



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**

Farmacijos fakultetas

# **Viruso mimetiku Poli I:C veikiamų kvėpavimo takų egzosomų reikšmė mikroglijos ląstelių aktyvinimui**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Deimantė Narauskaitė**

Projekto autorė

**dr. Aistė Jekabsone**

Vadovė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas



**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**  
Farmacijos fakultetas

# **Viruso mimetiku Poli I:C veikiamų kvėpavimo takų egzosomų reikšmė mikroglijos ląstelių aktyvinimui**

Baigiamasis magistro projektas  
Medicininė chemija (6281CX001)

---

**Deimantė Narauskaitė**

Projekto autorė

**dr. Aistė Jekabsone**

Vadovė

**dr. Silvija Jankevičiūtė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas



**Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas**  
Farmacijos fakultetas

Deimantė Narauskaitė

## **Viruso mimetiku Poli I:C veikiamų kvėpavimo takų egzosomų reikšmė mikroglijos ląstelių aktyvinimui**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, **Deimantės Narauskaitės**, baigiamasis projektas tema „Viruso mimetiku Poli I:C veikiamų kvėpavimo takų egzosomų reikšmė mikroglijos ląstelių aktyvinimui“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Deimantė Narauskaitė

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Naruskaitė, Deimantė. Viruso mimetiku Poli I:C veikiamų kvėpavimo takų egzosomų reikšmė mikroglijos ląstelių aktyvinimui. Baigiamasis magistro projektas / vadovė dr. Aistė Jekabsone; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: poli I:C, kvėpavimo takų ląstelių egzosomos, mikroglijos imunometabolizmas, aktyvūs deguonies junginiai, kaspazė-1.

Kaunas, 2020. 73 p.

### **Santrauka**

Vieni dažniausių infekcinių susirgimų – tai viršutinių kvėpavimo takų virusinės infekcijos. Paprastai tokios infekcijos veikia lokaliai, tačiau kai kurie infekcijas sukeltantys veiksniai gali būti perduoti į toliau nuo infekcijos židinio nutolusias vietas ląstelių pūslelinės komunikacijos būdu. Vienas iš geriausiai ištirtų tarpląstelinės komunikacijos būdų yra nano dydžio pūslelės – egzosomos. Jos svarbios medžiagų pasikeitimui tarp ląstelių, nereikalingų baltymų ar kitų molekulių pašalinimui. Virusais veikiamų ląstelių egzosomos gali pernešti prouždegimines molekules ar net paties viruso daleles. Žinoma, kad egzosomos gali pereiti kraujo-smegenų barjerą. Kadangi viršutiniai kvėpavimo takai išsidėstę labai arti galvos smegenų, tikėtina, kad virusų veikiamų ląstelių egzosomos gali pernešti į smegenis uždegiminius veiksnius ir taip prisidėti prie neurouždegiminių procesų inicijavimo. Svarbiausios imuninio atsako ląstelės smegenyse yra mikroglija, todėl labiausiai tikėtina, kad šios ląstelės turėtų būti pirmos atsakančios į virusų veikiamų kvėpavimo takų ląstelių egzosomų signalus. Vis dėlto virusų veikiamų kvėpavimo takų ląstelių egzosomų poveikis mikroglijai iki šiol nebuvo tiriamas.

Šio projekto tikslas – ištirti viruso mimetiku poli I:C veikiamų kvėpavimo takų epitelio ląstelių egzosomų reikšmę žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvinimui. Projekto metu iš poli I:C seka stimuliuotų žmogaus kvėpavimo takų bronchų epitelio ląstelių išskirtos ir pagal dalelių dydį ir egzosominius paviršiaus žymenis charakterizuotos egzosomos, kuriomis buvo veikiamos žmogaus mikroglijos ląstelės. Nustatyta, kad kvėpavimo takų ląstelių išskiriamos egzosomos į mikroglijos ląsteles patenka per 2 valandas. Nustatyta, kad infekcijų stimuliuotų egzosomų aplinkoje slopinama mikroglijos ląstelių mitochondrijų funkcija, į mažiau mitochondrinį ir labiau glikolitinį persiskirsto ląstelių energetinis fenotipas. Taip pat padidėja viduląstelinė ir vidumitochondrinė aktyvių deguonies junginių produkcija bei kaspazės-1 aktyvumas, rodantis aktyvintą mikroglijos būseną po poveikio virusine seka stimuliuotomis egzosomomis. Gauti rezultatai rodo, kad mikroglijos aktyvinimui gali turėti įtakos periferijoje infekcijų poveikyje susiformavusios egzosomos.

Narauskaite, Deimante. The effect of virus mimetic Poly I:C-primed airway exosomes on microglial cell activation. Master's Final Degree Project / supervisor PhD Aiste Jekabsone; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

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

Keywords: poli I:C, airway cells` exosomes, microglia immunometabolism, reactive oxygen species, caspase-1.

Kaunas, 2020. 73 pages.

### **Summary**

One of the most common infectious diseases is viral infections of the upper respiratory tract. Usually, such infections are localized, however some of the factors, which cause infections might be transmitted to more remote locations by extracellular communication. The one of the best studied way of extracellular communication is nano-sized extracellular vesicles – exosomes. They are important for the exchange of substances between cells, the removal of unnecessary proteins or other molecules. Exosomes from virus-infected cells can carry pro-inflammatory molecules or even particles of the virus itself. It is known that exosomes can cross the blood-brain barrier. Because the upper respiratory tract is located very close to the brain, it is likely that virus-primed cell exosomes can transfer inflammatory factors to the brain and thus contribute to the initiation of neuroinflammatory processes. The most important immune response cells in the brain are microglia. Therefore, most likely, that those cells should be affected first of exosomes from virus-primed cells. However, the effect of virus-primed upper respiratory tract cell exosomes on microglia have not been studied yet.

The aim of this project – to investigate the effect of virus mimetic poly I:C-primed airway exosomes on human microglial cell activation. In this project, exosomes were isolated from poly I:C-primed human bronchial epithelial cell culture medium and were characterized by particle size and specific exosomes markers. It was determined that the exosomes are internalized by microglial cells after 2 hours. It was established that the mitochondrial function of microglial cells is inhibited in the environment of virus-primed exosomes, and the energetic phenotype of the cells is redistributed towards less mitochondrial and more glycolytic. There is also an increase in the production of intracellular and mitochondrial reactive oxygen species and caspase-1 activity, indicating an activated state of microglia after exposure to viral sequence-stimulated exosomes.

## TURINYS

<b>SANTRUMPŲ IR TERMINŲ SĄRAŠAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>10</b>
1.1 Viršutinių kvėpavimo takų virusinės infekcijos ir jų sukeltas imuninis atsakas.....	10
1.2 Egzosomos ir jų struktūra.....	12
1.3 Egzosomų biogenezė.....	14
1.4 Egzosomų išskyrimas ir charakterizavimas.....	15
1.5 Egzosomų funkcija ir reikšmė.....	16
1.6 Mikroglijos ląstelės ir jos morfologinės formos.....	17
1.7 Mikroglijos reikšmė imuninio atsako reguliavimui.....	17
1.8 Mitochondrijų struktūra ir funkcijos.....	19
1.9 Ląstelinis kvėpavimas.....	20
1.10 Mitochondrijų reikšmė imunometabolizme.....	21
1.11 Mitochondrijų reikšmė neurouždegimų metu.....	23
1.12 Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir projekto tikslo pagrindimas.....	24
<b>2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI</b> .....	<b>26</b>
2.1 Naudotos medžiagos.....	26
2.2 Imortalizuotos žmogaus mikroglijos ląstelių linijos paruošimas tyrimams.....	27
2.3 Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus įvertinimas.....	28
2.4 Egzosomų preparatų paruošimas iš imortalizuotos žmogaus bronchų epitelio ląstelių kultūros.....	29
2.5 Mikroglijos veikimas bronchų epitelio ląstelių egzozomomis.....	30
2.6 Egzosomų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	31
2.7 Egzosomų identifikavimas pagal dydį dinaminės šviesos sklaidos metodu.....	32
2.8 Egzosomų identifikavimas imunofermentiniu ELISA metodu pagal CD9 žymens koncentraciją.....	32
2.9 Mikroglijos ląstelių gyvybingumo įvertinimas.....	33
2.10 Egzosomų patekimo į mikroglijos ląsteles nustatymas.....	34
2.11 Mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumo įvertinimas mikroglijos ląstelėse.....	34
2.12 Mikroglijos ląstelių viduląstelių aktyvių deguonies junginių kiekio nustatymas.....	38
2.13 Mikroglijos ląstelių vidumitochondrinių aktyvių deguonies junginių kiekio nustatymas.....	38
2.14 Kaspazės-1 aktyvumo įvertinimas mikroglijos ląstelėse.....	39
2.15 Statistinių duomenų analizė.....	39
<b>3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	<b>40</b>
3.1 Išskirtų kvėpavimo takų ląstelių egzozomų charakterizavimas.....	40
3.2 Kvėpavimo takų ląstelių egzozomų patekimas į mikroglijos ląsteles.....	42
3.3 Kvėpavimo takų išskiriamų egzozomų poveikis mikroglijos gyvybingumui.....	43
3.4 Kvėpavimo takų išskiriamų egzozomų poveikis mikroglijos mitochondrijų funkcijai.....	44
3.5 Kvėpavimo takų išskiriamų egzozomų poveikis aktyvių deguonies junginių susidarymui.....	51
3.6 Kvėpavimo takų išskiriamų egzozomų poveikis kaspazės-1 aktyvinimui mikroglijos ląstelėse.....	56
3.7 Projekto rezultatų apibendrinimas ir jų svarba.....	58
<b>IŠVADOS</b> .....	<b>59</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	<b>60</b>

## SANTRUMPŲ IR TERMINŲ SĄRAŠAS

**acetil-Ko-A** – acetilkofermentas A arba kofermentas A

**ADJ** – aktyvūs deguonies junginiai

**ADP** – adenzindifosfatas

**ATP** – adenzintrifosfatas

**CARD** – kaspazę pritraukiantys domenai (angl. *Caspase recruitment domains*)

**CNS** – centrinė nervų sistema

**DAMP** – su pažeistomis molekulinėmis struktūromis susiję ligandai (angl. *Damage-associated molecular patterns*)

**DCF** – 2,7-dichlorofluoresceinas

**DMEM** – ląstelių mitybinė terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

**DNR** – deoksiribonukleorūgštis

**ECAR** – tarpląstelinis rūgštėjimo greitis (angl. *Extracellular acidification rate*)

**EDTA** – etilendiamintetraacto rūgštis

**ELISA** – imunofermentinės analizės metodas (angl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

**ESCRT** – transportui reikalingas endosomų rūšiavimo kompleksas (angl. *Endosomal sorting complexes required for transport*)

**FAD** – flavino adenino dinukleotidas

**FCCP** – karbonilcianido-4-(trifluormetoksi)fenilhidrazonas

**FDB** – fosfatinis druskų buferis

**H<sub>2</sub>DCF** – 2,7-dichlorodihidrofluoresceinas

**H<sub>2</sub>DCFDA** – 2,7-dichlorodihidrofluoresceino diacetatas

**HBSS** – Hankso subalansuotas druskos tirpalas (angl. *Hank's Balanced Salt Solution*)

**IL** – interleukinas

**ILV** – vidinės endosomų pūslelės (angl. *intraluminal vesicle*)

**INF** – interferonas

**iRNR** – informacinė RNR

**KoQ** – kofermentas Q

**KTEL** – kvėpavimo takų epitelio ląstelės

**LPS** – lipopolisacharidai

**MAVS** – mitochondrijų antivirusinio signalo perdavimo baltymas (angl. *Mitochondrial antiviral-signaling protein*)

**MDA-5** – su melanomos disociacija susijęs genas 5

**MHC** – didysis audinių suderinamumo kompleksas (angl. *Major histocompatibility complex*)

**miRNR** – mikro-RNR

**mtDNR** – mitochondrijų DNR

**MVB** – daugiapūslelinis kūnas (angl. *Multivesicular body*)

**NAD** – nikotinamido adenino dinukleotidas

**NF-κB** – aktyvuotų B limfocitų lengvasias grandines sustiprinantis branduolio veiksnys kappa (angl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

**NLR** – nukleotidų oligomerizacijos domeno receptoriai (angl. *Nucleotide oligomerization domain-like receptor*)

**NOD** – nukleotidų oligomerizacijos domenas

**OCR** – deguonies suvartojimo greitis (angl. *Oxygen Consumption Rate*)

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

**PEG** – polietilenglikolis

**Poli I:C** – poliinozino policitidino rūgštis (angl. *Polyinosinic: polycytidylic acid*)

**PRR** – specifinės molekulinės struktūros atpažįstantys receptoriai (angl. *Pattern recognition receptors*)

**RIG-I** – Retino rūgštį indukuojantis genas 1

**RLR** – Retino rūgštį indukuojančio geno 1 receptoriai (angl. *Retinoic acid-induced gene I-like proteins receptor*)

**RNR** – ribonukleorūgštis

**SOD** – superoksido dismutazės fermentas

**TCA** – trikarboksirūgščių ciklas (angl. *Tricarboxylic acid cycle*)

**TLR** – Toll tipo receptoriai (angl. *Toll-like receptor*)

**TNF** – navikų nekrozės faktorius (angl. *Tumour necrosis factor*)

**UCP2** – atkabinimo baltymas 2 (angl. *Uncoupling protein*)



## IVADAS

Vieni dažniausių infekcinių susirgimų – tai viršutinių kvėpavimo takų virusinės infekcijos [1]. Paprastai, tokios infekcijos lokaliai veikia vieną audinį ar organą, tačiau kai kurie veiksniai, sukeliantys infekcijas, pūslelinės komunikacijos būdu gali būti pernešami į kitus organizmo audinius ar organus [2]. Egzosomos – tai mažos, ląstelių produkuojamos pūslelės, svarbios tarpląstelinei komunikacijai: medžiagų pasikeitimui tarp ląstelių, nereikalingų baltymų ir kitų molekulių pašalinimui [3]. Pūslelės gali veikti lokaliai arba sukelti sisteminių poveikį, cirkuliuodamos įvairiuose organizmo skysčiuose [4]. Taip pat egzosomos geba pereiti kraujo-smegenų barjerą [5–6], todėl tikėtina, kad jos į smegenis gali pernešti uždegiminius procesus inicijuojančius veiksniai ir prisidėti prie neurouždegiminių procesų susidarymo, kurie turi svarbią reikšmę vystantys neurodegeneraciniams susirgimams.

Mikroglijos ląstelės – tai pagrindinės imuninės smegenų ląstelės, kurios svarbios palaikant homeostazę smegenyse ir sukuriant imuninį atsaką į uždegiminius procesus [7]. Aktyvinta mikroglia išskiria įvairius priešuždegiminius veiksniai, kurie yra svarbūs imuniniame infekcinių, uždegiminių, išeminių ir degeneracinių centrinių nervų sistemos ligų atsake [8]. Nors yra žinoma, kad egzosomos patenka į smegenis, tačiau nėra ištirta, kaip periferijoje virusinių infekcijų poveikyje susidariusios egzosomos veikia smegenų ląsteles. Projekto metu atlikti tyrimai, gali suteikti naujų duomenų apie galimą neurouždegimų susidarymą ir potencialius neurodegeneracinių susirgimų iniciacijos mechanizmus, veikiant smegenų ląsteles periferijoje infekcijų metu ląstelių išskirtomis egzosomomis.

**Šio projekto tikslas** – ištirti viruso mimetiku poli I:C veikiamų kvėpavimo takų epitelio ląstelių egzosomų reikšmę žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvinimui.

### **Projekto tikslui pasiekti išsikelti uždaviniai:**

1. išskirti virusine poli I:C seka stimuliuotas ir nestimuliuotas egzosomas iš kvėpavimo takų epitelio ląstelių ir charakterizuoti jas pagal dalelių dydį ir specifinius žymenis;
2. įvertinti kvėpavimo takų egzosomų patekimą į mikroglijos ląsteles ir nustatyti jų poveikį mikroglijos ląstelių gyvybingumui;
3. įvertinti poli I:C seka stimuliuotų egzosomų įtaką mitochondrijų funkcijoms mikroglijos ląstelėse;
4. ištirti poli I:C seka stimuliuotų egzosomų įtaką aktyvių deguonies junginių susidarymui mikroglijos ląstelėse;
5. įvertinti poli I:C seka stimuliuotų egzosomų įtaką kaspazės-1 aktyvinimui mikroglijos ląstelėse.

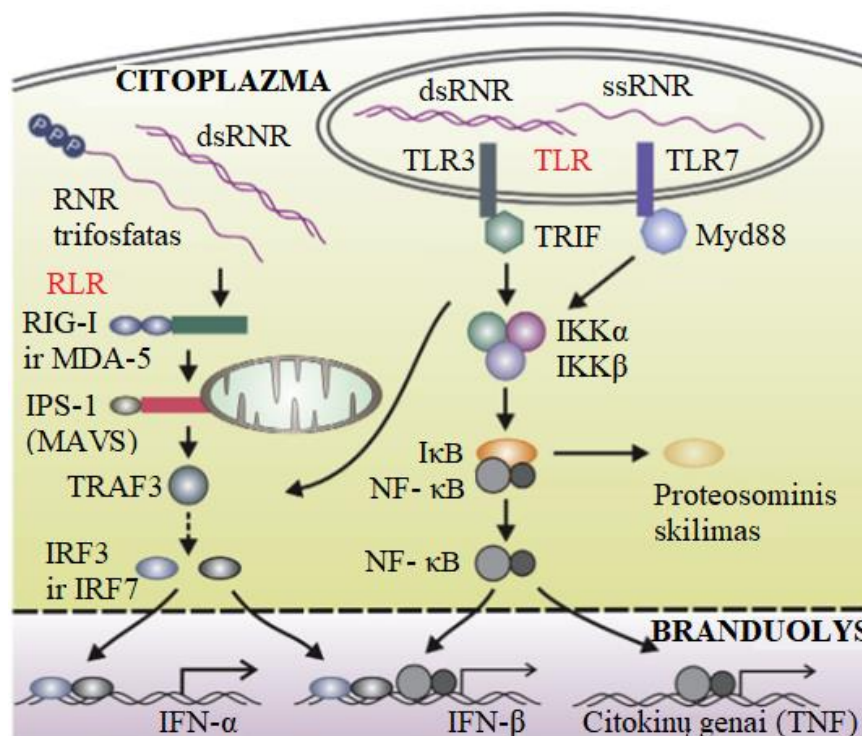
## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1 Viršutinių kvėpavimo takų virusinės infekcijos ir jų sukeliamas imuninis atsakas

Kvėpavimo takai skirstomi į viršutinius, kuriuos sudaro nosies ertmė, ryklė, gerklos, ir apatinius kvėpavimo takus, kuriems priskiriama trachėja, bronchai, bronchiolės ir plaučiai. Vidinę šių organų dalį dengia epitelio ląstelės, sudarančios fizinį barjerą, apsaugantį nuo patogenų patekimo į organizmą, kuris yra svarbi įgimto imuniteto dalis. Visus kvėpavimo takus, išskyrus plaučius, dengia gleivių sluoksnis, padedantis pašalinti čia patekusius patogenus. Nepaisant minėtų apsauginių mechanizmų šeimininko kvėpavimo takus galima užkrėsti virusais, šiems prisijungiant prie specifinių receptorių. Dauguma virusų, užkrečiančių žmones, į organizmą patenka aerozolių forma, susidarančių kosėjant ar čiaudint kitam užsikrėtusiam žmogui. Dažniausi virusai sukeliantys viršutinių kvėpavimo takų infekcijas – tai *gripo* virusas, *rinovirusas*, *kvėpavimo-sinticijos* virusas, *paragripo* virusas, *koronavirusas*, *bokavirusas* ir *metapneumovirusas* [9]. Nustatyta, kad per metus dėl viršutinių kvėpavimo takų infekcijų įvyksta 10 milijonų ambulatorinių vizitų pas gydytojus, o 70–90 % šių infekcijų sukelia virusai [1, 9].

Virusinės infekcijos skatina įgimtą arba nespecifinį ir įgytą arba specifinį imuninį atsaką. Įgimtas imuninis atsakas yra suaktyvinamas pradinėse užsikrėtimo stadijose, kuomet su patogenais susijusios molekulinės struktūros (angl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) prisijungia prie šias specifines molekulinės struktūras atpažįstančių receptorių (angl. *Pattern recognition receptors*, PRR) [10]. Įgytas imuninis atsakas yra kompleksiškesnis, turintis atmintį, atsiranda vėlesnėse virusinės infekcijos stadijose. Jo metu yra atpažįstami specifiniai antigenai ir sukeliamas B ir T limfocitų atsakas [9–10]. Efektyvus imuninis atsakas į virusines infekcijas priklauso nuo abiejų tipų imunitetų sąveikos [9].

PRR atpažįsta virusinę dvigrandę ir viengrandę ribonukleorūgštį (RNR), RNR su 5`trifosfatais, deoksiribonukleorūgštį (DNR) ir kitus baltymus. PRR receptorių klasę sudaro trys pagrindinės receptorių grupės: retino rūgštį indukuojančio geno 1 (RIG-I) baltymų receptoriai (angl. *Retinoic acid-induced gene I-like proteins receptor*, RLR); Toll tipo receptoriai (angl. *Toll-like receptor*, TLR); nukleotidų oligomerizacijos domeno (NOD) receptoriai (angl. *Nucleotide oligomerization domain-like receptor*, NLR). Kiekvienos grupės receptoriai atsakingi už tam tikrų virusinių komponentų atpažinimą ir aktyvuoja skirtingas imuninio atsako sritis [11]. TLR ir RLR receptorių aktyvuojami imuninio atsako signalų perdavimo procesai, dar vadinami kaskada, pavaizduoti 1.1 paveiksle.



1.1 pav. Imuninio atsako signalo perdavimo keliai. Adaptuota pagal [11]

RLR yra būtini sukeliant įgimtą imuninį atsaką į RNR virusus, turinčius helikazės ir C-galinio represoriaus domenų. Kaspazę pritraukiantys domenai (angl. *Caspase recruitment domains*, CARD), aptinkami RIG-I gene, ir su melanomos disociacija susijusio geno 5 (MDA-5) baltymai svarbūs tolimesniam imuninio signalo perdavimui RLR receptoriniu keliu [11–13]. RLR receptorių šeimos nariai į virusines infekcijas reaguoja skirtingai. RIG-I dalyvauja esant *hepatito C*, *paramikso* viruso ir *gripo* viruso infekcijoms, o MDA-5 suaktyvina įgimtą imuninį atsaką į *pikornavirusą* [11, 14–16]. Imuniniam atsakui į *reovirusą* reikalingi ir RIG-I, ir MDA-5 [17]. Po RNR prisijungimo prie RIG-I ir MDA-5, šie baltymai asocijuojasi su CARD turinčiu adapteriu, kitaip vadinamu interferono (IFN) β promotoriaus stimulatoriumi 1 (1.1 pav. IPS-1), arba su mitochondrijų antivirusinio signalo perdavimo baltymu (angl. *Mitochondrial antiviral-signaling protein*, MAVS). Vėliau, suaktyvinus su navikų nekrozės faktoriaus (angl. *Tumour necrosis factor*, TNF) receptoriu asocijuotą faktorių TRAF-3, stimuliuojami I tipo INF genai [18–21]. Padidėja IFN-α ir IFN-β sekrecija, kuriems būdingas pagrindinis antivirusinis poveikis. Aktyvuotas MAVS skatina INF reguliuojančių veiksnių (angl. *Interferon regulatory factor*) IRF3 ir IRF7 bei branduolio veiksnio kappos, kuris stiprina aktyvuotų B limfocitų lengvasias grandines NF-κB (angl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), aktyvaciją, taip indukuojant antivirusinių citokinių gamybą [22]. Citokinių, tokių kaip TNF-α, interleukinų (IL) IL-1β ir IL-6, išskyrimas skatina imuninių ląstelių pritraukimą į infekcijos vietas ir sukelia uždegimą [18]. Taip pat padidėjus kostimuliuojančių molekulių, tokių kaip CD40, CD80 ir CD86, sintezei išskiriami priešuždegiminiai citokinai ir chemokinai, kurie prisideda prie T limfocitų imuninio atsako [11].

TLR receptoriai – tai membranos receptoriai, kurių funkcijas lemia jų struktūra ir lokalizacija. Šio tipo PRR receptoriai gali atpažinti virusų komponentus, esančius ląstelių išorėje ir citoplazminėse vakuolėse. Žmonių organizmuose aptinkama mažiausiai dešimt TLR tipų [21]. TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 ir TLR9 yra ypač svarbūs atpažįstant virusus. TLR2 ir TLR4 randami ant plazminių membranų

ir atpažįstą virusų paviršinius baltymus. TLR3, TLR7 ir TLR9 atpažįsta viduląstelines virusines struktūras, esančias citoplazmos vakuolėse. Dvigrandė RNR aktyvuoja signalą per TLR3, o viengrandė RNR bei DNR, su nemetilintomis CpG salomis, aktyvuoja signalą per TLR7 ir TLR9 receptorius. Imuninio atsako signalinis kelias „paleidžiamas“, kuomet prie receptorių prisijungia mieloidinis diferenciacijos faktorius 88 (*I.1 pav.* Myd88) arba žmogaus IL-1 receptorių homologo domenais TRIF, sukeliantis INF- $\beta$  sintezę. Tokiu būdu indukuojamo imuninio atsako rezultatas – aktyvinama uždegiminio atsako genų ekspresija, kuriai daugiausia įtakos turi NF- $\kappa$ B, IRF3 ir IRF7 transkripcijos faktoriai ir I $\kappa$ B kinazės (IKK $\alpha$  ir IKK $\beta$ ) [18–21]. TLR ir RLR aktyvuojami imuninio atsako keliai, susiję tarpiniais molekuliniais produktais [11].

IL-1 $\beta$  ir IL-18 tarpininkauja kitame svarbiame įgimto imuninio atsako mechanizme virusinių infekcijų metu. [23]. Skirtingai nuo TLR ir RLR receptorinių kelių, IL-1 $\beta$  ir IL-18 gamyba aktyvuojama, kaspazei-1 skaidant citokinų pirmtakus [24–25]. Šis procesas vyksta inflamasiomoje [26]. Keletas uždegiminių baltymų, tokių kaip NOD leucino gausias pasikartojančias sritis turinčių receptorių ir su apoptozės kaskada susijusių baltymų, turinčių CARD, dalyvauja kaspazės-1 veikloje, iš IL-1 $\beta$  prekursoriaus – pro-IL-1 $\beta$  suformuojant subrendusį ir biologiškai aktyvų IL-1 $\beta$  [21, 27]. Tikslus inflamasiomos vaidmuo dalyvaujant įgimto imuninio atsako į virusines infekcijas metu nėra žinomas. Tačiau yra duomenų, kad dvigrandė RNR ir *adenovirusų* DNR gali suaktyvinti pro-IL-1 $\beta$  perdurbimą. Taip pat yra duomenų, kad DNR virusai gali modifikuoti inflamasiomos funkciją, kad išvengtų įgimto imuninio atsako mechanizmo [11].

Dažnai eksperimentuose siekiant imituoti virusines infekcijas naudojami sintetiniai virusinės dvigrandės RNR analogai, pavyzdžiui, poliinozino policitidino rūgštis (angl. *Polyinosinic: polycytidylic acid*, poli I:C), kuri jungiasi prie TLR3 receptorių ir *in vitro* inicijuoja virusinę infekciją [28]. Imuninis atsakas į poli I:C sintetinę dvigrandę RNR seką, atitinka anksčiau aptartą klasikinių priešvirusinį atsaką, sukeliama per TLR receptorius. *In vitro* imuninio atsako tyrimuose realius virusus pakeitus poli I:C viruso mimetiku, jie tampa – saugesni, greitesni ir paprastesni [29].

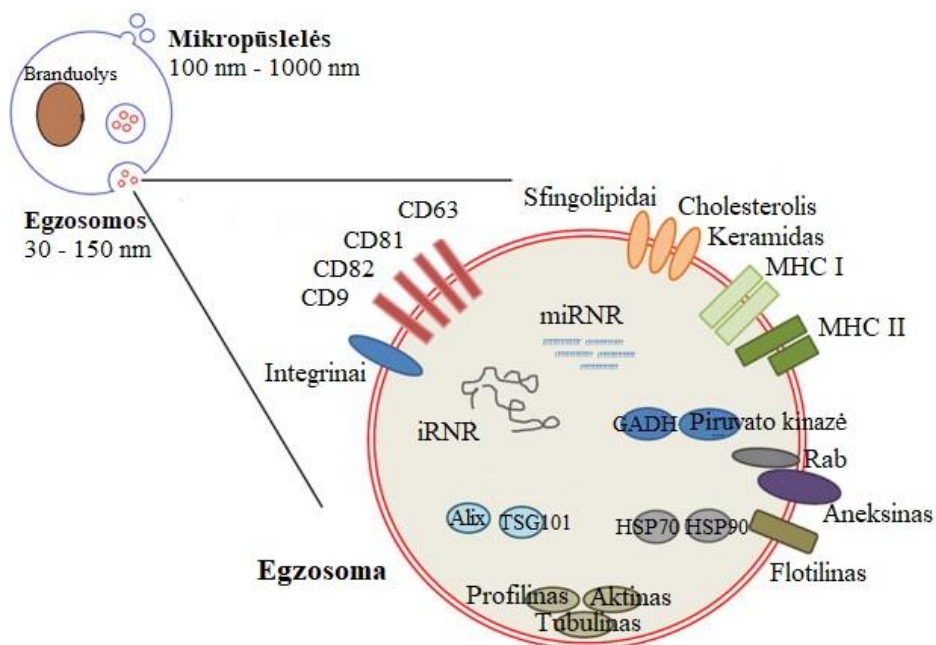
Virusai, sukeliantys viršutinių kvėpavimo takų infekcijas, paprastai veikia tik lokaliai. Tarpląstelinei komunikacijai svarbios ląstelių produkuojamos pūslelės – egzosomos, galinčios laisvai pereiti biologinius barjerus. Yra žinoma, kad egzosomų sudėtis kinta priklausomai nuo jas išskiriančių ląstelių tipo, fiziologinių ar pataloginių ląstelės sąlygų [30], tačiau dar nėra pakankamai ištirtas virusinių infekcijų metu susidariusių egzosomų poveikis į toliau nuo infekcijos židinio nutolusius organizmo audinius ar organus.

## 1.2 Egzosomos ir jų struktūra

Ekstraląstelinės pūslelės – tai sferinės pūslelės, apgaubtos dvigubu lipidiniu sluoksniu, kurios įvairių ląstelių tipų yra išskiriamos į tarpląstelinius skysčius. Tokias pūsleles galima rasti kraujyje, serume, motinos piene, seilėse, šlapime, smegenų skystyje ir kituose organizmo skysčiuose [30]. Remiantis jų dydžiu, fizikinėmis savybėmis ir sudėtimi ekstraląstelinės pūslelės skirstomos į tris tipus: mikropūsleles, 50–1000 nm skersmens pūsleles, susidarančias iš plazminės membranos, egzosomas, kurios susidaro iš endosomų ir yra 30–150 nm skersmens, ir apoptotinius kūnelius, kurie atsiranda apoptozės metu, o jų skersmuo – 50–500 nm [31].

Egzosomų sudėtis kinta priklausomai nuo jas išskiriančių ląstelių tipo, fiziologinių ar pataloginių ląstelės sąlygų [30]. Egzosomos sudėtingos ląstelinės struktūros, kurias sudaro įvairios biomolekulės

– iki 4563 baltymų, 194 lipidų, virš dviejų tūkstančių RNR molekulių [32–34]. Schematinė egzosomų sudėtis pavaizduota 1.2 paveiksle.



1.2 pav. Egzosomų sudėtis. Adaptuota pagal [41]

Pagrindiniai egzosomų transmembraniniai baltymai tetraspaninai (CD9, CD63, CD81, CD82) yra svarbūs vidinių pūslelių biogenezei [35]. Šie proteinais turi keturis transmembraninius domenus ir membranose gali suformuoti sritis – tetraspaniniais gausius membraninius domenus (angl. *tetraspanin-enriched membrane domains*). Manoma, kad šie domenai gali sąveikauti tarpusavyje arba su kitais baltymais [36]. Egzosomų, išskiriamų iš dendritinių ląstelių paviršiuje yra didieji audinių suderinamumo kompleksai (angl. *Major histocompatibility complex*, MHC) MHC I ir MHC II, kurie svarbūs imuniniame reguliavime, jie gali dalyvauti antigeno pateikime [37–38]. Egzosomose randami ir citozoliniai baltymai, pavyzdžiui, aneksinas, Rab baltymas, flotilinas, kurie reikalingi pūslelių susiliejimui ir medžiagų transportavimui per membraną. Citozoliniai baltymai Alix, TSG101 dalyvauja egzosomų biogenezeje, jai formuojantis iš endosomų [39–40]. Pūslelėse citoskeleto funkciją atlieka aktinas, tubulinas, profilinas ir kt. baltymai, o reakcijas katalizuoja metaboliniai fermentai (GAPDH, piruvato kinazė) [41]. Egzosomose randami ir šiluminio šoko baltymai (Hsp70, Hsp90) reaguojantys į aplinkos stresą ir padedantys susilankstyti baltymams [3].

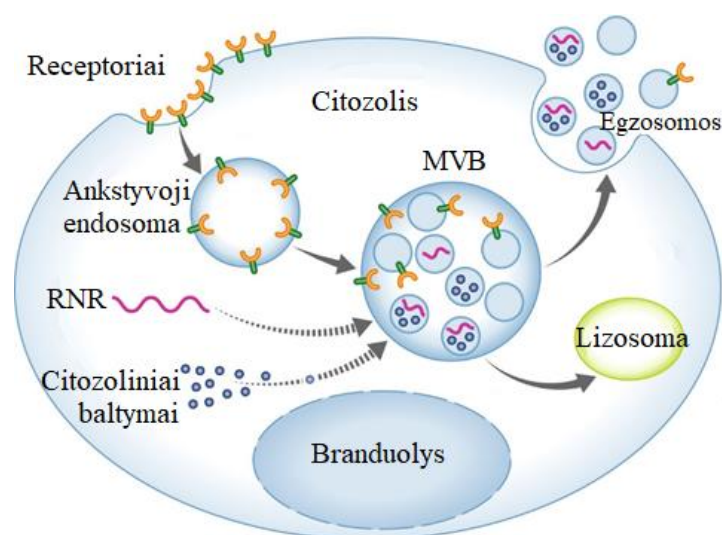
Pagrindiniai egzosomų lipidai – cholesterolis, sfingolipidai, keramidas ir glicerolfosfolipidai, sudaryti iš sočiųjų riebalų rūgščių. Sfingolipidai ir cholesterolis svarbūs egzosomų stabilumo palaikymui, taip pat padeda apsaugoti pūsleles nuo suardymo kraujo ląstelėmis [42]. Egzosomose taip pat randama prostaglandinų bei laisvųjų riebalų rūgščių, tokių kaip arachidono rūgštis iš kurios sintetinami prostaglandinai [43].

H. Valadi su kolegomis nustatė, kad egzosomose yra informacinės RNR (iRNR) ir mikro-RNR (miRNR) [44]. Vėlesni tyrimai parodė, kad pūslelėse randama ir ilgų nekoduojančių RNR [45]. iRNR transkriptai gali būti paversti baltymais transliacijos metu [44]. Tačiau naujausi tyrimai rodo, kad egzosomose esančios iRNR reikšmė daugiau reguliacinė nei funkcinė, dėl gausių 3'-netransliuojamų

sričių iRNR transkripte [46]. miRNR yra funkcionali recipiento ląstelėse ir gali slopinti genų raišką [47].

### 1.3 Egzosomų biogenezę

Eukariotinėse ląstelėse plazminei membranai pumpuruojantis į ląstelės vidų susidaro viduląstelinės pūslelės, kurios susiliejusios suformuoja didesnes pūsleles – ankstyvasias endosomas. Ankstyvųjų endosomų brendimas iki vėlyvųjų yra susijęs su baltymų pokyčiais [48]. Endosominei membranai linkstant į vidų ir apgaubiant dalį citozolio su jame esančiais baltymais, RNR, taip pat įterpiant transmembraninius baltymus, formuojasi vidinės endosomų pūslelės (angl. *Intraluminal vesicle*, ILV) [48–49]. Tokiu būdu endosomos subręsta iki vėlyvųjų endosomų, dar kitaip vadinamų daugiapūslelinių kūnelių (angl. *Multivesicular body*, MVB) [50]. Bręstant endosomos pakeičia savo formą iš primenančios vamzdelius į sferinę, taip pat priartėja prie branduolio [49]. MVB toliau gali susiliesti su lizosomomis, ir jo turinys gali būti suardytas hidrolizės fermentų [51], arba gali susiliesti su ląstelės plazmine membrana ir egzocitozės būdu į tarpląstelinę terpę atpalaiduoti ILV, kaip egzosomas (žr. 1.3 pav.) [50].



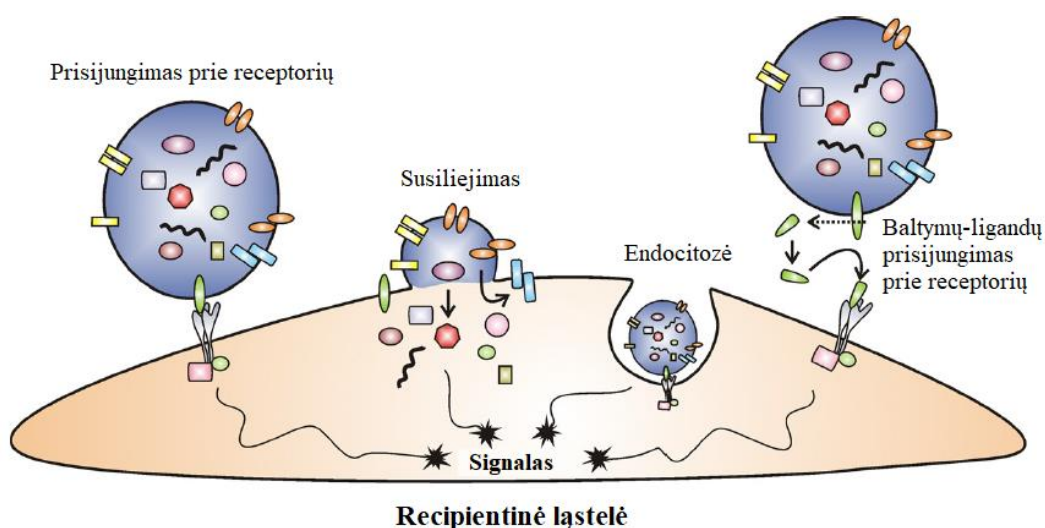
1.3 pav. Egzosomų biogenezę. Adaptuota pagal [13]

Egzosomas sekretuoja dauguma ląstelių tiek normaliomis fiziologinėmis, tiek pataloginėmis sąlygomis [52]. Jos gali būti sekretuojamos bręstant endosomoms anksčiau aptartu būdu, kai yra panaudojami ląstelės plazminės membranos ir citozolio baltymai. Tačiau pūslelės gali būti sintetinės ir *de novo* iš endoplazminio tinklo ir Goldžio komplekso komponentų iš karto į MVB [53].

MVB ir ILV formavime svarbų vaidmenį atlieka transportui reikalingi endosomų rūšiavimo kompleksai (angl. *Endosomal sorting complexes required for transport*, ESCRT) [13]. Tai baltyminiai kompleksai randami ant MVB membranų [54]. ESCRT-0 kompleksas atpažįsta ubikvitilintus baltymus ir juos surūšiuoja į endosomas, taip pat aktyvina ESCRT-I ir ESCRT-II kompleksus, kurie dalyvauja membranos įlenkime. Vėliau ESCRT-III kompleksas nuo membranos atskiria susiformavusią pūslelę [55]. Be ESCRT, pūslelių pernašai svarbi ir keramido-tetraspaninų pernašos sistema. Kai kuriose ląstelėse ILV ir MVB formavimą, t. y. membranų pumpuravimą inicijuoja sfingomielinazė, kuri hidrolizuoja plazminės membranos sfingomieliną ir sukelia keramido

kaupimą [56]. Krovinių į endosomas perkėlime ir ILV formavime dalyvauja tetraspaninai (CD63, CD81) [57]. Nustatyta, kad nesubrendusių dendritinių ląstelių MVB, kurių membranose mažai cholesterolio ir gausu lizobifosfato rūgšties, yra nukreipiamos į lizosomas. Subrendusiuose dendritinių ląstelių MVB – gausu cholesterolio ir tetraspaninų (CD9), šios pūslelės yra nukreipiamos į plazminę membraną [58]. MVB susiliejime su plazmine membrana dalyvauja SNARE baltymai ir Rab GTPazės [59].

Recipientines ląsteles, arba ląsteles-taikinius, egzosomos gali veikti tiesioginiu ir netiesioginiu būdu [53, 60]. Fagocitozė, endocitozė, makropinocitozė ir egzosomos susiliejimas su taikinio ląstelės plazmine membrana, atpalaiduojant savo turinį į ląstelės vidų, priskiriami tiesioginio veikimo būdams. Netiesioginio veikimo metu egzosomų plazminėje membranoje esantys baltymai jungiasi prie recipientinių ląstelių receptorių. Taip pat šie baltymai gali būti atskeliami nuo endosominės membranos ir veikti receptorių kaip ligandai (žr. 1.4 pav.) [53, 60–61].

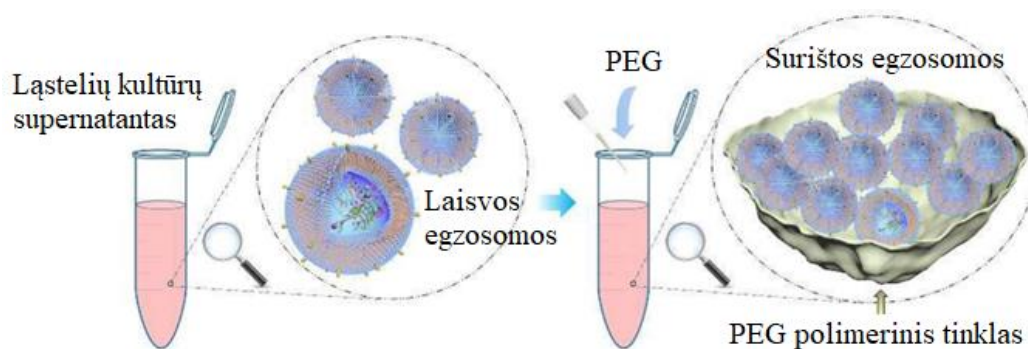


1.4 pav. Egzosomų veikimo būdai recipientinėms ląstelėms. Adaptuota pagal [61]

#### 1.4 Egzosomų išskyrimas ir charakterizavimas

Egzosomų, išskyrimui iš biologinių skysčių, identifikavimui taikomi įvairūs metodai. Mokslinėje literatūroje dažniausiai aprašomi įvairūs chromatografiniai metodai, ultracentrifugavimas, filtravimas, nusodinimas polimeru bei įvairūs imunologiniai metodai [62]. Ultracentrifugavimas – tai centrifugavimo procesas, kurio metu naudojamos itin didelės išcentrinės jėgos, paprastai, iki 100 000 g. Priklausomai nuo išcentrinės jėgos dydžio suspensijos dalelės gali būti išskirstomos pagal fizikines savybes ir tirpiklio tankį bei klampą [63]. Filtruojant naudojamos ultrafiltravimo membranos, kurios atskiria egzosomas nuo baltymų ir kitų makromolekulių. Chromatografiniai metodai lyginant su ultracentrifugavimu leidžia geriau atskirti egzosomas, jas frakcionuojant pagal dydį, taip pat taikant šį metodą dalelės nėra veikiamos didelėmis išcentrinėmis jėgomis, todėl mažesnė jų dalis yra pažeidžiama išskyrimo metu [62]. Egzosomų nusodinimas polimeru paremtas dalelių tirpumo ir sklaidumo pokyčiais tirpale. Vienas dažniausiai naudojamų polimerų egzosomų išskyrimui yra polietilenglikolis (PEG) [62, 64–66]. Vandeninis PEG tirpalas suformuoja polimerinį tinklą, kuris sulipina egzosomas į agregatus, ir taip sudaromos sąlygos jų nusodinimui centrifuguojant. Toks metodas yra pigus, greitas, nereikalaujantis papildomos įrangos ir leidžiantis išsodinti egzosomas, naudojant žemus centrifugavimo greičius [67] (žr. 1.5 pav.). Taip pat šiuo metodu egzosomas

išskiriamos neutraliame pH [63]. Pastaruoju metu vis dažniau taikomi mišrūs egzosomų išskyrimo būdai, siekiant kokybiškiau išgryninti nanopūsleles [64].



1.5 pav. Egzosomų nusodinimas PEG. Adaptuota pagal [67]

Egzosomos charakterizuojamos pagal dydį, baltymų ar lipidų kiekį. Paprastai jos identifikuojamos vaizdinant, nustatant dalelių dydį ar paviršiaus žymenis [68]. Egzosomų morfologijai patvirtinti naudojama transmisinė elektronų mikroskopija, skenuojanti elektronų mikroskopija, atominės jėgos mikroskopija ir krioelektroninė mikroskopija [69]. Dalelių dydis ir jų pasiskirstymas suspensijoje nustatomas nanodalelių sekimo analizės (angl. *Nanoparticle tracking analysis*) ir dinaminės šviesos sklaidos (angl. *Dynamic light scattering*) metodais naudojant įvairius analizatorius [70]. Egzosomų identifikavimui pagal specifinius ir nespecifinius žymenis dažniausiai naudojama masių spektrometrija, tėkmės citometrija, imunoblotai, pavyzdžiui, *Western blotas*, ir imunofermentinės analizės metodas ELISA (angl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) [71]. Egzosomų paviršiaus žymenimis laikomi tetraspaninai – CD9, CD82, CD81 ir CD63. Taip pat egzosomos gali būti identifikuojamos ir iš šiluminio šoko ar membraninių transportinių baltymų buvimo [68].

### 1.5 Egzosomų funkcija ir reikšmė

Egzosomos yra svarbios tarpląstelinei komunikacijai: medžiagų pasikeitimui tarp ląstelių, nereikalingų baltymų ir kitų molekulių pašalinimui [3]. Jei ląstelė patiria stresą: yra toksinėse sąlygose, trūksta deguonies ar turi DNR pažeidimų yra aktyvinamas navikus slopinantis genas p53. Šis genas sukelia TSAP6 ir CHMP4C genų transkripciją, dėl kurios aktyvinama egzosomų sekrecija. Su egzosomomis ląstelės išskiria įvairius baltymus, kurie aplinkinėse ląstelėse sukulia signalą ir sukuria atsaką į stresą [72–73]. Taigi, egzosomos vaidina svarbų vaidmenį slopinant naviko vystymąsi.

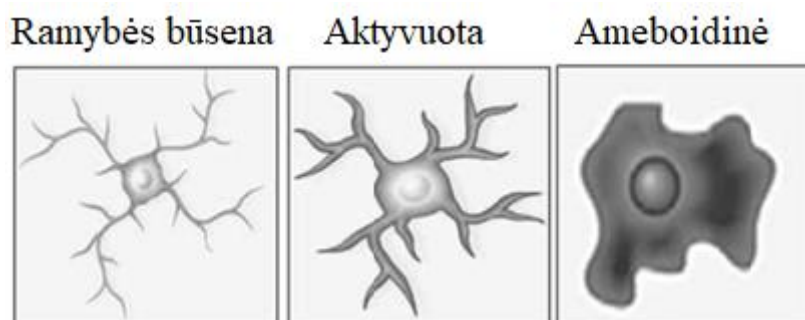
Be audinių homeostazės palaikymo šios pūslelės svarbios ir imuninio atsako moduliacijoje [60]. Priklausomai nuo egzosomas išskiriančių ląstelių kilmės ir kuriamo signalo jos gali skatinti arba slopinti organizmo imuninį atsaką. Imuninių ląstelių egzosomos padidina tolerogeninį atsaką ir taip sumažina transplanto atmetimo tikimybę [74]. Virusais paveiktų makrofagų egzosomos savo sudėtyje turi prouždegiminių citokininų, kurie aktyvina B ir T limfocitus ir taip stiprina imuninį atsaką [75–76]. Virusais paveiktos ląstelės turi viruso baltymų ir RNR, kurie recipientinėse ląstelėse sukulia infekciją, replikuojantis viruso genetinė medžiagai [32]. Dalyvaujant egzosomoms plinta *Herpes Simplex 1*, *Herpes 6*, *hepatito A, B, C* ir *žmogaus imunodeficito (ŽIV)* virusai [30]. Bakterijų, virusų, parazitų ar grybelių paveiktų ląstelių egzosomų sudėtyje yra patogeno komponentų, kurie gali būti pernešti kitoms ląstelėms [32]. Pūslelės gali veikti lokaliai arba sukelti sisteminį poveikį, cirkuliuodamos įvairiuose organizmo skysčiuose [4]. Egzosomos, susiformavusios periferijoje, gali pereiti kraujo-



smegenų barjerą ir pernešti uždegiminį signalą į smegenis [5–6]. Nepaisant to, kad žinoma, jog periferinės egzomosos patenka į smegenis, tikslus jų poveikis nėra žinomas.

## 1.6 Mikroglijos ląstelės ir jos morfologinės formos

Centrinę nervų sistemą (CNS) sudaro du ląstelių tipai: neuronai ir glijos ląstelės, kurioms priskiriami astrocitai, oligodendrocitai bei mikroglija. Mikroglijos ląstelės sudaro 5–12 % glijos ląstelių [77] ir yra svarbios imuniniame infekcinių, uždegiminių, išeminių ir degeneracinių CNS ligų atsake [8]. Tai imuninės smegenų ląstelės, kurios svarbios palaikant CNS homeostazę ir sukuriant imuninį atsaką į uždegiminius procesus [7]. Remiantis morfologiniais tyrimais išskiriamos trys mikroglijos ląstelių formos: ameboidinė, ramybės būsenos ir aktyvuota (žr. 1.6 pav.) [8].



1.6 pav. Morfologinės mikroglijos ląstelių formos. Adaptuota pagal [78]

Mikroglijos morfologinė būseną priklauso nuo uždegiminės aplinkos CNS [79]. Ameboidinės formos mikroglija fenotipiškai panaši į aktyvuotą, nes turi didelį sferinį ląstelės kūną. Organizmui vystantys ameboidinė mikroglija virsta ramybės būsenos mikroglija, kuri yra pagrindinė sveiko suaugusio žmogaus CNS dalis [8]. Mikroglija yra aktyvuojama dėl įvairių neurodegeneracinių ligų ir patologinėmis sąlygomis atsiradusių smegenų pažeidimų. *In vitro* tyrimų duomenimis mikroglijos ląstelės aktyvuoja įvairūs uždegiminiai faktoriai, tokie kaip bakterijų lipopolisacharidai (LPS), IFN- $\gamma$ ,  $\beta$ -amiloidinis baltymas (A $\beta$ ), trombinas ir priešūždegiminiai citokinai. Ilgai nepašalinus aktyvaciją sukėlusio pažeidimo mikroglijos ląstelės iš aktyvios formos pereina į ameboidinę [80].

## 1.7 Mikroglijos reikšmė imuninio atsako reguliavimui

Mikroglijos ląstelės turi PRR klasės receptorių TLR [81], kurie atpažįsta PAMP bei su pažeistomis molekulinėmis struktūromis (angl. *Damage-associated molecular patterns*, DAMP) susijusius ligandus. PAMP priskiriamos patogenų molekulinės dalys, o DAMP – agregavęsi peptidai, nesulankstyti baltymai ir kitos struktūros besikaupiančios pažeistose smegenyse [82, 79]. Ligandams prisijungus prie receptorių aktyvuojamos mikroglijos ląstelės.

Aktyvuotos mikroglijos sukeliama uždegiminis atsakas atrodo pastovus, nors dirgiklių pobūdis skiriasi. Ląstelėse prasideda morfologiniai ir funkciniai pokyčiai, siekiant užtikrinti CNS gynybinę sistemą. Aktyvuotos būsenos mikroglijos ląstelės išskiria įvairius citokinus, pavyzdžiui IL-10, chemokinus, laisvuosius radikalus, augimo faktorius ir prostaglandinus kaip atsaką į CNS atsiradusias nepalankias sąlygas [81, 83–85]. Manoma, kad aktyvuota mikroglija smegenyse imuninį atsaką sukelia dviem skirtingais ir vienas kitą papildančiais procesais [86]. Pirmojo metu ląstelės vykdo fagocitozę, taip sunaikindamos patogenus ar pažeistas ląsteles, antrojo metu – indukuojama azoto sintazė, dėl kurios padidinama kenksmingų junginių, tokių kaip azoto oksidas, išskyrimas [86–87].

Taip pat padidinama ir aktyvių deguonies junginių (ADJ) sintezė [85]. Šiems junginiams priskiriamos reaktyvios molekulės ar deguonies laisvieji radikalai, tokie kaip vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ), hidroksilo radikalas ( $\cdot OH$ ), superoksido anijonai ( $\cdot O_2^-$ ), hidroksilo jonai ( $OH^-$ ) ir kt. [88]

Išskiriami du mikroglijos aktyvavimo būdai klasikinis M1 ir alternatyvusis M2 [79]. M1 aktyvacijos metu ląstelės sekretuoja įvairius uždegiminius veiksnius, todėl sukelia neurouždegimines reakcijas, kurios skatina smegenų pažeidimus. Alternatyviosios aktyvacijos M2 metu sekretuojami priešuždegiminiai faktoriai, kurie šalina arba apsaugo galvos smegenis nuo pažeidimų [79, 89–90]. Taigi, aktyvavus mikrogliją sukuriama imuninė atsakas į neurouždegimą. Pastaruoju metu daugėja duomenų, kad neurouždegimas sukelia ar paskatina neurodegeneracinius procesus ir atvirkščiai. Uždegimas, kurio nesukelia patogenai ar toksinai tiesiogiai prisijungiant prie PRR receptorių, vadinamas steriliu uždegimu [81].

Literatūroje gausu duomenų apie neuronų-mikroglijos komunikaciją egzozomomis ir jų svarbą fiziologinėse ir patologinėse sąlygose CNS. Mikroglijos imuniniam atsakui svarbios jų produkuojamos egzozomos, skatinančios keramido ir sfingozino gamybą neuronuose, ir taip reguliuojančios uždegiminio atsako veiksmų plitimą per sinapses, kad būtų sustiprinama jų neurotransmisija *in vivo* ir *in vitro* [81, 91–92]. Mikroglijos ląstelės taip pat išskiria imunomoduliacines egzozomas, kuriose yra antigeno pateikimo molekulių (MHC-I ir MHC-II) ir su uždegimu susijusių miRNR [81]. Nustatyta, kad mikroglija yra astrocitu, oligodendrocitu ir neuronų išskiriamų egzozomų recipientė [91]. Tokia tarpląstelinė komunikacija egzozomomis susijusi su neurouždegimo patogenezė ir neurodegeneracinėmis ligomis [81].

Neurouždegimai yra susiję su periferinio imuninio atsako sistema [93]. Su gyvūnais atlikti tyrimai rodo, kad periferinio uždegimo dirgikliai yra svarbūs aktyvuojant mikroglijos ląsteles sepsio metu [94–95]. Nustatyta, kad patogenai veikiantys organizmą aktyvina mikroglijos genuose esančius stipriklius (angl. *Enhancers*) ir taip keičia genų raišką. Tačiau net iš organizmo pašalinus patogeninius veiksnius genų stiprikliai išlieka aktyvūs, o genų raiška išlieka pakeista, dėl kurios formuojama imuninė ląstelių atmintis [96]

Esant kvėpavimo takų uždegimui, padidėja kraujagyslių pralaidumas [97]. Tai turi įtakos bronchų epitelio ląstelių produkuojamų egzozomų [98] patekimui į sisteminę kraujotaką [2, 99]. Periferijoje kilęs uždegiminis signalas egzozomomis perduodamas per kraujo-smegenų barjerą ir aktyvina mikrogliją [93]. *In vivo* tyrimų su pelėmis metu nustatyta, kad bakterijų LPS stimuliuotos egzozomos, išskirtos iš kraujo serumo, sukelia ūmų periferinį uždegimą bei yra susijusios su neurouždegimu, nes aktyvuoja mikroglijos ir astrocitu ląsteles. Atlikta genų ekspresijos analizė patvirtino, kad tiriamosios grupės, iniciavusios neurouždegimą, egzozomose, rasta uždegiminė miRNR [93]. Gali būti, kad kvėpavimo takų ląstelių sekretuojamos egzozomos ir virusinių infekcijų metu sukelia mikroglijos ląstelių aktyvaciją bei palaiko imuninį atsaką galvos smegenyse.

Vykstant priešvirusiniam imuniniam atsakui stebimi mitochondrijų struktūriniai ir funkciniai pokyčiai [100]. Manoma, kad šių pokyčių atsiradimui įtakos turi mitochondrijų signalinis baltymas MAVS [101].

## 1.8 Mitochondrijų struktūra ir funkcijos

Mitochondrijos – tai po branduolio antros pagal dydį, eukariotinių ląstelių citoplazmoje, esančios organelės, kurių užimamas plotas yra  $0,75\text{--}3\ \mu\text{m}^2$  [102–103]. Jos randamos daugumos žinduolių ląstelėse, išskyrus subrendusius eritrocitus [102], o jų dydis, forma ir išsidėstymas priklauso nuo ląstelių rūšies [103]. Organelių kiekis ląstelėse priklauso nuo energetinio poreikio [104]. Miokardo ir griaučių raumenų ląstelėse mitochondrijų randama daugiau nei, pavyzdžiui, kepenų ląstelėse [103].

Mitochondrijas gaubia dvi membranos – išorinė ir vidinė, tarp kurių yra perimitochondrinė membranos ertmė [102], užpildyta vandenine terpe, kurioje randama citochromo c, svarbaus baltymo, dalyvaujančio mitochondrijų ląsteliniam kvėpavime ir apoptozėje [103–104]. Abi mitochondrijų membranos yra fosfolipidų dvisluoksniai, į kuriuos įsiterpę įvairūs baltymai. Išorinė mitochondrijų membrana sudaryta iš baltymų porinų, kurie sudarydami poras reguliuoja jonų patekimą į mitochondrijas ir iš jų. Vidinė membrana išsilanksčiusi klostėmis, dar vadinamomis kristomis, kurios padidina membranos paviršiaus plotą, ir yra svarbi oksidaciniam fosforilinimui. Per vidinę membraną jonai pernešami specialiais nešikliais [103]. Taip pat vidinėje membranoje gausu fermentų: glicerolio fosfatdehidrogenazės, sukcinato dehidrogenazės, kvėpavimo grandinės kompleksų, taip pat adenzintrifosfatų (ATP) gamybai svarbios ATP sintazės, bei transportinių baltymų, kurie reguliuoja metabolitų patekimą abipus membranos [104]. Erdvė tarp vidinės membranos ir mitochondrijų vidaus vadinama mitochondrijų užpildu (angl. *Matrix*) [104]. Šiame užpilde gausu fermentų, tokių kaip malato ir glutamato dehidrogenazės, riebalų rūgščių oksidacijos fermentų, trikarboksirūgščių ciklo (angl. *Tricarboxylic acid cycle*, TCA), dar vadinamu Krebso ciklu fermentų [102–103]. Taip pat randama mitochondrijų DNR (mtDNR), RNR, ribosomų bei kalcio granulių [102].

Mitochondrijos turi savo genomą, kurį ekspresuoja ir replikuoja branduolio užkoduoti veiksniai (angl. *Nucleus-encoded factors*), esantys mitochondrijų užpilde. mtDNR koduoja trylika proteinų, reikalingų oksidaciniam fosforilinimui, taip pat ribosomines ir transportines RNR, reikalingas jų translacijai [105].

Funkciniu požiūriu mitochondrijos yra universalios organelės, kurios nuolat pailgėja (susiliedamos), dalijasi formuodamos naujas mitochondrijas ar skyla mitofagijos kontroliuojamo proceso metu. Šie procesai atspindi pagrindinę mitochondrijų dinamikos struktūrą, lemiančią mitochondrijų morfologiją ir tūrį, bei leidžia joms greitai prisitaikyti prie energetinių ląstelės poreikių. Mitochondrijos keičia savo formą ir skaičių reaguodamos į organizmo fiziologines ar metaboles sąlygas ir taip palaiko ląstelių homeostazę [105–106].

Taip pat mitochondrijos yra pagrindinis ląstelių ADJ šaltinis, todėl jos aktyviai dalyvauja oksidaciniame stese [106]. ADJ yra itin reaktyvios molekulės, kurios gali oksiduoti DNR, baltymus, riebalus. Fiziologiniu lygmeniu ADJ yra kaip mitogeninės signalinės molekulės, dalyvaujančios tarpląsteliniam reguliavime, tačiau ADJ perteklius sukelia ląstelių žūtį ir skatina vidinį apoptozės kelią [102, 106].

Pagrindinė mitochondrijų funkcija metabolitų oksidacija Krebso ciklo metu ir ATP sintezė elektronų pernašos grandinėje (angl. *Electron transport chain*). Mitochondrijos svarbios ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonų homeostazei, ląstelių diferenciacijos ir apoptozės procesams [107], nes saugo kaspazes, atsakingas už apoptozės sukėlimą ląstelėse [102].

## 1.9 Ląstelinis kvėpavimas

Ląstelinis kvėpavimas apibūdinami visi mitochondrijose vykstantys procesai, kurių metu pagaminama ATP [108]. Ląstelinis kvėpavimas prasideda po glikolizės, kurios metu ląstelės citozolyje gliukozė suskaidoma iki dviejų piruvato (piruvo rūgšties) molekulių, o šios molekulės patenka į mitochondrijas [103, 108]. Paprastai, ląstelinis kvėpavimas skirstomas į tris etapus: pereinamąją reakciją, Krebso ciklą ar TCA ir kvėpavimo grandinės – oksidacinio fosforilavimo sistemą [103].

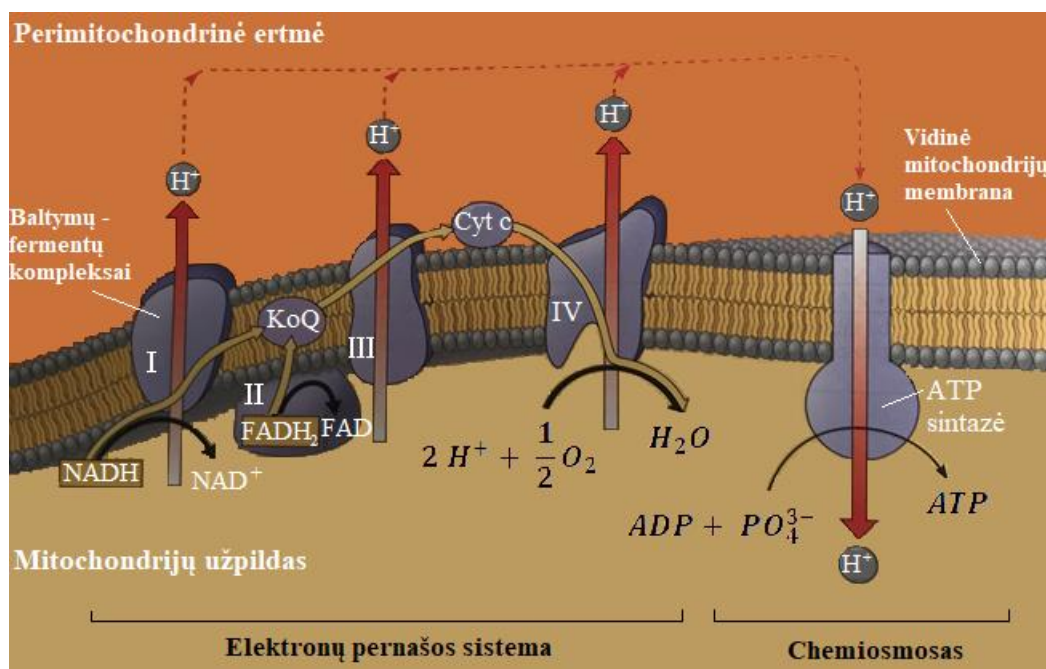
Pereinamosios reakcijos metu piruvo rūgšties molekulės dekarboksilinamos, dehidrinamos ir susijungusios su kofermentu A sudaro acetilkofermentą A (acetil-Ko-A), kuris patenka į Krebso ciklą [108]. TCA metu substratai, acetil-Ko-A forma, yra oksiduojami. Šis etapas susijęs su acetilo grupės suskaidymu iki anglies dioksido molekulių ir dideliu energijos išlaisvinimu, sukauptu flavino adenino dinukleotido (FAD) ir nikotinamido adenino dinukleotido (NAD) redukuotose formose –  $\text{FADH}_2$  ir NADH [103, 109]. Paskutinėje stadijoje, mitochondrijų kvėpavimo grandinėje, redukuoti kofermentai  $\text{FADH}_2$  ir NADH naudojami kaip substratai sintetinant ATP. Oksiduojant substratus išlaisvinamas didžiausias energijos kiekis bei susidaro vandens molekulė.

Kvėpavimo grandinė arba elektronų pernašos sistema – tai vidinėje mitochondrijų membranoje išsidėsčiusi sistema, kurią sudaro keturi hidrofobiniai baltymai-fermentų kompleksai (I–IV) ir du elektronų nešikliai: citochromas c (*1.7 pav. cyt c*) ir kofermentas Q (*1.7 pav. KoQ*). Tai oksidacijos – redukcijos sistema, kurios metu elektronai nešikliais yra pernešami deguonies atomui, sudarant vandens molekulę [103]. Hidrofobinis elektronų nešiklis KoQ, dar vadinamas ubichinonu, nėra susijęs su baltymu, jis I ir II kvėpavimo grandinės kompleksų elektronus perneša III kompleksui [110–111]. Citochromas c – periferinis, hidrofilinis baltymas, prie vidinės mitochondrijų membranos išorinės pusės prisijungęs silpnais ryšiais, elektronus perduodantis tarp III ir IV kompleksų [103, 111]. Elektronai prie kompleksų prijungiami per prostetines grupes – nebaltyminius kompleksų komponentus būtinus fermentų katalitiniui aktyvumui [103, 112]. Einant iš eilės standartinis potencialas elektronų pernašos sistemoje didėja ir sudaro sąlygas nuo NADH ir  $\text{FADH}_2$ , arba kitų elektronų donorų, elektronus perduoti molekuliniam deguoniui. Kartu su elektronų pernešimu per I, III ir IV kompleksus vyksta ir protonų ( $\text{H}^+$ ) išmetimas iš mitochondrijų užpildo į perimitochondrinę ertmę [111]. Dėl vidinės mitochondrijų membranos nelaidumo krūvį turinčioms dalelėms, protonams abipus šios membranos yra formuojamas elektrocheminis protonų gradientas, kuriame sukaupiama dalis elektronų pernešamos laisvosios energijos. Transmembraninis elektrocheminis protonų gradientas, kaip energijos šaltinis, naudojamas ATP sintezei oksidacinio fosforilavimo metu [103, 111].

ATP sintazė, dažnai vadinama kompleksu V, tai vidinėje mitochondrijų membranoje esantis fermentas, sudarytas iš katalitinio subvieneto bei protonų kanalo. Pagrindinė ATP sintazės funkcija adenzindifosfato (ADP) fosforilavimas iki ATP, panaudojant protonų elektrocheminį gradientą. Proceso metu protonai per ATP sintazės protonų kanalą pagal koncentracijos gradientą atgal patenka į mitochondrijų užpildą ir taip suteikia energiją fosforilavimo procesui. Toks veikimo mechanizmas vadinamas chemiosmosine oksidacinio fosforilavimo teorija (žr. *1.7 pav.*) [111–112].

Oksidacinio fosforilavimo metu nuolatinį ADP molekulių buvimą mitochondrijų užpilde užtikrina adenino nukleotidų nešiklis ANT, kuris užpilde susidariusį ATP maino į citozolyje esantį ATP. Fosforilavimui reikalingos fosfato grupės, turinčios krūvį, jų patekimui į mitochondrijų užpildą

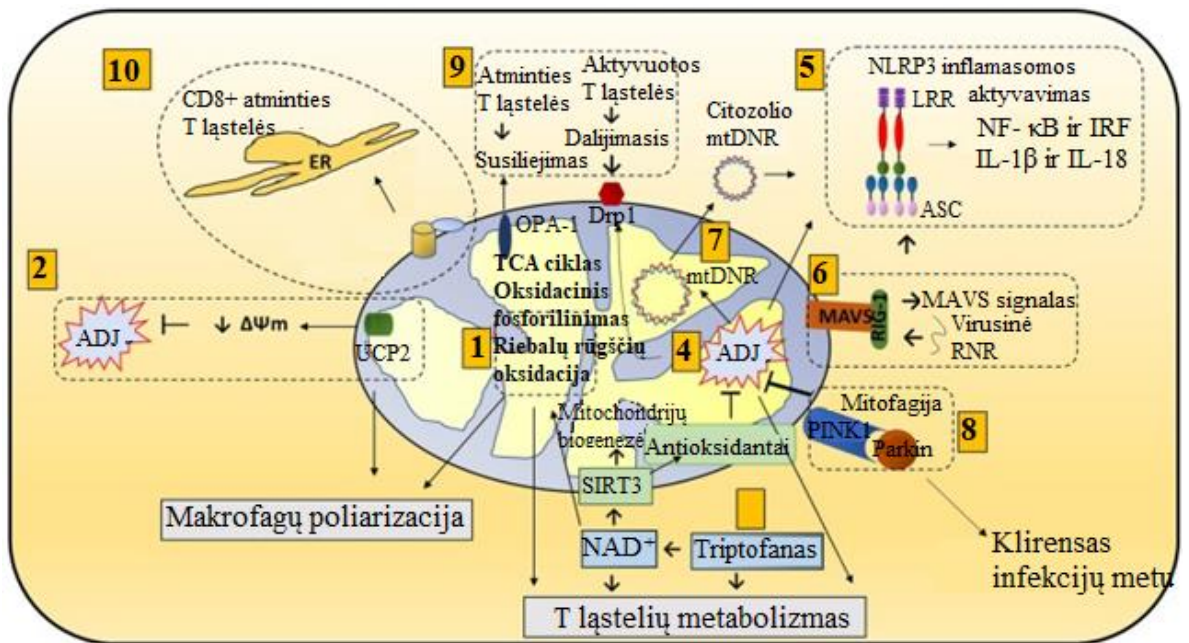
naudojami baltymai nešikliai, esantys membranoje [111]. Oksidacinis fosforilinimas, vykstantis mitochondrijoje, yra vienas iš pagrindinių ADJ susidarymo šaltinių [113].



1.7 pav. Oksidacinio fosforilinimo sistemos schema. Adaptuota pagal [112]

### 1.10 Mitochondrijų reikšmė imunometabolizme

Mitochondrijos atlieka daug pagrindinių ląstelės funkcijų, tokių kaip energijos gamyba, aprūpinimas metabolitais, reikalingais makromolekulių sintezei, taip pat dalyvauja diferenciacijos, apoptozės ir ląstelės ciklo metaboliniuose procesuose [114]. Pastaruoju metu daugėja duomenų, kad mitochondrijos svarbios įgimtam imunitetui ir uždegiminiam atsakui [105]. Imuninis atsakas ir metabolizmas yra vienas nuo kito labai priklausomi procesai. Imuninio atsako metu imuninės ląstelės iš metabolinės ramybės fazės pereina į aktyvią. Šis perėjimas yra susijęs su metaboliniu poslinkiu iš katabolinės į anabolinę būseną. Ramybės būsenoje vyksta kataboliniai procesai, kurių metu pagaminama energija ir palaikomas ilgalaikis ląstelių išgyvenimas. Anabolinės būsenos metu energija vartojama, t. y. sintetamos makromolekulės, palaikoma pusiausvyra tarp ATP poreikio ir reikalingų metabolitų. Priklausomai nuo ATP poreikio, imuninės ląstelės pasirenka specifinį metabolinį kelią, pavyzdžiui, tokį kaip β-oksidacija, kad susidarytų daugiau ATP nei glikolizės metu. ATP ir metaboliniai tarpiniai produktai suteikia signalus aktyvuoti imunines reakcijas [114–115]. Toks energijos persiskirstymas priskiriamas imunometabolizmui [116]. Ši nauja mokslo sritis formuoja naują požiūrį, į tai, kad mitochondrijos atlieka svarbų vaidmenį palaikant ir nustatant imuninį atsaką, nes reguliuoja imuninių ląstelių aktyvaciją ir diferenciaciją. Taip pat mitochondrijos išskiria imunogenines molekules – DAMP, tokias kaip mtDNR, mitochondrijų ADJ, kurie reguliuoja imuninių ląstelių transkripciją [114]. Literatūroje randama daug informacijos kokiais būdais mitochondrijos dalyvauja imuniteto reguliavime (žr. 1.8 pav.).



1.8 pav. Mitochondrijų vaidmuo imuniniame reguliavime. Adaptuota pagal [114]

Metaboliniai keliai, tokie kaip TCA ciklas, oksidacinis fosforilimas, riebalų rūgščių oksidacija, yra svarbūs aktyvių makrofagų polarizacijai tarp klasikinio M1 ir alternatyvaus M2 fenotipų, taip pat T ląstelių diferenciacijai (žr. 1.8 pav., 1). Pasikeitęs metabolizmas ląstelėse ir mitochondrijų sukelti transkripcijos pokyčiai sukelia skirtingą rezultatą imuninėse ląstelėse. M1 makrofagai pasižymi nepilnu TCA ciklu ir jiems būdingas uždegiminis poveikis, o M2 makrofaguose vykstanti  $\beta$ -oksidacija svarbi kuriant priešuždegiminį atsaką. Vidinėje mitochondrijų membranoje esantis atkabimo baltymas 2 (angl. *Uncoupling protein*, UCP2) svarbus protonų perdavimui į mitochondrijų užpildą, keičiant elektrocheminį protonų gradientą yra reguliuojama ir mitochondrijų ADJ produkcija. Mažėjant gradientui slopinama ADJ sintezė (žr. 1.8 pav., 2). Šis baltymas turi įtakos ir makrofagų polarizacijai. UCP2 ekspresija M1 makrofaguose yra sumažėjusi. Minėto baltymo blokavimas, sumažina IL-4 kiekį, kuris skatina M2 makrofagų aktyvaciją. Mitochondrijų dydis, skaičius ir mtDNR kiekis padidėja T ląstelių aktyvacijos metu [114].

Amino rūgščių metabolizmas taip pat prisideda prie imuninių mitochondrijų funkcijų. Tryptofano sumažėjimas gali sukelti imuninę toleranciją. Iš triptofano sintetinamas  $NAD^+$  prisideda prie mitochondrijų biogenezės, kuri vyksta tarpininkaujant nuo  $NAD$  priklausomai deacetilazei Sirtuin 3 (angl. *NAD-dependent deacetylase Sirtuin 3*) (1.8 pav. SIRT3), kuri dalyvauja reguliuojant mitochondrijų baltymus TCA,  $\beta$ -oksidacijos metu (žr. 1.8 pav. 3). Antioksidantai, pavyzdžiui, glutationas, palaiko mitochondrijų ADJ balansą.  $NAD^+$  reikalingas minėtiems metaboliniams keliams ir svarbus  $CD4^+$  T ląstelių diferenciacijai. Mitochondriniai ADJ kontroliuoja imuninių ląstelių transkripciją, metabolizmą ir NLRP3 inflammasomos sukeltą uždegimą, nes aktyvuoja kaspazę-1, kuri dalyvauja IL-1 $\beta$  ir IL-18 gamyboje, skaidant šių citokinų pirmtakus [24–25] (žr. 1.8 pav., 4–5) [114]. Inflamasomos – tai imunogeniniai receptoriai, prisijungiantys PAMP ir DAMP [117]. Paprastai inflammasomos sudarytos iš jutiklinio baltymo, priklausančio NLR receptoriams, ir su apoptoze susijusio baltymo, kurio C-gale yra kaspazės komplektavimo domenas ASC (angl. *Apoptosis-associated speck-like protein containin a C-terminal caspase recruitment domain*) [105,

114]. Daugiausiai ištirta NLRP3 inflammasoma, tai NOD domeną, gausių leucino sekų LRR domeną ir pirino domeną 3 turintis baltymų kompleksas, dalyvaujantis imuniam atsake [117–118].

Mitochondrijų antivirusiniai signalai MAVS mitochondrijų membranoje sukelia uždegiminį atsaką per RLR kelią [105]. Esant virusinėms infekcijoms, prie RIG-I receptorių prijungiama virusinė RNR. RIG-I aktyvina MAVS, esantį ant išorinės mitochondrijų membranos. MAVS signalizacija gali suaktyvinti NLRP3 inflammasomą ir sukelti NF- $\kappa$ B ir IRF veiksnių transkripciją ir taip indukuoti antivirusinių citokinių gamybą (žr. 1.8 pav., 6) [22]. Suaktyvinti NLRP3 inflammasomą gali ir iš mitochondrijų į citozolį išskirta mtDNR (žr. 1.8 pav., 7). Taip pat citozolyje mtDNR yra aptinkama ciklinės guanino monofosfato-adenino monofosfato sintazės, toks susijungimas stimuliuoja už INF gamybą atsakingus genus ir sukelia jų transkripciją [119]. Taip pat mtDNR gali jungtis prie TLR9 receptorių ir sukelti atitinkamų transkripcijos veiksnių aktyvaciją [117, 120]. Svarbu pažymėti, kad mitochondriniai ADJ gali sukelti mtDNR mutaciją [114].

Mitofagijos procesas yra svarbus norint pašalinti pažeistas mitochondrijas, kurios yra ADJ šaltinis, nes tai padeda palaikyti ADJ balansą. Ant išorinės mitochondrijų membranos esanti PTEN-inicijuota kinazė 1 (angl. *PTEN-induced putative kinase 1*) (1.8 pav. PINK1) jungiasi su ubikvitino ligaze Parkin ir inicijuoja mitofagiją (žr. 1.8 pav., 8). Parkin mutacijos gali padidinti jautrumą tarpląstelinėms bakterijoms *Mycobacterium leprae* ir *Salmonella enterica*. Dėl sumažėjusios mitofagijos padidėja ADJ, o tai dar labiau padidina jautrumą infekcijoms. *Hepatitis B* ir *C* virusai naudoja mitofagiją savo naudai. Šie virusai apsisaugo nuo mitochondrijų sukeltos apoptozės, aktyvuodami mitofagiją [114].

Mitochondrijų dinamikoje dalyvaujantys tam tikri baltymai, dalijimosi metu – OPA-1, o suliejimo – metu Drp1, yra atitinkamai susiję su aktyvuotomis T ir atminties T ląstelėmis (žr. 1.8 pav., 9). Mitochondrijos pagal savo lokalizaciją ląstelėje yra netoli endoplazminio tinklo ir teikia energiją čia vykstančiai proteinų ir lipidų sintezei [114]. G. R. Bantug [121] su kolegomis pabrėžia, kad endoplazminio tinklo ir mitochondrijų komunikacija per signalines molekules yra svarbi CD8<sup>+</sup> atminties T ląstelėms (žr. 1.8 pav., 10).

Taigi, mitochondrijų mechanizmai, tokie kaip medžiagų apykaitos keliai, aminorūgščių metabolizmas, antioksidacinės sistemos, mitochondrijų dinamika, mtDNR, mitofagija ir mitochondrijų ADJ yra nepaprastai svarbūs imuninėms funkcijoms [114].

### **1.11 Mitochondrijų reikšmė neurouždegimų metu**

Uždegiminiai signalai linkę suaktyvinti anabolinius procesus, būtinus imuniniam atsakui palaikyti. Makrofagai, dendritinės ląstelės ir T ląstelės gali būti metaboliškai perprogramuojamos, kad palaikytų įvairaus tipo ląstelių funkcijas ir veiklą. Naivios ir atminties T ląstelės priklauso nuo katabolinio metabolizmo, tuo tarpu efektorinės T ląstelės ir makrofagai, stimuliuojami per TLR receptorius, dalyvauja glikolizėje ir anaboliniame metabolizme. Taip pat kai kurie priešuždegiminiai signalai skatina medžiagų apykaitos procesus, nepalaikančias uždegiminio atsako. Dėl šių procesų reguliacijos sutrikimų kyla daugybė šiuolaikinių žmonių ligų, tokių kaip sepsis, diabetas ir nutukimas [116].

Mikroglijos ląstelės atitinka makrofagų funkciją smegenyse. Jos atsakingos už pažeistų neuronų pašalinimą. Sutrikęs mikroglijos aktyvinimo reguliavimas, kartu su padidėjusiu DAMP molekulių

kiekiu sukelia lėtinį neurouždegimą, dėl kurio vystosi neurodegeneracinės ligos [105]. Oksidacinis stresas ir mitochondrijų metabolizmas yra susiję su neurodegeneracinėmis ligomis. Molekuliniu lygmeniu neurouždegimo atsiradimą daugiausia lemia oksidacijos-redukcijos reakcijos [105, 122]. Pagrindinės neurouždegiminio proceso dalyvės yra mitochondrijos, nes jos yra atsakingos ir už ADJ generavimą, ir už reagavimą į ADJ sukeltus ląstelių pokyčius [105, 123].

Pažeistų mitochondrijų kaupimasis gali suaktyvinti nuo NLRP3 inflamamosos priklausomą uždegimą mikroglijoje. Neurouždegimų metu pažeisti neuronai yra atsakingi už DAMP, pavyzdžiui, mtDNR, išsiskyrimą tarpląstelinėje aplinkoje, sukeldami vietinį uždegimą [105, 124], padidindami uždegiminį aktyvumą ir tokiu būdu – IL-1 $\beta$  sekreciją, taip pat jungdamiesi prie mikroglijos TLR9 receptorių, sukeldami TNF- $\alpha$  ir azoto oksido susidarymą [105, 126].

Gera žinoma, kad mitochondrijos atspindi ląstelių energijos tiekimą, o kadangi pagrindinis smegenų energijos šaltinis yra gliukozė, neuronų gliukozės metabolizmo pokyčiai, daugiausia palaikomi mitochondrijų, gali sutrikdyti pažinimo funkcijas [105, 123]. Smegenys sunaudoja maždaug 25 % visos organizmui reikalingos gliukozės [126], nes neuronai, priklausomai nuo oksidacinio fosforilinimo, palaiko savo funkcijas, tokias kaip sinapsinis perdavimas ir neuronų potencialo palaikymas [105, 127].

Yra žinoma, kad mikroglijos virusiniame atsake dalyvauja mitochondrijų MAVS [114], tačiau mažai ištirtas poveikis mikroglijos aktyvinimui ir su tuo siejamais mitochondrijų funkciniais pokyčiais virusinių infekcijų metu. Gali būti, kad mikroglijos mitochondrijų disfunkcija, atsiradusi virusinės infekcijos metu, yra viena pagrindinių neuroinfekcijos priežasčių vedanti į neurodegeneracines ligas.

## **1.12 Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir projekto tikslo pagrindimas**

Kvėpavimo takų virusinės infekcijos yra ganėtinai dažnos. Virusinių infekcijų metu yra skatinamas organizmo specifinis ir nespecifinis imuninis atsakas. Įgimtas ar nespecifinis imuninis atsakas aktyvinamas PAMP ir DAMP prisijungus prie PRR grupės receptorių – TLR, RLR ar NLR. Priklausomai nuo ligando prisijungimo vietos yra inicijuojami skirtingi antivirusinio imuninio atsako signaliniai keliai, kurių metu aktyvinama uždegiminio atsako genų ekspresija ir išskiriami įvairūs priešuždegiminiai citokinai ir chemokinai. Imuninio atsako moduliacijoje svarbų vaidmenį atlieka egzosomos, įvairių organizmo ląstelių į tarpląstelinis skysčius išskiriamos, mažos, sferinės pūslelės, galinčios pereiti kraujo-smegenų barjerą. Šių nanopūslelių vykdomos tarpląstelinės komunikacijos metu pernešamos įvairios medžiagos. Virusinių infekcijų metu ląstelių išskiriamos egzosomos gali turėti uždegimą sukeliančių veiksnių, kuriuos gali pernešti į kitas organizmo vietas. Kadangi viršutiniai kvėpavimo takai yra arti smegenų, tikėtina, kad egzosomos iš infekcijos židinio gali pateikti į smegenis.

Mikroglijos ląstelės – tai smegenų imuninės ląstelės, svarbios palaikant jų homeostazę ir imuninį atsaką į įvairius uždegiminius veiksnis, galinčius ją aktyvinti ir sukelti neurouždegimą. Aktyvinta mikroglija skatina citokinų ir ADJ sintezę, kurie svarbūs neurouždegimėse reakcijose. Didelis ADJ kiekis mikroglijos ląstelėse gali paveikti imunometabolizmą, mitochondrijų ląstelinį kvėpavimą ir papildomai padidinti ADJ sintezę, kuri aktyvuoja inflamomas ir sukelia uždegiminį atsaką.

Literatūroje yra duomenų, kad lėtinis neurouždegimas sukelia ar paspartina neurodegeneracinius procesus, tačiau nėra aiškūs tikslūs šio proceso iniciacijos mechanizmai. Gali būti, kad



neuroūždegimą skatina periferiniai uždegimai dėl egzosomose pernešamos uždegimą sukeliančios informacijos. Siekiant išsiaiškinti virusinių infekcijų sukeliama periferinio uždegimo poveikį mikroglijos ląstelėms iškeltas projekto tikslas – ištirti viruso mimetiku poli I:C veikiamų kvėpavimo takų epitelio ląstelių egzosomų reikšmę žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvinimui.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

### 2.1 Naudotos medžiagos

Darbo metu naudotos medžiagos pateiktos 2.1 lentelėje.

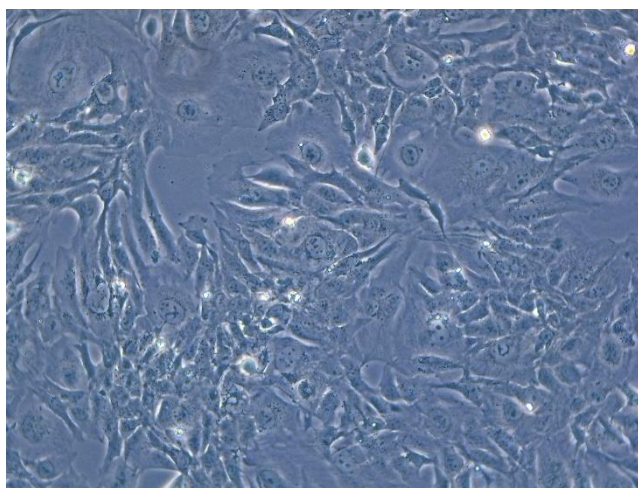
**2.1 lentelė** Tyrimams naudotos medžiagos ir jų charakteristikos

Medžiagos pavadinimas	Prekės ženklas, gamintojas ir medžiagos grynumo klasė
DMEM-GlutaMAX™ mitybinė terpė	GIBCO®, Life Technologies Limited, Jungtinė Karalystė
Veršelio serumas	GIBCO®, Life Technologies Limited, Jungtinė Karalystė
Penicilino-streptomicino tirpalas	GIBCO®, Life Technologies Corporation, JAV, 10000 IU/ml–10000 µg/ml
Fosfatinio druskų buferinio tirpalo tabletės	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, JAV
Tripsino-etilendiamintetraacto rūgšties tirpalas	GIBCO®, Life Technologies Limited, Jungtinė Karalystė
Tripano mėlio tirpalas	Sigma-Aldrich, Jungtinė Karalystė, steriliai filtruotas
EpiLife® mitybinė terpė	GIBCO®, Life Technologies Corporation, JAV
EpiLife® mitybinės terpės augimo priedas (EDGS)	GIBCO®, Life Technologies Corporation, JAV
Poliinozino policitidino rūgštis (Poli I:C)	Tocris Bioscience, Bio-Techne Ltd., Jungtinė Karalystė
Polietilenglikolis 6000	ROTIPURAN®, Carl Roth GmbH + Co KG, Vokietija
Natrio chloridas	CELLPURE®, Carl Roth GmbH + Co KG, Vokietija, chemiškai švarus 99,9 %
Natrio azidas	Sigma-Aldrich, Vokietija, chemiškai švarus 99,5 %
Tritonas (Triton™ X-100)	Sigma-Aldrich, JAV
Bradfordo reagentas	Sigma-Aldrich, Vokietija
ELISA CD9 rinkinys	MyBioSource, Kanada
BisBenzimido H 33342 trihydrochloridas/ Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Izraelis, chemiškai švarus 98 %
Propidžio jodidas	Sigma-Aldrich, JAV, chemiškai švarus 94 %
BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control, konjuguota su Alexa Fluor® 555	Invitrogen®, Life Technologies Corporation, JAV
Lipofektaminas RNAiMAX	Invitrogen®, Life Technologies Corporation, JAV
Opti-MEM® beseruminė terpė	GIBCO®, Life Technologies Limited, JAV
Seahorse XF DMEM terpė	Agilent Technologies Inc., JAV
Gliukozė	Merck KGaA, Vokietija
Natrio piruvatas	Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd., Izraelis
L-glutaminas	Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd., Izraelis

Seahorse XF kalibrantas	Agilent Technologies Inc., JAV
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit reagentų rinkinys	Agilent Technologies Inc., JAV
2',7'-dichlorofluoresceino diacetatas	Sigma-Aldrich, JAV, chemiškai švarus 97 %
Hankso subalansuotas druskos tirpalas	GIBCO®, Life Technologies Limited, Jungtinė karalystė
MitoSOX™ Red fluorescencinis dažas	Invitrogen™, Life Technologies Corporation, JAV
Caspase-Glo 1 Inflammasome Assay G9951 reagentų rinkinys	Promega Corporation, JAV

## 2.2 Imortalizuotos žmogaus mikroglijos ląstelių linijos paruošimas tyrimams

Egzosomų poveikio smegenų ląstelių tyrimams naudota imortalizuota žmogaus mikroglijos ląstelių linija (angl. *human microglial cells*) HMC-3, įsigyta iš *LGC Standarts* (Jungtinė Karalystė) (žr. 2.1 pav.). Su ląstelėmis buvo dirbama steriliomis sąlygomis laminarinio oro srauto spintoje *ESCO Class II BSC* (ESCO, Singapūras).



**2.1 pav.** Mikroglijos ląstelių kultūros vaizdas pro šviesinį mikroskopą (padidinimas 10 kartų)

Prieš atšildant ląsteles iš skysto azoto, paruošiama ląstelių kultūrų auginimui skirta mitybinė terpė. Naudojama komercinė terpė *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) su glutamino priedu – DMEM-GlutaMAX™, kuri buvo papildyta 20 % veršelio serumu, prafiltruotu per 0,22 μm porų diametro filtrą, ir 1 % penicilino-streptomicino (10000 IU/ml–10000 μg/ml) tirpalu. Paruošta terpė šildoma vandens vonelėje (Grant Instruments Ltd, Jungtinė karalystė) 37 °C temperatūroje.

Mikroglijos ląstelės buvo išimtos iš skysto azoto ir atšildytos iki kambario temperatūros. Tuomet ląstelės buvo sumaišomos su nedideliu kiekiu (iki 5 ml) jų auginimui skirtos mitybinės terpės. Taip paruošta ląstelių suspensija centrifuguojama *LMC-4200R* centrifugoje (BioSan, Latvija) 120 g 5 min. Po centrifugavimo supernatantas nusiurbiamas serologine pipete, o ląstelių peletas suspenduojamas šiltoje ląstelių augimo terpėje. Gauta ląstelių suspensija buvo sėjama į 75 cm<sup>2</sup> paviršiaus ploto audinių kultūrų auginimui skirtus plastikinius flakonus, prieš tai į juos įpylus 7–10 ml šiltos ląstelių mitybinės terpės. Užsėtas flakonas dedamas į inkubatorių *Heracell VIOS 160i* (Thermo Fisher Scientific, JAV), kuriame palaikoma 37 °C temperatūra, 5 % anglies dioksido kiekis ir santykinė oro drėgmė. Kitą

dieną ląstelių mitybinė terpė pakeičiama į DMEM-GlutaMAX™ terpę, turinčią 10 % filtruoto veršelio serumo ir 1 % antibiotiko penicilino-streptomicino (10000 IU/ml–10000 µg/ml) tirpalo. Vėliau terpė keičiama kas 3 dienas, iki kol ląstelės pasiekia 70–90 % konfluentiškumą. Konfluentiškumas – tai procentinis matas, parodantis, kiek auginamos ląstelės yra padengusios indo, kuriame yra kultivuojamos, ploto.

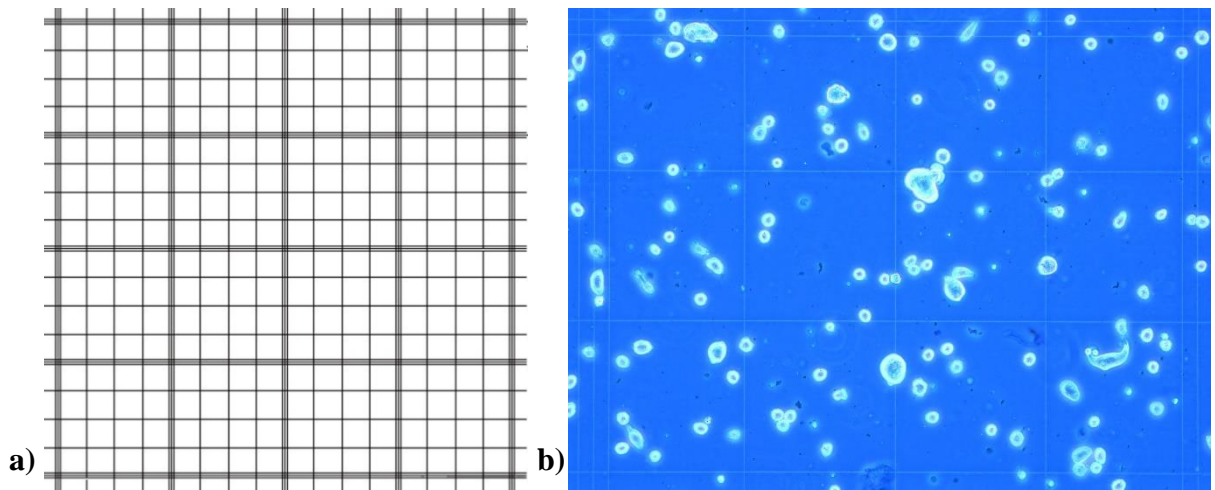
Pasiekus pakankamą konfluentiškumą ląstelės ruošiamos persėjimui. Visų pirma, serologine pipete nusiurbiami ląstelių augimo terpė. Ląstelės du kartus praplaunamos fosfatinių druskų buferiniu (FDB) tirpalu. Vėliau siekiant atkabinti ląsteles nuo plastikinio flakono dugno naudojamas fermentas, suardantis ryšius, kuriais ląstelės yra prikibusios prie paviršiaus. Taigi, jos yra veikiamos 2 ml 0,25 % tripsino-etilendiamintetraacto rūgšties (tripsino – EDTA) tirpalu ir laikomos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje 5 min. Praėjus šiam laikui ląstelių vaizdas patikrinamos po šviesiniu mikroskopu *Leica DMil* (Leica, Vokietija), turi būti matoma judanti ląstelių suspensija, jei ne, inkubacija tęsiama dar 2 min. Po to, siekiant apsaugoti ląsteles nuo tolesnės pažaidos, į flakoną įpilama 4 ml ląstelių mitybinės terpės, taip dėl terpėje esančio veršelio serumo neutralizuojamas fermentas tripsinas. Gauta ląstelių suspensija pipete perkeliama į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 120 g 5 min. Po centrifugavimo supernatantas nusiurbiamas serologine pipete, o ląstelių peletas suspenduojamas su nedideliu kiekiu šiltos augimo terpės (paprastai 1–2 ml). Gauta ląstelių suspensija naudojama sėti ląsteles į 96 šulinėlių lėkšteles ar kitus indus, kuriuose bus atliekami tolimesni tyrimai, arba persėjama į 75 cm<sup>2</sup> plastikinius flakonus tolimesniam kultivavimui [128].

### 2.3 Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus įvertinimas

Siekiant nustatyti bendrą ląstelių skaičių bei sveikų ir žuvusių ląstelių santykį naudotas 0,4 % tripano mėlio dažas. Sveikos ląstelės, kurių membrana vientisa ir nepažeista, nepraleidžia dažo molekulių į ląstelės vidų. Ląstelei virstant apoptotine jos membrana sutrūkinėja, fragmentuojasi ir praranda vientisumą, todėl dėl susidarancio koncentracijos gradiento dažas patenka į ląstelės vidų per pažeistą membraną ir nudažo jas tamsiai mėlyna spalva.

Prieš sėjant ląsteles eksperimentams buvo įvertinamas jų skaičius. Tam tikslui naudojant hemocitometro kamerą *Fuchs–Rosenthal* (BRAND®, Vokietija) ant kurios prispaudžiamas dengiamasis stiklelis.

Ląstelių suspensija buvo maišoma su tripano mėlio dažu santykiu 1:1, paprastai, po 20 µl. Gautas ląstelių suspensijos ir dažo mišinys automatine pipete įleidžiamas tarp dengiamojo stiklelio ir hemocitometro kameros. Ląstelės stebimos pro šviesinį mikroskopą, sufokusavus hemocitometro kameros vaizdą yra įvertinamas sveikų/ gyvų (t. y. nenusidažusių, matomų baltai) ir negyvų/ mirusių (t. y. nusidažusių, matomų mėlynai) ląstelių kiekis, suskaičiuojant jas matomuose langeliuose (žr. 2.2 a) ir b) pav.).



**2.2 pav.** Hemocitometro kameros a) schematinis vaizdas [129] b) vaizdas matomas pro šviesinį mikroskopą (padidinimas 20 kartų)

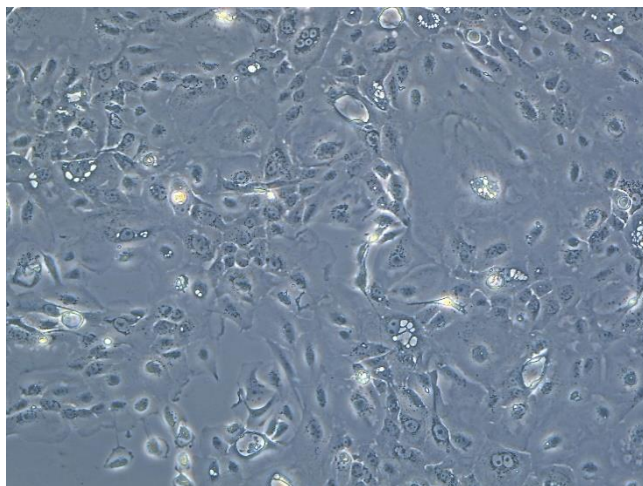
Galutinis ląstelių skaičius apskaičiuojamas pagal 2.1 formulę.

$$\text{Suskaiciuotų ląstelių suma} \cdot 2 \cdot 5000 = \text{Ląstelių kiekis/ml} \quad (2.1)$$

Apskaičiuojant galutinį ląstelių skaičių suskaiciuota per mikroskopą matoma ląstelių suma yra dauginama iš 2 (skiedimų skaičiaus) ir iš 5000 (nustatyta vieno kvadrato tūrio dalis mililitre). Gautas rezultatas parodo skaičiuojamų ląstelių kiekį viename mililitre ląstelių kultūrų terpės [130].

#### **2.4 Egzosomų preparatų paruošimas iš imortalizuotos žmogaus bronchų epitelio ląstelių kultūros**

Egzosomų preparatai buvo ruošiami iš komercinės imortalizuotos žmogaus bronchų epitelio ląstelių linijos (angl. *human bronchus epithelium cells*) HBEC-3, įsigytos iš *LGC Standarts* (Jungtinė Karalystė) (žr. 2.3 pav.).



**2.3 pav.** Žmogaus bronchų epitelio ląstelių kultūros vaizdas pro šviesinį mikroskopą (padidinimas 10 kartų)

Preparatų paruošimą sudaro trys pagrindiniai etapai:

1. HBEC-3 ląstelių užauginimas iki reikiamo konfluentiškumo;

2. ląstelių produkuojamų egzosomų surinkimas beseruminėje terpėje;
3. egzosomų išskyrimas iš ląstelių kultūrų terpės naudojant polimerą.

Iš pradžių ląstelės buvo išimtos iš skysto azoto ir atšildytos iki kambario temperatūros. Tuomet buvo sumaišomos su nedideliu kiekiu (iki 5 ml) jų mitybinės terpės – EpiLife®, kuri papildyta 20 % filtruotu veršelio serumu, 1 % penicilino-streptomicino (10000 IU/ml–10000 µg/ml) tirpalu ir 1 % EpiLife® terpės augimo priedu. Taip paruošta ląstelių suspensija centrifuguojama 360 g 5 min. Po centrifugavimo supernatantas nusiurbiamas serologine pipete, o ląstelių peletas suspenduojamas šiltoje ląstelių auginimo terpėje. Paruošta ląstelių suspensija buvo sėjama į 75 cm<sup>2</sup> audinių kultūrų auginimui skirtus flakonus, prieš tai į juos įpylus 7–10 ml šiltos ląstelių mitybinės terpės. Užsėtas flakonas dedamas į inkubatorių. Kitą dieną ląstelių augimo terpė pakeičiama į EpiLife® terpę, turinčią 10 % veršelio serumo, 1 % antibiotiko penicilino-streptomicino (10000 IU/ml–10000 µg/ml) ir 1 % EpiLife® augimo terpės priedo. Vėliau terpė keičiama kas 3 dienas iki kol ląstelės pasiekia 70–90 % konfluentiškumą [131].

Siekiant surinkti ląstelių produkuojamas egzosomas, pasiekus reikiamą konfluentiškumą, parą laiko ląstelės auginamos beseruminėje terpėje. Po paros terpė nupilama, ląstelės praplaunamos FDB tirpalu ir 1 val. yra veikiamos paruoštu 1 µg/ml poli I:C tirpalu beseruminėje terpėje. Po valandos terpė nusiurbiamas serologine pipete, ir ląstelės du kartus praplaunamos FDB tirpalu, siekiant išplauti poli I:C sekos likučius, ir veikiamos beserumine terpe 24 val. 37 °C temperatūroje. Per šį laiką surenkamos poli I:C seka stimuliuotų ląstelių produkuojamos egzosomos. Lygiagrečiai renkamas ir kontrolinis egzosomų mėginys, analogiškai auginant ląsteles, tik nestimuliuojant jų poli I:C seka, o iškart pradedant rinkti egzosomas beseruminėje terpėje. Po paros ląstelių terpės su egzosomomis nusiurbiamos ir centrifuguojamos 3000 g 15 min, siekiant pašalinti ląstelių likučius. Supernatantas papildomai filtruojamas per 0,22 µm porų skersmens filtrą, kurį egzosomos praeina.

Siekiant išskirti egzosomas iš filtruotos ląstelių kultūrų terpės, pagaminamas PEG vandeninis tirpalas, kurio galutinėje sudėtyje yra 20 % PEG 6000, 4 % natrio chlorido ir 1 % natrio azido kiekis pagal masę. Po filtravimo ląstelių kultūrų terpė santykiu 1:1 maišoma su paruoštu PEG tirpalu, kol susidaro homogeninis tirpalas, kuris per naktį paliekamas šaldytuve. Polimeras sudarydamas porėtą tinklą nusodina egzosomas [67]. Kitą dieną mėginys centrifuguojamas 3000 g 30 min 5 °C temperatūroje. Po centrifugavimo atsargiai pašalinamas supernatantas, o nusėdęs egzosomų peletas suspenduojamas mažame kiekyje FDB tirpalo. Taip paruoštu egzosomų preparatu ląstelės gali būti veikiamos iš karto, arba preparatas laikomas –20 °C temperatūroje.

## **2.5 Mikroglijos veikimas bronchų epitelio ląstelių egzosomomis**

Atšildytas egzosomų preparatas 10 min suspenduojamas, naudojant insulininio švirkšto adatą, siekiant atskirti sukibusias egzosomas. Taip paruoštas reikiamos egzosomų baltymų koncentracijos mėginys dedamas į ant stiklo ar plastiko užaugintų mikroglijos ląstelių. Iki reikiamo tūrio įpilama beseruminės ląstelių mitybinės terpės DMEM-GlutaMAX™. Egzosomomis paveiktos ląstelės laikomos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje.

Visų eksperimentų metu mikroglijos ląstelės 24 val. buvo veikiamos dviejų tipų egzosomų preparatais:

1. kontroliniu, gautu iš sveikų bronchų epitelio ląstelių kultūrų terpės;

2. stimuliuotu, gautu iš poli I:C virusinę infekciją imituojančia seka veiktų bronchų epitelio ląstelių kultūrų terpės.

Eksperimentuose siekiant turėti teigiamos kontrolės mėginį, mikroglijos ląstelės 1 val. tiesiogiai buvo veikiamos 1 µg/ml poli I:C seka, inkubuojant ląsteles 37 °C temperatūroje. Kaip neigiama kontrolė eksperimentuose buvo nepaveikta mikroglijos ląstelių kultūra.

## 2.6 Egzosomų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

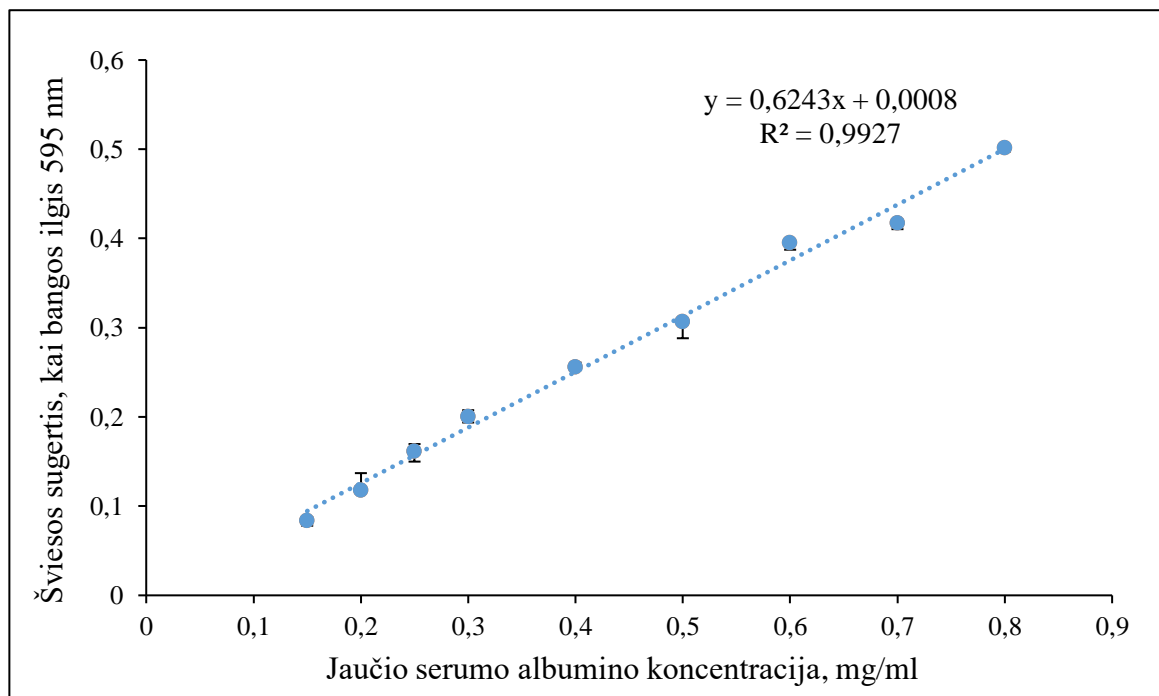
Mikroglijos ląstelės tyrimų metu buvo veikiamos tokia pat egzosomų koncentracija (0,01 mg/ml), siekiant išlaikyti vienodas eksperimento sąlygas. Daugiausia egzosomų turinį sudaro baltymai, todėl norint nustatyti egzosomų koncentraciją, ji buvo vertinama pagal bendrą preparato baltymų kiekį, kuris nustatomas Bradfordo metodu. Šio metodo esmė bazinių ir aromatinių aminorūgščių, esančių bandinyje, sąveika su Kumasi briliantiniu mėliu G-250, kuris yra ištirpintas rūgštyje, keičiant spalvą iš rudos į mėlyną ir matuojant pasikeitusią šviesos sugertį [132].

Prieš matuojant šviesos absorbciją, egzosomų preparatas veikiamas 0,1 % tritono tirpalu santykiu 9:1 (paprastai, 18 µl egzosomų veikiama 2 µl tritono), taip siekiant suardyti egzosomų fosfolipidų dvisuoksnį, kad reagentas surištų ne tik egzosomų viduje, bet ir išorėje esančius proteinus. Kaip kontrolė ruošiamas FDB tirpalas, kuris tokiu pat santykiu sumaišomas su 0,1 % tritono tirpalu. Egzosomų preparatas ir kontrolinis mėginys inkubuojami šaldytuve 15–20 min. Vėliau tamsoje į 96 šulinėlių lėkštelę įdedama 190 µl Bradfordo reagento, kuris sumaišomas su 10 µl egzosomų mėginiu, lygiagrečiai ruošiamas ir kontrolinis mėginys. Po kelių minučių spektrofotometriškai plokštelių skaitytuvu *Infinite 200 PRO* (Tecan, Šveicarija) išmatuojama mėginių šviesos sugertis, kuomet bangos ilgis yra 595 nm.

Siekiant įvertinti egzosomų bandinyje esančių baltymų kiekį buvo sudaryta kalibracinė kreivė, išmatavus žinomų skirtingų koncentracijų jaučio serumo albumino tirpalų šviesos sugertį (žr. 2.4 pav.). Bendram baltymo kiekiui apskaičiuoti išvesta 2.2 formulė:

$$x = \frac{y-0,0008}{0,6243} \quad (2.2)$$

čia:  $x$  – baltymo koncentracija tiriamajame mėginyje, mg/ml;  $y$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis, kai balgos ilgis 595 nm.



2.4 pav. Kalibracinė kreivė kiekybiniam baltymo koncentracijos nustatymui tiriamajame mėginyje

## 2.7 Egzosomų identifikavimas pagal dydį dinaminės šviesos sklaidos metodu

Egzosomų preparatų dalelių dydis vertintas nanodalelių analizatoriumi *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments Ltd, Jungtinė karalystė) dinaminės šviesos sklaidos metodu.

Egzosomų preparatai buvo skiedžiami FDB, per 0,2 μm porų skersmens filtrą prafiltruotu, tirpalu iki 1 ml. Vėliau iki 0,5 ml perpilti į vienkartinę kiuvetę ir analizuojami minėtu prietaisu. Preparate esančios dalelės, judėdamos Brauno judesiais, apšvietus monochromatiniu šviesos šaltiniu, sukelia aplink daleles esančio skysčio, skirtingų intensyvumų šviesos bangų išsklaidymą. Analizatoriaus sistema matuoja intensyvumų pokytį laike. Naudojant šiuos duomenis kompiuterine programa *Zetasizer Software 7.12* nustatomi preparato dalelių dydžiai ir jų procentinis pasiskirstymas [68, 133].

Prieš analizę programoje nustatomi dydžiai: egzosomų refrakcijos indeksas 1,38; FDB tirpalo refrakcijos indeksas 1,33; FDB klampumas 0,88 cP. Statistiniam patikimumui gauti vienas mėginys analizatoriumi skanuojamas 15 kartų, iš kurių programa apskaičiuoja rezultatų vidurkį.

Buvo vertinami kontrolinis, gautas iš sveikų bronchų epitelio ląstelių terpės, ir stimuliuotas, išskirtas iš poli I:C seka veiktų bronchų epitelio ląstelių terpės, egzosomų preparatai.

## 2.8 Egzosomų identifikavimas imunofermentiniu ELISA metodu pagal CD9 žymens koncentraciją

Egzosomų preparatuose imunofermentiniu ELISA metodu buvo nustatomi egzosomų paviršiaus žymenys CD9. Tyrimo atlikimui buvo naudojamas komercinis *ELISA CD9 rinkinys* (MyBioSource, Kanada). Tyrimui naudota 96 šulinėlių lėkštelė buvo padengta antikūnu, kuris specifiskai atpažįsta CD9 antigeną.

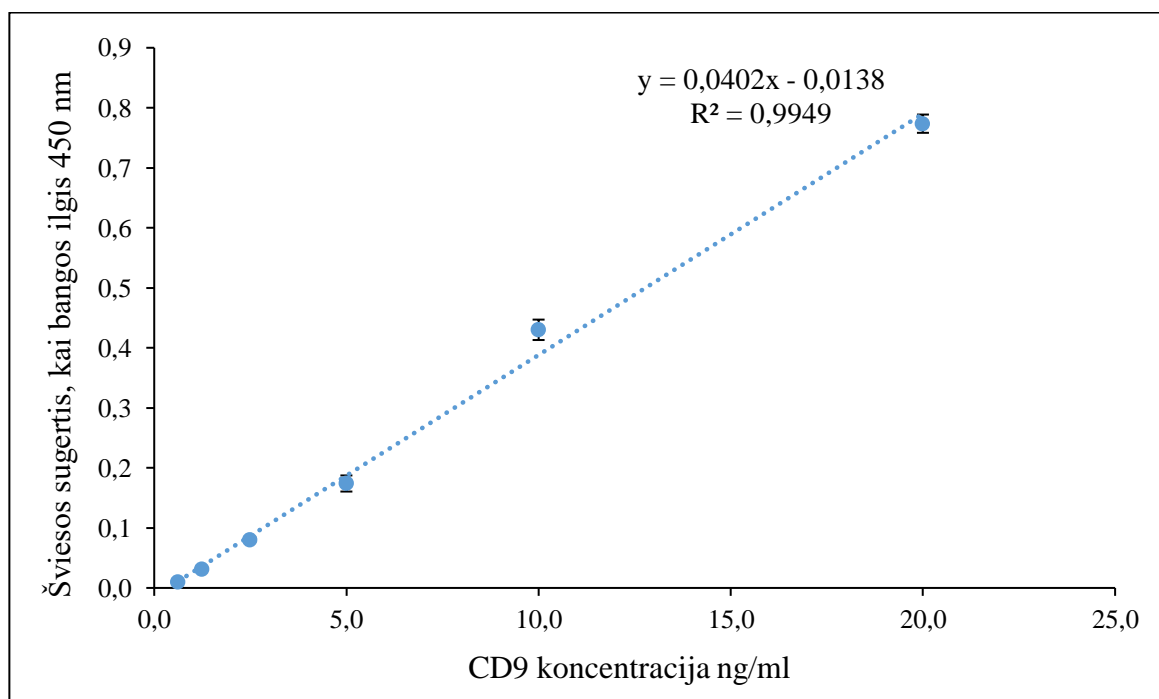


Lygiagrečiai su tiriamais egzosomų preparatais buvo ruošiamas ir kontrolinis tyrimo atlikimui reikalingas mėginys. Į lėkštelės šulinėlius įdedama po 50 μl mėginio ir į šulinėlius su tiriamaisiais mėginiais įdedama po 100 μl su peroksidaze konjuguoto reagento. Taip paruošta lėkštelė inkubuojama 37 °C temperatūroje 1 val. Inkubacijos metu, jei mėginyje esama specifinių antigenų vyksta antikūno surišimo su antigenu reakcija. Po inkubacijos šulinėliai keturis kartus praplaunami iš anksto pasiruoštu plovimo buferiu. Vėliau į kiekvieną mėginį įdedama 50 μl chromogeno A ir 50 μl chromogeno B tirpalų. Lėkštelė inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje saugant ją nuo tiesioginio šviesos poveikio. Po inkubacijos į kiekvieną mėginį įpilama po 50 μl STOP tirpalo ir, po to, per 15 min spektrofotometru matuojama šviesos absorbcija, esant 450 nm bangos ilgiui [134].

Siekiant įvertinti CD9 žymens koncentraciją egzosomų preparatuose buvo sudaryta kalibracinė kreivė, išmatavus žinomų koncentracijų standartinius tirpalus, esančius tyrimui skirtame rinkinyje (žr. 2.5 pav.). CD9 egzosomų žymenų koncentracija buvo apskaičiuojama pagal išvestą 2.3 formulę:

$$x = \frac{y+0,0138}{0,0402} \quad (2.3)$$

Čia:  $x$ – antigeno CD9 koncentracija tiriamajame mėginyje (ng/ml), o  $y$  – tiriamojo tirpalo 450 nm bangos ilgio šviesos sugertis.



**2.5 pav.** Kalibracinė kreivė CD9 egzosomų paviršiaus žymenų nustatymui tiriamajame mėginyje

Buvo vertinami skirtingų koncentracijų pagal bendrą baltymo kiekį kontrolinis ir poli I:C stimuliuotas egzosomų preparatai. Rezultatu laikomas mažiausiai trijų pakartojimų aritmetinis vidurkis.

## 2.9 Mikroglijos ląstelių gyvybingumo įvertinimas

Mikroglijos ląstelių gyvybingumas vertintas fluorescencinės mikroskopijos metodu. Ląstelės 96 šulinėlių lėkštelėse buvo veikiamos fluorescuojančiais dažais: 10 μg/ml *Hoescht 33342* ir 5 μg/ml propidžio jodidu, kurie sąveikauja su DNR, esančia ląstelių branduoliuose. *Hoescht 33342* dažas

patenka į visų ląstelių branduolius, o propidžio jodidas – tik į pažeistų, t. y. nekrozių ar praradusių membranos intaktiškumą. Po kelių minučių inkubacijos su dažais, atliekamas mikroglijos ląstelių vaizdinimas naudojant fluorescencinį mikroskopą *OLYMPUS IX2-ILL 100* (OLYMPUS, Japonija). Naudojant filtrų rinkinį DAPI gyvybingi ląstelių branduoliai švytėjo mėlyna spalva, o per filtrų rinkinį TXRED buvo matomos raudona spalva švytintys žuvę ląstelių branduoliai [135].

Gautos fotografijos įvertintos kompiuterine programa *ImageJ*, apskaičiuojant bendrą ląstelių skaičių ir procentiškai įvertinant gyvybingų ir žuvusių ląstelių kiekį. Buvo vertinami kontrolinis ir stimuliuotas egzosomų mėginiai, taip pat tiesiogiai poli I:C veiktos ir neveiktos mikroglijos ląstelės. Rezultatu laikomas mažiausiai trijų eksperimentinių pakartojimų aritmetinis vidurkis.

## **2.10 Egzosomų patekimo į mikroglijos ląsteles nustatymas**

Egzosomų patekimas į mikroglijos ląsteles stebėtas fluorescencinės mikroskopijos metodu. Tam tikslui egzosomos yra pažymimos fluorescuojančiais dažais.

Egzosomos buvo dažomos RNR atpažįstančiais fluorescenciniais dažais BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control, kurie konjuguoti su Alexa Fluor® 555. Kad dažas pereitų lipidinę egzosomų membraną buvo naudojamas transfekcijos reagentas lipofektaminas RNAiMAX. Tam tikslui 3 µl lipofektamino tirpalo buvo praskiedžiama beserumine Opti-MEM® terpe iki 50 µl. Tokiame pat kiekyje beseruminės terpės praskiedžiamas 1 µl dažo, taip pasiekama 0,4 µM koncentracija. Abu paruošti tirpalai sumaišomi tarpusavyje ir inkubuojami tamsoje kambario temperatūroje 5 min. Lipofektamino struktūroje esantis lipidų dvisluoksniu fragmentas formuoja liposomą aplink Alexa Fluor® 555 dažą. Po inkubacijos 100 µl egzosomų preparato buvo veikiamas paruoštu dažų tirpalu ir inkubuojama 1–2 val. 37 °C temperatūroje. Per šį laiką egzosomos susilieja su liposomomis, kuriose yra dažas, ir yra nudažomos [136].

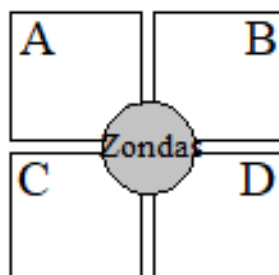
Vėliau mikroglijos ląstelės buvo veikiamos nudažytų egzosomų preparatu. Egzosomų patekimas į mikroglijos ląsteles stebėtas fluorescenciniu mikroskopu *Carl Zeiss Axio Observer Z1* (Carl Zeiss AG, Vokietija). Ląstelės buvo stebimos šviesinio lauko vaizde, o per TXRED filtrą buvo matomos raudonai šviečiančios egzosomos.

## **2.11 Mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumo įvertinimas mikroglijos ląstelėse**

Mikroglijos ląstelių mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumo įvertinimas atliktas *Seahorse XFp* (Agilent Technologies Inc., JAV) analizatoriumi, naudojant *Mitostress* testą ir dirbant pagal gamintojo nurodytą protokolą.

Analizatoriuje naudojamos vienkartinės jutiklių kasetės (angl. *Sensor cartridge*), kuriose kiekvienam lėkštelės šulinėliui yra zondas su dviem fluoroforais, vienas skirtas deguonies, kitas pH nustatymui. Atliekant matavimus jutiklio kasetėje esantys zondai nuleidžiami iki 200 µm atstumo virš ląstelių monosluoksniu, taip laikinai izoluojant itin mažą terpės kiekį ir sudarant mikrokamerą. Ląstelinis deguonies suvartojimas (kvėpavimas) ir protonų išskyrimas (glikolizė) mikrokameroje sukelia greitus, lengvai išmatuojamus ištirpusio deguonies ir laisvųjų protonų koncentracijos pokyčius, kurie fiksuojami kaip šviesos srautu sužadintų fluoroforų emisijos skirtumai. Deguonies koncentracijos ir pH pokyčiai realiu laiku automatiškai apskaičiuojami analizatoriaus ir pateikiami kaip deguonies suvartojimo greičio pmol/min (angl. *Oxygen Consumption Rate*, OCR) ir tarpląstelinio rūgštelėjimo

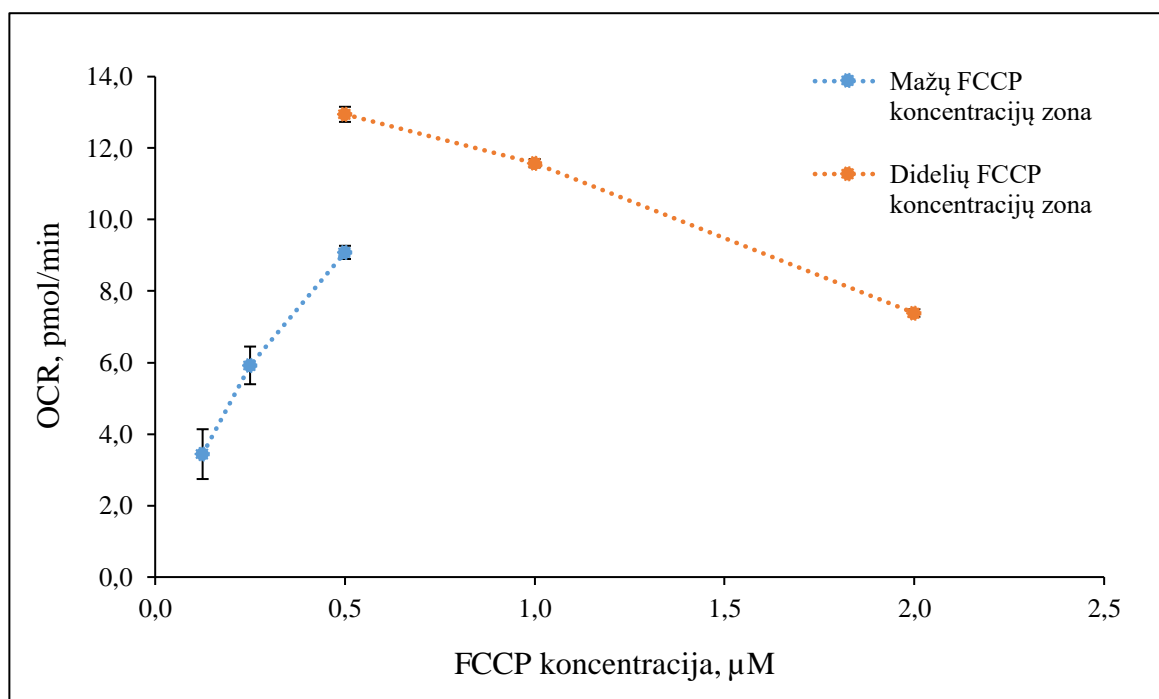
greičio mpH/min (angl. *Extracellular acidification rate*, ECAR) vertės, kurios leidžia nustatyti kinetinius ląstelių metabolizmo duomenis. Prieš pradėdant analizę išmatuojamas bazinis ląstelių kvėpavimas. Šalia jutiklių kasetės zondų yra keturios celės (A, B, C ir D) į kurias prieš analizę atsargiai pipete įleidžiami tyrimui reikalingi tirpalai, kurie nustatytais kiekiais ir laiko intervalais analizatoriuje pneumatiniu būdu automatiškai injekuojami į lėkštelių su ląstelėmis šulinėlius (žr. 2.6 pav.).



**2.6 pav.** Jutiklio kasetės celių ir zondo išsidėstymo schema

Pirmoji tirpalo injekcija yra oligomicinas. Tai mitochondrijų kvėpavimo grandinės ATP sintazės inhibitorius. Po šios injekcijos mikrokameroje yra vertinamas ląstelių deguonies suvartojimas, priklausantis tik nuo oksidacinio fosforilavimo t. y. nuo mitochondrijų vidinės membranos laidumo protonams. Antroji injekcija – karbonilcianido-4-(trifluorometoksi)fenilhidrazono (FCCP) tirpalu, dar vadinamu skyrikliu. FCCP poveikyje vidinė mitochondrijų membrana tampa pralaidi protonams, todėl nebelieka elektrocheminio protonų gradiento, o vertinamas deguonies suvartojimas tampa nebesusietas su ATP sinteze, dėl įvykusio oksidacinio fosforilavimo atskyrimo. Trečioji tirpalo injekcija – rotenono ir antimicino A mišinys, kuris slopina mitochondrijų kvėpavimo grandinės I ir III kompleksus, todėl mitochondrinis kvėpavimas nevyksta. Po šios injekcijos vertinamas deguonies suvartojimas nesusijęs su mitochondrijose vykstančiais procesais. Po kiekvieno tirpalo injekcijos, 2–5 min matuojami deguonies ir laisvųjų protonų koncentracijų pokyčiai, o pabaigus matavimą zondai pakeliami, sumaišant didesnę terpės tūrį, nei buvusį mikrokameroje, taip atkuriant ląstelių kvėpavimo grandinės reikšmes iki pradinės būsenos ir pasiruošiant naujai injekcijai iš kitos jutiklio kasetės celės.

Prieš atliekant mikroglijos ląstelių mitochondrijų aktyvumo tyrimus nustatytas ląstelių sėjimo tankumas ir atliktas FCCP tirpalo titravimas, siekiant nustatyti FCCP koncentraciją, kuri tam tikram ląstelių tankiui atitiktų didžiausią deguonies suvartojimą. FCCP sutrikdo mitochondrijų membranos potencialą, dėl to elektronų srautas abipus membranos nėra kliudomas, o IV elektronų kvėpavimo grandinės kompleksas pasiekia didžiausią deguonies suvartojimo piką. Titravimui atlikti į jutiklio kasetės celes pipete įleisti skirtingų koncentracijų FCCP tirpalai. Paruošta kasetė dedama į analizatorių ir pasirinkus *FCCP titravimo* testą atliekamas titravimas. Gauti rezultatai leidžia nustatyti ar ląstelių sėjimo tankis tinkamas. Jei jis tinkamas, gautos bazinio kvėpavimo OCR reikšmės turi patekti į 20–150 pmol/min intervalą. Iš analizatoriumi gautų duomenų sudarytos FCCP titravimo kreivės pateiktos 2.7 paveiksle.



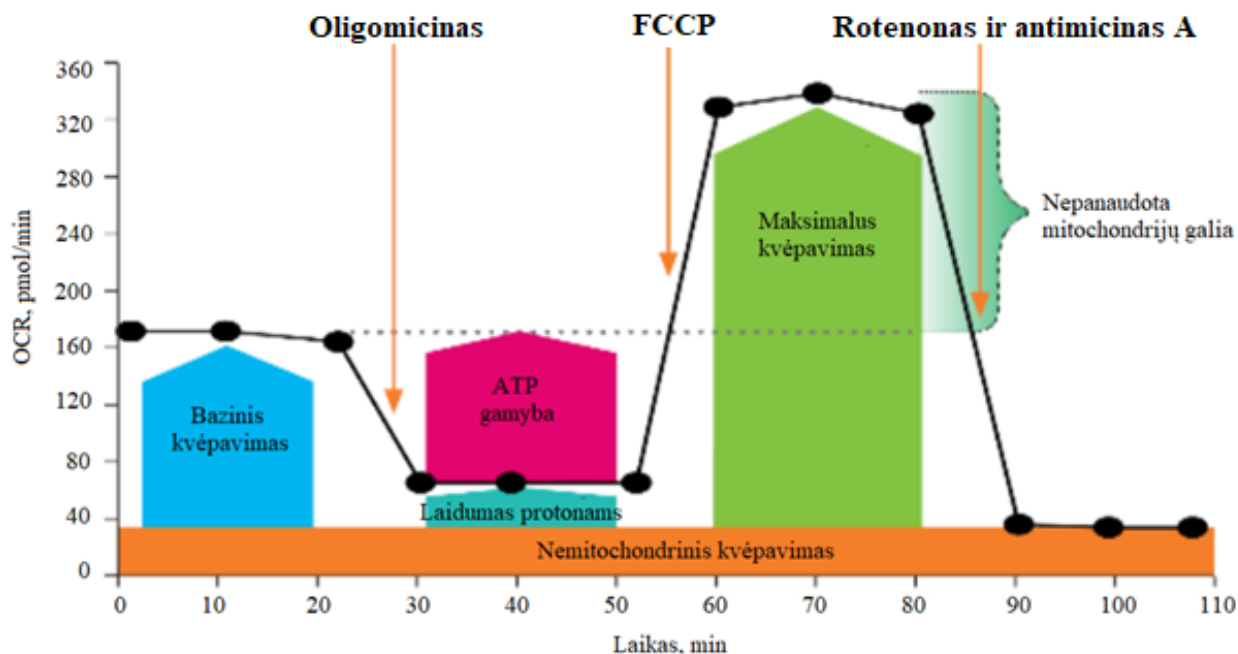
2.7 pav. FCCP titravimo kreivės

Tyrimui atlikti mikroglijos ląstelių kultūra užsėjama į specialias analizatoriui tinkamas lėkšteles, kurios per naktį inkubuojamos 37 °C temperatūroje, leidžiant ląstelėms prikibti prie jų paviršiaus. Kitą dieną ląstelės veikiamos egzosomų preparatais ir toliau 24 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Lygiagrečiai ruošiami ir kontroliniai mėginiai: egzosomomis neveiktos ląstelės ir tiesiogiai poli I:C veiktos ląstelės. Eksperimentų lėkštelėse keli šulinėliai paliekami kaip analizatoriui reikalingos kontrolės, į juos nesėjant ląstelių, o tiesiog įpilant mitybinės terpės. Taip pat diena prieš analizę paruošiamos komercinės jutiklių kasetės, hidratuojant jose esančius zondus. Į lėkštelių šulinėlius įpilama sterilus vandens, į kurį zondai įleidžiami. Taip paruoštos kasetės dedamos į inkubatorių *Heraeus CO<sub>2</sub>-AUTO-ZERO* (Heareus-Christ GmbH, Vokietija), kuriame nėra anglies dioksido ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

Eksperimento dieną paruošiama speciali tyrimo Seahorse XF DMEM terpė, kuri papildoma 10 mM gliukoze, 1 mM natrio piruvatu ir 2 mM L-glutaminu. Ląstelės du kartus atsargiai praplaunamos šilta specialia tyrimo terpe. Vėliau kiekvienas lėkštelės šulinėlis užpilamas 180  $\mu\text{l}$  paruoštos Seahorse XF DMEM terpės. Lėkštelės 1 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje be anglies dioksido. Iš jutiklių kasetės lėkštelių išėmus zondus, nupilamas vanduo, kuris pakeičiamas Seahorse XF kalibrantu. Zondus įstačius atgal jutiklių kasetės 45 min inkubuojamos 37 °C temperatūroje be anglies dioksido. *Mitostress* testui atlikti naudojamas specialus *Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit* reagentų rinkinys. Jame esantys tirpalai praskiedžiami Seahorse XF DMEM terpe iki reikiamos koncentracijos. Paruošiami 1,5  $\mu\text{M}$  oligomicino, 0,5  $\mu\text{M}$  FCCP ir 0,5  $\mu\text{M}$  rotenono/ antimicino A tirpalai, kurie pipete įleidžiami į jutiklių kasetėse esančias celes. 20  $\mu\text{l}$  oligomicino injekuojama į A celę, 22  $\mu\text{l}$  FCCP – į B celę, 25  $\mu\text{l}$  rotenono/ antimicino A – į C celę. Taip paruošta jutiklio kasetė įdedama į analizatorių ir pasirinkus *Mitostress* testą pradedama prietaiso kalibracija. Po kalibracijos į analizatorių įdedama eksperimento lėkštelė ir pradedama analizė. Po bazinio kvėpavimo nustatymo, pradedant nuo A celės, vienas po kito injekuojami jose esantys tirpalai, kaskart atliekant po tris matavimus. Gauti OCR ir ECAR duomenys analizuojami kompiuterine programa *Wave 2.6.1.*, apskaičiuojant svarbius

mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumą rodančius parametrus, tokius kaip bazinis ir maksimalus kvėpavimas, ATP gamyba, nepanaudota mitochondrijų galia (angl. *Spare capacity*), laidumas protonams (angl. *Proton leak*) ir nemitochondrinis deguonies suvartojimas, taip pat ląstelių metabolinis potencialas ir metabolinis fenotipas [137]. Klasikinė *Mitostress* testo rezultatų interpretacijos schema pavaizduota 2.8 paveiksle. Analizės metu gauti duomenys kompiuterine programa yra normalizuojami, atsižvelgiant į bendrą ląstelių baltymo kiekį, kuris kiekviename iš tirtų šulinėlių po atlikto eksperimento buvo nustatytas, anksčiau aptartu Bradfordo metodu (žr. 2.6 poskyrį).

Rezultatu laikomas mažiausiai trijų eksperimentinių pakartojimų aritmetinis vidurkis.



2.8 pav. Klasikinė *Mitostress* testo rezultatų interpretacijos schema [137]

Bazinis kvėpavimas – tai deguonies suvartojimas, reikalingas patenkinti ląstelių ATP poreikį, atsirandantį dėl protonų laidumo. Taip pat šis dydis parodo ląstelių energetinį poreikį pradinėmis analizės sąlygomis. ATP gamyba – deguonies suvartojimo sumažėjimas, po oligomicino injekcijos, rodantis kuri bazinio kvėpavimo dalis sunaudojama ATP sintezei. Šis dydis atspindi, mitochondrijų pagaminamą ATP, kuris reikalingas energetiniam ląstelių poreikiui patenkinti. Laidumas protonams – tai likusi bazinio kvėpavimo dalis, nesusijusi su ATP gamyba. Šis dydis gali parodyti mitochondrijų pažeidimus. Taip pat laidumas protonams naudojamas kaip reguliacinis mechanizmas ATP sintezei. Maksimalus kvėpavimas – tai didžiausias deguonies suvartojimo greitis, pasiekiamas po FCCP skyriklio injekcijos. FCCP imituoja fiziologinį „energijos poreikį“, skatindamas mitochondrijų kvėpavimo grandinę veikti maksimaliai, kas sukelia greitą cukrų, riebalų ir amino rūgščių substratų oksidaciją, kad būtų patenkintas kilęs metabolinis „iššūkis“. Šis dydis parodo maksimalų kvėpavimo greitį, kurį gali pasiekti ląstelė. Nepanaudotos mitochondrijų galios dydis parodo ląstelės gebėjimą reaguoti į padidėjusį energijos poreikį arba esant stresinėms sąlygoms. Taip pat kaip arti maksimalios kvėpavimo ribos yra ląstelės. Nemitochondrinio kvėpavimo dydis parodo, koks deguonies suvartojimas išlieka dėl ląstelėse esančių fermentų veiklos, po rotenono ir antimicino A mišinio injekcijos. Šis dydis svarbus norint tiksliai nustatyti mitochondrijų kvėpavimą [137].

## 2.12 Mikroglijos ląstelių viduląstelinų aktyvių deguonies junginių kiekio nustatymas

Viduląstelinų ADJ nustatymui naudotas 2',7'-dichlorodihidrofluoresceino diacetatas (H<sub>2</sub>DCFDA), kuris pralaidus ląstelių membranoms. Veikiant ląstelių fermentams esterazėms H<sub>2</sub>DCFDA deacilinamas iki 2',7'-dichlorodihidrofluoresceino (H<sub>2</sub>DCF). Ląstelei produkuojant ADJ H<sub>2</sub>DCF yra oksiduojamas iki 2',7'-dichlorofluoresceino (DCF), kuriam būdinga fluorescencija [138].

Prieš eksperimentą mikroglijos ląstelės buvo užsėtos į 96 šulinėlių lėkštelę. Kita dieną jos buvo veikiamos nestimuliuotu ir stimuliuotu egzosomų preparatais ir inkubuojamos 24 val. 37 °C temperatūroje. Trečiąją eksperimento dieną, siekiant pasiruošti neigiamą kontrolę, mikroglijos ląstelės buvo veikiamos 1 µg/ml poli I:C ir 4 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai praplaunami nuo egzosomų ir poli I:C likučių Hankso subalansuotu druskos tirpalu (angl. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) ir užpilami ląstelių mitybine terpe. Vėliau mikroglijos ląstelės buvo veikiamos 10 µM H<sub>2</sub>DCFDA 30 min 37 °C temperatūroje. Inkubacijos metu dažas prasiskverbė į ląsteles. Po pusvalandžio pakartotinai praplaunama HBSS, siekiant pašalinti į ląstelę nepatekusius dažus. Praplovus ląsteles užpilamas nedidelis kiekis HBSS ir vaizdinama fluorescenciniu mikroskopu *OLYMPUS IX2-ILL 100* (OLYMPUS, Japonija). Per FITC filtrų rinkinį matomos žalios spalvos citoplazmos švytėjimas.

Mikroskopavimo metu gautos nuotraukos įvertinamos kompiuterine programa *ImageJ*. Išmatuojama ląstelių skleidžiama fluorescencija ir procentiškai lyginama nuo kontrolės – neveiktų mikroglijos ląstelių. Rezultatu laikomas mažiausiai trijų eksperimentinių pakartojimų metu apskaičiuotas fluorescencijos intensyvumo aritmetinis vidurkis.

## 2.13 Mikroglijos ląstelių vidumitochondrinių aktyvių deguonies junginių kiekio nustatymas

Mitochondrijų produkuojamų ADJ nustatymui naudotas fluorescencinis dažas – MitoSOX<sup>TM</sup> Red, mitochondrijų superoksido indikatorius. Tai katijoninis dihidroetidžio junginys, prisiskverbiantis į ląsteles, dėl trifenilfosfonio pakaito, esančio dažo molekulėje. Pakaitas atsakingas už dažo patekimą į mitochondrijas ir sąveika su čia išsiskiriančiais superoksidaais, įvykusi oksidacija sukelia raudonos spalvos fluorescenciją [139].

Mikroglijos ląstelių produkuojami vidumitochondriniai ADJ vertinti po paros veikimo nestimuliuotu ir stimuliuotu egzosomų preparatais. Lygiagrečiai vertinami ir kontroliniai mėginiai: tiesiogiai poli I:C seka veiktos ir papildomai neveiktos mikroglijos ląstelės. Prieš inkubaciją su fluorescuojančiu dažu, ląstelės nuo egzosomų ir poli I:C likučių praplaunamos HBSS tirpalu. Po to mikroglijos ląstelės buvo veikiamos 2 µM MitoSOX<sup>TM</sup> Red dažu ir 10 min inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Vėliau ląstelės HBSS tirpalu du kartus praplaunamos nuo į ląsteles nepatekusių dažų likučių. Praplovus ląsteles užpilamas nedidelis kiekis HBSS ir ląstelės vaizdinamos fluorescenciniu mikroskopu *OLYMPUS IX2-ILL 100* (OLYMPUS, Japonija). Per TXRED filtrų rinkinį buvo matomas raudonos spalvos mitochondrijų tinklo švytėjimas.

Mikroskopavimo metu gautos nuotraukos įvertinamos kompiuterine programa *ImageJ*. Išmatuojama ląstelių skleidžiama fluorescencija ir procentiškai lyginama kontrolės – neveiktų mikroglijos ląstelių. Rezultatu laikomas mažiausiai trijų eksperimentinių pakartojimų metu apskaičiuotas fluorescencijos intensyvumo aritmetinis vidurkis.

## 2.14 Kaspazės-1 aktyvumo įvertinimas mikroglijos ląstelėse

Kaspazės-1 aktyvumui mikroglijos ląstelėse įvertinti naudotas komercinis *Caspase-Glo 1 Inflammasome Assay G9951* (Promega Corporation, JAV) reagentų rinkinys. Į ląstelių mitybinę terpę pridėjus Z-WEHD-aminoliuciferino substrato, aktyvios kaspazės-1 poveikyje jis yra skaidomas iki aminoliuciferino, kuris kaip substratas prisijungęs prie liuciferazės fermento sukelia termostabilių liuminescencinį signalą, kurio intensyvumas proporcingas kaspazės-1 aktyvumui [140]. Matavimai atliekami pagal gamintojo nurodytą protokolą.

Po paros inkubacijos egzozomomų preparatais mikroglijos ląstelių kultūrų terpė santykiu 1:1 (paprastai po 50 µl) baltoje lėkštelėje sumaišoma su Z-WEHD-aminoliuciferino substratu ir 1 val. yra inkubuojama kambario temperatūroje, saugant nuo tiesioginių saulės spindulių. Po inkubacijos plokštelių skaitytuvu išmatuojamas liuminescencinis signalas. Lygiagrečiai vertinama ir egzozomų preparatais neveikta mikroglija bei tiesiogiai poli I:C seka veiktos mikroglijos ląstelės. Išmatuotas liuminescencinis signalas procentiškai lyginamas nuo neveiktų mikroglijos ląstelių kaip kontrolės. Rezultatu laikomas mažiausiai trijų eksperimentinių pakartojimų metu apskaičiuotas liuminescencijos intensyvumo aritmetinis vidurkis.

## 2.15 Statistinių duomenų analizė

Rodiklių vidutinės vertės, standartinio nuokrypio vertės ir koreliacijos koeficientas apskaičiuojamos naudojant *Microsoft Excel 2016* programinį paketą.

Aritmetinis vidurkis  $A$  apskaičiuojamas pagal 2.4 formulę:

$$A = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i \quad (2.4)$$

čia:  $n$  – reikšmių kiekis,  $a$  – nario reikšmė,  $i$  – aibės duotasis narys.

Standartinis nuokrypis  $SN$  apskaičiuojamas naudojantis 2.5 formule:

$$SN = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (a_i - A)^2} \quad (2.5)$$

Koreliacijos koeficientas apskaičiuojamas naudojantis 2.6 formule:

$$K = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} \quad (2.6)$$

čia:  $x$  ir  $y$  imčių reikšmės,  $\bar{x}$  ir  $\bar{y}$  imčių vidurkiai.

Statistinė kiekybinių eksperimentų duomenų analizė atlikta *IBM SPSS Statistics 20* programiniu paketu. Vertinti kiekvieno eksperimento pakartojimų vidurkiai, naudojant vienakryptę dispersinę ANOVA analizę, taikant Fišerio mažiausiai reikšmingo skirtumo kriterijų – *LSD Post Hoc* testą. Duomenys laikomi statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

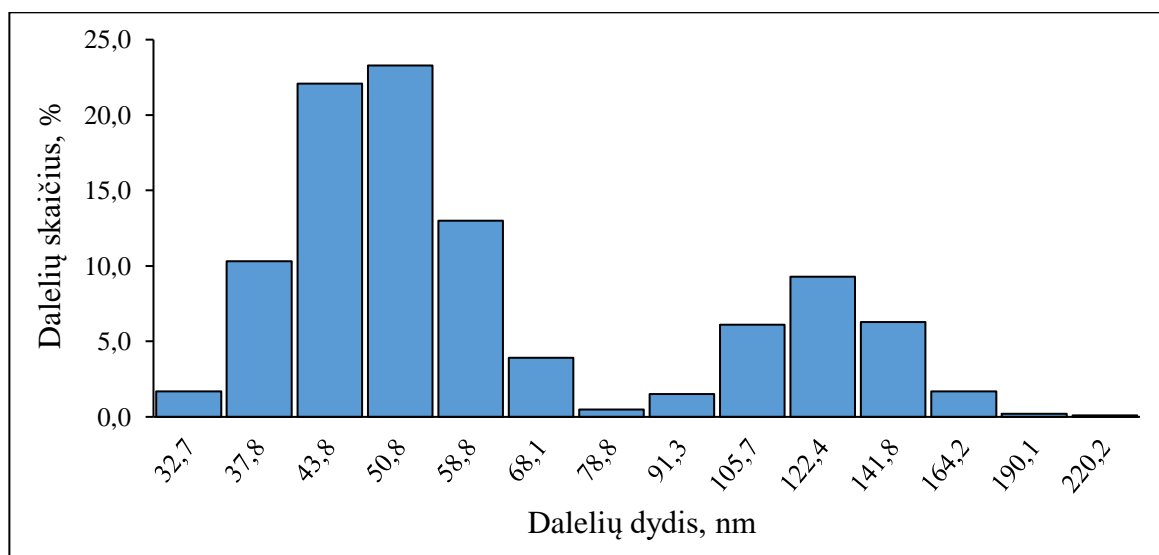
Visų atliktų eksperimentų  $n = 3-10$ .

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Norint nustatyti, ar virusų veikiamos kvėpavimo takų ląstelių egzomosos keičia mikroglijos ląstelių aktyvumą, žmogaus kvėpavimo takų epitelio ląstelės (KTEL) buvo stimuliuotos sintetiniu viruso mimetiku laikoma dvigrandės RNR seka – poli I:C, sukeliančia klasikinį antivirulinį imuninį atsaką, aktyvuojama per TLR3 receptorius [28]. Mikroglijos ląstelės buvo veikiamos iš poli I:C seka stimuliuotų KTEL kultūrų terpės išskirtais egzosomų preparatais. Mikroglijos ląstelių aktyvumo įvertinimui nustatyti buvo tirti jų gyvybingumo, funkciniai mitochondrijų, ADJ produkcijos ir kaspazės-1 aktyvumo pokyčiai. Tyrimų patikimumui užtikrinti visi eksperimentai lygiagrečiai atlikti ir su sveikų, virusine seka nestimuliuotų iš KTEL kultūrų terpės išskirtais egzosomų preparatais, kuriais taip pat buvo veiktos mikroglijos ląstelės. Palyginimui, mikroglijos ląstelės buvo tiesiogiai veikiamos ir poli I:C seka. Taip pat buvo atliekami kontroliniai eksperimentai su nepaveiktomis mikroglijos ląstelėmis.

#### 3.1 Išskirtų kvėpavimo takų ląstelių egzosomų charakterizavimas

Siekiant ištirti dalelių pasiskirstymą pagal dydį iš KTEL kultūrų terpių išskirtų egzosomų preparatuose, jie buvo tiriami dalelių analizatoriumi *Zetasizer*. Visų tirtų mėginių dalelių dydis ir pasiskirstymas buvo panašus. Rezentaciniai poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatų analizės rezultatai pateikti 3.1 paveiksle.



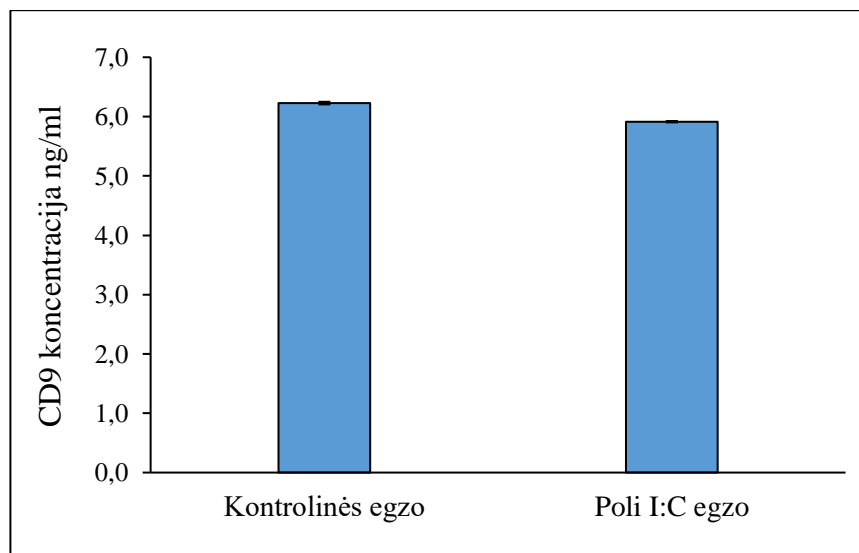
**3.1 pav.** Dalelių dydžio ir pasiskirstymo histograma poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparate

Iš pateiktos histogramos duomenų matoma, kad preparate esančių dalelių dydis svyruoja nuo 32 iki 220 nm. Apie 68 % preparate esančių dalelių dydis yra 37–58 nm. Literatūros duomenimis egzosomų dydis varijuoja nuo 30 iki 150 nm [31]. Naudojant dinaminės šviesos sklaidos metodą prietaisais matuojama ne pačių dalelių dydį, bet aplink jas judantį ir šviesą sklaidantį skystį, dėl to gaunami dydžiai yra šiek tiek didesni už pačių dalelių. Tuo remiantis galima teigti, kad beveik visos tirtame egzosomų preparate esančios dalelės gali būti priskiriamos egzosomoms.

Taip pat KTEL preparatuose buvo nustatomi specifiniai molekuliniai egzosomų paviršiaus žymenys – CD9 tetraspaninai [68]. Žymenų aptikimui taikytas imunofermeninės analizės ELISA metodas, leidžiantis specifiškai ir ganėtina tiksliai (ng/ml) įvertinti CD9 žymens koncentraciją egzosomų



preparatuose. Buvo vertinami abiejų tipų poli I:C seka stimuliuotas ir nestimuliuotas KTEL egzosomų preparatai, esant vienodoms bendro baltymo, nustatyto pagal Bradfordo metodą, koncentracijoms tiriamuose mėginiuose. Gauti rezultatai pateikti 3.2 paveiksle.

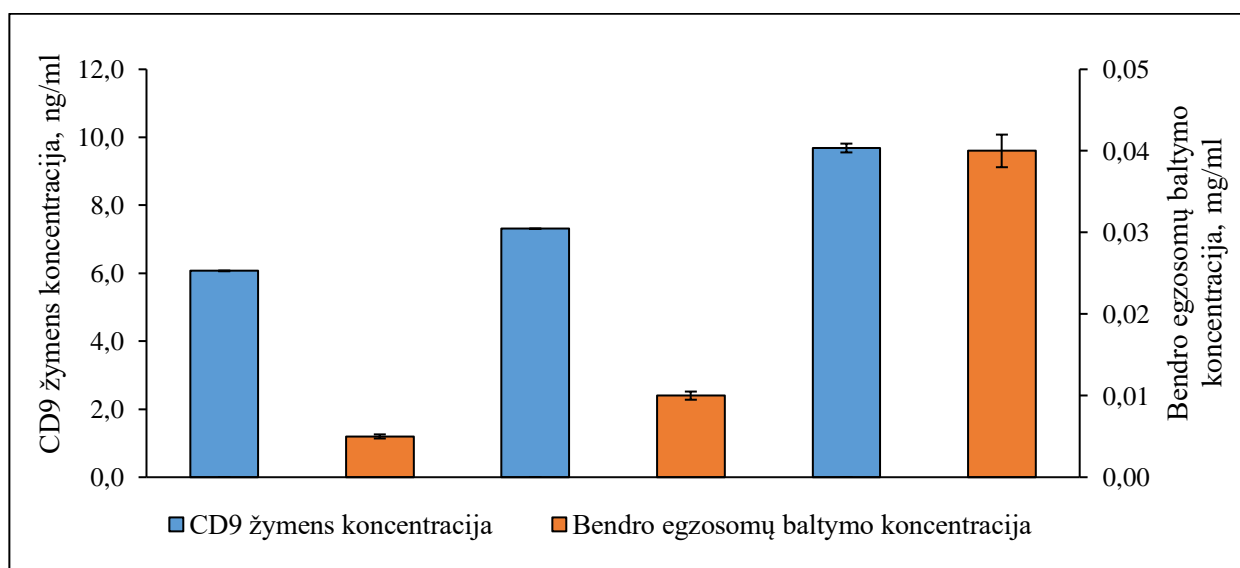


**3.2 pav.** Egzosomų CD9 paviršiaus žymens koncentracija tiriamuose egzosomų preparatuose.

*Kontrolinės egzo* – iš sveikų KTEL išskirtų egzosomų preparatas; *Poli I:C egzo* – iš poli I:C seka stimuliuotų KTEL išskirtų egzosomų preparatas

Iš pateiktų duomenų matyti, kad abiejų tipų egzosomų preparatuose CD9 žymens koncentracija buvo panaši ir sudarė apie 6 ng/ml. Preparatuose nustatytas specifinis egzosomų žymuo CD9 patvirtina, kad iš KTEL kultūrų terpės išskirtuose preparatuose yra egzosomų.

Taip pat buvo įvertinta koreliacija tarp bendro baltymo kiekio egzosomų preparatuose ir egzosomų paviršiaus žymens CD9 koncentracijų. Gauti rezultatai pavaizduoti 3.3 paveiksle.

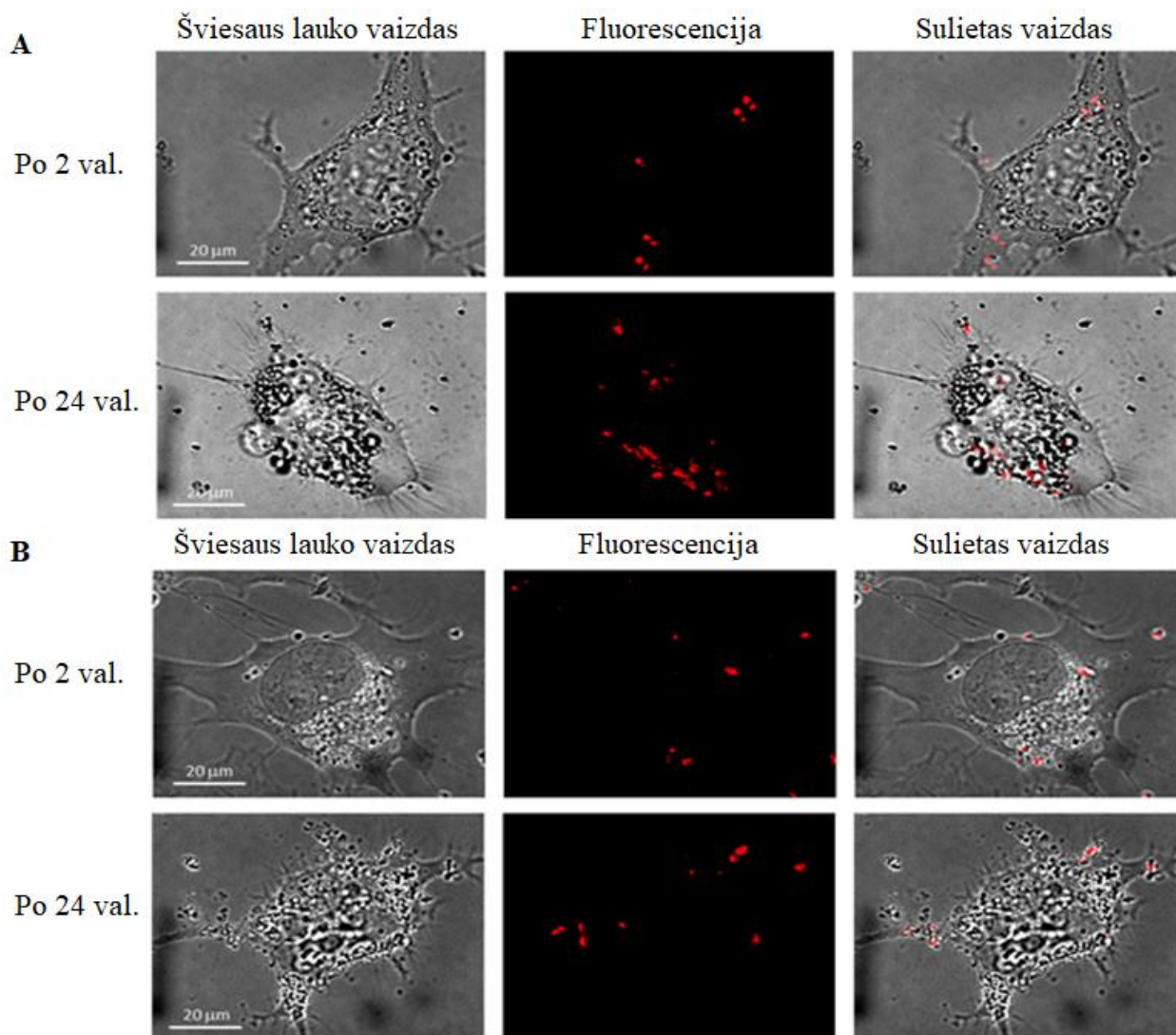


**3.3 pav.** Koreliacija tarp bendro egzosomų preparatų baltymo ir CD9 egzosomų žymens koncentracijų

Atlikta analizė parodė, kad egzosomų paviršiaus žymens CD9 koncentracija turi sąryšį su bendru egzosomų preparate nustatytu baltymo kiekiu. Didėjant bendram baltymo kiekiui, didėja ir egzosominio žymens koncentracija. Apskaičiuotas koreliacijos koeficientas lygus 0,9139. Todėl galima teigti, kad egzosomų koncentracijos matavimui galima taikyti Bradfordo metodą.

### 3.2 Kvėpavimo takų ląstelių egzosomų patekimas į mikroglijos ląsteles

Išskyrus ir identifikavus KTEL produkuojamas egzosomas buvo ištirtas jų patekimas į mikroglijos ląsteles fluorescencinės mikroskopijos metodu. Abiejų tipų egzosomų preparatai buvo nudažyti fluorescuojančiais dažais ir stebėti fluorescenciniu mikroskopu. Mikroglijos ląstelės vaizdintos taikant šviesaus lauko mikroskopiją. Gautos atskiros ir sulietos to paties mikroskopinio lauko nuotraukos pateiktos 3.4 paveiksle.



**3.4 pav.** Egzosomų patekimą į mikroglijos ląsteles reprezentuojančios nuotraukos.

A – poli I:C seka stimuliuoto KTEL egzosomų preparato; B – nestimuliuoto KTEL egzosomų preparato

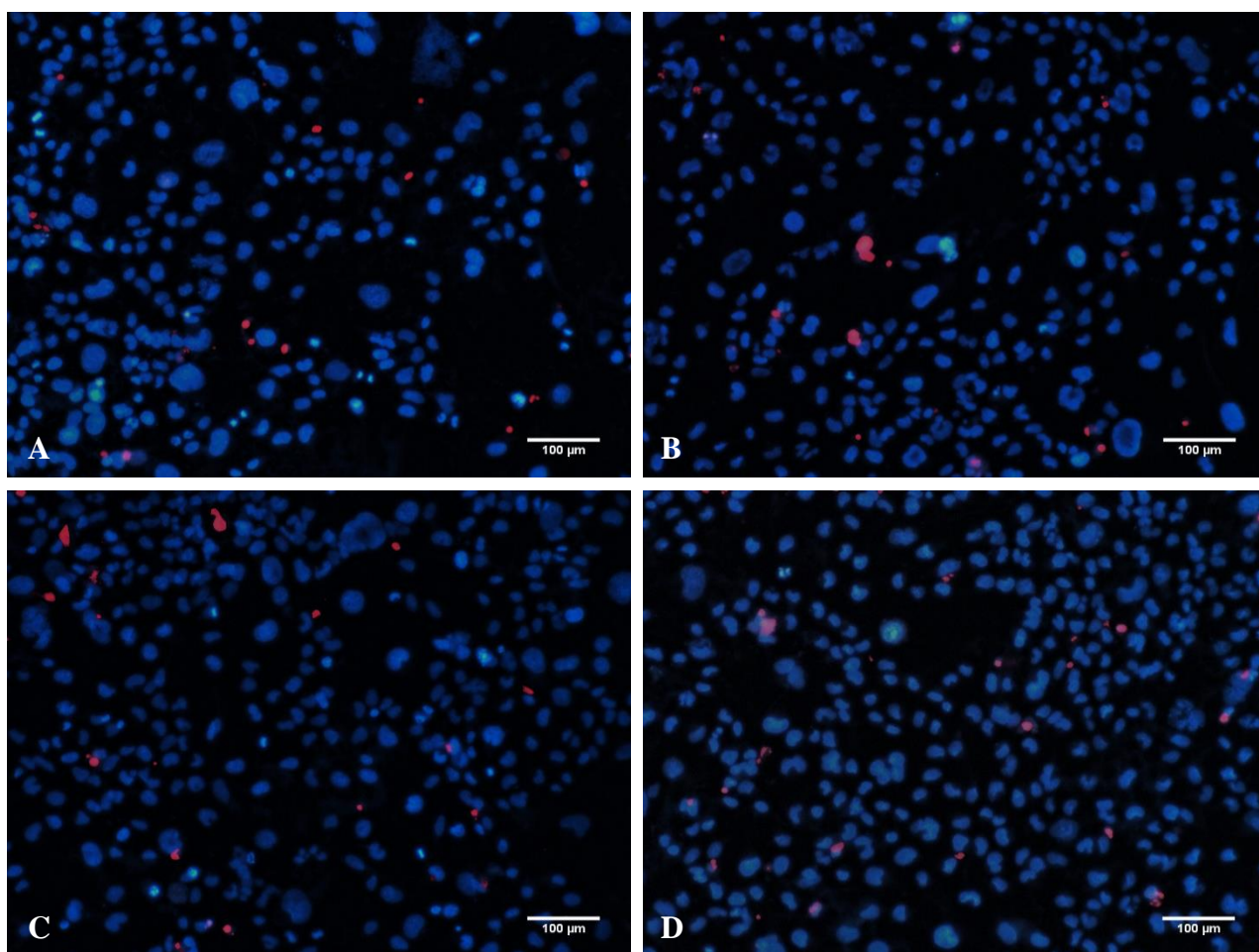
Paveiksle matoma, kad egzosomos patenka į mikroglijos ląsteles jau po 2 val. veikimo jų preparatais, o jų turinys nėra pasklidęs. Po paros stebėta pilna egzosomų internalizacija į ląsteles. Remiantis literatūra [60–61] galima manyti, kad KTEL išskirtos egzosomos į mikroglijos ląsteles pateko

tiesioginiu fagocitozės, makropinocitozės arba endocitozės būdu, nes jų turinys išliko nepasklidęs citoplazmoje. Gauti rezultatai neprieštaruoja kitų mokslininkų atliktiems tyrimams, rodantiems, kad egzosomos į immortalizuotas pelės mikroglijos ląsteles patenka fagocitozės [141], o į pirminės mikroglijos ląsteles – makropinocitozės būdu [142–143].

Pateiktuose egzosomų internalizacijos į mikrogliją vaizduose (žr. 3.4 pav.) matoma, kad po paros tiek poli I:C seka stimuliuotos KTEL, tiek nestimuliuotos KTEL egzosomos vis dar išlieka mikroglijos ląstelėse.

### 3.3 Kvėpavimo takų išskiriamų egzosomų poveikis mikroglijos gyvybingumui

Prieš atliekant tolimesnius mikroglijos aktyvumo vertinimo tyrimus buvo įvertintas mikroglijos ląstelių gyvybingumas po jų poveikio egzosomų preparatais, išskirtais iš KTEL kultūrų terpių. Tam tikslui mikroglijos ląstelės buvo nudažytos fluorescuojančiais dažais: *Hoechst 33342* ir prodidžio jodidu, kurie jungdamiesi su DNR leidžia atskirti gyvybingus ir negyvus – žuvusius branduolius, vaizdinant ląsteles fluorescenciniu mikroskopu. Reprezentacinės mikroglijos ląstelių gyvybingumo nuotraukos pateiktos 3.5 paveiksle.



3.5 pav. Mikroglijos ląstelių gyvybingumą vaizduojančios fluorescencinės nuotraukos.

A – ląstelių kontrolės, neveiktos mikroglijos ląstelės; B – po poveikio nestimuliuotų KTEL egzosomų preparatu; C – po tiesioginio poveikio poli I:C seka; D – po poveikio poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu

Nuotraukose matomi mėlyna spalva švytintys gyvybingi ląstelių branduoliai ir raudoni – nekroziniai branduoliai. Mikroglijos gyvybingumo kiekybiniam įvertinimui iš mikroskopinių nuotraukų kompiuterine programa *ImageJ* buvo apskaičiuotas bendras ląstelių skaičius, nuo kurio apskaičiuotas ir procentiškai išreikštas gyvybingų branduolių skaičius. Gauti rezultatai pateikiami 3.1 lentelėje.

**3.1 lentelė** Gyvybingų mikroglijos branduolių kiekybinio įvertinimo rezultatai

Tiriamo mėginio tipas	Gyvybingi branduoliai, %
Kontrolė	94,22 ± 1,11
EGZO	94,20 ± 1,17
Poli IC	93,05 ± 1,73
EGZO-Poli IC	90,23 ± 2,46

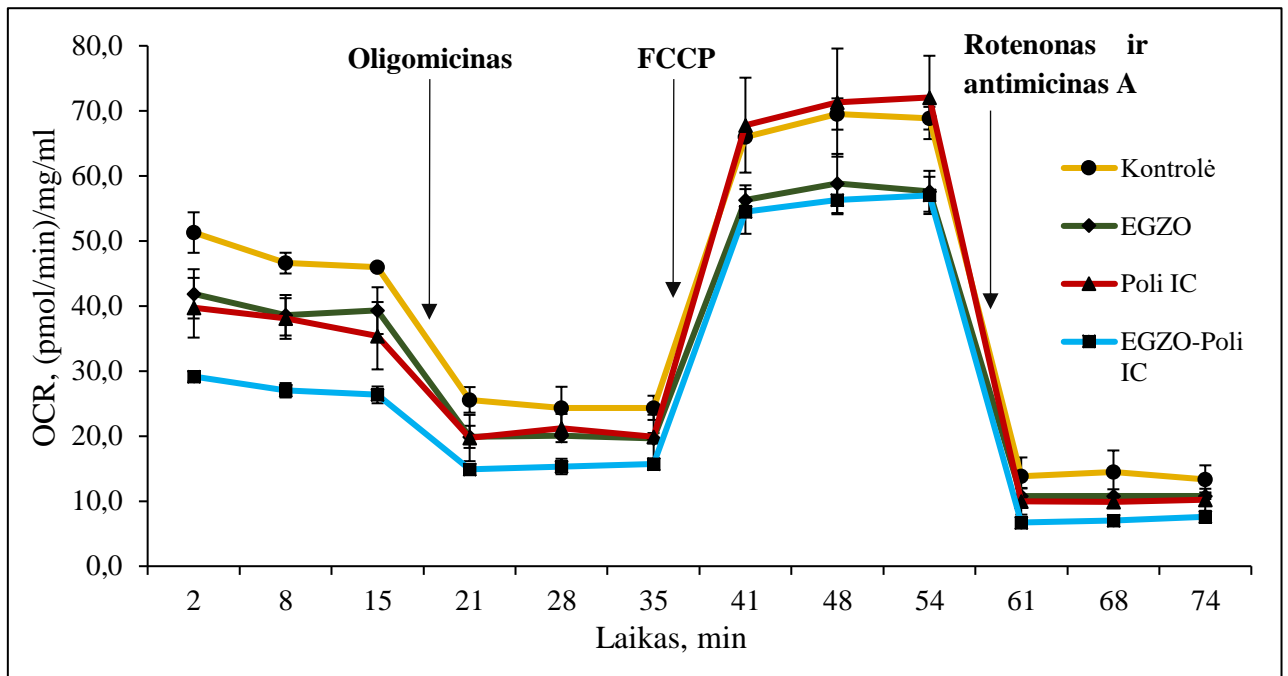
Tyrimo metu naudotų mikroglijos ląstelių gyvybingumas, kaip ląstelių kontrolės, buvo 94,22 ± 1,11 %. Mikrogliją tiesiogiai veikiant poli I:C seka stebėtas nežymus mikroglijos gyvybingumo sumažėjimas iki 93,05 ± 1,73 % (žr. 3.1 lentelė, Poli IC). Po paros inkubacijos egzozomomis, nustatyta, kad nestimuluotas egzozomų preparatas mikroglijos ląstelių gyvybingumo nepakeitė ir išliko 94,20 % (žr. 3.1 lentelė, EGZO). Tiesioginis veikimas poli I:C seka mikroglijos gyvybingumo reikšmingai nesumažino. Tokių rezultatų ir buvo tikėtasi, nes viruso mimetiko seka tiesiogiai nežudo ląstelių, o tik aktyvina imuninį atsaką prisijungusi prie receptorių [28]. Poli I:C seka stimuliuotas egzozomų preparatas ląstelių gyvybingumą sumažino apie 4 %, tačiau toks pokytis nebuvo statistiškai reikšmingas (žr. 3.1 lentelė, EGZO-Poli IC). Iš gautų rezultatų matome, kad mikroglijos gyvybingumas po poveikio egzozomų preparatais reikšmingai nepasikeitė.

### 3.4 Kvėpavimo takų išskiriamų egzozomų poveikis mikroglijos mitochondrijų funkcijai

Yra žinoma, kad priešvirusinio imuninio atsako metu atsiranda mitochondrijų struktūriniai ir funkciniai pokyčiai [100]. Aktyvavus imunines ląsteles, pavyzdžiui, makrofagus, jų ląstelių energetinis fenotipas persitvarko iš mitochondrinio į glikolitinį [116]. Mikroglija atitinka makrofagų funkcijas smegenyse [7], tačiau jos energetinis persitvarkymas egzozomų, susidariusių virusinėmis infekcijomis veikiamų ląstelių, poveikyje nėra tirtas. Siekiant išsiaiškinti, kaip pakinta mikroglijos ląstelių mitochondrijų funkcijos, veikiant jas iš KTEL išskirtais egzozomų preparatais, buvo atlikta mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumo analizė *Seahorse* analizatoriumi.

Tyrimo metu analizatoriumi buvo įvertinti deguonies koncentracijos pokyčiai, atsiradę mikroglijos ląstelių mitybinėje terpėje, paeiliui automatiškai injekuojant mitochondrijų kvėpavimo grandinės slopiklius ar stimulatorius, leidžiančius įvertinti kvėpavimo grandinės aktyvumo pokyčius. Susidarę deguonies koncentracijos pokyčiai, normalizuoti pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį, grafiškai pateikiami 3.6 paveiksle kaip analizės metu kintantis deguonies suvartojimo greitis OCR, kuris išreikštas mg/ml bendro baltymo kiekiui.

Buvo tirti keturių tipų mėginiai: tiesiogiai poli I:C seka veiktos mikroglijos, nestimuluotomis KTEL egzozomomis veiktos mikroglijos ląstelės, poli I:C seka stimuliuotos KTEL egzozomomis veiktos mikroglijos ląstelės ir papildomai neveiktos mikroglijos ląstelės.



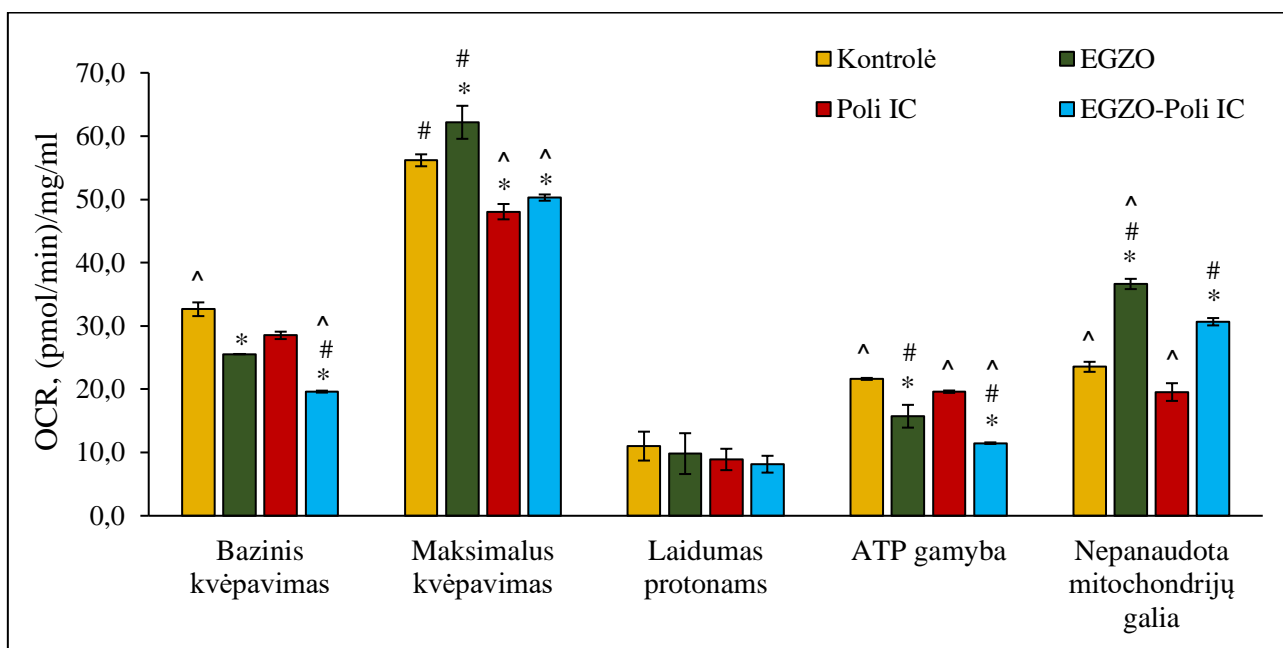
**3.6 pav.** Deguonies suvartojimo greitis mikroglijos ląstelėse.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzosomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzosomomis; *OCR* – pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį normalizuotas deguonies suvartojimo greitis

Iš pradžių buvo įvertintas ląstelių bazinis kvėpavimas – tai deguonies suvartojimo greitis, atspindintis ATP sintezės greitį, ir yra sąlygojamas ATP suvartojimo intensyvumo ląstelėje. Po bazinio kvėpavimo įvertinimo automatiškai injekuotas mitochondrijų kvėpavimo grandinės V komplekso – ATP sintazės slopiklis – oligomicinas, kuris sustabdė deguonies sunaudojimą ATP gamybai, todėl sumažėjo mitochondrijų kvėpavimą rodančios OCR vertės. Likęs deguonies sunaudojimo dydis yra sąlygojamas vidinės mitochondrijų membranos laidumo protonams. Antroji injekcija papildė ląstelių terpę skyrikliu FCCP, kuris padarė mitochondrijų vidinę membraną pralaidžią protonams taip panaikindamas elektrocheminį protonų gradientą. Taip kvėpavimo grandinė buvo aktyvinama maksimaliai ir pasiekta didžiausia OCR reikšmė t. y. maksimalus kvėpavimas. FCCP stimuliuotas OCR padidėjimas naudojamas apskaičiuojant nepanaudotą mitochondrijų galią, kuri apibrėžiama kaip skirtumas tarp maksimalaus ir bazinio kvėpavimo. Šis dydis parodo ląstelės gebėjimą reaguoti į padidėjusį energijos poreikį arba esant stresinėms sąlygoms. Trečioji injekcija yra rotenono, I kvėpavimo grandinės komplekso slopiklio, ir antimicino A, III komplekso slopiklio, mišinys, kuris sustabdo mitochondrijų kvėpavimą ir leidžia apskaičiuoti nemitochondrinį, kitų procesų lemiamą kvėpavimą [137]. Bendruoju atveju po oligomicino tirpalo injekcijos OCR vertės visada mažėja, po FCCP – didėja, o po rotenono ir antimicino A mišinio – mažėja.

Iš pateikto grafiko (žr. 3.6 pav.) matyti, kad po kiekvienos injekcijos matuotas mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis, visais atvejais didžiausias buvo kontrolėje, o mažiausias mikroglijos ląstelėse, paveiktose poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu. Siekiant pamatyti ir aiškiau įvertinti mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumo skirtumus tarp tiriamųjų grupių, iš 3.6

paveiksle pateikto grafiko buvo apskaičiuoti įvairūs kvėpavimo grandinės veiklą atspindintys parametrai, kurie pateikti 3.7 paveiksle.



**3.7 pav.** Mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumą rodančių parametru palyginimas skirtinguose mikroglijos ląstelių mėginiuose.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzozomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzozomomis; *OCR* – pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį normalizuotas deguonies suvartojimo greitis. \* – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą); # – žymi statistinį patikimumą lyginant su tiesiogiai poli I:C seka veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą); ^ – žymi statistinį patikimumą lyginant su nestimuliuotomis egzozomomis veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą)

Iš pateiktų bazinio kvėpavimo duomenų matyti, kad tiek tiesiogiai poli I:C seka, tiek egzozomų preparatais veiktų mikroglijos ląstelių deguonies suvartojimo greitis, buvo sumažėjęs lyginant su kontrolinėmis bazinio kvėpavimo reikšmėmis. Mažiausios bazinio kvėpavimo reikšmės buvo nustatytos poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzozomų preparatu veiktų mikroglijos ląstelių mėginiuose. Šio preparato bazinio kvėpavimo OCR reikšmės turėjo statiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, tiesiogiai poli I:C veiktomis mikroglijos ląstelėmis ir nestimuliuotomis egzozomomis veikta mikroglija.

Viena iš pagrindinių mitochondrijų funkcijų – tai ATP gamyba, panaudojant protonų sukurtą elektrocheminį gradientą. Šio gradiento sutrikdymui ir vidinės mitochondrijų membranos depolarizacijai įtakos turi vidinės mitochondrijų membranos laidumas protonams. Laidumui protonams yra priskiriamas natūralus ar specialių vidinėje membranoje esančių baltymų nešiklių, pavyzdžiui, UCP2, sukeltas protonų grąžinimas iš perimitochondrinės ertmės į mitochondrijų užpildą. Laidumas protonams gali būti sąlygojamas vidinės mitochondrijų membranos nevientisumo, dėl atsiradusių trūkių ar pažaidų, per kurias protonai gali laisvai judėti abipus membranos. Didėjantis laidumas protonams, susijęs su sumažėjusiu elektrocheminiu protonų gradientu, dėl kurio sumažėja

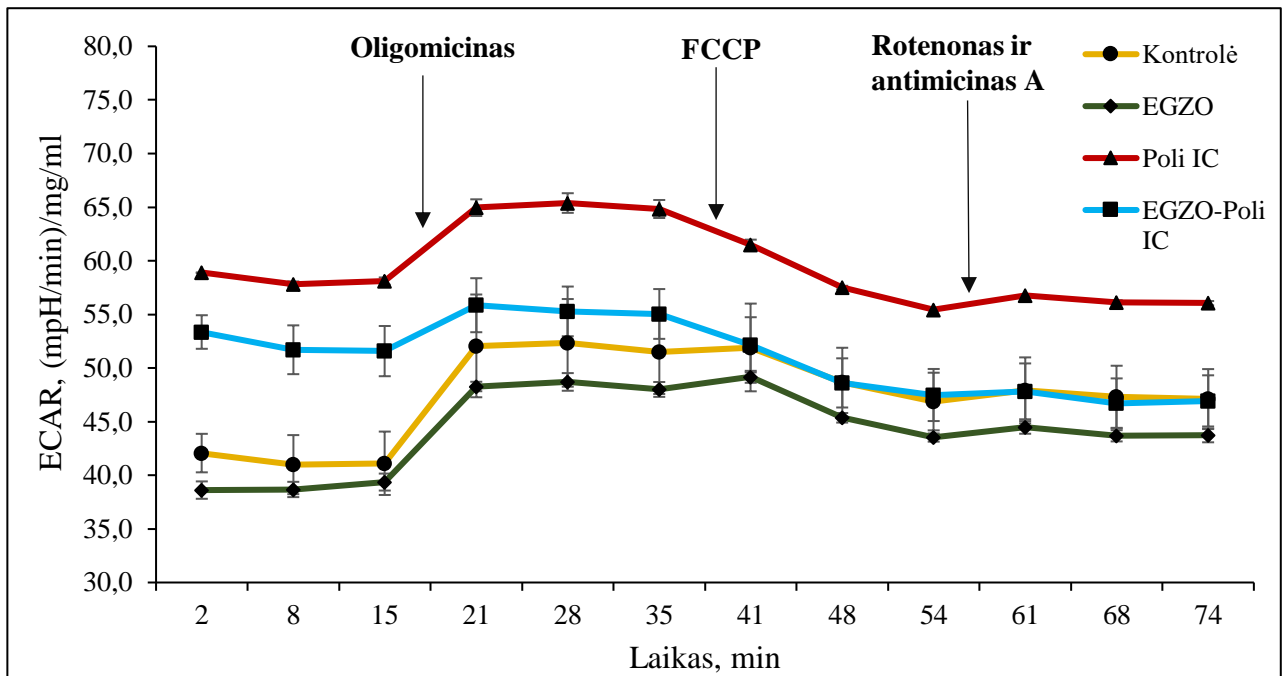
ATP gamybos kiekis [144]. Iš atlikto tyrimo rezultatų (žr. 3.7 pav.) matyti, kad mikroglijos ląstelėse, abiejų tipų egzosomų preparatų poveikyje, ATP sintezė buvo reikšmingai slopinama, tačiau nestebimas padidėjęs laidumas protonams lyginant su ląstelių kontrole. Didžiausias ATP gamybos sumažėjimas ir laidumas protonams buvo poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomomis veiktų mikroglijos ląstelių mėginiuose, tačiau minėti skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi lyginant su kitomis tiriamomis grupėmis. Be to, ATP gamybos sumažėjimas mikroglijos ląstelėse poli I:C stimuliuotų ląstelių egzosomų poveikyje turėjo statistinę reikšmę ir lyginant su nestimuliuotomis egzosomomis veikta mikroglija.

Po FCCP injekcijos ląstelėms sukėlus stresines sąlygas pastebėta, kad egzosomų preparatais veiktų mikroglijos ląstelių deguonies sunaudojimas padidėja, atitinkamai lyginant su kontrole ar tiesiogiai poli I:C veikiama pavyzdžiais. Mažesnis padidėjimas stebimas tarp tiesiogiai poli I:C seka veiktų mikroglijos ląstelių ir poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomomis veiktų mikroglijos ląstelių. Lyginant kontrolės ir poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu veiktų mikroglijos ląstelių maksimalaus kvėpavimo reikšmės stebimas reikšmingas jų sumažėjimas, tačiau nepanaudotą mitochondrijų galią rodančios reikšmės – reikšmingai padidėja. Stebimas statistiškai reikšmingas skirtumas ir tarp abiejų tipų egzosomų preparatais veiktų mikroglijos ląstelių maksimalaus kvėpavimo verčių. Tokie rezultatai gali reikšti, kad stimuliuotų egzosomų poveikyje mikroglijos ląstelių metabolizmas persitvarko mitochondrinio deguonies sunaudojimo slopinimo linkme.

Neseniai E. A. Russell et al. atlikto tyrimo metu nustatyta, kad egzosomomis, išskirtomis iš citokinu TNF- $\alpha$  stimuliuotų imortalizuotų pelės neuronų hipokampo ląstelių HT-22 linijos perduotas priešuždegiminis citokinas sukelia reikšmingą mitochondrijų disfunkciją neuronų tipo ląstelėse. Nustatyta, kad bazinį kvėpavimą, maksimalų kvėpavimą, ATP gamybą, atsarginę mitochondrijų galią rodančios OCR reikšmės sumažėjo, o laidumas protonams padidėjo lyginant su egzosomomis neveiktomis ląstelėmis [145]. Literatūroje yra aprašyta, kad įvairių uždegiminių veiksnių poveikyje makrofagai yra aktyvinami, stebimas jų metabolizmo persitvarkymas į glikolitinį [146]. Kadangi mikroglija atitinka makrofagų funkcijas CNS, galbūt ir jos ląstelės gali būti aktyvinamos keičiant jų mitochondrijų funkcijas ir pertvarkant metabolizmą.

Tyrimo metu analizatoriumi buvo įvertinti ir ląstelių kultūrų terpės pH pokyčiai, normalizuoti pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį, grafiškai pateikiami 3.8 paveiksle kaip analizės metu kintantis tarpląstelinis rūgštėjimo greitis ECAR, kuris išreikštas mg/ml bendro baltymo kiekiui.

Anksčiau aptarti OCR duomenys yra mitochondrinio kvėpavimo greičio rodiklis, o ECAR – glikolizės greičio matas.



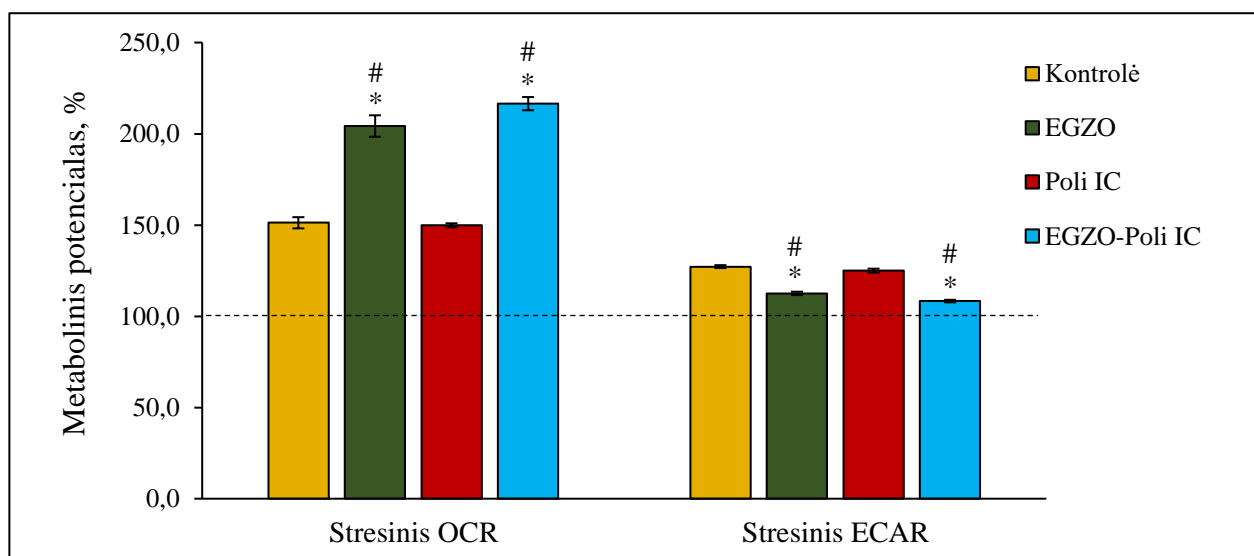
**3.8 pav.** Tarpląstelinis rūgštėjimo greitis mikroglijos ląstelėse.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzosomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzosomomis; *ECAR* – pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį normalizuotas tarpląstelinis rūgštėjimo greitis

Iš 3.8 paveikslo matoma, kad nestimuliuotų KTEL egzosomų preparatu veiktų mikroglijos ląstelių terpės pH lyginant su kontrole yra sumažėjęs, o poli I:C stimuliuotų ląstelių egzosomų preparatu veiktų – padidėjęs, tačiau mažesnis nei tiesioginio poli I:C veikimo mikroglijos mėginiuose. Matyti, kad stimuliuotų ląstelių egzosomų preparatu veiktų mikroglijos ląstelių terpė rūgštinama labiau, kas parodo pasikeitusį ląstelių glikolitinį aktyvumą.

Metaboliniu potencialu vadinamas ląstelių gebėjimas patenkinti energijos poreikį mitochondrinio kvėpavimo ir glikolizės būdu. Oligomicinas slopina mitochondrijų ATP gamybą ir sukelia kompensacinį glikolizės greičio padidėjimą, kai ląstelės bando patenkinti savo energijos poreikius glikolitiniais keliais. FCCP depoliarizuoja mitochondrijų membraną ir padidina deguonies sunaudojimo greitį, dėl mitochondrijų „pastangų“ atstatyti vidinės mitochondrijų membranos elektrocheminį potencialą, tuo metu sumažinamas glikolizės greitis. Metabolinis potencialas – tai procentinis dydis išreiškiamas stresinėmis sąlygomis nustatytų OCR ir ECAR reikšmių pokyčiu nuo pradinėmis eksperimento sąlygomis nustatytų minėtų dydžių verčių. Šiam dydžiui nustatyti iš analizatorių gautų duomenų sudaromas grafikas (žr. 3.9 pav.).



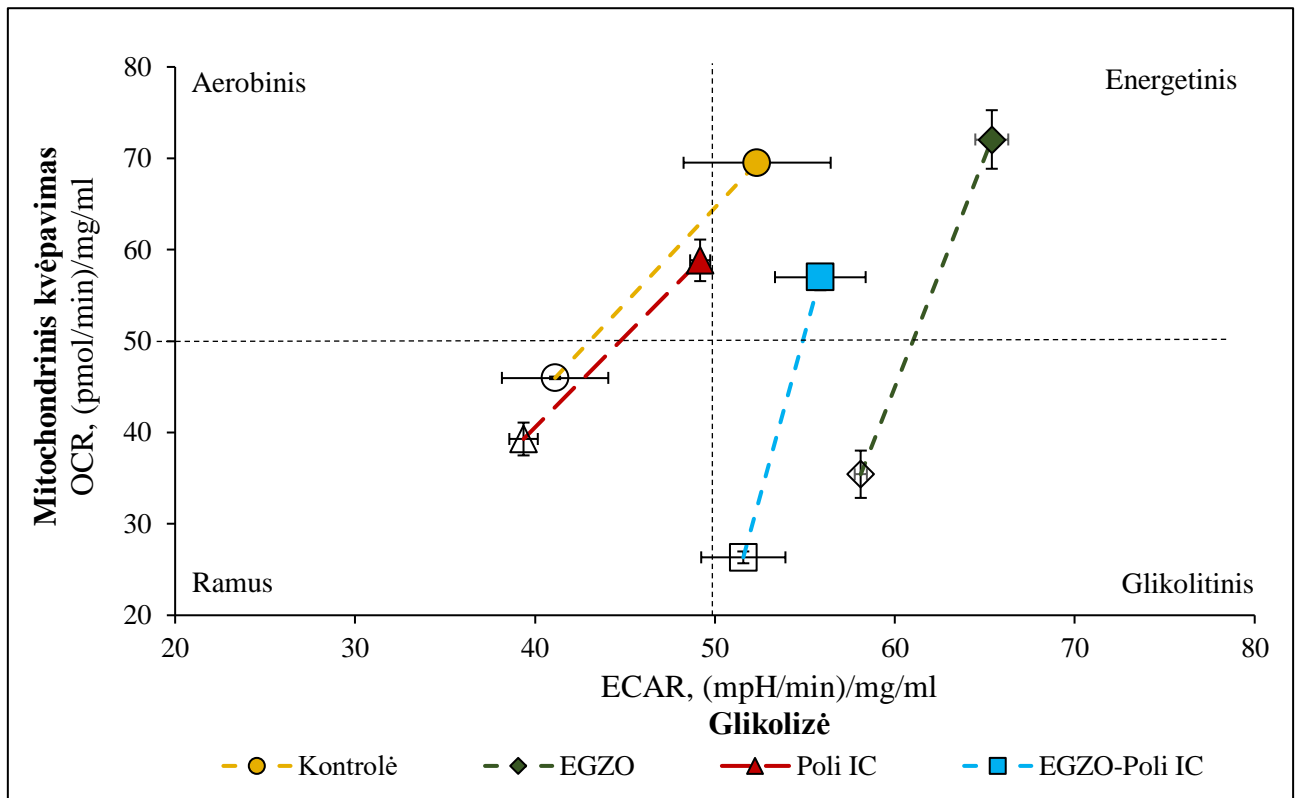


**3.9 pav.** Metabolinio potencialo palyginimas mikroglijos ląstelėse.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzosomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzosomomis. \* – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą). # – žymi statistinį patikimumą lyginant su tiesiogiai poli I:C seka veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą). *Stresinis OCR* – tai stresinėmis sąlygomis nustatytas suvartojamo deguonies greitis, žymintis ląstelių mitochondrinio kvėpavimo potencialą; *Stresinis ECAR* – stresinėmis sąlygomis nustatytas tarpląstelinis rūgštėjimo greitis, žymintis ląstelių glikolitinį potencialą

Iš pateikto grafiko matyti, kad tiesioginis veikimas poli I:C seka neturi reikšmingo skirtumo metabolinio potencialo procentinėms vertėms lyginant su kontrole. Tiek nestimuliuotų egzosomų, tiek stimuliuotų egzosomų preparatais veiktų mikroglijos ląstelių mitochondrinio kvėpavimo metabolinis potencialas reikšmingai padidėjo lyginant su kontrole ir tiesioginiu poli I:C veikimu. Mikroglijos ląstelių veikimas abiejų tipų KTEL egzosomomis pakeitė ir ląstelių gebėjimą patenkinti, atsiradusį energijos poreikį glikolizės būdu, tai rodančios metabolinio potencialo ECAR reikšmės lyginant su kontrole reikšmingai sumažėjo.

Siekiant nustatyti mikroglijos ląstelių metabolinius fenotipo pokyčius sudarytas OCR priklausomybės nuo ECAR grafikas (žr. 3.10 pav.).



**3.10 pav.** Mikroglijos ląstelių metabolinio fenotipo persiskirstymas.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzozomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzozomomis. *OCR* – pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį normalizuotas deguonies suvartojimo greitis; *ECAR* – pagal bendrą ląstelių baltymo kiekį normalizuotas tarpląstelinis rūgštėjimo greitis. Tuščiaviduriai žymekliai žymi pradinį ląstelių metabolinį fenotipą, užpildyti žymekliai – susidariusius stresinėmis sąlygomis, o punktyrinės linijos žymi metabolinį potencialą

Iš pateikto grafiko (žr. 3.10 pav.) matome, kad mikroglijos ląstelių metabolinis fenotipas abiejų tipų egzozomų preparatų poveikyje paslenkamas į labiau energetinį, be to, yra sumažinama ląstelių galimybė reaguoti į stresą. Tiesiogiai poli I:C veiktų mikroglijos ląstelių metabolinis fenotipas lyginant su kontrole pasikeitė – tapo ramesnis ir labiau glikolitinis. Stimuliuotų KTEL egzozomomis veiktų mikroglijos ląstelių metabolinis fenotipas pasikeitė ženkliai. Jis sumažėjus OCR bei padidėjus ECAR vertėms pasislinko į glikolitinį fenotipą žymintį ketvirtį. Tokie gauti rezultatai, parodo, kad poli I:C stimuliuotomis ląstelių egzozomomis veiktos mikroglijos ląstelės lyginant su kontrole pakeitė savo metabolinę būklę, panašiai kaip ir mikroglijos ląstelės po tiesioginio poli I:C poveikio, silpnindamos mitochondrinio kvėpavimo oksidacinį fosforinimą ir stiprindamos glikolitinius procesus, kitaip tariant, įvyko jų metabolinis energetinis persiskirstymas.

Toks persiskirstymas aprašytas ir literatūroje. Makrofagus stimuliuojant per TLR receptorių sukeliama jų aktyvinimas ir energijos persiskirstymas iš katabolinio į anabolinį metabolizmą [116]. Kaip ir makrofaguose, aktyvinta mikroglijos būsena greičiausiai priklauso nuo mitochondrijų metabolizmo persitvarkymo.

Literatūroje aprašyta, kad pelių BV-2 mikroglijos ląsteles veikiant LPS, kurie susiję su klasikinio mikroglijos aktyvinimo M1 genų raiškos padidiniu, buvo pertvarkomas ląstelių metabolizmas iš pirminio oksidacinio į glikolitinį [147]. Panašūs rezultatai su BV-2 ląstelių linija po LPS poveikio gauti ir A. L. Voloboueva et al. atliktų tyrimų metu. Mokslininkai nustatė, kad LPS poveikyje ląstelių metabolizmui persitvarkius į glikolitinį mechanizmą, sumažėjo mikroglijos ląstelių deguonies suvartojimas, ir dėl išsiskiriančio laktato padidėjo tarpląstelinis rūgštėjimo greitis [148].

Nepaisant to, kad yra žinoma, jog LPS poveikyje yra pertvarkomas mikroglijos ląstelių metabolizmas, tačiau nėra duomenų apie žmogaus mikroglijos ląstelių metabolizmo pokyčius infekcijų stimuliuotų egzosomų poveikyje.

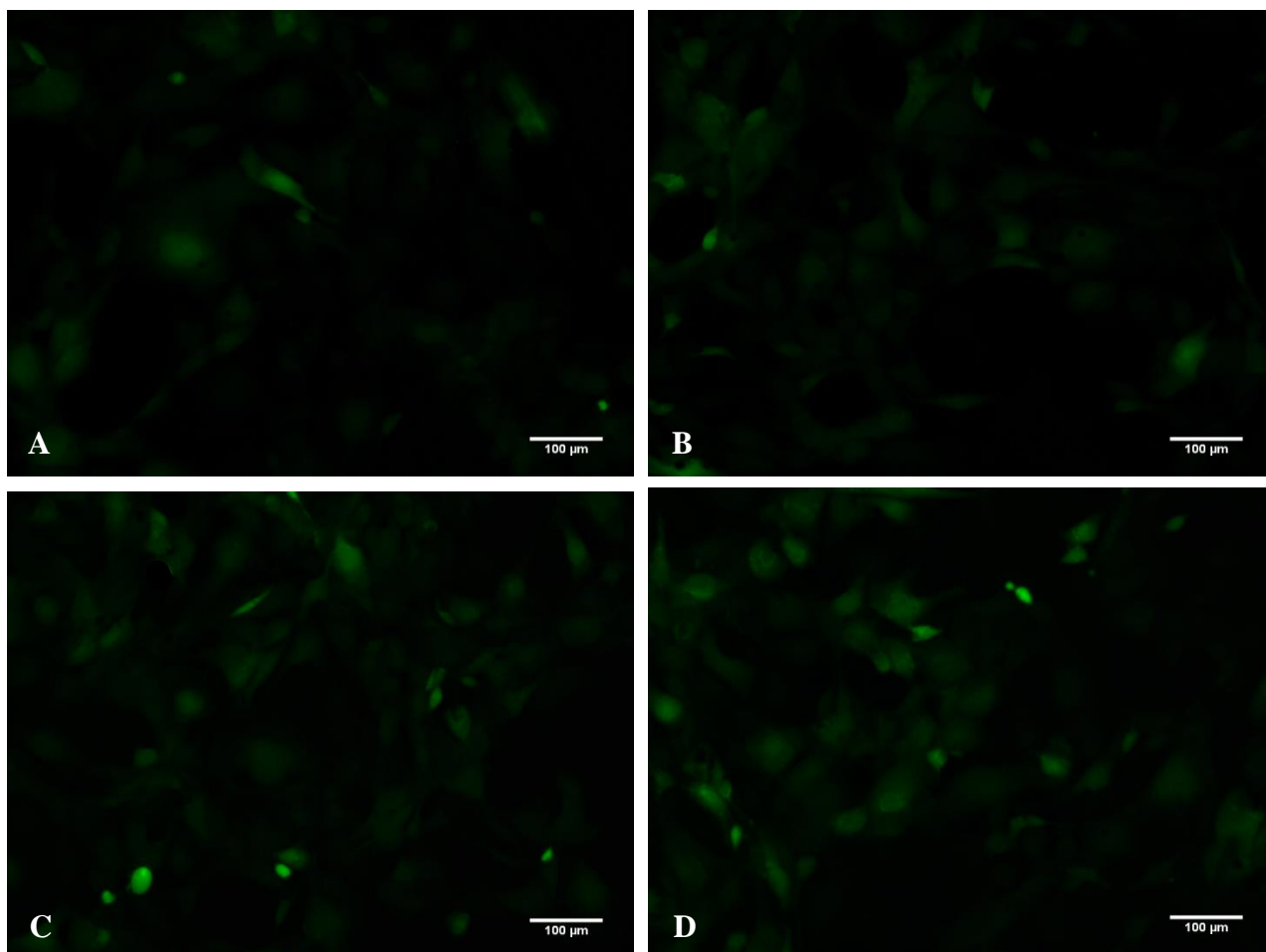
Projekto metu atliktus mikroglijos ląstelių mitochondrijų funkcijų analizę, galima teigti, kad po mikroglijos ląstelių poveikio poli I:C stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu, jos perprogramavo savo metabolinį fenotipą: iš ramybės būsenos perėjo į glikolitinę, padidėjus ECAR reišmėms ir sumažėjus OCR reišmėms. Taigi, mikroglijos veikimas poli I:C stimuliuotų ląstelių egzosomomis turi įtakos mikroglijos ląstelių metabolizmui ir gali būti siejamas su aktyvuota mikroglijos metaboline būsena.

### **3.5 Kvėpavimo takų išskiriamų egzosomų poveikis aktyvių deguonies junginių susidarymui**

Literatūros duomenimis yra žinoma, kad aktyvinta mikroglija produkuoja ADJ, kurie sukelia uždegiminius procesus ar sąlygoja ląstelių žūtį [85]. Siekiant nustatyti ar egzosomomis veikiamos mikroglijos ląstelės yra aktyvinamos buvo tirtas ADJ susidarymas jose, ląsteles veikiant nestimuliuotų KTEL egzosomų ir poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatais. Taip pat palyginimui buvo įvertintas ADJ susidarymas kontroliniuose, neveiktose mikroglijos, mėginiuose ir tiesiogiai poli I:C seka veiktose mikroglijos ląstelėse.

Viduląstelinį ADJ nustatymui naudotas H<sub>2</sub>DCFDA dažas, kuriam ląstelių membranos yra pralaidžios. Dažas ląstelės fermentų deacilinamas ir, jeigu ląstelėje produkuojami ADJ, tokie kaip vandenilio peroksidas, laisvieji radikalai, hidroksiperoksidai ir peroksinitrilai, yra oksiduojamas į fluorescuojančią formą [138]. Dažo fluorescencinis intensyvumas tiesiogiai susijęs su ADJ produkcijos kiekiu.

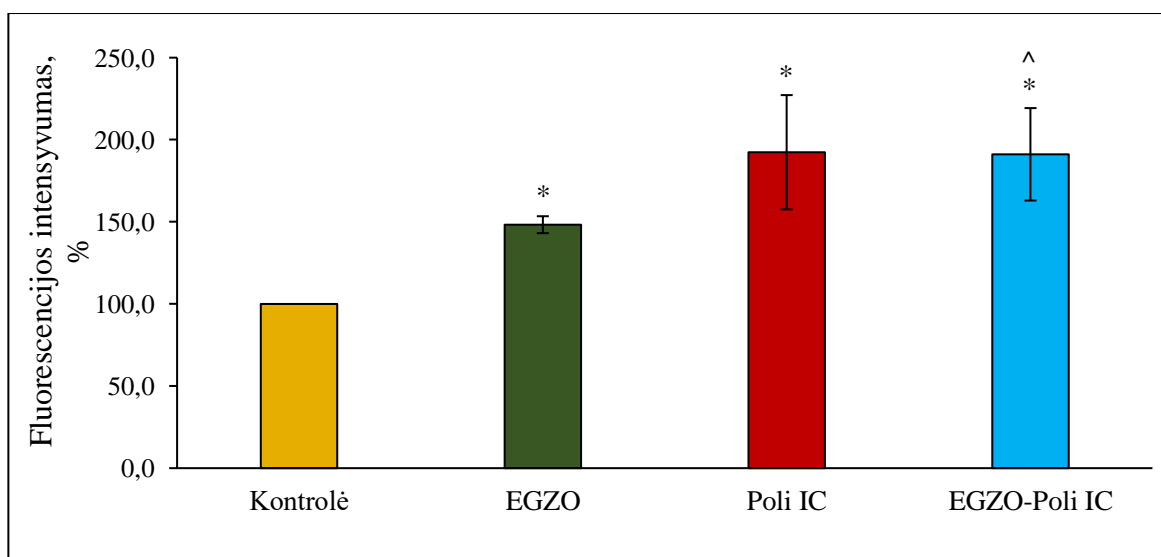
Fluorescenciniam intensyvumui įvertinti naudota fluorescencinė mikroskopija. Kiekybiniam mikroglijos ADJ produkcijos įvertinimui, tarp tiriamųjų mėginių grupių, kompiuteriniu programiniu paketu *ImageJ* buvo išmatuotas mikroskopu vaizdintų nuotraukų fluorescencinis intensyvumas. Palyginimui gauti rezultatai išreiškiami procentiškai nuo kontrolės. 3.11 paveiksle pateikiamos ADJ susidarymą mikroglijos ląstelėse reprezentuojančios nuotraukos.



**3.11 pav.** Vidulastelinių ADJ susidarymą mikroglijos ląstelėse reprezentuojančios fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos.

A – ląstelių kontrolės; B – po poveikio nestimuliuotų KTEL egzosomų preparatu; C – po tiesioginio poveikio poli I:C seka; D – po poveikio poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu

Programa apskaičiuotos procentinės fluorescencinio intensyvumo vertės pateiktos 3.12 paveiksle.



**3.12 pav.** Fluorescencijos intensyvumas vertinant vidulastelinių ADJ susidarymą mikroglijos ląstelėse.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzozomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzozomomis. \* – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą); ^ – žymi statistinį patikimumą lyginant su nestimuliuotomis egzozomomis veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą)

Iš gautų duomenų matyti, kad tiek nestimuliuotų KTEL egzozomų, tiek stimuliuotų KTEL egzozomų preparatu veikta mikroglija produkuoja daugiau ADJ lyginant su kontrole. Nustatytas pokytis yra statistiškai reišmingas. Nestimuliuotų KTEL egzozomų preparatu veikta mikroglija fluorescencinio intensyvumo vertes padidino 48 %, o stimuliuotų KTEL egzozomomis veiktos mikroglijos ląstelių fluorescencinio intensyvumo vertės buvo net 90 % didesnės lyginant su kontrole ir atitiko tiesioginį poli I:C sekos sukeliama mikroglijos ląstelių fluorescencinį aktyvumą.

Literatūroje yra duomenų rodančių, kad tiesioginis mikroglijos veikimas poli I:C seka aktyvuoja mikrogliją ir padidina ADJ susidarymą, kaip atsaką į ligando prisijungimą prie TLR3 receptorių [139, 149]. Literatūroje rastus duomenis patvirtina ir mūsų atlikto tyrimo rezultatai.

Taip pat gauti rezultatai parodo, kad į mikrogliją patekusios egzozomos reikšmingai didina viduląstelių ADJ susidarymą šiose ląstelėse. Todėl galima daryti prielaidą, kad poli I:C seka veiktos KTEL egzozomos aktyvina mikroglijos ląsteles, galimai pernešdamos šią seką kaip savo krovinį tarpląstelinės komunikacijos metu, nes sukelia labai panašią ADJ produkciją lyginant su tiesioginiu poli I:C sekos veikimu. Tačiau vis tiek nėra aišku, ar su egzozomomis patenkanti poli I:C seka inicijuoja mikroglijos imuninį atsaką tokiu pat būdu kaip ir tiesioginis veikimas.

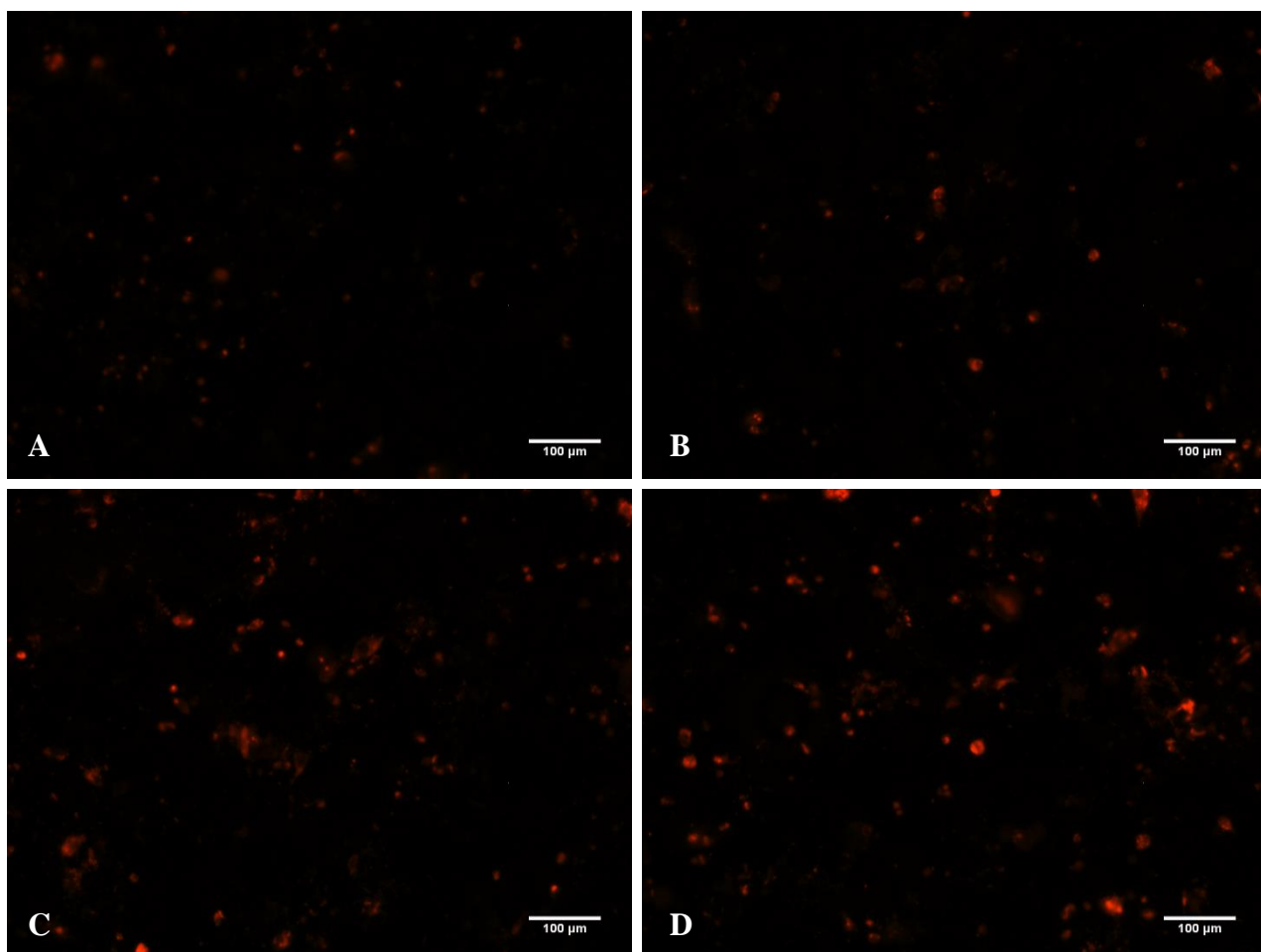
Iš sveikų KTEL išskirtos egzozomos taip pat padidina ADJ susidarymą mikroglijoje. Taip pat iš gautų rezultatų matome, kad poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzozomų poveikis ADJ produkcijai mikroglijos ląstelėse reikšmingai skyrėsi nuo nestimuliuotų egzozomų poveikyje sukkelto ADJ gamybos padidėjimo.

Atlikto tyrimo rezultatai sutampa su literatūroje aprašytu analogišku tyrimu su pirminėmis žiurkės mikroglijos ląstelėmis. Publikacijoje teigiama, kad iš pirminių žiurkės kvėpavimo takų ląstelių išskirtomis poli I:C seka stimuliuotomis bei poli I:C seka nestimuliuotomis – kontrolinėmis egzozomomis veiktos pirminės žiurkės mikroglijos ląstelės padidina ADJ produkciją [150].

Literatūroje yra duomenų, kad mikroglijos ląstelių produkuojamų ADJ padidėjimas susijęs su fagocitozės procesu [151], kurio metu aktyvuojamas fermentas – NADPH oksidazė, skatinantis ADJ sintezę [152]. Anksčiau aptarti egzozomų internalizacijos tyrimai leidžia manyti, kad atliekant eksperimentus egzozomos į mikroglijos ląsteles patekdavo jas fagocituojant, o tai savo ruožtu aktyvavo fermentą, produkuojantį ADJ. Tokia prielaida paaiškintų, kodėl ir poli I:C seka nestimuliuotos egzozomos padidina ADJ gamybą mikroglijoje.

Tyrimų metu naudotas H<sub>2</sub>DCFDA daugiausia yra specifiskas vandenilio peroksido aptikimui ląstelėse. Siekiant tiksliau įvertinti mikroglijos ląstelių produkuojamų ADJ įvairovę buvo įvertinti ir mitochondrijų išskiriami ADJ, naudojant MitoSOX<sup>TM</sup>. Superoksido poveikyje dažas oksiduojamas į fluorescencinę formą. Dažo fluorescencinis intensyvumas tiesiogiai koreliuoja su ADJ produkcijos kiekiu [139]. Kaip ir H<sub>2</sub>DCFDA dažo, taip ir MitoSOX<sup>TM</sup> dažo fluorescenciniam intensyvumui

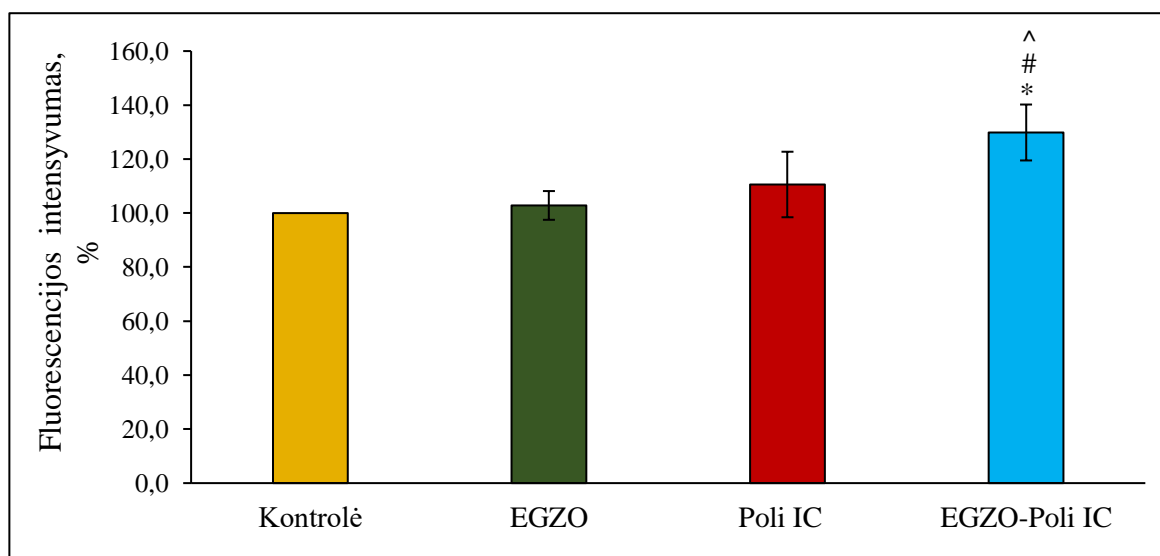
įvertinti naudota fluorescencinė mikroskopija. Kiekybiniam mikroglijos ADJ produkcijos įvertinimui, tarp tiriamųjų mėginių grupių, buvo išmatuotas mikroskopinių nuotraukų fluorescencinis intensyvumas kompiuteriniu programiniu paketu *ImageJ*. Palyginimui gautos reikšmės apskaičiuotos kaip procentas nuo kontrolės. 3.13 paveiksle pateikiamos ADJ susidarymą mikroglijos ląstelių mitochondrijose reprezentuojančios nuotraukos.



**3.13 pav.** Mitochondrinių ADJ susidarymą mikroglijos ląstelėse reprezentuojančios fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos.

*A* – ląstelių kontrolės; *B* – po poveikio nestimuliuotų KTEL egzosomų preparatu; *C* – po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *D* – po poveikio poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu.

Programa apskaičiuotos ir procentiškai nuo kontrolės išreikštos fluorescencinio intensyvumo vertės pateiktos 3.14 paveiksle.



**3.14 pav.** Fluorescencijos intensyvumas vertinant mitochondrių ADJ susidarymą mikroglijos ląstelėse.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzosomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzosomomis. \* – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą). # – žymi statistinį patikimumą lyginant su tiesiogiai poli I:C seka veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą); ^ – žymi statistinį patikimumą lyginant su nestimuliuotomis egzosomomis veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą)

Pagrindinis ADJ šaltinis mikroglijos ląstelių membranoje esanti NADPH oksidazė [7], perduodanti elektronus molekuliniam deguoniui iš NADPH ar NADH suformuojant superoksido anijonus. Taip pat yra žinoma, kad kitas ADJ šaltinis mikroglijos ląstelėse yra mitochondrijos [153]. A. L. Voloboueva et al. nustatė, kad gramneigiamų bakterijų LPS BV-2 pelės mikroglijos ląstelių mitochondrijose sukelia padidėjusią superoksidų produkciją, kuri reguliuojama mitochondrijų šaperonais [148]. Pasikeitęs protonų elektrocheminis balansas vidinėje mitochondrijų membranoje gali sukelti mitochondrių ADJ susidarymą [154]. Taigi, NADPH sąlygota ADJ produkcija susijusi su ADJ gamyba mitochondrijose [153].

Mikroglijos sukeliama atsakas į infekcijas yra jų produkuojami ADJ, kurie gali būti žalingi pačioms ląstelėms. Siekiant apsaugoti ląsteles nuo pažeidimų, jų mitochondrijose yra superoksido dismutazės fermentų (SOD), pagrindinių antioksidacinių fermentų, kurie superoksidą, susidariusį kvėpavimo grandinės metu, verčia į vandenilio peroksidą bei molekulinį deguonį ir taip reguliuoja ADJ lygį ląstelėse. Yra žinoma, kad SOD klasės fermentas SOD2 dalyvauja reguliuojant atsaką į CNS uždegimus. Y. Ishihara et al. nustatė, kad pirminių žiurkės mikroglijos ląstelių veikimas LPS ar poli I:C turi įtakos SOD2 genų ekspresijai, ją sustiprinant [153]. Tai rodo, padidėjusį poreikį mažinti ADJ lygį mikroglijos ląstelėse. Todėl manoma, kad galbūt SOD2 kiekio reguliavimas CNS yra svarbus mikroglijos aktyvinimo procesuose.

Yra žinoma, kad infekcijų, sukeliama *ŽIV-1* ar *influenza* virusų, poveikyje aktyvinama ADJ produkcija astrocitų ir mikroglijos ląstelėse [155].

Iš projekto metu atlikto tyrimo rezultatų (žr. 3.12 ir 3.14 pav.) matome, kad tiesiogiai poli I:C seka veiktoje mikroglijoje stebimas reikšmingas ADJ produkcijos padidėjimas. Toks rezultatas atitinka aprašomus literatūroje, rodančius, kad BV-2 pelės mikroglijos ląstelėse veiktose LPS mitochondrijų ADJ susidarymas padidėja, lyginant su sveikomis mikroglijos ląstelėmis.

Iš pateiktos diagramos (žr. 3.14 pav.) matyti, kad poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu veiktos mikroglijos vidumitochondrinių ADJ produkcija lyginant su kontrole reikšmingai padidėjo apie 30 %. Įdomu, tai kad toks rezultatas taip pat buvo reikšmingai didesnis nei gautas mikroglijos ląsteles veikiant tiesiogiai poli I:C seka. Tai leidžia manyti, kad galbūt egzosomos pernešė uždegiminius veiksnius, kurie galėjo sukelti mikroglijos aktyvinimą ir taip padidinti ADJ produkciją. Tokią prielaidą galėtų patvirtinti ir su kontrole lyginamas nepasikeitęs vidumitochondrinių ADJ susidarymas nestimuliuotomis KTEL egzosomomis veiktose mikroglijos ląstelėse, taip pat matomas reikšmingas vidumitochondrinių ADJ produkcijos padidėjimas lyginant abiejų tipų egzosomų preparatų veiktas mikroglijos ląsteles.

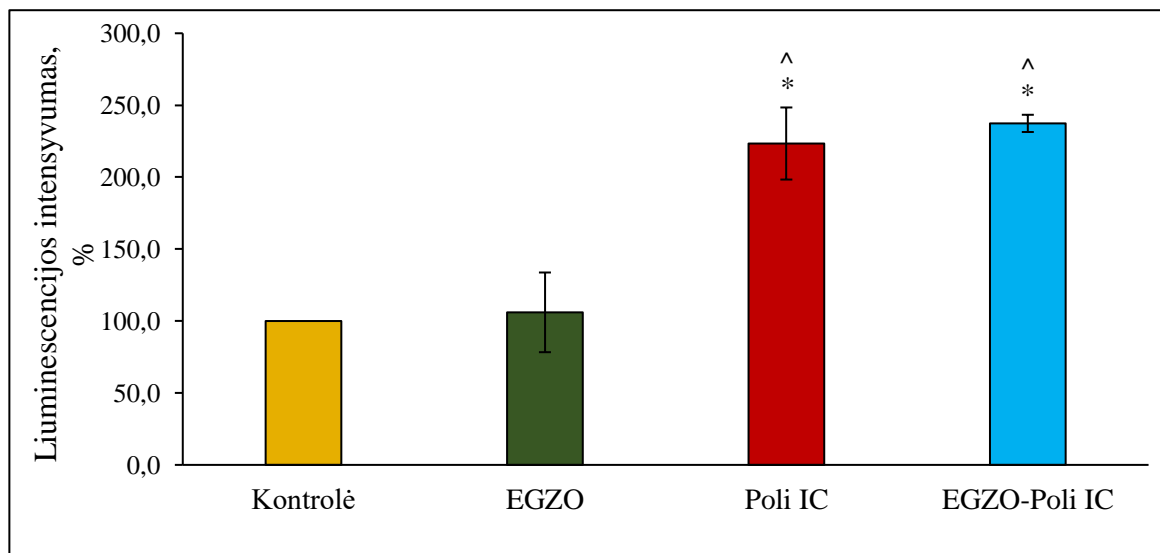
Gauti rezultatai, leidžia manyti, kad virusinių infekcijų poveikyje susidariusios egzosomos, internalizuotos į mikroglijos ląsteles, galimai savyje turinčios mikrogliją aktyvinančių veiksnių, kai kuriais atvejais kaip ir tiesioginis poli I:C veikimas, gali sukelti mikroglijos aktyvaciją, skatindamos tiek viduląstelių, tiek vidumitochondrinių ADJ susidarymą.

### **3.6 Kvėpavimo takų išskiriamų egzosomų poveikis kaspazės-1 aktyvinimui mikroglijos ląstelėse**

Aktyvavus NLPR3 inflamasmą, aktyvinamas imuninis atsakas, kuomet subrendusi kaspazė-1 sukelia biologiškai aktyvių citokinų IL-1 $\beta$  ir IL-18 gamybą proteolitinio skaidymo būdu [24–26]. Yra nustatyta, kad NLPR3 inflamasma aktyvinama ADJ poveikyje [24–25]. Taip pat yra žinoma, kad aktyvuota mikroglija imunį atsaką gali sukelti aktyvinant NLPR3 inflamasmą [105].

Siekiant išsiaiškinti ar mikroglija yra aktyvinama, paveikus poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzosomomis, liuminescencijos metodu buvo įvertintas kaspazės-1 aktyvumas. Naudotas komercinis kaspazės-1 substratas, kuris esant aktyviai kaspazės-1 būsenai yra suskaidomas, ir įvykusios liuciferazės fermentinės reakcijos metu gaunamas stabilus liuminescencinis signalas, kuris yra fiksuojamas. Signalo intensyvumas yra proporcingas kaspazės-1 aktyvumui. Nuo mikroglijos ląstelių kontrolės apskaičiuotos kaspazės-1 aktyvumą rodančios liuminescencijos procentinės vertės pateikiamos 3.15 paveiksle.





**3.15 pav.** Kaspazės-1 aktyvumo įvertinimas mikroglijos ląstelėse.

*Kontrolė* – neveiktos mikroglijos ląstelės; *EGZO* – mikroglijos ląstelės, po poveikio nestimuliuotomis, sveikų KTEL išskirtomis egzosomomis; *Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po tiesioginio poveikio poli I:C seka; *EGZO-Poli IC* – mikroglijos ląstelės, po poveikio poli I:C seka stimuliuotomis KTEL egzosomomis. \* – žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą); ^ – žymi statistinį patikimumą lyginant su nestimuliuotomis egzosomomis veiktomis mikroglijos ląstelėmis, kai  $p < 0,05$  (taikant *LSD Post Hoc* testą)

Atlikto tyrimo metu nustatyta, kad nestimuliuotų KTEL egzosomų preparatu veikta mikroglija nėra aktyvinama, nes nesukelia kaspazės-1 aktyvumo pokyčių lyginant su kontrole. Taip pat matome, kad poli I:C seka stimuliuotų KTEL egzosomų preparatu veiktų mikroglijos ląstelių terpėje fiksuotas statistiškai reikšmingas, daugiau nei du kartus didesnis lyginant su kontrole ir nestimuliuotomis egzosomomis veikta mikroglija, kaspazės-1 aktyvumas, kuris atitinka tiesioginį poli I:C sukeltą kaspazės-1 aktyvumą. Tai leidžia manyti, kad virusinių infekcijų metu susidariusios egzosomos gali sukelti uždegiminiuosius procesus smegenyse, aktyvindamos inflamasiomą mikroglijos ląstelėse.

Mokslininkų atlikti tyrimai su makrofagais, juos stimuliuojant poli I:C seka, parodė, kad esant TLR3 receptorių ir jų ligandų Myd88 ar TRIF trūkumui, poli I:C seka dalyvauja NLPR3 inflamasiomos aktyvinime, kurį inicijuoja mitochondrijų baltymas MAVS, nepriklausomai nuo TLR kuriamo signalo [156]. Literatūroje yra duomenų, kad LPS aktyvina kaspazę-1 mikroglijos ląstelėse [157]. Parodyta, kad mikroglijos inflamasiomos aktyvinimas susijęs su neurodegeneracinėmis patologijomis, tokiomis kaip Alzheimerio ar Parkinsono ligos [158].

Literatūroje aprašomas ŽIV infekcijos plitimas egzosomomis, pernešant viruso komponentus į smegenis ir ten sukeldami stiprias imunines uždegimines reakcijas, kurios turi įtakos neurologiniams sutrikimams [159]. Periferijoje susidariusių egzosomų gebėjimas pereiti į smegenis ir ten sukelti neurouždegimą, nustatytas ir *in vivo* tyrimuose su pelėmis, kuomet su endotoksiemijos LPS iš kraujo serumo išgrynintos egzosomos su fluorescensine žyma buvo injekuojamos į pelių uodegas ir sukėlė uždegiminiuosius procesus mikroglijos ląstelėse [93].

### 3.7 Projekto rezultatų apibendrinimas ir jų svarba

Yra žinoma, kad mikroglijos aktyvinimas susijęs su neurouždegiminiais procesais, gali būti svarbus neurodegeneracinių susirgimų vystymesi. Tačiau nėra aišku, kokių būdu mikroglija aktyvinama. Šiame tyrime gauti rezultatai parodė, kad viruso mimetiku poli I:C stimuliuotos KTEL egzosomos gali pernešti uždegiminį signalą į mikroglijos ląsteles ir jas aktyvinti.

Projekto vykdymo metu nustatyta, kad iš KTEL išskirtos egzosomos tiesioginiu būdu patenka į mikroglijos ląsteles ir čia išlieka mažiausiai 24 valandas.

Poli I:C stimuliuotų KTEL egzosomos keičia ląstelių mitochondrijų funkcijas panašiai, kaip ir tiesioginis poli I:C poveikis. Tokių egzosomų poveikyje silpninamas bazinis ir maksimalus kvėpavimas, taip pat ATP sintezė. Stimuliuotų egzosomų poveikyje, kaip ir tiesiogiai veikiant poli I:C, persiskirsto mikroglijos ląstelių energetinis fenotipas, iš ramaus, aerobinėmis sąlygomis vartojančio deguonį, pasikeičia į labiau glikolitinį fenotipą. Toks energetinis persiskirstymas priskiriamas imunometaboliniams procesams, žinomiems aktyvintuose makrofaguose. Projekto rezultatai patvirtina, kad ir mikroglijos ląstelės infekcijų poveikyje vykdo imunometabolinius energijos persiskirstymus, galinčius sąlygoti imuninį aktyvinimą.

Literatūros duomenimis yra žinoma, kad mikroglija aktyvioje būsenoje produkuoja ADJ, kurie padeda modeliuoti imuninį atsaką aktyvindami NLPR3 inflamomas, sukeldami apoptozės ar kitus procesus [85]. Viduląstelių ir vidumitochondrinių reikšmingas ADJ produkcijos padidėjimas mikroglijos ląstelėse poli I:C stimuliuotų egzosomų poveikyje patvirtina, kad mikroglijos ląstelės yra aktyvinamos. Viduląstelių ADJ, produkuojamų iš viruso seka nestimuliuotų egzosomų, gamybos padidėjimas gali būti siejamas su egzosomų internalizacijos metu vykstančiu fagocitozės procesu, kurio metu aktyvuojamas NADPH oksidazės fermentas, atsakingas už ADJ produkciją ląstelėse.

Įvertinus kaspazės-1 aktyvumą mikroglijos ląstelėse, pastebėta, kad poli I:C stimuliuotų egzosomų poveikyje, kaip ir tiesioginiu veikimo poli I:C metu, ši kaspazė buvo aktyvinama. Yra žinoma, kad aktyvi kaspazė-1 padidina uždegiminio atsako stiprumą, sužadindama IL-18 ir IL-1 $\beta$  raišką [24–26], todėl tęsiant šiame darbe pradėtus tyrimus, rekomenduotina ištirti šių citokinų genų raišką poli I:C stimuliuotų KTEL egzosomų veikiamose mikroglijos ląstelėse.

Gauti rezultatai suteikia naujų žinių apie galimą mikroglijos aktyvinimo mechanizmą virusų veikiamų kvėpavimo takų ląstelių egzosomomis. Toks mikroglijos aktyvinimas gali prisidėti prie lėtinio neurouždegimo ir su juo susijusių neurodegeneracinių patologijų vystymosi, tačiau šiai hipotezei pagrįsti reikalingas platesnis uždegiminių žymenų ištyrimas bei *in vivo* studijos.

## IŠVADOS

1. Kvėpavimo takų epitelio ląstelių egzosomų preparatuose esančių dalelių dydis 32–220 nm ir jos turi egzosomoms specifinį žymenį CD9, kurio kiekis susijęs su bendro egzosomų preparato baltymo kiekiu. Tai leidžia teigti, kad egzosomų koncentracija gali būti nustatoma Bradfordo metodu.
2. Egzosomos į mikroglijos ląsteles patenka tiesioginiu būdu jau po 2 val. bei išlieka jose ne trumpiau kaip 24 val. Tiek nepaveiktų, tiek poli I:C stimuliuotų kvėpavimo takų epitelio ląstelių egzosomos mikroglijos gyvybingumo reikšmingai neveikia.
3. Paveikus poli I:C seka stimuliuotomis kvėpavimo takų ląstelių egzosomomis mikroglijos ląstelių metabolizmas persitvarko panašiai, kaip ir paveikus tiesiogiai poli I:C seka: susilpnėja bazinis ir maksimalus mitochondrijų kvėpavimas, ir suintensyvėja glikolizė.
4. Mikroglijos ląstelių veikimas kvėpavimo takų ląstelių egzosomomis padidina viduląstelių ir vidumitochondrinių aktyvių deguonies junginių susidarymą. Poli I:C seka nestimuliuotų egzosomų preparatas mikroglijos ląstelių viduląstelių aktyvių deguonies junginių produkciją reikšmingai padidino 1,5 karto, o poli I:C seka stimuliuotas – beveik 2 kartus, ir tai atitinka tiesiogiai poli I:C seka veikiamos mikroglijos aktyvių deguonies junginių produkciją. Taip pat poli I:C seka stimuliuotų kvėpavimo takų epitelio ląstelių egzosomos reikšmingai padidina vidumitochondrinių aktyvių deguonies junginių produkcijos padidėjimą, o nestimuliuotų ląstelių egzosomos vidumitochondrinių aktyvių deguonies junginių gamybos neveikia.
5. Mikroglijos ląstelėse, veikiamose poli I:C stimuliuotomis kvėpavimo takų egzosomomis, kaspazės-1 aktyvumas buvo du kartus didesnis, lyginant su egzosomomis neveikta ląstelių kontrole ir siekė panašų lygį, kaip tiesiogiai poli I:C seka veiktose mikroglijos ląstelėse. Nestimuliuotų kvėpavimo takų ląstelių egzosomos kaspazės-1 aktyvumui mikroglijos ląstelėse įtakos neturėjo.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. *Upper Respiratory Tract Infection* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-05-02]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532961/>
2. WAHLUND, J. E. Casper, Anders EKLUND, Johan GRUNEWALD, Susanne GABRIELSSON. Mini review. Pulmonary Extracellular Vesicles as Mediators of Local and Systemic Inflammation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [interaktyvus]. 2017, 5 (39), 1–8 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 2296-634X. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00039>
3. BEACH, Alison, Huang-Ge ZHANG, Mariusz Z. RATAJCZAK, Sham S. KAKAR. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* [interaktyvus]. 2014, 7 (14) [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1757-2215. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-14>
4. ZHU, Motao, et al. Exosomes as extrapulmonary signaling conveyors for nanoparticle-induced systemic immune activation. *Small* [interaktyvus]. 2012, 8 (3), 404–412 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1613-6829. Prieiga per doi: 10.1002/sml.201101708
5. BALUSU, Sriram, et al. Identification of a Novel Mechanism of Blood–Brain Communication during Peripheral Inflammation via Choroid Plexus-Derived Extracellular Vesicles. *EMBO Molecular Medicine* [interaktyvus]. 2016, 8 (10), 1162–1183 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1757-4684. Prieiga per doi: 10.15252/emmm.201606271
6. ALVAREZ-ERVITI, Lydia, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* [interaktyvus]. 2011, 29 (4), 341–345 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1546-1696. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
7. BLOCK, L. Michelle, Jau-Shyong HONG. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology* [interaktyvus]. 2005, 76, 77–98 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 0301-0082. Prieiga per doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.004
8. THAMEEM DHEEN, S. Dheen, Charanjit KAUR, Eng-Ang LING. Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 14 (11), 1189–1197 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1875-533X. Prieiga per doi: 10.2174/092986707780597961
9. MANJARREZ-ZAVALA, Eugenia, Dora Patricia ROSETE-OLVERA, Luis Horacio GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, Rodolfo OCADIZ-DELGADO, Carlos CABELLO-GUTIÉRREZ. Pathogenesis of Viral Respiratory Infection. In: *Respiratory Disease and Infection - A New Insight* [interaktyvus]. London: IntechOpen, 2013 [žiūrėta 2020-05-02]. ISBN 978-953-51-7080-8. Prieiga per: <https://www.intechopen.com/books/respiratory-disease-and-infection-a-new-insight/pathogenesis-of-viral-respiratory-infection>
10. THOMPSON, R. Mikayla, John J. KAMINSKI, Evelyn A. KURT-JONES, Katherine A. FITZGERALD. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses* [interaktyvus]. 2011, 3 (6), 920–940 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1999-4915. Prieiga per doi: 10.3390/v3060920
11. ARBUTHNOT, Patrick. Essentials of Viruses and their Suitability for Treatment Using Gene Therapy. In: *Gene Therapy for Viral Infections* [interaktyvus]. Amsterdam: Elsevier, 2015, 1–28 [žiūrėta 2020-05-02]. ISBN 978-0-12-410518-8. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410518-8.01001-2>

12. SAITO, Takeshi, et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [interaktyvus]. 2007, 104 (2), 582–587 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1091-6490. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0606699104>
13. YONEYAMA Mitsutoshi, et al. RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* [interaktyvus]. 2004, 5 (7), 730–737 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1529-2916. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1038/ni1087>
14. KATO, Hiroki, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* [interaktyvus]. 2006, 441 (7089), 101–105 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1476-4687. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1038/nature04734>
15. MELCHJORSEN, Jesper, et al. Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a celltype-specific manner. *Journal of Virology* [interaktyvus]. 2005, 79 (20), 12944–12951 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1098-5514. Prieiga per doi: 10.1128/JVI.79.20.12944-12951.2005
16. GITLIN, Leonid, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [interaktyvus]. 2006, 103 (22), 8459–8464 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1091-6490. Prieiga per doi: 10.1073/pnas.0603082103
17. KATO, Hiroki, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *Journal of Experimental Medicine* [interaktyvus]. 2008, 205 (7), 1601–1610 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1540-9538. Prieiga per doi: 10.1084/jem.20080091
18. AOSHI, Taiki, et al. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Current Opinion in Virology* [interaktyvus]. 2011, 1 (4), 226–232 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1879-6257. Prieiga per doi: 10.1016/j.coviro.2011.07.002
19. IWASAKI, Akiko, Ruslan MEDZHITOV. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* [interaktyvus]. 2010, 327 (5963), 291–295 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1095-9203. Prieiga per doi: 10.1126/science.1183021
20. PALM, W. Noah, Ruslan MEDZHITOV. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews* [interaktyvus]. 2009, 227 (1), 221–233 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1600-065X. Prieiga per doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x
21. TAKEUCHI, Osamu, Shizuo AKIRA. Innate immunity to virus infection. *Immunological Reviews* [interaktyvus]. 2009, 227 (1), 75–86 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1600-065X. Prieiga per doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x
22. SETH, B. Rashu, Lijun SUN, Chee-Kwee EA, Zhijian J. CHEN. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell* [interaktyvus]. 2005, 122 (5), 669–682 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1097-4172. Prieiga per doi: 10.1016/j.cell.2005.08.012
23. Van de VEERDONK, L. Frank, Mihai G. NETEA, Charles A. DINARELLO, Leo A. JOOSTEN. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology* [interaktyvus]. 2011, 32 (3), 110–116 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1471-4981. Prieiga per doi: 10.1016/j.it.2011.01.003

24. CERRETTI, D. P., et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* [interaktyvus]. 1992, 256 (5053), 97–100 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1095-9203. Prieiga per doi: 10.1126/science.1373520
25. THORNBERRY, A. Nancy, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* [interaktyvus]. 1992, 356 (6372), 768–774. [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1476-4687. Prieiga per doi: 10.1038/356768a0
26. MARTINON, Fabio, Kimberly BURNS, Jürg TSCHOPP. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* [interaktyvus]. 2002, 10 (2), 417–426 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1097-4164. Prieiga per doi: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3
27. KANNEGANTI, Thirumala-Devi, et al. Critical role for cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2006, 281(48), 36560–36568 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 00219258. Prieiga per doi: 10.1074/jbc.M607594200
28. REISINGER, Sonali, et al. The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology and Therapeutics* [interaktyvus]. 2015, 149, 213–226 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 0163-7258. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.001>
29. STOWELL, C. Nicole, et al. Long-term activation of TLR3 by Poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respiratory Research* [interaktyvus]. 2009, 10 (1), 43 [žiūrėta 2020-05-02]. ISSN 1465-993X. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-43>
30. NEERUKONDA, Sabari Nath, Nicholas A. EGAN, Mark S. PARCELLS. Exosomal Communication during Infection, Inflammation and Virus-Associated Pathology. *Journal of Cancer and Therapeutic Science* [interaktyvus]. 2017, 1 (1) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1948-5956. Prieiga per internetą: [https://www.researchgate.net/publication/321306502\\_Exosomal\\_Communication\\_during\\_Infection\\_Inflammation\\_and\\_Virus-Associated\\_Pathology](https://www.researchgate.net/publication/321306502_Exosomal_Communication_during_Infection_Inflammation_and_Virus-Associated_Pathology)
31. THÉRY, Clotilde, Matias OSTROWSKI, Elodie SEGURA. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology* [interaktyvus]. 2009, 9, 581–593 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1474-1741. Prieiga per doi: 10.1038/nri2567
32. SCHOREY, S. Jeffrey, Yong CHENG, Prachi P. SINGH, Victoria L. SMITH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles in Host-Pathogen Interactions. *EMBO reports* [interaktyvus]. 2014, 16 (1), 24–43 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1469-3178. Prieiga per doi: 10.15252/embr.201439363
33. MATHIVANAN, Suresh, Cassie J. FAHNER, Gavin E. REID, Richard J. SIMPSON. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research* [interaktyvus]. 2012, 40, D1241–D1244 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1362-4962. Prieiga per doi: 10.1093/nar/gkr828
34. MATHIVANAN, Suresh, Richard J. SIMPSON. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* [interaktyvus] 2009, 9, 4997–5000 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1615-9861. Prieiga per doi: 10.1002/pmic.200900351
35. ADMYRE, Charlotte, Sara M. JOHANSSON, Staffan PAULIE, Susanne GABRIELSSON. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *European*

- Journal of Immunology* [interaktyvus]. 2006, 36 (7), 1772–1781 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1521-4141. Prieiga per doi: 10.1002/eji.200535615
36. YÁÑEZ-MÓ, María, et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology* [interaktyvus]. 2009, 19 (9), 434–446 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 0962-8924. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.004>
  37. UTSUGI-KOBUKAI, Saho, et al. MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunology Letters* [interaktyvus]. 2003, 89 (2–3), 125–131 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1879-0542. Prieiga per doi: 10.1016/s0165-2478(03)00128-7
  38. LUKETIC, Lea, et al. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *Journal of Immunology* [interaktyvus]. 2007, 179 (8), 5024–5032 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1550-6606. Prieiga per doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5024
  39. RAPOSO, Graça, Willem STOORVOGEL. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* [interaktyvus]. 2013, 200 (4), 373–383 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2330-0183. Prieiga per doi: 10.1083/jcb.201211138
  40. OHNO, Shin-Ichiro, Akio ISHIKAWA, Masahiko KURODA. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* [interaktyvus]. 2013, 65 (3), 398–401 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1872-8294. Prieiga per doi: 10.1016/j.addr.2012.07.019
  41. GUPTA, Archana, Lynn PULLIAM. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* [interaktyvus]. 2014, 11 (68) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1742-2094. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-68>
  42. YOON, Yae Jin, Oh Youn KIM, Yong Song GHO. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Reports* [interaktyvus]. 2014, 47 (10), 531–539 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1976-670X. Prieiga per doi: 10.5483/BMBRep.2014.47.10.164
  43. SUBRA, Caroline, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research* [interaktyvus]. 2010, 51 (8), 2105–2120 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1539-7262. Prieiga per doi: 10.1194/jlr.M003657
  44. VALADI, Hadi, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* [interaktyvus]. 2007, 9, 654–659 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1476-4679. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
  45. NOLTE-'T HOEN, N. M. Esther, et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research* [interaktyvus]. 2012, 40 (18), 9272–9285 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1362-4962. Prieiga per doi: 10.1093/nar/gks658
  46. BATAGOV, O. Arsen, Igor V. KUROCHKIN. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology Direct* [interaktyvus]. 2013, 8 (12) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1745-6150. Prieiga per doi: 10.1186/1745-6150-8-12.

47. HU, G., et al. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated neuronal dysfunction. *Cell Death & Disease* [interaktyvus]. 2012, 3:e381 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2041-4889. Prieiga per doi: 10.1038/cddis.2012.114.
48. EMANUELI, Costanza, Andrew I. U. SHEARN, Gianni D. ANGELINI, Susmita SAHOO. Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascular Pharmacology*. [interaktyvus]. 2015, 71, 24–30 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1879-3649. Prieiga per doi: 10.1016/j.vph.2015.02.008
49. KELLER, Sascha, Michael P. SANDERSON, Alexander STOECK, Peter ALTEVOGT. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* [interaktyvus]. 2006, 107 (2), 102–108 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1879-0542. Prieiga per doi: 10.1016/j.imlet.2006.09.005
50. Van NIEL, Guillaume, Isabel PORTO-CARREIRO, Sabrina SIMOES, Graça RAPOSO. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *Journal of Biochemistry* [interaktyvus]. 2006, 140 (1), 13–21 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1756-2651. Prieiga per doi: 10.1093/jb/mvj128
51. SIMONS, Mikael, Graça RAPOSO. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion of Cell Biology* [interaktyvus]. 2009, 21 (4), 575–581 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 0955-0674. Prieiga per doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007
52. HENDERSON, C. Meredith, David O. AZORSA. The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. *Frontiers in Oncology* [interaktyvus]. 2012, 2 (38) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2234-943X. Prieiga per doi: 10.3389/fonc.2012.00038
53. MCKELVEY, J. Kelly, Katie L. POWELL, Anthony W. ASHTON, Jonathan M. MORRIS, Sharon A. MCCracken. Exosomes: Mechanisms of Uptake. *Journal of Circulating Biomarkers* [interaktyvus]. 2015, 4 (7) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 18494544. Prieiga per doi: 10.5772/61186
54. REGGIORI, Fulvio, Hugh R. B. PELHAM. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO Journal*. [interaktyvus]. 2001, 20 (18), 5176–5186 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1460-2075. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5176>
55. HENNE, M. William, Nicholas J. BUCHKOVICH, Scot de EMR. The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* [interaktyvus]. 2011, 21 (1), 77–91 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1878-1551. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
56. TRAJKOVIC, Katarina, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, [interaktyvus]. 2008, 319 (5867), 1244–1247 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1095-9203 . Prieiga per doi: 10.1126/science.1153124.
57. PEREZ-HERNANDEZ, Daniel, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 288, 11649–11661 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1083-351X. Prieiga per doi: 10.1074/jbc.M112.445304
58. BUSCHOW, I. Sonja, et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* [interaktyvus]. 2009, 10 (10), 1528–1542 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1600-0854. Prieiga per doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x



59. COLOMBO, Marina, Graça RAPOSO, Clotilde THÉRY. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell Developmental Biology* [interaktyvus]. 2014, 30, 255–289 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN: 1530-8995. Prieiga per doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
60. KONIUSZ, Sylwia, et al. Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [interaktyvus]. 2016, 10 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1663-4365. Prieiga per doi: 10.3389/fncel.2016.00109
61. MECKES, G. David, Nancy RAAB-TRAUB. Minireview: Microvesicles and Viral infection. *Journal of Virology* [interaktyvus]. 2011, 85 (24), 12844–12854. [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1098-5514. Prieiga per doi: 10.1128/JVI.05853-11
62. YAKIMCHUK, Konstantin. Exosomes: Isolation and Characterization Methods and Specific Markers. *Materials and Methods* [interaktyvus]. 2015, 5, 1450 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2329-5139. Prieiga per doi: 10.13070/mm.en.5.1450
63. LI, Pin, et al. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* [interaktyvus]. 2017, 7(3), 789–804 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1838-7640. Prieiga per doi: 10.7150/thno.18133
64. LUDWIG, Anna-Kristin, et al. Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles* [interaktyvus]. 2018, 7 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2001-3078. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1528109>
65. ZERINGER, Emily, Timothy BARTA, Mu LI, Alexander V. VLASSOV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols* [interaktyvus]. 2015, 4, 319–323 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1559-6095. Prieiga per doi: 10.1101/pdb.top074476
66. RIDER, A. Mark, Stephanie N. HURWITZ, David G. MECKES. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2016, 6, 23789 [žiūrėta 2020-05-10]. ISSN 2045-2322. Prieiga per doi: 10.1038/srep23978
67. WENG, Yejing, et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *The Analyst* [interaktyvus]. 2016, 141 (15), 4640–4646 [žiūrėta 2020-05-10]. ISSN: 1364-5528. Prieiga per doi: 10.1039/c6an00892e
68. YANG, Xiao-Xia, Chao SUN, Lei WANG, Xiu-Li GUO. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *Journal of Controlled Release* [interaktyvus]. 2019, 308 (28), 119–129 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1873-4995. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.021>
69. SINGH, Ramesh, et al. Exosome-mediated transfer of mir-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Molecular Cancer* [interaktyvus]. 2014, 13 (1), 256 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1476-4598. Prieiga per doi: 10.1186/1476-4598-13-256
70. SITAR, Simona, et al. Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation. *Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2015, 87 (18), 9225–9233 [žiūrėta 2020-05-10]. ISSN 1520-6882. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01636>

71. SHAO, Huilin, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical Reviews* [interaktyvus]. 2018, 118 (4), 1917–1950 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1520-6890. Prieiga per doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00534
72. YU, Xin, Sandra L. HARRIS, Arnold J. LEVINE. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Research* [interaktyvus]. 2006, 66 (9), 4795–4801 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2330-8214. Prieiga per doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4579
73. YU, Xin, Todd RILEY, Arnold J. LEVINE. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *The FEBS Journal* [interaktyvus]. 2009, 276, 2201–2212 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1742-4658. Prieiga per doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06949.x
74. PÊCHE, Hélène, et al. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* [interaktyvus]. 2003, 76 (10), 1503–1510 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1365-2249. Prieiga per doi: 10.1097/01.TP.0000092494.75313.38
75. BHATNAGAR, Sanchita, Jeffrey S. SCHOREY. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 282, 25779–25789 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 00219258. Prieiga per doi: 10.1074/jbc.M702277200
76. QACH, J. C. Ben, Helen C. O'NEILL. Mycoplasma contaminants present in exosome preparations induce polyclonal B cell responses. *Journal of Leukocyte Biology* [interaktyvus]. 2007, 82, 1070–1082 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1938-3673. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0507277>
77. LING, Eng-Ang, C. P. LEBLOND. Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *The Journal of Comparative Neurobiology* [interaktyvus]. 1973, 149, 73–81 [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 1096-9861. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1002/cne.901490105>
78. CREWS, T. Fulton, Collen J. LAWRIMORE, T. Jordan WALTER, Leon G. COLEMAN. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. *Neuropharmacology* [interaktyvus]. 2017, 122, 56–73 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1873-7064. Prieiga per doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.031
79. BUTOVSKY, Oleg, Howard L. WEINER. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1471-0048. Prieiga per doi: 10.1038/s41583-018-0057-5
80. DAVIS, M. Benjamin, et al. Characterizing microglia activation: A spatial statistics approach to maximize information extraction. *Scientific Reports volume* [interaktyvus]. 2017, 7 (1) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2045-2322. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01747-8>
81. PASCUAL, María, Francesc IBÁÑEZ, Consuelo GUERRI. Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation. *Neural Regeneration Research* [interaktyvus]. 2020, 15 (5), 796–801 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1876-7958. Prieiga per doi: 10.4103/1673-5374.268893
82. KOFLER, Julia, Clayton A. WILEY. Microglia: Key Innate Immune Cells of the Brain. *Toxicologic pathology* [interaktyvus]. 2010, 39 (1), 103–114 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1533-1601. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1177/0192623310387619>

83. SONG, M. Wilbur, Marco COLONNA. The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nature Immunology* [interaktyvus]. 2018 19, 1048–1058 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1529-2916. Prieiga per doi: 10.1038/s41590-018-0212-1
84. HENEKA, T. Michael, Markus P. KUMMER, Eicke LATZ. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology* [interaktyvus]. 2014, 14 (7), 463–477 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 14741733. Prieiga per doi: 10.1038/nri3705
85. *Microglial function in the Healthy Brain* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per internet: <https://faculty.sites.uci.edu/kimgreen/bio/microglia-in-the-healthy-brain/>
86. BANATI, B. Richard, Jochen GEHRMANN, Peter SCHUBERT, Georg W. KREUTZBERG. Cytotoxicity of microglia. *Glia* [interaktyvus]. 1993, 7 (1), 111–118 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1098-1136. Prieiga per doi: 10.1002/glia.440070117
87. KAUR, Charanjit, Viswanathan SIVAKUMAR, Lin Stella ANG, Alamelu SUNDARESAN. Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: Role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry* [interaktyvus] 2006, 98 (4), 1200–1216 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1471-4159. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03964.x>
88. HELD, Paul. An Introduction to Reactive Oxygen Species. Measurement of ROS in Cells. *White paper* [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per internetą: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>
89. ZHANG, Lijuan, Jinqiang ZHANG, Zili YOU. Switching of the microglial activation phenotype is a possible treatment for depression disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [interaktyvus]. 2018, 12 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1663-4365. Prieiga per doi: 10.3389/fncel.2018.00306
90. ZHOU, Tian, et al. Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Frontiers in Neuroanatomy* [interaktyvus]. 2017, 11 (77) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1662-5129 . Prieiga per doi: 10.3389/fnana.2017.00077
91. PAOLICELLI, C. Rosa, Giorgio BERGAMINI, Lawrence RAJENDRAN. Cell-to-cell communication by extracellular vesicles: focus on microglia. *Neuroscience* [interaktyvus]. 2019, 405, 148–157 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1529-2401. Prieiga per doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.04.003
92. ANTONUCCI, Flavia, et al. Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO Journal* [interaktyvus], 2012, 31, 1231–1240 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1460-2075. Prieiga per doi: 10.1038/emboj.2011.489
93. LI, Jing Jing, et al. In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* [interaktyvus]. 2018, 15 (8) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1742-2094. Prieiga per doi: 10.1186/s12974-017-1038-8
94. HOOGLAND, C. M. Inge, et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *Journal of Neuroinflammation* [interaktyvus]. 2015, 12 (114) [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1742-2094. Prieiga per doi: 10.1186/s12974-015-0332-6
95. HOOGLAND, C. M. Inge, et al. Microglial Activation After Systemic Stimulation With Lipopolysaccharide and Escherichia coli. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [interaktyvus]. 2018, 12, 110 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1663-4365. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00110>

96. WENDELN, Ann-Christin, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* [interaktyvus]. 2018, 556 (7701), 332–338 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1476-4687. Prieiga per doi: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0023-4>
97. NAGY, A. Janice, et al. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* [interaktyvus]. 2008, 11, 109–119 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1573-7209. Prieiga per doi: 10.1007/s10456-008-9099-z
98. KULSHRESHTHA, Anhur, Tanveer AHMAD, Anurag AGRAWAL, Balaram GHOSH. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [interaktyvus]. 2013, 131 (4), 1194–1203, 203.e1–14 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1097-6825. Prieiga per doi: 10.1016/j.jaci.2012.12.1565
99. HEROLD, Susanne, Nievi M. GABRIELLI, István VADÁSZ. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* [interaktyvus]. 2013, 305 (10), L665–L6681 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1040-0605. Prieiga per doi: 10.1152/ajplung.00232.2013
100. WEINBERG, E. Samuel, Laura A. SENA, Navdeep S. CHANDEL. Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* [interaktyvus]. 2015, 42 (3), 406–417 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1097-4180. Prieiga per doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.002>
101. WEST, A. Phillip, Gerald S. SHADEL, Sankar GHOSH. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* [interaktyvus]. 2011, 11 (6), 389–402 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1474-1741. Prieiga per doi: 10.1038/nri2975
102. *Mitochondria* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per internetą: <https://teachmephysiology.com/basics/cell-structures/mitochondria/>
103. *Mitochondrijų struktūra* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per internetą: <http://www.bchi.lt/LBD/saitas/files/mkitoch.pdf>
104. MCCARRON, G. John, et al. From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. *Journal of Vascular Research* [interaktyvus]. 2013, 50 (5), 357–371 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1423-0135. Prieiga per doi: 10.1159/000353883
105. MISSIROLI, Sonia, et al. Review. The Role of Mitochondria in Inflammation: From Cancer to Neurodegenerative Disorders. *Journal of Clinical Medicine* [interaktyvus]. 2020, 9 (3), 740 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 2077-0383. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9030740>
106. MARCHI, Saverio, et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *Journal of Signal Transduction* [interaktyvus]. 2012, 329635 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 2059-3635. Prieiga per doi: 10.1155/2012/329635.
107. GIORGI, Carlotta, Saverio MARCHI, Paolo PINTON. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [interaktyvus]. 2018, 19, 713–730 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1471-0080. Prieiga per doi: 10.1038/s41580-018-0052-8
108. *Cellular respiration* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per internetą: <https://www.jove.com/science-education/10976/what-is-cellular-respiration>

109. KRAUSS, Stefan, 2001. Mitochondria : Structure and Role in Respiration. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001. Prieiga per internetą: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001380/full>
110. MIMAKI, Masakazu, et al. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* [interaktyvus]. 2012; 1817 (6), 851–862 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 0006-3002. Prieiga per doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.010>
111. NAVICKAITĖ, Daiva, 2013. Žiurkės kepenų ir smegenų mitochondrijų kvėpavimo greičių palyginimas esant normalioms ir hipertermijos sąlygoms. *Magistro baigiamasis darbas*. Kaunas: Vytauto Didžiojo Universitetas. Prieiga per internetą: <https://vb.vdu.lt/object/elaba:2048499/2048499.pdf>
112. REECE, B. Jane, Lisa A. URRY, Michael L. CAIN, Steven A. WESSERMAN, Peter V. MINORSKY, Robert B. JACKSON, 2011. Cellular Respiration and Fermentation. In: *Campbell Biology*. San Francisko: Pearson Education, Inc., 209–230. ISBN 9780321739759.
113. PHANIENDRA, Alugoju, Dinesh Bahu JESTADI, Latha PERIYASAMY. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [interaktyvus]. 2015, 30 (1), 11–26 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 0970-1915. Prieiga per doi: 10.1007/s12291-014-0446-0
114. ANGAJALA, Anusha, et al. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Frontiers in Immunology* [interaktyvus]. 2018, 9, 1605 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1664-3224. Prieiga per doi: 10.3389/fimmu.2018.01605
115. PEARCE, L. Erika, Edward J. PEARCE. Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence. *Immunity* [interaktyvus]. 2013, 38 (4), 633–643 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1097-4180. Prieiga per doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.005
116. WANG, ViAndrew, Harding H. LUAN, Ruslan MEDZHITOV. Review. An evolutionary perspective on immunometabolism. *Science* [interaktyvus]. 2019, 363 (6423) [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1095-9203. Prieiga per doi: 10.1126/science.aar3932
117. RILEY, S. Joel, Stephen W. G. TAIT. Review. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO reports* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1469-3178. Prieiga per doi: 10.15252/embr.20194
118. ALCOCER-GÓMEZ, Elízabet, Beatriz CASTEJÓN-VEGA, Mario D. CORDERO, 2017. Stress-Induced NLRP3 Inflammasome in Human Diseases. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [interaktyvus]. Academic Press Inc., 2017, p. 127–62 [žiūrėta 2020-05-20]. ISBN 978-0-12-812388-1. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.02.002>
119. IWASAKI, Yukiko, Yusuke TAKESHIMA, Keishi FUJIO. Review Article. Basic mechanism of immune system activation by mitochondria. *Immunological medicine* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 25785826. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1080/25785826.2020.1756609>
120. RODRÍGUEZ-NUEVO, Aida, Antonio ZORZANO. Review. The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells. *Cell stress* [interaktyvus]. 2019, 3 (6) [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 2523-0204. Prieiga per doi: 10.15698/cst2019.06.190
121. BANTUG, R. Glenn, et al. Mitochondria–ER contact sites are immunometabolic hubs that orchestrate the rapid recall response of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* [interaktyvus]. 2018,

- 48 (3), 542–555 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1097-4180. Prieiga per doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.012
122. INNAMORATO, G. Nadia, Isabel LASTRES-BECKER, Antonio CUADRADO. Role of Microglial Redox Balance in Modulation of Neuroinflammation. *Current Opinion in Neurology* [interaktyvus]. 2009, 22 (3), 308–314 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1473-6551. Prieiga per doi: 10.1097/WCO.0b013e32832a3225
123. HANDY, E. Diane, Joseph LOSCALZO. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants and Redox Signaling* [interaktyvus]. 2012, 16 (11), 1323–1367 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1557-7716. Prieiga per doi: 10.1089/ars.2011.4123
124. NAKAHIRA, Kiichi, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology* [interaktyvus]. 2011, 12, 222–230 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1529-2916. Prieiga per doi: 10.1038/ni.1980
125. ILIEV, I. Asparouh, Argyrios K. STRINGARIS, Roland NAU, Harald NEUMANN. Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB Journal* [interaktyvus]. 2004, 18, 412–414 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1530-6860. Prieiga per doi: 10.1096/fj.03-0670fje
126. ROSSI, S., et al. Brain temperature, body core temperature, and intracranial pressure in acute cerebral damage. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* [interaktyvus]. 2001, 71 (4), 448–454 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 1468-330X. Prieiga per doi: 10.1136/jnnp.71.4.448
127. ROSE, Jordan, et al. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology* [interaktyvus]. 2017, 391, 109–115 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 0300-483X. Prieiga per doi: 10.1016/j.tox.2017.06.011
128. *HMC-3 subculturing protocol* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per internetą: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3304.aspx#culturemethod>
129. *Fuchs–Rosenthal* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per internetą: [https://www.google.com/search?q=Fuchs%E2%80%93Rosenthal&sxsrf=ALeKk029jQaCIoWkDcKfzXikBDDKc4yJVw:1586266855813&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEWjqu9bDuNboAhVGK5oKHQpSDFkQ\\_AUoAXoECAsQAw&biw=1536&bih=754#imgrc=JzBpEukpR\\_3h9M](https://www.google.com/search?q=Fuchs%E2%80%93Rosenthal&sxsrf=ALeKk029jQaCIoWkDcKfzXikBDDKc4yJVw:1586266855813&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEWjqu9bDuNboAhVGK5oKHQpSDFkQ_AUoAXoECAsQAw&biw=1536&bih=754#imgrc=JzBpEukpR_3h9M)
130. *Hemocytometer cell count and trypan blue cell viability* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per internetą: <http://www.bowdish.ca/lab/wp-content/uploads/2016/05/Cell-Count.pdf>
131. *HBEC-3 subculturing protocol* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per internetą: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4051.aspx?geo\\_country=lt#culturemethod](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4051.aspx?geo_country=lt#culturemethod)
132. HE, Fanglian. Bradford Protein Assay. *Bio-101*: e45. [interaktyvus]. 2011, [žiūrėta 2020-05-15]. Prieiga per doi: 10.21769/BioProtoc.45.
133. *Zetasizer manual* [interaktyvus] [žiūrėta 2020 04 07]. Prieiga per internetą: <https://www.manualslib.com/manual/1225799/Malvern-Zetasizer-Nano-Series.html?page=10#manual>
134. *Elisa protocol MyBioSource* [interaktyvus] [žiūrėta 2020 04 07]. Prieiga per internetą: [https://cdn.mybiosource.com/tds/protocol\\_manuals/800000-9999999/MBS9341392.pdf](https://cdn.mybiosource.com/tds/protocol_manuals/800000-9999999/MBS9341392.pdf)

135. *Hoechst 33342 and propidium iodide* [interaktyvus] [žiūrėta 2020 04 07]. Prieiga per internetą: [https://www.genscript.com/tech\\_guide/TM0361.pdf](https://www.genscript.com/tech_guide/TM0361.pdf)
136. *BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Control* [interaktyvus] [žiūrėta 2020 04 07]. Prieiga per internetą: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/BLOCK\\_IT\\_AF\\_RedFluorOligo\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/BLOCK_IT_AF_RedFluorOligo_man.pdf)
137. *Seahorse mito stress test protocol* [interaktyvus] [žiūrėta 2020 04 09]. Prieiga per internetą: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Cell\\_Mito\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf)
138. YANG, Chendong et al. Conceptual Background and Bioenergetic/Mitochondrial Aspects of Oncometabolism. In *Methods in Enzymology*. 2014, Volume 542, 2-509. ISSN 0076-6879
139. ZIELONKA, Jacek, Jeannette VASQUEZ-VIVAR, Balaraman KALYANARAMAN. Detection of 2-hydroxyethidium in Cellular Systems: a Unique Marker Product of Superoxide and Hydroethidine. *Nature Protocols* [interaktyvus]. 2008, 3 (1), 8–21 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1750-2799. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.473>
140. *Caspase-1 assay protocol* [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per internetą: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm456-caspaseglo-1-inflammasome-assay-protocol.pdf?la=en>
141. YUYAMA, Kohei, Hui SUN, Susumu MITSUTAKE, Yasuyuki IGARASHI. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2012, 287 (14), 10977–10989 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1083-351X. Prieiga per doi: 10.1074/jbc.M111.324616
142. FITZNER, Dirk, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of Cell Science* [interaktyvus]. 2011, 124, (3), 447–458b [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1477-9137. Prieiga per doi: 10.1242/jcs.074088
143. GONDA, Amber, et al. Cellular-Defined Microenvironmental Internalization of Exosomes. In: *Extracellular Vesicles and Their Importance in Human Health*. London: IntechOpen, 2019. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-05-14]. Prieiga per internetą: <https://www.intechopen.com/books/extracellular-vesicles-and-their-importance-in-human-health/cellular-defined-microenvironmental-internalization-of-exosomes>
144. JASTROCH, Martin, et al. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochemistry* [interaktyvus]. 2010, 47, 53–67 [žiūrėta 2020-05-25]. ISSN 1744-1358. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1042/bse0470053>
145. RUSSELL, E. Ashley, et al. Extracellular Vesicles Secreted in Response to Cytokine Exposure Increase Mitochondrial Oxygen Consumption in Recipient Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2020-05-25]. ISSN 1662-5102. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00051>
146. VIOLA, Antonella, et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology* [interaktyvus]. 2019, 10, 1462 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1664-3224. Prieiga per doi: 10.3389/fimmu.2019.01462
147. ORIHUELA, Ruben, Christopher A. MCPHERSON, Gaylia Jean HARRY. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology* [interaktyvus]. 2015, 173 (4), 649–665 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1476-5381. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/bph.13139>

148. VOLOBOUEVA, A. Liudmila, John F. EMERY, Xiaoyun SUN, Rona G. GIFFARD. 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, 587 (6), 756–762 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1873-3468. Prieiga per doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.067
149. MIN-JI, Choi, et al. Galangin Suppresses Pro-Inflammatory Gene Expression in Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Microglial Cells. *Biomolecules and Therapeutics* [interaktyvus]. 2017, 25 (6), 641–647 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 2005-4483. Prieiga per doi: 10.4062/biomolther.2017.173
150. BLAŽAUSKAITĖ, Deimantė, Aiste JEKABSONE, Lina JANKAUSKAITĖ. Airway cell exosome uptake in microglia is related to mitochondrial suppression and ROS production. In: *62nd International conference for Students of physics and natural sciences "Open Readings 2019"*, 19-22 March 2019, Vilnius: abstract book / Faculty of Physics. Vilnius University. Vilnius: Vilnius University, p. 436–436, no. P4–62. ISBN 978-609-07-0137-9. Prieiga per internetą: <http://www.openreadings.eu/thesismanager/thesis19/P4-62.pdf>
151. ZHANG, Wei, et al. Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *The FASEB Journal* [interaktyvus]. 2005, 19 (6), 533–542 [žiūrėta 2020-05-15]. ISSN 1530-6860. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>
152. HASLUND-VINDING, J., G. MCBEAN, V. JAQUET, F. VILHARDT. NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. *British Journal of Pharmacology* [interaktyvus]. 2017, 174 (12), 1733–1749 [žiūrėta 2020-05-17]. ISSN 1365-2125. Prieiga per doi: 10.1111/bph.13425
153. ISHIHARA, Yasuhiro, et al. Dual Role of Superoxide Dismutase 2 Induced in Activated Microglia. OXIDATIVE STRESS TOLERANCE AND CONVERGENCE OF INFLAMMATORY RESPONSES. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2015, 290 (37), 22805–22817 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1083-351X. Prieiga per doi: 10.1074/jbc.M115.659151
154. NAIK, Edwina, Vishva M. DIXIT. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine* [interaktyvus]. 2011, 208 (3), 417–420 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1540-9538. Prieiga per doi: 10.1084/jem.20110367
155. LIMONGI, Dolores, Sara BALDELLI. Redox Imbalance and Viral Infections in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [interaktyvus]. 2016, 6547248 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1942-0994. Prieiga per doi: 10.1155/2016/6547248
156. FRANCHI, Luigi, et al. Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K<sup>+</sup> Efflux. *Journal of Immunology* [interaktyvus]. 2014, 193 (8), 4214–4222 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1550-6606. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400582>
157. BURGUILLOS, A. Miguel, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* [interaktyvus]. 2011, 472, 319–324 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1476-4687. Prieiga per doi: 10.1038/nature09788.



158. VOET, Sofie, Sahana SRINIVASAN, Mohamed LAMKANFI, Geert van LOO. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Molecular Medicine* [interaktyvus]. 2019, e10248 [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1757-4684. Prieiga per doi: 10.15252/emmm.201810248
159. PATTERS, J. Benjamin, Santosh KUMAR. The role of exosomal transport of viral agents in persistent HIV pathogenesis. *Retrovirology* [interaktyvus]. 2018, 15 (79) [žiūrėta 2020-05-27]. ISSN 1742-4690. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0462-x>.