



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Amiloidinių baltymų α -sinukleino ir S100A9 neurotoksinio poveikio mechanizmo mikroglijos ląstelėms tyrimas

Baigiamasis magistro projektas

Jovita Gružaitė
Projekto autorė

prof. dr. Ramunė Morkūnienė
Vadovė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Amiloidinių baltymų α -sinukleino ir S100A9 neurotoksinio poveikio mechanizmo mikroglijos ląstelėms tyrimas

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Jovita Gružaitė

Projekto autorė

prof. dr. Ramunė Morkūnienė

Vadovė

doc. dr. Evelina Rekuviene

Konsultantė

lekt. dr. Justina Dambrauskienė

Recenzentė

Kaunas, 2024



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Jovita Gružaitė

Amiloidinių baltymų α -sinukleino ir S100A9 neurotoksinio poveikio mechanizmo mikroglijos ląstelėms tyrimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – KTU) ir Lietuvos sveikatos universiteto (toliau – LSMU) intelektualinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei KTU ir LSMU akademinės etikos kodeksuose nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal KTU ar LSMU galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš KTU ar LSMU, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Jovita Gružaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Gružaitė, Jovita. Amiloidinių baltymų α -sinukleino ir S100A9 neurotoksinio poveikio mechanizmo mikroglijos ląstelėms tyrimas. Baigiamasis magistro projektas / vadovė prof. dr. Ramunė Morkūnienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: amiloidiniai baltymai, α -sinukleinas, S100A9, lipopolisacharidas, mikroglija, energetinis metabolizmas, neurotoksiškumas, neurouždegimas, neurodegeneracija, Parkinsono liga.

Kaunas, 2024. 81 p.

Santrauka

Per pastaruosius metus atlikti įvairūs tyrimai praplėtė mūsų žinias apie neurodegeneracinių ligų patogenezės molekulinis mechanizmus ir atskleidė mikroglijos ląstelių svarbą šių ligų vystymosi procese. Daugėja duomenų, rodančių, jog mikroglijos metabolizmo pokyčiai, įvykstantys reaguojant į patologinius veiksnius, yra svarbūs reguliuojant imuninį ir uždegiminį atsaką smegenyse. Vis dėlto, su Parkinsono liga siejamų amiloidinių baltymų agregatų ir endotoksino lipopolisacharido neurotoksiškumo mechanizmai lieka iki galo neatskleisti. Nėra žinoma, kokius tiksliai medžiagų apykaitos pokyčius mikroglijos ląstelėse sukelia šie veiksniai ir kaip tai prisideda prie šių ląstelių funkcijų reguliavimo bei prouždegiminio fenotipo atsiradimo neurodegeneracinių procesų metu.

Šio baigiamojo projekto tikslas – ištirti amiloidinių baltymų α -sinukleino ir S100A9 vaidmenį mikroglijos ląstelių energetiniam metabolizmui bei palyginti jį su bakterinio endotoksino poveikiu. Tikslui pasiekti buvo išskirti šie uždaviniai: 1) įvertinti nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 ir bakteriniam endotoksinui; 2) įvertinti permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 ir bakteriniam endotoksinui; 3) įvertinti glikolitinį aktyvumą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 ir bakteriniam endotoksinui; 4) nustatyti įvairių prouždegiminių veiksnių susidarymą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 bei bakteriniam endotoksinui. Tyrimo objektas – imortalizuotos pelių BV-2 mikroglijos ląstelės.

BV-2 ląstelės buvo paveikiamos 100 nM ir 500 nM α -sinukleino ir S100A9 oligomerais bei 100 ng/ml, 500 ng/ml ir 1 μ g/ml lipopolisacharidu 24 val. Mikroglijos energetinio metabolizmo pokyčiai vertinti, matuojant kvėpavimo greičius ir glikolitinį aktyvumą didelės raiškos respirometrijos metodu, naudojant oksigrafinę sistemą Oroboros O2k ir O2k-pH ISE-Module. Užląstelinio azoto monoksido susidarymas vertintas spektrofotometriškai, naudojant Griess reagentų rinkinį. Kiekybinė prouždegiminio citokino TNF- α susidarymo ląstelių auginimo terpėje analizė atlikta ELISA metodu. Aktyvių deguonies junginių susidarymas vertintas pagal užląstelinio H₂O₂ susidarymą terpėje fluorimetriniu metodu. Statistinė duomenų analizė atlikta su SigmaPlot 14.0 programa.

Nustatėme, kad α -sinukleinas, S100A9 ir lipopolisacharidas neturi poveikio nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių bazaliniam kvėpavimo greičiui ir nekeičia permeabilizuotų ląstelių laidumo būsenos po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis. Tačiau 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 100 nM ir 500 nM α -sinukleinu nuslopina oksidacinį fosforilinimą, oksiduojant I-ojo kvėpavimo grandinės komplekso substratus piruvatą ir malatą. Mes pirmą kartą parodėme, kad 100 nM ir 500 nM S100A9 slopina mikroglijos ląstelių vykdomą oksidacinį fosforilinimą, oksiduojant I-ojo komplekso substratus piruvatą ir malatą bei II-ojo komplekso substratą sukcinatą po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis.

Be to, S100A9 sumažina bendrą mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumą, atskyrus oksidaciją nuo fosforilinimo. Panašus poveikis buvo stebimas BV-2 ląsteles paveikus 500 ng/ml lipopolisacharidu, tačiau 24 val. inkubacija su 100 ng/ml ir 1 µg/ml lipopolisacharidu reikšmingos įtakos mikroglijos ląstelių kvėpavimui įvairiose metabolinėse būsenose neturėjo. Mes taip pat nustatėme, jog mikroglijos glikolizės procesas gerokai suintensyvėja po 24 val. inkubacijos su 500 nM α -sinukleinu, 500 nM S100A9 bei 500 ng/ml ir 1 µg/ml koncentracijų lipopolisacharidu. Tačiau 100 nM α -sinukleino ir 100 nM S100A9 oligomerai bei 100 ng/ml lipopolisacharido nepaveikia BV-2 ląstelių glikolitinio aktyvumo po 24 val. inkubacijos. Be to, iš visų tiriamų medžiagų tik 500 nM α -sinukleinas padidino maksimalų BV-2 ląstelių glikolitinį aktyvumą. Nustatėme, kad BV-2 ląstelių inkubacija su 500 nM S100A9 ir 1 µg/ml lipopolisacharido gerokai padidino TNF- α sekreciją ir šio citokino koncentraciją ląstelių auginimo terpėje, tačiau 500 nM α -sinukleinas tokio poveikio po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis nesukėlė. Be to, gauti duomenys parodė, jog 24 val. inkubacija su 500 ng/ml ir 1 µg/ml koncentracijų lipopolisacharidu smarkiai padidina užląstelinio H₂O₂ susidarymą, tačiau α -sinukleinas, S100A9 ir 100 ng/ml lipopolisacharido neturi įtakos šio aktyvaus deguonies junginio koncentracijai ląstelių auginimo terpėje. Taip pat 24 val. inkubacija su α -sinukleinu, S100A9 ir lipopolisacharidu poveikio užląstelinio NO susidarymui neturėjo.

Apibendrinant, mūsų duomenys rodo, jog α -sinukleino ir S100A9 oligomerai bei lipopolisacharidas galimai prisideda prie neurodegeneracinių procesų, sukeldami mikroglijos ląstelių energetinio metabolizmo pokyčius ir savitą uždegiminį atsaką, priklausomai nuo patologinio veiksnio ir jo koncentracijos.

Gružaitė, Jovita. Investigation of the Mechanism of Neurotoxicity of the Amyloid Proteins α -synuclein and S100A9 on Microglial Cells. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Ramunė Morkūnienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: amyloid proteins, α -synuclein, S100A9, lipopolysaccharide, microglia, energy metabolism, neurotoxicity, neuroinflammation, neurodegeneration, Parkinson's disease.

Kaunas, 2024. 81 pages.

Summary

Over the last few years, various studies have expanded our knowledge of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of neurodegenerative diseases and have revealed the importance of microglial cells in the development of these diseases. A growing body of evidence suggests that changes in microglial metabolism in response to pathological factors are crucial in regulating immune and inflammatory responses in the brain. Nevertheless, the mechanisms of neurotoxicity of amyloid protein aggregates and endotoxin lipopolysaccharide linked to Parkinson's disease remain to be elucidated. It is still unknown what kind of metabolic changes in microglial cells are induced by these factors and how this contributes to the regulation of their functions and the development of proinflammatory phenotype during neurodegenerative processes.

This final degree project aimed to investigate the effects of the amyloid proteins α -synuclein and S100A9 on the microglial energy metabolism and to compare these results with the effect of bacterial endotoxin. To achieve this aim, the following objectives have been set: 1) to assess the respiration of intact BV-2 cells in response to α -synuclein, S100A9 and bacterial endotoxin; 2) to assess the respiration of permeabilized BV-2 cells in response to α -synuclein, S100A9 and bacterial endotoxin; 3) to assess glycolytic activity in response to α -synuclein, S100A9 and bacterial endotoxin; 4) to determine the production of various proinflammatory factors in cell growth media in response to α -synuclein, S100A9 and bacterial endotoxin. The object of investigation was immortalized mouse microglial BV-2 cells.

BV-2 cells were exposed to 100 nM and 500 nM α -synuclein and S100A9 oligomers and 100 ng/ml, 500 ng/ml and 1 μ g/ml concentrations of lipopolysaccharide for 24 h. Changes in microglial energy metabolism were assessed by measuring respiration rates and glycolytic activity using a high-resolution respirometer Oroboros O2k and O2k-pH ISE-Module. Production of extracellular nitric oxide was measured spectrophotometrically using the Griess Reagent Kit. Quantitative ELISA analysis was performed to determine the production of proinflammatory cytokine TNF- α in cell growth media. The generation of reactive oxygen species was evaluated by measuring efflux of H₂O₂ into the extracellular media using a fluorometric assay. Statistical analysis was performed using SigmaPlot 14.0 software.

We have found that α -synuclein, S100A9 and lipopolysaccharide do not affect the basal cellular respiration rate of the intact BV-2 cells and have no impact on the leak state of respiration in permeabilized cells after 24 h of incubation period with BV-2 cells. However, 24 h incubation of BV-2 cells with 100 nM and 500 nM α -synuclein inhibits oxidative phosphorylation, oxidizing respiratory

chain complex I-linked substrates pyruvate and malate. For the first time, we have demonstrated that 100 nM and 500 nM S100A9 suppress oxidative phosphorylation through decreased oxidation of the mitochondrial complex I- and complex II-linked substrates pyruvate and malate, and succinate after 24 h incubation with BV-2 cells. Moreover, S100A9 lowers the overall efficiency of mitochondrial respiratory chain complexes when oxidative phosphorylation is uncoupled. A similar effect was observed when BV-2 cells were exposed to 500 ng/ml lipopolysaccharide; however, incubation with 100 ng/ml and 1 µg/ml lipopolysaccharide for 24 h exerted no significant impact on the respiration of microglial cells across various metabolic states. We have also found that the glycolysis was markedly enhanced in microglial cells when exposed to 500 nM α -synuclein, 500 nM S100A9, as well as to 500 ng/ml and 1 µg/ml lipopolysaccharide for 24 h. However, 100 nM α -synuclein and 100 nM S100A9 oligomers, as well as 100 ng/ml lipopolysaccharide, did not appear to affect the glycolytic activity of BV-2 cells after 24 h incubation. Besides, out of all pathological factors investigated, only 500 nM α -synuclein increased the maximal glycolytic activity of BV-2 cells. We have determined that incubation of BV-2 cells with 500 nM S100A9 and 1 µg/ml lipopolysaccharide considerably increased TNF- α secretion and its concentration in cell growth media; however, 500 nM α -synuclein did not produce this kind of effect after 24 h incubation with BV-2 cells. Additionally, the obtained results revealed that 24 h incubation with 500 ng/ml and 1 µg/ml concentrations of lipopolysaccharide dramatically increased extracellular H₂O₂ production, whereas α -synuclein, S100A9 and 100 ng/ml lipopolysaccharide did not alter the concentration of this reactive oxygen compound in cell growth media. Moreover, 24 h incubation with α -synuclein, S100A9 and lipopolysaccharide had no impact on extracellular NO production.

Overall, our results suggest that α -synuclein and S100A9 oligomers, as well as lipopolysaccharide, may contribute to neurodegenerative processes by triggering energy metabolism changes in microglial cells and inducing distinct inflammatory responses, depending on the pathological factor itself and its concentration.

Turinys

Santrumpų sąrašas	10
Įvadas	12
1. Literatūros apžvalga	14
1.1. α -sinukleinas: struktūra, funkcijos ir neurotoksinio poveikio mechanizmai	14
1.2. S100A9: struktūra, funkcijos ir neurotoksinio poveikio mechanizmai	19
1.3. Endotoksino lipopolisacharido hipotezė	21
1.4. Mikroglijos reikšmė neuoroždegiminiame procese	23
1.4.1. Mikroglija ir jos funkcijos	23
1.4.2. Mikroglijos fenotipai ir jų skirstymas	25
1.4.3. Mikroglijos bioenergetika ir metabolinis perprogramavimas	26
1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir projekto temos bei uždavinių pagrindimas	29
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	30
2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir reagentai	30
2.2. Tyrimams naudota laboratorinė įranga	31
2.3. Tyrimų metodai	31
2.3.1. Imortalizuotos pelių mikroglijos BV-2 ląstelių kultūros kultivavimas	31
2.3.2. Ląstelių skaičiavimas ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu	32
2.3.3. Lipopolisacharido, α -sinukleino ir S100A9 paruošimas neurotoksiškumo tyrimams ir ląstelių kultūros inkubacija su tiriamomis medžiagomis	33
2.3.4. Ląstelių kvėpavimo greičio registravimas	33
2.3.5. Ląstelių glikolitinio aktyvumo vertinimas	34
2.3.6. Azoto monoksido auginimo terpėje kiekybinis įvertinimas	35
2.3.7. Prouždegiminio citokino TNF- α auginimo terpėje kiekybinis įvertinimas	36
2.3.8. Aktyvių deguonies junginių auginimo terpėje kiekybinis įvertinimas	36
2.3.9. Statistinė duomenų analizė	37
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	38
3.1. α -sinukleino poveikis nepermeabilizuotų ir permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiui	38
3.2. S100A9 poveikis nepermeabilizuotų ir permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiui	40
3.3. Lipopolisacharido poveikis nepermeabilizuotų ir permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiui	42
3.4. α -sinukleino ir S100A9 poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui	45
3.5. Lipopolisacharido poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui	47
3.6. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikio įtaka azoto monoksido susidarymui terpėje	49
3.7. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikio įtaka TNF- α koncentracijai terpėje	51
3.8. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikio įtaka aktyvių deguonies junginių susidarymui terpėje	53
Rekomendacijos	56
Išvados	57
Literatūros sąrašas	58
Publikacijų sąrašas	81
Priedai	82
1 priedas. LSMU Bioetikos centro leidimas	82

2	priedas. Padėka	83
3	priedas. Geriausio molekulinų neuromokslų studinio pranešimo laimėjimo pažymėjimas ..	84

Santrumpų sąrašas

α Syn – α -sinukleinas;

A53T α Syn – 53-ios aminorūgšties taškinės mutacijos α -sinukleinas;

A β – β amiloidas;

ADJ – aktyvūs deguonies junginiai (angl. *reactive oxygen species*, ROS);

ADP – adenzino difosfatas;

AKT – baltymų kinazė B;

AL – Alzheimerio liga;

ATP – adenzino trifosfatas;

CAT – karboksiatraktilozidas;

CNS – centrinė nervų sistema;

DAM – su ligomis siejamas mikroglijos fenotipas (angl. *disease-associated microglia*);

DAMP – su pažeidimu susijusios molekulinės struktūros (angl. *damage-associated molecular patterns*);

Dig – digitoninas;

DNP – 2,4-dinitrofenolis;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

DOG – 2-deoksi-d-gliukozė;

ERK – užląstelinio signalo reguliuojama kinazė (angl. *extracellular signal regulated kinase*);

Glu – gliukozė;

GLUT – gliukozės nešiklis;

GWAS – plataus masto genomo asociacijos tyrimai (angl. *genome-wide association studies*);

HIF-1 α – hipoksijos indukuojamas veiksnys 1- α (angl. *hypoxia-inducible factor 1- α*);

IL – interleukinas;

KT – kambario temperatūra;

LPS – lipopolisacharidas;

MGNd – su neurodegeneracinėmis ligomis siejamas mikroglijos fenotipas (angl. *microglia associated with neurodegenerative disease*);

mTOR – žinduolių rapamicino taikiny (angl. *mammalian target of rapamycin*);

NF- κ B – branduolio veiksnys κ B (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*);

NO – azoto monoksidas;

Omy – oligomicinas;

PAMP – su patogenais susijusios molekulinės struktūros (angl. *pathogen-associated molecular patterns*);

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinazė;

PL – Parkinsono liga;

RNR – ribonukleorūgštis;

scRNA-seq – pavienių ląstelių RNR sekoskaita (angl. *single-cell RNA sequencing*);

Succ – sukcinatas;

TLR – transmembraniniai atpažinimo receptoriai (angl. *toll-like receptors*);

TNF- α – naviko nekrozės veiksnys α (angl. *tumor necrosis factor α*);

WT α Syn – laukinio tipo α -sinukleinas.

Įvadas

Su amžiumi susijusios neurodegeneracinės ligos, tokios kaip Alzheimerio liga (AL) ir Parkinsono liga (PL) – didelė ir opi visuomenės sveikatos problema dėl nuolatos prastėjančios epidemiologinės situacijos ir terapinių priemonių ribotumo [1]. PL pasaulyje serga virš 10 mln. žmonių [2], o ilgėjant vidutinei gyvenimo trukmei šia liga sergančių pacientų skaičius labai sparčiai auga. Manoma, jog 2040 m. gali pasiekti net 17,5 mln. [3]. Neurodegeneracinių ligų grupei yra būdingas netaisyklingas amiloidinių baltymų susilankstymas, jų agregacija į įvairaus dydžio sankaupas bei kaupimasis ląstelėse ir už jos ribų specifiniuose smegenų regionuose. Tai sąlygoja oksidacinį stresą, lėtinį uždegimą, paveiktų neuronų disfunkciją ir sinapsių nykimą [1]. Pagrindiniai PL požymiai – amiloidinio baltymo α -sinukleino (α Syn) sankaupos dėl agregacijos į stambesnius junginius: oligomerus, protofibriles, fibriles ir Lewy kūnelius, bei laipsniška dopaminerginių neuronų degeneracija smegenų juodosios medžiagos tankiojoje dalyje. Dėl to pasireiškia įvairūs klinikiniai motoriniai ir nemotoriniai simptomai: tremoras, bradikinezija, rigidiškumas, miego sutrikimai, vidurių užkietėjimas, depresija, kognityvinių funkcijų sutrikimai ir kt. [4]. PL atveju tradiciškai yra labiausiai išskiriamas toksiškus agregatus sudarantis α Syn, o AL atveju – β amiloidas ($A\beta$) ir tau, tačiau naujausi tyrimai rodo, kad įvairių rūšių amiloidiniai baltymai ir jų tarpusavio sąveika persidengia skirtingų neurodegeneracinių ligų patogenezėje [5–7]. Pavyzdžiui, kalcio jonus (Ca^{2+}) prijungiantis amiloidinis baltymas S100A9, kurio padidėjusi koncentracija anksčiau buvo nustatyta AL paveiktų smegenų lizatuose ir mikroglijoje [8], geba skatinti α Syn agregaciją ir yra randamas koagregatuose kartu su α Syn PL sergančiųjų smegenyse [9]. Tačiau, koks yra šios sąveikos vaidmuo PL patogenezėje, kuris iš šių baltymų, α Syn ar S100A9, ir kokia jų agregatinė forma pasižymi didžiausiu citotoksiškumu, duomenų yra mažai arba mokslininkų nuomonės išsiskiria. Taip pat kyla daug diskusijų, ar amiloidinių baltymų agregacija yra neurodegeneracinių ligų patogenezės centre, nes nei vienas iš PL klinikinių tyrimų, pagrįstų monokloninių antikūnų imunoterapija nukreipta prieš α Syn agregatus, nedavė teigiamų rezultatų ir nepasiteisino [10,11]. Panaši situacija yra ir su AL [12]. Dėl to šios ligos vis dar lieka neišgydomos – pacientams yra prieinamas tik simptominis gydymas.

Pastaruoju metu manoma, kad neurouždegimas ir ši procesą reguliuojančios bei jame tiesiogiai dalyvaujančios mikroglijos ląstelės užima svarbiausią vaidmenį, aiškinantis neurodegeneracinių ligų etiologiją. Ši prielaida grindžiama pastebėjimais, kad PL sergančiųjų smegenyse randama daug reaktyvių mikroglijos ląstelių ir yra nustatomos didelės prouždegiminių citokinų koncentracijos smegenų skystyje bei plazmoje [13,14]. Manoma, jog neurouždegimas yra vienas anksčiausiai pasireiškiančių procesų vystantis PL [15], o plataus masto genomo asociacijos (angl. *genome-wide association studies*, GWAS) bei mikroglijos genomo atlaso tyrimai yra parodę, kad daugelio su AL ir PL susijusių genų raiška vyksta išimtinai mikroglijos ląstelėse [13,16,17]. Be to, viena iš neurodegeneracinių ligų patogenezę aiškinančių hipotezių yra endotoksino lipopolisacharido (LPS) hipotezė, teigianti, jog LPS skatina amiloidų agregaciją ir sukelia neurouždegimą, tarpininkaujant mikroglijos ląstelėms ir taip prisidedant prie neuropatologinių procesų grandinės smegenyse [18].

Smegenys – labai metaboliškai aktyvus organas, sunaudojantis apie 25 % visos organizmui reikalingos gliukozės [19], tačiau PL atvejais yra stebimas susilpnėjęs gliukozės metabolizmas [20]. Todėl yra manoma, kad neurodegeneracinių ligų metu stebimi patologiniai pokyčiai smegenyse yra glaudžiai susiję su sutrikusia nervinių ląstelių, ypač mikroglijos, bioenergetika. Tai – svarbu, nes mikroglijos metabolinių kelių persitvarkymai, reaguojant į smegenų mikroaplinkos pokyčius, tiesiogiai turi įtakos šių ląstelių funkciniam aktyvumui, uždegiminio atsako reguliavimui, fenotipiniams bei morfologiniams pokyčiams, o tai turi didelę reikšmę neurodegeneracinių ligų

vystymuisi ir tolimesniam progresavimui [15,21]. Užtai tikėtina, kad mikroglijos ląstelių metabolinių kelių reguliavimas gali būti perspektyvus taikinyis neuroprotekcinei terapijai. Visgi, mikroglijos medžiagų apykaitos pokyčiai, vykstantys AL ir PL metu, lieka iki galo nesuprasti. Egzistuoja didelis poreikis išsamiai tirti LPS ir amiloidinių baltymų reikšmę neurodegeneracinių ligų vystymosi metu, reguliuojant mikroglijos funkcijas, keičiant jų metabolizmą ir aiškintis, kaip tai prisideda prie šių ląstelių prouždegiminio fenotipo atsiradimo. Mokslinėje literatūroje trūksta tyrimų, kurie leistų suprasti mikroglijos bioenergetinių pokyčių visumą neuouždegiminiuose procesuose ir molekulinis mechanizmus AL bei PL modeliuose. Ypač trūksta tyrimų, išsamiai analizuojančių S100A9 poveikį mikroglijos ląstelių bioenergetikai.

Tai – pirmasis Lietuvoje *in vitro* tyrimas, nagrinėjantis užląstelinių α Syn ir S100A9 agregatų bei LPS poveikį mikroglijos ląstelių bioenergetikai, taikant šių procesų plataus spektro analizę. Gauti rezultatai suteiks naujų įžvalgų ir padės geriau suprasti neurodegeneracinių ligų patogenezės molekulinis mechanizmus, apimančius amiloidinių baltymų poveikį glijos ląstelėms ir jų energetiniam metabolizmui, o tai – svarbu, ateityje ieškant potencialių taikinių naujoms ir efektyvioms terapinėms priemonėms kurti.

Darbo tikslas – ištirti amiloidinių baltymų α -sinukleino ir S100A9 vaidmenį mikroglijos ląstelių energetiniam metabolizmui bei palyginti jį su bakterinio endotoksino poveikiu.

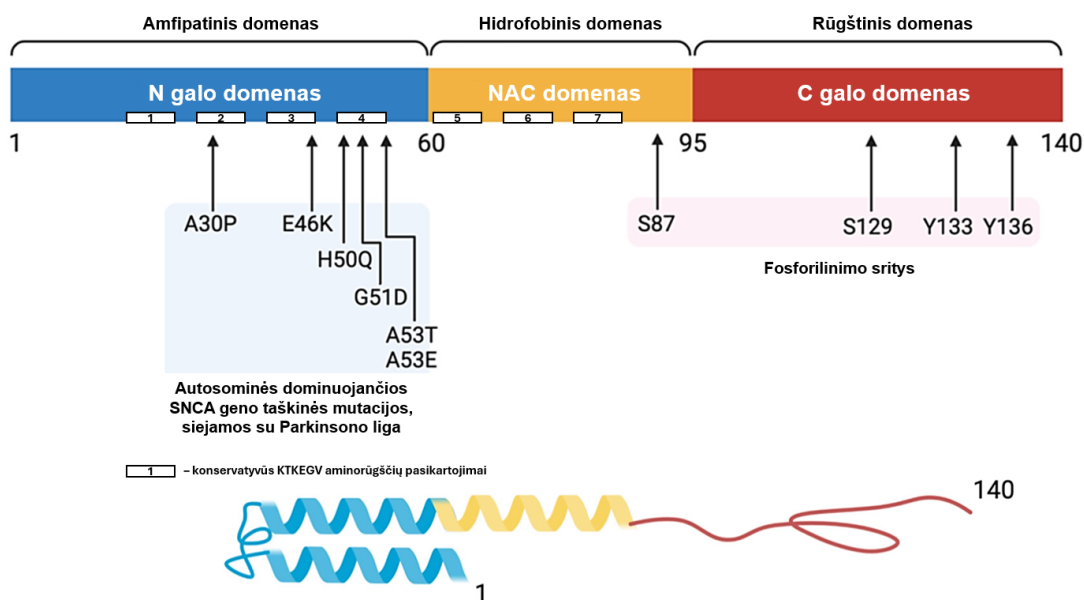
Darbo uždaviniai:

1. įvertinti nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 bei bakteriniam endotoksinui;
2. įvertinti permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimą skirtingose metabolinėse būsenose, veikiant α -sinukleinui, S100A9 bei bakteriniam endotoksinui;
3. įvertinti glikolitinį aktyvumą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 bei bakteriniam endotoksinui;
4. nustatyti įvairių prouždegiminių veiksnių susidarymą, veikiant α -sinukleinui, S100A9 bei bakteriniam endotoksinui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. α -sinukleinas: struktūra, funkcijos ir neurotoksinio poveikio mechanizmai

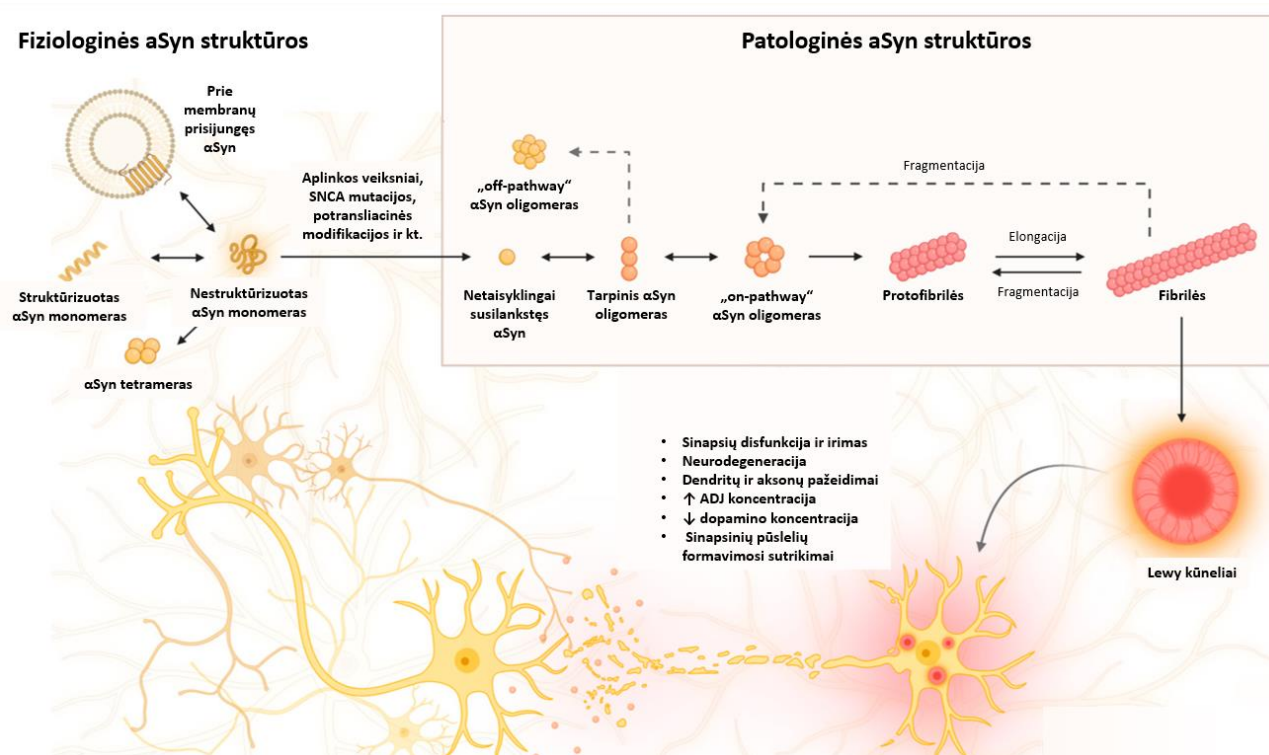
α -sinukleinas (α Syn) – tai citozolinis, iš 140 aminorūgščių liekanų sudarytas, sąlyginai mažas (14 kDa) baltymas, koduojamas SNCA geno, esančio ilgajame ketvirtos žmogaus chromosomos petyje (4q21) [22]. Tačiau dėl alternatyvaus splaisingo yra nustatytos mažiausiai 4 šio baltymo izoformos: SNCA140, SNCA126, SNCA112, SNCA98 [23]. Didžiausia α Syn raiška vyksta centrinėje nervų sistemoje (CNS), ypač neuronų presinapsinėse galūnėlėse, aksonuose ir neuronų kūnuose [24,25]. Glijos ląstelės (astrocitai, oligodendrocitai, mikroglia) taip pat vykdo šio baltymo raišką, o nedideli α Syn kiekiai randami širdies, plaučių, inkstų, griaučių skersaruožių raumenų bei kraujo ląstelėse [24,26]. Yra išskiriami trys α Syn struktūriniai domenai: N galo (1-60 aminorūgštys), vidurinis NAC (angl. *non-amyloid β -component*) (61-95 aminorūgštys) ir C galo domenai (96-140 aminorūgštys) (1.1.1 pav.). α Syn turi septynis 11-os aminorūgščių konservatyvius pasikartojimus (XKTKEGVXXXX), iš kurių keturi yra N galo domene, o likę – NAC domene. Jie formuoja α -spiralių struktūrinius griaučius ir yra svarbūs sąveikai su membranomis [22]. Svarbu ir tai, kad beveik visos su PL susijusios mutacijos SNCA gene pasireiškia pokyčiais N galo domene [27]. Hidrofobinis NAC domenai yra svarbus α Syn agregacijai ir yra atsakingas už α Syn protofibrilių ir fibrilių susidarymą, nes geba formuoti β -klosčių struktūras, o neigiamą krūvį turintis lankstus C galo domenai reguliuoja baltymų tarpusavio sąveikas ir jungimąsi su mažomis molekulėmis bei metalo jonais, ypač Ca^{2+} . Dažnai α Syn C galas tampa fosforilinimo taikiniu ir neretai yra sutrumpinamas [26,28]. Be to, C galo domenai, sąveikaudamas su N galo domenu, riboja ir apsaugo α Syn nuo pataloginio netaisyklingo susilankstymo ir agregacijos į didesnius toksiškus agregatus [22,27].



1.1.1 pav. α -sinukleino monomero struktūros schema. Adaptuota pagal [28]

Fiziologinėmis sąlygomis randamos kelios natyvios α Syn formos. α Syn gali egzistuoti kaip tirpus nestruktūrizuotas monomeras, kaip prie fosfolipidų membranų prisijungęs multimeras arba kaip agregatų nesudarantis tetrameras (~58 kDa) [25,26,29]. Dažnai natyvių α Syn monomerų N galai yra acetilinti, dėl to išvengiama spontaniškos savaiminės agregacijos [29,30]. Kadangi α Syn neturi stabilios erdvinės struktūros, įvairūs veiksniai, tokie kaip potransliacinės baltymo modifikacijos, SNCA geno mutacijos, temperatūros ir pH pokyčiai, susidariusios pataloginės sąlygos ir kt. gali

inicijuoti α Syn monomerų netaisyklingą susilankstymą ir agregaciją į toksiškus oligomerus (angl. *on-pathway oligomers*), protofibriles, o vėliau suformuoti netirpias fibriles ir galiausiai sudaryti Lewy kūnelius bei neuritų sancaupas neuronuose [25,29,31]. Visgi, ne visi oligomerai yra toksiški ir gali toliau formuoti didesnius agregatus – tokie oligomerai yra vadinami „off-pathway“ [29]. Reikia paminėti, kad fibrilės gali fragmentuotis ir paskatinti tolimesnę α Syn agregaciją bei plitimą smegenyse (1.1.2 pav.) [25,29]. Apskritai, α Syn gali sudaryti įvairius oligomerus ir fibriles, tarpusavyje besiskiriančius morfologiškai, struktūriškai, molekuline mase, savybėmis, toksiškumo profiliu ir funkcijomis [31,32].



1.1.2 pav. α -sinukleino įgaunamos struktūrinės formos fiziologinėmis ir pataloginėmis sąlygomis. Adaptuota pagal [29]

α Syn fiziologinės funkcijos vis dar yra tiriamos, tačiau daugėja duomenų, kad šis baltymas yra itin svarbus, reguliuojant sinapsių plastiškumą, sinapsinių pūslelių skaičių, mobilizaciją ir jų bei jose esančių neurotransmiterių atpalaidavimą, ypač dopaminerginiuose neuronuose [29,33–35]. Šie procesai vykdomi prie membranų prisijungusiam monomeriniam α Syn sąveikaujant su pagrindiniu SNARE komplekso baltymu VAMP2 (sinaptobrevinu-2) ir tokiu būdu skatinant SNARE komplekso susidarymą bei reguliuojant pūslelių egzocitozę ir endocitozę [26,31,36]. Kadangi natyvi α Syn forma gali lengvai sąveikauti su membranomis ir jas sudarančiais komponentais, nenuostabu, kad šis baltymas dalyvauja membranų biogenezeje, jas stabilizuojant ir skatinant membranų išsilenkimą formuojantis pūslelėms, o tai – ypač svarbu egzocitozės ir endocitozės procesams sinapsėse [24,37,38]. Be to, α Syn reguliuoja dopamino metabolizmą, biosintezę, pernašą ir kaupimąsi sinapsinėse pūslelėse, taip kontroliuodamas šio mediatoriaus koncentraciją sinapsėse [22,39]. Taip pat įvairūs *in vitro* ir *in vivo* tyrimai parodė, kad α Syn dalyvauja, reguliuojant aksoninį transportą neuronuose. α Syn gali tiesiogiai jungtis ir sąveikauti su ląstelės griaučių baltymais: tubulinu, kinezinu ir dineinu, todėl tampa svarbus mikrovamzdelių polimerizacijai, nervinių ląstelių struktūros palaikymui, pernašos ir aksonų regeneracijos procesuose [22,40–42]. Nors α Syn pavadinimas buvo

suteiktas dėl pagrindinės šio baltymo lokalizacijos sinapsėse (syn-) ir ląstelių branduoliuose (-nuclein), tačiau α Syn funkcija branduolyje vis dar nėra iki galo žinoma. Manoma, kad α Syn gali tiesiogiai sąveikauti su deoksiribonukleorūgštimi (DNR), histonais ir kitais branduolio baltymais ir taip dalyvauti genetiniame bei epigenetiniame genų raiškos reguliavime [29]. α Syn randamas ir kitose nervinių ląstelių organelėse: mitochondrijose, endoplazminiame tinkle, Goldžio komplekse. Tačiau tikslios α Syn fiziologinės funkcijos šiuose ląstelės organoiduose lieka taip pat iki galo neišaiškintos [26]. Visai neseniai Ramezani'is ir kt. atskleidė, kad α Syn galimai padeda reguliuoti ir palaikyti tinkamą Ca^{2+} srautą tarp mitochondrijų ir endoplazminio tinklo, taip reguliuojant šių jonų homeostazę [43]. Taip pat tyrimai rodo, kad α Syn fiziologinėmis sąlygomis dalyvauja palaikant mitochondrijų funkcijas ir dinamiką neuronuose [44] bei gali apsaugoti nuo oksidacinio streso [35]. Manoma, kad natyvus α Syn prisideda prie nervinio audinio apsaugos, sąveikaudamas su molekuliniais šaperonais (14-3-3 baltymu, CSP α), mažindamas proapoptotinių veiksnių (PKC- δ , BAD) raišką bei palaikydamas neurogenezę [29,35]. Be to, Li ir kt. tyrimas atskleidė naują α Syn fiziologinę funkciją ir parodė, kad α Syn monomerai gali sumažinti α Syn oligomerų sukeltą uždegimą ir neurotoksinį poveikį mikroglijos ląstelėse, reguliuodami šių ląstelių fenotipą per užląstelinio signalo reguliuojamos kinazės (ERK), branduolio veiksnio κ B (NF- κ B) ir peroksisomų proliferatoriaus aktyvinamo receptoriaus γ (PPAR γ) signalinius kelius [45]. Taip pat mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad α Syn reguliuoja informacinės ribonukleorūgšties (iRNR) stabilumą, N galo domenu sąveikaudamas su P-kūnelių baltymais Edc4 ir Dcp1 [46]. Bendrai visi šie tyrimų rezultatai dar kartą pabrėžia natyvaus α Syn svarbą normaliai nervų sistemos fiziologijai palaikyti. Tačiau, įvykus α Syn potransliacinei modifikacijai, α Syn netaisyklingai susilanksčius ir toliau suformuojant didesnius agregatus, yra sutrikdomos arba išvis prarandamos fiziologinės šio baltymo funkcijos, pasireiškia neurotoksinis poveikis [35].

Potransliacinės α Syn modifikacijos, tokios kaip fosforilinimas, C galo sutrumpinimas, nitrinimas, acetilinimas, sulfoninimas ir kt., turi svarbų vaidmenį šio baltymo agregacijai ir neurodegeneracinių ligų vystymuisi [31,47]. Pavyzdžiui, α Syn 129-to lizino liekanos fosforilinimas (pS129) yra siejamas su patologinių fibrilių suformavimu ir atsidėjimu į Lewy kūnelius [26]. Homocisteino tiolaktono vykdoma α Syn 80-to lizino liekanos kovalentinė modifikacija taip pat skatina α Syn agreguotis ir sudaryti neurotoksiškas fibriles. Šiame tyrime buvo parodyta, kad tokių homocisteinilintų α Syn fibrilių injekcija į smegenis pelėms sukelia sunkiau išreikštą α Syn patologiją ir motorinius sutrikimus, lyginant su nmodifikuoto α Syn sudarytomis fibrilėmis [48]. Be abejo, SNCA geno taškinės mutacijos taip pat lemia α Syn oligomerizaciją į didesius toksiškus agregatus, skatina jų kaupimąsi ir sąlygoja nervinių ląstelių pažeidimus [25,26]. Verta paminėti ir tai, kad senstant ląstelių pajėgumas šalinti α Syn baltymų sankaupas gerokai sumažėja, užtai susidaro palankios sąlygos kauptis amiloidiniams baltymams ir plisti neuromediacijai [22,49]. Be to, patologinės α Syn formos gali neigiamai paveikti baltymų šalinimo mechanizmus: ubikvitino-proteosomos sistemos, lizosomų veiklą ir autofagijos procesus [29,50,51]. Dėl sutrikusios baltymų degradacijos sistemų veiklos pasireiškia oksidacinis stresas, sinapsių disfunkcija ir suirimas [24,28]. Tyrimai rodo, jog α Syn agregatai sutrikdo aksoninį transportą neuronuose ir SNARE komplekso susidarymą, dėl to sutrinka sinapsinių pūslelių dinamika, mobilumas ir neuromediatorių išskyrimas [52,53]. Ypač neigiamai paveikiami dopaminerginiai keliai, nes ilgalaikė per didelę α Syn raišką sumažina dopamino koncentraciją ir atpalaidavimą slopinant tirozino hidroksilazės, sinapsinių pūslelių nešiklio VMAT2 bei dopamino nešiklio DAT raišką ir aktyvumą [26,29]. Be to, nustatyta, kad neuronų sinapsių disfunkcija, lydima kognityvinių funkcijų sutrikimų, atsiranda α Syn oligomerams ir fibrilėms sąveikaujant su GluN2A NMDA receptoriaus subvienetais [54]. Kognityvinių funkcijų susilpnėjimas

gali būti stebimas ir dėl α Syn agregatų sąlygotos intensyvesnės mikroglijos ląstelių vykdomos glutamato sekrecijos, nes padidėjusi šio mediatoriaus koncentracija sinapsėse sutrikdo nervinio impulso perdavimą [55]. Neseniai Maor su kolegomis pateikė naujų įžvalgų apie α Syn neurotoksinio poveikio mechanizmą. Jie parodė, kad patologinėmis sąlygomis stebimas α Syn tiesioginis jungimasis su β -spektrinu, pagrindiniu ląstelės griaučių baltymu, reikalingu plazminės membranos baltymams lokalizuoti, sutrikdo spektrino-ankirino komplekso struktūrą. Dėl to, įvyksta ląstelės integralinių baltymų, pavyzdžiui, Na^+/K^+ ATPazės, persitvarkymas membranoje bei sutrinka jų funkcijos. Tokie pokyčiai sukelia neuronų membranos potencialo reguliavimo sutrikimus ir galiausiai sąlygoja neuronų žūtį [56].

Taip pat kyla daug diskusijų, kuri α Syn forma yra neurotoksiškiausia. Kol kas mokslininkai vieningai teigia, kad α Syn oligomerai ir fibrilės yra toksiški ląstelėms, tačiau, kuris iš jų labiausiai toksiškas – nesutariama, nes mokslinių tyrimų rezultatai yra kontroversiški. Visgi, šiuo metu daugėja duomenų, kad tam tikros α Syn oligomerų rūšys galimai yra labiausiai citotoksiškos ir yra svarbiausios neurodegeneracinių ligų vystymosi bei progresavimo procesuose [28]. α Syn oligomerų ir kitų šio baltymo formų aptikimas PL sergančių pacientų smegenų skystyje ir plazmoje rodo, kad užląstelinis α Syn taip pat dalyvauja neurodegeneracinių ligų patogenezėje [27,57]. Taigi, ne tik viduląstelinės, bet ir užląstelinės α Syn sankaupos gali būti citotoksiškos [22,58]. Tačiau įdomu tai, kad pastarųjų toksiškumas nepriklauso nuo viduląstelinio α Syn [59]. Įvairių *in vivo* ir *in vitro* tyrimų rezultatai rodo, kad užląstelinis α Syn gali tiesiogiai ir netiesiogiai sąlygoti ląstelių žūtį [24]. Yra duomenų, kad didelės masės užląsteliniai α Syn oligomerai gali tiesiogiai pažeisti plazminės membranos integralumą iš išorinės ląstelės pusės ir taip suaktyvinti išorinį apoptozės kelią, sukelti neuronų žūtį [58]. Dėl α Syn oligomerų sukkelto membranos vientisumo pažeidimo, lydimo membranos lipidų peroksidacijos, padidėjusio Ca^{2+} patekimo į ląstelių vidų ir membranos potencialo svyravimų, neuronai gali žūti ir ferroptozės būdu [60]. Fusco ir kt. nustatė dvi svarbiausias α Syn oligomerų struktūrinės dalis, tiesiogiai dalyvaujančias tokiaame membranos pažeidimo procese. Tai – oligomerų išorėje esanti lipofilinė sritis, sudaranti stiprią sąveiką su ląstelių membranos paviršiumi, ir oligomerų šerdis, sudaryta iš β -klosčių, kuriomis yra įsiterpiama į fosfolipidų dvisluoksnį, taip pažeidžiant membranos vientisumą, suformuojant poras ir padidinant viduląstelinę Ca^{2+} bei aktyvių deguonies junginių (ADJ) koncentraciją [61]. Svarbu tai, kad tiek monomerinės formos α Syn, tiek α Syn oligomerai gali sutrikdyti Ca^{2+} homeostazę ir nuo šių jonų priklausomus signalinius kelius, tačiau tik oligomerinė baltymo forma sąlygoja neurodegeneraciją [60,62]. Be to, α Syn gali neigiamai paveikti geležies apykaitą, sąlygoti $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ santykio disbalansą ir dėl to inicijuoti nuo geležies priklausomą ląstelių žūtį, ferroptozę, nerviniame audinyje bei neigiamai paveikti mitochondrijų funkcijas [22,63]. Iš tiesų, α Syn oligomerai yra linkę jungtis prie mitochondrijų išorinės ar vidinės membranos, o jų sukeltas toksinis poveikis šioms organelėms – daugialypis [25,64]. Moksliniais tyrimais parodyta, jog patologinės α Syn formos slopina baltymų pernašą į mitochondrijas, prisijungdami prie išorinės mitochondrijų membranos translokazės TOM20 [65,66]. Taip pat sutrikdoma mitochondrijų membranos porino VDAC veikla [67], o α Syn oligomerams pažeidus mitochondrijų membranos vientisumą kartu yra prarandamas protonų gradientas, reikalingas oksidaciniam fosforilinimui vykdyti, ir suintensyvėja ADJ susidarymas [31]. Eksperimentiškai parodyta, kad mutantinis α Syn, per didelę šio baltymo raišką ir sudaromi agregatai slopina I-ojo kvėpavimo grandinės komplekso aktyvumą ir skatina ADJ, daugiausia vandenilio peroksido (H_2O_2), susidarymą, o tai sąlygoja greitesnę *de novo* mutantinio A53T α Syn oligomerizaciją, sukelia mitochondrijų membranos permeabilizaciją ir neuronų žūtį [29,68]. Be to, α Syn oligomerams sukėlus oksidacinį stresą ir Ca^{2+} disbalansą, atsiveria nespecifinio laidumo pora (angl. *permeability transition pore*), o ilgalaikis šios

poros atsivėrimas lemia mitochondrijų disfunkciją, brinkimą, membranos plyšimą, citochromo c atpalaidavimą ir galiausiai ląstelių žūtį [68,69]. Perteklinė α Syn raiška ir patologinės šio baltymo formos taip pat gali sukelti mitochondrijų fragmentaciją, membranų biogenezės sutrikimus ir mitochondrijų morfologijos pažeidimus [22,29]. Tokiems mitochondrijų pažeidimams ypač jautrūs tampa dopaminerginiai neuronai, kurių gyvybingumui ir normalioms funkcijoms palaikyti nuolatos reikalingos didelės energijos sąnaudos. Visgi, α Syn agregatai pažeidžia ne tik mitochondrijas, bet ir kitas organeles: endoplazminę tinklą, branduolį, Goldžio kompleksą, lizosomas [70].

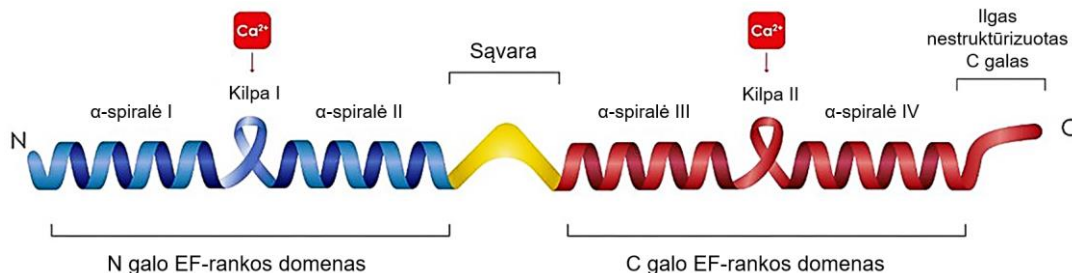
Užląstelinio α Syn toksiškumas taip pat yra siejamas su jo gebėjimu plisti nerviniame audinyje ir skatinti viduląstelinę α Syn monomerų agregaciją [24,29,71]. Patologiniai α Syn agregatai gali plisti iš CNS per klajoklinį nervą į periferinius organus, ypač virškinamąjį traktą, ir atvirkščiai [72,73]. Tačiau vis dar nėra iki galo aišku, ar pirminis toks α Syn patologinių formų išplitimas įvyksta retrogradiniu ar anterogradiniu keliu. α Syn monomerai ir mažos molekulinės masės oligomerai gali difuzijos būdu prasiskverbti pro ląstelės membraną į užląstelinę erdvę. Žūstantys neuronai taip pat gali atpalaiduoti įvairios agregatinės būsenos α Syn. Jis gali būti išskiriamas su egzosomomis, egzocitozės būdu arba tiesiogiai perduodamas greta esančioms ląstelėms per tunelinius nanovamzdelius (angl. *tunneling nanotubes*) [24,29]. Užląstelinį α Syn paprastai fagocituoja šalia esantys astrocitai ir mikroglia, dalyvaujant transmembraniniams atpažinimo receptoriams TLR-2, TLR-4, LAG3 ir Fc γ RIIB receptoriams, tačiau α Syn agregatai slopina šių ląstelių fagocitinį aktyvumą. Dėl to yra stebimas tokių agregatų susikaupimas ir tolimesnis plitimas, sukeliantis neuroūdegimines reakcijas nerviniame audinyje. Svarbu pasakyti, jog mikroglia taip pat aktyviai dalyvauja šio amiloidinio baltymo sekrecijoje ir perdavime neuronams [22,24,57], o selektyvus TLR-2/MyD88/NF- κ B signalinio kelio inhibavimas sumažina mikroglijos uždegiminį atsaką ir slopina toksinių α Syn formų plitimą *in vitro* ir *in vivo* [74]. Įdomu tai, kad La Vitola'os ir kt. *in vivo* tyrimas parodė, jog α Syn oligomerai sutrikdo kognityvines funkcijas, veikdami per TLR-2, bet ne per TLR-4 mikroglijos ir astrocitų receptorių [75]. TLR ir kitų receptorių suaktyvinimas sąlygoja NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją, o tai lemia intensyvią prouždegiminių citokinų (TNF- α , IL-6, IL-1 β), ADJ sekreciją bei inflamamosos susidarymą ir aktyvaciją [27,33]. Tai patvirtina ir transgeninių CX3CR1-SNCA pelių juodosios medžiagos pavienių ląstelių RNR sekoskaitos (angl. *single-cell RNA sequencing*, scRNA-seq) analizė, kuri atskleidė, jog α Syn agregacija mikroglijos ląstelėse padidina su uždegimu susijusių genų raišką: NLRP3 inflamamosos komponentų ASC dalelių, IL-1 β ir NF- κ B [76]. Taip pat yra duomenų, kad netaisyklingai susilankstęs α Syn pasižymi genotoksiškumu [34]. Hinkle'is ir kt. *in vitro* ir *in vivo* tyrimais parodė, kad PL atveju α Syn fibrilės pažeidžia mikroglijos DNR ir suaktyvina cGAS/STING, užtai sukeliamas neuroūdegimas ir neurodegeneracija [77]. Verta pabrėžti, jog amiloidinių baltymų sankaupų sąlygotas uždegimas ir nervinių ląstelių degeneracija gali dar labiau sustiprinti α Syn sukeltą citotoksinį poveikį, skatinant toksiškų agregatų plitimą ir agregaciją [78]. Be to, pastaruoju metu daugėja duomenų, rodančių, jog užląstelinis α Syn sankaupų citotoksiškumas gali pasireikšti, sukeliant mikroglijos ląstelių metabolizmo pokyčius, dėl kurių sustiprėja neuroūdegimas ir dopaminerginių neuronų degeneracija [79–81]. Tačiau tikslūs tokio poveikio mechanizmai dar nėra išaiškinti.

Apibendrinant, α Syn neurotoksinio poveikio mechanizmas – sudėtingas, daugialypis ir iki šiol nėra pakankamai gerai atskleistas. Lieka neaišku, ar neurotoksiškumas pirmiausia pasireiškia dėl patologinių α Syn formų susikaupimo, ar dėl sumažėjusios natyvaus α Syn koncentracijos. Skirtingos α Syn agregatinės formos jungiasi prie skirtingų receptorių ir pasižymi skirtingu toksiškumo profiliu, tačiau mokslinėje literatūroje trūksta turimų duomenų apie įvairių šio baltymo formų neurotoksinį

poveikį susistemimui. Taip pat mažai žinoma, kaip užląstelinis α Syn paveikia mikroglijos energetinį metabolizmą bei kaip užląstelinis α Syn sąveikauja su viduląstelinio α Syn ir skatina jo netaisyklingą susilankstymą, agregaciją bei citotoksinį poveikį. Dėl šių priežasčių α Syn vaidmuo neurouždegiminiuose ir neurodegeneraciniuose procesuose vis dar yra intensyviai tiriamas.

1.2. S100A9: struktūra, funkcijos ir neurotoksinio poveikio mechanizmai

S100A9 (Kalgranulinas B, MRP14) – tai prouždegiminis, Ca^{2+} surišančių S100 baltymų šeimai priklausantis, 13,2 kDa dydžio baltymas, koduojamas ilgajame pirmos žmogaus chromosomos petyje (1q21) [82–84]. Jį sudaro 114 aminorūgščių liekanų, tačiau dėl alternatyvaus splaisingo randama ir kita, mažesnė S100A9 izoforma (12,7 kDa), be pirmų keturių N galo aminorūgščių [85]. S100A9 baltymo struktūroje yra du Ca^{2+} prijungiantys EF-rankos (angl. *EF-hand*) domenai, sudaryti iš spiralė-kilpa-spiralė motyvų. Tarpusavyje šie domenai yra sujungti sąvaros sritimi (angl. *hinge region*), o Ca^{2+} jungiasi prie EF-rankos duomenų kilpinių struktūrinių dalių (1.2.1 pav.). Įdomu tai, kad šis baltymas turi ilgiausią nestruktūrizuotą C galą iš visų S100 šeimos baltymų [84,86,87]. Ca^{2+} prisijungimas ir disociacija sąlygoja baltymo konformacinius pokyčius, todėl turi įtakos S100A9 susilankstymui ir oligomerizacijai į didesnius amiloidinius agregatus bei sudaro sąlygas sąveikauti su receptoriais ir kitais amiloidiniais baltymais [84,88,89]. S100A9 turi afiniškumą ir kitiems divalenčiams jonams, pavyzdžiui, Zn^{2+} , Mn^{2+} ir Cu^{2+} . Šie taip pat gali keisti S100A9 struktūrą ir funkcijas bei yra svarbūs baltymo antimikrobiniam aktyvumui ir metalo jonų homeostazės reguliavimui smegenyse [84,88]. Nors dauguma S100 šeimos baltymų egzistuoja kaip homodimerai, paprastai S100A9 su homologiniu baltymu S100A8 *in vivo* sudaro stabilų heterodimero kompleksą – kalprotektiną [84,90], kurio kiekiai padidėja PL metu [91].



1.2.1 pav. Antrinė S100A9 baltymo struktūros schema. Adaptuota pagal [87]

Didžiausia S100A9 raiška vyksta neutrofiluose, monocituose, kraujagyslių endotelio ir dendritinėse ląstelėse, neuronuose bei mikroglijose [86,89,92]. Įprastai, tai – citozolinis baltymas, tačiau yra randamas ir ląstelių branduolyje, o reaguojant į ląstelės pažeidimą, infekciją ar uždegimą, yra sekretuojamas į užląstelinę erdvę ir netgi yra randamas koagregavęs su kitais amiloidiniais baltymais [93,94]. Todėl natūralu, kad šis baltymas atlieka svarbias funkcijas, dalyvaudamas ir kontroliuodamas įvairius viduląstelinius ir užląstelinius procesus: apoptozę, proliferaciją, diferenciaciją, fagocitozę, ląstelės griaučių dinamiką, judrumą, aminorūgščių metabolizmą, Ca^{2+} homeostazę ir nuo Ca^{2+} priklausomų signalinių kelių aktyvaciją [84,90,92,93,95]. Be to, užląstelinis S100A9 yra svarbus reguliuojant imuninį ir uždegiminį atsaką, nes gali pasižymėti tiek priešuždegiminiu, tiek uždegimą skatinančiu poveikiu, reguliuodamas citokinų išsiskyrimą ir makrofagų aktyvaciją [84,90,92,95]. Taip pat yra duomenų, kad S100A9 gali tiesiogiai jungtis prie kai kurių citokinų ir taip moduluoti viduląstelinius signalinius kelius [84,96]. Reikia paminėti, kad S100A9 gali pasižymėti ir antioksidaciniu aktyvumu, apsaugančiu ląsteles nuo ADJ ir NO [92], bei antimikrobinio aktyvumu.

Parodyta, kad užląstelinis S100A9 gali padidinti neutrofilų chemotaksį ir baktericidinį aktyvumą prieš *E. coli*, skatindamas šių ląstelių fagocitozę, suaktyvinant Syk, PI3K/AKT, ERK1/2 signalų perdavimo kaskadą [84]. Įdomu dar ir tai, jog esant išeminiam pažeidimui ir padidėjus S100A9 raiškai mikroglijos ląstelėse, S100A9 baltymas gali reguliuoti mitochondrijų funkcijas, skatindamas mikrogliją internalizuoti egzogenines mitochondrijas, bei, dalyvaudamas IL-17 signaliniame kelyje, reguliuoja mikroglijos piroptozę ir neurogenezę išeminio pažeidimo srityje [97]. Užtai reiktų neatmesti tos prielaidos, kad panašūs procesai galimai vyksta ir neurodegeneracijos proceso pradžioje. Reikia paminėti dar ir tai, jog Tian'o ir kt. tyrimai atskleidė, kad S100A9 ankstyvose neurodegeneracijos stadijose skatina neuroninių kamieninių ląstelių (angl. *neural stem cells*) diferenciaciją, siekiant kompensuoti žuvusių neuronų skaičių, tačiau didelės šio baltymo koncentracijos sąlygoja neuronų ir vėliau pačių neuroninių kamieninių ląstelių žūtį. Manoma, kad šiame procese įtraukiamas Notch signalinis kelias [98]. Be to, Bai su kolegomis eksperimentiškai parodė, kad nedidelės S100A9 baltymo koncentracijos skatina BV-2 mikroglijos ląstelių migraciją ir proliferaciją, tačiau didelės koncentracijos pasižymi neurotoksišku poveikiu: susidaro ūmaus uždegimo sąlygos, sutrinka ląstelių judrumas, proliferacija ir sumažinamas ląstelių gyvybingumas. Toks poveikis pasireiškia S100A9 baltymui aktyvuojant TLR-4 ir TLR-7 signalinius kelius ir taip paskatinant prouždegiminių citokinų TNF- α ir IL-6 sekreciją [93]. Taigi, akivaizdu, jog S100A9 funkcijos priklauso nuo šio baltymo koncentracijos, agregacijos laipsnio ir lokalizacijos.

Esant neurodegeneracinėms, autoimuninėms, onkologinėms ir infekcinėms ligoms bei uždegimui, stebimas aukštas kalprotektino, S100A9 ir S100A8 baltymų raiškos lygis [83,84]. Šių baltymų raiška padidėja ir organizmui senstant [99]. Lėtinis neurouždegiminis procesas skatina ne tik S100A9 raišką, bet ir S100A9 plitimą smegenyse, o tai gali inicijuoti S100A9 koagregaciją su kitais amiloidiniais baltymais [9,33]. S100A9 randamas A β agregatuose šeiminės ir sporadinės kilmės AL pacientų smegenyse [8,83]. Nustatyta, kad S100A9 sąvaros sritimi jungiasi su A β ir tokiu būdu skatina fibrilinių A β struktūrų susidarymą [83]. Be to, S100A9 baltymas A β agregatų susidarymą gali reguliuoti ir transkripciniame lygmenyje. Kummer'is ir kt. parodė, jog S100A8/A9 aktyvuoja mikrogliją ir padidina TNF- α bei IFN- γ sekreciją, o šie prouždegiminiai citokinai sąlygoja BACE1 ir BACE2 promotorių transkripcinį aktyvumą ir dėl to yra skatinamas A β sancaupų susiformavimas [100]. Tačiau vyrauja nuomonė, kad tokių koagregatų susidarymas galimai yra natūralus ląstelių apsauginis mechanizmas, sumažinantis S100A9 citotoksinį poveikį bent jau pradinėse neurodegeneracinių ligų stadijose [93,95,101]. *Ex vivo* ir *in vitro* tyrimai atskleidė, kad S100A9 dalyvauja ir PL patogenezėje, nes Lewy kūneliuose suformuoja agregatus kartu su α Syn. Nustatyta, kad S100A9 monomerai sąveikauja su α Syn monomero C ir N galais ir gali reguliuoti α Syn agregatų formavimosi kinetiką [9,86,102]. S100A9 stabilizuoja α Syn fibrilių struktūras ir turi įtakos jų toksiškumui [86,102]. Be to, esant S100A9 α Syn agreguojasi greičiau ir sudaro didesnius amiloidų agregatus. Tačiau, vėlgi, kaip ir A β atveju, α Syn ir S100A9 sudaryti oligomerai yra mažiau toksiški nei oligomerai suformuoti šių baltymų atskirai [9]. Pats S100A9 baltymas yra labai amiloidogeninis. Jis vienas geba lengvai oligomerizuotis ir formuoti fibriles bei didesnius amiloidinius agregatus tiek *in vitro*, tiek *in vivo* sąlygomis, o šie agregatai neigiamai paveikia atmintį ir kitas kognityvines funkcijas. Transgeniniai pelių modeliai yra parodę, kad S100A9 geno veikimo blokavimas (angl. *knockout*) pagerina atmintį, sumažina amiloidinių plokštelių formavimąsi, mikroglija ima efektyviau šalinti amiloidinų sancaupas, užtai yra stebima silpniau išreikšta neurodegeneracinės ligos patologija [86,100,103–105]. Formuojantis amiloidų sancaupoms ir dėl to susidarius uždegiminėms sąlygoms bei suintensyvėjus S100A9 raiškai neuronuose bei mikroglijos ląstelėse, šis baltymas gali toliau skatinti ir stiprinti uždegiminį procesą [92,95]. Ypač šio baltymo raiška ir sekrecija padidėja greta

amiloidinių agregatų esančiose mikroglijos [95,100]. Dėl to yra aktyvuojamos signalinių kelių kaskados, S100A9 baltymui daugiausia tiesiogiai veikiant per dviejų tipų mikroglijos receptorių: TLR-4 ir RAGE [83,106]. S100A9 sąveika su šiais receptoriais suaktyvina MAPK p38, ERK/NF-κB, JNK/NF-κB, JAK/STAT, PI3K/AKT bei nuo Ca²⁺ priklausomus signalinius kelius, dėl to yra stimuliuojama intensyvi prouždegiminių veiksnių (IL-1β, IL-6, TNF-α, MMP-9, iNOS), chemokinių (CCL2, CCL3, CXCL10) gamyba ir sekrecija [84,105–107]. Be to, neuroūždegimą skatina bei prie citotoksinio poveikio prisideda S100A9 sąlygotas viduląstelinės Ca²⁺ koncentracijos padidėjimas [105] ir intensyvesnis NLRP3 inflamazomos bei ADJ susidarymas nerviniame audinyje [92,108]. Taip pat yra duomenų, jog S100A9 gali sukelti neuroūždegimą ir neuronų apoptozę, aktyvuodamas TLR-4/MYD88/NF-κB signalinį kelią ir taip pablogindamas esamą smegenų pažeidimą [109]. Kiti *in vivo* tyrimai atskleidė, jog intranazaliniu būdu pelėms įvedus S100A9 fibriles, stebimas šio baltymo plitimas į smegenų kaktinę skiltį, hipokampą ir smegenėles bei skatinama amiloidinių baltymų oligomerizacija. Tai sąlygoja stresą nervinėms ląstelėms ir yra sukeliamas neurotoksiškas poveikis, pasireiškiantis elgesio ir atminties sutrikimais bei padidėjusia proapoptotinių veiksnių, Bax ir kaspazės-3, raiška bei aktyvumu smegenų audiniuose [110]. Iš tikrųjų, ne tik S100A9, bet ir S100A8/A9 kompleksas gali sukelti apoptozę, nes veikia Bax ir Bcl-2 baltymų raišką, jų santykį ir inhibuoja ERK signalinį kelią [87]. Reikėtų pasakyti, kad S100A9 gali neigiamai paveikti mikrogliją ir jos funkcijas. Visai neseniai, pirmą kartą buvo parodyta, jog S100A9 veikia BV-2 ląstelių fagocitozę per TLR-4/MYD88/NF-κB signalinį kelią, dalyvaujant Rho GTPazėms Rac1 ir Cdc42, kurios reguliuoja ląstelių griaučių persitvarkymą, būtiną fagocitozei vykdyti. Šiame tyrime nustatyta, jog didelės baltymo koncentracijos (10 μg/ml – 20 μg/ml) sąlygoja mikroglijos fagocitinio aktyvumo ir gyvybingumo sumažėjimą [83]. Be to, įdomu tai, kad vis daugiau tyrimų rodo amiloidinių baltymų sąveikos su ląstelių membranomis svarbą šių baltymų susikaupimui ir agregatų augimui. Tamulytė ir kt. atskleidė, kad S100A9 citotoksinis poveikis pasireiškia šiam baltymui įsiterpus į hidrofobinį lipidų dvisluoksnį ir taip suardžius membranos integralumą [89]. Taip pat tam tikromis sąlygomis S100A9 gali pagreitinti natūralų dopaminerginių neuronų senėjimo procesą (angl. *senescence*), o tai tampa svarbu aiškinantis PL etiologiją [111]. Dar mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad S100A9 toksiškumas pasireiškia, sutrikdant dopaminerginę sistemą ir pertvarkant smegenyse vykstančius neurocheminius procesus. Gruden'o ir kt. atliktas *in vivo* tyrimas atskleidė, kad būtent S100A9 oligomerai ir fibrilės, bet ne natyvios struktūros baltymas, sukelia amneziją ir sutrikdo prefrontalinės smegenų žievės ir hipokampo dopaminerginius kelius [112]. Taip pat parodyta, kad S100A9 fibrilės sąlygoja erdvinės atminties sutrikimus kartu su padidėjusia glutamato sekrecija hipokampe ir sutrikusiu dopamino metabolizmu [113].

Akivaizdu, kad S100A9 baltymas dalyvauja neurodegeneracinių ligų patogenezėje ir yra svarbus veiksnys, reguliuojantis imuninį atsaką ir uždegimą, tačiau tikslūs šio amiloidinio baltymo toksiškumo mechanizmai nerviniame audinyje lieka neišaiškinti. Mokslinėje literatūroje trūksta tyrimų, nagrinėjančių S100A9 poveikį neuronų ir glijos ląstelėms, jų organelėms ir bioenergetikai. Taip pat nėra atlikta skirtingų šio baltymo agregatinių formų citotoksinio poveikio palyginimo.

1.3. Endotoksino lipopolisacharido hipotezė

Netaisyklingą amiloidinių baltymų susilankstymą, agregaciją į didesnes sankaupas ir, atitinkamai, neurodegeneracinių ligų išsivystymą gali lemti genų mutacijos, tačiau dauguma PL atvejų vis dėlto yra sporadiniai ir pirminė šios ligos etiologija yra iki šiol nežinoma [13]. Tai leidžia daryti prielaidą, kad PL patogenezėje yra svarbūs ir aplinkos veiksniai bei kiti faktoriai. Vienas tokių – endotoksinas LPS. LPS yra randamas išorinėje gram-neigiamų bakterijų sienelėje. Daugiausia šių bakterijų yra

žarnyne, kiek mažiau – odoje, dantenose, plaučiuose ir kituose epitelinių audinių paviršiuose. Bakterijos nuolat nedideliais kiekiais išskiria LPS, tačiau jo koncentracija kraujo plazmoje gali smarkiai padidėti, esant bakterinei infekcijai, žarnyno uždegimui bei pasireiškus prodrominei PL stadijai būdingiems žarnyno mikrobiotos pokyčiams ir padidėjus virškinamojo trakto pralaidumui [18,114–116]. Padidėjusi LPS koncentracija gali sukelti sisteminį uždegimą, padidinti hematoencefalinio barjero pralaidumą ir paskatinti α Syn raišką bei agregaciją enteriniuose neuronuose, o vėliau sąlygoti susiformavusių α Syn agregatų plitimą į smegenis per klajoklinį nervą ir dopaminerginių neuronų nykimą juodojoje medžiagoje. Be to, dėl padidėjusio hematoencefalinio barjero pralaidumo plazmoje esantys toksiški baltymai A β ir α Syn, LPS bei kiti uždegimą sąlygojantys veiksniai gali lengviau patekti į smegenis ir ten inicijuoti neurouždegimą bei ląstelių pažaidą [18,117–119]. *In vivo* tyrimai rodo, kad intraperitoninė LPS injekcija pelėms sukelia lėtinį neurouždegimą, dopaminerginių neuronų žūtį juodojoje medžiagoje, pasireiškia motoriniai sutrikimai [120,121]. Tai patvirtina, kad periferijoje padidėję LPS kiekiai, kurie, beje, yra nustatomi ir PL sergantiems pacientams [18], yra pakankami sukelti neuropatologiją smegenyse. Be to, endotoksinas gali sukelti neurotoksinį poveikį ir taip prisidėti prie neurodegeneracinių ligų išsivystymo, sinergistiškai veikdamas su kitais amiloidiniais baltymais. Nustatyta, jog LPS skatina A β ir tau baltymų agregaciją bei sustiprina šių baltymų citotoksinį poveikį [122], o neseniai atliktas tyrimas parodė, kad intranazaliniu būdu A53T- α Syn transgeninėms pelėms įvedus LPS, pasireiškia hipokinezija, anosmija, padaugėja α Syn sancaupų, sumažėja dopamino kiekiai ir vyksta selektyvi dopaminerginių neuronų žūtis. Tokie PL būdingi patologiniai požymiai buvo stipriau išreikšti transgeninėms pelėms nei kontrolinėms, laukinio tipo pelėms (angl. *wild-type*) [123]. Sinergistinį α Syn ir LPS toksinį poveikį patvirtina ir kitas tyrimas. Gao ir kt. atskleidė, kad LPS injekcija kontrolinėms ir A53T- α Syn pelėms sukelia panašaus stiprumo ūmų neurouždegimą, tačiau tik transgeninėms pelėms vėliau išsivystė lėtinis neurouždegimas, suintensyvėjo α Syn agregacija, Lewy kūnelių formavimasis ir pasireiškė progresuojantis dopaminerginių neuronų nykimas [124]. Manoma, kad LPS skatina α Syn agregaciją, suaktyvindamas NF- κ B signalinį kelią ir inhibuodamas su branduoliniais receptoriais susijusį baltymą 1 (angl. *nuclear receptor-related 1 protein*, Nurr1) mikroglijos ląstelėse [123]. Kadangi LPS yra priskiriamas su patogenais susijusioms molekulinėms struktūroms (angl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), jį lengvai gali atpažinti ir prijungti mikroglijos ląstelės daugiausia per TLR-4 receptorius, dalyvaujant LPS prijungiančiam baltymui LBP (angl. *LPS binding protein*). Tolesnės signalinės kaskados apima suintensyvėjusią prouždegiminių citokinų (TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO), laisvųjų radikalų ir chemokinių gamybą, o tai prisideda prie neurouždegimo, sinapsių nykimo ir galiausiai neurodegeneracijos [115,125,126]. Be to, viduląstelinis LPS gali tiesiogiai aktyvuoti kaspazes ir sąlygoti ląstelių žūtį piroptozės būdu [127]. Įdomu tai, kad vienas LPS nesukelia neuronų žūties – toks poveikis pasireiškia tarpininkaujant mikroglijos ląstelėms. Tyrimai su mišriomis neuronų-glijos ląstelių kultūromis atskleidė, kad neurotoksiškas endotoksino poveikis yra stebimas tik esant mikroglijos ląstelėms ir joms aktyviai vykdant neuronų fagocitozę, o jas pašalinus iš kultūros, šis poveikis išnyksta [125,128]. Taip pat egzistuoja ryšys tarp su PL susijusių genetinių mutacijų ir padidėjusiu uždegiminiu atsaku į LPS, sąlygojančiu neuronų žūtį. Todėl yra tikėtina, kad ši hipotezė – aktuali abiems, ir sporadinės, ir šeiminės, PL atvejams [18]. Taip pat reikėtų neatmesti galimos genetinių ir aplinkos veiksnių tarpusavio sąveikos. Taigi, endotoksino LPS hipotezė teigia, kad padidėjusi LPS koncentracija sisteminėje kraujotakoje gali prisidėti prie PL išsivystymo. Nors atlikta nemažai mokslinių tyrimų, rodančių šios hipotezės pagrindžiamumą, ji vis dar nėra patvirtinta, turi trūkumų ir reikalauja išsamesnių tyrimų.

1.4. Mikroglijos reikšmė neuroūždegiminiame procese

1.4.1. Mikroglija ir jos funkcijos

Mikroglijos ląstelės – tai pagrindinės specializuotos CNS imuninės ląstelės, makrofagai [129], sudarančios 5–12 % visų CNS ląstelių [130]. Jos atlieka daugybę funkcijų, būtinų normaliam CNS vystymuisi ir homeostazei palaikyti, tačiau taip pat atlieka lemiamą vaidmenį neurodegeneracinių ir kitų neurologinių ligų patogenezėje [129]. Tai – itin dinaminės ir plastiškos smegenų ląstelės, galinčios keisti ir įgyti įvairius morfologinius bei funkcinius fenotipus [131–133]. Mikroglija randama ameboidinės, lazdelės (angl. *rod*) ar medūzos (angl. *jellyfish*) formų, jos taip pat gali sudaryti akėto tinklo struktūras (angl. *honeycomb*), turėti nedidelį kūną su be galo tankiai išsišakojančiomis ataugėlėmis (angl. *hyper-ramified*) arba turėti suapvalėjusius ataugėlių galus (angl. *bulbous tips*) [132]. Nors mokslininkai bando susieti skirtingas mikroglijos morfologines formas su šių ląstelių atliekamomis tam tikromis funkcijomis, tačiau dar per mažai žinoma tiksliai struktūros ir funkcijos tarpusavio ryšiui nustatyti. Pavyzdžiui, ilgą laiką buvo manoma, jog už fagocitozę išimtinai yra atsakingos ameboidinės formos mikroglijos, tačiau dabar žinoma, jog šią funkciją vykdo ne tik tokį morfologinį fenotipą įgavusios ląstelės [133]. Visgi, duomenys rodo, kad dauguma sveikų suaugusių smegenų mikroglijų turi nedidelį ovalų kūną (somą) ir daug nuo jo išsišakojančių plonų ataugėlių, kurios nuolatos juda ir vertina smegenų parenchimos būklę, ieškodamos infekcijos ar nervinių ląstelių pažeidimo požymių [130,134,135]. Ši funkcija priklauso nuo mikroglijos membranos potencialo, kurį kontroliuoja K^+ jonų kanalai THIK-1 [136]. Purinerginiai P2Y₁₂ metabotropiniai mikroglijos receptoriai yra taip pat svarbūs šių ląstelių judrumui ir teisingam jų nukreipimui pažeidimo židinio link (chemotaksiui) [137]. Be abejo, šios ląstelės ekspresuoja daugybę kitų receptorių (TREM2, TLR, RAGE, NLR, Fcγ ir kt.) bei MHC I ir II klasės molekules, todėl gali jautriai reaguoti į bet kokius smegenų mikroaplinkos pokyčius, atpažįstant PAMP bei su pažeidimu susijusias molekulinės struktūras (angl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), ir greitai inicijuoti imuninį atsaką, įtraukiant kitas imunines ląsteles ir išskiriant mediatorius. Mikroglija gali atpalaiduoti įvairius prouždegiminius (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, Ccl2, Ccl4 ir kt.) ir uždegimą slopinančius (IL-4, IL-8, IL-10, TGF-α, TGFβ ir kt.) citokinus ir taip reguliuoti sukkelto neuroūždegiminio atsako stiprumą [138,139]. Be to, mikroglijos ląstelės, kaip pagrindiniai smegenų makrofagai, efektyviai vykdo žuvusių ląstelių ir jų nuolaužų, aksonų ir mielino liekanų, patogenų bei baltymų agregatų fagocitozę [135]. Nustatyta, kad TAM receptorių tirozino kinazės Mer ir Axl bei jų ligandai Gas6 ir baltymas S reguliuoja mikroglijos vykdomą apoptotinių neuronų fagocitozės procesą [140]. Žuvusių neuronų [141] bei amiloidinių baltymų sancaupų [142] šalinimui fagocitozės būdu svarbūs yra ir TREM2 receptoriai. Pastarieji receptoriai, apskritai, yra itin svarbūs, reguliuojant uždegiminius procesus CNS, mikroglijos metabolizmą ir fenotipus [143]. Yra duomenų, kad amiloidus, pavyzdžiui, αSyn, mikroglija gali šalinti ir autofagijos būdu, aktyvuodama TLR-4/NF-κB/p62 signalinį kelią ir tokiu būdu padidindama autofagijos receptoriaus p62/SQSTM1 raišką [144]. Nors tikslūs molekuliniai fagocitozės mechanizmai nėra iki galo ištirti, viena aišku – tinkamai reguliuojamas mikroglijos fagocitinis aktyvumas yra būtinas, šalinant neurodegeneraciją ir neuroūždegimą sukeliančius toksiškų baltymų agregatus ir užtikrinant nervinio audinio homeostazę.

Svarbu pasakyti, kad šių ląstelių funkcinis profilis yra daug platesnis ir neapsiriboja vien tik fagocitoze ir klasikinėmis imuninėms ląstelėms būdingomis funkcijomis. Įvairiais *in vitro* ir *in vivo* tyrimais yra parodyta didžiulė mikroglijos reikšmė smegenų sinapsių pertvarkymo procesuose, kurie yra svarbūs CNS vystymuisi, homeostazei ir neurodegeneracijai. Mikroglijos gali tiesiogiai arba netiesiogiai, pavyzdžiui, per neuromediatorius (glutamata, GABA), užląstelines pūsleles

(egzosomas), citokinus (IL-6, TNF- α , IL-10), tarpines ląsteles (astrocitus, T limfocitus, oligodendrocitus) sąveikauti su neuronais. Taip jos reguliuoja šių ląstelių pagrindines funkcijas ir dalyvauja procesuose, tokiuose kaip sinapsių karpymas arba genėjimas (angl. *pruning*), aksonų remodeliacija, neurogenezė [145]. Nustatyta, jog neuronų išskiriamas chemokinas fraktalkinas (CX3CL1), sąveikaudamas su mikroglijos CX3CR1 receptoriais, reguliuoja ne tik šių ląstelių migraciją, bet ir sinapsių brendimą bei plastiškumą [146]. Sinapsių plastiškumą per PI3K/BDNF signalinį kelią taip pat reguliuoja mikroglijų išskiriamas BDNF veiksnys [147,148]. Tinkamai kontroliuojama ir reguliuojama neuronų ekspresuojamo baltymo CD200 sąveika su mikroglijos CD200R receptoriais yra taip pat svarbi palaikyti tarpneuroninius ryšius ir sinapsių plastiškumą bei suvaldyti neuroūždegiminius procesus [149]. Įdomu tai, kad šios sąveikos reguliacijos sutrikimai yra siejami su dopaminerginių neuronų degeneracija PL atveju [150]. Naujausi tyrimai rodo, kad transkripcijos veiksnys *Irf1*, specifiskai ekspresuojamas mikroglijos ląstelių smegenų žievės ir hipokampo srityse, yra svarbus hipokampo neuronų plastiškumui, kognityvinėms funkcijoms bei reguliuojant pačių mikroglijų morfologiją ir funkcijas. Užtai yra laikomas nauju svarbiu šių ląstelių homeostazės reguliatoriumi uždegimo ir neurodegeneracijos sąlygomis [151]. Be to, mikroglijos geba pašalinti nereikalingas ir nefunkcionalias sinapses, pažymėtas komplemento baltymų C1q ir C3, per C3R receptoriaus signalinį kelią, todėl yra itin svarbios normaliam CNS vystymuisi [152]. Tyrimai rodo, kad mikroglijos gali reaguoti į greta esančių astrocitus išskiriamą IL-33 ir taip skatinti sinapsių karpymą smegenų hipokampo ir gumburo tinklinio branduolio srityse [153]. Parodyta, kad mikroglijos dalyvauja CNS mielinizacijos procese ir padeda išsaugoti mielino struktūros vientisumą [154], o mikroglijų atpalaiduojamas veiksnys IGF-1 yra būtinas neuronų augimui ir išgyvenamumui [155]. Be to, vystantis smegenims mikroglija kartu su astrocituais dalyvauja angiogenezėje – padeda susiformuoti naujoms kraujagyslėms smegenyse ir vėliau su jomis išlaiko glaudų ryšį bei palaiko hematoencefalinio barjero integralumą [156,157].

Dėl įvairių priežasčių įvykus genų, koduojančių baltymus, atsakingus už tam tikras mikroglijos funkcijas, mutacijoms, ar pasikeitus šių genų raiškai, gali sutrikti anksčiau išvardytų funkcijų vykdymas. Pavyzdžiui, senstant ir sergant neurodegeneracinėmis ligomis, gali sumažėti mikroglijos jautrumas ir gebėjimas reaguoti į pažeidimus ar susidariusias patologines sąlygas. Mikroglija gali imti nebeefektyviai šalinti susikaupusius citotoksiškų amiloidų agregatus ir infekuotus, pažeistus ar degeneruojančius neuronus. Visa tai lemia CNS patologinės būklės progresavimą [133,135,158]. Be to, esant uždegimui ir užląstelinėms amiloidų sankaupoms, mikroglijos ląstelės gali pradėti fagocituoti vis dar gyvus neuronus ir taip dar labiau skatinti neurodegeneraciją [159,160]. Šios ląstelės geba skatinti ir nuo ferroptozės priklausomą neurodegeneraciją [161] bei sustiprinti neuroūždegimą, intensyviau sekretuodamos ADJ, NO ir kitus prouždegiminius citokinus [138,162]. Yra publikacijų, skelbiančių, kad mikroglijos, suformuodamos tunelinius nanovamzdelius, gali perduoti α Syn greta esančioms mikroglijos ląstelėms [163] arba, išskirdamos A β užląstelinėmis pūslelėmis, gali sąlygoti sinapsių disfunkciją bei neigiamai paveikti jų plastiškumą [164]. Tokie duomenys leidžia daryti prielaidą, kad mikroglija tokiu būdu gali prisidėti prie neurotoksiškų amiloidinių baltymų plitimo ir tolimesnio kaupimosi nerviniame audinyje.

Taigi, mikroglijos turi dvejopą vaidmenį CNS: jos svarbios smegenų vystymuisi ir palaikant nervinio audinio homeostazę, tačiau, sutrikus ir pablogėjus neuroapsauginėms šių ląstelių funkcijoms, jos prisideda prie sudėtingos neuroūždegiminių ir neurodegeneracinių procesų vystymosi grandinės.

1.4.2. Mikroglijos fenotipai ir jų skirstymas

Nuo XX a. septintojo dešimtmečio vidurio mokslininkai pradėjo skirstyti mikrogliją į 2 fenotipus: M1 ir M2. Tuo metu buvo sutariama, kad fiziologinėmis sąlygomis mikroglija išlieka statiška (ramybės būsenos), o pataloginėmis – aktyvuojasi ir įgyja ameboidinę formą [131,133]. Toks patogus dichotominis šių ląstelių skirstymas greitai prigijo ir imtas plačiai taikyti mokslininkų bendruomenėje. M1 fenotipas buvo siejamas su prouždegiminių citokinų (TNF- α , IL-6 ir IL-1 β), chemokinų bei ADJ sekrecija, o M2 – su priešuždegiminių citokinų (IL-4 ir IL-13) atpalaidavimu, dalyvavimu žaizdų gijimo ir smegenų homeostazės atkūrimo procesuose. Buvo daroma prielaida, kad į susidariusias patologines sąlygas reaguoja M1 mikroglija, o vėliau ši įgauna M2 fenotipą [165,166]. Tačiau per pastaruosius metus atlikti GWAS, scRNA-seq, genų ir baltymų raiškos integruotos analizės suteikė naujų įžvalgų apie molekulinis mechanizmus, reguliuojančius šių ląstelių perėjimą į tam tikras būsenas, ir tapo aišku, jog ši supaprastinta M1/M2 klasifikacija nėra tiksli ir tinkama apibūdinti šių ląstelių fenotipų įvairovę [129,133]. Dabar yra aišku, kad nėra ramybės būsenoje egzistuojančių mikroglijų. Jos nuolat yra aktyvios, vykdo savo funkcijas, pasižymi itin dideliu heterogeniškumu ir, priklausomai nuo jas supančios aplinkos, palapsniui gali įgyti labai skirtingus fenotipus. Perėjimas į bet koki fenotipą pasižymi savitu genų raiškos profiliu ir, atitinkamai, ląstelių morfologijos, fagocitinio bei proliferacinio aktyvumo pokyčiais [133,166–168].

Mokslininkai, studijuodami neurodegeneracinių ligų modelius ir transkriptomikos tyrimams naudodami transgenines peles, yra nustatę DAM (angl. *disease-associated microglia*), MGnD (angl. *microglia associated with neurodegenerative disease*) ir ARM (angl. *activated response microglia*) mikroglijos tipus [169]. Nors DAM fenotipas pirmą kartą buvo identifikuotas AL modelyje, vėliau paaiškėjo, kad jis būdingas taupatijų, išsėtinės sklerozės, šoninės amiotrofinės sklerozės ir kitų neurodegeneracinių ligų atvejais. DAM mikroglija, lokalizuota greta A β sancaupų, taip pat randama ir žmonių smegenyse [170]. Nustatyta, kad, reaguojant į susikaupusius apoptotinius neuronus, mielino nuolaužas ar amiloidų sancaupas, mikroglijos perėjimas iš homeostazės į DAM fenotipą vyksta dviem etapais [170,171]. Pirmiausia padidėja TREM2 reguliacinių ir adaptorinių baltymų Tyrobp ir Apoe raiška ir sumažėja nervinio audinio homeostazei palaikyti svarbių genų CXCR1, Tmem119, P2RY12 ir P2RY13 raiška. Vėliau, įsijungus TREM2 signaliniam keliui, suintensyvėja lipidų metabolizmas, fagocitozė (padidėja Lpl, Cst7, CD9, Axl raiška), reguliuojamas uždegiminis atsakas [143,169,170]. Be to, DAM skatina mikroglijos ląstelių proliferaciją ir išgyvenamumą per PI3K, β -katenino ir žinduolių rapamicino taikinio (mTOR) signalinius kelius bei dalyvauja šalinant baltymų agregatus [170]. Tačiau net ir DAM fenotipas turi pereinamasias ar tarpines būsenas ir subtipus, pasižyminčius uždegimą slopinančiomis ir skatinančiomis savybėmis [169,172]. Todėl manoma, kad DAM yra svarbi tiek atliekant nervinio audinio apsauginę funkciją ligos pradžioje, tiek po to prisidedant prie neurotoksiško poveikio vėlesnėse ligos stadijose, o SYK tirozino kinazė (angl. *spleen tyrosine kinase*) turi lemiamą reikšmę, koordinuojant mikroglijos fagocitinį aktyvumą ir perėjimą į DAM/MGnD fenotipą neurodegeneracijos metu [173]. Visgi, tikslus funkcinis DAM fenotipo aktyvumas lieka iki galo neišaiškintas.

Literatūroje aprašomi ir kiti mikroglijos tipai. Su neurodegeneracija siejamas MGnD fenotipas taip pat charakterizuojamas sumažėjusia su homeostaze susijusių genų (P2RY12, Tmem119, Olfml3, Csf1r, Rhob, Cx3cr1, Tgfb1, Mef2a, Mafb, Sall1) raiška ir padidėjusia uždegime dalyvaujančių molekulių (APOE, Spp1, Itgax, Axl, Lilrb4, Clec7a, Csf1) raiška [174]. Šiuo atžvilgiu MGnD yra panašus į DAM fenotipą, tačiau vis tik reikšmingai skiriasi savo transkripciniu profiliu, o perėjimą į šį fenotipą reguliuoja TREM2-APOE signalinis kelias [175]. Remiantis scRNA-seq tyrimu

duomenimis, išskiriamas ir lipidus kaupiančios mikroglijos fenotipas LDAM (angl. *lipid-droplet-accumulating microglia*), kuriam būdinga sekretuoti itin didelius kiekius ADJ ir citokinų (IL-6, CCL3, CSCL10). LDAM randama senstančiose smegenyse ir yra siejama su sutrikusia šių ląstelių fagocitine funkcija [176,177]. Taip pat aprašoma tamsioji, distrofinė, nekroptotinė mikroglija, su baltąja smegenų medžiaga susijusi mikroglija (angl. *white matter-associated microglia*, WAM), su proliferaciniu regionu susijusi mikroglija (angl. *proliferative-region-associated microglia*, PAM) ir kt.[177,178].

Visi šie skirtingi mikroglijos fenotipai priklauso nuo smegenų mikroaplinkos, anatominio regiono, mikroglijos ląstelių ontogenezės, neurodegeneracinės ligos stadijos, organizmo amžiaus, lyties, mitybos įpročių bei kitų egzogeninių ir endogeninių veiksnių. Įgaunant kurį nors iš šių fenotipų, mikroglijos ląstelėse vyksta unikalūs transkripciniai, epigenetiniai, morfologiniai ir funkciniai pokyčiai [131,133]. Taigi, dabartinis mūsų supratimas apie mikroglijos būsenų plastiškumą įvairiais smegenų vystymosi laikotarpiais ir CNS patologijų metu leidžia pagrįstai atsisakyti supaprastintos M1/M2 klasifikacijos. Ji neatspindi mikroglijų kompleksiskumo, būdingo sergant neurodegeneracinėmis ligomis, ir yra nesuderinama su plačia šių ląstelių būsenų ir funkcijų visuma besivystančiose ir senstančiose smegenyse. Daugiamatė epigenetikos, transkriptomikos, metabolomikos ir proteomikos tyrimų duomenų integracija leistų tiksliau įvertinti ir suprasti mikroglijos fenotipų įvairovę, kaip jie keičiasi progresuojant ligai bei išvengti klaidinančių potipių ir funkcijų sąsajų sudarymo.

1.4.3. Mikroglijos bioenergetika ir metabolinis perprogramavimas

Mikroglijos funkcinis ir imuninis aktyvumas yra glaudžiai susijęs su šių ląstelių medžiagų energijos apykaita. Visada, nepriklausomai nuo ląstelės fenotipo, turi būti patenkinami ląstelių gyvybinėms funkcijoms, diferenciacijai, proliferacijai ir kitiems ląsteliniams procesams palaikyti reikalingi bioenergetiniai poreikiai [179–181]. Įprastai, oksidacinis fosforilinimas ir glikolizė yra du pagrindiniai metabolizmo keliai, kuriais ląstelės apsirūpina energija adenozino trifosfato (ATP) molekulės pavidalu [182]. Čia gliukozė tampa svarbiausiu ir pagrindiniu energijos šaltiniu smegenų ląstelėms [79]. Mikroglija pasisavina gliukozę daugiausia per gliukozės nešiklius GLUT1, ypač uždegiminėmis sąlygomis, nors molekuliniai tyrimai yra parodę, kad jos turi ir kitus GLUT nešiklius: GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT6, GLUT8, GLUT9, GLUT10, GLUT12 ir GLUT13 [183]. Transkriptominė analizė atskleidė, kad šios ląstelės vykdo visų, glikolizės ir oksidacinio fosforilinimo procesams būtinų, genų raišką [184], todėl homeostazės ir fiziologinėmis sąlygomis mikroglija daugiausia energiją gauna oksiduodama gliukozę. Pirmiausia glikolizės proceso metu gliukozė citozolyje laipsniškai suskaidoma iki piruvato. Tuomet aerobinėmis sąlygomis mitochondrijose vyksta piruvato oksidacinis dekarboksilinimas, kurio metu susidaro acetilkofermentas A (acetil-KoA) toliau yra oksiduojamas Krebso cikle, teikiant redukcinius ekvivalentus kvėpavimo kompleksų grandinei (elektronų pernašos grandinei) ir ATP sintezei, o anaerobinėmis sąlygomis, katalizuojant laktato dehidrogenazei, piruvatas yra redukuojamas ir verčiamas laktatu [182,185,186].

Tačiau reikia paminėti ir tai, kad mikroglija pasižymi metaboliniu lankstumu, t.y. prireikus šios ląstelės geba panaudoti ne tik gliukozę, bet ir kitas įvairias maisto medžiagas energijai gaminti [166,187]: lipidai, aminorūgštys irgi gali būti skaidomi iki acetil-KoA ir kitų tarpinių produktų, reikalingų ATP generuoti. Pavyzdžiui, esant nepakankamam gliukozės kiekiui, per SNAT1 (Slc38a1) nešiklį į mikroglijos citozolį patekęs glutaminas, veikiant glutaminazei, suskaidomas į glutamatą, o šis oksidacinio deaminavimo metu, veikiant glutamato dehidrogenazei, verčiamas į α -ketoglutaratą ir

nukreipiamas į Krebso ciklą. Per mikroglijos monokarboksilato nešiklius MCT1 ir MCT2 patekę laktatas ir ketonai bei lipidų translokazės CD36, ABC ir FABP nešiklių pagalba patekusios sočiosios ir nesočiosios riebalų rūgštys taip pat gali būti panaudojami kaip alternatyvūs energijos šaltiniai [185,186,188]. Tai yra itin naudinga, nes energijos apykaitai reikalingų substratų prieinamumas smegenyse nuolat kinta bei skiriasi fiziologijos ir patologijos atvejais [184].

Kita svarbi ir unikali mikroglijos savybė – metabolinis perprogramavimas (angl. *metabolic reprogramming*), apibrėžiamas kaip mikroaplinkos pokyčių sąlygotas greitas metabolinių kelių persitvarkymas [181,182,189]. Toks reiškinys padeda šioms ląstelėms prisitaikyti prie tuo metu susidariusių ir vyraujančių aplinkos sąlygų bei yra svarbus jų imuniniam atsakui, fenotipų ir funkcijų pokyčiams, ląstelės griaučių persitvarkymui, proliferacijai ir vykdomai biosintezei reikalingos energijos poreikiams tenkinti [181,182]. Metabolinį perprogramavimą mikroglijos ląstelėse transkripcijos lygmenyje valdo TREM2, PI3K/AKT, AMPK, PPAR, mTOR ir hipoksijos indikuojamas veiksnys 1- α (HIF-1 α), iš kurių, kaip vėliau bus matyti, mTOR atitenka svarbiausias vaidmuo signalinių kelių sukeliamų reakcijų kaskadoje [181,186]. Svarbu pabrėžti, jog mikroglijos metabolinių kelių persitvarkymas gali įvykti ląstelėms reaguojant tiek į prouždegiminius, tiek į priešūždegiminius veiksnius [182]. Pavyzdžiui, reaguodama į priešūždegiminius citokinus IL-4 ir IL-13, mikroglija pradeda intensyviau vykdyti ATP sintezę oksidacinio fosforilavimo būdu. Tai patvirtina stebimi padidėję ląstelių deguonies suvartojimo ir bazaliniai kvėpavimo (angl. *basal respiration*) greičiai [190,191]. Be to, IL-4 sumažina anaerobinės glikolizės produkto laktato susidarymą [192] ir aktyvuoja CARKL baltymą, taip sumažindamas pentozų fosfatinio kelio aktyvumą ir glutationo kiekius [193]. Prie uždegimą slopinančio poveikio galimai prisideda ir PPAR- γ receptoriaus signalinio kelio aktyvacija [21]. Iš tokių duomenų galima daryti išvadą, kad, esant nervinio audinio homeostazei ar mikroglijai susidūrus su priešūždegiminiais veiksniais, didžiausia energijos dalis gaminama oksidacinio fosforilavimo būdu. Toks oksidacinio metabolizmo kelių išnaudojimas leidžia palaikyti neuroprotekcines mikroglijos funkcijas [79,182].

Kalbant apie metabolinius pokyčius neuouždegimo metu, mikroglijose dažnai stebimas suintensyvėjęs gliukozės pasisavinimas, padidėjusi glikolizės fermentų raiška bei bioenergetinių kelių persitvarkymas iš mitochondrijų vykdomo oksidacinio fosforilavimo į glikolitinį, suintensyvėjant anaerobinei glikolizei, ir, atitinkamai, padidėjant laktato sintezei, net ir esant pakankamai ir optimaliai nervinio audinio oksigenacijai [79,80,182]. Toks fenomenas yra panašus į vėžinėse ląstelėse stebimą Warburgo efektą (angl. *Warburg effect*) [15,182,187]. Nepaisant mokslinių tyrimų pažangos šioje srityje, vis dar sunku paaiškinti tokią metabolinių kelių persitvarkymo priežastį, nes glikolizės būdu ATP sintetinama greičiau, bet ne taip veiksmingai, lyginant su oksidaciniu fosforilavimu [182,185,186]. Tai galimai vyksta dėl padidėjusio ATP energijos poreikio prouždegiminiams procesams vykdyti, tačiau kol kas nėra įrodymų, kad tokioms reakcijoms reikia daugiau energijos nei bet kokiam kitam mikroglijos atsakui [194]. Padidėjęs glikolitinis aktyvumas gali neigiamai paveikti mitochondrijų dinamiką, paskatinti NLRP3 inflamamosos susidarymą ir suaktyvinti kaspazę-1. Dėl to ląstelės patiria oksidacinį stresą, skatinama IL-1 β ir IL-18 citokinių sintezė bei išsiskyrimas, sutrinkdomas fagocitinis mikroglijos aktyvumas. Visi šie procesai gali dar labiau sustiprinti uždegimą ir paskatinti neurodegeneracijos progresavimą [79,184,186]. Nustatyta, kad, reaguojant į uždegimą ir pradėjus didžiąją energijos dalį gaminti glikolizės proceso metu, mikroglijos ląstelėse atitinkamai suintensyvėja GLUT1 ir glikolizės fermentų, tokių kaip heksokinazės ir fosfofruktokinazės, raiška [186]. Glikolizėje dalyvaujančių fermentų raiška kinta mikroglijai reaguojant ir į amiloidinius baltymus. Qiao ir kt. parodė, kad α Syn padidina piruvato

kinazės ir glicerinaldehido fosfato dehidrogenazės (GAPDH) raišką [80], o Yang'as ir kt. nustatė, kad GAPDH, jungdamasi prie IFN- γ iRNR ir tokiu būdu reguliuodama IFN- γ raišką, gali keisti mikroglijos funkcijų, fagocitozės ir citokinų gamybos, aktyvumą [195]. Mikroglijos bioenergetiniams procesams ir šių ląstelių fagocitozei bei chemotaksiui koordinuoti yra būtinas mitochondrijų baltymas translokatorius TSPO ir heksokinazė-2 (HK2) [196]. Tačiau yra duomenų, kad, vyraujant anaerobinei glikolizei, HK2 gali disocijuoti nuo mitochondrijų ir aktyvuoti branduolio transkripcijos veiksnį NF- κ B, reguliuojantį uždegimą ir ląstelių išgyvenamumą [197].

Apskritai, mikroglija, reaguodama į susidariusias patologines sąlygas, per skirtingus, tačiau tarpusavyje susipinančius, signalinius kelius geba gerokai padidinti daugelio prouždegiminių genų raišką, ypač tų, kurių aktyvumą reguliuoja transkripcijos veiksniai NF- κ B ir HIF-1 α [182,194]. Tačiau pastarųjų veiksmų aktyvumą reguliuoja mTOR, kuris signalo perdavimo reakcijose užima pagrindinį vaidmenį ir tampa be galo svarbiu mikroglijos metaboliniam perprogramavimui [182,186,198]. Suintensyvėjusi glikolizė, ADJ ir CtBP baltymas, reaguodamas į padidėjusius viduląstelinis NADH kiekius, stebimus padidėjus glikolitiniam aktyvumui, aktyvina NF- κ B [184,194], užtai suintensyvėja TNF- α ir IL-6 citokinų sekrecija [186]. Moksliniais tyrimais parodyta, kad PL modelyje mitochondrijų hidroksilazės Clk1 trūkumas skatina neurouždegimą ir dopaminerginių neuronų žūtį, reguliuojant mikroglijos metabolinį perprogramavimą per mTOR/HIF-1 α ir ADJ/HIF-1 α signalinius kelius [199], o HIF-1 α gali inhibuoti piruvato dehidrogenazę ir taip netiesioginiu būdu slopinti Krebso ciklą, priverčiant ląsteles ATP sintetinti vien tik glikolizės būdu [21]. Nustatyta, kad piruvato virtimas laktatu yra stimuliuojamas PI3K/AKT signalinio kelio [182], o α Syn fibrilės mikroglijos perprogramavimą sukelia per AKT/mTOR/HIF-1 α signalinį kelią [81]. Taip pat yra duomenų, kad mikroglijos metabolinių kelių persitvarkymą iš oksidacinio fosforilinimo į glikolitinį esant uždegimui gali reguliuoti NADPH oksidazė 4 [200] ir mitochondrijų skaidymasis (angl. *fission*) [201], lygiagrečiai suaktyvindamas NLRP3 inflamomasą [202].

Žinoma, pokyčiai įvyksta ir kituose metaboliniuose keliuose. Sutrikus Krebso ciklui gali pradėti kauptis Krebso ciklo tarpiniai metabolitai: sukcinatas ir itakono rūgštis, kurie gali prisidėti prie uždegimo per HIF-1 α skatindami ADJ, IL-1 β , NO ir kitų prouždegiminių veiksmų koncentracijos didėjimą [181,182,194,203]. Įvairūs *in vitro* ir *in vivo* PL modelių tyrimai atskleidė, kad esant Krebso ciklo disfunkcijai mikroglijos ląstelėse suaktyvėja pentozų fosfato kelias. Ypač padidėja šio metabolinio kelio pagrindinio fermento gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės aktyvumas, susidaro pertekliniai NADPH kiekiai ir atitinkamai suintensyvėja ADJ susidarymas, skatinama dopaminerginių neuronų degeneracija [79,182,204]. Mikroglijos ląstelėse pasikeičia ir lipidų bei geležies apykaitos keliai, kurie taip pat galimai turi reikšmingą įtaką neurouždegiminių ir neurodegeneracinių procesų vystymuisi [182].

Taigi, metabolinio perprogramavimo fenomenas yra stebimas, mikroglijai reaguojant į prouždegiminius ir priešuždegiminius veiksmus. Esant neurouždegimui dažnu atveju mikroglija energiją ima gaminti pirmaisia išnaudodama anaerobinį glikolizės mechanizmą, taip pat pradeda vyrauti pentozės fosfato metabolinis kelias ir riebalų rūgščių sintezė, o smegenų mikroaplinkoje vyraujant priešuždegiminiams veiksmams ATP sintetinama oksidacinio fosforilinimo proceso metu. Tokie dinamiški metabolizmo ir bioenergetikos pokyčiai betarpiškai siejasi su mikroglijos atliekamomis funkcijomis, įgyjamu fenotipu ir uždegiminiu atsaku. Vis dėlto, medžiagų apykaitos pokyčiai, vykstantys neurodegeneracinių ligų vystymosi ir progresavimo metu, lieka iki galo nesuprasti. Trūksta duomenų, kaip vyksta metabolinių kelių persitvarkymas, priklausomai nuo ūmaus

ar lėtinio neurotoksiškų veiksnių poveikio. Be to, dar nepakankamai tiksliai nustatyti bioenergetinių pokyčių molekuliniai mechanizmai, juolab – priežastys.

1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir projekto temos bei uždavinių pagrindimas

Remiantis mokslinėje literatūroje prieinamais duomenimis, neurodegeneracija ir neurouždegimas – vienas nuo kito neatsiejami procesai. Egzistuojančios įvairios hipotezės, aiškinančios neurodegeneracinių ligų etiologiją, rodo žinių trūkumą apie šių ligų išsivystymo priežastis ir mechanizmus. Visgi, α Syn ir S100A9 sudaromi toksiški agregatai bei padidėjusi LPS koncentracija sisteminėje kraujotakoje reikšmingai prisideda prie neurotoksiško poveikio smegenyse, o mikroglijos svarba reguliuojant neurouždegimą ir neurodegeneraciją – neabejotina. Mikroglijos ląstelėms būdingas metabolinis lankstumas ir medžiagų apykaitos kelių persitvarkymas yra itin svarbūs, reaguojant į DAMP ir PAMP bei kontroliuojant CNS imuninį atsaką. Progresuojant neurodegeneracijai, mikroglija reaguoja į susidariusias patologines sąlygas ir patiria transkripcinius, epigenetinius, funkcinis, morfologinius ir bioenergetinių kelių pokyčius, o tai pertvarko įvairius viduląstelinius signalinius kelius. Dėl to mikroglijos metabolizme dalyvaujantys fermentai ir svarbiausios signalinių kelių molekulės, reguliuojančios šių ląstelių reaktyvumą ir neurouždegiminio atsako stiprumą, potencialiai galėtų būti puikūs nauji taikiniai PL gydyti. Tačiau daugelį metų mikroglijos ląstelių tyrimus riboja supaprastinta M1/M2 klasifikacija ir šiandien dar nėra sukaupta pakankamai duomenų, kurie išsamiai paaiškintų mikroglijos bioenergetinių pokyčių visumą, vystantis neurodegeneracinėms ligoms. Atitinkamai, nėra selektyvių, AL ar PL gydyti skirtų vaistų, kurių taikynys būtų tam tikri mikroglijos ląstelių bioenergetiką reguliuojantys mechanizmai. Atsižvelgiant į tai, šis tyrimas yra orientuotas į mikroglijos ląstelių energetinio metabolizmo kelių pokyčių vertinimą, jas paveikus neurodegeneracijos procesuose dalyvaujančiais amiloidiniais baltymais α Syn ir S100A9 bei bakteriniu endotoksinu LPS. Šis tyrimas suteiks naujų žinių apie PL patogenezę ir jos galimą ryšį su bakterine infekcija bei mikroglijos aktyvacijos kelius. Be to, naujos išvalgos apie anksčiau nežinomą užląstelinių α Syn ir S100A9 agregatų poveikį mikroglijos ląstelių bioenergetikai galimai prisidės prie kryptingo naujų, neurouždegimą ir neurodegeneraciją slopinančių, terapinių priemonių kūrimo.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Visi baigiamojo projekto eksperimentai buvo atlikti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų instituto (LSMU NI) Biochemijos laboratorijoje vadovaujantis ir laikantis visų bioetikos reikalavimų. Pritarimą vykdyti tyrimą išdavė LSMU Bioetikos centro komisija Nr. 2023-BEC2-047 (1 priedas).

2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir reagentai

- BV-2 mikroglijos ląstelės (AcceGen, JAV);
- LPS iš *Escherichia coli* (O26:B6 kamienas) (Sigma-Aldrich, JAV);
- Rekombinantiniai žmogaus α Syn ir S100A9 baltymai buvo gauti iš Vilniaus universiteto Gamtos mokslų centro, dr. Vytauto Smirnovo vadovaujamos mokslininkų grupės;
- DMEM + GlutaMAX (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Fetalinis jaučio serumas (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Penicilino-streptomicino tirpalas (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Tripano mėlio tirpalas, 0,4 % (Sigma-Aldrich, JAV);
- TrypLE Express Enzyme (1X) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Fosfatinis druskų buferinis tirpalas, pH 7,4 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Dejonizuotas vanduo (Ph.Eur.01/2008:0008, LSMU laboratorija);
- MgCl₂ (Sigma-Aldrich, JAV);
- Sacharozė (Carl Roth, Vokietija);
- Laktobioninė rūgštis (Sigma-Aldrich, JAV);
- EGTA (Sigma-Aldrich, JAV);
- KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, JAV);
- HEPES (Sigma-Aldrich, JAV);
- Taurinas (Sigma-Aldrich, JAV);
- Piruvatas, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, JAV);
- Malatas, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, JAV);
- Digitoninas (Sigma-Aldrich, JAV);
- Adenozino difosfatas, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, JAV);
- Sukcinatas, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, JAV);
- Karboksitraktilozido natrio druska (Sigma-Aldrich, JAV);
- 2,4-dinitrofenolis (Sigma-Aldrich, JAV);
- Natrio azidas (Sigma-Aldrich, JAV);
- CaCl₂ · 2H₂O (Carl Roth, Vokietija);
- Imidazolas (Sigma-Aldrich, JAV);
- KCl (Sigma-Aldrich, JAV);
- NaCl (Carl Roth, Vokietija);
- MgCl₂ · 6H₂O (Sigma-Aldrich, JAV);
- Bevandė gliukozė (Carl Roth, Vokietija);
- Oligomicinas (Sigma-Aldrich, JAV);
- 2-deoksi-d-gliukozė (Sigma-Aldrich, JAV);
- Komercinis Griess reagentų rinkinys (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Komercinis pelės TNF- α ELISA rinkinys (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, JAV);

- HBSS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Amplex Red (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Krienų peroksidazė (Sigma-Aldrich, JAV).

2.2. Tyrimams naudota laboratorinė įranga

- Laminarinė oro srauto spinta (HeraSafe KS, Thermo Fisher Scientific);
- Inkubatorius (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Hemocitometras (Fuchs-Rosenthal, Vokietija);
- Šviesinis mikroskopas (Olympus CKX41, Japonija);
- Centrifuga (Eppendorf 581R, Kanada);
- Mikrocentrifuga (Espresso Personal, Thermo Scientific);
- Mikroplokštelių skaitytuvas (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific);
- 1,5 ml tūrio plastikiniai mėgintuvėliai (CAPP, Danija);
- T25 ir T75 plastikiniai plokščiadugniai ląstelių auginimo flakonai su filtriniais kamšteliais (Falcon™, JAV);
- Sterilūs ląstelių grandikliai (Falcon™, JAV);
- 15 ml ir 50 ml tūrio sterilūs centrifuginiai mėgintuvėliai (Falcon™, JAV);
- 5 ml, 10 ml ir 25 ml tūrio sterilios vienkartinės serologinės pipetės (Nerbe Plus, Vokietija);
- Oksigrafas Oxygraph-2k ir O2k-pH ISE-Module sistema (Oroboros instruments, Innsbruck, Austrija);
- Mikrošvirkštai su fiksuota adata (Hamilton, Šveicarija);
- Kintamo tūrio automatinės pipetės (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl ir 100-1000 µl) bei jų antgaliai;
- Fluorometras (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, JAV);
- Tamsios 96 šulinėlių lėkštelės (BRANDplates®, cellGrade™, Vokietija);
- Vartyklė (WT17, Biometra);
- Purtyklė (IKA MS 3 digital vortex mixer);
- pH-metras (Knick 766 Calimatic, Vokietija);
- Termostatinė vandens vonelė (Grant GD120, Anglija).

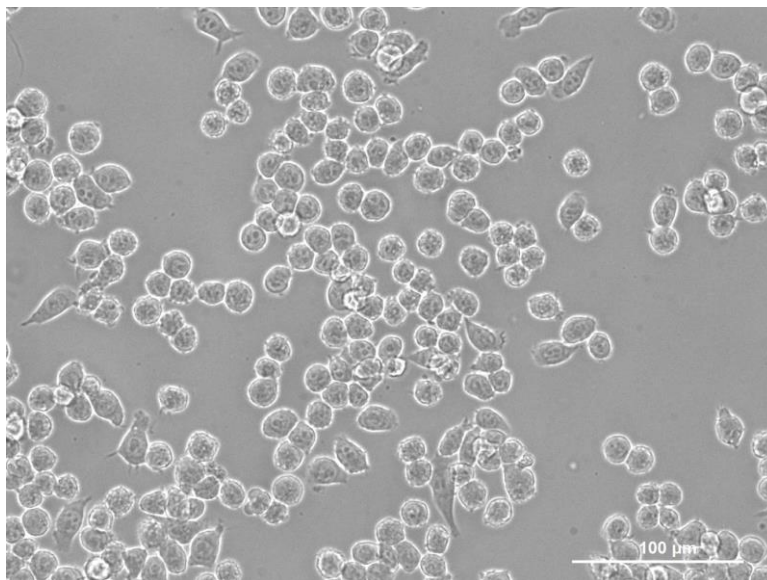
2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Imortalizuotos pelių mikroglijos BV-2 ląstelių kultūros kultivavimas

Tyrimams naudota imortalizuota pelių mikroglijos BV-2 ląstelių linija buvo įsigyta iš AcceGen Biotech (2.3.1.1 pav.). Norint užtikrinti sterilias sąlygas, visos manipuliacijos su ląstelėmis buvo atliktos laminarinėje oro srauto spintoje. BV-2 ląstelės buvo kultivuojamos pagal AcceGen rekomendacijas ir protokolus. Buvo naudojama auginimo terpė DMEM + GlutaMAX, papildyta 10 % FBS ir 1 % penicilino-streptomicino antibiotikų tirpalu. Mikroglijos ląstelės buvo užsėjamos monoslukšniu į 75 cm² (T75) ir 25 cm² (T25) sterilius plastikinius flakonus ir auginamos inkubatoriuje, kuriame palaikoma +37 °C temperatūra, 95–98 % drėgnumas ir 5 % CO₂ prisotinta aplinka. Vėliau kas 2–3 dienas pusė auginimo terpės buvo keičiama į šviežią, o ląstelėms pasiekus 90–100 % konfluentiškumą, atliekamas persėjimas.

Persėjant ląsteles, pirmiausia buvo nupilama visa ląstelių auginimo terpė, o flakonas su ląstelėmis gerai praplaunamas fosfatinio buferiniu tirpalu (PBS). Toliau ląstelės atkeliamos, užpilant 2 ml

tripsino analogo tirpalo TrypLE Express ir inkubuojant 5 min. +37 °C temperatūroje. Ląstelėms atkibus nuo flakono paviršiaus, tripsinas neutralizuojamas, įpilant 5 ml šviežios ląstelių auginimo terpės, ląstelės surenkamos ir suspenduojamos. Toliau vertinamas ląstelių gyvybingumas, apskaičiuojama atkeltų ląstelių koncentracija ir reikiama dalis ląstelių suspensijos užsėjama į paruoštus naujus flakonus su šviežia ir pašildyta auginimo terpe. Į T75 flakonus buvo užsėjama dešimtadalis visų atkeltų ląstelių, o į eksperimentams skirtus T25 flakonus ir tamsias 96 šulinėlių lėkšteles – po 1,5 mln. ląstelių ir 10^4 ląstelių/šulinėlį, atitinkamai. Persėtos ląstelės auginamos inkubatoriuje anksčiau aprašytais sąlygomis.



2.3.1.1 pav. Pavyzdinė BV-2 mikroglijos ląstelių šviesinė nuotrauka

Mikroskopas OLYMPUS IX71S1F-3, objektyvas $\times 20$, padidinimas – 500 kartų, skalė – 100 μm

2.3.2. Ląstelių skaičiavimas ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu

Atliekant ląstelių persėjimą ir prieš kvėpavimo greičio registravimo bei glikolitinio aktyvumo vertinimo tyrimus, mikroglijos ląstelių skaičius suspensijoje ir gyvybingumas buvo vertinamas, naudojant 0,4 % tripano mėlio azo dažą. Šis metodas pagrįstas tuo, kad negyvos ir pažeistos ląstelės praranda plazminės membranos integralumą, todėl tripano mėlis tamsiai mėlyna spalva selektyviai nudažo tik žuvusias ląsteles. Pro gyvybingų ląstelių plazminę membraną šis dažas neprasiskverbia ir dėl to mikroskopu stebimos šviesios, skaidrios ar baltos ląstelės.

Pirmiausia į 1,5 ml talpos mėgintuvėlį buvo įpilama 20 μl paruoštos ląstelių suspensijos ir 20 μl tripano mėlio bei suspenduojama. Tuomet 20 μl šio mišinio buvo suleidžiama į hemocitometro kamerą, uždegtą dengiamuoju stikliuku. Stebint šviesiniu mikroskopu, skaičiuojamos skaidrios, t.y. gyvos, ląstelės, esančios 16 kvadratų. Suskaičiuota ląstelių suma dauginama iš skiedimo ($\times 2$) ir hemocitometro ($\times 5000$) koeficientų. Gautas gyvų ląstelių skaičius išreiškiamas ląstelių skaičiumi viename mililitre suspensijos (ląstelių sk./ml).

2.3.3. Lipopolisacharido, α -sinukleino ir S100A9 paruošimas neurotoksiškumo tyrimams ir ląstelių kultūros inkubacija su tiriamomis medžiagomis

100 ng/ml, 500 ng/ml ir 1 μ g/ml koncentracijų LPS tirpalai buvo ruošiami iš motininio 1 mg/ml LPS tirpalo (angl. *stock solution*), jį praskiedžiant dejonizuotu vandeniu. Praskiedus, mėgintuvėlis su LPS tirpalu buvo paliekamas 15 min. 1500 aps./min. ant purtyklės, kad gerai išsimaišytų ir kad ant mėgintuvėlio sienelių neliktų prilipusio LPS, nes jis yra linkęs absorbuotis ant plastikinių paviršių.

Motininiai rekombinantinių žmogaus α Syn ir S100A9 monomerų tirpalai buvo praskiedžiami PBS iki 1 mg/ml α Syn ir 0,138 mg/ml S100A9 koncentracijos tirpalų, išmaišomi, nucentrifuguojami 15 sek. 5000 aps./min. ir paliekami inkubuotis 6 val. kambario temperatūroje (KT) ant vartyklės (25 aps./min.). Taip suformuoti amiloidinių baltymų oligomerų tirpalai iki eksperimentų buvo laikomi šaldiklyje $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$, siekiant išvengti tolimesnės amiloidų agregacijos.

Kai T25 flakonuose auginamos BV-2 ląstelės pasiekdavo 90 % konfluentiškumą, jos buvo paveikiamos tiriamomis medžiagomis: α Syn, S100A9 ir LPS. Sena ląstelių auginimo terpė buvo išpilama, tuomet gerai praplaunama PBS, įpilama 3 ml šviežios auginimo terpės ir dedamos reikiamų koncentracijų paruoštos tiriamos medžiagos bei švelniai pamaišoma. α Syn, S100A9 ir LPS paveiktos ląstelės buvo gražinamos į inkubatorių ir paliekamos inkubuotis 24 val. $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros, 95–98 % drėgnumo ir 5 % CO_2 aplinkos sąlygose.

2.3.4. Ląstelių kvėpavimo greičio registravimas

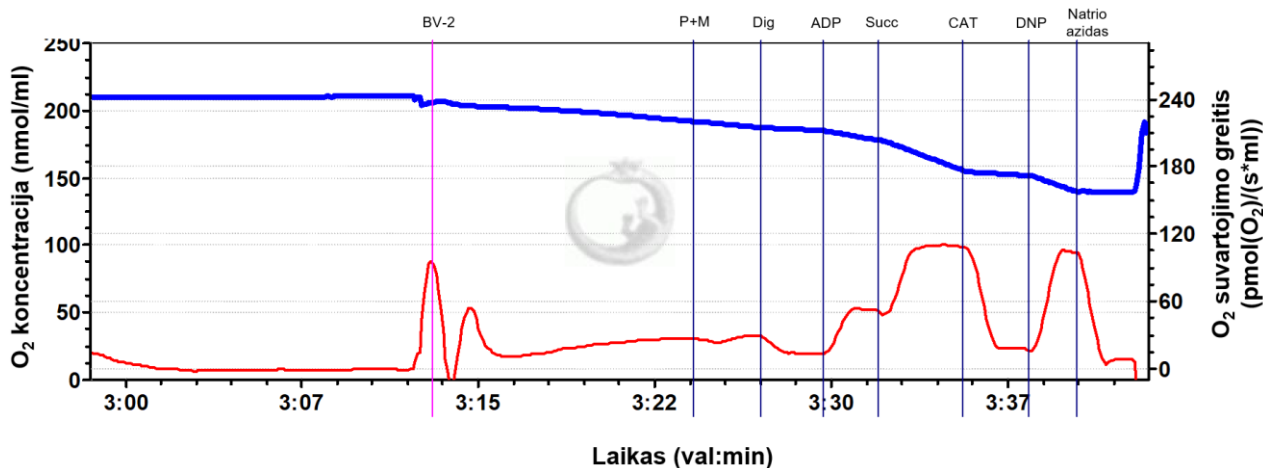
Po 24 val. BV-2 ląstelių inkubacijos su tiriamomis medžiagomis buvo surenkama ląstelių auginimo terpė, kad vėliau būtų galima atlikti prouždegiminių veiksnių, išsiskyrusių į mikroglijos ląstelių kultūrų terpę, kiekybinę analizę. Tuomet ląstelės buvo praplaunamos PBS, surenkamos iš T25 flakonų, naudojant sterilų ląstelių grandiklį, ir suspenduojamos 1 ml kvėpavimo matavimo terpės MiR05 (10 mM KH_2PO_4 , 3 mM MgCl_2 , 20 mM taurinas, 110 mM d-sacharozė, 0,5 mM EGTA, 20 mM HEPES, 60 mM laktobioninė rūgštis; pH 7,1). Tada 1 mln. gyvų ląstelių perkeliamas į oksigrafo matavimo kamerą, užpildytą iki $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros pašildytos kvėpavimo matavimo terpės MiR05, ir sandariai uždaroma specialiais kamščiais.

BV-2 ląstelių kvėpavimo greitis buvo matuojamas didelės raiškos respirometrijos metodu, naudojant oksigrafinę sistemą Oxygraph-2k ir programinę įrangą DatLab. Visi matavimai buvo atliekami $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ląstelėms patekus į kiuvetę, jos pradeda vartoti deguonį (kvėpuoti), todėl oksigrafo elektrodai iškart ima fiksuoti deguonies koncentracijos pokyčius. Siekiant išmatuoti nepermeabilizuotų ląstelių bazalinį kvėpavimo greitį ir permeabilizuotų ląstelių kvėpavimo greičius, joms esant skirtingose metabolinėse būsenose, sistema buvo papildoma tam tikrais elektronų pernašos grandinės substratais, inhibitoriais ir skyrikliais.

Išmatavus bazalinį mikroglijos ląstelių kvėpavimo greitį, į kamerą buvo pridėdama I-ojo kvėpavimo grandinės komplekso (NADH dehidrogenazės) substratų, 5 mM piruvato ir 2 mM malato, o po to – 12,15 μM digitonino (Dig), siekiant permeabilizuoti ląsteles ir išmatuoti kvėpavimo greitį ląstelėms esant laidumo būsenoje (II-oje metabolinėje būsenoje). Tokioje būsenoje kvėpavimo grandinės kompleksai palaiko pakankamą elektrocheminį protonų gradientą, tačiau fosforilinimas nevyksta, nes terpėje yra tik kvėpavimo substratai, bet nėra adenosino difosfato (ADP). Todėl II-oje metabolinėje būsenoje deguonies suvartojimas, vykstantis dėl nespecifinio membranos pralaidumo protonams, yra nedidelis [205]. Nuo oksidacinio fosforilinimo priklausomas kvėpavimas buvo matuojamas pridėjus

2 mM ADP (III-oji metabolinė būseną) ir vėliau, norint pasiekti maksimalų mitochondrijų kvėpavimo greitį, buvo dedamas II-ojo kvėpavimo grandinės komplekso (sukcinato dehidrogenazės) substratas 10 mM sukcinatas (Succ). Šioje būsenoje stebimas staigus kvėpavimo pagreitėjimas ir intensyvus deguonies suvartojimas, nes dėl ADP ir I-ojo bei II-ojo kvėpavimo grandinės komplekso substratų pertekliaus oksidacinis fosforilinimas (elektronų pernaša kvėpavimo grandinėje ir ATP sintezė) vyksta visu pajėgumu [205]. Toliau adenino nukleotidų translokazės inhibitorius karboksitraktilozidas (CAT, 1 μ M) buvo dedamas, norint išmatuoti nuo protonų laidumo priklausomą deguonies suvartojimą ir įvertinti vidinės mitochondrijų membranos laidumą (IV-oji metabolinė būseną). Šioje metabolinėje būsenoje kvėpavimo greitis staigiai sumažėja, nes yra užblokuojamas ADP patekimas į mitochondrijas ir slopinama ATP sintezė [205]. Įdėjus 100 μ M skyriklio 2,4-dinitrofenolio (DNP) ir atskyrus oksidaciją nuo fosforilinimo, buvo išmatuotas bendras kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumas. Galiausiai, įdėjus citochromo c oksidazės inhibitoriaus 10 mM natrio azido ir užslopinus nuo mitochondrijų priklausomą kvėpavimą, buvo fiksuojamas likutinis deguonies suvartojimas, sąlygotas kitų ląstelėje vykstančių procesų.

Pridėjus minėtų priedų, buvo užrašomi kvėpavimo kreivių pokyčiai, leidžiantys stebėti deguonies suvartojimą per laiko tarpą. Taigi, BV-2 ląstelių kvėpavimo greitis skirtingose metabolinėse būsenose buvo vertinamas pagal deguonies suvartojimo greitį ir išreiškiamas $\text{pmol}(\text{O}_2)/(\text{s}\cdot\text{ml})/1$ mln. ląstelių. Tipinė kontrolinių BV-2 ląstelių kvėpavimo greičio registravimo schema pateikta 2.3.4.1 pav.



2.3.4.1 pav. Tipinė BV-2 ląstelių kvėpavimo greičio matavimo grafinė schema, kvėpavimo terpę su ląstelėmis titruojant substratais, slopikliais ir skyrikliais

Mėlyna kreivė rodo deguonies koncentraciją kiuvetėje (nmol/ml), o raudona – deguonies suvartojimo greitį ($\text{pmol}(\text{O}_2)/(\text{s}\cdot\text{ml})/1$ mln. ląstelių). Vertikalios linijos rodo priedų įdėjimą į sistemą, kur P – piruvatas, M – malatas, Dig – digitoninas, ADP – adozino difosfatas, Succ – sukcinatas, CAT – karboksitraktilozidas, DNP – 2,4-dinitrofenolis

2.3.5. Ląstelių glikolitinio aktyvumo vertinimas

Praėjus 24 val. trukusiai BV-2 ląstelių inkubacijai su tiriamomis medžiagomis ir surinkus auginimo terpę prouždegiminių veiksnių kiekybinei analizei atlikti, ląstelės buvo praplaunamos PBS ir steriliu ląstelių grandikliu surenkamos iš T25 flakonų bei suspenduojamos 1 ml HMM (angl. *Hanks modified media*) terpės (137 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 0,42 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mM imidazolas; pH 7,1; buferinė talpa 0,001). Tuomet 1 mln. gyvų ląstelių perkeliamas į oksigrafo matavimo kamerą, užpildytą iki +37 °C temperatūros pašildytos HMM terpės, ir sandariai uždaroma

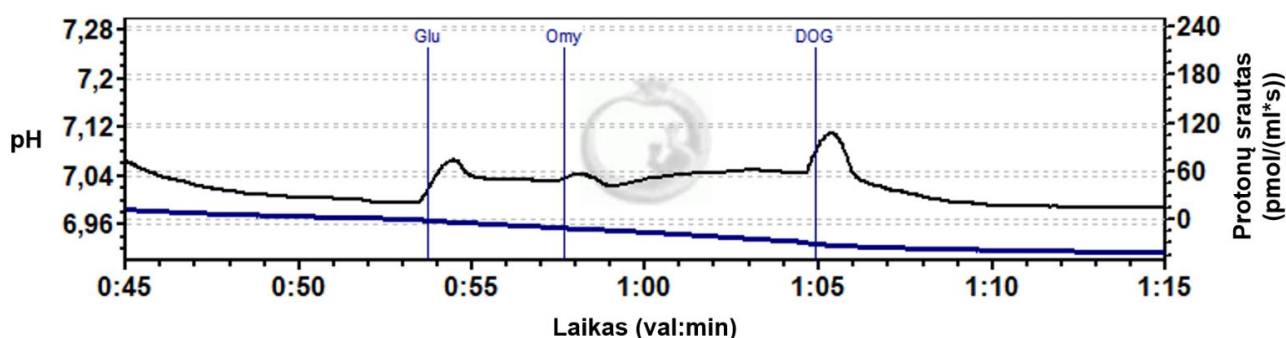
specialiais kamščiais. Matavimai atlikti naudojantis DatLab programine įranga ir O2k-pH ISE-Module oksigrafine sistema, leidžiančia pX ir referentiniu elektodais jautriai registruoti potenciometrinius (įtampos) signalus ir tiksliai nustatyti pH pokyčius matavimo kameroje. Paeiliui į matavimo kamerą buvo pridėdama šių priedų: 5 mM gliukozės (Glu), 5 nM oligomicino (Omy) ir 25 mM 2-deoksi-d-gliukozės (DOG). Citozolyje anaerobinės glikolizės metu iš vienos gliukozės molekulės susidaro dvi laktato molekulės, kurias ląstelės sekretuoja į užląstelinę terpę. Kadangi laktatas turi karboksi- funkcinę grupę, šio proceso metu kartu į užląstelinę terpę yra atpalaiduojami ir vandenilio jonai (H⁺) [206]. Dėl to ląstelių glikolitinis ir maksimalus glikolitinis aktyvumas yra vertinami pagal terpės rūgštėjimą, išreiškiamą protonų srautu (angl. *proton flux*) pmol/(ml*s), ir apskaičiuojamas pagal formules:

$$\text{Glikolitinis aktyvumas} = \text{terpės rūgštėjimas įdėjus Glu} - \text{terpės rūgštėjimas įdėjus DOG}$$

$$\text{Maksimalus glikolitinis aktyvumas} = \text{terpės rūgštėjimas įdėjus Omy} - \text{terpės rūgštėjimas įdėjus DOG}$$

Glu dedama kaip pagrindinis glikolizės substratas, siekiant aktyvuoti glikolizės procesą ląstelėse. Po to dedamas Omy inhibuoja ATP sintazę, sumažina ATP/ADP santykį ir užslopina oksidacinį fosforilinimą. Taip ląstelės yra priverčiamos ATP gaminti glikolizės būdu. Eksperimento pabaigoje dedama DOG nuslopina glikolizę, konkurenciniu būdu inhibuodama heksokinazę, ir leidžia išmatuoti nuo glikolizės nepriklausomą terpės rūgštėjimą [207].

BV-2 ląstelių glikolitinio ir maksimalaus glikolitinio aktyvumo pokyčių rezultatai procentiškai lyginami nuo kontrolinių grupių glikolitinio aktyvumo, o tipinė kontrolinių BV-2 ląstelių glikolitinio aktyvumo matavimo schema pateikta 2.3.5.1 pav.



2.3.5.1 pav. Tipinė BV-2 ląstelių glikolitinio aktyvumo matavimo grafinė schema

Juoda kreivė rodo protonų srautą (pmol/(ml*s)), o mėlyna – pH pokyčius. Vertikalios linijos rodo priedų įdėjimą į sistemą, kur Glu – gliukozė, Omy – oligomicinas, DOG – 2-deoksi-d-gliukozė

2.3.6. Azoto monoksido auginimo terpėje kiekybinis įvertinimas

NO koncentracija ląstelių auginimo terpėje buvo nustatoma, naudojant komercinį Griess reagentų rinkinį pagal NO oksidacijos produkto, nitrito, kiekį. Griess reakcijos metu susidaro azo dažas, leidžiantis spektrofotometriškai įvertinti susidariusių nitritų koncentraciją mikroglijos ląstelių auginimo terpėje. Prieš kiekvieną eksperimentą buvo šviežiai paruošiamas Griess reagentas, sumaišant 0,1 % N-(1-naftil)etilendiamino dihidrochloridą ir 1 % sulfalininę rūgštį (5 % fosforo rūgštyje) vienodomis dalimis. Kadangi Griess reagentas yra jautrus šviesai ir deguonies poveikiui, jo

paruošimas buvo atliekamas prieblandoje, greitai ir kruopščiai, o paruoštas buvo sandariai uždaromas ir laikomas tamsoje.

Po ląstelių inkubacijos su tiriamosiomis medžiagomis, auginimo terpė buvo surenkama ir centrifuguojama $10000 \times g$ 10 min. Tuomet į 96 šulinėlių lėkštelės atitinkamus šulinėlius buvo sumaišoma 150 μ l nucentrifuguotos auginimo terpės su 130 μ l dejonizuotu vandeniu ir 20 μ l Griess reagentu. Siekiant nustatyti atskaitos tašką, 20 μ l Griess reagento buvo sumaišoma su 280 μ l dejonizuotu vandeniu. Išmaišius, lėkštelė su mėginiais buvo paliekama inkubuotis 30 min. tamsoje, lėkštelę laikant ant vartyklės. Po inkubacijos buvo matuojamas absorbcijos intensyvumas spektrofotometru, esant bangos ilgiui $\lambda = 548$ nm. Pagal sudarytą kalibracinę kreivę, naudojant standartinį nitrito tirpalą, buvo apskaičiuotas mikroglijos išskirto NO kiekis μ M terpėje.

2.3.7. Prouždegiminio citokino TNF- α auginimo terpėje kiekybinis įvertinimas

Prouždegiminis citokinas TNF- α buvo kiekybiškai vertinamas „sumuštinio“ tipo ELISA metodu (angl. *sandwich ELISA*), naudojant komercinį pelės TNF- α ELISA rinkinį, remiantis gamintojo protokole pateikta informacija.

Pirmiausia surinkta ląstelių auginimo terpė po inkubacijos su tiriamomis medžiagomis buvo nucentrifuguojama $10000 \times g$ 10 min. Tuomet mikroplokštelės šulinėliai, padengti specifiniais antikūnais, buvo praplaunami plovimo buferiu, o po to į juos įpilama 50 μ l mėginio skiediklio (angl. *sample diluent*), 50 μ l nucentrifuguotos mėginių terpės ir 50 μ l biotino konjugato. Uždengus, lėkštelė buvo paliekama inkubuotis 2 val. KT ant vartyklės. Po inkubacijos buvo atliekamas praplovimas plovimo buferiu ir į kiekvieną šulinėlį įpilama po 100 μ l streptavidino-HRP tirpalo bei paliekama inkubuotis 1 val. KT ant vartyklės. Praėjus inkubacijos laikui, šulinėliai buvo praplaunami plovimo buferiu, įpilama po 100 μ l į kiekvieną šulinėlį chromogeno substrato TMB tirpalo ir inkubuojama 30 min. KT tamsoje. Toliau buvo įpilama 100 μ l reakcijos stabdymo tirpalo, išmaišoma ir nedelsiant matuojamas kiekvieno mikrolėkštelės šulinėlio optinis tankis, esant bangos ilgiui $\lambda = 450$ nm. Pagal sudarytą kalibracinę kreivę buvo apskaičiuotas mikroglijos išskirto TNF- α kiekis μ g/ml terpės.

2.3.8. Aktyvių deguonies junginių auginimo terpėje kiekybinis įvertinimas

Mikroglijos ląstelių į užląstelinę terpę išskiriamų ADJ kiekybinė analizė atlikta pagal H₂O₂ susidarymą, taikant fluorimetrinį metodą ir naudojant Amplex Red dažą. Katalizuojant krienų peroksidazei, šis dažas, reaguodamas su H₂O₂, yra oksiduojamas į raudonai fluorescuojantį junginį – resorufiną.

Šiam tyrimui atlikti, ląstelės buvo užsėjamos į tamsias 96 šulinėlių lėkšteles 10^4 ląstelių/šulinėlį tankiu, o po 24 val. buvo paveikiamos 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μ g/ml LPS bei 100 nM ir 500 nM koncentracijų α Syn ir S100A9. Po 24 val. inkubacijos su tiriamomis medžiagomis iš šulinėlių buvo nusiurbiamas terpė ir į kiekvieną šulinėlį įpilama po 100 μ l paruošto HBSS tirpalo (angl. *Hank's balanced salt solution*), papildyto 50 nM gliukoze, 15 μ M Amplex Red dažu ir 30 μ g/ml krienų peroksidaze. Tai buvo atliekama prieblandoje, greitai ir kruopščiai. Toliau, naudojantis fluorometru ir Ascent Software 2.6 programiniu paketu, buvo vertinamas H₂O₂ susidarymo greitis, matuojant fluorescencijos pokytį per 1 val., esant sužadavimo bangos ilgiui $\lambda = 544$ nm ir emisijos bangos ilgiui $\lambda = 590$ nm. Užfiksuoti fluorescencijos signalai buvo vertinami pagal kalibracinę kreivę, gautą su žinomais H₂O₂ kiekiais.

2.3.9. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta, įtraukiant mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų rezultatus, naudojantis SigmaPlot 14.0 programos paketu. Rezultatų duomenys statistiškai lyginami, taikant vienkryptį ANOVA testą (angl. *one-way ANOVA*) ir post hoc Tukey kriterijų. Resultatuose ir grafikuose pateikiami eksperimentų duomenų vidurkiai su standartinėmis vidurkio paklaidomis ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Duomenys laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Šiame darbe buvo tiriami užląstelinių 100 nM ir 500 nM koncentracijų α Syn ir S100A9 oligomerų bei 100 ng/ml, 500 ng/ml ir 1 μ g/ml koncentracijų LPS poveikiai mikroglijos ląstelėms.

Anksčiau LSMU NI Biochemijos laboratorijoje atlikti tyrimai parodė, kad preinkubavus α Syn ir S100A9 monomerus 6 val. KT ant vartyklės susidaro pirminei mišriai neuronų-glijos ląstelių kultūrai toksiški oligomerai. Dėl to toliau siekiant ištirti tokių toksiškų oligomerų poveikį mikroglijos ląstelių bioenergetikai, šiame projekte tyrimams buvo naudojami būtent tokiais sąlygomis susidarę amiloidiniai agregatai.

Pirmajame tyrimų etape aukštos raiškos respirometrijos metodu buvo matuojami kvėpavimo greičiai, atspindintys tiriamų medžiagų poveikį BV-2 mikroglijos ląstelių oksidacinio fosforilinimo sistemai. Ištirti bazaliniai nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiai ir, permeabilizavus ląsteles, mikroglijos mitochondrijų kvėpavimo greičiai antroje, trečioje ir ketvirtoje metabolinėse būsenose. Toliau eksperimentai buvo tęsiami, atliekant mikroglijos glikolitinio aktyvumo vertinimą bei prouždegiminių veiksnių kiekybinę analizę, siekiant įvertinti amiloidinių baltymų α Syn ir S100A9 bei endotoksino LPS sukiamą neurouždegiminį mastą.

3.1. α -sinukleino poveikis nepermeabilizuotų ir permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiui

Įvairūs *in vitro* ir *in vivo* PL tyrimų modeliai rodo, kad mitochondrijos yra svarbus α Syn taikiny [208,209], o šių organelių svarba, dalyvaujant ir reguliuojant mikroglijos imuninio atsako stiprumą, metabolinį perprogramavimą, neurouždegiminius ir neurodegeneracinius procesus, yra ypač didelė [210]. Nors mokslinėje literatūroje yra nemažai duomenų, patvirtinančių α Syn toksišką poveikį neuronų mitochondrijų bioenergetikai ir funkcijoms [68,209,211–213], šio amiloidinio baltymo poveikis glijos ląstelių bioenergetikai ir gliukozės metabolizmui nėra gerai ištirtas. Dėl to, mūsų tyrime pirmiausia buvo siekiama nustatyti α Syn poveikį BV-2 mikroglijos ląstelių oksidacinio fosforilinimo sistemai.

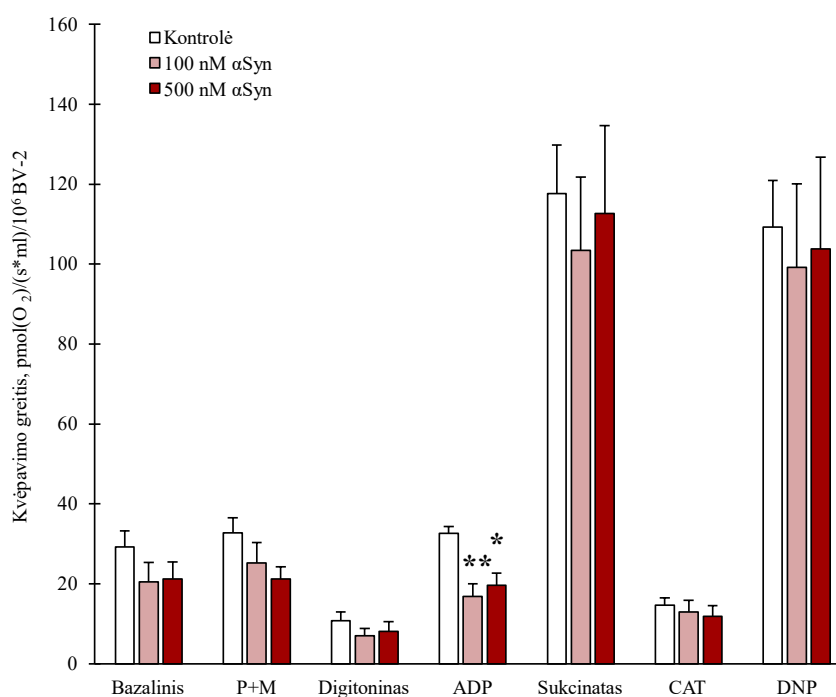
Iš pradžių, buvo siekiama įvertinti nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimą, išmatuojant bazalinį mikroglijos ląstelių kvėpavimo greitį. Kontrolinėje grupėje šis greitis siekė $29,26 \pm 3,97$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių ir statistškai reikšmingai nesiskyrė nuo skirtingomis α Syn koncentracijomis 24 val. paveiktų BV-2 ląstelių eksperimentinėse grupėse užfiksuotų bazalinių kvėpavimo greičių (3.1.1 pav.). Taigi, mes nustatėme, jog α Syn neturi poveikio nepermeabilizuotų mikroglijos ląstelių bazaliniam kvėpavimui.

Toliau matavimo terpę papildžius I-ojo kvėpavimo grandinės komplekso substratais piruvatu ir malatu (P+M), buvo matuojamas vis dar nepermeabilizuotų mikroglijos ląstelių deguonies suvartojimas. Iš gautų rezultatų (3.1.1 pav.) matyti, jog statistškai reikšmingo skirtumo tarp eksperimentinių grupių nebuvo gauta. Permeabilizavus ląsteles digitoninu ir išmatavus jų kvėpavimo greitį, esant laidumo būsenoje (II-oje metabolinėje būsenoje), reikšmingo skirtumo tarp kontrolinės ir tiriamų eksperimentinių grupių taip pat nenustatyta (3.1.1 pav.).

Tuomet, siekiant įvertinti nuo oksidacinio fosforilinimo priklausomą BV-2 ląstelių mitochondrijų kvėpavimą (III-ąją metabolinę būseną), buvo dedamas ADP ir vėliau – sukcinatas. Matavimo terpę papildžius ADP, buvo registruojamas $32,67 \pm 1,65$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 α Syn nepaveiktų

mikroglijos ląstelių deguonies suvartojimo greitis, o 24 val. inkubacija su 100 nM ir 500 nM α Syn nuslopino ADP stimuliuojamą kvėpavimo greitį, oksiduojant piruvatą ir malatą, iki $16,85 \pm 3,16$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių ($p \leq 0,01$) ir $19,61 \pm 3,06$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių ($p < 0,05$) atitinkamai, lyginant su kontrole (3.1.1 pav.). Tačiau įdomu tai, kad maksimalūs mitochondrijų deguonies suvartojimo greičiai, išmatuoti terpę papildžius sukcinatu, tarp tiriamų grupių nesiskyrė. Tai rodo, kad α Syn galimai neigiamai paveikia I-ojo, bet ne II-ojo kvėpavimo grandinės komplekso veiklą, ir taip slopina mikroglijų mitochondrijų vykdomą oksidacinį fosforilinimą.

Tęsiant eksperimentą, kontrolinėje ir α Syn paveiktose grupėse nustatyti BV-2 ląstelių deguonies suvartojimo greičiai, užslopinus ADP patekimą į mikroglijos mitochondrijas su CAT ir ląstelėmis perėjus į IV-ąją metabolinę būseną bei atskyrus oksidacijos procesą nuo fosforilinimo su DNP, statistiškai reikšmingai nesiskyrė (3.1.1 pav.).



3.1.1 pav. α Syn poveikis BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiams po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis

Išmatuoti bazalinis kvėpavimo greitis, kvėpavimo greitis pridėjus piruvato ir malato (P+M), kvėpavimo greitis laidumo būsenoje pridėjus digitonino (II-oji metabolinė būseną), oksidacinio fosforilinimo greitis pridėjus ADP ir sukcinato (III-oji metabolinė būseną), kvėpavimo greitis laidumo būsenoje pridėjus karboksitraktilozido (CAT) (IV-oji metabolinė būseną) ir nustatytas kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumas pridėjus 2,4-dinitrofenolio (DNP); * – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, lyginant su atitinkama kontrole (n = 6)

Taigi, remiantis gautais rezultatais, galima teigti, kad 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 100 nM ir 500 nM α Syn oligomerais slopina oksidacinį fosforilinimą, vykstant I-ojo kvėpavimo kompleksų substratų, piruvato ir malato, oksidacijai, galimai dėl šio komplekso pažaidos. Tačiau tai neturi įtakos bendram kvėpavimo grandinės kompleksų veiklos efektyvumui, atskyrus oksidaciją nuo fosforilinimo skyrikliu DNP.

Tokius šio tyrimo rezultatus patvirtina daugelis kitų mokslininkų atliktų tyrimų, rodančių, jog α Syn agregatai pažeidžia I-ąjį kvėpavimo grandinės kompleksą [68,211,212,214,215]. Tiesa, reikėtų pabrėžti, kad šie tyrimai buvo atlikti ne su mikroglijos, bet su neuronų ląstelėmis arba iš smegenų išskirtomis mitochondrijomis. Atsižvelgiant į tai, galima daryti prielaidą, kad α Syn toksiškas poveikis mikroglijos mitochondrijų bioenergetikai, pasireiškiantis I-ojo komplekso disfunkcija, yra panašus į poveikį stebimą neuronų mitochondrijoms. Manoma, kad tokį poveikį α Syn oligomerai sukelia tiesiogiai, jungdamiesi prie I-ojo kvėpavimo grandinės komplekso ir inhibuodami jo funkciją, arba netiesiogiai, pažeisdami mitochondrijų membranos lipidus [214].

Iš tiesų, nedaug yra tyrimų, vertinančių užląstelinių α Syn agregatų poveikį išimtinai mikroglijos ląstelių mitochondrijų funkcijoms. Ypač mažai tyrimų atlikta su BV-2 mikroglijos ląstelių linija. Vis dėlto, mokslinėje literatūroje yra duomenų, rodančių, jog 24 val. pirminės pelių mikroglijos kultūros inkubacija su 1 μ g/ml α Syn fibrilėmis sumažina šių ląstelių bazalinį ir maksimalų mitochondrijų kvėpavimų greičius bei slopina ATP gamybą [81]. Panašius rezultatus yra gavusi Sarkar'o ir kt. mokslininkų grupė. Jie, dirbami taip pat su pirmine pelių mikroglijos kultūra, nustatė, kad 24 val. inkubacija su 1 μ M α Syn agregatais neigiamai paveikia mitochondrijų dinamiką ir funkcijas, sumažina bazalinį mikroglijos kvėpavimą, maksimalų oksidacinį fosforilinimą, ATP sintezę bei sąlygoja mažesnius kvėpavimo greičius, ląstelėms esant laidumo būsenoje [216]. Įdomu tai, kad Qiao ir kt. parodė, jog po 24 val. inkubacijos su 10 μ g/ml laukinio tipo α Syn (WT α Syn) ir A53T α Syn oligomerais yra slopinamas ne tik pirminės žiurkių mikroglijos ląstelių vykdomas oksidacinis fosforilinimas, bet ir IV-ojo kvėpavimo grandinės komplekso aktyvumas [80]. Mes taip pat nustatėme, jog užląsteliniai α Syn oligomerai slopina oksidacinį fosforilinimą po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis, bet neigiamo poveikio kitiems kvėpavimo grandinės kompleksams, išskyrus I-ąjį, nenustatėme. Be to, priešingai nei aptarti kitų mokslininkų tyrimai, mes nepastebėjome reikšmingų pokyčių mikroglijos ląstelių bazaliniam, maksimaliam ADP stimuliuojamam bei laidumo būsenoje registruojamiems kvėpavimo greičiams. Tokie skirtumai gali būti nulemti tyrimuose taikomų skirtingų metodologinių aspektų: naudojamos skirtingos mikroglijos ląstelių kultūros, skirtingo agregacijos laipsnio ir koncentracijų α Syn bei tarpusavyje besiskiriančios deguonies suvartojimo pokyčius registruojančios sistemos, o tai riboja gautų rezultatų lyginimą bei interpretavimą.

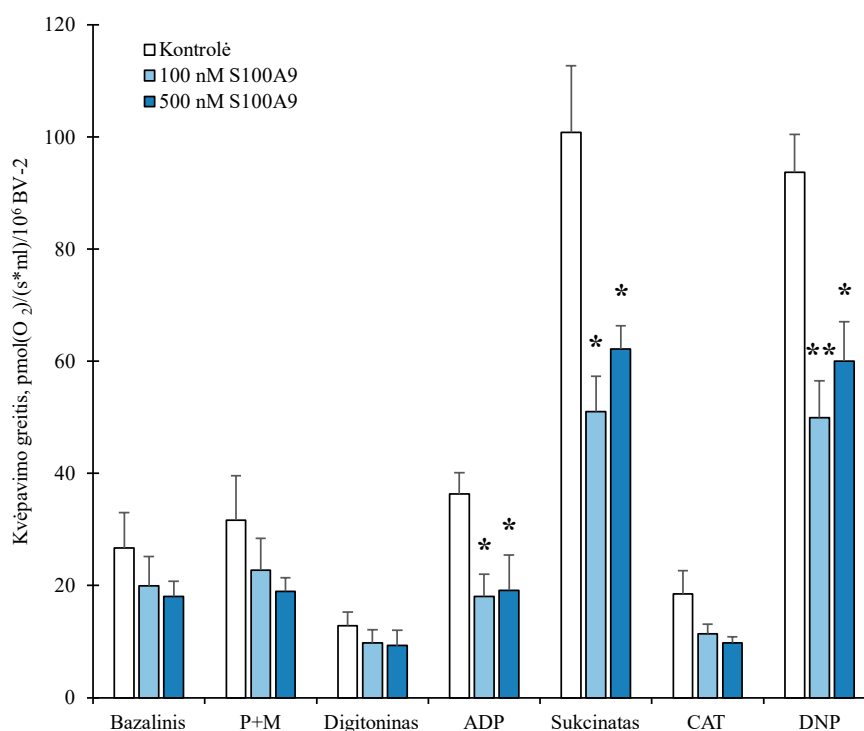
3.2. S100A9 poveikis nepermeabilizuotų ir permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiui

Įvertinę α Syn agregatų poveikį BV-2 mikroglijos mitochondrijų kvėpavimui, mes toliau tęsėme tyrimus, siekdami įvertinti kito amiloidinio baltymo S100A9 poveikį šių ląstelių energetiniam metabolizmui. Visų pirma, mes nustatėme, kad kontrolinės grupės nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių bazalinis kvėpavimo greitis siekė $26,72 \pm 6,34$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių. Lyginant šį greitį su 100 nM ir 500 nM S100A9 24 val. paveiktų nepermeabilizuotų mikroglijos ląstelių deguonies suvartojimo greičiais, statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta (3.2.1 pav.).

Tuomet pridėjus piruvato ir malato bei permeabilizavus mikroglijos ląsteles su digitoninu, buvo užrašytas kvėpavimo greitis laidumo būsenoje. Gauti rezultatai parodė, kad 24 val. inkubacija su 100 nM ir 500 nM S100A9 baltymu neturi įtakos mikroglijos ląstelių II-ajai metabolinei būsenai, lyginant su kontrole (3.2.1 pav.). Toks pat rezultatas buvo gautas, tiriant α Syn poveikį.

Tęsiant eksperimentą, buvo dedamas ADP, kad ATP-sintazė, panaudodama elektrocheminio protonų gradiento pavidalu sukauptą energiją, pradėtų intensyviai sintetinti ATP ir pasiektų III-ąją metabolinę

arba oksidacinio fosforilavimo būseną. Nustatėme, kad tokioje būsenoje kontrolinių BV-2 ląstelių kvėpavimo greitis buvo $36,34 \pm 3,75$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių, o 24 val. inkubacija su S100A9 stipriai slopina šių ląstelių oksidacinį fosforilavimą. 100 nM S100A9 deguonies suvartojimą sumažino 2,01 karto, t.y. iki $18,10 \pm 3,94$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių ($p < 0,05$), o 500 nM S100A9 – 1,9 karto, iki $19,12 \pm 6,31$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių ($p < 0,05$), lyginant su kontrole (3.2.1 pav.). Toliau, pridėjus II-ojo kvėpavimo komplekso substrato sukcinato, buvo registruojamas maksimalus mikroglijos ląstelių mitochondrijų ADP stimuliuotas kvėpavimas. Iš 3.2.1 pav. matyti, kad S100A9 oligomerais nepaveiktų mikroglijos ląstelių kvėpavimo greitis šioje metabolinėje būsenoje siekė $100,83 \pm 11,84$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių, o po 24 val. trukusios inkubacijos su 100 nM S100A9 ir 500 nM S100A9 BV-2 kvėpavimo greitis sumažėjo iki $51,05 \pm 6,32$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių ir $62,18 \pm 4,15$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių, atitinkamai. Tai rodo, kad S100A9 beveik per pusę sumažina maksimalų ADP stimuliuojamą kvėpavimą su piruvatu, malatu ir sukcinatu, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).



3.2.1 pav. S100A9 poveikis BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiams po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis

Išmatuoti bazalinis kvėpavimo greitis, kvėpavimo greitis pridėjus piruvato ir malato (P+M), kvėpavimo greitis laidumo būsenoje pridėjus digitonino (II-oji metabolinė būseną), oksidacinio fosforilavimo greitis pridėjus ADP ir sukcinato (III-oji metabolinė būseną), kvėpavimo greitis laidumo būsenoje pridėjus karboksitraktilozido (CAT) (IV-oji metabolinė būseną) ir nustatytas kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumas pridėjus 2,4-dinitrofenolio (DNP); * – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, lyginant su atitinkama kontrole ($n = 3$)

Indukavus IV-ąją metabolinę būseną su CAT, kontrolinėje grupėje buvo fiksuojamas $18,54 \pm 4,09$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. ląstelių kvėpavimo greitis, kuris statistiškai reikšmingai tarp S100A9 paveiktų grupių nesiskyrė (3.2.1 pav.). Tai rodo, kad S100A9 nekeičia vidinės mitochondrijų membranos laidumo. Toliau, siekiant įvertinti, ar S100A9 neigiamai paveikia kvėpavimo grandinės kompleksų veiklą, buvo dedamas oksidacijos ir fosforilavimo procesus atskiriantis junginys – DNP. Tokioje būsenoje buvo registruojamas $93,70 \pm 6,78$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. kontrolinės grupės BV-2

ląstelių deguonies suvartojimas, o S100A9 paveiktose grupėse buvo fiksuojami daug mažesni kvėpavimo greičiai. Po 24 val. inkubacijos su 100 nM S100A9 BV-2 kvėpavimo greitis, matavimo terpę papildžius DNP, sumažėjo iki $49,93 \pm 6,62 \text{ pmol(O}_2\text{)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių}$ ($p \leq 0,01$), o 500 nM S100A9 eksperimentinėje grupėje sumažėjo iki $60,06 \pm 6,96 \text{ pmol(O}_2\text{)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių}$ ($p < 0,05$), lyginant su kontrole (3.2.1 pav.).

Apibendrinant, tokie rezultatai rodo, kad amiloidinis baltymas S100A9 slopina mikroglijos ląstelių bendrą mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų funkcinių pajėgumą, o nustatyti mažesni kvėpavimo greičiai III-oje metabolinėje būsenoje, lyginant su kontrole, gali būti siejami su S100A9 oligomerų sąlygota I-ojo ir II-ojo kvėpavimo grandinės kompleksų pažeida.

Mūsų žiniomis, S100A9 poveikis BV-2 mikroglijos ląsteliniam kvėpavimui ir bioenergetikai iki šiol nebuvo tirtas. Taip pat nėra atliktų *in vitro* ar *in vivo* tyrimų, kurie atskleistų užląstelių S100A9 amiloidinių agregatų poveikį kitų rūšių ląstelių energetiniam metabolizmui.

3.3. Lipopolisacharido poveikis nepermeabilizuotų ir permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiui

Kitaip nei amiloidinių baltymų α Syn ar tuo labiau S100A9 agregatų atveju, endotoksino LPS poveikis mikroglijos ląstelių energetiniam metabolizmui yra geriau ištirtas. LPS aktyvuotiems makrofagams yra būdinga stipriau išreikšta glikolizė. Toks reiškinys pirmą kartą buvo pastebėtas pelės pilvaplėvės makrofaguose dar 1970 m. [217]. Dabar yra sutariama, jog tipinis prouždegiminis PAMP klasei priskiriamas veiksnys LPS greitai nuslopina mikroglijų oksidacinį fosforilinimą ir suaktyvina glikolizę, taip reguliuodamas mikroglijos funkcijas ir imuninį atsaką [218,219]. Visgi, mokslinėje literatūroje daugiausia publikuojami tyrimai, kuriuose yra tirta tik viena pasirinkta tam tikra LPS koncentracija, ir dėl to nėra gerai žinoma, kaip keičiasi poveikis ląstelių bioenergetikai priklausomai nuo LPS koncentracijos. Tačiau šis aspektas yra svarbus, nes LPS koncentracija organizme neurodegeneracinių ir neurouždegiminių ligų metu gali kisti [220]. Užtai, siekdami geriau suprasti LPS reikšmę, reguliuojant mikroglijos gliukozės metabolizmą, mes analizavome trijų skirtingų koncentracijų (100 ng/ml, 500 ng/ml 1 μ g/ml) LPS poveikį BV-2 ląstelėms ir pirmiausia ištyrėme jų poveikį mikroglijos kvėpavimui.

Kaip matyti 3.3.1 pav., kontrolinės grupės nepermeabilizuotų BV-2 ląstelių bazalinis kvėpavimo greitis buvo $19,81 \pm 2,16 \text{ pmol(O}_2\text{)/(s*ml)/1 mln. ląstelių}$ ir statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo 100 ng/ml, 500 ng/ml ir 1 μ g/ml LPS paveiktų mikroglijos ląstelių grupėse užregistruotų bazalinių kvėpavimo greičių. Taigi, LPS, taip pat kaip ir α Syn bei S100A9, neturi poveikio nepermeabilizuotų BV-2 mikroglijos ląstelių bazaliniam kvėpavimui po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis.

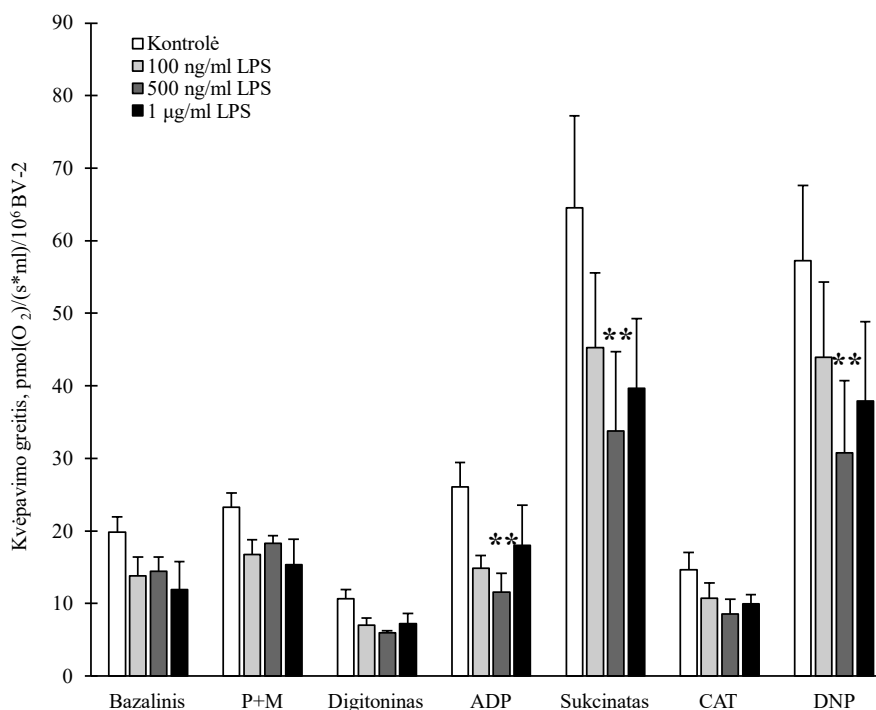
Deguonies suvartojimo greičiai, išmatuoti kontrolinėje ir skirtingų koncentracijų LPS paveiktose grupėse, taip pat nesiskyrė, pridėjus piruvato ir malato bei permeabilizavus ląsteles su digitoninu. Todėl galima teigti, kad ir LPS, identiška amiloidiniams baltymams, nekeičia BV-2 ląstelių laidumo arba II-osios metabolinės būsenos (3.3.1 pav.).

Įdomu tai, kad 24 val. inkubacija su 100 ng/ml ir 1 μ g/ml LPS, apskritai, neturėjo jokios statistiškai reikšmingos įtakos BV-2 ląstelių kvėpavimo grandinės funkcijai ir oksidacinio fosforilinimo efektyvumui, lyginant su kontrole (3.3.1 pav.). Tačiau 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 500 ng/ml LPS neigiamai paveikia mikroglijos mitochondrijų kvėpavimą. Matavimo terpę papildžius ADP ir įvedus mikroglijos mitochondrijas į III-ąją metabolinę būseną, kontrolinių grupių deguonies

suvartojimo greitis siekė $26,07 \pm 3,34$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių, o 500 ng/ml LPS grupėje šis greitis sumažėjo net iki $11,57 \pm 2,61$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių. Tai rodo, kad 24 val. mikroglijos ląstelių inkubacija su 500 ng/ml LPS sąlygoja daugiau nei dvigubai silpnesnį ADP stimuliuojamą kvėpavimą, oksiduojant piruvatą ir malatą, lyginant su kontrole ($p \leq 0,01$).

Be to, iš 3.3.1 pav. matyti, kad 24 val. inkubacija su 500 ng/ml LPS nuslopino ADP stimuliuojamą kvėpavimą, oksiduojant ne tik piruvatą ir malatą, bet ir sukcinatą. LPS nepaveiktoje grupėje deguonies suvartojimo greitis siekė $64,56 \pm 12,66$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių, o 500 ng/ml LPS grupėje šis maksimalus oksidacinio fosforilinimo greitis statistiškai reikšmingai sumažėjo iki $33,75 \pm 10,99$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių, lyginant su kontrole ($p \leq 0,01$).

Toliau tęsiant eksperimentą ir matavimo terpę papildžius CAT, kvėpavimo greičio pokyčių IV-oje metabolinėje būsenoje tarp visų tiriamų grupių nenustatyta. Tačiau pridėjus DNP ir atskyrus oksidacijos procesą nuo fosforilinimo, buvo stebimas 1,86 kartų mažesnis deguonies suvartojimo greitis 500 ng/ml LPS paveiktoje BV-2 ląstelių grupėje, lyginant su kontrole ($p \leq 0,01$) (3.3.1 pav.), kur kontrolinėje grupėje kvėpavimo greitis šioje metabolinėje būsenoje buvo $57,26 \pm 10,37$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių, o 500 ng/ml LPS grupėje – $30,79 \pm 9,96$ pmol(O₂)/(s*ml)/1 mln. BV-2 ląstelių. Kitose LPS koncentracijų grupėse toks poveikis nebuvo stebimas.



3.3.1 pav. LPS poveikis BV-2 ląstelių kvėpavimo greičiams po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis

Išmatuoti bazalinis kvėpavimo greitis, kvėpavimo greitis pridėjus piruvato ir malato (P+M), kvėpavimo greitis laidumo būsenoje pridėjus digitonino (II-oji metabolinė būseną), oksidacinio fosforilinimo greitis pridėjus ADP ir sukcinato (III-oji metabolinė būseną), kvėpavimo greitis laidumo būsenoje pridėjus karboksitraktilozido (CAT) (IV-oji metabolinė būseną) ir nustatytas kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumas pridėjus 2,4-dinitrofenolio (DNP); ** – $p \leq 0,01$, lyginant su atitinkama kontrole ($n = 5$)

Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad BV-2 mikroglijos ląstelių inkubacija su 500 ng/ml LPS po 24 val. sąlygoja kvėpavimo grandinės I-ojo ir II-ojo kompleksų disfunkciją, sumažina bendrą kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumą, atskyrus oksidaciją nuo fosforilinimo, ir nuslopina šiu

ląstelių vykdomą oksidacinį fosforilinimą. Toks poveikis taip pat buvo stebimas BV-2 mikroglijos ląsteles paveikus 100 nM ir 500 nM S100A9 agregatais 24 val. (3.2.1 pav.).

Tokie mūsų gauti LPS poveikio kvėpavimo grandinės kompleksams rezultatai sutampa su mokslinėje literatūroje esančiais duomenimis, rodančiais, jog per TLR-4 receptorius vykstanti mikroglijos ląstelių stimuliacija su LPS skatina susidaryti endogeninio metabolito itakono rūgšties perteklių, kuris inhibuoja II-ojo kvėpavimo grandinės komplekso veiklą ir užtai yra stebimas oksidacinio fosforilinimo procesų slopinimas [221,222]. Be to, šio darbo metu buvo nustatytas LPS sąlygotas mažesnis deguonies suvartojimo greitis III-oje metabolinėje būsenoje. Šis rezultatas yra taip pat panašus į Hunter'io ir kt. mokslininkų atlikto *in vivo* tyrimo rezultatus, kurie atskleidė, jog praėjus 3 dienoms po intrastriatalinės LPS injekcijos, pasireiškia I-ojo ir II-ojo neuronų mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų pažaidos ir yra registruojami silpnesni kvėpavimo greičiai III-oje metabolinėje būsenoje [223]. Panašūs duomenys yra gauti, atliekant eksperimentus su kardiomiocitų mitochondrijomis. Nustatyta, kad LPS gali pažeisti ne tik I-ąjį, bet ir IV-ąjį bei V-ąjį (ATP sintazę) kompleksus [224]. Tiesa, yra ir prieštaringų duomenų, rodančių, jog LPS gali padidinti I-ojo ir II-ojo kvėpavimo grandinės kompleksų aktyvumus [225].

Įdomu dar ir tai, kad mūsų rezultatai parodė stiprų 500 ng/ml LPS poveikį mikroglijos ląstelėms, tačiau dvigubai didesnė, 1 µg/ml, endotoksino koncentracija tokio poveikio BV-2 ląstelėms po 24 val. inkubacijos nesukėlė. Tokį rezultatą yra gana sunku paaiškinti, o bioenergetinių tyrimų su mikroglijos ląstelėmis, naudojant tokią (500 ng/ml) LPS koncentraciją, atlikta nėra. Galimai didesnės LPS koncentracijos suaktyvina kitus signalinius kelius ir mechanizmus. Literatūroje yra duomenų, rodančių, kad 1 µg/ml LPS gali sukelti net „hipermetabolinę“ mikroglijų būseną, kurios metu suintensyvėja tiek oksidacinis fosforilinimas, tiek glikolizė, tačiau yra stebimas padidėjęs protonų pralaidumas [225]. Kita vertus, Liu ir kt. yra parodę, kad 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 1 µg/ml LPS neturi poveikio bazaliniam kvėpavimui, tačiau slopina maksimalų ląstelių kvėpavimą [218].

Vis dėlto, literatūroje daugiausia aprašomi tyrimų rezultatai gauti, naudojant Seahorse XF analizatorių ir tiriant 100 ng/ml LPS poveikį. Nors mes nenustatėme reikšmingo 100 ng/ml LPS poveikio BV-2 ląstelių bioenergetikai po 24 val. inkubacijos, Orihuela ir kt. parodė, kad ši koncentracija pirminėse mikroglijos ląstelėse gali sumažinti bazalinius kvėpavimo greičius [191]. Tačiau Hu ir kt. nustatė, kad 100 ng/ml LPS po 12 val. inkubacijos su pirminėmis žiurkės mikroglijos ląstelėmis sumažina ne tik bazalinį, bet ir maksimalų bei rezervinį (angl. *spare respiration*) kvėpavimus [198]. Tokie rezultatai sutampa ir su kito tyrimo rezultatais, kurie atskleidė, jog 24 val. inkubacija su 100 ng/ml LPS sumažina bazalinius ir maksimalius pirminių pelių mikroglijos mitochondrijų kvėpavimus bei padidina protonų laidumą. Taip pat šie mokslininkai tyrė mažesnių LPS koncentracijų poveikį ir priėjo prie išvados, kad energetinio metabolizmo pokyčiai mikroglijos ląstelėse vyksta ne tik priklausomai nuo koncentracijos, bet ir nuo inkubacijos su ląstelėmis trukmės [201]. Be to, yra duomenų, jog BV-2 ir B6M7 mikroglijos ląstelių linijose ATP sintezės ir bazalinio bei maksimalaus kvėpavimo slopinimą gali sukelti 24 val. 100 ng/ml LPS inkubacija kartu su 100 ng/ml INF-γ citokinu [183].

Taip pat yra viena studija, kurioje, kaip ir mūsų atveju, buvo naudojama Oroboros oksigrafinė sistema, tačiau matavimai atlikti, naudojant kitos sudėties kvėpavimo matavimo terpę bei taikant kitokį statistinį testą rezultatams vertinti. Šie mokslininkai nustatė, kad po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis, 100 ng/ml LPS sumažina mitochondrijų membranos potencialą ir deguonies suvartojimo greitį III-oje metabolinėje būsenoje, tačiau IV-osios metabolinės būsenos nepaveikia [226]. Kita

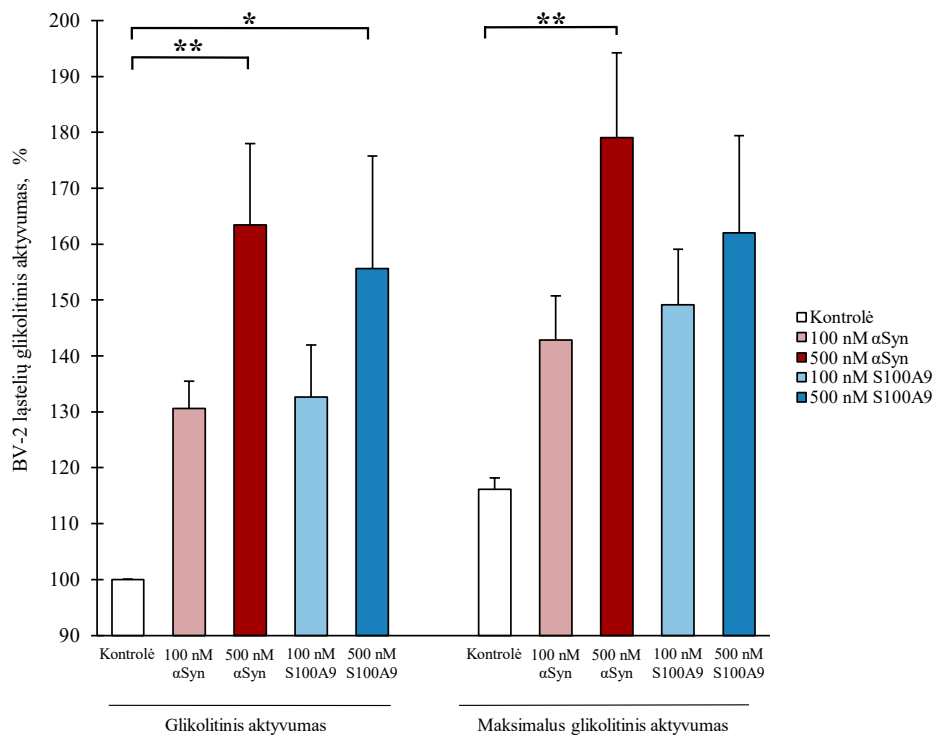
mokslininkų komanda tyrė metabolinį perprogramavimą, vykstantį pirminėse pelių mikroglijos ir žmogaus mikroglijos ląstelėse, jas 24 val. inkubavus su 250 ng/ml LPS. Transkriptomine analize atskleidė, kad LPS slopina oksidacinį fosforilinimą abiejų rūšių mikroglijos ląstelėse, tačiau deguonies suvartojimo greičio registravimo Seahorse XF analizatoriumi rezultatai to nepatvirtino. Nepaisant to, ATP sintezė buvo nuslopinta abiejų rūšių mikroglijos ląstelėse, tačiau bazalinio kvėpavimo greičio sumažėjimas buvo stebimas pelės, o jo padidėjimas – žmogaus mikroglijos ląstelėse po 24 val. inkubacijos su LPS. Vadinasi, egzistuoja nežymūs tarprūšiniai ląstelių ypatumai, į kuriuos taip pat būtina atsižvelgti [227].

Nors tokius nesutapimus tarp kai kurių tyrimų rezultatų gali sąlygoti naudoti skirtingi analizatoriai, ląstelių linijos, taikyti skirtingi statistiniai testai bei kiti metodologiniai aspektai, vis tik tai parodo, kad šiuo metu turimi rezultatai apie LPS poveikį turėtų būti interpretuojami atsargiai. Greičiausiai egzistuoja daug sudėtingesni, dar nežinomi ir nepaaiškinti molekuliniai mechanizmai, valdantys mikroglijos ląstelių energetinį metabolizmą.

3.4. α -sinukleino ir S100A9 poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui

Kaip jau buvo minėta, įprastai, įvairių rūšių makrofagams, reaguojant į susidariusias patologines mikroaplinkos sąlygas, yra būdinga įgyti uždegiminį fenotipą ir pertvarkyti savo medžiagų apykaitos kelius. Dažnu atveju tai pasireiškia suintensyvėjusia glikolize ir laktato susidarymui, net ir esant pakankamai deguonies koncentracijai audinyje [228]. Specializuoti smegenų makrofagai – mikroglijos ląstelės, reaguodamos į įvairių tipų PAMP (LPS ir kt.) ir DAMP (ATP, A β , α Syn, S100A9 ir kt.) klasės molekules, taip pat vykdo metabolinį perprogramavimą. Tačiau šių ląstelių atsakas į PAMP ir DAMP skiriasi bei yra duomenų, kad net tai pačiai DAMP klasei priskiriamos, bet skirtingos molekulės sukelia savitus mikroglijos medžiagų apykaitos kelių persitvarkymus [218]. Todėl mokslinėje literatūroje nesant nuoseklių duomenų apie α Syn ir S100A9 oligomerų poveikį mikroglijos ląstelių metaboliniams ir bioenergetiniams procesams bei nustatčius, kad šie amiloidiniai baltymai slopina oksidacinį fosforilinimą, mes kitame darbo etape siekėme įvertinti α Syn ir S100A9 mažos molekulinės masės agregatų poveikį BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui po 24 val.

Mūsų rezultatai parodė, kad 24 val. inkubacija su 100 nM α Syn ir 100 nM S100A9 neturi statistiškai reikšmingo poveikio BV-2 ląstelių glikolitiniam ir maksimaliam glikolitiniam aktyvumams (3.4.1 pav.). Tačiau iš 3.4.1 pav. matyti, kad didesnės šių baltymų koncentracijos skatina mikroglijos ląsteles intensyviau vykdyti glikolizę. Gauti rezultatai rodo, jog 500 nM α Syn padidino BV-2 ląstelių glikolitinį aktyvumą 1,63 karto ($p \leq 0,01$), o 500 nM S100A9 – 1,56 karto ($p < 0,05$), lyginant su kontrole. Vis dėlto, tik 500 nM α Syn po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis statistiškai patikimai 1,79 kartų padidino maksimalų mikroglijos glikolitinį aktyvumą, lyginant su kontrole ($p \leq 0,01$) (3.4.1 pav.).



3.4.1 pav. αSyn ir S100A9 poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis

* – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, lyginant su kontrole ($n = 6$)

Apjungiant šiuos (3.4.1 pav.) ir prieš tai aptartus, amiloidinių baltymų poveikio mikroglijos ląstelių kvėpavimo greičiams skirtingose metabolinėse būsenose (3.1.1 pav. ir 3.2.1 pav.), rezultatus, galima daryti prielaidą, kad 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija tiek su 100 nM αSyn, tiek su 500 nM αSyn slopina oksidacinį fosforilinimą, oksiduojant piruvatą ir malatą, tačiau tik 500 nM αSyn suaktyvina glikolizę ir padidina maksimalų mikroglijos ląstelių glikolitinį pajėgumą, lyginant su kontrole. Užląstelių S100A9 oligomerų poveikis BV-2 mikroglijos ląstelių energetiniam metabolizmui šiek tiek skiriasi nuo αSyn poveikio. Po 24 val. BV-2 ląstelių inkubacijos su 100 nM ir 500 nM S100A9 yra inhibuojama oksidacinio fosforilinimo sistema, oksiduojant piruvatą, malatą ir sukcinatą, tačiau tik 500 nM S100A9 sąlygoja glikolizės proceso suaktyvėjimą mikroglijos ląstelėse, bet, skirtingai nei αSyn, maksimalaus BV-2 glikolitinio aktyvumo nekeičia. Tai rodo, kad prouždegiminių ir su neurodegeneracinėmis ligomis siejamų veiksnių poveikis mikroglijos bioenergetikai priklauso ne tik nuo paties veiksnio tipo, bet ir nuo jo koncentracijos.

Šio tyrimo metu gauti rezultatai, atskleidžiantys, jog 24 val. inkubacija su 500 nM αSyn agregatais sukelia mikroglijos ląstelių energetinio metabolizmo kelių persitvarkymus, sutampa su kitų mokslininkų atliktais tyrimais. Lu ir kt. parodė, kad 24 val. pirminės mikroglijos ląstelių kultūros inkubacija su αSyn fibrilėmis per mTOR/AKT/HIF-1α signalinį kelią sukelia oksidacinio fosforilinimo slopinimą ir glikolizės proceso suintensyvėjimą. Tačiau yra įdomu tai, kad, imituojant lėtinį šių αSyn fibrilių sukiamą stresą pirminėms mikroglijos ląstelėms, buvo stebimi gerokai mažesni glikolitinis ir maksimalus glikolitinis šių ląstelių aktyvumai [81]. Tokie duomenys leidžia daryti prielaidą, kad αSyn poveikis mikroglijos ląstelių bioenergetikai priklauso ne tik nuo amiloidinių agregatų dydžio, bet ir nuo jų poveikio trukmės. Kiti mokslininkai parodė, kad αSyn oligomerai stimuliuoja pirmines mikroglijos ląsteles intensyviau vykdyti glikolizę per PKM2 kelią,

o tai lemia greitesnį gliukozės pasisavinimą (angl. *uptake*), didesnę laktato dehidrogenazės aktyvumą ir, atitinkamai, intensyvesnį laktato susidarymą bei terpės rūgštėjimą [80]. Palyginimui, tyrimai su BV-2 ląstelėmis taip pat rodo, kad α Syn gali sukelti tokio tipo gliukozės metabolizmo pokyčius. Yang'as ir kt. atskleidė, jog didelės šio baltymo koncentracijos (10 μ M) irgi slopina mitochondrijų kvėpavimą ir lygiagrečiai stimuliuoja glikolizę gaminti ATP [229]. Tačiau Wang'as ir kt. parodė, kad toks BV-2 ląstelių metabolinių kelių persitvarkymas link glikolizės, mikroglijas paveikus 3,6 μ g/ml α Syn fibrilėmis, yra vis tiek neefektyvus energijos gamybos atžvilgiu – α Syn paveiktose grupėse buvo nustatytos mažesnės viduląstelinės ATP koncentracijos, lyginant su kontrole [230].

Dar svarbu pažymėti, jog fiziologinėmis sąlygomis ląstelės paprastai vykdo ir reguliuoja savo medžiagų apykaitą mažesniu nei didžiausiu ar maksimaliu įmanomu pajėgumu. Todėl maksimalaus glikolitinio aktyvumo registravimas mums leidžia įvertinti mikroglijos glikolitinio pajėgumo atsargas arba rezervą (angl. *glycolytic reserve*), įprastai reikalingą ląstelėms lengviau ir greičiau prisitaikyti prie pasikeitusių aplinkos sąlygų ir energijos poreikių, bei įvertinti jo pokyčius, ląstelėms reaguojant į tam tikrus stimulus [206]. Mūsų eksperimentų rezultatai parodė, kad tik didesnės koncentracijos α Syn, bet ne S100A9, oligomerai stipriai padidina mikroglijos maksimalų glikolitinį aktyvumą po 24 val., lyginant su kontrole. Tai galima bandyti paaiškinti tuo, kad mikroglijos ląstelėms reaguojant į α Syn, galimai labiau padidėja energijos poreikiai, reikalingi tam tikroms mikroglijos funkcijoms atlikti, nei reaguojant į užląstelinis S100A9 agregatus. Galima daryti prielaidą, kad užląsteliniai α Syn ir S100A9 aktyvuoja skirtingus mikroglijos signalinius kelius, atitinkamai sąlygojančius savitus šių ląstelių bioenergetikos pokyčius ir metabolinį perprogramavimą.

Be to, mes pirmą kartą parodėme, kad 24 val. inkubacija su 500 nM S100A9 oligomerais sąlygoja BV-2 mikroglijos ląstelių metabolinių kelių persitvarkymą iš oksidacinio fosforilinimo į glikolitinį energijai gaminti, o mažesnės šio baltymo koncentracijos tokio poveikio nesukelia. Tai dar kartą patvirtina amiloidinių baltymų poveikio mikroglijos medžiagų apykaitai priklausomybę nuo koncentracijos.

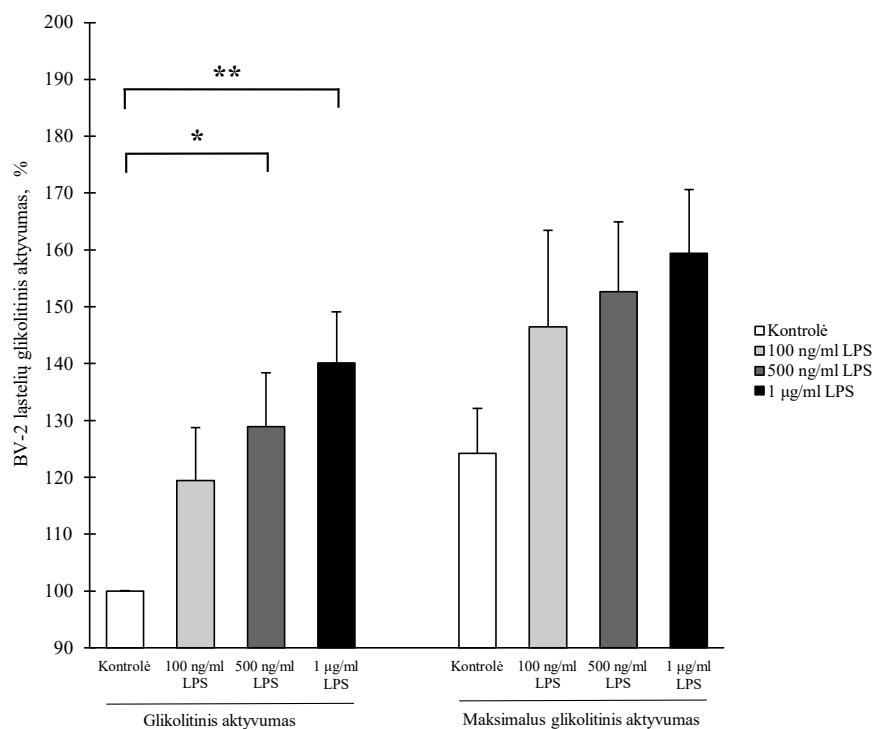
Viską apibendrinant, tokie šio tyrimo metu nustatyti užląstelinis α Syn ir S100A9 oligomerų sukeltami energetinio metabolizmo persitvarkymai iš mitochondrinio į glikolitinį yra gana tipiniai prouždegiminių mikroglijos fenotipui [182]. Mes nustatėme, kad toks poveikis pasireiškia dėl sutrikdytos kvėpavimo grandinės kompleksų veiklos. Dėl to šie rezultatai yra svarbūs toliau tiriant šių amiloidinių baltymų agregatų poveikį mikroglijos ląstelėms ir aiškinantis jų toksiškumo molekulinis mechanizmus AL ir PL vystymosi bei progresavimo metu. Tai gali prisidėti prie kryptingo naujų terapinių priemonių, nukreiptų į mikroglijos energetinio metabolizmo reguliavimą ir leidžiančių suvaldyti ar gydyti neuroūždegiminius ir neurodegeneracinius procesus, kūrimo.

3.5. Lipopolisacharido poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui

Atsižvelgiant į tai, jog tiriant LPS poveikį BV-2 ląstelių oksidacinio fosforilinimo sistemai nustatėme mažesnius deguonies suvartojimus III-oje metabolinėje būsenoje, o tai dažniausiai yra siejama su atitinkamai padidėjusiu laktato susidarymu, tyrimus tęsėme tirdami LPS poveikį glikolitiniam BV-2 ląstelių aktyvumui.

Iš gautų rezultatų matyti, kad tik 100 ng/ml LPS koncentracija neturėjo įtakos BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui po 24 val. (3.5.1 pav.). Tačiau 24 val. inkubacija su 500 ng/ml LPS reikšmingai padidino mikroglijos glikolitinį aktyvumą 28,94 % ($p < 0,05$), o 1 μ g/ml LPS – net 40,14 % ($p \leq 0,01$), lyginant su kontrole. Taip pat galima išvelgti dėsninę, kad didėjant LPS

koncentracijai, atitinkamai intensyvėja mikroglijos glikolitinis aktyvumas. Be to, 3.5.1 pav. pateikti rezultatai rodo dar ir tai, jog nei viena iš tirtų LPS koncentracijų nepakeitė BV-2 ląstelių maksimalaus glikolitinio aktyvumo po 24 val. inkubacijos, lyginant su kontrole.



3.5.1 pav. LPS poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis

* – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, lyginant su kontrole ($n = 6$)

Susiejus šiuos (3.5.1 pav.) ir kvėpavimo rezultatus (3.3.1 pav.), galima teigti, jog 100 ng/ml LPS nekeičia BV-2 ląstelių energetinio metabolizmo, 500 ng/ml LPS neabejotinai sukelia ryškų mikroglijos ląstelių metabolinių kelių persitvarkymą iš oksidacinio fosforilinimo į glikolizę, o 1 μg/ml LPS, neslopindamas mitochondrijų kvėpavimo, padidina glikolitinį mikroglijos ląstelių aktyvumą po 24 val. inkubacijos. Remiantis šiais rezultatais, tampa akivaizdu, jog, veikiant prouždegiminiams veiksniams, ne visada yra stebimas klasikinis mikroglijos ląstelių atsakas, pasireiškiantis oksidacinio fosforilinimo slopinimu ir glikolitinio aktyvumo padidėjimu. Pavyzdžiui, Nair’as ir kt. yra parodę, jog mažos LPS koncentracijos (50 ng/ml) padidina mikroglijos ląstelių oksidacinio fosforilinimo ir glikolizės aktyvumus [201]. Tai rodo, kad mikroglijos ląstelių bioenergtiniai pokyčiai, vykstantys reaguojant į patologinius veiksnius, yra daug sudėtingesni nei iki šiol buvo manytina ir galimai priklauso ne tik nuo paties prouždegiminio veiksnio, jo koncentracijos, poveikio trukmės, bet ir kitų, dar neištirtų, faktorių.

Mes nustatėme, kad 24 val. inkubacija su 100 ng/ml LPS neturi poveikio BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui ir, apskritai, ląstelių bioenergetikai. Tokius rezultatus patvirtina Rubio-Araiz’o ir kt. atliktas tyrimas, kuriame buvo parodyta, jog 24 val. inkubacija su 100 ng/ml LPS nepaveikia pirminės mikroglijos kultūros glikolitinio aktyvumo [231]. Tačiau literatūroje yra ir prieštaringų tyrimų rezultatų, rodančių, kad ši LPS koncentracija gali padidinti mikroglijos glikolitinį aktyvumą ir sąlygoti metabolinį perprogramavimą iš mitochondrijų vykdomo oksidacinio fosforilinimo į glikolitinį. Nair’as ir kt. nustatė, kad 24 val. pirminės pelių mikroglijos inkubacija su 100 ng/ml LPS

sąlygoja glikolitinio ir maksimalaus glikolitinio aktyvumo padidėjimus bei mitochondrijų fragmentaciją [201]. Panašius rezultatus yra gavusi Hu ir kt. mokslininkų grupė. Jie, dirbdami su pirmine žiurkės mikroglijos ląstelių kultūra, parodė, kad 12 val. inkubacija su 100 ng/ml LPS suaktyvina mTOR signalinį kelią bei padidina glikolitinį ir maksimalų glikolitinį aktyvumus [198].

Nors mokslinių tyrimų, vertinančių mikroglijos bioenergetikos pokyčius, ląsteles paveikus 500 ng/ml LPS koncentracija, atlikta nėra, Sabogal-Guáqueta ir kt. parodė, kad užtenka 24 val. 250 ng/ml LPS poveikio pelės ir žmogaus mikroglijos ląstelėms, kad įvyktų metabolinis perprogramavimas iš oksidacinio į glikolitinį, stebint reikšmingai padidėjusius ląstelių glikolitinį ir maksimalų glikolitinius aktyvumus [227]. Tai iš dalies sutampa su mūsų rezultatais, gautais mikroglijas paveikus 500 ng/ml LPS. Be to, mes parodėme, kad 1 µg/ml LPS koncentracija stipriai padidina BV-2 ląstelių glikolitinį aktyvumą po 24 val. Tai taip pat sutampa su Liu ir kt. tyrimų rezultatais, kurie parodė, kad 1 µg/ml LPS po 24 val. lėmė BV-2 ląstelių glikolitinio aktyvumo padidėjimą ir smarkiai padidino užląstelinio laktato koncentraciją terpėje, lyginant su kontrole [218].

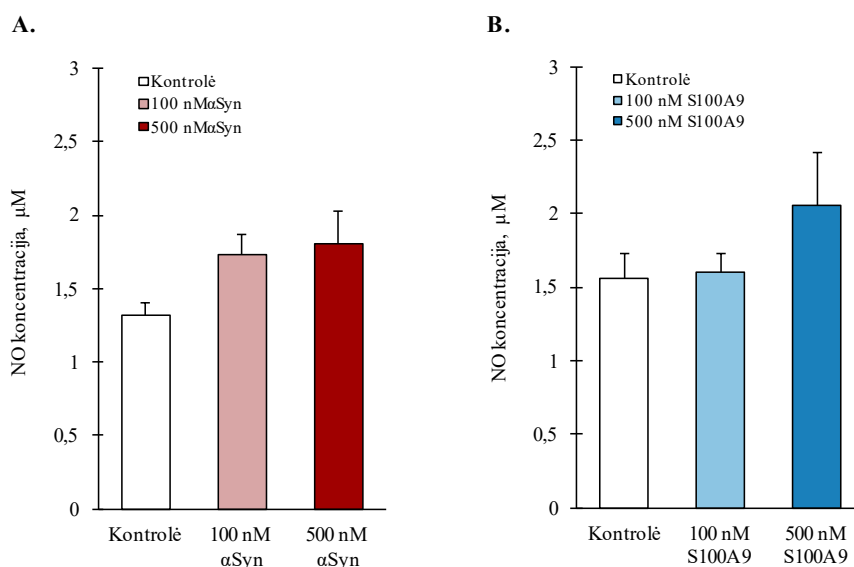
Nors mes tyrėme LPS poveikį BV-2 ląstelių bioenergetikai po 24 val. inkubacijos, tyrimai rodo, kad pirminis energetinio metabolizmo kelių poslinkis link suintensyvėjusios glikolizės įvyksta labai anksti – jau po pirmų 2 val. paveikus LPS, o po to ląstelių glikolitinis aktyvumas palaipsniui auga [219,232]. Voloboueva ir kt. yra parodę, kad toks metabolizmo perprogramavimas BV-2 mikroglijos ląstelėse yra reguliuojamas mitochondrijų baltymo Grp75/mortalino [233]. Tačiau įdomu yra tai, kad šis mikroglijos metabolinių kelių persitvarkymas net nėra susijęs su staiga padidėjusiu ATP poreikiu, reaguojant į prouždegiminiuosius stimulus, nes jis įvyksta daug anksčiau nei yra inhibuojama ATP gamyba mitochondrijose oksidacinio fosforilinimo metu [234]. Todėl galimai LPS sukiamas mikroglijos energetinių kelių persitvarkymas iš oksidacinio fosforilinimo į glikolizę yra labiausiai susijęs su imuniniam atsakui reikalingų prouždegiminių veiksnių sinteze.

3.6. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikio įtaka azoto monoksido susidarymui terpėje

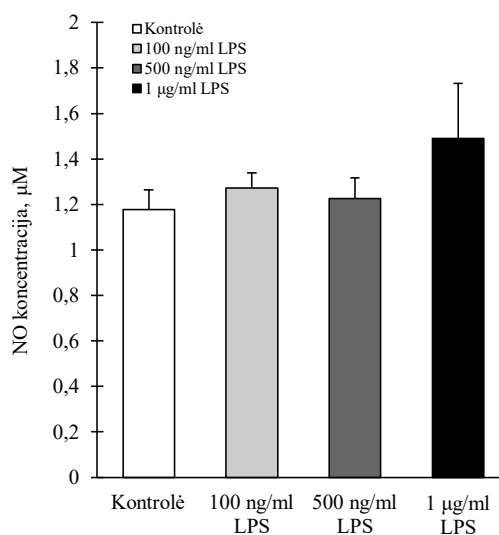
NO – tai svarbus neuromediatorius ir imuninės sistemos modulatorius, kurio metabolizmą CNS daugiausia kontroliuoja mikroglijos ląstelės [181]. Jos, reaguodamos į patologinius ir prouždegiminiuosius veiksnius, patiria sudėtingus fenotipų pokyčius, kurie yra lydimi įvairių genų raiškos pokyčių, įskaitant ir su prouždegiminių veiksnių sinteze susijusių genų raiškos padidėjimu. Užtai mikroglijos ląstelėse yra aktyvuojama indukuojamoji azoto oksido sintazė (iNOS) ir pradedama intensyviau sintetinti NO. Tačiau per didelė NO sekrecija gali dar labiau sustiprinti neuroūždegimą, oksidacinį stresą, sukelti neuronų žūtį ir audinių pažeidimus. Todėl pernelyg intensyvi NO sintezė yra siejama su neurodegeneracinėmis ligomis, tokiomis kaip AL ir PL [167,181,235]. Be to, dažnai pokyčiai mikroglijos mitochondrijų kvėpavimo metu yra siejami su NO ir kitų prouždegiminių citokinų sintezės ir sekrecijos reguliacijos pakitimais [236]. Atsižvelgiant į tai ir į mūsų anksčiau aptartus rezultatus, rodančius, jog kad tam tikros α Syn, S100A9 ir LPS koncentracijos neigiamai paveikia mikroglijos ląstelių bioenergetiką, tyrimus tęsėme, vertindami įvairių prouždegiminių veiksnių susidarymą BV-2 ląstelių auginimo terpėje. Pirmiausia atlikome kiekybinę mikroglijos NO sintezės analizę.

Tiriamomis medžiagomis nepaveiktose kontrolinėse grupėse užląstelinio NO koncentracija svyravo nuo 1,18 iki 1,56 µM ribose (3.6.1 pav. ir 3.6.2 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad 24 val. BV-2 mikroglijos ląstelių inkubacija su 100 nM ir 500 nM koncentracijų α Syn oligomerais statistiškai

reikšmingos įtakos NO susidarymui ir sekrecijai į užląstelinę terpę, lyginant su kontrole, neturėjo (3.6.1 pav. A). Poveikio NO susidarymui ir jo koncentracijos ląstelių auginimo terpėje padidėjimui ar sumažėjimui taip pat neturėjo 24 val. trukusi BV-2 mikroglijos ląstelių inkubacija su 100 nM ir 500 nM S100A9 (3.6.1 pav. B) bei 100 ng/ml, 500 ng/ml ir 1 µg/ml LPS (3.6.2 pav.). Taigi, mes nustatėme, kad nei amiloidiniai baltymai αSyn ir S100A9, nei bakterinis endotoksinas LPS nesukelia NO koncentracijos pokyčių BV-2 mikroglijos ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos.



3.6.1 pav. αSyn (A) ir S100A9 (B) poveikis NO susidarymui ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis (n = 3)



3.6.2 pav. LPS poveikis NO susidarymui ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis (n = 5)

Mokslinėje literatūroje yra įvairių duomenų apie amiloidinių baltymų poveikį NO sekrecijai. Zhang'as ir kt., taip pat kaip mes, yra parodę, kad αSyn nesukelia NO koncentracijos padidėjimo pirminėje žiurkės mikroglijos kultūroje po 24 val. Jie poveikio nepastebėjo net ir po 48 val. ar 72 val. trukusios inkubacijos [237]. Béraud'a ir kt. atskleidė, kad 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 50 nM αSyn lemia NO koncentracijos padidėjimą terpėje iki 70 µM, tačiau inkubacija su 50 nM dopamino paveiktu αSyn NO sekrecijos nesukėlė [238]. Tai rodo, kad skirtingos αSyn konformacinės formos

gali turėti skirtingą poveikį prouždegiminių veiksnių gamybai ir sekrecijai. Dar kita mokslininkų grupė, naudodama fluorimetrinį metodą NO kiekiui pirminės mikroglijos ląstelių terpėje įvertinti, nustatė, kad α Syn fibrilės padidina NO koncentraciją iki 30 pmol/ μ l [76]. Nors tyrimų, vertinančių S100A9 poveikį mikroglijos NO sekrecijai, nėra, parodyta, kad S100A9/S100A8 heterodimerai ir šių baltymų homodimerai gali padidinti šio makrofagų išskiriamo prouždegiminio veiksnio koncentraciją po 24 val. [239].

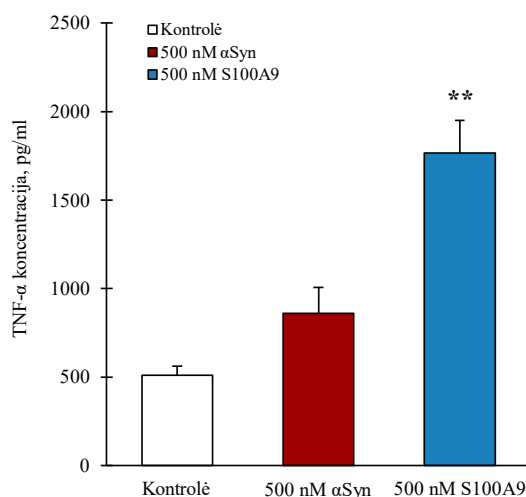
Vis dėlto, mokslinėje literatūroje yra duomenų, jog kartais su neurodegeneracinėmis ligomis siejami amiloidinių baltymų oligomerai ar peptidai nesukelia klasikinių uždegiminių veiksnių atsako [240,241]. Taip pat yra duomenų, rodančių, jog NO koncentracija reikšmingai padidėja tik po ilgesnės inkubacijos trukmės su amiloidiniais baltymais. Pavyzdžiui, Monsonogo ir kt. nustatė, kad 48 val. mikroglijos ląstelių inkubacija su A β nesukelia NO padidėjimo, tačiau praėjus 72 val. mikroglijos ląstelėse ryškiai padidėja iNOS raiška ir atitinkamai NO sekrecija [242]. Įdomu tai, kad Bussi'is ir kt. parodė, jog, vykstant BV-2 mikroglijos ląstelių autofagijai, sumažėja LPS ir α Syn sukeliamų prouždegiminių citokinų, įskaitant ir NO, išsiskyrimas į ląstelių auginimo terpę [243]. Be to, mikroglijų autofagijos procesas, kuris, beje, yra dažnai inicijuojamas mikroglijoms fagocituojant amiloidų agregatus [244], apsaugo nuo LPS ir α Syn sukeltos neuronų žūties [243].

Kalbant apie LPS poveikį mikroglijos ląstelių NO sekrecijai, Pereira'as ir kt. parodė, jog po 24 val. BV-2 ląstelių inkubacijos su 100 ng/ml LPS NO koncentracija ląstelių terpėje padidėja iki 20 μ M [226]. Taip pat yra duomenų, kad 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 1 μ g/ml LPS padidina NO koncentraciją dvigubai, lyginant su kontrole [245], o 48 val. inkubacija su 1 μ g/ml LPS sąlygoja NO koncentracijos padidėjimą terpėje net iki 120 μ M [246]. Tokie skirtumai ir nesutapimai su mūsų rezultatais, tiriant LPS poveikį, galėjo būti sąlygoti skirtingų eksperimentinių sąlygų.

3.7. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikio įtaka TNF- α koncentracijai terpėje

Toliau mes siekėme įvertinti, ar didžiausios tiriamų medžiagų koncentracijos gali sukelti prouždegiminio citokino TNF- α sekreciją. Mes nustatėme, jog kontrolinių BV-2 mikroglijos ląstelių grupių terpėje TNF- α koncentracija siekė $510 \pm 51,07$ pg/ml, o 500 nM α Syn nesukėlė statistiškai reikšmingo TNF- α kiekio padidėjimo ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos, lyginant su kontrole (3.7.1 pav.). Tačiau daug stipresnis poveikis buvo pastebėtas BV-2 mikroglijos ląsteles paveikus 500 nM S100A9, kur prouždegiminio citokino TNF- α koncentracija terpėje padidėjo daugiau nei trigubai – iki $1765 \pm 184,15$ pg/ml, lyginant su kontrole ($p \leq 0,01$) (3.7.1 pav.).

Tokius rezultatus patvirtina Bai ir kt. tyrimas, parodęs, jog 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su S100A9 skatina prouždegiminių veiksnių TNF- α ir IL-6 susidarymą, aktyvuojant TLR-4 ir TLR-7 receptorių signalinius kelius. Buvo nustatyta, kad TNF- α koncentracija ląstelių auginimo terpėje reikšmingai padidėja iki 2000 pg/ml, BV-2 ląsteles paveikus 0,0025 μ g/ml S100A9 baltymu. Šiame tyrime tirtos didesnės S100A9 koncentracijos taip pat sąlygojo reikšmingą TNF- α koncentracijos padidėjimą [93]. Be to, Ma ir kt. yra parodę, kad 0,01 μ M, 0,1 μ M ir 1 μ M koncentracijų S100A9/S100A8 heterodimerai, suaktyvindami ERK ir JNK NF- κ B signalinius kelius, po 12 val. inkubacijos su BV-2 mikroglijos ląstelėmis taip pat skatina prouždegiminio citokino TNF- α sintezę ir lemia jo koncentracijos ląstelių auginimo terpėje padidėjimą: 0,1 μ M S100A9/S100A8 padidino TNF- α koncentraciją iki ~ 1000 pg/ml, o 1 μ M S100A9/S100A8 – iki ~ 2000 pg/ml [106].

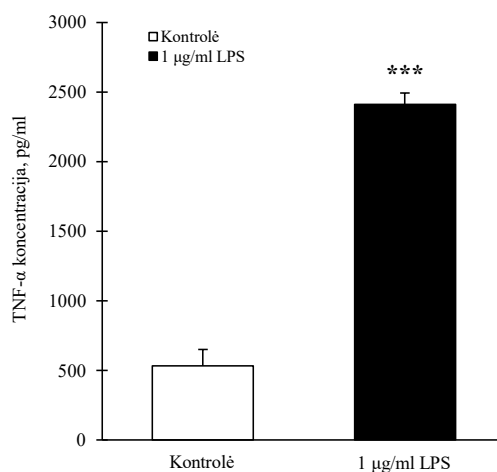


3.7.1 pav. αSyn ir S100A9 poveikis prouždegiminio citokino TNF-α susidarymui ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis

** – $p \leq 0,01$, lyginant su kontrole ($n = 3$)

Mes parodėme, kad 24 val. inkubacija su 500 nM αSyn oligomerais nekeičia BV-2 ląstelių TNF-α sekrecijos. Moksliniai tyrimai rodo, kad αSyn poveikis prouždegiminių citokinų sekrecijai gali stipriai priklausyti nuo šio baltymo agregacijos laipsnio ir konformacinių savybių. Yra duomenų, jog mažos molekulinės masės, kitaip nei didelės molekulinės masės, αSyn agregatai nesukelia TNF-α reikšmingos koncentracijos padidėjimo mikroglijos ląstelių auginimo terpėje [238]. Be to, ta pati mokslininkų grupė yra parodžius, jog 50 nM αSyn 24 val. inkubacija su BV-2 ląstelėmis lemia TNF-α koncentracijos padidėjimą iki ~900 pg/ml, tačiau struktūriškai besiskiriantis dopaminu paveiktas 50 nM αSyn tokio poveikio TNF-α sekrecijai nedaro [238]. Kitas tyrimas yra atskleidęs, kad 3 μM žmogaus rekombinantinio αSyn *de novo* suformuotos fibrilės ir 3 μM αSyn fibrilės, išskirtos iš PL sergančiųjų smegenų, sukelia skirtingą pirminės pelės mikroglijos ląstelių atsaką po 24 val. inkubacijos. Vėlgi, dėl skirtingų struktūrinių savybių *de novo* suformuotos αSyn fibrilės poveikio TNF-α koncentracijai nesukėlė, tačiau iš PL sergančiųjų smegenų išskirtos αSyn fibrilės sąlygojo net virš 10000 pg/ml TNF-α padidėjimą mikroglijos ląstelių auginimo terpėje [247].

Tiriant LPS poveikį mikroglijos TNF-α sekrecijai į užląstelinę terpę, mes gavome, kad po 24 val. BV-2 ląstelių inkubacijos su 1 μg/ml LPS TNF-α koncentracija padidėja net 4,51 kartus, lyginant su kontrole ($p \leq 0,001$) (3.7.2 pav.). Kontrolinėje BV-2 mikroglijos ląstelių grupėje nustatėme $534,44 \pm 115,28$ pg/ml, o 1 μg/ml LPS paveiktoje grupėje – $2412,22 \pm 79,36$ pg/ml TNF-α koncentracijas ląstelių auginimo terpėje. Taigi, LPS, taip pat kaip ir S100A9, suaktyvina BV-2 mikroglijos ląsteles, sukeldamas prouždegiminio citokino TNF-α sekreciją.



3.7.2 pav. LPS poveikis prouždegiminio citokino TNF- α susidarymui ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis

*** – $p \leq 0,001$, lyginant su kontrole ($n = 3$)

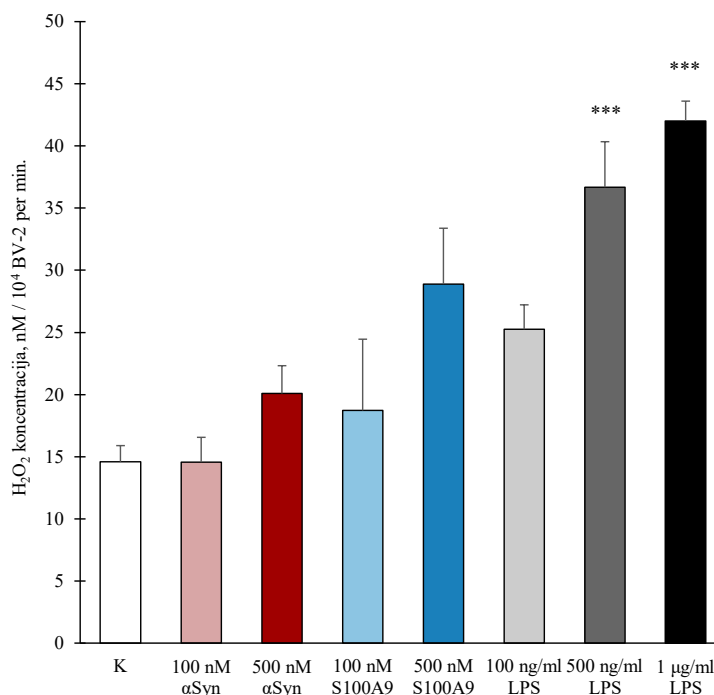
Tokius rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų atlikti tyrimai. Kaewmool’as ir kt. yra parodę, kad 48 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS sąlygoja ~ 1150 pg/ml TNF- α išskyrimą į ląstelių auginimo terpę [246]. Ma ir kt. yra nustatę, kad po 12 val. BV-2 ląstelių inkubacijos su 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS TNF- α koncentracija terpėje padidėja iki ~ 1250 pg/ml [106]. Tokį mikroglijos ląstelių atsaką patvirtina ne tik ELISA atlikti tyrimai TNF- α koncentracijai ląstelių auginimo terpėje nustatyti, bet ir transkriptomikos analizės. Sangineto’as ir kt. yra parodę, kad po 24 val. inkubacijos su 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS žmogaus mikroglijos ląstelėse HMC3 statistiškai reikšmingai padidėja TNF- α iRNR raiška [225]. Taip pat yra duomenų, jog mažesnės LPS koncentracijos, 200 ng/ml, 100 ng/ml ar net 10 ng/ml, taip pat yra pakankamos sukelti BV-2 ir pirminės pelės mikroglijos ląstelių prouždegiminį atsaką, lydimą reikšmingu TNF- α sekrecijos padidėjimu [219,221,247].

3.8. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikio įtaka aktyvių deguonies junginių susidarymui terpėje

Pagrindinių ADJ, superoksido (O_2^-) ir H_2O_2 , šaltinis mikroglijos ląstelėse yra mitochondrijos ir mikroglijos organelių membranose bei plazminėje membranoje esantis fermentas NADPH oksidazė. H_2O_2 gali laisvai difunduoti per ląstelių membranas, todėl fiziologinėmis sąlygomis atlieka signalinę ir reguliacines funkcijas. Tačiau neurodegeneracinių ligų vystymosi ir progresavimo metu mikroglijos ląstelėse įvykstantys metaboliniai pokyčiai, mitochondrijų pažaidos, ypač tam tikrų kvėpavimo grandinės kompleksų slopinimas bei įvykstantis ryškus atgalinės elektronų pernašos fenomeno pasireiškimas stipriai padidina H_2O_2 susidarymą [79,248–252]. Pertekliniai H_2O_2 kiekiai sukelia oksidacinį stresą, ląstelių makromolekulių pažaidas bei skatina amiloidinių baltymų agregaciją ir prouždegiminių citokinų genų raišką, taip dar labiau sustiprindami ir paskatindami vykstančius neuroūždegiminius ir neurodegeneracinius procesus [249,250].

Siekdami ištirti, kaip αSyn ir S100A9 oligomerai bei endotoksinas LPS paveikia mikroglijos ląstelių reguliuojamą ADJ sekreciją į užląstelinę terpę, mes fuorimetriniu metodu įvertinome užląstelinio H_2O_2 susidarymą. Nustatėme, jog 10^4 nepaveiktų, kontrolinės grupės BV-2 mikroglijos ląstelių į užląstelinę terpę sekretuoja $14,61 \pm 1,28$ nM H_2O_2 per minutę. Taip pat rezultatai parodė, kad 24 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 100 nM ir 500 nM koncentracijų αSyn ir S100A9 amiloidų agregatais bei

100 ng/ml LPS neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos užląstelinio H₂O₂ susidarymui ląstelių auginimo terpėje, lyginant su kontrole (3.8.1 pav.). Tačiau iš 3.8.1 pav. matyti, kad po 24 val. inkubacijos su 500 ng/ml ir 1 µg/ml LPS stipriai ir statistiškai patikimai padidėja H₂O₂ sekrecija net iki 36,66±3,66 nM H₂O₂ per minutę ir 42,01±1,60 nM H₂O₂ per minutę, atitinkamai, lyginant su kontrole (p ≤ 0,001).



3.8.1 pav. αSyn, S100A9 ir LPS poveikis užląstelinio H₂O₂ susidarymui ląstelių auginimo terpėje po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis

*** – p ≤ 0,001, lyginant su kontrole (n = 6)

Hu ir kt., naudodami tokį patį metodą kaip mes, nustatė, kad 24 val. 200 nM αSyn inkubacija su pirmine mikroglijos ląstelių kultūra reikšmingai padidina H₂O₂ sekreciją į užląstelinę terpę, lyginant su kontrole. Tačiau reikia pabrėžti tai, jog šie mokslininkai nenurodė, kokios agregatinės būsenos baltymą naudojo savo eksperimentuose [253]. Kita mokslininkų grupė nustatė, kad inkubuojant pelių mikroglijos ląsteles su 50 nM, 100 nM ir 500 nM koncentracijų agreguoto αSyn tirpalais, po 90 min. užląstelinio H₂O₂ koncentracija padidėja 41 %, 53 % ir 43 %, atitinkamai, lyginant su kontrole. Tačiau svarbu tai, jog šie mokslininkai, kitaip nei mes, mikroglijos ląsteles paveikė αSyn tirpalu, kurį sudarė αSyn oligomerų, protofibrilių ir fibrilių mišinys [254]. Taip pat yra atlikta nemažai tyrimų, vertinančių αSyn fibrilių poveikį viduląstelinio ADJ susidarymui. Bido’as ir kt., naudodami fluorescuojantį dažą dichlorfluoresceino diacetatą (DCF-DA) viduląstelinio H₂O₂ kiekiui įvertinti, nustatė, kad αSyn fibrilės padidina šio ADJ viduląstelinę koncentraciją 30 %, lyginant su kontrole [76]. Tai patvirtina ir Lu ir kt. tyrimas, parodęs, jog 24 val. pirminės mikroglijos inkubacija su 1 µg/ml αSyn fibrilėmis reikšmingai padidina viduląstelinio H₂O₂ susidarymą [81]. Be to, Yildirim-Balatan’as ir kt. atskleidė, jog paveikus pirmines pelių mikroglijos ląsteles 1,5 µM αSyn fibrilėmis, išskirtomis iš PL sergančiųjų smegenų, po 24 val. padidėja ne tik H₂O₂, bet ir O₂⁻ koncentracija [247]. Remiantis tokiais rezultatais, galima daryti prielaidą, kad mūsų eksperimentuose naudoti αSyn oligomerai nesukelia H₂O₂ reikšmingos sekrecijos dėl savo mažos molekulinės masės ir struktūrinių ypatumų.

Mūsų žiniomis, S100A9 agregatų poveikis mikroglijos ląstelių viduląstelinėms ir užląstelinėms ADJ susidarymui iki šiol nebuvo tirtas. Tačiau yra duomenų, jog per didelė S100A9 raiška vėžinėse ląstelėse sąlygoja viduląstelinėms ADJ koncentracijos padidėjimą [255].

Mes nustatėme, kad didesnės LPS koncentracijos stipriai padidina H₂O₂ susidarymą ir sekreciją į užląstelinę terpę po 24 val. inkubacijos su BV-2 ląstelėmis. Tokius rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai. Sahabuddin'as ir kt. parodė, kad užtenka vos 4 val. N9 mikroglijos ląstelių inkubacijos su 1 µg/ml LPS tokiam poveikiui sukelti [256], o Sangineto'as ir kt. nustatė, kad po 24 val. inkubacijos su 1 µg/ml LPS stebimas suintensyvėjęs H₂O₂ išsiskyrimas yra sąlygojamas HMC3 žmogaus mikroglijos ląstelių mitochondrijų I-ojo, II-ojo ir III-ojo kvėpavimo grandinės kompleksų veiklos [225]. Vis dėlto, daugiausia tyrimų atlikta, tiriant LPS poveikį viduląstelinėms ADJ susidarymui. Park'as ir kt., naudodami teknišką citometrą, nustatė, kad 12 val. BV-2 ląstelių inkubacija su 1 µg/ml LPS padvigubina mitochondrijų išskiriamų ADJ kiekį ir 3 kartus padidina bendrą mikroglijos viduląstelinėms ADJ koncentraciją, lyginant su kontrole [257]. Nors mes 100 ng/ml LPS reikšmingo poveikio užląstelinio H₂O₂ koncentracijai nustatėme, literatūroje yra duomenų, jog ši LPS koncentracija gali padidinti viduląstelinėms ADJ kiekius. Naudodami DCF-DA, Hu ir kt. parodė, kad 100 ng/ml LPS jau po 3 val. stipriai padidina viduląstelinio H₂O₂ koncentraciją pirminės žiurkės mikroglijos ląstelėse [198], o po 24 val. inkubacijos viduląstelinio H₂O₂ koncentracija BV-2 ląstelėse padidėja beveik dvigubai, lyginant su kontrole [245]. Įdomu tai, kad toks LPS sąlygotas pernelyg didelis viduląstelinėms ADJ susidarymas sumažinamas inhibavus mTOR [198]. Kiti mokslininkai, naudodami fluorescuojantį dažą MitoSOX, nustatė, kad 24 val. inkubacija su 100 ng/ml LPS sąlygoja mitochondrijų išskiriamo O₂⁻ koncentracijos padidėjimą pirminėse pelės mikroglijos ląstelėse [201]. Dar svarbu pasakyti, jog mikroglijos ląsteles paveikus LPS+INF-γ ir joms įgavus prouždegiminį fenotipą, perteklinis H₂O₂ ir O₂⁻ susidarymas pasireiškia dėl atsirandančios pataloginės atgalinės elektronų pernašos kvėpavimo grandinėje. Paprastai, elektronai juda nuo I-ojo kvėpavimo komplekso link IV-ojo. Tačiau, esant uždegimui, kai dėl kvėpavimo grandinės kompleksų pažeidimo ir veiklos pokyčių mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje susikaupia protonai arba matrikse susikaupia sukcinatas, elektronai pradeda judėti nuo II-ojo komplekso atgal link I-ojo, o tai sąlygoja intensyvią ADJ susidarymą. Naujausi *in vitro* tyrimai rodo, kad inhibavus atgalinę elektronų pernašą mikroglijos ląstelėse, sumažėja oksidacinis stresas, neurotoksiškumas ir amiloidinių baltymų kaupimo kiekis [248,258]. Be to, visai neseniai Rimal'is ir kt. pirmą kartą parodė, kad atgalinės elektronų pernašos fenomenas yra stipriai išreikštas transgeninių AL pelių ir AL sergančių pacientų smegenyse, o šio proceso intensyvumas stipriai koreliuoja su AL sunkumo stadija [258]. Taigi, pataloginių veiksmų sąlygotas perteklinis ADJ susidarymas mikroglijos ląstelėse bei šių junginių sekrecija į užląstelinę terpę, be abejonės, yra svarbūs neurowždegiminių ir neurodegeneracinių procesų vystymuisi ir progresavimui.

Rekomendacijos

- Patologinių veiksnių sukeltų mikroglijos metabolizmo pokyčių valdymas – perspektyvus terapinis taikynys. Tai galėtų padėti suvaldyti neurouždegiminius ir neurodegeneracinius procesus, tačiau reikalingi išsamesni tyrimai, kurie atskleistų tikslius toksiškų amiloidinių baltymų agregatų molekulinis mechanizmus nerviniame audinyje. Atlikto baigiamojo magistrinio projekto metu buvo nustatyta, kad 500 nM koncentracijos α Syn ir S100A9 oligomerai po 24 val. sąlygoja BV-2 mikroglijos ląstelių metabolinių kelių persitvarkymą iš mitochondrinio į glikolitinį, o S100A9 atveju lygiagrečiai skatinamas prouždegiminio citokino TNF- α susidarymas. Tačiau nėra aišku, ar toks persitvarkymas padeda užtikrinti pakankamą ATP kiekį mikroglijos ląstelėse normaliam mikroglijos funkciniam aktyvumui palaikyti. Būtų tikslinga nustatyti BV-2 ląstelių fagocitinį aktyvumą ir įvertinti mitochondrijų metabolitus, lemiančius metabolinių kelių persitvarkymą iš mitochondrinio į glikolitinį.
- Kadangi mes parodėme, jog α Syn ir S100A9 neigiamai paveikia mikroglijos mitochondrijų kvėpavimą įvairiose metabolinėse būsenose, būtų vertinga ištirti BV-2 mikroglijos mitochondrijų oksidacijos-redukcijos (redokso) pokyčius ir jų vaidmenį mikroglijos ląstelių aktyvumui bei fagocitozei.
- Gauti rezultatai parodė mikroglijos metabolizmo pokyčius, veikiant PL patogeneziniams veiksniams, α Syn ir S100A9, atskirai, tačiau PL sergančiųjų smegenyse dažnai randami šių amiloidinių baltymų koagregatai. Dėl to būtų tikslinga tęsti tyrimus, siekiant išsiaiškinti šių veiksnių sinergistinį poveikį BV-2 mikroglijos ląstelių energetiniam metabolizmui, gyvybingumui ir aktyvacijai, taip pat ištirti sinergistinį α Syn ir S100A9 poveikį mišriai neuronų-glijos ląstelių kultūrai.

Išvados

1. Užląsteliniai 100 nM ir 500 nM koncentracijų α -sinukleino ir S100A9 oligomerai bei 100 ng/ml, 500 ng/ml ir 1 μ g/ml koncentracijų bakterinis endotoksinas lipopolisacharidas neturi poveikio nepermeabilizuotų BV-2 mikroglijos ląstelių kvėpavimui po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis.
2. α -sinukleinas, S100A9 ir lipopolisacharidas skirtingai paveikia permeabilizuotų BV-2 ląstelių kvėpavimą įvairiose metabolinėse būsenose po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis:
 - 2.1. 100 nM ir 500 nM α -sinukleino sąlygoja kvėpavimo slopinimą III-oje metabolinėje būsenoje, oksiduojant I-ojo komplekso substratus piruvatą ir malatą, tačiau neturi poveikio laidumo būsenai ir bendram kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumui, atskyrus oksidaciją nuo fosforilinimo;
 - 2.2. 100 nM ir 500 nM S100A9 bei 500 ng/ml lipopolisacharido slopina kvėpavimą III-oje metabolinėje būsenoje, oksiduojant I-ojo ir II-ojo kompleksų substratus piruvatą ir malatą bei sukcinatą, ir bendrą kvėpavimo grandinės kompleksų efektyvumą, atskyrus oksidaciją nuo fosforilinimo, tačiau neturi poveikio laidumo būsenai;
 - 2.3. 100 ng/ml ir 1 μ g/ml lipopolisacharidas neturi poveikio permeabilizuotų BV-2 ląstelių mitochondriniam kvėpavimui.
3. α -sinukleino, S100A9 ir lipopolisacharido poveikis BV-2 ląstelių glikolitiniam aktyvumui po 24 val. inkubacijos su ląstelėmis priklauso nuo šių medžiagų koncentracijos:
 - 3.1. 500 nM α -sinukleinas padidina glikolitinį ir maksimalų glikolitinį ląstelių aktyvumus, o 100 nM α -sinukleinas neveikia mikroglijos ląstelių glikolitinio aktyvumo;
 - 3.2. 500 nM S100A9 padidina ląstelių glikolitinį aktyvumą, o 100 nM S100A9 neveikia mikroglijos ląstelių glikolitinio aktyvumo;
 - 3.3. 500 ng/ml ir 1 μ g/ml lipopolisacharido padidina ląstelių glikolitinį aktyvumą, o 100 ng/ml lipopolisacharido neveikia mikroglijos ląstelių glikolitinio aktyvumo.
4. α -sinukleinas, S100A9 ir lipopolisacharidas skirtingai paveikia skirtingų prouždegiminių veiksnių susidarymą BV-2 ląstelių auginimo terpėje po 24 val.:
 - 4.1. S100A9 ir lipopolisacharidas gerokai padidina TNF- α kiekį, o α -sinukleinas TNF- α susidarymui įtakos neturi;
 - 4.2. 500 ng/ml ir 1 μ g/ml lipopolisacharido gerokai padidina užląstelinio H₂O₂ koncentraciją, o α -sinukleinas, S100A9 ir 100 ng/ml lipopolisacharido užląstelinio H₂O₂ susidarymui įtakos neturi;
 - 4.3. α -sinukleinas, S100A9 ir lipopolisacharidas užląstelinio azoto monoksido susidarymui įtakos neturi.

Literatūros sąrašas

1. ZAIB, S., JAVED, H., KHAN, I., JABER, F., SOHAIL, A. ir kt. Neurodegenerative diseases: Their onset, epidemiology, causes and treatment. *ChemistrySelect*. Interaktyvus. 2023, vol. 8, no. 20. ISSN 2365-6549. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202300225>. [žiūrėta 2024-02-29].
2. HIJAZ, B.A. ir VOLPICELLI-DALEY, L.A. Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular neurodegeneration*. Interaktyvus. 2020, vol. 15, no. 1. ISSN 1750-1326. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>. [žiūrėta 2024-02-29].
3. DORSEY, E.R., SHERER, T., OKUN, M.S. ir BLOEM, B.R. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's disease*. Interaktyvus. 2018, vol. 8, no. s1. ISSN 1877-7171. Prieiga per: <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>. [žiūrėta 2024-02-29].
4. ADAM, H., GOPINATH, S.C.B., MD ARSHAD, M.K., ADAM, T., PARMIN, N.A. ir kt. An update on pathogenesis and clinical scenario for Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *3 biotech*. Interaktyvus. 2023, vol. 13, no. 5. ISSN 2190-572X. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-023-03553-8>. [žiūrėta 2024-02-29].
5. FORREST, S.L. ir KOVACS, G.G. Current concepts of mixed pathologies in neurodegenerative diseases. *The Canadian journal of neurological sciences*. Interaktyvus. 2023, vol. 50, no. 3. ISSN 0317-1671. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/cjn.2022.34>. [žiūrėta 2024-02-29].
6. SENGUPTA, U. ir KAYED, R. Amyloid β , Tau, and α -Synuclein aggregates in the pathogenesis, prognosis, and therapeutics for neurodegenerative diseases. *Progress in neurobiology*. Interaktyvus. 2022, vol. 214, no. 102270. ISSN 0301-0082. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102270>. [žiūrėta 2024-02-29].
7. CALABRESE, G., MOLZAHN, C. ir MAYOR, T. Protein interaction networks in neurodegenerative diseases: From physiological function to aggregation. *The journal of biological chemistry*. Interaktyvus. 2022, vol. 298, no. 7. ISSN 0021-9258. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102062>. [žiūrėta 2024-02-29].
8. WANG, C., KLECHIKOV, A.G., GHARIBYAN, A.L., WÄRMLÄNDER, S.K.T.S., JARVET, J. ir kt. The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta neuropathologica*. Interaktyvus. 2014, vol. 127, no. 4. ISSN 0001-6322. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1208-4>. [žiūrėta 2024-02-29].
9. HORVATH, I., IASHCHISHYN, I.A., MOSKALENKO, R.A., WANG, C., WÄRMLÄNDER, S.K.T.S. ir kt. Co-aggregation of pro-inflammatory S100A9 with α -synuclein in Parkinson's disease: ex vivo and in vitro studies. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2018, vol. 15, no. 1. ISSN 1742-2094. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1210-9>. [žiūrėta 2024-02-14].
10. JENSEN, P.H., SCHLOSSMACHER, M.G. ir STEFANIS, L. Who ever said it would be easy? Reflecting on two clinical trials targeting α -synuclein. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. Interaktyvus. 2023, vol. 38, no. 3. ISSN 0885-3185. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.29318>. [žiūrėta 2024-02-29].
11. XIAO, B. ir TAN, E.-K. Immunotherapy trials in Parkinson's disease: challenges. *Journal of translational medicine*. Interaktyvus. 2023, vol. 21, no. 1. ISSN 1479-5876. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-023-04012-x>. [žiūrėta 2024-02-29].
12. ASHER, S. ir PRIEFER, R. Alzheimer's disease failed clinical trials. *Life sciences*. Interaktyvus. 2022, vol. 306, no. 120861. ISSN 0024-3205. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120861>. [žiūrėta 2024-02-29].

13. SCHILDER, B.M., NAVARRO, E. ir RAJ, T. Multi-omic insights into Parkinson's Disease: From genetic associations to functional mechanisms. *Neurobiology of disease*. Interaktyvus. 2022, vol. 163, no. 105580. ISSN 0969-9961. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105580>. [žiūrėta 2024-02-29].
14. ISIK, S., YEMAN KIYAK, B., AKBAYIR, R., SEYHALI, R. ir ARPACI, T. Microglia mediated neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Cells*. Interaktyvus. 2023, vol. 12, no. 7. ISSN 2073-4409. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cells12071012>. [žiūrėta 2024-02-29].
15. YU, H., CHANG, Q., SUN, T., HE, X., WEN, L. ir kt. Metabolic reprogramming and polarization of microglia in Parkinson's disease: Role of inflammasome and iron. *Ageing research reviews*. Interaktyvus. 2023, vol. 90, no. 102032. ISSN 1568-1637. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102032>. [žiūrėta 2024-02-29].
16. LOPES, K.P., SNIJDERS, G.J.L., HUMPHREY, J., DE WITTE, L.D. ir RAJ, T. Atlas of genetic effects in human microglia transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. Interaktyvus. 2021, vol. 17, no. S3. ISSN 1552-5260. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/alz.050942>. [žiūrėta 2024-02-29].
17. NOTT, A. ir HOLTMAN, I.R. Genetic insights into immune mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in immunology*. Interaktyvus. 2023, vol. 14. ISSN 1664-3224. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1168539>. [žiūrėta 2024-02-29].
18. BROWN, G.C., CAMACHO, M. ir WILLIAMS-GRAY, C.H. The endotoxin hypothesis of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. Interaktyvus. 2023, vol. 38, no. 7. ISSN 0885-3185. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.29432>. [žiūrėta 2024-02-29].
19. ONYANGO, I., BENNETT, J. ir STOKIN, G. Regulation of neuronal bioenergetics as a therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*. Interaktyvus. 2021, vol. 16, no. 8. ISSN 1673-5374. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.303007>. [žiūrėta 2024-02-29].
20. EDISON, P., AHMED, I., FAN, Z., HINZ, R., GELOSA, G. ir kt. Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology*. Interaktyvus. 2013, vol. 38, no. 6. ISSN 0893-133X. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.255>. [žiūrėta 2024-02-29].
21. HUANG, Z.-P., LIU, S.-F., ZHUANG, J.-L., LI, L.-Y., LI, M.-M. ir kt. Role of microglial metabolic reprogramming in Parkinson's disease. *Biochemical pharmacology*. Interaktyvus. 2023, vol. 213, no. 115619. ISSN 0006-2952. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115619>. [žiūrėta 2024-02-24].
22. ZHANG, N., YAN, Z., XIN, H., SHAO, S., XUE, S. ir kt. Relationship among α -synuclein, aging and inflammation in Parkinson's disease (Review). *Experimental and therapeutic medicine*. Interaktyvus. 2023, vol. 27, no. 1. ISSN 1792-0981. Prieiga per: <https://doi.org/10.3892/etm.2023.12311>. [žiūrėta 2024-02-24].
23. BUNGEROTH, M., APPENZELLER, S., REGULIN, A., VÖLKER, W., LORENZEN, I. ir kt. Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms. *Neurobiology of aging*. Interaktyvus. 2014, vol. 35, no. 8. ISSN 0197-4580. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.009>. [žiūrėta 2024-02-24].

24. NEUPANE, S., DE CECCO, E. ir AGUZZI, A. The hidden cell-to-cell trail of α -synuclein aggregates. *Journal of molecular biology*. Interaktyvus. 2023, vol. 435, no. 12. ISSN 0022-2836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167930>. [žiūrėta 2024-02-24].
25. WANG, R., REN, H., KAZNACHEYEVA, E., LU, X. ir WANG, G. Association of glial activation and α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Neuroscience bulletin*. Interaktyvus. 2023, vol. 39, no. 3. ISSN 1673-7067. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00957-z>. [žiūrėta 2024-02-24].
26. CALABRESI, P., MECHELLI, A., NATALE, G., VOLPICELLI-DALEY, L., DI LAZZARO, G. ir kt. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell death & disease*. Interaktyvus. 2023, vol. 14, no. 3. ISSN 2041-4889. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05672-9>. [žiūrėta 2024-02-24].
27. MIAO, Y. ir MENG, H. The involvement of α -synucleinopathy in the disruption of microglial homeostasis contributes to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell communication and signaling*. Interaktyvus. 2024, vol. 22, no. 1. ISSN 1478-811X. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-023-01402-y>. [žiūrėta 2024-02-24].
28. FAN, T.-S., LIU, S.C.-H. ir WU, R.-M. Alpha-synuclein and cognitive decline in Parkinson disease. *Life*. Interaktyvus. 2021, vol. 11, no. 11. ISSN 2075-1729. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/life11111239>. [žiūrėta 2024-02-24].
29. SARAMOWICZ, K., SIWECKA, N., GALITA, G., KUCHARSKA-LUSINA, A., ROZPĘDEK-KAMIŃSKA, W. ir kt. Alpha-synuclein contribution to neuronal and glial damage in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2023, vol. 25, no. 1. ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms25010360>
30. BELL, R., THRUSH, R.J., CASTELLANA-CRUZ, M., OELLER, M., STAATS, R. ir kt. N-terminal acetylation of α -synuclein slows down its aggregation process and alters the morphology of the resulting aggregates. *Biochemistry*. Interaktyvus. 2022, vol. 61, no. 17. ISSN 0006-2960. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00104>. [žiūrėta 2024-02-24].
31. NORDENGEN, K. ir MORLAND, C. From synaptic physiology to synaptic pathology: The enigma of α -synuclein. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2024, vol. 25, no. 2. ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms25020986>. [žiūrėta 2024-02-24].
32. DU, X.-Y., XIE, X.-X. ir LIU, R.-T. The role of α -synuclein oligomers in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2020, vol. 21, no. 22. ISSN 1661-6596. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228645>. [žiūrėta 2024-02-24].
33. LILLIAN, A., ZUO, W., LAHAM, L., HILFIKER, S. ir YE, J.-H. Pathophysiology and neuroimmune interactions underlying Parkinson's disease and traumatic brain injury. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2023, vol. 24, no. 8. ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms24087186>. [žiūrėta 2024-02-14].
34. VASQUEZ, V., MITRA, J., WANG, H., HEGDE, P.M., RAO, K.S. ir kt. A multi-faceted genotoxic network of alpha-synuclein in the nucleus and mitochondria of dopaminergic neurons in Parkinson's disease: Emerging concepts and challenges. *Progress in neurobiology*. Interaktyvus. 2020, vol. 185, no. 101729. ISSN 0301-0082. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101729>. [žiūrėta 2024-02-14].
35. SERRATOS, I.N., HERNÁNDEZ-PÉREZ, E., CAMPOS, C., ASCHNER, M. ir SANTAMARÍA, A. An update on the critical role of α -synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies:

- From tissue to cellular and molecular levels. *Molecular neurobiology*. Interaktyvus. 2022, vol. 59, no. 1, ISSN 0893-7648. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-021-02596-3>. [žiūrėta 2024-02-24].
36. GAO, V., BRIANO, J.A., KOMER, L.E. ir BURRÉ, J. Functional and pathological effects of α -synuclein on synaptic SNARE complexes. *Journal of molecular biology*. Interaktyvus. 2023, vol. 435, no. 1. ISSN 0022-2836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167714>. [žiūrėta 2024-02-24].
37. BURRÉ, J. The synaptic function of α -synuclein. *Journal of Parkinson's disease*. Interaktyvus. 2015, vol. 5, no. 4. ISSN 1877-7171. Prieiga per: <https://doi.org/10.3233/JPD-150642>. [žiūrėta 2024-02-24].
38. RUNWAL, G. ir EDWARDS, R.H. The membrane interactions of synuclein: Physiology and pathology. *Annual review of pathology*. Interaktyvus. 2021, vol. 16, no. 1, ISSN 1553-4006. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-031920-092547>. [žiūrėta 2024-02-24].
39. BARBA, L., PAOLINI PAOLETTI, F., BELLOMO, G., GAETANI, L., HALBGEBAUER, S. ir kt. Alpha and beta synucleins: From pathophysiology to clinical application as biomarkers. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. Interaktyvus. 2022, vol. 37, no. 4, ISSN 0885-3185. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.28941>. [žiūrėta 2024-02-24].
40. TOBA, S., JIN, M., YAMADA, M., KUMAMOTO, K., MATSUMOTO, S. ir kt. Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport. *Scientific reports*. Interaktyvus. 2017, vol. 7, no. 1. ISSN 2045-2322. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15575-3>. [žiūrėta 2024-02-24].
41. CARTELLI, D., ALIVERTI, A., BARBIROLI, A., SANTAMBROGIO, C., RAGG, E.M. ir kt. α -Synuclein is a Novel Microtubule Dynamase. *Scientific reports*. Interaktyvus. 2016, vol. 6, no. 1. ISSN 2045-2322. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/srep33289>. [žiūrėta 2024-02-24].
42. MAZZETTI, S., CALOGERO, A.M., PEZZOLI, G. ir CAPPELLETTI, G. Cross-talk between α -synuclein and the microtubule cytoskeleton in neurodegeneration. *Experimental neurology*. Interaktyvus. 2023, vol. 359, no. 114251. ISSN 0014-4886. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114251>. [žiūrėta 2024-02-24].
43. RAMEZANI, M., WAGENKNECHT-WIESNER, A., WANG, T., HOLOWKA, D.A., ELIEZER, D. ir kt. Alpha synuclein modulates mitochondrial Ca^{2+} uptake from ER during cell stimulation and under stress conditions. *NPJ Parkinson's disease*. Interaktyvus. 2023, vol. 9, no. 1. ISSN 2373-8057. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00578-x>. [žiūrėta 2024-02-24].
44. FAUSTINI, G., MARCHESAN, E., ZONTA, L., BONO, F., BOTTANI, E. ir kt. Alpha-synuclein preserves mitochondrial fusion and function in neuronal cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Interaktyvus. 2019, vol. 2019. ISSN 1942-0900. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4246350>. [žiūrėta 2024-02-24].
45. LI, N., STEWART, T., SHENG, L., SHI, M., CILENTO, E.M. ir kt. Immunoregulation of microglial polarization: an unrecognized physiological function of α -synuclein. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2020, vol. 17, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-020-01940-z>. [žiūrėta 2024-02-24].
46. HALLACLI, E., KAYATEKIN, C., NAZEEN, S., WANG, X.H., SHEINKOPF, Z. ir kt. The Parkinson's disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability. *Cell*. Interaktyvus. 2022, vol. 185, no. 12. ISSN 0092-8674. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.008>. [žiūrėta 2024-02-24].

47. MANZANZA, N. de O., SEDLACKOVA, L. ir KALARIA, R.N. Alpha-synuclein post-translational modifications: Implications for pathogenesis of Lewy Body Disorders. *Frontiers in aging neuroscience*. Interaktyvus. 2021, vol. 13. ISSN 1663-4365. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.690293>. [žiūrėta 2024-02-24].
48. ZHOU, L., GUO, T., MENG, L., ZHANG, X., TIAN, Y. ir kt. N-homocysteinylolation of α -synuclein promotes its aggregation and neurotoxicity. *Aging cell*. Interaktyvus. 2023, vol. 22, no. 3, ISSN 1474-9718. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13745>. [žiūrėta 2024-02-24].
49. HONG, B., OHTAKE, Y., ITOKAZU, T. ir YAMASHITA, T. Glial senescence enhances α -synuclein pathology owing to its insufficient clearance caused by autophagy dysfunction. *Cell death discovery*. Interaktyvus. 2024, vol. 10, no. 1. ISSN 2058-7716. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01816-8>. [žiūrėta 2024-02-24].
50. MCKINNON, C., DE SNOO, M.L., GONDARD, E., NEUDORFER, C., CHAU, H. ir kt. Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by α -synuclein. *Acta neuropathologica communications*. Interaktyvus. 2020, vol. 8, no. 1, ISSN 2051-5960. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-020-0894-0>. [žiūrėta 2024-02-24].
51. POPOVA, B., GALKA, D., HÄFFNER, N., WANG, D., SCHMITT, K. ir kt. A-synuclein decreases the abundance of proteasome subunits and alters ubiquitin conjugates in yeast. *Cells*. Interaktyvus. 2021, vol. 10, no. 9. ISSN 2073-4409. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cells10092229>. [žiūrėta 2024-02-24].
52. PROTS, I., GROSCH, J., BRAZDIS, R.-M., SIMMNACHER, K., VEBER, V. ir kt. α -Synuclein oligomers induce early axonal dysfunction in human iPSC-based models of synucleinopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Interaktyvus. 2018, vol. 115, no. 30, ISSN 0027-8424. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1713129115>. [žiūrėta 2024-02-24].
53. HAWK, B.J.D., KHOUNLO, R. ir SHIN, Y.-K. Alpha-synuclein continues to enhance SNARE-dependent vesicle docking at exorbitant concentrations. *Frontiers in neuroscience*. Interaktyvus. 2019, vol. 13. ISSN 1662-4548. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00216>. [žiūrėta 2024-02-24].
54. DURANTE, V., DE IURE, A., LOFFREDO, V., VAIKATH, N., DE RISI, M. ir kt. Alpha-synuclein targets GluN2A NMDA receptor subunit causing striatal synaptic dysfunction and visuospatial memory alteration. *Brain*. Interaktyvus. 2019, vol. 142, no. 5. ISSN 0006-8950. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/brain/awz065>. [žiūrėta 2024-02-24].
55. DOS-SANTOS-PEREIRA, M., ACUÑA, L., HAMADAT, S., ROCCA, J., GONZÁLEZ-LIZÁRRAGA, F. ir kt. Microglial glutamate release evoked by α -synuclein aggregates is prevented by dopamine. *Glia*. Interaktyvus. 2018, vol. 66, no. 11. ISSN 0894-1491. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/glia.23472>. [žiūrėta 2024-02-24].
56. MAOR, G., DUBREUIL, R.R. ir FEANY, M.B. A-synuclein promotes neuronal dysfunction and death by disrupting the binding of ankyrin to β -spectrin. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Interaktyvus. 2023, vol. 43, no. 9, ISSN 0270-6474. Prieiga per: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-22.2022>. [žiūrėta 2024-02-24].
57. GUO, M., WANG, J., ZHAO, Y., FENG, Y., HAN, S. ir kt. Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain*. Interaktyvus. 2020, vol. 143, no. 5. ISSN 0006-8950. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/brain/awaa090>. [žiūrėta 2024-02-24].

58. ITO, N., TSUJI, M., ADACHI, N., NAKAMURA, S., SARKAR, A.K. ir kt. Extracellular high molecular weight α -synuclein oligomers induce cell death by disrupting the plasma membrane. *NPJ Parkinson's disease*. Interaktyvus. 2023, vol. 9, no. 1. ISSN 2373-8057. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00583-0>. [žiūrėta 2024-02-24].
59. DENING, Y., STRASSL, T., RUF, V., DIRSCHERL, P., CHOVSSEPIAN, A. ir kt. Toxicity of extracellular alpha-synuclein is independent of intracellular alpha-synuclein. *Scientific reports*. Interaktyvus. 2022, vol. 12, no. 1. ISSN 2045-2322. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25790-2>. [žiūrėta 2024-02-24].
60. ANGELOVA, P.R., CHOI, M.L., BEREZHNOV, A.V., HORROCKS, M.H., HUGHES, C.D. ir kt. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation. *Cell death and differentiation*. Interaktyvus. 2020, vol. 27, no. 10. ISSN 1350-9047. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0542-z>. [žiūrėta 2024-02-24].
61. FUSCO, G., CHEN, S.W., WILLIAMSON, P.T.F., CASCELLA, R., PERNI, M. ir kt. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*. Interaktyvus. 2017, vol. 358, no. 6369. ISSN 0036-8075. Prieiga per: <https://doi.org/10.1126/science.aan6160>. [žiūrėta 2024-02-24].
62. ANGELOVA, P.R., LUDTMANN, M.H.R., HORROCKS, M.H., NEGODA, A., CREMADES, N. ir kt. Ca^{2+} is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. *Development*. Interaktyvus. 2016, vol. 143, no. 10. ISSN 0950-1991. Prieiga per: <https://doi.org/10.1242/dev.139345>. [žiūrėta 2024-02-24].
63. DING, X.-S., GAO, L., HAN, Z., ELEUTERI, S., SHI, W. ir kt. Ferroptosis in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Ageing research reviews*. Interaktyvus. 2023, vol. 91, no. 102077. ISSN 1568-1637. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102077>. [žiūrėta 2024-02-24].
64. THORNE, N.J. ir TUMBARELLO, D.A. The relationship of alpha-synuclein to mitochondrial dynamics and quality control. *Frontiers in molecular neuroscience*. Interaktyvus. 2022, vol. 15. ISSN 1662-5099. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.947191>. [žiūrėta 2024-02-24].
65. DE MIRANDA, B.R., ROCHA, E.M., CASTRO, S.L. ir GREENAMYRE, J.T. Protection from α -Synuclein induced dopaminergic neurodegeneration by overexpression of the mitochondrial import receptor TOM20. *NPJ Parkinson's disease*. Interaktyvus. 2020, vol. 6, no. 1. ISSN 2373-8057. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41531-020-00139-6>. [žiūrėta 2024-02-24].
66. DI MAIO, R., BARRETT, P.J., HOFFMAN, E.K., BARRETT, C.W., ZHARIKOV, A. ir kt. α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*. Interaktyvus. 2016, vol. 8, no. 342. ISSN 1946-6234. Prieiga per: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>. [žiūrėta 2024-02-24].
67. ROSTOVTSEVA, T.K., GURNEV, P.A., PROTCHENKO, O., HOOGERHEIDE, D.P., YAP, T.L. ir kt. α -Synuclein shows high affinity interaction with voltage-dependent anion channel, suggesting mechanisms of mitochondrial regulation and toxicity in Parkinson disease. *The journal of biological chemistry*. Interaktyvus. 2015 vol. 290, no. 30, ISSN 0021-9258. Prieiga per: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641746>. [žiūrėta 2024-02-24].
68. CHOI, M.L., CHAPPARD, A., SINGH, B.P., MACLACHLAN, C., RODRIGUES, M. ir kt. Pathological structural conversion of α -synuclein at the mitochondria induces neuronal toxicity. *Nature neuroscience*. Interaktyvus. 2022, vol. 25, no. 9. ISSN 1097-6256. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01140-3>. [žiūrėta 2024-02-24].

69. BERNARDI, P., GERLE, C., HALESTRAP, A.P., JONAS, E.A., KARCH, J. ir kt. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell death and differentiation*. Interaktyvus. 2023, vol. 30, no. 8. ISSN 1350-9047. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>. [žiūrėta 2024-02-24].
70. BERNAL-CONDE, L.D., RAMOS-ACEVEDO, R., REYES-HERNÁNDEZ, M.A., BALBUENA-OLVERA, A.J., MORALES-MORENO, I.D. ir kt. Alpha-synuclein physiology and pathology: A perspective on cellular structures and organelles. *Frontiers in neuroscience*. Interaktyvus. 2020, vol. 13. ISSN 1662-4548. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01399>. [žiūrėta 2024-02-24].
71. DOMINGUES, R., SANT'ANNA, R., DA FONSECA, A.C.C., ROBBS, B.K., FOGUEL, D. ir kt. Extracellular alpha-synuclein: Sensors, receptors, and responses. *Neurobiology of disease*. Interaktyvus. 2022, vol. 168, no. 105696. ISSN 0969-9961. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105696>. [žiūrėta 2024-02-24].
72. CHALLIS, C., HORI, A., SAMPSON, T.R., YOO, B.B., CHALLIS, R.C. ir kt. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nature neuroscience*. Interaktyvus. 2020, vol. 23, no. 3. ISSN 1097-6256. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0589-7>. [žiūrėta 2024-02-24].
73. AROT CARENA, M.-L., DOVERO, S., PRIGENT, A., BOURDENX, M., CAMUS, S. ir kt. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain*. Interaktyvus. 2020, vol. 143, no. 5, ISSN 0006-8950. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awaa096>. [žiūrėta 2024-02-24].
74. DUTTA, D., JANA, M., MAJUMDER, M., MONDAL, S., ROY, A. ir kt. Selective targeting of the TLR2/MyD88/NF- κ B pathway reduces α -synuclein spreading in vitro and in vivo. *Nature communications*. Interaktyvus. 2021, vol. 12, no. 1. ISSN 2041-1723. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25767-1>. [žiūrėta 2024-02-24].
75. LA VITOLA, P., BALDUCCI, C., CEROVIC, M., SANTAMARIA, G., BRANDI, E. ir kt. Alpha-synuclein oligomers impair memory through glial cell activation and via Toll-like receptor 2. *Brain, behavior, and immunity*. Interaktyvus. 2018, vol. 69. ISSN 0889-1591. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.012>. [žiūrėta 2024-02-24].
76. BIDO, S., MUGGEO, S., MASSIMINO, L., MARZI, M.J., GIANNELLI, S.G. ir kt. Microglia-specific overexpression of α -synuclein leads to severe dopaminergic neurodegeneration by phagocytic exhaustion and oxidative toxicity. *Nature communications*. Interaktyvus. 2021, vol. 12, no. 1. ISSN 2041-1723. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26519-x>. [žiūrėta 2024-02-24].
77. HINKLE, J.T., PATEL, J., PANICKER, N., KARUPPAGOUNDER, S.S., BISWAS, D. ir kt. STING mediates neurodegeneration and neuroinflammation in nigrostriatal α -synucleinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Interaktyvus. 2022, vol. 119, no. 15, ISSN 0027-8424. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2118819119>. [žiūrėta 2024-02-24].
78. WANG, Q., ZHENG, J., PETERSSON, S., REYNOLDS, R. ir TAN, E.-K. The link between neuroinflammation and the neurovascular unit in synucleinopathies. *Science advances*. Interaktyvus. 2023, vol. 9, no. 7, ISSN 2375-2548. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abq1141>. [žiūrėta 2024-02-24].
79. MIAO, J., CHEN, L., PAN, X., LI, L., ZHAO, B. ir kt. Microglial metabolic reprogramming: Emerging insights and therapeutic strategies in neurodegenerative diseases. *Cellular and molecular*

- neurobiology*. Interaktyvus. 2023, vol. 43, no. 7, ISSN 0272-4340. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-023-01376-y>. [žiūrėta 2024-02-03].
80. QIAO, H., HE, X., ZHANG, Q., YUAN, H., WANG, D. ir kt. Alpha-synuclein induces microglial migration via PKM2-dependent glycolysis. *International journal of biological macromolecules*. Interaktyvus. 2019, vol. 129, ISSN 0141-8130. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.029>. [žiūrėta 2024-02-03].
81. LU, J., WANG, C., CHENG, X., WANG, R., YAN, X. ir kt. A breakdown in microglial metabolic reprogramming causes internalization dysfunction of α -synuclein in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2022, vol. 19, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-022-02484-0>. [žiūrėta 2024-02-03].
82. JUKIC, A., BAKIRI, L., WAGNER, E.F., TILG, H. ir ADOLPH, T.E. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut*. Interaktyvus. 2021, vol. 70, no. 10, ISSN 0017-5749. Prieiga per: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324855>. [žiūrėta 2024-02-14].
83. ZHANG, X., SUN, D., ZHOU, X., ZHANG, C., YIN, Q. ir kt. Proinflammatory S100A9 stimulates TLR4/NF- κ B signaling pathways causing enhanced phagocytic capacity of microglial cells. *Immunology letters*. Interaktyvus. 2023, vol. 255, ISSN 0165-2478. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.02.008>. [žiūrėta 2024-02-14].
84. XIA, P., JI, X., YAN, L., LIAN, S., CHEN, Z. ir kt. Roles of S100A8, S100A9 and S100A12 in infection, inflammation and immunity. *Immunology*. Interaktyvus. 2024, vol. 171, no. 3, ISSN 0019-2805. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/imm.13722>. [žiūrėta 2024-02-14].
85. VOGL, T., GHARIBYAN, A.L. ir MOROZOVA-ROCHE, L.A. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: Self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2012, vol. 13, no. 3, ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms13032893>. [žiūrėta 2024-02-14].
86. TOLEIKIS, Z., BOBROVS, R., JANONIENE, A., LENDS, A., ZIAUNYS, M. ir kt. Interactions between S100A9 and alpha-synuclein: Insight from NMR spectroscopy. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2022, vol. 23, no. 12, ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms23126781>. [žiūrėta 2024-02-14].
87. SHABANI, F., MAHDAVI, M., IMANI, M., HOSSEINPOUR-FEIZI, M.A. ir GHEIBI, N. Calprotectin (S100A8/S100A9)-induced cytotoxicity and apoptosis in human gastric cancer AGS cells: Alteration in expression levels of Bax, Bcl-2, and ERK2. *Human & experimental toxicology*. Interaktyvus. 2020, vol. 39, no. 8, ISSN 0960-3271. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1177/0960327120909530>. [žiūrėta 2024-02-14].
88. SANDERS, E., CSONDOR, R., ŠULSKIS, D., BARONAITĖ, I., SMIRNOVAS, V. ir kt. The stabilization of S100A9 structure by calcium inhibits the formation of amyloid fibrils. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2023, vol. 24, no. 17, ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms241713200>. [žiūrėta 2024-02-14].
89. TAMULYTĖ, R., JANKAITYTĖ, E., TOLEIKIS, Z., SMIRNOVAS, V. ir JANKUNEC, M., 2023. Pro-inflammatory protein S100A9 alters membrane organization by dispersing ordered domains. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*. Interaktyvus. 2023, vol. 1865, no. 3, ISSN 0005-2736. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184113>. [žiūrėta 2024-02-14].
90. GONZALEZ, L.L., GARRIE, K. ir TURNER, M.D. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. Interaktyvus. 2020, vol. 1867, no. 6, [consulta: 9 May 2024]. ISSN 0167-4889. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118677>

91. AL-KURAI SHY, H.M., AL-GAREEB, A.I., ZAIDALKIANI, A.T., ALEXIOU, A., PAPADAKIS, M. ir kt. Calprotectin in Parkinsonian disease: Anticipation and dedication. *Ageing research reviews*. Interaktyvus. 2024, vol. 93, no. 102143. ISSN 1568-1637. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102143>. [žiūrėta 2024-02-14].
92. SINGH, P. ir ALI, S.A. Multifunctional role of S100 protein family in the immune system: An update. *Cells*. Interaktyvus. 2022, vol. 11, no. 15. ISSN 2073-4409. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cells11152274>. [žiūrėta 2024-02-14].
93. BAI, Q., SUN, D., ZENG, Y., ZHU, J., ZHANG, C. ir kt. Effect of proinflammatory S100A9 protein on migration and proliferation of microglial cells. *Journal of molecular neuroscience*. Interaktyvus. 2023, vol. 73, no. 11–12, ISSN 0895-8696. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-023-02168-1>. [žiūrėta 2024-02-14].
94. CERÓN, J.J., ORTÍN-BUSTILLO, A., LÓPEZ-MARTÍNEZ, M.J., MARTÍNEZ-SUBIELA, S., ECKERSALL, P.D. ir kt. S-100 proteins: Basics and applications as biomarkers in animals with special focus on calgranulins (S100A8, A9, and A12). *Biology*. Interaktyvus. 2023, vol. 12, no. 6. ISSN 2079-7737. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/biology12060881>. [žiūrėta 2024-02-14].
95. WANG, Siwen, SONG, R., WANG, Z., JING, Z., WANG, Shaoxiong ir kt. S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in immunology*. Interaktyvus. 2018, vol. 9. ISSN 1664-3224. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>. [žiūrėta 2024-02-14].
96. KAZAKOV, A.S., SOKOLOV, A.S., PERMYAKOVA, M.E., LITUS, E.A., UVERSKY, V.N. ir kt. Specific cytokines of interleukin-6 family interact with S100 proteins. *Cell calcium*. Interaktyvus. 2022, vol. 101, no. 102520. ISSN 0143-4160. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102520>. [žiūrėta 2024-02-14].
97. SUN, L., ZHAO, Z., GUO, J., QIN, Y., YU, Q. ir kt. Mitochondrial transplantation confers protection against the effects of ischemic stroke by repressing microglial pyroptosis and promoting neurogenesis. *Neural regeneration research*. Interaktyvus. 2024, vol. 19, no. 6. ISSN 1673-5374. Prieiga per: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.385313>. [žiūrėta 2024-02-14].
98. TIAN, Y., CAO, R., CHE, B., SUN, D., TANG, Y. ir kt. Proinflammatory S100A9 regulates differentiation and aggregation of neural stem cells. *ACS chemical neuroscience*. Interaktyvus. 2020, vol. 11, no. 21. ISSN 1948-7193. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00365>. [žiūrėta 2024-02-14].
99. SWINDELL, W.R., JOHNSTON, A., XING, X., LITTLE, A., ROBICHAUD, P. ir kt. Robust shifts in S100a9 expression with aging: A novel mechanism for chronic inflammation. *Scientific reports*. Interaktyvus. 2013, vol. 3, no. 1. ISSN 2045-2322. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/srep01215>. [žiūrėta 2024-02-14].
100. KUMMER, M.P., VOGL, T., AXT, D., GRIEP, A., VIEIRA-SAECKER, A. ir kt. Mrp14 deficiency ameliorates amyloid β burden by increasing microglial phagocytosis and modulation of amyloid precursor protein processing. *The Journal of neuroscience*. Interaktyvus. 2012, vol. 32, no. 49, ISSN 0270-6474. Prieiga per: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-12.2012>. [žiūrėta 2024-02-14].
101. ZHANG, C., LIU, Y., GILTHORPE, J. ir VAN DER MAAREL, J.R.C. MRP14 (S100A9) protein interacts with Alzheimer beta-amyloid peptide and induces its fibrillization. *PloS one*. Interaktyvus. 2012, vol. 7, no. 3. ISSN 1932-6203. Prieiga per: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032953>. [žiūrėta 2024-02-14].

102. TOLEIKIS, Z., ZIAUNYS, M., BARANAUSKIENE, L., PETRAUSKAS, V., JAUDZEMS, K. ir kt. S100A9 alters the pathway of alpha-synuclein amyloid aggregation. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2021, vol. 22, no. 15. ISSN 1661-6596. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157972>. [žiūrėta 2024-02-14].
103. HA, T.-Y., CHANG, K.-A., KIM, J. a., KIM, H.-S., KIM, S. ir kt. S100a9 knockdown decreases the memory impairment and the neuropathology in Tg2576 mice, AD animal model. *PloS one*. Interaktyvus. 2010, vol. 5, no. 1, ISSN 1932-6203. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008840>. [žiūrėta 2024-02-14].
104. KIM, H.J., CHANG, K.-A., HA, T.-Y., KIM, J., HA, S. ir kt. S100A9 knockout decreases the memory impairment and neuropathology in crossbreed mice of Tg2576 and S100A9 knockout mice model. *PloS one*. Interaktyvus. 2014, vol. 9, no. 2, ISSN 1932-6203. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088924>. [žiūrėta 2024-02-14].
105. CHANG, K.-A., KIM, H.J. ir SUH, Y.-H. The role of S100a9 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: The therapeutic effects of S100a9 knockdown or knockout. *Neurodegenerative diseases*. Interaktyvus. 2012, vol. 10, no. 1–4, ISSN 1660-2854. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1159/000333781>. [žiūrėta 2024-02-14].
106. MA, L., SUN, P., ZHANG, J.-C., ZHANG, Q. ir YAO, S.-L. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *International journal of molecular medicine*. Interaktyvus. 2017, vol. 40, no. 1. ISSN 1107-3756. DOI Prieiga per: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2987>. [žiūrėta 2024-02-14].
107. WU, M., XU, L., WANG, Y., ZHOU, N., ZHEN, F. ir kt. S100A8/A9 induces microglia activation and promotes the apoptosis of oligodendrocyte precursor cells by activating the NF-κB signaling pathway. *Brain research bulletin*. Interaktyvus. 2018, vol. 143. ISSN 0361-9230. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.014>. [žiūrėta 2024-02-14].
108. SIMARD, J.-C., CESARO, A., CHAPETON-MONTES, J., TARDIF, M., ANTOINE, F. ir kt. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-κB1. *PloS one*. Interaktyvus. 2013, vol. 8, no. 8, ISSN 1932-6203. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072138>. [žiūrėta 2024-02-14].
109. WANG, G., HUANG, K., TIAN, Q., GUO, Y., LIU, C. ir kt. S100A9 aggravates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via inducing neuroinflammation and inflammasome activation. *iScience*. Interaktyvus. 2024, vol. 27, no. 3. ISSN 2589-0042. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2024.109165>. [žiūrėta 2024-02-14].
110. IASHCHISHYN, I.A., GRUDEN, M.A., MOSKALENKO, R.A., DAVYDOVA, T.V., WANG, C. ir kt. Intranasally administered S100A9 amyloids induced cellular stress, amyloid seeding, and behavioral impairment in aged mice. *ACS chemical neuroscience*. Interaktyvus. 2018, vol. 9, no. 6, ISSN 1948-7193. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00512>. [žiūrėta 2024-02-14].
111. RUSSO, T., KOLISNYK, B., B. S., A., PLESSIS-BELAIR, J., KIM, T.W. ir kt. The SATB1-MIR22-GBA axis mediates glucocerebroside accumulation inducing a cellular senescence-like phenotype in dopaminergic neurons. *Aging cell*. Interaktyvus. 2024, vol. 23, no. 4. ISSN 1474-9718. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/accel.14077>. [žiūrėta 2024-02-14].
112. GRUDEN, M.A., DAVYDOVA, T.V., WANG, C., NARKEVICH, V.B., FOMINA, V.G. ir kt. The misfolded pro-inflammatory protein S100A9 disrupts memory via neurochemical remodelling instigating an Alzheimer's disease-like cognitive deficit. *Behavioural brain research*. Interaktyvus.

- 2016, vol. 306. ISSN 0166-4328. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.016>. [žiūrėta 2024-02-14].
113. GRUDEN, M.A., DAVYDOVA, T.V., KUDRIN, V.S., WANG, C., NARKEVICH, V.B. ir kt. S100A9 protein aggregates boost hippocampal glutamate modifying monoaminergic neurochemistry: A glutamate antibody sensitive outcome on Alzheimer-like memory decline. *ACS chemical neuroscience*. Interaktyvus. 2018, vol. 9, no. 3. ISSN 1948-7193. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00379>. [žiūrėta 2024-02-14].
114. PALACIOS, N., WILKINSON, J., BJORNEVIK, K., SCHWARZSCHILD, M.A., MCIVER, L. ir kt. Metagenomics of the gut microbiome in Parkinson's disease: Prodromal changes. *Annals of neurology*. Interaktyvus. 2023, vol. 94, no. 3, ISSN 0364-5134. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.26719>. [žiūrėta 2024-03-03].
115. KALYAN, M., TOUSIF, A.H., SONALI, S., VICHITRA, C., SUNANDA, T. ir kt. Role of endogenous lipopolysaccharides in neurological disorders. *Cells*. Interaktyvus. 2022, vol. 11, no. 24. ISSN 2073-4409. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cells11244038>. [žiūrėta 2024-03-03].
116. BHATTACHARYYA, D. ir BHUNIA, A. Gut-Brain axis in Parkinson's disease etiology: The role of lipopolysaccharide. *Chemistry and physics of lipids*. Interaktyvus. 2021, vol. 235, no. 105029. ISSN 0009-3084. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105029>. [žiūrėta 2024-03-03].
117. SUI, Y.-T., BULLOCK, K.M., ERICKSON, M.A., ZHANG, J. ir BANKS, W.A. Alpha synuclein is transported into and out of the brain by the blood–brain barrier. *Peptides*. Interaktyvus. 2014, vol. 62. ISSN 0196-9781. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.018>. [žiūrėta 2024-03-03].
118. VUTUKURI, R., BRUNKHORST, R., KESTNER, R.-I., HANSEN, L., BOUZAS, N.F. ir kt. Alteration of sphingolipid metabolism as a putative mechanism underlying LPS-induced BBB disruption. *Journal of neurochemistry*. Interaktyvus. 2018, vol. 144, no. 2, ISSN 0022-3042. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14236>. [žiūrėta 2024-03-03].
119. HOUSER, M.C. ir TANSEY, M.G. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinson's disease*. Interaktyvus. 2017, vol. 3, no. 1. ISSN 2373-8057. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41531-016-0002-0>. [žiūrėta 2024-03-03].
120. MILDE, S., VAN TARTWIJK, F.W., VILALTA, A., HORNIK, T.C., DUNDEE, J.M. ir kt. Inflammatory neuronal loss in the substantia nigra induced by systemic lipopolysaccharide is prevented by knockout of the P2Y6 receptor in mice. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2021, vol. 18, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-021-02280-2>. [žiūrėta 2024-03-03].
121. LIU, Y., QIN, L., WILSON, B., WU, X., QIAN, L. ir kt. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits. *Neurotoxicology*. Interaktyvus. 2008, vol. 29, no. 5. ISSN 0161-813X. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.02.014>. [žiūrėta 2024-03-03].
122. BROWN, G.C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2019, vol. 16, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7>. [žiūrėta 2024-03-03].
123. HE, Q., ZHANG, S., WANG, J., MA, T., MA, D. ir kt. The synergistic effect study of lipopolysaccharide (LPS) and A53T- α -synuclein: Intranasal LPS exposure on the A53T- α -synuclein

- transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Molecular neurobiology*. Interaktyvus. 2024, ISSN 0893-7648. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-024-04020-y>. [žiūrėta 2024-03-03].
124. GAO, H.-M., ZHANG, F., ZHOU, H., KAM, W., WILSON, B. ir kt. Neuroinflammation and α -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*. Interaktyvus. 2011, vol. 119, no. 6, ISSN 0091-6765. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003013>. [žiūrėta 2024-03-03].
125. NEHER, J.J., NENISKYTE, U., ZHAO, J.-W., BAL-PRICE, A., TOLKOVSKY, A.M. ir kt. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *The journal of immunology*. Interaktyvus. 2011, vol. 186, no. 8, ISSN 0022-1767. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003600>. [žiūrėta 2024-03-03].
126. BODEA, L.-G., WANG, Y., LINNARTZ-GERLACH, B., KOPATZ, J., SINKKONEN, L. ir kt. Neurodegeneration by activation of the microglial complement-phagosome pathway. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Interaktyvus. 2014, vol. 34, no. 25, ISSN 0270-6474. Prieiga per: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5002-13.2014>. [žiūrėta 2024-03-03].
127. SHI, J., ZHAO, Y., WANG, Y., GAO, W., DING, J. ir kt. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. Interaktyvus. 2014, vol. 514, no. 7521. ISSN 0028-0836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nature13683>. [žiūrėta 2024-03-03].
128. FRICKER, M., NEHER, J.J., ZHAO, J.-W., THÉRY, C., TOLKOVSKY, A.M. ir kt. MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Interaktyvus. 2012, vol. 32, no. 8, ISSN 0270-6474. Prieiga per: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4837-11.2012>. [žiūrėta 2024-03-03].
129. BALAK, C.D., HAN, C.Z. ir GLASS, C.K. Deciphering microglia phenotypes in health and disease. *Current opinion in genetics & development*. Interaktyvus. 2024, vol. 84, no. 102146. ISSN 0959-437X. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2023.102146>. [žiūrėta 2024-03-03].
130. HICKMAN, S., IZZY, S., SEN, P., MORSETT, L. ir EL KHOURY, J. Microglia in neurodegeneration. *Nature neuroscience*. Interaktyvus. 2018, vol. 21, no. 10. ISSN 1097-6256. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>. [žiūrėta 2024-01-25].
131. GAO, C., JIANG, J., TAN, Y. ir CHEN, S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*. Interaktyvus. 2023, vol. 8, no. 1. ISSN 2095-9907. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01588-0>. [žiūrėta 2024-01-25].
132. VIDAL-ITRIAGO, A., RADFORD, R.A.W., ARAMIDEH, J.A., MAUREL, C., SCHERER, N.M. ir kt. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in immunology*. Interaktyvus. 2022, vol. 13. ISSN 1664-3224. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>. [žiūrėta 2024-01-25].
133. PAOLICELLI, R.C., SIERRA, A., STEVENS, B., TREMBLAY, M.-E., AGUZZI, A. ir kt. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*. Interaktyvus. 2022, vol. 110, no. 21, ISSN 0896-6273. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>. [žiūrėta 2024-01-25].
134. REDDAWAY, J., RICHARDSON, P.E., BEVAN, R.J., STONEMAN, J. ir PALOMBO, M. Microglial morphometric analysis: so many options, so little consistency. *Frontiers in*

- neuroinformatics*. Interaktyvus. 2023, vol. 17. ISSN 1662-5196. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fninf.2023.1211188>. [žiūrėta 2024-01-25].
135. SIERRA, A., PAOLICELLI, R.C. ir KETTENMANN, H. Cien años de microglía: Milestones in a century of microglial research. *Trends in neurosciences*. Interaktyvus. 2019, vol. 42, no. 11, ISSN 0166-2236. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.004>. [žiūrėta 2024-01-25].
136. MADRY, C., KYRARGYRI, V., ARANCIBIA-CÁRCAMO, I.L., JOLIVET, R., KOHSAKA, S. ir kt. Microglial ramification, surveillance, and interleukin-1 β release are regulated by the two-pore domain K⁺ channel THIK-1. *Neuron*. Interaktyvus. 2018, vol. 97, no. 2, ISSN 0896-6273. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.002>. [žiūrėta 2024-02-03].
137. LOU, N., TAKANO, T., PEI, Y., XAVIER, A.L., GOLDMAN, S.A. ir kt. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood–brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Interaktyvus. 2016, vol. 113, no. 4, ISSN 0027-8424. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1520398113>. [žiūrėta 2024-01-25].
138. MUZIO, L., VIOTTI, A. ir MARTINO, G. Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: From understanding to therapy. *Frontiers in neuroscience*. Interaktyvus. 2021, vol. 15. ISSN 1662-4548. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.742065>. [žiūrėta 2024-01-25].
139. HU, X., LIOU, A.K.F., LEAK, R.K., XU, M., AN, C. ir kt. Neurobiology of microglial action in CNS injuries: Receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles. *Progress in neurobiology*. Interaktyvus. 2014, vol. 119–120. ISSN 0301-0082. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.06.002>. [žiūrėta 2024-01-25].
140. FOURGEAUD, L., TRAVÉS, P.G., TUFAIL, Y., LEAL-BAILEY, H., LEW, E.D. ir kt. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature*. Interaktyvus. 2016, vol. 532, no. 7598. ISSN 0028-0836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nature17630>. [žiūrėta 2024-01-25].
141. XUE, T., JI, J., SUN, Y., HUANG, X., CAI, Z. ir kt. Sphingosine-1-phosphate, a novel TREM2 ligand, promotes microglial phagocytosis to protect against ischemic brain injury. *Acta pharmaceutica Sinica. B*. Interaktyvus. 2022, vol. 12, no. 4. ISSN 2211-3835. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.10.012>. [žiūrėta 2024-01-25].
142. LONG, H., ZHONG, G., WANG, C., ZHANG, J., ZHANG, Y. ir kt. TREM2 attenuates A β 1-42-mediated neuroinflammation in BV-2 cells by downregulating TLR signaling. *Neurochemical research*. Interaktyvus. 2019, vol. 44, no. 8, ISSN 0364-3190. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-019-02817-1>. [žiūrėta 2024-01-25].
143. ZHANG, X., CHEN, X., ZHANG, L., SUN, Y., LIANG, Y. ir kt. Role of trigger receptor 2 expressed on myeloid cells in neuroinflammation—neglected multidimensional regulation of microglia. *Neurochemistry international*. Interaktyvus. 2023, vol. 171, no. 105639. ISSN 0197-0186. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105639>. [žiūrėta 2024-01-25].
144. CHOI, I., ZHANG, Y., SEEGOBIN, S.P., PRUVOST, M., WANG, Q. ir kt. Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nature communications*. Interaktyvus. 2020, vol. 11, no. 1. ISSN 2041-1723. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15119-w>. [žiūrėta 2024-01-25].
145. HU, Y. ir TAO, W. Current perspectives on microglia-neuron communication in the central nervous system: Direct and indirect modes of interaction. *Journal of advanced research*. Interaktyvus. 2024, ISSN 2090-1232. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2024.01.006>. [žiūrėta 2024-01-25].

146. PAWELEC, P., ZIEMKA-NALECZ, M., SYPECKA, J. ir ZALEWSKA, T. The impact of the CX3CL1/CX3CR1 axis in neurological disorders. *Cells*. Interaktyvus. 2020, vol. 9, no. 10. ISSN 2073-4409. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cells9102277>. [žiūrėta 2024-01-25].
147. RAUTI, R., CELLOT, G., D'ANDREA, P., COLLIVA, A., SCAINI, D. ir kt. BDNF impact on synaptic dynamics: extra or intracellular long-term release differently regulates cultured hippocampal synapses. *Molecular brain*. Interaktyvus. 2020, vol. 13, no. 1, ISSN 1756-6606. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s13041-020-00582-9>. [žiūrėta 2024-01-25].
148. SAW, G., KRISHNA, K., GUPTA, N., SOONG, T.W., MALLILANKARAMAN, K. ir kt. Epigenetic regulation of microglial phosphatidylinositol 3-kinase pathway involved in long-term potentiation and synaptic plasticity in rats. *Glia*. Interaktyvus. 2020, vol. 68, no. 3, ISSN 0894-1491. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23748>. [žiūrėta 2024-01-25].
149. SUN, H., HE, X., TAO, X., HOU, T., CHEN, M. ir kt. The CD200/CD200R signaling pathway contributes to spontaneous functional recovery by enhancing synaptic plasticity after stroke. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2020, vol. 17, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-020-01845-x>. [žiūrėta 2024-01-25].
150. ZHANG, S., WANG, X.-J., TIAN, L.-P., PAN, J., LU, G.-Q. ir kt. CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2011, vol. 8, no. 1. ISSN 1742-2094. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-154>. [žiūrėta 2024-01-25].
151. BALLASCH, I., GARCÍA-GARCÍA, E., VILA, C., PÉREZ-GONZÁLEZ, A., SANCHO-BALSELLS, A. ir kt. Ikzf1 as a novel regulator of microglial homeostasis in inflammation and neurodegeneration. *Brain, behavior, and immunity*. Interaktyvus. 2023, vol. 109. ISSN 0889-1591. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.01.016>. [žiūrėta 2024-01-25].
152. STEVENS, B., ALLEN, N.J., VAZQUEZ, L.E., HOWELL, G.R., CHRISTOPHERSON, K.S. ir kt. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. Interaktyvus. 2007, vol. 131, no. 6. ISSN 0092-8674. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>. [žiūrėta 2024-01-25].
153. VAINCHTEIN, I.D., CHIN, G., CHO, F.S., KELLEY, K.W., MILLER, J.G. ir kt. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science*. Interaktyvus. 2018, vol. 359, no. 6381, ISSN 0036-8075. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal3589>. [žiūrėta 2024-01-25].
154. MCNAMARA, N.B., MUNRO, D.A.D., BESTARD-CUCHE, N., UYEDA, A., BOGIE, J.F.J. ir kt. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature*. Interaktyvus. 2023, vol. 613, no. 7942. ISSN 0028-0836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05534-y>. [žiūrėta 2024-01-25].
155. UENO, M., FUJITA, Y., TANAKA, T., NAKAMURA, Y., KIKUTA, J. ir kt. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience*. Interaktyvus. 2013, vol. 16, no. 5. ISSN 1097-6256. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nn.3358>. [žiūrėta 2024-01-25].
156. CASALI, B.T. ir REED-GEAGHAN, E.G. Microglial function and regulation during development, homeostasis and Alzheimer's disease. *Cells*. Interaktyvus. 2021, vol. 10, no. 4. ISSN 2073-4409. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/cells10040957>. [žiūrėta 2024-01-25].

157. HATTORI, Y. The microglia-blood vessel interactions in the developing brain. *Neuroscience research*. Interaktyvus. 2023, vol. 187. ISSN 0168-0102. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.09.006>. [žiūrėta 2024-01-25].
158. ANGELOVA, D.M. ir BROWN, D.R. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *Journal of neurochemistry*. Interaktyvus. 2019, vol. 151, no. 6, ISSN 0022-3042. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14860>. [žiūrėta 2024-01-25].
159. BROWN, G.C. ir NEHER, J.J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature reviews. Neuroscience*. Interaktyvus. 2014, vol. 15, no. 4. ISSN 1471-003X. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nrn3710>. [žiūrėta 2024-01-25].
160. PAMPUSCENKO, K., MORKUNIENE, R., KRASAUSKAS, L., SMIRNOVAS, V., BROWN, G.C. ir kt. Extracellular tau stimulates phagocytosis of living neurons by activated microglia via Toll-like 4 receptor–NLRP3 inflammasome–caspase-1 signalling axis. *Scientific reports*. Interaktyvus. 2023, vol. 13, no. 1. ISSN 2045-2322. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37887-3>. [žiūrėta 2024-01-25].
161. RYAN, S.K., ZELIC, M., HAN, Y., TEEPLE, E., CHEN, L. ir kt. Microglia ferroptosis is regulated by SEC24B and contributes to neurodegeneration. *Nature neuroscience*. Interaktyvus. 2023, vol. 26, no. 1. ISSN 1097-6256. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01221-3>. [žiūrėta 2024-01-25].
162. KAUR, C., RATHNASAMY, G. ir LING, E.-A. Biology of microglia in the developing brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Interaktyvus. 2017, vol. 76, no. 9. ISSN 0022-3069. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx056>. [žiūrėta 2024-01-25].
163. SCHEIBLICH, H., DANSOKHO, C., MERCAN, D., SCHMIDT, S.V., BOUSSET, L. ir kt. Microglia jointly degrade fibrillar alpha-synuclein cargo by distribution through tunneling nanotubes. *Cell*. Interaktyvus. 2021, vol. 184, no. 20. ISSN 0092-8674. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.007>. [žiūrėta 2024-01-25].
164. GABRIELLI, M., PRADA, I., JOSHI, P., FALCICCHIA, C., D'ARRIGO, G. ir kt. Microglial large extracellular vesicles propagate early synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain*. Interaktyvus. 2022, vol. 145, no. 8. ISSN 0006-8950. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/brain/awac083>. [žiūrėta 2024-01-25].
165. CHERRY, J.D., OLSCHOWKA, J.A. ir O'BANION, M.K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2014, vol. 11, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>. [žiūrėta 2024-01-28].
166. AFRIDI, R., LEE, W.-H. ir SUK, K. Microglia Gone Awry: Linking Immunometabolism to Neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*. Interaktyvus. 2020, vol. 14. ISSN 1662-5102. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00246>. [žiūrėta 2024-01-28].
167. CANDLISH, M. ir HEFENDEHL, J.K. Microglia Phenotypes Converge in Aging and Neurodegenerative Disease. *Frontiers in neurology*. Interaktyvus. 2021, vol. 12. ISSN 1664-2295. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.660720>. [žiūrėta 2024-01-28].
168. TAN, Y.-L., YUAN, Y. ir TIAN, L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular psychiatry*. Interaktyvus. 2020, vol. 25, no. 2. ISSN 1359-4184. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>. [žiūrėta 2024-01-28].
169. BOCHE, D. ir GORDON, M.N. Diversity of transcriptomic microglial phenotypes in aging and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*.

- Interaktyvus. 2022, vol. 18, no. 2, ISSN 1552-5260. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/alz.12389>. [žiūrėta 2024-01-28].
170. DECZKOWSKA, A., KEREN-SHAUL, H., WEINER, A., COLONNA, M., SCHWARTZ, M ir kt. Disease-associated microglia: A universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*. Interaktyvus. 2018, vol. 173, no. 5. ISSN 0092-8674. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>. [žiūrėta 2024-01-28].
171. SONG, W.M. ir COLONNA, M. The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nature immunology*. Interaktyvus. 2018, vol. 19, no. 10. ISSN 1529-2908. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0212-1>. [žiūrėta 2024-01-28].
172. RANGARAJU, S., DAMMER, E.B., RAZA, S.A., RATHAKRISHNAN, P., XIAO, H. ir kt. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*. Interaktyvus. 2018, vol. 13, no. 1, ISSN 1750-1326. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-018-0254-8>. [žiūrėta 2024-01-28].
173. ENNERFELT, H. ir LUKENS, J.R. Microglia rely on SYK signalling to mount neuroprotective responses in models of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Clinical and translational medicine*. Interaktyvus. 2023, vol. 13, no. 1. ISSN 2001-1326. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/ctm2.1178>. [žiūrėta 2024-01-28].
174. BRAWEK, B., SKOK, M. ir GARASCHUK, O. Changing functional signatures of microglia along the axis of brain aging. *International journal of molecular sciences*. Interaktyvus. 2021, vol. 22, no. 3. ISSN 1661-6596. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms22031091>. [žiūrėta 2024-01-28].
175. KRASEMANN, S., MADORE, C., CIALIC, R., BAUFELD, C., CALCAGNO, N. ir kt. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity*. Interaktyvus. 2017, vol. 47, no. 3, ISSN 1074-7613. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>. [žiūrėta 2024-01-28].
176. MARSCHALLINGER, J., IRAM, T., ZARDENETA, M., LEE, S.E., LEHALLIER, B. ir kt. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature neuroscience*. Interaktyvus. 2020, vol. 23, no. 2. ISSN 1097-6256. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0566-1>. [žiūrėta 2024-01-28].
177. WEI, Y. ir LI, X. Different phenotypes of microglia in animal models of Alzheimer disease. *Immunity & ageing*. Interaktyvus. 2022, vol. 19, no. 1, ISSN 1742-4933. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12979-022-00300-0>. [žiūrėta 2024-01-28].
178. LI, C., REN, J., ZHANG, M., WANG, H., YI, F. ir kt. The heterogeneity of microglial activation and its epigenetic and non-coding RNA regulations in the immunopathogenesis of neurodegenerative diseases. *Cellular and molecular life sciences*. Interaktyvus. 2022, vol. 79, no. 10, ISSN 1420-682X. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-022-04536-3>. [žiūrėta 2024-01-28].
179. MONSORNO, K., BUCKINX, A. ir PAOLICELLI, R.C. Microglial metabolic flexibility: emerging roles for lactate. *Trends in endocrinology and metabolism*. Interaktyvus. 2022, vol. 33, no. 3, ISSN 1043-2760. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2021.12.001>. [žiūrėta 2024-02-03].
180. BERNIER, L.-P., YORK, E.M., KAMYABI, A., CHOI, H.B., WEILINGER, N.L. ir kt. Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nature communications*. Interaktyvus. 2020, vol. 11, no. 1. ISSN 2041-1723. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15267-z>. [žiūrėta 2024-02-03].
181. WANG, Q., LU, M., ZHU, X., GU, X., ZHANG, T. ir kt. The role of microglia immunometabolism in neurodegeneration: Focus on molecular determinants and metabolic

- intermediates of metabolic reprogramming. *Biomedicine & pharmacotherapy*. Interaktyvus. 2022, vol. 153, no. 113412, ISSN 0753-3322. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113412>. [žiūrėta 2024-02-03].
182. YANG, S., QIN, C., HU, Z.-W., ZHOU, L.-Q., YU, H.-H. ir kt. Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiology of disease*. Interaktyvus. 2021, vol. 152, no. 105290. ISSN 0969-9961. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105290>. [žiūrėta 2024-02-03].
183. WANG, L., PAVLOU, S., DU, X., BHUCKORY, M., XU, H. ir kt. Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis. *Molecular neurodegeneration*. Interaktyvus. 2019, vol. 14, no. 1. ISSN 1750-1326. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0305-9>. [žiūrėta 2024-02-03].
184. GHOSH, S., CASTILLO, E., FRIAS, E.S. ir SWANSON, R.A. Bioenergetic regulation of microglia. *Glia*. Interaktyvus. 2018, vol. 66, no. 6. ISSN 0894-1491. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/glia.23271>. [žiūrėta 2024-02-03].
185. LEPIARZ-RABA, I., GBADAMOSI, I., FLOREA, R., PAOLICELLI, R.C. ir JAWAID, A. Metabolic regulation of microglial phagocytosis: Implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Translational neurodegeneration*. Interaktyvus. 2023, vol. 12, no. 1, ISSN 2047-9158. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s40035-023-00382-w>. [žiūrėta 2024-02-03].
186. AFRIDI, R., RAHMAN, M.H. ir SUK, K. Implications of glial metabolic dysregulation in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of disease*. Interaktyvus. 2022, vol. 174, no. 105874. ISSN 0969-9961. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105874>. [žiūrėta 2024-02-03].
187. BERNIER, L.-P., YORK, E.M. ir MACVICAR, B.A. Immunometabolism in the brain: How metabolism shapes microglial function. *Trends in neurosciences*. Interaktyvus. 2020, vol. 43, no. 11, ISSN 0166-2236. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2020.08.008>. [žiūrėta 2024-02-03].
188. NAGY, A.M., FEKETE, R., HORVATH, G., KONCSOS, G., KRISTON, C. ir kt. Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*. Interaktyvus. 2018, vol. 1859, no. 3. ISSN 0005-2728. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.12.002>. [žiūrėta 2024-02-03].
189. HARPER, M.-E. ir PATTI, M.-E. Metabolic terminology: what's in a name? *Nature metabolism*. Interaktyvus. 2020, vol. 2, no. 6. ISSN 2522-5812. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0216-7>. [žiūrėta 2024-02-03].
190. HOLLAND, R., MCINTOSH, A.L., FINUCANE, O.M., MELA, V., RUBIO-ARAIZ, A. ir kt. Inflammatory microglia are glycolytic and iron retentive and typify the microglia in APP/PS1 mice. *Brain, behavior, and immunity*. Interaktyvus. 2018, vol. 68. ISSN 0889-1591. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.017>. [žiūrėta 2024-02-03].
191. ORIHUELA, R., MCPHERSON, C.A. ir HARRY, G.J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British journal of pharmacology*. Interaktyvus. 2016, vol. 173, no. 4, ISSN 0007-1188. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13139>. [žiūrėta 2024-02-03].
192. GIMENO-BAYÓN, J., LÓPEZ-LÓPEZ, A., RODRÍGUEZ, M.J. ir MAHY, N. Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *Journal of neuroscience research*. Interaktyvus. 2014, vol. 92, no. 6, ISSN 0360-4012. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23356>. [žiūrėta 2024-02-03].

193. HASCHEMI, A., KOSMA, P., GILLE, L., EVANS, C.R., BURANT, C.F. ir kt. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell metabolism*. Interaktyvus. 2012, vol. 15, no. 6. ISSN 1550-4131. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.023>. [žiūrėta 2024-02-03].
194. RAE, C.D., BAUR, J.A., BORGES, K., DIENEL, G., DÍAZ-GARCÍA, C.M. ir kt. Brain energy metabolism: A roadmap for future research. *Journal of neurochemistry*. Interaktyvus. 2024, ISSN 0022-3042. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.16032>. [žiūrėta 2024-02-03].
195. YANG, S., YUAN, Z., ZHU, Y., LIANG, C., CHEN, Z. ir kt. Multi-omics analysis reveals GAPDH posttranscriptional regulation of IFN- γ and PHGDH as a metabolic checkpoint of microglia polarization. *Brain, behavior, and immunity*. Interaktyvus. 2024, vol. 117. ISSN 0889-1591. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.01.009>. [žiūrėta 2024-02-03].
196. HU, Y., CAO, K., WANG, F., WU, W., MAI, W. ir kt. Dual roles of hexokinase 2 in shaping microglial function by gating glycolytic flux and mitochondrial activity. *Nature metabolism*. Interaktyvus. 2022, vol. 4, no. 12. ISSN 2522-5812. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00707-5>. [žiūrėta 2024-02-03].
197. GUO, D., TONG, Y., JIANG, X., MENG, Y., JIANG, H. ir kt. Aerobic glycolysis promotes tumor immune evasion by hexokinase2-mediated phosphorylation of I κ B α . *Cell metabolism*. Interaktyvus. 2022, vol. 34, no. 9. ISSN 1550-4131. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.08.002>. [žiūrėta 2024-02-03].
198. HU, Y., MAI, W., CHEN, L., CAO, K., ZHANG, B. ir kt. mTOR-mediated metabolic reprogramming shapes distinct microglia functions in response to lipopolysaccharide and ATP. *Glia*. Interaktyvus. 2020, vol. 68, no. 5, ISSN 0894-1491. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23760>. [žiūrėta 2024-02-03].
199. GU, R., ZHANG, F., CHEN, G., HAN, C., LIU, J. ir kt. Clk1 deficiency promotes neuroinflammation and subsequent dopaminergic cell death through regulation of microglial metabolic reprogramming. *Brain, behavior, and immunity*. Interaktyvus. 2017, vol. 60. ISSN 0889-1591. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.10.018>. [žiūrėta 2024-02-03].
200. ZHAI, L., RUAN, S., WANG, J., GUAN, Q. ir ZHA, L. NADPH oxidase 4 regulate the glycolytic metabolic reprogramming of microglial cells to promote M1 polarization. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. Interaktyvus. 2023, vol. 37, no. 5, ISSN 1095-6670. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.23318>. [žiūrėta 2024-02-03].
201. NAIR, S., SOBOTKA, K.S., JOSHI, P., GRESSENS, P., FLEISS, B., ir kt. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*. Interaktyvus. 2019, vol. 67, no. 6. ISSN 0894-1491. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/glia.23587>. [žiūrėta 2024-02-03].
202. HAN, Q.-Q. ir LE, W. NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation and related mitochondrial impairment in Parkinson's disease. *Neuroscience bulletin*. Interaktyvus. 2023, vol. 39, no. 5, ISSN 1673-7067. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-023-01023-y>. [žiūrėta 2024-02-03].
203. TANNAHILL, G.M., CURTIS, A.M., ADAMIK, J., PALSSON-MCDERMOTT, E.M., MCGETTRICK, A.F. ir kt. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. Interaktyvus. 2013, vol. 496, no. 7444. ISSN 0028-0836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nature11986>. [žiūrėta 2024-02-03].

204. TU, D., GAO, Y., YANG, R., GUAN, T., HONG, J.-S. ir kt. The pentose phosphate pathway regulates chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2019, vol. 16, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-019-1659-1>. [žiūrėta 2024-02-03].
205. GNAIGER, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An introduction to OXPHOS analysis. *Bioenergetics Communications*. Interaktyvus. 2020, 5th ed. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.26124/BEC:2020-0002>. [žiūrėta 2024-05-07].
206. MOOKERJEE, S.A., NICHOLLS, D.G. ir BRAND, M.D. Determining maximum glycolytic capacity using extracellular flux measurements. *PLoS one*. Interaktyvus. 2016, vol. 11, no. 3, ISSN 1932-6203. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152016>. [žiūrėta 2024-04-26].
207. TESLAA, T. ir TEITELL, M.A. Techniques to Monitor Glycolysis. *Methods in Enzymology*. Interaktyvus. 2014, vol. 542, pp. 91–114. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00005-4>. [žiūrėta 2024-05-08].
208. CHINTA, S.J., MALLAJOSYULA, J.K., RANE, A. ir ANDERSEN, J.K. Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters*. Interaktyvus. 2010, vol. 486, no. 3, ISSN 0304-3940. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.061>. [žiūrėta 2024-04-26].
209. IMAIZUMI, Y., OKADA, Y., AKAMATSU, W., KOIKE, M., KUZUMAKI, N. ir kt. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Molecular brain*. Interaktyvus. 2012, vol. 5, no. 1, ISSN 1756-6606. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-35>. [žiūrėta 2024-04-26].
210. LI, Y., XIA, X., WANG, Y. ir ZHENG, J.C. Mitochondrial dysfunction in microglia: a novel perspective for pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2022, vol. 19, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-022-02613-9>. [žiūrėta 2024-04-26].
211. LUDTMANN, M.H.R., ANGELOVA, P.R., HORROCKS, M.H., CHOI, M.L., RODRIGUES, M. ir kt. α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nature communications*. Interaktyvus. 2018, vol. 9, no. 1, ISSN 2041-1723. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>. [žiūrėta 2024-04-26].
212. REEVE, A.K., LUDTMANN, M.H.R., ANGELOVA, P.R., SIMCOX, E.M., HORROCKS, M.H. ir kt. Aggregated α -synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell death & disease*. Interaktyvus. 2015, vol. 6, no. 7, ISSN 2041-4889. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.166>. [žiūrėta 2024-04-26].
213. GANJAM, G.K., BOLTE, K., MATSCHKE, L.A., NEITEMEIER, S., DOLGA, A.M. ir kt. Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell death & disease*. Interaktyvus. 2019, vol. 10, no. 11, ISSN 2041-4889. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2091-2>. [žiūrėta 2024-04-26].
214. LUTH, E.S., STAVROVSKAYA, I.G., BARTELS, T., KRISTAL, B.S. ir SELKOE, D.J. Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction. *The journal of biological chemistry*. Interaktyvus. 2014, vol. 289, no. 31, ISSN 0021-9258. Prieiga per: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545749>. [žiūrėta 2024-04-26].
215. DEVI, L., RAGHAVENDRAN, V., PRABHU, B.M., AVADHANI, N.G. ir ANANDATHEERTHAVARADA, H.K. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein

- impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The journal of biological chemistry*. Interaktyvus. 2008, vol. 283, no. 14, ISSN 0021-9258. Prieiga per: <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>. [žiūrėta 2024-04-26].
216. SARKAR, S., DAMMER, E.B., MALOVIC, E., OLSEN, A.L., RAZA, S.A. ir kt. Molecular signatures of neuroinflammation induced by α Synuclein aggregates in microglial cells. *Frontiers in immunology*. Interaktyvus. 2020, vol. 11. ISSN 1664-3224. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00033>. [žiūrėta 2024-04-26].
217. HARD, G.C. Some biochemical aspects of the immune macrophage. *British journal of experimental pathology*. Interaktyvus. 1970, vol. 51, no. 1, ISSN 0007-1021. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2072214/>. [žiūrėta 2024-04-26].
218. LIU, X., JIANG, N. ir ZHOU, W. Various energetic metabolism of microglia in response to different stimulations. *Molecules*. Interaktyvus. 2023, vol. 28, no. 11. ISSN 1420-3049. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules28114501>. [žiūrėta 2024-04-26].
219. CHENG, J., ZHANG, R., XU, Z., KE, Y., SUN, R. ir kt. Early glycolytic reprogramming controls microglial inflammatory activation. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2021, vol. 18, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-021-02187-y>. [žiūrėta 2024-04-26].
220. BROWN, G.C. ir HENEKA, M.T. The endotoxin hypothesis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*. Interaktyvus. 2024, vol. 19, no. 1, ISSN 1750-1326. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-024-00722-y>. [žiūrėta 2024-04-26].
221. CHAUSSE, B., LEWEN, A., POSCHET, G. ir KANN, O. Selective inhibition of mitochondrial respiratory complexes controls the transition of microglia into a neurotoxic phenotype in situ. *Brain, behavior, and immunity*. Interaktyvus. 2020, vol. 88. ISSN 0889-1591. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.052>. [žiūrėta 2024-04-26].
222. MARROCCO, A. ir ORTIZ, L.A. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. *Frontiers in immunology*. Interaktyvus. 2022, vol. 13. ISSN 1664-3224. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.936167>. [žiūrėta 2024-04-26].
223. HUNTER, R.L., DRAGICEVIC, N., SEIFERT, K., CHOI, D.Y., LIU, M. ir kt. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *Journal of neurochemistry*. Interaktyvus. 2007, vol. 100, no. 5. ISSN 0022-3042. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04327.x>. [žiūrėta 2024-04-26].
224. SULIMAN, H., WELTYWOLF, K., CARRAWAY, M., TATRO, L. ir PIANTADOSI, C. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovascular research*. Interaktyvus. 2004, vol. 64, no. 2. ISSN 0008-6363. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.07.005>. [žiūrėta 2024-04-26].
225. SANGINETO, M., CIARNELLI, M., CASSANO, T., RADESCO, A., MOOLA, A. ir kt. Metabolic reprogramming in inflammatory microglia indicates a potential way of targeting inflammation in Alzheimer's disease. *Redox biology*. Interaktyvus. 2023, vol. 66, no. 102846. ISSN 2213-2317. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102846>. [žiūrėta 2024-04-26].
226. PEREIRA, O.R., Jr, RAMOS, V.M., CABRAL-COSTA, J.V. ir KOWALTOWSKI, A.J. Changes in mitochondrial morphology modulate LPS-induced loss of calcium homeostasis in BV-2 microglial cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. Interaktyvus. 2021, vol. 53, no. 2, ISSN 0145-479X. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-021-09878-4>. [žiūrėta 2024-04-26].

227. SABOGAL-GUÁQUETA, A.M., MARMOLEJO-GARZA, A., TROMBETTA-LIMA, M., OUN, A., HUNNEMAN, J. ir kt. Species-specific metabolic reprogramming in human and mouse microglia during inflammatory pathway induction. *Nature communications*. Interaktyvus. 2023, vol. 14, no. 1. ISSN 2041-1723. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42096-7>. [žiūrėta 2024-04-26].
228. GALVÁN-PEÑA, S. ir O'NEILL, L.A.J. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Frontiers in immunology*. Interaktyvus. 2014, vol. 5, ISSN 1664-3224. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00420>. [žiūrėta 2024-04-26].
229. YANG, X., MA, H., YV, Q., YE, F., HE, Z. ir kt. Alpha-synuclein/MPP+ mediated activation of NLRP3 inflammasome through microtubule-driven mitochondrial perinuclear transport. *Biochemical and biophysical research communications*. Interaktyvus. 2022, vol. 594. ISSN 0006-291X. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.047>. [žiūrėta 2024-04-26].
230. WANG, D., GU, X., MA, X., CHEN, J., ZHANG, Q. ir kt. Nanopolyphenol rejuvenates microglial surveillance of multiple misfolded proteins through metabolic reprogramming. *Acta pharmaceutica Sinica. B*. Interaktyvus. 2023, vol. 13, no. 2, ISSN 2211-3835. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2022.07.014>. [žiūrėta 2024-04-26].
231. RUBIO-ARAIZ, A., FINUCANE, O.M., KEOGH, S. ir LYNCH, M.A. Anti-TLR2 antibody triggers oxidative phosphorylation in microglia and increases phagocytosis of β -amyloid. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2018, vol. 15, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-018-1281-7>. [žiūrėta 2024-04-26].
232. MONTILLA, A., RUIZ, A., MARQUEZ, M., SIERRA, A., MATUTE, C. ir kt. Role of mitochondrial dynamics in microglial activation and metabolic switch. *ImmunoHorizons*. Interaktyvus. 2021, vol. 5, no. 8, ISSN 2573-7732. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.4049/immunohorizons.2100068>. [žiūrėta 2024-04-26].
233. VOLOBOUEVA, L.A., EMERY, J.F., SUN, X. ir GIFFARD, R.G. Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. *FEBS letters*. Interaktyvus. 2013, vol. 587, no. 6, ISSN 0014-5793. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.067>. [žiūrėta 2024-04-26].
234. CHAUSSE, B., KAKIMOTO, P.A., CALDEIRA-DA-SILVA, C.C., CHAVES-FILHO, A.B., YOSHINAGA, M.Y. ir kt. Distinct metabolic patterns during microglial remodeling by oleate and palmitate. *Bioscience reports*. Interaktyvus. 2019, vol. 39, no. 4. ISSN 0144-8463. Prieiga per: <https://doi.org/10.1042/BSR20190072>. [žiūrėta 2024-04-26].
235. LIY, P.M., PUZI, N.N.A., JOSE, S. ir VIDYADARAN, S. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine*. Interaktyvus. 2021, vol. 246, no. 22. ISSN 1535-3702. Prieiga per: <https://doi.org/10.1177/1535370221997052>. [žiūrėta 2024-04-26].
236. BIELANIN, J.P. ir SUN, D. Significance of microglial energy metabolism in maintaining brain homeostasis. *Translational stroke research*. Interaktyvus. 2023, vol. 14, no. 4, ISSN 1868-4483. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s12975-022-01069-6>. [žiūrėta 2024-04-26].
237. ZHANG, Wei, WANG, T., PEI, Z., MILLER, D.S., WU, X., BLOCK, M.L. ir kt. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Interaktyvus. 2005, vol. 19, no. 6. ISSN 0892-6638. Prieiga per: <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>. [žiūrėta 2024-04-26].

238. BÉRAUD, D., HATHAWAY, H.A., TRECKI, J., CHASOVSKIKH, S., JOHNSON, D.A. ir kt. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein α -synuclein. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. Interaktyvus. 2013, vol. 8, no. 1. ISSN 1557-1890. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9401-0>. [žiūrėta 2024-04-26].
239. POULIOT, P., PLANTE, I., RAQUIL, M.-A., TESSIER, P.A. ir OLIVIER, M. Myeloid-related proteins rapidly modulate macrophage nitric oxide production during innate immune response. *The journal of immunology*. Interaktyvus. 2008, vol. 181, no. 5, ISSN 0022-1767. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3595>. [žiūrėta 2024-04-26].
240. WICKSTEAD, E.S., KARIM, H.A., MANUEL, R.E., BIGGS, C.S., GETTING, S.J. ir kt. Reversal of β -amyloid-induced microglial toxicity in vitro by activation of Fpr2/3. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Interaktyvus. 2020, vol. 2020. ISSN 1942-0900. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/2139192>. [žiūrėta 2024-04-26].
241. GOODWIN, J.L., UEMURA, E. ir CUNNICK, J.E. Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of β -amyloid and IFN- γ . *Brain research*. Interaktyvus. 1995, vol. 692, no. 1–2. ISSN 0006-8993. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00646-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00646-8). [žiūrėta 2024-04-26].
242. MONSONEGO, A., IMITOLA, J., ZOTA, V., OIDA, T. ir WEINER, H.L. Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid β -peptide presentation to Th1 cells. *The journal of immunology*. Interaktyvus. 2003, vol. 171, no. 5, ISSN 0022-1767. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2216>. [žiūrėta 2024-04-26].
243. BUSSI, C., PERALTA RAMOS, J.M., ARROYO, D.S., GAVIGLIO, E.A., GALLEA, J.I. ir kt. Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death. *Scientific reports*. Interaktyvus. 2017, vol. 7, no. 1. ISSN 2045-2322. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/srep43153>. [žiūrėta 2024-04-26].
244. WANG, Z., WANG, Q., LI, S., LI, X.-J., YANG, W. ir kt. Microglial autophagy in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience*. Interaktyvus. 2023, vol. 14, ISSN 1663-4365. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2022.1065183>. [žiūrėta 2024-04-26].
245. YAN, J.-J., DU, G.-H., QIN, X.-M. ir GAO, L. Baicalein attenuates the neuroinflammation in LPS-activated BV-2 microglial cells through suppression of pro-inflammatory cytokines, COX2/NF- κ B expressions and regulation of metabolic abnormality. *International immunopharmacology*. Interaktyvus. 2020, vol. 79, no. 106092. ISSN 1567-5769. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106092>. [žiūrėta 2024-04-26].
246. KAEWMOOL, C., KONGTAWELERT, P., PHITAK, T., POTHACHAROEN, P. ir UDOMRUK, S. Protocatechuic acid inhibits inflammatory responses in LPS-activated BV2 microglia via regulating SIRT1/NF- κ B pathway contributed to the suppression of microglial activation-induced PC12 cell apoptosis. *Journal of neuroimmunology*. Interaktyvus. 2020, vol. 341, no. 577164. ISSN 0165-5728. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577164>. [žiūrėta 2024-04-26].
247. YILDIRIM-BALATAN, C., FENYI, A., BESNAULT, P., GOMEZ, L., SEPULVEDA-DIAZ, J.E. ir kt. Parkinson's disease-derived α -synuclein assemblies combined with chronic-type inflammatory cues promote a neurotoxic microglial phenotype. *Journal of neuroinflammation*. Interaktyvus. 2024, vol. 21, no. 1, ISSN 1742-2094. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-024-03043-5>. [žiūrėta 2024-04-26].
248. PERUZZOTTI-JAMETTI, L., WILLIS, C.M., KRZAK, G., HAMEL, R., PIRVAN, L. ir kt. Mitochondrial complex I activity in microglia sustains neuroinflammation. *Nature*. Interaktyvus.

- 2024, vol. 628, no. 8006. ISSN 0028-0836. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07167-9>. [žiūrėta 2024-04-26].
249. SIMPSON, D.S.A. ir OLIVER, P.L. ROS generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants*. Interaktyvus. 2020, vol. 9, no. 8. ISSN 2076-3921. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antiox9080743>. [žiūrėta 2024-04-26].
250. LEE, Y.M., HE, W. ir LIOU, Y.-C. The redox language in neurodegenerative diseases: oxidative post-translational modifications by hydrogen peroxide. *Cell death & disease*. Interaktyvus. 2021, vol. 12, no. 1. ISSN 2041-4889. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03355-3>. [žiūrėta 2024-04-26].
251. PARK, J., LEE, S., LEE, H.-S., LEE, S.-R. ir LEE, D.-S. Profiling of cytosolic and mitochondrial H₂O₂ production using the H₂O₂-sensitive protein HyPer in LPS-induced microglia cells. *Neuroscience letters*. Interaktyvus. 2017, vol. 654. ISSN 0304-3940. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.017>. [žiūrėta 2024-04-26].
252. PARDO-PEÑA, K., LOREA-HERNÁNDEZ, J.J., CAMACHO-HERNÁNDEZ, N.P., ORDAZ, B., VILLASANA-SALAZAR, B. ir kt. Hydrogen peroxide extracellular concentration in the ventrolateral medulla and its increase in response to hypoxia in vitro: Possible role of microglia. *Brain research*. Interaktyvus. 2018, vol. 1692. ISSN 0006-8993. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.032>. [žiūrėta 2024-04-26].
253. HU, Z., WANG, W., LING, J. ir JIANG, C. A-mangostin inhibits α -synuclein-induced microglial neuroinflammation and neurotoxicity. *Cellular and molecular neurobiology*. Interaktyvus. 2016, vol. 36, no. 5, ISSN 0272-4340. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-015-0264-9>. [žiūrėta 2024-04-26].
254. THOMAS, M.P., CHARTRAND, K., REYNOLDS, A., VITVITSKY, V., BANERJEE, R. ir kt. Ion channel blockade attenuates aggregated alpha synuclein induction of microglial reactive oxygen species: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. Interaktyvus. 2007, vol. 100, no. 2. ISSN 0022-3042. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04315.x>. [žiūrėta 2024-04-26].
255. ZHONG, C., NIU, Y., LIU, W., YUAN, Yichuan, LI, Kai, SHI, Y., QIU, Z. ir kt. S100A9 derived from chemoembolization-induced hypoxia governs mitochondrial function in hepatocellular carcinoma progression. *Advanced science*. Interaktyvus. 2022, vol. 9, no. 30, ISSN 2198-3844. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202202206>. [žiūrėta 2024-04-26].
256. AHMED, S., PANDA, S.R., KWATRA, M., SAHU, B.D. ir NAIDU, V.G.M. Pharmacological Blocker of NF- κ b and Mitochondrial Ros Restrict NLRP3 Inflammasome Activation and Rescue Dopaminergic Neurons in Vitro and in Vivo Parkinson's Disease. *Research Square*. Interaktyvus. 2021. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-260478/v1>. [žiūrėta 2024-04-26].
257. PARK, J., MIN, J.-S., KIM, B., CHAE, U.-B., YUN, J.W. ir kt. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Neuroscience letters*. Interaktyvus. 2015, vol. 584. ISSN 0304-3940. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.016>. [žiūrėta 2024-05-08].
258. RIMAL, S., LI, W., KHAKET, T.P., LI, Yu, TANTRAY, I., LI, Yanping, BHURTEL, S. ir kt. Deregulation of mitochondrial reverse electron transport alters the metabolism of reactive oxygen species and NAD⁺/NADH and presents a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Ageing and Neurodegenerative Diseases*. Interaktyvus. 2024, vol. 4, no. 1, ISSN 2769-5301. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.20517/and.2024.07>. [žiūrėta 2024-05-08].

Publikacijų sąrašas

Mokslinių tyrimų rezultatų skelbimas konferencijose

1. **Gružaitė J**, Pampuščenko K, Umbrasas D, Smirnovas V, Borutaitė V, Morkūnienė R. Extracellular Aggregates of Amyloid Protein S100A9 Induce Microglial Energy Metabolism Shift. International Conference of Life Sciences The COINS 2024: book of abstracts. April 24-27th, 2024, Vilnius: Vilnius University, 2024.
2. **Gružaitė J**, Morkūnienė R, Umbrasas D, Rekuviene E, Smirnovas V, Pampuščenko K. Investigation of the Changes in Microglial Energy Metabolism upon Pro-inflammatory Stimulation with Amyloid Protein S100A9 and LPS. The 15th International Conference of the Lithuanian Neuroscience Association „Neurodiversity: from Theory through Artificial Intelligence to Clinical Practice“: 24th November 2023, Kaunas, Lithuania / Lithuanian Neuroscience Association. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2023.
3. Umbrasas D, Pampuščenko K, Fujimoto Y, Biskytė E, **Gružaitė J**, Borutaitė V. Comparison of the energy metabolism of LPS-stimulated microglia with the effects of itaconic acid. The XVIth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society "Biochemistry Targeting Diseases" : Taujėnai, Lithuania, June 28-30th, 2023 : programme and abstract book / Lietuvos Biochemikų Draugija. Vilnius: Lietuvos Biochemikų draugija, 2023.

Priedai

1 priedas. LSMU Bioetikos centro leidimas



LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETO BIOETIKOS CENTRAS

Medicinos akademija (MA)
Antrosios pakopos studijų programa - Medicininė chemija
I k. studentė: Jovita Gružaitė
Darbo vadovas: Vyriausiasis mokslo darbuotojas Ramunė Morkūnienė
NI Biochemijos laboratorija

Nr. 2023-BEC2-047

DĖL PRITARIMO TYRIMUI

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs pateiktus dokumentus, moksliniam-tiriamajam darbui tema „Amiloidinių baltymų -sinukleino ir S100A9 neurotoksinio poveikio mechanizmo mikroglijos ląstelėms tyrimas“ P R I T A R I A .

dr. Aušra Urbonienė 2023-04-06 14:22:49

* Pastaba: šis pritarimas neatleidžia tiriamąjį mokslinį darbą vykdančių asmenų nuo prievolės laikytis Bendrojo duomenų apsaugos reglamento nuostatų ir nuo atsakomybės gauti nacionalinio arba regioninio bioetikos komiteto leidimą, jei toks leidimas būtinas pagal LR Biomedicininį tyrimų etikos įstatyme numatytus reikalavimus.

2 priedas. Padėka

Pirmiausia noriu išreikšti nuoširdžią padėką savo mokslinio darbo vadovei prof. dr. Ramunei Morkūnienei už nuolatinį dalijimąsi žiniomis, vertingas išvalgas, skirtą laiką, kantrybę, besąlygišką palaikymą ir visada malonų bendravimą.

Už vertingus patarimus ir pagalbą eksperimentiniame darbe labai dėkoju mokslo darbuotojams dr. Katrynai Pampuščenko ir dr. Danieliui Umbrasui. Už šiltą priėmimą esu dėkinga ir kitiems LSMU NI Biochemijos laboratorijos darbuotojams.

Taip pat noriu padėkoti prof. dr. Vilmantei Borutaitei už suteiktą materialinę bazę ir galimybę atlikti šį tyrimą LSMU NI Biochemijos laboratorijoje bei VU mokslininkui dr. Vytautui Smirnovui už bendradarbiavimą ir padovanotus amiloidinius baltymus.

Jūs esate pavyzdys ir įkvėpimas siekti, tobulėti ir tęsti mokslinę veiklą.

Dalis šio darbo buvo finansuojama Lietuvos mokslo tarybos (LMT Nr. S-MIP-23-98 ir Nr. S-SV-23-117).



Special Prize by Expertus Vilnensis

during the XV Lithuanian Neuroscience Association
**Neurodiversity: from Theory through Artificial Intelligence
to Clinical Practice**
is awarded to

**Jovita Gružaitė, Ramunė Morkūnienė,
Danielius Umbrasas, Evelina Rekuvienė,
Vytautas Smirnovas, Katryna Pampuščenko**

for the Best Molecular Neuroscience Poster

**Investigation of the Changes in Microglial Energy
Metabolism upon Pro-inflammatory Stimulation
with Amyloid Protein S100A9 and LPS**

24 November 2023, Kaunas, Lithuania

Prof. Osvaldas Rukšėnas
President of the Lithuanian
Neuroscience Association

Dr. Rima Naginienė
Deputy Director for Research
Neuroscience Institute
Lithuanian University of Health Sciences

