to date, we aimed to determine whether our selected muscle-derived stem/progenitor cells could be a suitable alternative for the treatment of AKI based on the properties of these cells.

In a second phase of *in vivo* studies, we aimed to elucidate the effect of muscle-derived stem/progenitor cell therapy on the regeneration of the damaged kidney after gentamicin-induced acute kidney injury. Although skeletal muscle-derived stem cell therapy has been widely explored in experimental studies, muscle-derived stem/progenitor cells have not been used to treat AKI to date.

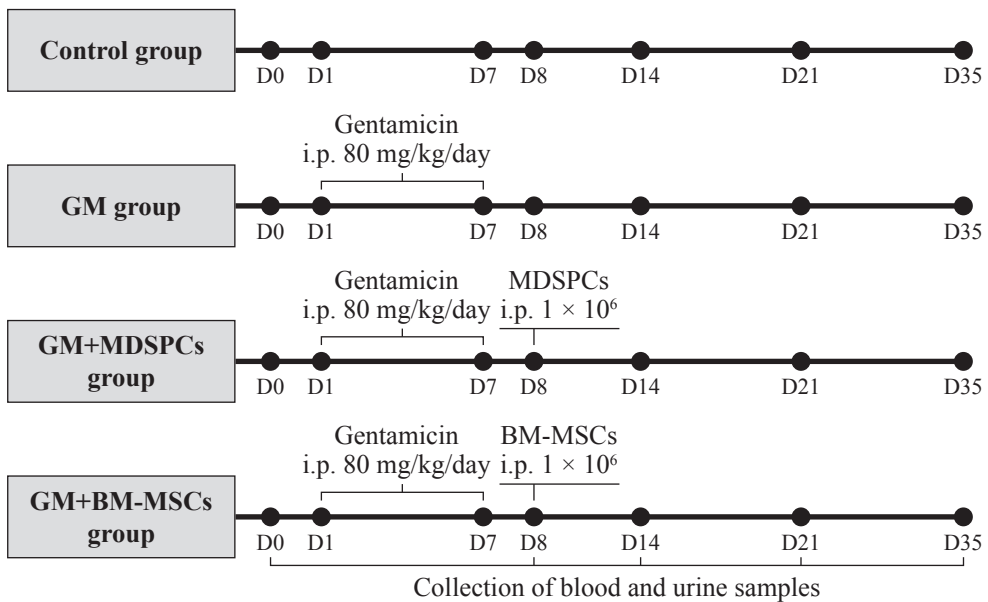
In the third stage of *in vivo* studies, we wanted to compare the differences in the therapeutic efficiency of muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells in an acute kidney injury model, and to evaluate and compare the cytokinetic features of these cells.

To our knowledge, we were the first group of researchers to demonstrate that muscle-derived stem/progenitor cells are an alternative source of mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney injury, with several advantages compared to bone marrow stem cells, including the abundance and availability of skeletal muscle tissue for cell isolation compared to facile techniques for cell isolation and propagation and, most importantly, higher proliferation rates [64, 65].

## MATERIALS AND METHODS

All experiments were performed using Wistar rats. All study-related procedures were approved by the Animal Health and Welfare Department, State Food and Veterinary Service of Lithuania (No. G2-21). MDSPCs [13] and BM-MSCs [16] were isolated according to the previously published protocols. The characteristics of rat MDSPCs and BM-MSCs were assessed by the population doubling time (PDT), immunofluorescence, flow cytometry, multipotent differentiation capacity and RT-PCR, as previously described by our research group [64].

For the experiments *in vivo* 8–12-week-old female Wistar rats weighing 150 to 250 g were used. AKI was induced by intraperitoneal gentamicin injection at 80 mg/kg daily for 7 consecutive days. The AKI model design was based on our previous experiments [64, 136]. In order to investigate the effects of MDSPCs and BM-MSCs in the gentamicin-induced AKI animal model, the rats were randomly divided into 4 groups ( $n = 6$  for each group per time point) as shown in Fig. 1.



**Fig. 1.** Experimental study design flowchart [65]

GM group was treated with gentamicin injections only, GM+MDSPCs and GM+BM-MSCs groups received gentamicin injections plus MDSPCs or BM-MSCs injection respectively. A single injection of either MDSPCs, or BM-MSCs ( $1 \times 10^6$  cells/500  $\mu$ L serum-free medium) was administered intra-

venously into the tail vein 24 hours after the last gentamicin injection. The stem cells concentration was chosen according to previous protocols [34, 107, 137, 138]. The control group animals were healthy rats kept under same conditions, without administration of either gentamicin, or stem cells. Blood, urine and tissue samples were collected for the determination of the renal function and tissue damage. The rats were euthanized on day 8 for the validation of the nephrotoxicity and AKI, later on day 14, day 21 and day 35 of the experiment.

Blood and 24-h urine samples were collected for the analysis of urinary ( $U_{Cr}$ ) and serum ( $S_{Cr}$ ) creatinine levels. Creatinine clearance ( $C_{Cr}$ ) was calculated. Samples were analysed using automatic biochemistry analyser COBAS INTEGRA 400 plus (Tegimenta Ltd Roche, Switzerland). Kidney injury molecule-1 (KIM-1) and Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) secretion changes in urine were determined by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Kidney specimens were sectioned at 5  $\mu$ m and then stained with haematoxylin and eosin (HE) for light-microscopy analysis. Tubular injury was scored by calculating the percentage of affected tubules. The whole tubule numbers per field were considered as standard. Apoptosis was determined by a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labelling (TUNEL) assay kit (Molecular Probes Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. Apoptosis was scored by calculating the percentage of TUNEL-positive cells. The whole cell numbers per field were considered as standard.

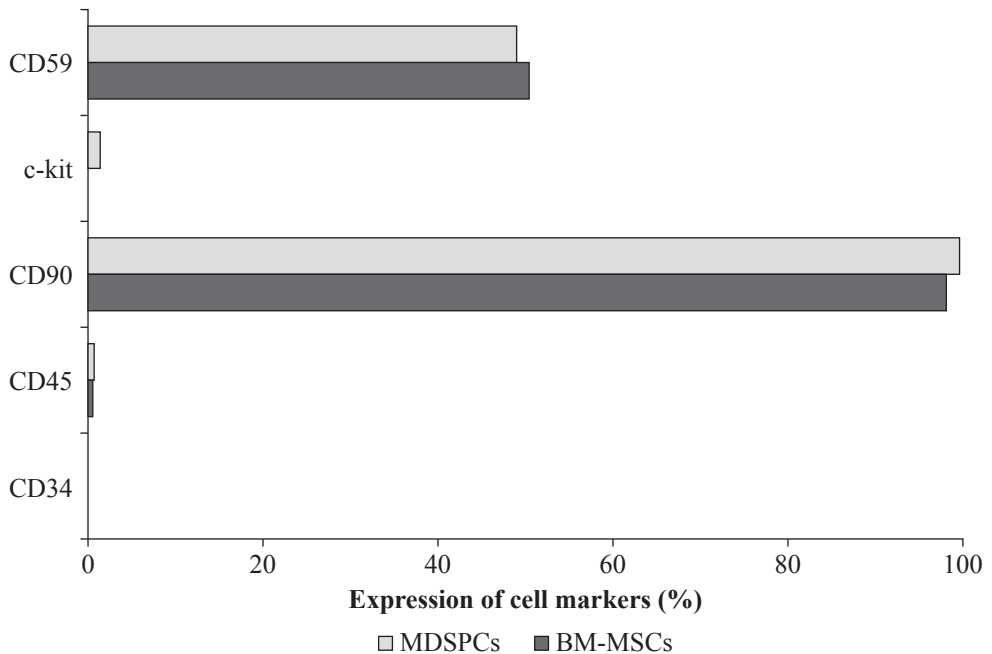
For *in vivo* tracking, MDSPCs and BM-MSCs were labelled with the red fluorescent membrane dye PKH26 according to the instructions provided by the manufacturer (Sigma-Aldrich) just prior the injection. The rats were sacrificed 7, 14 and 28 days after MDSPCs administration (on day 14, day 21 and day 35 of the experiment), the kidney samples were snap frozen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until examination. The frozen samples were sectioned at 5  $\mu$ m, the nuclei were stained with DAPI. Fluorescent microscopy was performed with Olympus IX73 microscope using QCapture Pro 7 image and analysis software.

Statistical data analysis was performed using the SPSS Statistics 17.0. All quantitative data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Student's t test was used for comparison between the 2 groups. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD post hoc test were used for multi-group comparison. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

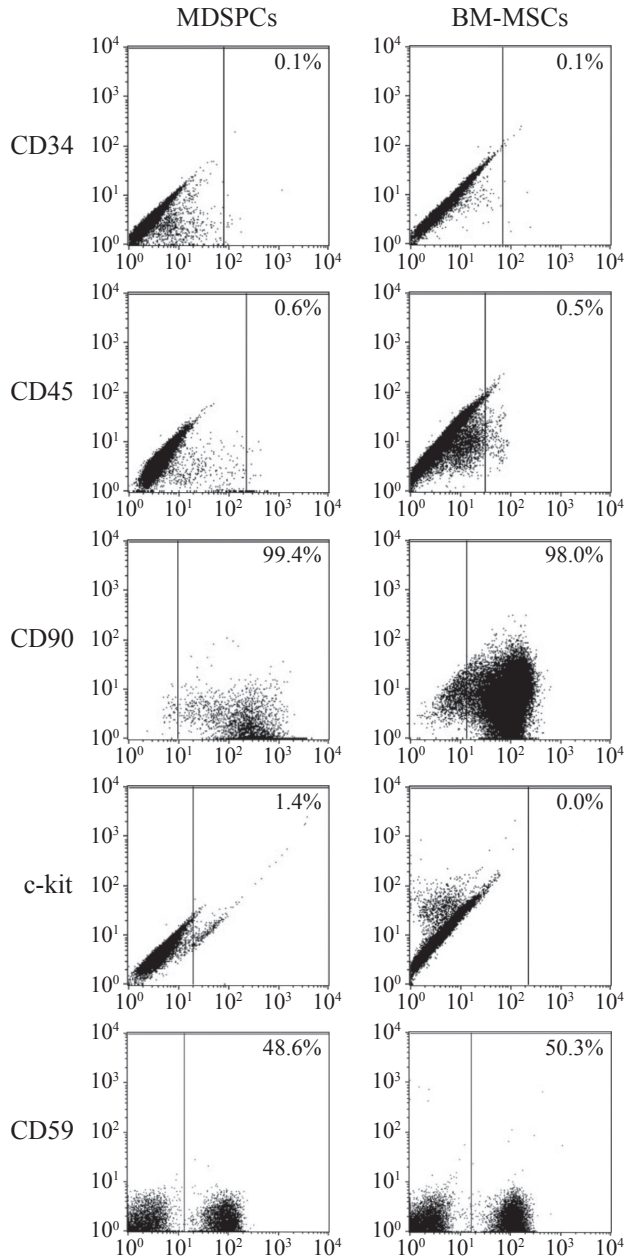
## RESULTS

### Characteristics of MDSPCs and BM-MSCs

MDSPCs are morphologically round, spindle-shaped, or triangular. BM-MSCs are morphologically round or spindle-shaped. MDSPCs were found to have significantly lower PDT in comparison with BM-MSCs ( $p = 0.001$ ). Both MDSPCs and BM-MSCs isolated from rats were found to be highly positive for CD90 and negative for CD34 and CD45 (as shown in Fig. 2 A and B).

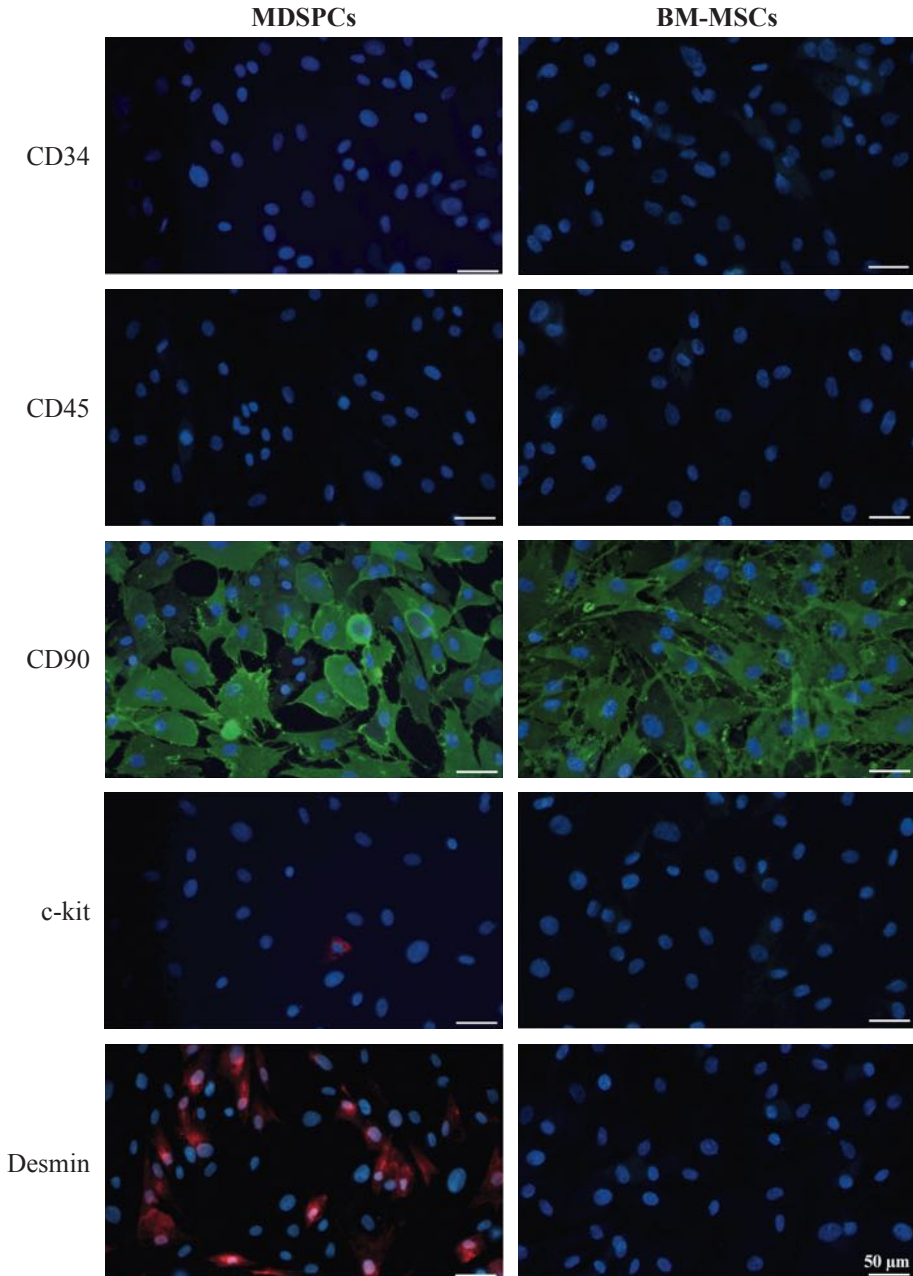


**Fig. 2 (A).** Immunophenotype of MDSPCs and BM-MSCs assessed by flow cytometry [64]



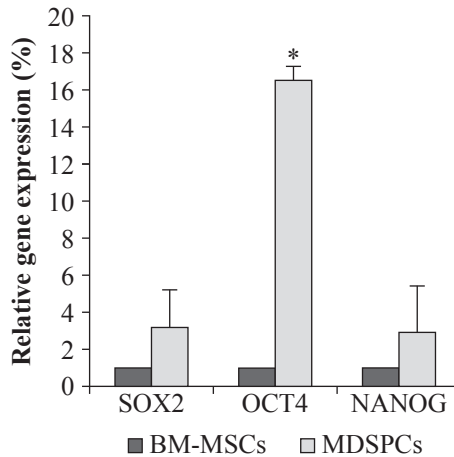
**Fig. 2 (B).** Immunophenotype of MDSPCs and BM-MSCs assessed by flow cytometry [64]

MDSPCs were also positive for desmin, showing their origin from the muscle tissue, and have shown weak c-kit expression (as shown in Fig. 3). The expression of these markers has not been determined in BM-MSCs.



**Fig 3.** Immunophenotype of MDSPCs and BM-MSCs assessed by immunofluorescence [64]

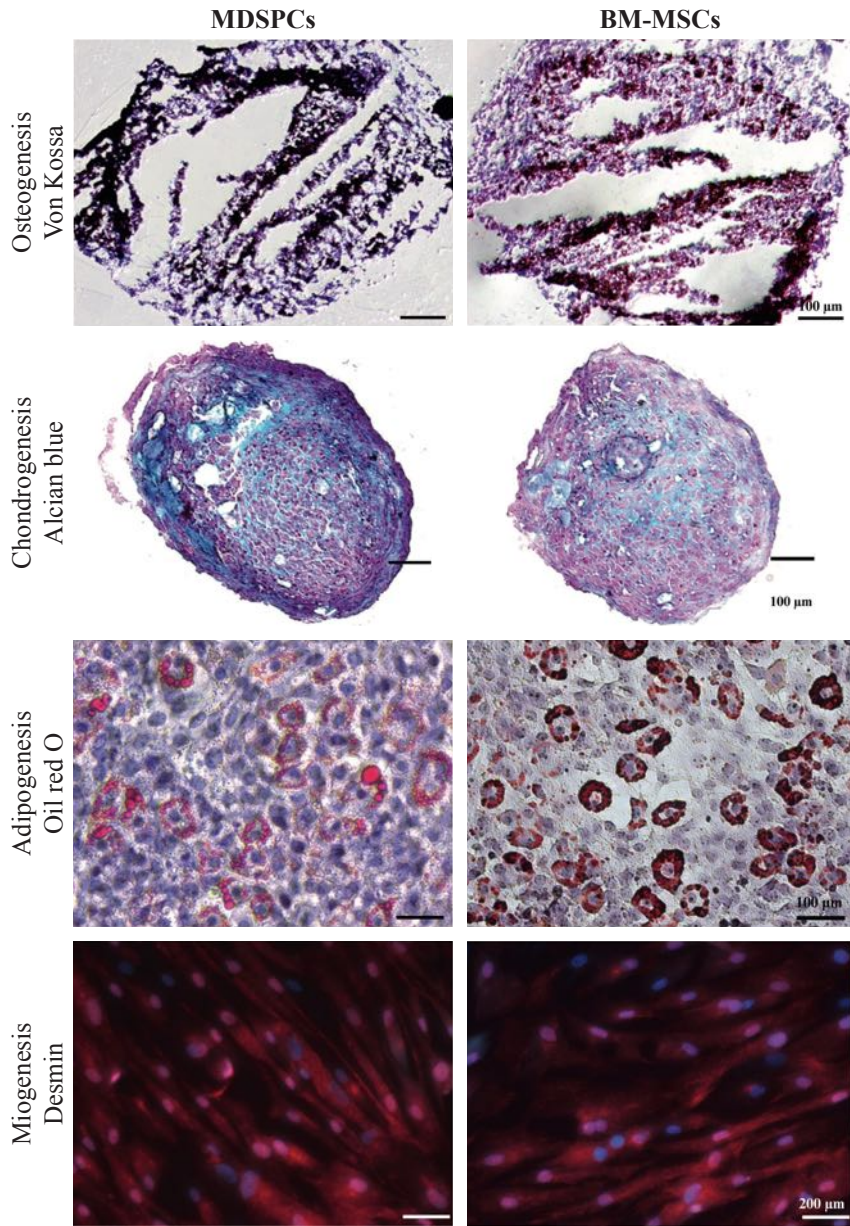
While MDSPCs had a significantly higher expression of OCT4, NANOG and SOX2 expression in comparison to BM-MSCs, the significant difference was found only for OCT4 ( $p = 0.037$ ) as shown in Fig. 4.



**Fig. 4.** Relative gene expression of MDSPCs and BM-MSCs ( $*p < 0.05$ ) [64]

Both cell types were also capable of adipogenic, chondrogenic, osteogenic and myogenic differentiation *in vitro* as shown in Fig. 5. The detailed characteristics of both cell types are presented in our previous scientific publication [64].





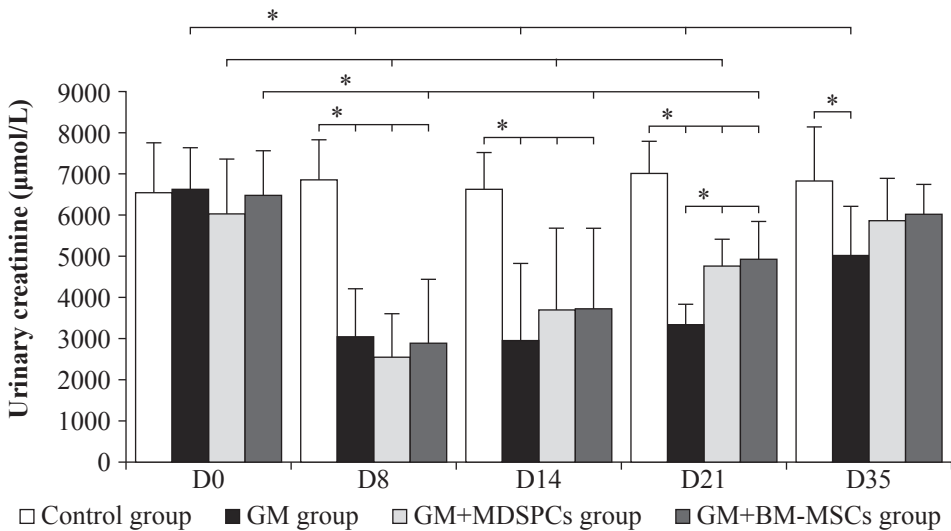
**Fig. 5.** Multipotent differentiation of MDSPCs and BM-MSCs [64]

## Effects of MDSPCs and BM-MSCs on kidney function after AKI

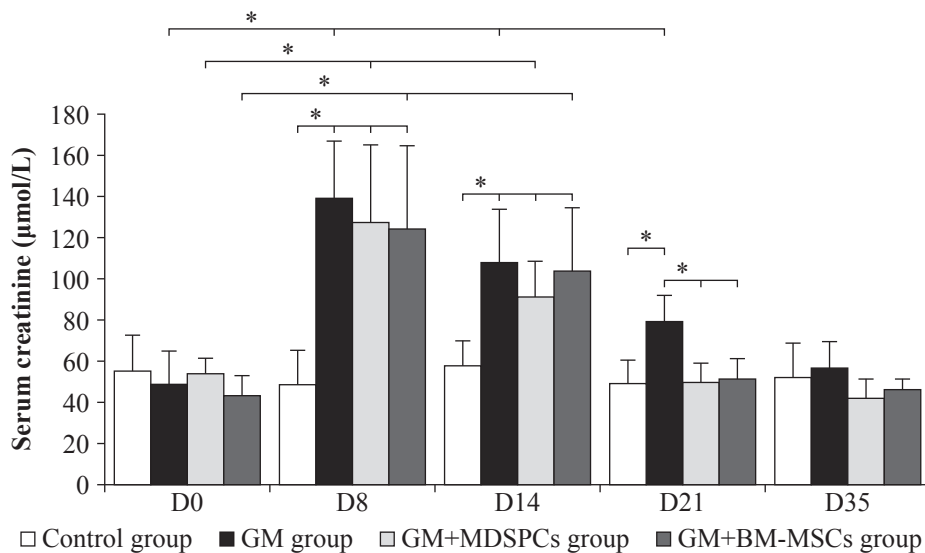
Five time points (day 0, 8, 14, 21, 35) were chosen for determination of the serial changes in rat serum and urinary levels of creatinine and creatinine clearance. There was no significant difference in any parameters at any time point in control group animals. Similarly, no significant differences were found between all 4 groups on day 0. There was no significant difference in any parameters on day 0, 8 and 14 between GM, GM+MDSPCs and GM+BM-MSCs groups ( $p > 0.05$ ).

The physiological and functional changes were present in rats from the GM, GM+MDSPCs and GM+BM-MSCs groups on day 8 and 14, demonstrating gentamicin-induced acute kidney injury and these differences were statistically significant in comparison with parameters on day 0 within the group ( $p < 0.05$ ) and in comparison, with control group on day 8 and 14 ( $p < 0.05$ ).

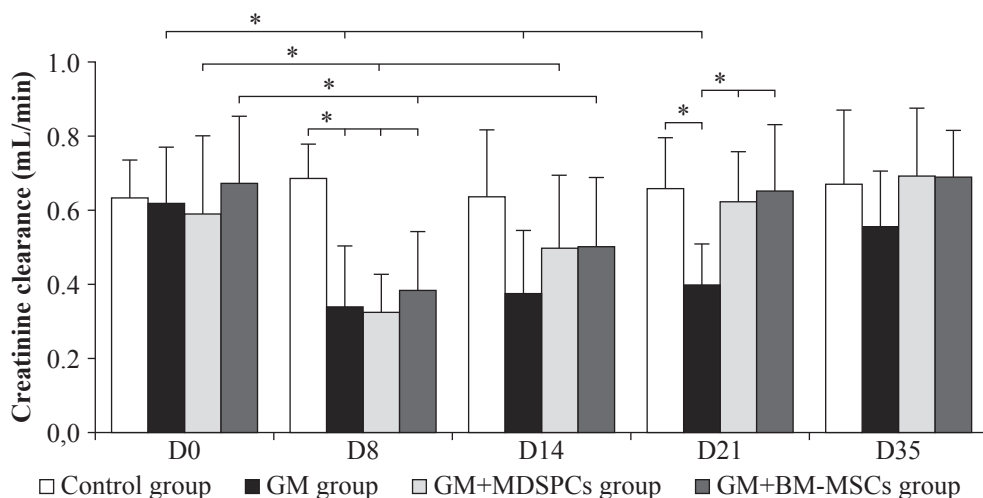
As shown in Figs. 6–8, both MDSPCs and BM-MSCs accelerated the recovery after AKI, as reflected by significantly lower serum creatinine ( $p < 0.05$ ), increased urinary creatinine levels ( $p < 0.05$ ) and creatinine clearance ( $p < 0.05$ ) compared with the GM group rats, not treated with MDSPCs or BM-MSCs.



**Fig. 6.** Changes in urinary creatinine concentration ( $*p < 0.05$ ) [65]



**Fig. 7.** Changes in serum creatinine concentration (\* $p < 0.05$ ) [65]

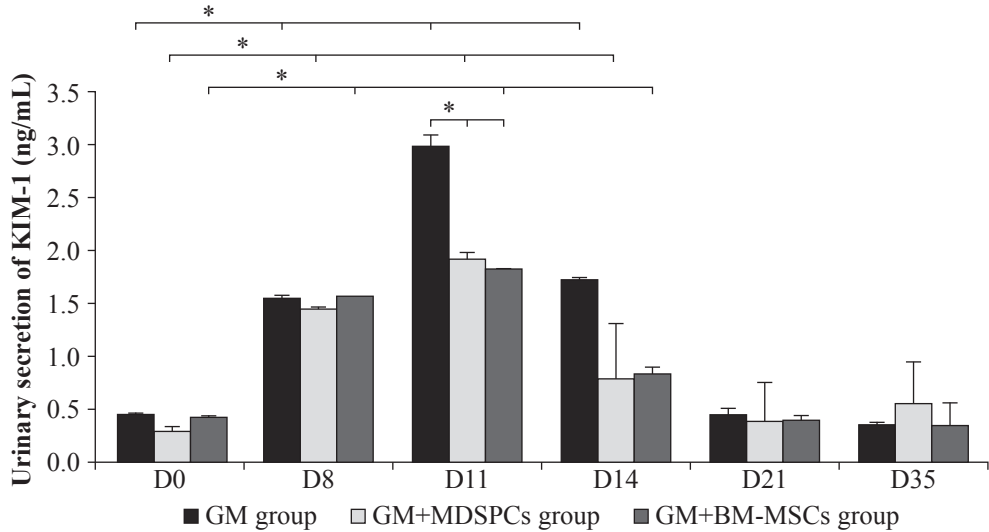


**Fig. 8.** Changes in creatinine clearance (\* $p < 0.05$ ) [65]

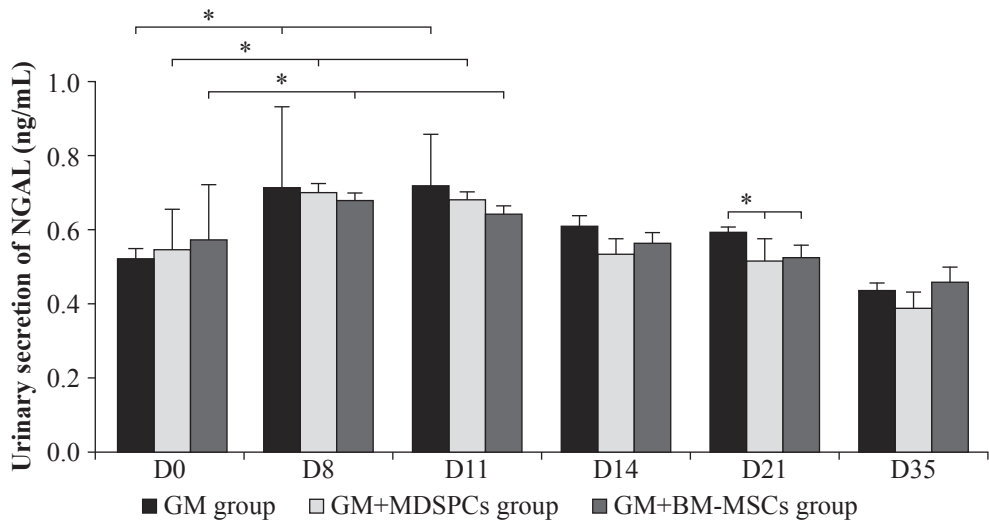
### Effects of MDSPCs and BM-MSCs on KIM-1 and NGAL secretion

Quantification of urinary KIM-1 and NGAL by ELISA showed a statistically significant increase in urine of rats treated with 80 mg/kg gentamicin. The increase of urinary proteins KIM-1 and NGAL was statistically significant 7 days after treatment in rats from the GM, GM+MDSPCs and GM+BM-MSCs, demonstrating gentamicin-induced acute kidney injury.

As shown in Figs. 9 and 10, both MDSPCs and BM-MSCs had the beneficial effect on kidney recovery after AKI, as reflected by significantly lower KIM-1 secretion on day 14 ( $p < 0.05$ ) and NGAL secretion on day 21 ( $p < 0.05$ ), compared with the GM group rats, not treated with neither MDSPCs, nor BM-MSCs.



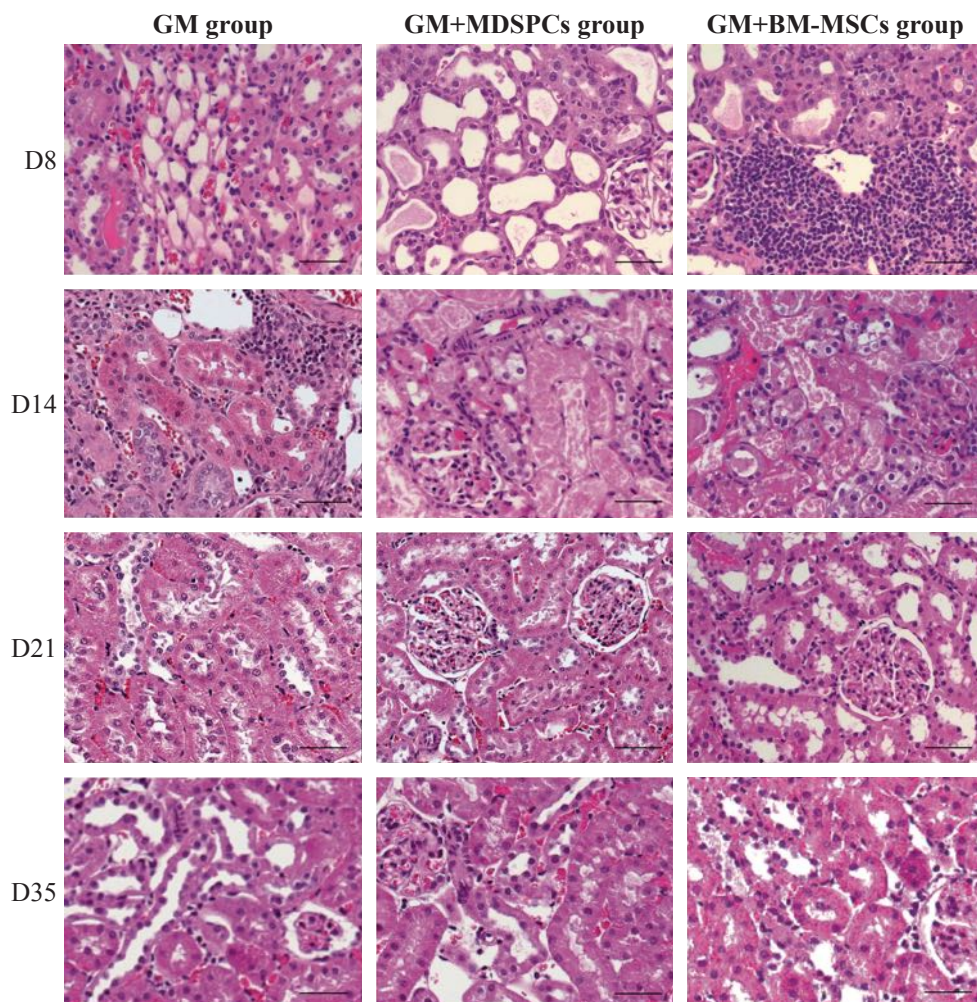
**Fig. 9.** Changes in urinary KIM-1 secretion ( $*p < 0.05$ ) [65]



**Fig. 10.** Changes in urinary NGAL secretion ( $*p < 0.05$ ) [65]

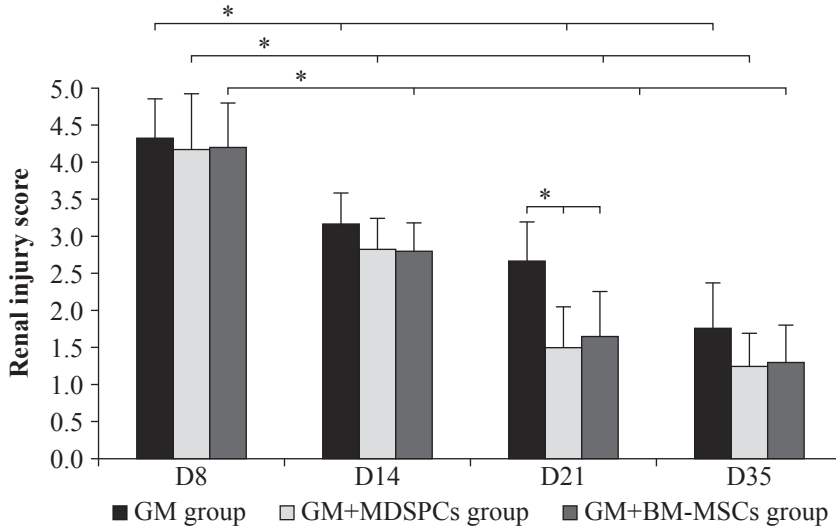
## Effects of MDSPCs and BM-MSCs on kidney histology after AKI

Gentamicin injections at 80 mg/kg for 7 consecutive days caused typical aminoglycoside-induced AKI, including the tubular necrosis, cast formation, loss of brush border in the renal tubules and tubular dilatation. Even though 7 days after the last gentamicin injection kidney injury was considerably decreased in GM+MDSPCs and GM+BM-MSCs groups in comparison to GM group, this difference was not statistically significant.



**Fig. 11.** Morphological changes of kidney; images are 20 $\times$  magnification (scale bar is 50  $\mu$ m) [65]

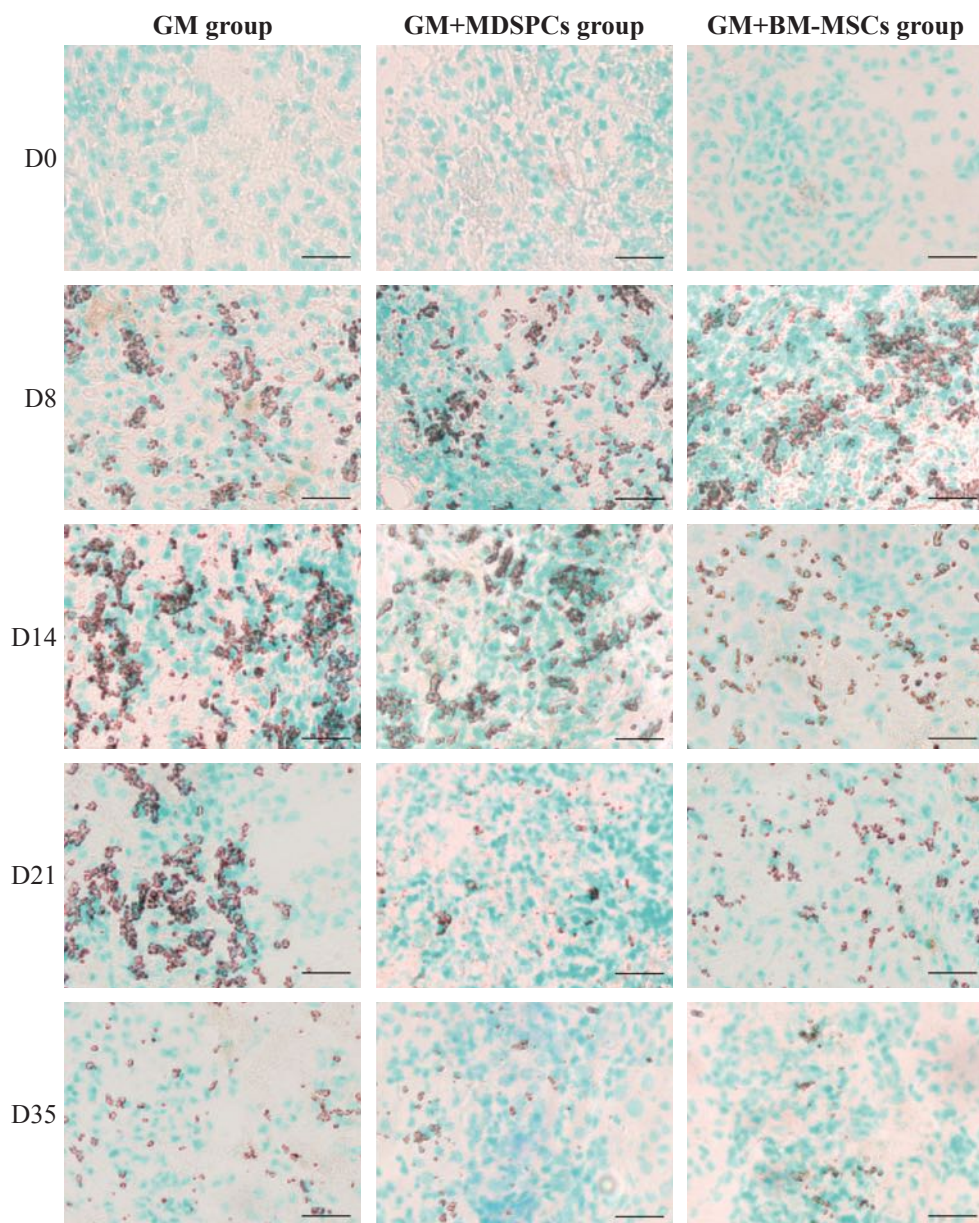
MDSPCs injection significantly attenuated renal tubular damage, as shown by the kidney histology (Fig. 11) and significantly lower renal injury (Fig. 12) score in the GM+MDSPCs and GM+BM-MSCs groups, compared with the injury score in the GM group after 21 days of the experiment (2 weeks after the injection of MDSPCs).



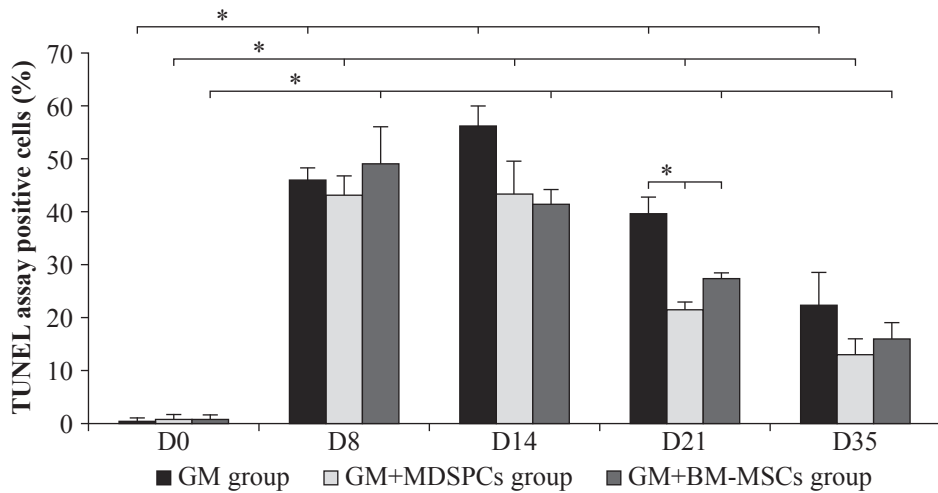
**Fig. 12.** Changes in renal injury score (\* $p < 0.05$ ) [65]

### Anti-apoptotic effects of MDSPCs and BM-MSCs

The results indicate that both mesenchymal stem cell types, MDSPCs and BM-MSCs promote regeneration and exert an anti-apoptotic effect in gentamicin-induced nephrotoxicity and acute kidney injury (Figs. 13 and 14). Moreover, TUNEL assay showed significantly reduced percentage of apoptotic cells in MDSPCs ( $p < 0.05$ ) and BM-MSCs ( $p < 0.05$ ) treated animal kidney sections as compared to GM group on day 21 (GM+MDSPCs  $21.53 \pm 1.34\%$ , GM+BM-MSCs  $27.35 \pm 0.97\%$  vs. GM group  $39.66 \pm 3.14\%$  TUNEL positive cells) and day 35 (GM+MDSPCs  $12.99 \pm 2.90\%$ , GM+BM-MSCs  $16.02 \pm 2.95\%$  vs. GM group  $22.38 \pm 5.98\%$  TUNEL-positive cells).



**Fig. 13.** Manifestation of apoptosis in kidney; images are 10× magnification (scale bar is 100 μm) [65]

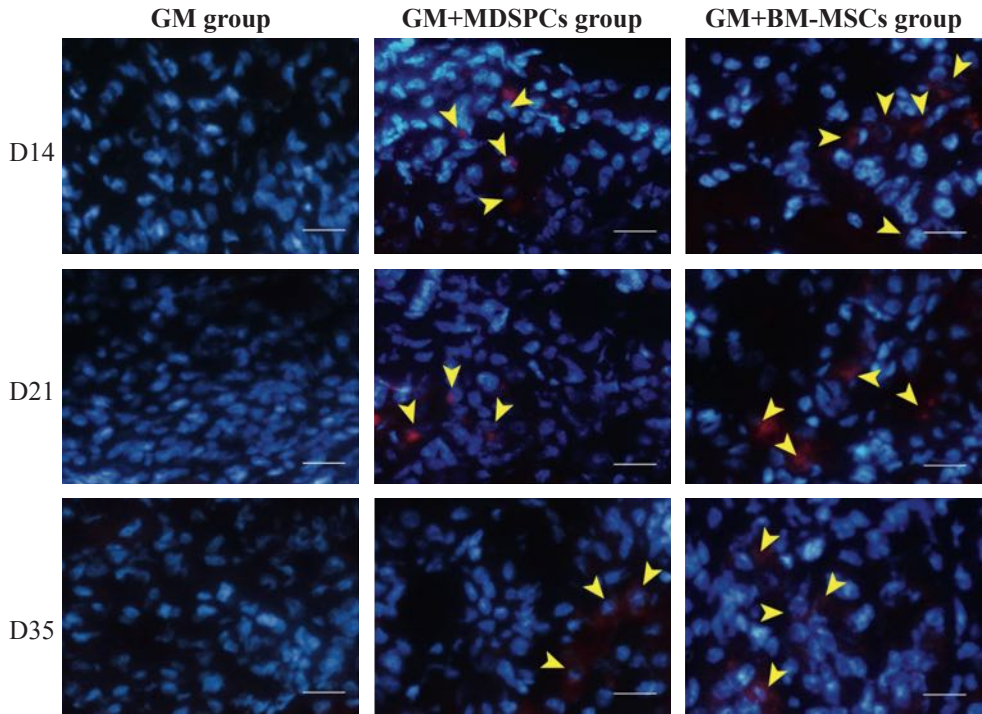


**Fig. 14.** Changes in percentage of TUNEL assay positive apoptotic cells ( $*p < 0.05$ ) [65]

### Tracking of MDSPCs and BM-MSCs *in vivo*

The existence of MDSPCs and BM-MSCs in the renal tissue was evaluated by the presence of PKH-26-labeled cells in the kidney sections on day 14, day 21 and day 35 of the experiment. PKH-26-labeled MDSPCs and BM-MSCs were identified within the renal cortex and localized around the renal tubules and the interstitial compartment of the kidney (as shown by yellow arrows in Fig. 15). No PKH-26 positive cells were detected in the renal tissue of GM group on day 14, day 21 and day 35.





**Fig. 15.** PKH-26-labelled MDSPCs and BM-MSCs incorporated in kidney tissue; images are 20 $\times$  magnification (scale bar is 50  $\mu$ m) [65]

## CONCLUSIONS

- 1.1. Muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells exhibited typical morphology and expressed mesenchymal markers CD59 and CD90, while lacking the expression of hematopoietic and endothelial markers CD45 and CD34. Muscle-derived stem/progenitor cells also showed positive desmin expression and weak c-kit expression.
- 1.2. Muscle-derived stem/progenitor cells had a statistically significantly shorter population doubling time compared to bone marrow mesenchymal stem cells.
- 1.3. Muscle-derived stem/progenitor cells exhibited statistically significantly higher regenerative OCT4 gene expression compared to bone marrow mesenchymal stem cells.
- 1.4. Both muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells are multipotent, as they demonstrate osteogenic, chondrogenic, adipogenic, and myogenic potential.

2. Muscle-derived stem/progenitor cells accelerate functional and morphological kidney recovery by inducing statistically significant changes in blood serum and urine creatinine concentrations, creatinine clearance, kidney morphology and kidney injury score, as well as apoptosis expression on the day 21 of the experiment. Additionally, they influence changes in kidney injury biomarkers in urine – KIM-1 on the 11 day and NGAL on the day 21 of the experiment.
3. Muscle-derived stem/progenitor cells are equivalent to bone marrow mesenchymal stem cells in terms of efficacy, making them a potential candidate for acute kidney injury treatment.
4. Muscle-derived stem/progenitor cells are capable of migrating to damaged kidney tissues after systemic injection, with a small portion incorporating into the renal cortex and persisting in the kidney parenchyma throughout the experiment – 35 days.

### **PRACTICAL RECOMMENDATIONS**

Muscle-derived stem/progenitor cells have potential in kidney regeneration. Further studies should aim to:

1. Determine the possible mechanisms of action of muscle-derived stem/progenitor cells and investigate in more detail their incorporation into damaged kidney tissues.
2. Examine the pharmacokinetic differences of these stem cells in the cases of local and systemic injections.
3. Clarify the differences in therapeutic effects when applying single versus repeated injections of muscle-derived stem/progenitor cells.
4. Evaluate the differences in therapeutic effects when stem cells are combined with antioxidant-active compounds to improve cell survival after systemic injection.
5. Confirm the protective effect of muscle-derived stem/progenitor cells in preventing chronic kidney failure following acute kidney injury.

## BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet Lond Engl.* 2019 Nov 23;394(10212):1949–64.
2. Al-Hwiesh A, Abdul-Rahman I, Finkelstein F, Divino-Filho J, Qutub H, Al-Audah N, et al. Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients: A Prospective Randomized Study of Tidal Peritoneal Dialysis Versus Continuous Renal Replacement Therapy. *Ther Apher Dial Off Peer-Rev J Int Soc Apher Jpn Soc Apher Jpn Soc Dial Ther.* 2018 Aug;22(4):371–9.
3. Perinel S, Vincent F, Lautrette A, Dellamonica J, Mariat C, Zeni F, et al. Transient and Persistent Acute Kidney Injury and the Risk of Hospital Mortality in Critically Ill Patients: Results of a Multicenter Cohort Study. *Crit Care Med.* 2015 Aug;43(8):e269-275.
4. Silveira Santos CG da, Romani RF, Benvenuti R, Ribas Zahdi JO, Riella MC, Mazza do Nascimento M. Acute Kidney Injury in Elderly Population: A Prospective Observational Study. *Nephron.* 2018;138(2):104–12.
5. Skarupskiene I, Balciuviene V, Ziginskiene E, Kuzminskis V, Vaiciuniene R, Bumblyte IA. Changes of etiology, incidence and outcomes of severe acute kidney injury during a 12-year period (2001-2012) in large university hospital. *Nephrol Ther.* 2016 Nov; 12(6):448–53.
6. Trongtrakul K, Sawawiboon C, Wang AY, Chitsomkasem A, Limphunudom P, Kurathong S, et al. Acute kidney injury in critically ill surgical patients: Epidemiology, risk factors and outcomes. *Nephrol Carlton Vic.* 2019 Jan;24(1):39–46.
7. Wu HC, Lee LC, Wang WJ. Incidence and mortality of postoperative acute kidney injury in non-dialysis patients: comparison between the AKIN and KDIGO criteria. *Ren Fail.* 2016;38(2):330–9.
8. Fortrie G, de Geus HRH, Betjes MGH. The aftermath of acute kidney injury: a narrative review of long-term mortality and renal function. *Crit Care Lond Engl.* 2019 Jan 24;23(1):24.
9. Yun CW, Lee SH. Potential and Therapeutic Efficacy of Cell-based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Acute/chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 1;20(7):E1619.
10. Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y. Regenerative medicine for the kidney: renotropic factors, renal stem/progenitor cells, and stem cell therapy. *BioMed Res Int.* 2014; 2014:595493.
11. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2018 Jan;93(1):19–31.
12. Chu DT, Phuong TNT, Tien NLB, Tran DK, Thanh VV, Quang TL, et al. An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 21;21(3).
13. Lavasani M, Lu A, Thompson SD, Robbins PD, Huard J, Niedernhofer LJ. Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;976:53–65.
14. Lee AR, Moon DK, Siregar A, Moon SY, Jeon RH, Son YB, et al. Involvement of mitochondrial biogenesis during the differentiation of human periosteum-derived mesenchymal stem cells into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. *Arch Pharm Res.* 2019 Dec;42(12):1052–62.

15. Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, Cifone MG, Cinque B, Giuliani M. Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 28;19(7):1897.
16. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* 2009;4(1):102–6.
17. Wright A, Snyder L, Knights K, He H, Springer NL, Lillich J, et al. A Protocol for the Isolation, Culture, and Cryopreservation of Umbilical Cord-Derived Canine Mesenchymal Stromal Cells: Role of Cell Attachment in Long-Term Maintenance. *Stem Cells Dev.* 2020 Jun 1;29(11):695-713.
18. Meyer MB, Benkusky NA, Sen B, Rubin J, Pike JW. Epigenetic Plasticity Drives Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *J Biol Chem.* 2016 19;291(34):17829–47.
19. Szaraz P, Gratch YS, Iqbal F, Librach CL. In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Functional Cardiomyocyte-like Cells. *J Vis Exp.* 2017 Aug 9;(126):55757.
20. Venkatesh K, Sen D. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Dopaminergic Neurons: A Potential Cell Based Therapy for Parkinson’s Disease. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017;12(4):326–47.
21. Zajdel A, Kalucka M, Kokoszka-Mikołaj E, Wilczok A. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton’s jelly of the umbilical cord. *Acta Biochim Pol.* 2017;64(2):365–9.
22. Zhang J, Zhao J, Mao Q, Xia H. A simple, efficient and economical method for isolating and culturing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Mol Med Rep.* 2019 Dec;20(6):5257–64.
23. Gu W, Hong X, Le Bras A, Nowak WN, Issa Bhaloo S, Deng J, et al. Smooth muscle cells differentiated from mesenchymal stem cells are regulated by microRNAs and suitable for vascular tissue grafts. *J Biol Chem.* 2018 25;293(21):8089–102.
24. Hodgson B, Mafi R, Mafi P, Khan null. The Regulation of Differentiation of Mesenchymal Stem-cells into Skeletal Muscle: A Look at Signalling Molecules Involved in Myogenesis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(5):384–407.
25. Wong CY, Chang YM, Tsai YS, Ng WV, Cheong SK, Chang TY, et al. Decoding the differentiation of mesenchymal stem cells into mesangial cells at the transcriptomic level. *BMC Genomics.* 2020 Jul 7;21(1):467.
26. Chen Y, Tang X, Li P, Zhou Y, Xue T, Liu J, et al. Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Acute Kidney Injury in Rats via Secreting Tumor Necrosis Factor-Inducible Gene 6 Protein. *BioMed Res Int.* 2019;2019:9845709.
27. Jiao X, Cai J, Yu X, Ding X. Paracrine Activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway by Bone Marrow Stem Cell Attenuates Cisplatin-Induced Kidney Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(5):1980–94.
28. Xiu GH, Zhou X, Li XL, Chen XZ, Li BQ, Chen XL, et al. Role of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Attenuating Inflammatory Reaction in Lipopolysaccharide-induced Acute Kidney Injury of Rats Associated with TLR4-NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Inhibition. *Ann Clin Lab Sci.* 2018 Nov;48(6):743–50.
29. Zhang JB, Wang XQ, Lu GL, Huang HS, Xu SY. Adipose-derived mesenchymal stem cells therapy for acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in a rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017 Dec;44(12):1232–40.

30. Lee KH, Tseng WC, Yang CY, Tarng DC. The Anti-Inflammatory, Anti-Oxidative, and Anti-Apoptotic Benefits of Stem Cells in Acute Ischemic Kidney Injury. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 19;20(14) :3529.
31. Yao W, Hu Q, Ma Y, Xiong W, Wu T, Cao J, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells repair cisplatin-induced acute kidney injury through antiapoptotic pathways. *Exp Ther Med*. 2015 Aug;10(2):468–76.
32. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019 Jul 28;8(8):784.
33. Reis LA, Borges FT, Simões MJ, Borges AA, Sinigaglia-Coimbra R, Schor N. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Repaired but Did Not Prevent Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury through Paracrine Effects in Rats. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44092.
34. Qi S, Wu D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced acute kidney injury in rats by inhibiting cell apoptosis. *Int J Mol Med*. 2013 Dec;32(6):1262–72.
35. Sadek EM, Afifi NM, Elfattah LIA, Mohsen MAAE. Histological study on effect of mesenchymal stem cell therapy on experimental renal injury induced by ischemia/reperfusion in male albino rat. *Int J Stem Cells*. 2013 May;6(1):55–66.
36. Luo C, Luo F, Che L, Zhang H, Zhao L, Zhang W, et al. Mesenchymal stem cells protect against sepsis-associated acute kidney injury by inducing Gal-9/Tim-3 to remodel immune homeostasis. *Ren Fail*. 2023 Dec;45(1):2187229.
37. Ni W, Zhang Y, Yin Z. The protective mechanism of Klotho gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells on acute kidney injury induced by rhabdomyolysis. *Regen Ther*. 2021 Dec;18:255–67.
38. Guo J, Wang R, Liu D. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Promoting Mitophagy of Renal Tubular Epithelial Cells via the SIRT1/Parkin Axis. *Front Endocrinol*. 2021;12:639165.
39. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*. 2004 Dec;14(6):1035–41.
40. Wong CY, Cheong SK, Mok PL, Leong CF. Differentiation of human mesenchymal stem cells into mesangial cells in post-glomerular injury murine model. *Pathology (Phila)*. 2008 Jan;40(1):52–7.
41. Čamernik K, Marc J, Zupan J. Human Skeletal Muscle-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell Isolation and Growth Kinetics Analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;2045:119–29.
42. Testa S, Riera CS, Fornetti E, Riccio F, Fuoco C, Bernardini S, et al. Skeletal Muscle-Derived Human Mesenchymal Stem Cells: Influence of Different Culture Conditions on Proliferative and Myogenic Capabilities. *Front Physiol*. 2020;11:553198.
43. Deasy BM, Gharaibeh BM, Pollett JB, Jones MM, Lucas MA, Kanda Y, et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Jul;16(7): 3323–33.
44. Gheller BJ, Blum J, Soueid-Baumgarten S, Bender E, Cosgrove BD, Thalacker-Mercer A. Isolation, Culture, Characterization, and Differentiation of Human Muscle Progenitor Cells from the Skeletal Muscle Biopsy Procedure. *J Vis Exp JoVE*. 2019 Aug 23;(150):10.3791/59580.
45. Klimczak A, Kozłowska U, Kurpisz M. Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018 Oct;66(5):341–54.

46. Lavasani M, Thompson SD, Pollett JB, Usas A, Lu A, Stolz DB, et al. Human muscle-derived stem/progenitor cells promote functional murine peripheral nerve regeneration. *J Clin Invest.* 2014 Apr;124(4):1745–56.
47. Chan DC, Chiu CY, Lan KC, Weng TI, Yang RS, Liu SH. Transplantation of human skeletal muscle-derived progenitor cells ameliorates knee osteoarthritis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2017;35(9):1886–93.
48. Dmitrieva RI, Lelyavina TA, Komarova MY, Galenko VL, Ivanova OA, Tikanova PA, et al. Skeletal Muscle Resident Progenitor Cells Coexpress Mesenchymal and Myogenic Markers and Are Not Affected by Chronic Heart Failure-Induced Dysregulations. *Stem Cells Int.* 2019;2019:5690345.
49. Lan KC, Wang CC, Yen YP, Yang RS, Liu SH, Chan DC. Islet-like clusters derived from skeletal muscle-derived stem/progenitor cells for autologous transplantation to control type 1 diabetes in mice. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2018;46(sup3):S328–35.
50. Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, Florkowska A, Ciemerych MA, Brzoska E. Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2020 Aug;104:93–104.
51. Elashry MI, Gaertner K, Klymiuk MC, Eldaey A, Wenisch S, Arnhold S. Characterisation of stemness and multipotency of ovine muscle-derived stem cells from various muscle sources. *J Anat.* 2021 Aug;239(2):336–50.
52. Tey SR, Robertson S, Lynch E, Suzuki M. Coding Cell Identity of Human Skeletal Muscle Progenitor Cells Using Cell Surface Markers: Current Status and Remaining Challenges for Characterization and Isolation. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:284.
53. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med.* 2015 Aug;41(8):1411–23.
54. Negi S, Koreeda D, Kobayashi S, Yano T, Tatsuta K, Mima T, et al. Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. *Semin Dial.* 2018;31(5):519–27.
55. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol.* 2014 Apr;10(4):193–207.
56. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De Maeseneer J, Endre Z, Kellum JA, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet Lond Engl.* 2013 Jul 13;382(9887):170–9.
57. Lee PW, Wu BS, Yang CY, Lee OKS. Molecular Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy in Acute Kidney Injury. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 22;22(21):11406.
58. Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Balby-Rocha MTA, Lira AO, Rangel EB. Mesenchymal stem cell therapy in acute kidney injury (AKI): review and perspectives. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2020 Jan 13;66Suppl 1(Suppl 1):s45–54.
59. Musavi L, Brandacher G, Hoke A, Darrach H, Lee WPA, Kumar A, et al. Muscle-derived stem cells: important players in peripheral nerve repair. *Expert Opin Ther Targets.* 2018 Dec;22(12):1009–16.
60. Tamaki T. Biomedical applications of muscle-derived stem cells: from bench to bedside. *Expert Opin Biol Ther.* 2020 Nov;20(11):1361–71.
61. Usas A, Mačiulaitis J, Mačiulaitis R, Jakubonienė N, Milašius A, Huard J. Skeletal muscle-derived stem cells: implications for cell-mediated therapies. *Medicina (Kaunas).* 2011;47(9):469–79.

62. Usas A, Huard J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(36):5401–6.
63. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
64. Pavyde E, Maciulaitis R, Mauricas M, Sudzius G, Ivanauskaite Didziokiene E, Laurinavicius A, Sutkeviciene N, Stankevicius E, Maciulaitis J, Usas A. Skeletal Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells: A Potential Strategy for the Treatment of Acute Kidney Injury. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9618480.
65. Pavyde E, Usas A, Pockevicius A, Maciulaitis R. Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells Ameliorate Acute Kidney Injury in Rats through the Anti-Apoptotic Pathway and Demonstrate Comparable Effects to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Medicina (Kaunas)*. 2023 Dec 28;60(1):63.
66. Ostermann M, Bellomo R, Burdman EA, Doi K, Endre ZH, Goldstein SL, et al. Controversies in acute kidney injury: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference. *Kidney Int*. 2020 Aug;98(2):294–309.
67. Koza Y. Acute kidney injury: current concepts and new insights. *J Inj Violence Res*. 2016 Jan;8(1):58–62.
68. Lombardi D, Becherucci F, Romagnani P. How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Aug;31(8):1243–50.
69. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*. 2012;120(4):c179–184.
70. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R204–12.
71. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.
72. Koza Y. Acute kidney injury: current concepts and new insights. *J Inj Violence Res*. 2016 Jan;8(1):58–62.
73. Goyal A, Daneshpajouhnejad P, Hashmi MF, Bashir K. Acute Kidney Injury. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Dec 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441896/>
74. Kashani K, Shao M, Li G, Williams AW, Rule AD, Kremers WK, et al. No increase in the incidence of acute kidney injury in a population-based annual temporal trends epidemiology study. *Kidney Int*. 2017;92(3):721–8.
75. Talabani B, Zouwail S, Pyart RD, Meran S, Riley SG, Phillips AO. Epidemiology and outcome of community-acquired acute kidney injury. *Nephrol Carlton Vic*. 2014 May; 19(5):282–7.
76. Al-Jaghbeer M, Dealmeida D, Bilderback A, Ambrosino R, Kellum JA. Clinical Decision Support for In-Hospital AKI. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2018;29(2):654–60.
77. Kolhe NV, Muirhead AW, Wilkes SR, Fluck RJ, Taal MW. The epidemiology of hospitalised acute kidney injury not requiring dialysis in England from 1998 to 2013: retrospective analysis of hospital episode statistics. *Int J Clin Pract*. 2016 Apr;70(4): 330–9.

78. Czempik P, Cieśla D, Knapik P, Krzych Ł. Mortality of patients with acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ.* 2018 Mar;27(3):327–33.
79. Alvarez G, Chrusch C, Hulme T, Posadas-Calleja JG. Renal replacement therapy: a practical update. *Can J Anaesth J Can Anesth.* 2019 May;66(5):593–604.
80. Akhoundi A, Singh B, Vela M, Chaudhary S, Monaghan M, Wilson GA, et al. Incidence of Adverse Events during Continuous Renal Replacement Therapy. *Blood Purif.* 2015;39(4):333–9.
81. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr Physiol.* 2012 Apr;2(2):1303–53.
82. Kosaka J, Lankadeva YR, May CN, Bellomo R. Histopathology of Septic Acute Kidney Injury: A Systematic Review of Experimental Data. *Crit Care Med.* 2016 Sep;44(9):e897–903.
83. Bussolati B, Camussi G. Therapeutic use of human renal progenitor cells for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol.* 2015 Dec;11(12):695–706.
84. Wang H ling, Liu N mei, Li R. Role of adult resident renal progenitor cells in tubular repair after acute kidney injury. *J Integr Med.* 2014 Nov;12(6):469–75.
85. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2012 Aug;30(8):1714–25.
86. Cakiroglu F, Osbahr JW, Kramer J, Rohwedel J. Differences of cell surface marker expression between bone marrow- and kidney-derived murine mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2016 Oct 31;62(12):11–7.
87. Chen TC, Neupane M, Chien SJ, Chuang FR, Crawford RB, Kaminski NE, et al. Characterization of Adult Canine Kidney Epithelial Stem Cells That Give Rise to Dome-Forming Tubular Cells. *Stem Cells Dev.* 2019 01;28(21):1424–33.
88. Liu QZ, Chen XD, Liu G, Guan GJ. Identification and isolation of kidney-derived stem cells from transgenic rats with diphtheria toxin-induced kidney damage. *Exp Ther Med.* 2016 Sep;12(3):1651–6.
89. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman’s capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Sep;17(9):2443–56.
90. Chen CL, Chou KJ, Fang HC, Hsu CY, Huang WC, Huang CW, et al. Progenitor-like cells derived from mouse kidney protect against renal fibrosis in a remnant kidney model via decreased endothelial mesenchymal transition. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:239.
91. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.* 2002 Oct;62(4):1285–90.
92. Broekema M, Harmsen MC, Koerts JA, Petersen AH, van Luyn MJA, Navis G, et al. Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. *Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2572–81.
93. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Sep;18(9):2486–96.
94. Maeshima A, Takahashi S, Nakasatomi M, Nojima Y. Diverse Cell Populations Involved in Regeneration of Renal Tubular Epithelium following Acute Kidney Injury. *Stem Cells Int.* 2015;2015:964849.
95. Chung HC, Ko IK, Atala A, Yoo JJ. Cell-based therapy for kidney disease. *Korean J Urol.* 2015 Jun;56(6):412–21.



96. Bussolati B, Camussi G. Therapeutic use of human renal progenitor cells for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol.* 2015 Dec;11(12):695–706.
97. Yen TH, Alison MR, Goodlad RA, Otto WR, Jeffery R, Cook HT, et al. Epidermal growth factor attenuates tubular necrosis following mercuric chloride damage by regeneration of indigenous, not bone marrow-derived cells. *J Cell Mol Med.* 2015 Feb;19(2):463–73.
98. Weidenbusch M, Rodler S, Anders HJ. Interleukin-22 in kidney injury and regeneration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 May 15;308(10):F1041-1046.
99. Jang HS, Han SJ, Kim JI, Lee S, Lipschutz JH, Park KM. Activation of ERK accelerates repair of renal tubular epithelial cells, whereas it inhibits progression of fibrosis following ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1832(12):1998–2008.
100. Zhou D, Tan RJ, Lin L, Zhou L, Liu Y. Activation of hepatocyte growth factor receptor, c-met, in renal tubules is required for renoprotection after acute kidney injury. *Kidney Int.* 2013 Sep;84(3):509–20.
101. Chung JS, Hwang S, Hong JE, Jo M, Rhee KJ, Kim S, et al. Skeletal muscle satellite cell-derived mesenchymal stem cells ameliorate acute alcohol-induced liver injury. *Int J Med Sci.* 2022;19(2):353–63.
102. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(12):2173–85.
103. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differ Res Biol Divers.* 2016 Aug;92(1–2):41–51.
104. Wong CY, Cheong SK, Mok PL, Leong CF. Differentiation of human mesenchymal stem cells into mesangial cells in post-glomerular injury murine model. *Pathology.* 2008 Jan;40(1):52–7.
105. Burgos-Silva M, Semedo-Kuriki P, Donizetti-Oliveira C, Costa PB, Cenedeze MA, Hiyane MI, et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Reduce Acute and Chronic Kidney Damage in Mice. *PloS One.* 2015;10(11):e0142183.
106. Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, Tsai TH, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med.* 2011;9:51.
107. Kim JH, Park DJ, Yun JC, Jung MH, Yeo HD, Kim HJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells protect kidneys from cisplatin nephrotoxicity in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 May 1;302(9):F1141-1150.
108. Jang HR, Park JH, Kwon GY, Lee JE, Huh W, Jin HJ, et al. Effect of preemptive treatment with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on the development of renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Nov 15;307(10):F1149–1161.
109. Lu G, Huang S, Chen Y, Ma K. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation ameliorates burn-induced acute kidney injury in rats. *Int J Low Extrem Wounds.* 2013 Sep;12(3):205–11.
110. Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest.* 2005 Jul;115(7):1756–64.
111. Westenfelder C, Togel FE. Protective actions of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury: relevance to clinical trials. *Kidney Int Suppl.* 2011 Sep;1(3):103–6.

112. Yao W, Hu Q, Ma Y, Xiong W, Wu T, Cao J, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells repair cisplatin-induced acute kidney injury through antiapoptotic pathways. *Exp Ther Med*. 2015 Aug;10(2):468–76.
113. Elhousseini FM, Saad MAAA, Anber N, Elghannam D, Sobh MA, Alsayed A, et al. Long Term Study of Protective Mechanisms of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells on Cisplatin Induced Kidney injury in Sprague-Dawley Rats. *J Stem Cells Regen Med*. 2016;12(1):36–48.
114. Sheashaa H, Lotfy A, Elhousseini F, Aziz AA, Baiomy A, Awad S, et al. Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. *Exp Ther Med*. 2016 May;11(5):1573–80.
115. Zhang JB, Wang XQ, Lu GL, Huang HS, Xu SY. Adipose-derived mesenchymal stem cells therapy for acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in a rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Dec;44(12):1232–40.
116. Lee SJ, Ryu MO, Seo MS, Park SB, Ahn JO, Han SM, et al. Mesenchymal Stem Cells Contribute to Improvement of Renal Function in a Canine Kidney Injury Model. *Vivo Athens Greece*. 2017 Dec;31(6):1115–24.
117. Perico L, Morigi M, Rota C, Breno M, Mele C, Noris M, et al. Human mesenchymal stromal cells transplanted into mice stimulate renal tubular cells and enhance mitochondrial function. *Nat Commun*. 2017 Oct 17;8(1):983.
118. Fahmy SR, Soliman AM, El Ansary M, Elhamid SA, Mohsen H. Therapeutic efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Tissue Cell*. 2017 Jun;49(3):369–75.
119. Rodrigues CE, Capcha JMC, de Bragança AC, Sanches TR, Gouveia PQ, de Oliveira PAF, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells protect against premature renal senescence resulting from oxidative stress in rats with acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther*. 2017 28;8(1):19.
120. Sheashaa H, Lotfy A, Elhousseini F, Aziz AA, Baiomy A, Awad S, et al. Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. *Exp Ther Med*. 2016 May;11(5):1573–80.
121. Arriero M, Brodsky SV, Gealekman O, Lucas PA, Goligorsky MS. Adult skeletal muscle stem cells differentiate into endothelial lineage and ameliorate renal dysfunction after acute ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Oct;287(4):F621–627.
122. Gooch A, Doty J, Flores J, Swenson L, Toegel FE, Reiss GR, et al. Initial report on a phase I clinical trial: Prevention and treatment of post-operative Acute Kidney Injury with allogeneic Mesenchymal Stem Cells in patients who require on-pump cardiac surgery. *Cell Ther Transplant*. 2008;1:e.000028.01.
123. Swaminathan M, Kopyt N, Atta MG, Radhakrishnan J, Umanath K, Nguyen S, et al. Pharmacological effects of ex vivo mesenchymal stem cell immunotherapy in patients with acute kidney injury and underlying systemic inflammation. *Stem Cells Transl Med*. 2021 Dec;10(12):1588–601.
124. Swaminathan M, Stafford-Smith M, Chertow GM, Warnock DG, Paragamian V, Brenner RM, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of AKI after Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Jan;29(1):260–7.
125. Agle CC, Rowler AM, Velloso CP, Lazarus NL, Harridge SDR. Isolation and quantitative immunocytochemical characterization of primary myogenic cells and fibroblasts from human skeletal muscle. *J Vis Exp*. 2015 Jan 12;(95):52049.

126. Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, Florkowska A, Ciemerych MA, Brzoska E. Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2020 Aug;104:93–104.
127. Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Jul;76(13):2559–70.
128. Yamakawa H, Kusumoto D, Hashimoto H, Yuasa S. Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 6;21(5):1830.
129. Cossu G, Tonlorenzi R, Brunelli S, Sampaolesi M, Messina G, Azzoni E, et al. Mesoangioblasts at 20: From the embryonic aorta to the patient bed. *Front Genet.* 2022; 13:1056114.
130. Gautam J, Yao Y. Pericytes in Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1122:59–72.
131. Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, et al. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun.* 2012 Jan 3;3:608.
132. Piera-Velazquez S, Jimenez SA, Stokes D. Increased life span of human osteoarthritic chondrocytes by exogenous expression of telomerase. *Arthritis Rheum.* 2002 Mar;46(3): 683–93.
133. Li G, Peng H, Corsi K, Usas A, Olshanski A, Huard J. Differential effect of BMP4 on NIH/3T3 and C2C12 cells: implications for endochondral bone formation. *J Bone Miner Res.* 2005 Sep;20(9):1611–23.
134. Lewis FC, Henning BJ, Marazzi G, Sassoon D, Ellison GM, Nadal-Ginard B. Porcine skeletal muscle-derived multipotent PW1pos/Pax7neg interstitial cells: isolation, characterization, and long-term culture. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Jun;3(6):702–12.
135. Gao X, Usas A, Lu A, Tang Y, Wang B, Chen CW, et al. BMP2 Is Superior to BMP4 for Promoting Human Muscle-Derived Stem Cell-Mediated Bone Regeneration in a Critical-Sized Calvarial Defect Model. *Cell Transplant.* 2013;22(12):2393–408.
136. Žymantienė J, Želvytė R, Oberauskas V, Daunoras G, Pockevičius A, Jokimas J, et al. Rat – an animal’s model for correction of nephrotoxicity using gentamicin. *Vet Med Zoot.* 2010;51(73):83–8.
137. Cheng K, Rai P, Plagov A, Lan X, Kumar D, Salhan D, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. *Exp Mol Pathol.* 2013 Jun;94(3):466–73.
138. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori J ya, et al. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell Transplant.* 2014;23(7):889–99.
139. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303–6.
140. Mercado MG, Smith DK, Guard EL. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2019 Dec 1;100(11):687–94.
141. WHO Factsheet: The Top 10 Causes of Death [Internet]. [cited 2024 Jan 9]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
142. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl.* 2020 Feb 29;395(10225):709–33.
143. Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, Tonelli M, García-García G, Jha V, et al. International Society of Nephrology’s 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet Lond Engl.* 2015 Jun 27;385(9987):2616–43.

144. Han Q, Wang X, Ding X, He J, Cai G, Zhu H. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Drug-Induced Acute Kidney Injury. *Front Immunol.* 2021; 12:683003.
145. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007 Mar;327(3):449–62.
146. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Sep;13(9):1738–55.
147. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
148. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Jul 28;7(1):97.
149. Valdivia A, Avalos AM, Leyton L. Thy-1 (CD90)-regulated cell adhesion and migration of mesenchymal cells: insights into adhesomes, mechanical forces, and signaling pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Nov 30;11:1221306.
150. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):761–74.
151. Krylova TA, Musorina AS, Zenin VV, Yakovleva TK, Poljanskaya GG. A comparative analysis of mesenchymal stem-cell lines derived from bone marrow and limb muscle of early human embryos. *Cell Tissue Biol.* 2014 Nov 1;8(6):441–53.
152. Cottle BJ, Lewis FC, Shone V, Ellison-Hughes GM. Skeletal muscle-derived interstitial progenitor cells (PICs) display stem cell properties, being clonogenic, self-renewing, and multi-potent in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Jul 4;8:158.
153. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2020 Jan 21;77(14):2771–94.
154. Wang Y, Fang J, Liu B, Shao C, Shi Y. Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. *Cell Stem Cell.* 2022 Nov 3;29(11):1515–30.
155. Wen Y, Parikh CR. Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2021 Jul 4;58(5):354–68.
156. Geng J, Qiu Y, Qin Z, Su B. The value of kidney injury molecule 1 in predicting acute kidney injury in adult patients: a systematic review and Bayesian meta-analysis. *J Transl Med.* 2021 Mar 12;19(1):105.
157. Kane-Gill SL, Smithburger PL, Kashani K, Kellum JA, Frazee E. Clinical Relevance and Predictive Value of Damage Biomarkers of Drug-Induced Kidney Injury. *Drug Saf.* 2017 Nov;40(11):1049–74.
158. Mirazi N, Baharvand F, Moghadasali R, Nourian A, Hosseini A. Treatment with human umbilical cord blood serum in a gentamicin-induced nephrotoxicity model in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2022 Sep;45(5):2262–8.
159. Zhang C, George SK, Wu R, Thakker PU, Abolbashari M, Kim TH, et al. Reno-protection of Urine-derived Stem Cells in A Chronic Kidney Disease Rat Model Induced by Renal Ischemia and Nephrotoxicity. *Int J Biol Sci.* 2020;16(3):435–46.
160. Moledina DG, Hall IE, Thiessen-Philbrook H, Reese PP, Weng FL, Schröppel B, et al. Performance of Serum Creatinine and Kidney Injury Biomarkers for Diagnosing Histologic Acute Tubular Injury. *Am J Kidney Dis.* 2017 Dec 1;70(6):807–16.

161. Selim RE, Ahmed HH, Abd-Allah SH, Sabry GM, Hassan RE, Khalil WKB, et al. Mesenchymal Stem Cells: a Promising Therapeutic Tool for Acute Kidney Injury. *Appl Biochem Biotechnol*. 2019 Sep;189(1):284–304.
162. Lee KH, Tseng WC, Yang CY, Tarng DC. The Anti-Inflammatory, Anti-Oxidative, and Anti-Apoptotic Benefits of Stem Cells in Acute Ischemic Kidney Injury. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 19;20(14):3529.
163. Zhou J, Cui H, Lu H, Xu Z, Feng W, Chen L, et al. Muscle-derived stem cells in peripheral nerve regeneration: reality or illusion? *Regen Med*. 2017 Apr;12(4):459–72.
164. Dong Y, Li Y, Zhang C, Chen H, Liu L, Chen S. Effects of SW033291 on the myogenesis of muscle-derived stem cells and muscle regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Feb 21;11(1):76.
165. Nakajima N, Tamaki T, Hirata M, Soeda S, Nitta M, Hoshi A, et al. Purified Human Skeletal Muscle-Derived Stem Cells Enhance the Repair and Regeneration in the Damaged Urethra. *Transplantation*. 2017 Oct;101(10):2312–20.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

### Publikacijos disertacinio darbo tema:

1. **Pavyde E**, Usas A, Pockevicius A, Maciulaitis R. Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells Ameliorate Acute Kidney Injury in Rats through the Anti-Apoptotic Pathway and Demonstrate Comparable Effects to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Medicina (Kaunas)*. 2023 Dec 28;60(1):63. [Citav. rod.: 2.948]
2. **Pavyde E**, Maciulaitis R, Mauricas M, Sudzius G, Ivanauskaite Didziokiene E, Laurinavicius A, Sutkeviciene N, Stankevicius E, Maciulaitis J, Usas A. Skeletal Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells: A Potential Strategy for the Treatment of Acute Kidney Injury. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9618480. doi: 10.1155/2016/9618480. [Citav. rod.: 3.687]
3. **Pavyde E**, Usas A, Maciulaitis R. Regenerative pharmacology for the treatment of acute kidney injury: Skeletal muscle stem/progenitor cells for renal regeneration? *Pharmacol Res*. 2016 Mar 18. pii: S1043-6618(16)30002-0. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.014. [Citav. rod.: 4.816]

### Pranešimai disertacijos tema:

1. **Pavydė E**, Mačiulaitis R, Ivanauskaitė Didžiokienė E, Sutkevičienė N, Mačiulaitis J, Malinauskas M, Žymantienė J, Bratčikov M, Ūsas A. Comparison of muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney injury. The 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference “Science and practice 2016”. October 20–21, 2016, Kaunas, Lithuania. Lithuanian university of Health Sciences, 2016. ISBN 9789955154549.p. 19-19.
2. **Pavydė E**, Ūsas A, Ivanauskaitė Didžiokienė E, Sutkevičienė N, Stankevicius E, Mačiulaitis J, Malinauskas M, Žymantienė J, Mačiulaitis R. Comparison of muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney injury. *Acta Physiologica*. FEPS 2016 – Joint meeting of the Federation of European physiological societies and the French physiological society. Paris, France. June 29<sup>th</sup>–July 1<sup>st</sup>, 2016. The French Society of Physiology and the Federation of the European Societies of Physiology ISSN 1748-1716. 2016, vol. 217, suppl. 708,p. 132-133, YCO.004.
3. **Pavydė E**, Ūsas A, Mačiulaitis R. Comparison of muscle-derived stem/progenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney injury. International scientific-practical conference BaltPharm Forum 2016 main theme: “Complementary and

self-care health products: A pharmacist competences and responsibilities”, 15–17 April, 2016, Klaipėda, Lithuania, abstract book. Lithuanian Pharmaceutical Society, 2016. ISBN 9789955956822. p. 42-42, no. BFP-16-12.

4. **Pavydė E**, Ūsas A, Mačiulaitis R. Raumeninės kilmės kamieninių ląstelių ir kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijų palyginimas ūminio inkstų pažeidimo gydymui. IX nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Konferencijos tezių knyga. 2016 balandžio 13 d. ISBN 9789955154310. p. 25-26.
5. **Pavydė E**, Mačiulaitis R, Mauricas M, Sūdžius G, Ivanauskaitė Didžiokienė E, Laurinavičius A, Sutkevičienė N, Stankevičius E, Mačiulaitis J, Ūsas A. Skeletal muscle-derived stem/progenitor cells: a potential strategy for the treatment of acute kidney injury. The 6th International Pharmaceutical Conference “Science and Practice 2015”: book of abstracts: November 5-6, 2015, Kaunas, Lithuania (Poster session). ISBN 9789955154105. p. 17-17.
6. **Pavydė E**, Mačiulaitis R, Mauricas M, Sūdžius G, Ivanauskaitė Didžiokienė E, Laurinavičius A, Sutkevičienė N, Mačiulaitis J, Ūsas A. Skeletal muscle-derived stem/progenitor cells: a potential strategy for the treatment of acute kidney injury. Acta Physiologica: Special Issue: Abstracts from the Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies: Kaunas, Lithuania, 26–29 August 2015. Stockholm: John Wiley & Sons Ltdiley & Sons Ltd. (EYPS Plenary Lecture). ISSN 1748-1716. 2015, vol. 215, suppl. S705, p. 8-9, no. Y\_9.
7. **Svitojūtė E**, Mačiulaitis R, Mauricas M, Sūdžius G, Ūsas A. Pažangios terapijos eksperimentinio preparato kūrimas: žiurkės raumeninės kilmės kamieninių ląstelių izoliavimas ir charakterizavimas. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ : konferencijos pranešimų tezės. 2015 m. balandžio 10 d, Kaunas (Eksperimentinė medicina). ISBN 9789955153863. p. 28-30.
8. **Svitojūtė E**, Mačiulaitis R, Mauricas M, Sūdžius G, Ūsas A. Development of the experimental advanced-therapy medicinal product: isolation, cultivation and characterization of muscle derived stem cells. The 5<sup>th</sup> International Conference On Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice dedicated to 145<sup>th</sup> Anniversary of prof. Petras Raudonikis: November 22, 2014 Kaunas, Lithuania. Book of abstracts (Short Talks). ISBN 9789955153726. p. 18-19.
9. **Svitojūtė E**, Ūsas A, Mačiulaitis R, Ivanauskaitė Didžiokienė E. Inkstų histologinių pokyčių įvertinimas eksperimentiniame nefrotoksiškumo modelyje *in vivo*. VII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija

- „Mokslas – sveikatai“: konferencijos pranešimų tezės. 2014 m. balandžio 9 d., Kaunas (Sekcija „Eksperimentinė medicina“). ISBN 978-995-515-342-9. p. 28-29, Nr. 5.
10. **Svitojūtė E**, Mačiulaitis R, Žymantienė J, Mačiulaitis J. Development of experimental nephrotoxicity model *in vivo* and assessment of its' applicability for stem cell research. 10th EACPT Summer School 2013, Edinburgh, 4–6 July 2013. BPS. RCPE, 2013. p. 1, no. P034.
  11. **Svitojūtė E**, Mačiulaitis R. Comparison of differences between the genders of laboratory animals used for the experimental nephrotoxicity model *in vivo* designed for stem cell research. 1<sup>st</sup> Meeting of the Baltic Physiological Societies: program and abstracts. May 10–11, 2013 (Basic and clinical pharmacology). ISBN 978-9955-15-275-0. p. 69-70.



# CURRICULUM VITAE

**Vardas, pavardė:** Eglė Pavydė  
**El. paštas:** egle.pavyde@gmail.com  
**Tel.:** +370 684 56752

## IŠSILAVINIMAS

2012–2016 Doktorantūros studijos. Medicinos ir sveikatos mokslai, Farmacijos kryptis (M 003). Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, Fiziologijos ir farmakologijos institutas.

2007–2012 Farmacijos magistras. Įgytas farmacijos magistro laipsnis, vaistinininko profesinė kvalifikacija. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas.

## KVALIFIKACIJOS KĖLIMAS, MOKYMAI

2014.01–2014.02 Mokslinė stažuotė. University of Pittsburgh Medical Center, Stem Cell Research Center. Pitsburgas, Pensilvanija, JAV.

2012.09–2013.01 Kursas „Laboratorinių gyvūnų mokslas“. Neurobiologijos magistro studijų programa, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos institutas. Įgytas FELASA reikalavimus atitinkantis C kategorijos pažymėjimas darbui su laboratoriniais gyvūnais. Vilnius, Lietuva.

## LAIMĖJIMAI

1-oji vieta BaltPharm Forum 2017, Klaipėda, Lietuva (2016 04)

2-oji vieta 9-oji nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“, Kaunas, Lietuva (2016 04)

1-oji vieta European Young Physiologists Symposium, Kaunas, Lietuva (2015 08)

2-oji vieta 8-oji nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“, Kaunas, Lietuva (2015 04)

1-oji vieta The International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy practice, Kaunas, Lietuva (2014 11)

3-oji vieta Kauno technologijos universiteto mokslo paroda-konkursas „Technorama 2014“, Kaunas, Lietuva (2014 05)

2-oji vieta 7-oji nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“, Kaunas, Lietuva (2014 04)

## PROJEKTAI, STIPENDIJOS, DOTACIJOS

2013–2014 Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mokslo fondo dotacija mokslinių tyrimų projektui.

2013.07 European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. Summer school stipendija.

- 2013.06 Mokslininkų grupių projektų dotacija. Lietuvos mokslo taryba.  
Projekto Nr. MIP-83/2013.
- 2013.01 Jaunojo profesionalo stipendija (Young Professional Fellowship).  
Drug Information Association

### **KONFERENCIJOS, KONGRESAI**

- 2016.04 BaltPharm Forum 2017, Klaipėda, Lietuva
- 2016.04 9-oji nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“,  
Kaunas, Lietuva
- 2015.07 European Young Physiologists Symposium, Paryžius, Prancūzija
- 2015.08 European Young Physiologists Symposium, Kaunas, Lietuva
- 2015.04 8-oji nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“,  
Kaunas, Lietuva
- 2014.11 The International Conference on Pharmaceutical Sciences and  
Pharmacy practice, Kaunas, Lietuva
- 2014.05 Kauno technologijos universiteto mokslo paroda-konkursas  
„Technorama 2014“, Kaunas, Lietuva
- 2014.04 7-oji nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“,  
Kaunas, Lietuva
- 2013.09 Tarptautinė konferencija „Žmogaus kamieninių ląstelių tyrimai,  
terapinio pritaikymo galimybės bei šios gydymo technologijos  
etiniai ir teisiniai aspektai Europos Sąjungoje“, Kaunas, Lietuva
- 2013.07 10<sup>th</sup> European Association for Clinical Pharmacology and  
Therapeutics Summer School, Edinburgas, Škotija
- 2013.05 Tarptautinė konferencija „1<sup>st</sup> Meeting of the Baltic Physiological  
Societies“, Kaunas, Lietuva
- 2013.05 Nacionalinė konferencija „Farmacijos naujienos 2013“,  
Kaunas, Lietuva
- 2013.03 Drug Information Association 25<sup>th</sup> Annual EuroMeeting,  
Amsterdamas, Olandija
- 2013.02 Quatrino projektas „Rational use of medicines for a healthier future“,  
Stambulas, Turkija
- 2012.12 Tarptautinė konferencija „Pharmacy news“, Kaunas, Lietuva

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. dr. Romaldui Mačiulaičiui už bendravimą ir bendradarbiavimą, vadovavimą, patarimus ir pastabas, vertingas pažintis su kitais mokslininkais, nuolatinį idėjų generavimą ir pagalbą jas įgyvendinant.

Taip pat nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Arvydui Ūsui už nuolatinę pagalbą, už daugybę tyrimo metodų kuriuos padėjo įsisavinti, už mokslines diskusijas, pagalbą rengiant mokslines publikacijas, kantrybę, suorganizuotą mokslinę stažuotę JAV.

Taip pat, noriu padėkoti LSMU Fiziologijos ir farmakologijos instituto vadovui prof. dr. Edgarui Stankevičiui už suteiktą galimybę rengti daktaro disertaciją institute. Dėkoju prorektorei mokslui prof. habil. dr. Vaivai Lesauskaitei bei LSMU Mokslo centro vadovei prof. dr. Ingridai Ulozienei už pagalbą ir supratingumą doktorantūros studijų metu.

Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už paskirtą finansavimą mokslo projektui Nr. MIP-83/2013. Taip pat LSMU Mokslo fondui už materialinę paramą papildomų reagentų įsigijimui ir LSMU atviram fondui už galimybę stažuotis JAV.

Iš visos širdies dėkoju savo šeimai ir draugams už buvimą kartu ir visapusišką palaikymą.