



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

**MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ SEKRETUOJAMŲ
EKSTRALĄSTELINIŲ VEZIKULIŲ NEUROPROTEKCINIO POVEIKIO
TYRIMAI**

**NEUROPROTECTIVE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS–
DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES**

Karolina Kriaučiūnaitė

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Darbo vadovas: dr. Augustas Pivoriūnas

Darbas atliktas: Valstybiniame tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre

Vilnius, 2017

Anotacija

Daugeliui neurodegeneracinių ligų būdingas lėtinis uždegimas. Centrinėje nervų sistemoje uždegiminiuosius procesus reguliuoja funkciniai audinių makrofagai, vadinami mikroglia. Fiziologinėmis sąlygomis mikroglia yra ramybės būsenos, tačiau neurouždegimo metu ji aktyvuojama ir atlieka kritinę funkciją diferencijuodama į uždegiminį M1 arba antiuždegiminį M2 imunofenotipą.

Šio darbo tikslas yra ištirti kaip pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių (PDPKL) sekretuojamos ekstraląstelinės vezikulės veikia žmogaus mikroglijos ląstelių uždegiminę aktyvaciją *in vitro*. Nustatyta, kad šiame darbe naudojamas *in vitro* poliarizavimo protokolas padeda efektyviai indukuoti M1 ir M2 imunofenotipą žmogaus mikroglijos ląstelėse. Taip pat identifikuoti potencialūs egzosomų taikiniai žmogaus mikroglijos ląstelėse. Eksperimento duomenys rodo, kad PDPKL egzosomos veikia uždegimą (ARG1, iNOS, VEGFA), fagocitozę (CD11b, TREM2), bei nespecifinį imuninį atsaką (CD14, TLR4) reguliuojančių genų ir miR-124-3p bei miR-145-5p raišką M0, M1 ir M2 žmogaus mikroglijos ląstelėse. Kitas svarbus rezultatas – PDPKL sekretuojamos egzosomos skatina mikroglijos ląstelių migraciją ir fagocitinį aktyvumą. Šie rezultatai suteikia naujų žinių apie priešuždegiminį ir neuroprotekcinį PDPKL sekretuojamų egzosomų poveikį ir potencialiai gali būti panaudoti kuriant naujus neurodegeneracinių ligų metodus.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, tyrimų rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 54 p., 14 paveikslų, 4 lentelės, 79 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: mikroglia, ekstraląstelinės vezikulės, egzosomos, neurodegeneracija, neurouždegimas

Annotation

Acute inflammation is associated with many neurodegenerative diseases. In central nervous system inflammatory process is regulated by resident tissue macrophages, named microglia. In physiology conditions microglial cells are ramified, but during neuroinflammation microglia become activated. During microglial activation cell morphology is changed either to M1, the typically activated phenotype, or to M2, an alternatively activated phenotype.

The aim of this study is to investigate the exosomes effect on the activation of human microglial cells. Exosomes were obtained from the stem cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth (SHEDs). During this study effective in vitro polarization of human microglial cells into M1 and M2 states was established. In addition, potential targets of exosomes in human microglial cells were identified. Obtained results indicate that exosomes affect expression of genes involved in the regulation of inflammatory response (ARG1, iNOS, VEGFA), phagocytosis (CD11b, TREM2) and also unspecific immune response (CD14, TLR4). Moreover, exosomes significantly affected expression of miR-124-3p and miR-145-5p in M0, M1 and M2 microglial cells. Another important finding of this study was that exosomes activate migration and phagocytic activity of human microglial cells. In conclusion, it demonstrates that exosomes derived from SHEDs can act as potent immunomodulators of human microglial cells. Herein, successful implementation of this project provides knowledge about neuroprotective and anti-inflammatory properties of exosomes which might be helpful for the development of new therapeutic strategies against neurodegenerative disorders.

Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions and references.

Thesis consist of: 54 p. text without appendixes, 14 pictures, 4 table, 79 bibliographical entries.

Keywords: microglia, extracellular vesicles, exosomes, neurodegeneration, neuroinflammation

TURINYS

PAVEIKSLAI IR LENTELĖS	6
SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. Centrinė nervų sistema ir mikroglija	12
1.2. Neurodegeneracinės ligos ir uždegimas.....	14
1.3. Uždegiminė mikroglijos aktyvacija	15
1.4. Mezenchiminių kamieninių ląstelių prieš uždegiminės savybės	17
1.5. Ekstraląstelinės vezikulės	18
1.6. Egzosomų neuroprotekcinis poveikis	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	26
2.1. Medžiagos ir aparatūra.....	26
2.1.1. Ląstelės	26
2.1.2. medžiagos	26
2.1.3. Aparatūra.....	27
2.2. Metodai	28
2.2.1. Mikroglijos ląstelių kultivavimas ir aktyvacija.....	28
2.2.2. Žmogaus pieninio danties pulpos ląstelių išskyrimas ir kultivavimas	29
2.2.3. Žmogaus nervinių kamieninių ląstelių ReNcell VM kultivavimas ir apoptotinių kūnelių generavimas	30
2.2.4. Egzosomų išskyrimas diferencinio ultracentrifugavimo metodu iš PDPKL	31
2.2.5. Egzosomų dozavimas.....	31
2.2.6. Mikroglijos ląstelių inkubacija su egzosomomis	31
2.2.7. Nanodalelių analizė.....	31
2.2.8. Mikroglijos migracijos tyrimas	32
2.2.9. Mikroglijos fagocitinis aktyvumas	32
2.2.10. RNR išskyrimas	32
2.2.11. Kopijinės DNR sintezė ir tikro laiko PGR.....	33
2.2.13. Baltymų išskyrimas iš mikroglijos ląstelių	35
2.2.14. Elektroforezė	35
2.2.15. Baltymų pernešimas ant membranos ir imuninė baltymų analizė	36
2.2.16. Statistinė analizė	36
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	37

3.1. Mikroglijos uždegiminė aktyvacija	37
3.2. Ekstraląstelinių vezikulių išskyrimas iš žmogaus pieninio danties pulpos MKL supernatantų	39
3.3. Ekstraląstelinių vezikulių poveikis mikroglijos genų ir mikroRNR ekspresijai.....	40
3.4. EV poveikis JAK/STAT signaliniam keliui žmogaus mikroglijos ląstelėse	42
3.5. Ekstraląstelinių vezikulių poveikis mikroglijos ląstelių migracijai ir fagocitiniam aktyvumui	44
4. IŠVADOS	48
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	49

PAVEIKSLAI IR LENTELĖS

- 1 pav.** Mikroglijos morfologija;
- 2 pav.** Mikroglijos aktyvacija: M1 ir M2;
- 3 pav.** Egzosomų susidarymas ir sekrecija;
- 4 pav.** Antigeną pateikiančios ląstelės egzosomos sudėtis;
- 5 pav.** Genų raiška ramybės būsenos (kontrolinėse) ir poliarizuotose M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse;
- 6 pav.** MiRNR raiška ramybės būsenos (kontrolinėse) ir poliarizuotose M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse;
- 7 pav.** Iš PDPKL išskirtų egzosomų NTA analizė;
- 8 pav.** Ramybės būsenos mikroglijos (kontrolinės) ir ramybės mikroglijos mikroglijos ląstelių veiktų egzosomomis kokybinis migracijos įvertinimas;
- 9 pav.** Ramybės būsenos mikroglijos (kontrolinės) ir ramybės būsenos mikroglijos ląstelių veiktų egzosomomis kiekybinis migracijos įvertinimas;
- 10 pav.** Žmogaus mikroglijos ląstelių fagocitinio aktyvumo tyrimas;
- 11 pav.** AK fagocitavusių ląstelių kiekis procentais;
- 12 pav.** Egzosomų poveikis genų raiškai M0, M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse;
- 13 pav.** Egzosomų poveikis miRNR raiškai M0, M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse;
- 14 pav.** Imunobloto JAK/STAT signalinio kelio analizė mikroglijos ląstelėse veiktose egzosomomis;
- 1 lentelė.** Ekstraląstelių vezikulių klasifikacija ;
- 2 lentelė.** TL–PGR pradmenų sekos;
- 3 lentelė.** Tirtų miRNR sąrašas;
- 4 lentelė.** Naudojami antikūnai.

SANTRUMPOS

AK – apoptotiniai kūneliai (angl. *apoptotic bodies*)

AL – Alzheimerio liga

ALS – amiotrofinė lateralinė sklerozė

AP-1 – aktyvuojantis baltymas 1 (angl. *activator protein 1*)

Arg-1 – arginazė 1

ATP – adenzintrifosfatas

A β – beta amiloidas

CD – diferenciacijos klasteris (angl. *cluster of differentiation*)

CNS – centrinė nervų sistema

COX-2 – ciklooksigenazė 2 (angl. *cyclooxygenase 2*)

CSF – cerebrospinalinis skystis (angl. *cerebrospinal fluid*)

DAMP – su pažeidimu susijusios molekulinės struktūros (angl. *damage associated molecular pattern*)

DVK – daugiavezikulinis kūnelis

ESCRT – transportui būtinas endosominio sortingo kompleksas (angl. *endosomal sorting complexes required for transport*)

EV – ekstraląstelinės vezikulės (angl. *extracellular vesicles*)

FA – fagocitinis aktyvumas

FS – fosfatidilserinas

FUS/TLS – sarkomos susilieimo arba liposarkomos translokacijos genas (angl. *fused in sarcoma or translocation in liposarcoma*)

GFAP – glijos skaidulinis rūgštinis baltymas (angl. *glial fibrillary acid protein*)

HBV – Hepatito B virusas

HMC II – pagrindinis audinių suderinamumo II klasės kompleksas (angl. *major histocompatibility complex class II*)

ICAM-1 – viduląstelinė adhezijos molekulė 1 (angl. *intercellular adhesion molecule 1*)

IL – interleukinas

ILR – interleukino receptorius

ILV – intraluminė vezikulė

INF γ – interferonas gama

INF γ R – interferono gama receptorius

iNOS – indukuojama azoto oksido sintazė (angl. *inducible nitric oxide synthase*)

IRF – interferono reguliacinis veiksnys (angl. *interferon regulator factor*)

IκB – kapa B slopiklis (angl. *inhibitor of kappa B*)

LPS – lipopolisacharidas

MAP – mitogeno aktyvuotas baltymas (angl. *mitogen activated protein*)

MARCO – kolageninės struktūros makrofagų receptorius (angl. *macrophage receptor with collagenous structure*)

MBP – pagrindinis mielino baltymas (angl. *myelin basic protein*)

MCP-1 – monocitų chemoatraktantas 1 (angl. *monocyte chemoattractant protein 1*)

miRNR – mažoji RNR

MyD88 – mieloidinės diferenciacijos pirminio atsako genas 88 (angl. *myeloid differentiation primary response gene 88*)

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas (angl. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NFT – neurofibrilių raizginiai (angl. *neurofibrillary tangles*)

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

NLR – NOD-like receptoriai

PAMP – su patogenų susijusios molekulinės struktūros (angl. *pathogen associated molecular pattern*)

PDPLK – žmogaus pieninio danties pulpos kamieninės ląstelės (angl. *stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)*)

PL – Parkinsono liga

PM – plazminė membrana

PRR – molekulinės struktūros atpažįstantis receptoriai (angl. *pattern recognition receptor*)

RAGE – galutinių glikooksidacijos produktų receptoriai (angl. *receptor for advanced glycoxidation end products*)

RNS – reaktyvios azoto formos (angl. *reactive nitric species*)

ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)

SOD-1 – superoksido dismutazė 1 (angl. *superoxide dismutase 1*)

TARDBP – tansaktyvaus atsako DNR surišantis baltymas (angl. *transactive response DNA binding protein*)

TLR – toll-like receptoriai

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

TPM – tetraspaniniais praturtinti mikrodomenai

TRIF – su TIR domenu susijęs adaptorinis interferonas beta (angl. *TIR domaincontaining adapter inducing interferon- β*)

VAMP7 – vezikulinis membraninis baltymas 7 (angl. *vesicle associated membrane protein 7*)

VV – veikimo vienetai

IVADAS

Alzheimerio liga, Parkinsono liga ir amiotrofinė lateralinė sklerozė yra dažniausios neurodegeneracinės ligos, pasireiškiančios senyvo amžiaus žmonėms. Jos pasižymi laipsniška nervinių ląstelių žūtimi ir kognityvinių funkcijų pablogėjimu. Pagrindinis veiksnys, inicijuojantis neurodegeneracinius susirgimus yra netipiškų baltymų sankaupos centrinėje nervų sistemoje (CNS), o ligos progresavimą itin paskatina daugelį neurodegeneracinių ligų lydintis lėtinis uždegimas.

CNS uždegiminius procesus reguliuoja funkciniai audinių makrofagai, vadinami mikroglia. Fiziologinėmis sąlygomis mikroglia yra ramybės būsenos, tačiau neuorūdegimo metu ji aktyvuojama ir atlieka kritinę funkciją, diferencijuodama į uždegiminį M1 fenotipą arba į antiuždegiminį M2 fenotipą¹. Neurodegeneracines ligas sukeliantys veiksniai aktyvuoja mikroglijos ląsteles ir paskatina NF- κ B signalinį kelią², kuris lemia uždegiminių citokinų raišką. Uždegiminiai citokinai paraleliai aktyvuoja dar daugiau mikroglijos ląstelių. Tokiu būdu uždegimas tampa ilgalaikis procesas, lemiantis neurodegeneracinių ligų progresavimą. Siekiant sulėtinti neurodegeneracinių ligų vystymąsi ar palengvinti jų simptomus, svarbus uždavinys yra kurti terapines priemones, nukreiptas prieš uždegiminę mikroglijos aktyvaciją.

Mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) yra daugiagaliu diferenciacijos potencialu pasižyminčios ląstelės išskiriamos iš postnatalinių audinių. Daugiau nei dvidešimtmetį jos naudojamos kaip uždegimą slopinantys agentai³. Danties audinių MKL kaip ir nervinės ląstelės yra neuroektoderminės kilmės, todėl manoma, kad jos galėtų būti sėkmingai naudojamos neuprotekciniais tikslais⁴. MKL terapinis poveikis daugiausia pasiekiamas per sekretuojamus veiksnius: uždegimą mažinančius citokinus, augimo ir diferenciacijos veiksnius, taip pat per sekrecines pūsleles vadinamas ekstraląstelinėmis vezikulėmis (EV).

EV yra ląstelių sekretuojami nanometrų (nm) dydžio citoplazmos fragmentai apgaubti fosfolipidinės membranos bisluoksniu⁵. EV skirstomos į endosominiame kelyje susidarančias egzomas, tiesioginiai nuo plazminės ląstelės membranos atsiskiriančias mikrovezikules ir apoptotinius kūnelius. Egzomos yra svarbios tarpląstelinei komunikacijai – jos iš ląstelės į ląstelę gali pernešti baltymus, įvairių tipų RNR ir kitas molekules. Egzomos yra 50–100 nm dydžio ir gali pereiti hematoencefalinį barjerą⁶, todėl neurodegeneracinėms ligoms gydyti jos gali būti lengvai pritaikytos *in vivo*, nenaudojant invazinių priemonių.

Egzosomų išskirtų iš neurogeninėmis savybėmis pasižyminčių danties audinių MKL, neuroprotekcinis poveikis *in vitro* jau įrodytas⁶, tačiau neutroprotekcinę funkciją lemiantis mechanizmas nėra pakankamai nagrinėtas. Aktyvuotos mikroglijos ląstelių linijos gali būti pritaikytos išsamesniems tyrimams, kurie paaiškintų, koku būdu egzosomos gali slopinti neurodegeneracinių ligų sukeltą uždegimą.

Šio darbo tikslas – ištirti ekstraląstelių vezikulių poveikį žmogaus mikroglijos funkciniam aktyvumui ir uždegiminei aktyvacijai.

Tikslui pasiekti iškelti šie uždaviniai:

1. Vykdyti žmogaus mikroglijos ląstelių uždegiminę aktyvaciją *in vitro*;
2. Išskirti ekstraląstelines vezikules (EV) iš žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių (PDPKL);
3. Nustatyti, kaip EV veikia uždegiminį atsaką reguliuojančių genų ir mikroRNR ekspresiją žmogaus mikroglijos ląstelėse;
4. Įvertinti, kaip EV veikia JAK/STAT signalinį kelią žmogaus mikroglijos ląstelėse;
5. Įvertinti EV poveikį žmogaus mikroglijos ląstelių migracijai ir fagocitiniam aktyvumui.

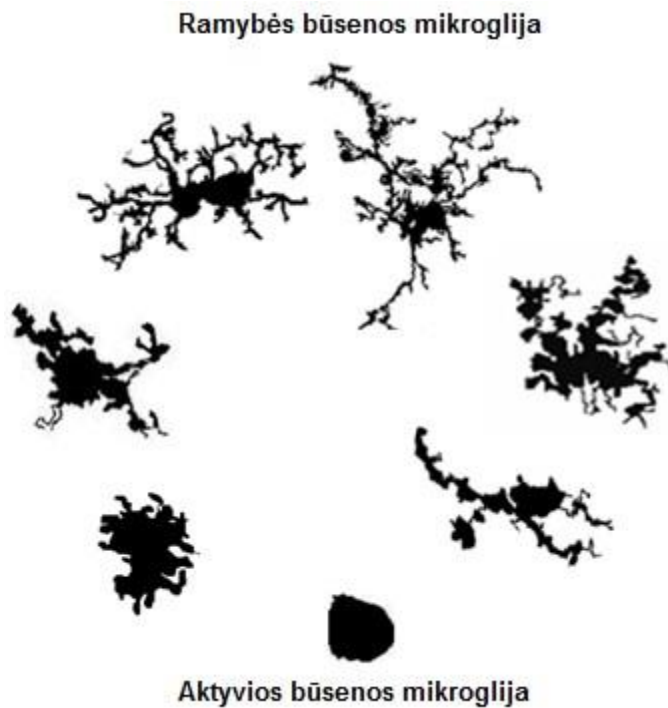
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Centrinė nervų sistema ir mikroglia

Centrinėje nervų sistemoje (CNS), sudarytoje iš galvos ir stuburo smegenų, yra du pagrindiniai ląstelių tipai – neuronai ir glija. Elektrinį potencialą generuojantys neuronai smegenyse pasiskirstę netolygiai ir sudaro ~10 procentų visų ląstelių⁷. Likusią dalį sudaro glija, skirstoma į oligodendrocitus, astrocitus, ependimocitus (kartu vadinamus makroglia) ir mikroglia. Astrocitai yra hematoencefalinio barjero tarpininkai⁸. Jie ne tik perduoda neuronams maistines medžiagas, reguliuoja metabolinius procesus, tačiau yra svarbūs ir sinapsių susidarymo eigoje bei neurotransmiterių recirkuliacijai. Oligodendrocitai gamina mieliną, iš kurio sudarytas dangalas izoliuoja neuronų aksonus bei užtikrina greitą ir sklandų veikimo potencialo sklidimą⁹. Ependimocitai sudaro ependimą – ploną epitelio sluoksnį tarp smegenų parenchimos ir skilvelių (du šoniniai smegenų skilveliai, trečiasis ir ketvirtasis skilvelis), užpildytų cerebrospinaliniu skysčiu (CSF, angl. *cerebrospinal fluid*). Pagrindinė ependimocitų funkcija – CSF apykaita¹⁰.

Mikroglia yra tik CNS būdinga imuninės sistemos dalis ir smegenyse atlieka vietinių makrofagų funkciją. Tai vienintelis CNS ląstelių tipas kildinamas iš mieloidinių pirmtakų. Mikroglia yra mezoderminės kilmės vienbranduolės ląstelės, kurios aptinkamos trynio maišelyje jau 4–5-ą žmogaus embriono vystymosi savaitę. Įgavusios ameboidinę išvaizdą, ląstelės migruoja į smegenis ir yra vadinamos mikrogliocitais. Mikrogliocitai yra itin svarbūs embriono smegenų vystymosi laikotarpiu, nes atlieka svarbią funkciją pašalindami nereikalingus aksonus¹¹. Po gimimo ameboidinė mikroglia diferencijuoja į ramybės būsenos mikroglia¹².

Suaugusio žmogaus smegenyse, priklausomai nuo vietos, mikroglia sudaro iki 16 procentų visų CNS esančių ląstelių¹³. Visos subrendusios mikroglijos ląstelės pasižymi transmembraninio baltymo 119 raiška¹⁴. Reaguodamos į įvairius aplinkos signalus, mikroglijos ląstelės įgauna savitą išvaizdą ir funkcijas. Pagal jos skirstomos į ramybės ir aktyvios būsenos mikroglia (**1 pav**)¹⁵.



1 pav. Mikroglijos morfologija¹⁶

Fiziologinėmis sąlygomis mikroglia yra ramybės būsenos. Ji turi sferinį kūną, daug šakotų ataugų¹⁵ ir pasižymi paviršiaus žymens CD11b raiška. Kiekviena ramybės stadijoje esanti mikroglijos ląstelė turi apibrėžtą teritoriją, kurioje ji periodiškai juda išplėsdama ir sutraukdama savo ataugas kelių sekundžių ar minučių intervalais¹⁷. Didelis paviršiaus plotas leidžia ląstelei sąveikauti su neuronais, kitomis glijos ląstelėmis bei greitai reaguoti į mikroaplinkos pakitimus. Ramybės būsenos mikroglia sekretuoja neurotrofines molekules ir šalina metabolitus bei toksiškus veiksnius, kuriuos išskiria pažeisti neuronai¹⁸. Bet kokie patogenai ir smegenų pažeidimo signalai gali paskatinti ramybės būsenos mikrogliją pereiti į aktyvios būsenos mikrogliją.

Po smegenų pažeidimo arba patogeno patekimo ramybės būsenos mikroglia pradeda sparčiai daugintis ir tampa aktyviais smegenų makrofagais – tai vadinama aktyvia mikroglijos būsena. Aktyvi mikroglia yra ameboidinės formos, turi daug lizosomų bei fagosomų. Tokia morfologija ir sudėtis leidžia mikroglijai migruoti į pažeidimo vietą ir fagocituoti žuvusias ląsteles bei jų nuolaužas. Aktyvi mikroglia savo paviršiuje turi pagrindinį audinių suderinamumo II klasės kompleksą (MHC II, angl. *major histocompatibility complex class II*), taip pat kitas, antigeno pristatymui svarbias molekules: kostimuliacinį baltymą B7 ir CD40 bei ICAM-1. Po pažeidimo, per 2–3 dienas mikroglia pasiekia aktyvacijos piką, tačiau jei žalingi veiksniai nėra pašalinami, ji

išlieka aktyvi. Ilgą laiką aktyvioje būsenoje esanti mikrogliją tampa hiperaktyvi ir palaiko lėtinį uždegimą, kuris siejamas su daugeliu neurodegeneracinių ligų¹⁹.

1.2. Neurodegeneracinės ligos ir uždegimas

Neurodegeneracija apibūdinama kaip laipsniškas neuronų netekimas ir jų funkcijų pablogėjimas. Alzheimerio liga (AL), Parkinsono liga (PL), amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS) yra neurodegeneraciniai susirgimai, turintys skirtingą patogenezę, tačiau visų jų metu smegenyse vyksta lėtinis neurouždegimas²⁰.

AL yra vienas labiausiai paplitusių su amžiumi susijusių susirgimų. Industrinėse šalyse šia liga serga apie 7 procentus žmonių, kuriems yra virš 65 metų ir apie 40 procentų – kuriems virš 80 metų. AL pasireiškia atminties praradimu, kognityvinių funkcijų blogėjimu, elgesio ir neuropsichiatriniais sutrikimais. AL patofiziologiniai požymiai yra netirpus beta amiloido (A β) agregatų, vadinamų senatvinėmis plokštelėmis, susikaupimas tarpląstelinėje ertmėje ir viduląsteliniai neurofibriliniai raizginiai (angl. *neurofibrillary tangles*), sudaryti iš hiperfosforilinto *tau* baltymo²¹.

PL yra kitas labiausiai paplitęs senatvinis susirgimas po AL. PL serga apie 2 procentus žmonių, priklausančių amžiaus grupei virš 60 metų. Šios ligos simptomai labiausiai susiję su motoriniais sutrikimais: bradikinezija (lėtais judesiais), tremoru (drebėjimu), rigidiškumu (raumenų sukaustymu), posturaliniu nestabilumu (pusiausvyros sutrikimu) ir greta pasireiškiančiais požymiais: depresija, nerimu, kognityviniais ir miego sutrikimais. Molekuliniam lygmenyje PL simptomai, panašiai kaip ir AL atveju, yra susiję su organizmui nebūdingų baltymų sankaupomis. Neteisingai susilankstęs baltymas α -sinukleinas sudaro vadinamuosius Levi kūnelius, kurie kaupiasi dopaminerginių neuronų aksonuose ir lemia jų žūtį²². Po neuronų žūties α -sinukleino dariniai patenka į tarpląstelinę ertmę.

ALS yra viena labiausiai paplitusių ligų pažeidžiančių motorinius neuronus. Rizika susirgti šia liga yra 1/600–1/2000. Paprastai ALS pasireiškia apie 55 metus ir pažeidžia motorinius smegenų kamieno, stuburo smegenų ir smegenų žievės neuronus. Pagrindiniai ligos simptomai yra hiperrefleksija, spazmai, raumenų fascikuliacija (raumeninių skaidulų pluoštelių susitraukimai) ir silpnumas. Po pirmųjų požymių pasireiškimo pacientai išgyvena apie 2–5 metus²³. ALS patofiziologinis požymis yra ubikvitilintų baltymų tarpai motorinių neuronų citoplazmoje²⁴. Šie tarpai skirstomi į hialinius (skaidrius baltyminius) Levi tipo ir raizginio tipo (angl. *strein-like*)

kūnelius. Ubikvitilinti intarpai sukelia neuronų žūtį ir stiprų uždegiminį atsaką. Apie 10 procentų ALS susirgimų yra paveldimi. Juos sieja kelių genų mutacijos: SOD-1, TARDBP ir FUS/TLS²³.

Neurodegeneraciniai susirgimai, daugiausia kyla dėl organizmui nebūdingų baltymų agregatų (Aβ sancaupos AL, α-sinukleino dariniai – PL, ubikvitilintų baltymų intarpai – ALS atveju) ir yra vadinami proteinomatijomis²⁵. Neteisingos tretinės struktūros baltymus eukariotinėse ląstelėse sunaikina proteosomos nuo ubikvitino priklausomu keliu arba lizosomos autofagijos būdu. Sutrikęs baltymų degradacijos mechanizmas lemia toksiškų baltymų kaupimąsi, kas sukelia neuronų žūtį ir mikroglijos hiperaktyvaciją.

Už imuninį atsaką atskingos mikroglijos ląstelės AL, PL ir ALS pažeistose smegenyse yra aktyvuojamos dviem keliais: dėl tiesioginės sąveikos su toksiškais baltymų agregatais arba dėl žūstančių neuronų sekretuojamų molekulių. Aktyvuota mikroglia pasižymi padidėjusia uždegiminių citokinų bei chemokinų raiška, kurie aktyvuoja dar daugiau imuninių ląstelių ir lemia ilgalaikį uždegimą.

1.3. Uždegiminė mikroglijos aktyvacija

Uždegimas yra griežtai reguliuojamas biologinis procesas, kurio tikslas – naikinti organizmui žalingus veiksnius. Imuninės reakcijos inicijuojamos per molekulinės struktūros atpažįstančius receptorius (PRR, angl. *pattern recognition receptor*), kurių ekspresija būdinga daugeliui ląstelių, tačiau daugiausiai jų turi imuninės ląstelės, taip pat mikroglia. Po mikroglijos PRR sąveikos su patogeninės kilmės (PAMP, angl. *patogen associated molecular pattern*) arba endogeninės kilmės (DAMP, angl. *damage associated molecular pattern*) molekulėmis yra sukeliamas įgimtas, tačiau ne specifinis imuninis atsakas²⁶.

Vienas pagrindinių PRR yra *toll-like* receptoriai (TLR). TLR atpažįsta įvairias PAMP, pavyzdžiui, TLR4 sąveikauja su bakterijų sienelės komponentu lipopolisacharidu (LPS), o TLR3 – virusine dvigubos spiralės RNR²⁷. Prieš tai aptartos PL atveju, mikroglijos imuninė reakcija sukelia α-sinukleinui susijungus su TLR2.

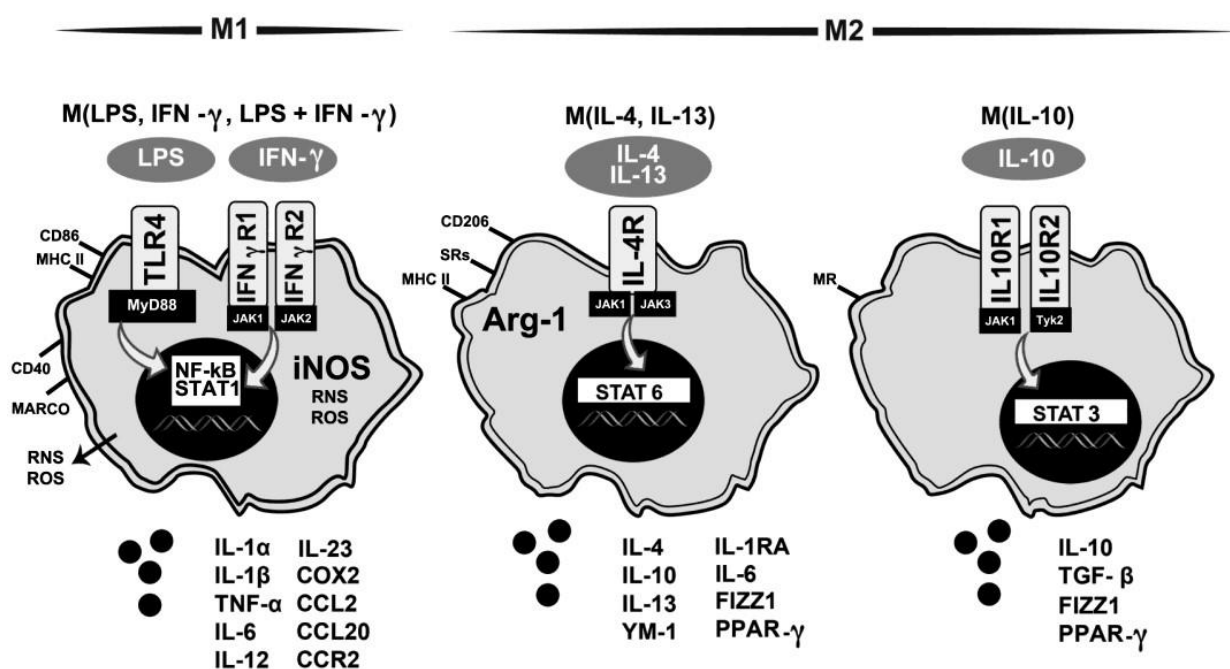
Kiti žinomi PRR – purinerginiai receptoriai ir receptoriai surinkėjai (angl. *scavenger receptor*), kurie sąveikauja su DAMP. Purinerginiai receptoriai jungiasi adenosintrifosfatu (ATP), kuris patenka į tarpląstelinę ertmę po ląstelių žūties, trauminio pažeidimo ar išemijos²⁸. Receptoriai

surinkėjai sąveikauja su įvairiais endogeninės kilmės ligandais: oksiduotais baltymais, lipidais, apoptotinėmis ląstelėmis²⁹.

Ligando sąveika su PRR aktyvuoja signalo perdavimo kelius, kurie reguliuoja skirtingus transkripcinius ir potranskripcinius procesus. Pavyzdžiui, TLR sąveikauja su signalo perdavimo adaptoriais MyD88 ir TRIF, kurie toliau jungiasi su I κ B inhibitoriaus ir MAP kinazėmis. Pastarosios kontroliuoja transkripcijos veiksnius, kurie yra NF κ B, AP-1 ir IRF šeimos nariai. Šie veiksniai reguliuoja su uždegimu susijusių genų raišką².

Kad imuninis atsakas būtų efektyvus, į uždegimo vietą turi būti pritraukta daugiau imuninių ląstelių. Tai pasiekama per padidėjusią citokinų, pavyzdžiui, naviko nekrozės veiksnio alfa (TNF α , angl. tumor necrosis factor alfa) interleukino 1 beta (IL-1 β) ir chemokinų, pavyzdžiui, MCP-1 geno transkripciją. Papildomai stimuliuojami genai, kurie susiję su antimikrobinį aktyvumą turinčių baltymų ekspresija, pavyzdžiui iNOS ir ROS³⁰.

Priklausomai nuo smegenų pažeidimo pobūdžio ir stadijos, galimi du mikroglijos aktyvacijos keliai – vadinamoji klasikinė aktyvacija (mikroglia įgauna M1 fenotipą) ir alternatyvioji aktyvacija (mikroglia įgauna M2 fenotipą). Pirmuoju atveju mikroglia skatina uždegiminius procesus, tuo tarpu M2 mikroglia pasižymi priešuždegimine ir atstatomąja funkcija. Toliau aprašomas mikroglijos aktyvacijos mechanizmas standartinėmis sąlygomis, kurios gali būti sudaromos mikroglijos ląstelių kultūroje *in vitro* (2 pav).



2 pav. Mikroglijos aktyvacija: M1 ir M2¹

M1 aktyvacijos metu LPS ir interferonas gama (INF γ) atitinkamai stimuliuoja TLR4, INF γ receptorių 1 (INF γ R1) ir INF γ R2. LPS susijungęs su TLR4 pradeda NF-kB signalinį kelią bei aktyvuoja transkripcijos veiksnius NF-kB, o INF γ susijungęs su INF γ R pradeda JAK/STAT signalinį kelią ir aktyvuoja transkripcijos veiksnį STAT1. Klasikinės mikroglijos aktyvacijos atveju padidėja paviršiaus žymenų CD86, CD40, MARCO ir MHC II raiška. Išauga ROS ir RNS produkcija. Taip pat padidėja uždegiminių citokinų (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23), chemokinų (CCL2, CCL20, CCR2) sekrecija ir COX-2 raiška¹.

IL4 susijungus su IL-4R arba IL-10 – su IL-10R, mikroglija įgyja M2 fenotipo požymius. Pirmu atveju aktyvuojamas STAT3, o antruoju – STAT6 transkripcijos veiksnius. STAT3 ir STAT6 transkripcijos veiksniai lemia prieš uždegiminį atsaką. Tokios mikroglijos ląstelės pasižymi padidėjusiu arginazės 1(Arg-1) kiekiu, manozės receptorių (CD206) ekspresija bei prieš uždegiminių veiksmių (IL-4, IL-6, IL-10, IL-10R2), FIZZ1 ir PPAR γ produkcija¹.

1.4.Mezenchiminių kamieninių ląstelių prieš uždegiminės savybės

2006 metais Tarptautinė ląstelių terapijos asociacija apibendrinio mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) požymius ir pagal juos sukūrė minimalių reikalavimų sąrašą³¹, kurį sudarė trys kriterijai, būtini MKL atpažinimui: adhezija (lipimas) prie plastiko, savitų paviršiaus antigenų (Ag) raiška, daugiagalis diferenciacijos potencialas.

MKL turi lipti prie plastiko įprastomis auginimo sąlygomis naudojant audinių kultūros flakonus. Taip pat ≥ 95 % MKL populiacijos privalo turėti CD105, CD73 bei CD90 paviršiaus Ag ir tuo pačiu stokoti CD45, CD34, CD14 ar CD11b, CD79 α ar CD19 ir MHC II Ag (tik $\leq 2\%$ visų MKL turi šiuos Ag). MKL turi diferencijuoti osteogenine, chondrogenine ir adipogenine kryptimi taikant įprastas diferenciacijos *in vitro* sąlygas³¹.

MKL randamos mažais kiekiais (apie 0,001-0,01 % visų ląstelių) tarp diferencjavusių ląstelių įvairiuose audiniuose: kaulų čiulpuose, riebaliniame audinyje, odoje, vikštelėje, danties audiniuose it kt. Jų telkimosi vieta audinyje vadinama niša, kuri susideda iš apink MKL esančių kitų nekamieninių ląstelių, ekstraląstelinio matrikso ir sekrecinių veiksmių. Niša sudaro palankias sąlygas MKL dauginimuisi ir atsinaujinimui³².

1998 metais buvo pastebėta, kad MKL gali slopinti imunines reakcijas. Nuo to laiko bandoma MKL naudoti uždegimo slopinimui. MKL uždegimą reguliuoja dvejopai: tarpląstelinės sąveikos ir parakrininiu būdais. Pagrindiniai jų yra IL-6, transformuojantis augimo veiksnys beta (TGF- β), prostaglandinas E2, HGF, triptofano katabolinis fermentas IDO, stromos ląstelių veiksnys 1, iNOS, NO bei epidermio, fibroblastų, vaskuliarinio endotelio, insulino ir trombocitų augimo veiksniai. Šie veiksniai veikdami kartu gali sumažinti uždegiminį atsaką ir skatinti progenitorinių ląstelių dauginimąsi ir diferenciaciją pažeistame audinyje³.

Danties audiniai formuojasi iš neuroektodermos, todėl iš šio audinio išskirtos MKL pasižymi neurogeninėmis savybėmis. Manoma, kad šios ląstelės gali būti sėkmingai panaudotos įvairių neurologinių būklių gydymui. Dantų audiniuose randamas kelių tipų MKL: dantų pulpos kamieninės ląstelės (DPKL), žmogaus pieninio danties KL (PDPKL), periodonto raiščio KL, apikalinės papilos KL ir dantų folikulo ląstelių pirmtakai³³.

PDPKL turi didesnę proliferacijos potencialą lyginant su kitomis danties audinių KL⁴, nes yra išskiriamos iš vaikų nenuolatinių, pieninių dantų pulpos. Jos sudaro iki 1 procento visų dantų pulpos ląstelių³⁴. PDPKL pasižymi c-kit, STRO-1, CD146 ir 3G5 raiška. Joms taip pat būdingi kai kurių nervinių žymenų raiška, pavyzdžiui, nestino ir beta III-tubulino. PDPKL ląstelės nesudėtingai dauginamos in vitro, yra labai plastiškos, daugiagalės ir gali diferencijuoti į neuronus, glijos ląsteles, adipocitus ir chondrocitus³⁴.

MKL terapija in vivo daugeliu atvejų buvo sėkminga, tačiau išlieka tam tikra rizika, pavyzdžiui, imuninės reakcijos³⁵. Dėl šios priežasties vis daugiau tyrimų atliekama su sekreciniais MKL veiksniais.

1.5. Ekstraląstelinės vezikulės

Visų gyvosios gamtos domenų – archėjų, bakterijų ir eukariotų – organizmai sekretuoja nanometrų dydžio pūsleles, vadinamas ekstraląstelinėmis vezikulėmis (EV). Jos apibūdinamos kaip ląstelinės kilmės sferoidiniai citoplazmos fragmentai, apgaubti fosfolipidinės membranos bisluoksniu. EV gali būti klasifikuojamos pagal dydį, kilmę ir funkcijas. Skiriami trys visoms ląstelėms būdingi EV tipai⁵: mikrovezikulės, egzomosos ir apoptotiniai kūneliai (**1 lentelė**).

Mikrovezikulės – tai nereguliarios formos EV, tiesiogiai atsiskiriančios nuo ląstelės plazminės membranos (PM)³⁶. Mikrovezikulė pradeda formuotis, kai fosfolipidas fosfatidilserinas (FS) iš vidinio PM sluoksnio patenka į išorinį. Šioje vietoje PM praranda ryšius su citoskeleto baltymais ir išlinksta išorės link sudarydama sferinį išsikišimą. Mikrovezikulė nuo ląstelės atsikiria dėl aktino-miozino susitraukimo pūslelės kaklelio vietoje ir patenka į ekstraląstelinę ertmę^{37,38}.

Mikrovezikulės yra praturtintos metaloproteinazėmis 2, integrinais ir selektinais³⁹

1 lentelė. Ekstraląstelinių vezikulių klasifikacija

Rūšis	Dydis	Tankis	Kilmė	Sandara
Mikrovezikulės	100-1000 nm	1.18-1.19 g/mL	Iš plazminės membranos pumpuravimosi būdu	Aktinas, tubulinas, β 1 integrinas, VAMP3*, miRNR*
Egzosomos	50-100 nm	1.13-1.19 g/mL	Iš daugiavezikulinio kūnelio egzocitozės būdu	Šiluminio šoko baltymai, aktinas, tubulinas, MHC molekulės*, tetraspaninai (CD63, CD81, CD82, CD9), miRNR, mRNR*
Apoptotiniai kūneliai	1000-5000 nm	1.16-1.28 g/mL	Iš plazminės membranos ląstelei apoptuojant	Aneksinas V, C3b*, trombospodinas, įvairūs ląstelės komponentai

*VAMP3, vezikulėms būdingas membraninis baltymas 3; miRNR, mažoji RNR; mRNR, informacinė RNR, MHC molekulės, didžiojo audinių suderinamumo komplekso molekulės; C3b, komplemento baltymas 3b; Gag, grupei būdingi antigenai

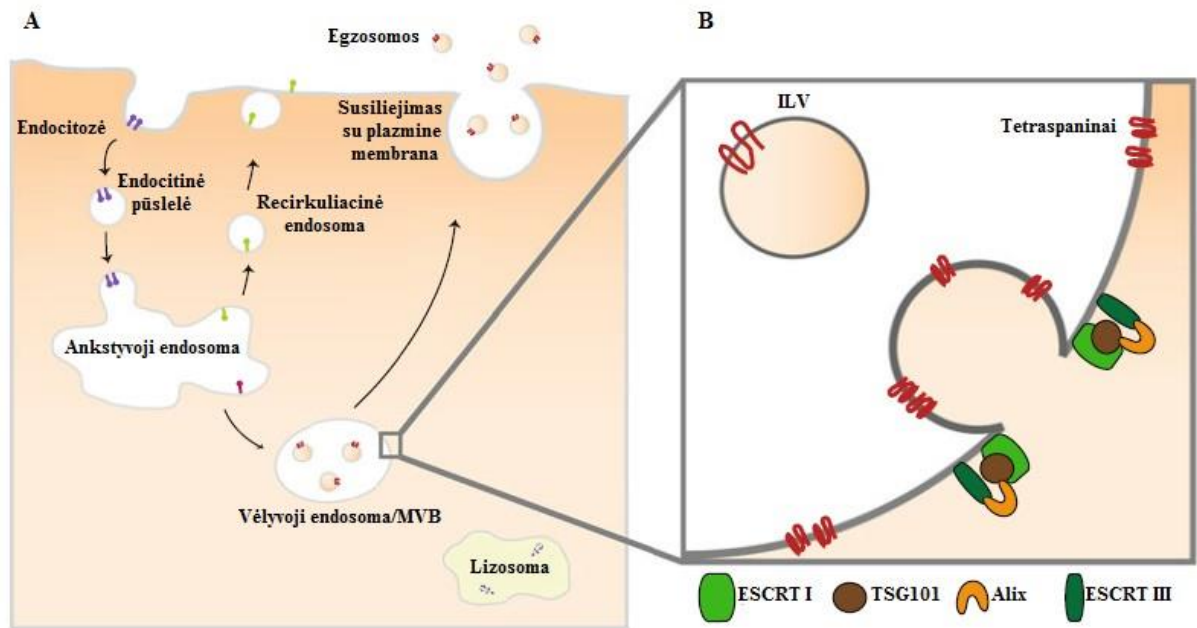
Mažos vezikulės, susidarančios apoptuojant ląstelei priskiriamos apoptotiniams kūneliams (AK). Ląstelei žūstant programuota mirtimi, branduolio DNR sutrūkinėja ir kondensuojasi, pati ląstelė ir jos organelės susitraukia, išyra citoskeleto tinklas⁴⁰. Visus minėtus procesus daugiausia inicijuoja kaspazė-3, kuri yra svarbiausias veiksnys ir ląstelės turinio reorganizacijai į AK⁴¹. Savo paviršiuje AK turi molekules, kurias atpažįsta fagocituojančios ląstelės: makrofagai, parenchiminės ir neoplastinės ląstelės⁴⁰. Pagrindiniai AK paviršiaus žymenys yra FS, aneksinas V, trombospodinas, komplemento baltymu 3b, tuo tarpu viduje randamos organelės, DNR ir histonai³⁸.

Egzosomas pirmą kartą 1983 metais lygiagrečiai atrado dvi nepriklausomos tyrėjų grupės. Tą pačią savaitę pasirodę straipsniai skelbė, jog ~50 nm pūslelės atsiskiria nuo bręstančių retikulocitų pašalindamos ląstelei nereikalingus transferino receptorius⁴². Tik po kelių metų naujai identifikuotas pūsleles, Rose Johnstone pavadino egzosomomis.

Egzosomų biogenezę prasideda endocitoze, kurios metu įlinkstantis PM segmentas formuoja viduląstelinę pūslelę – ankstyvąją endosomą, pripildytą ekstraląstelinio skysčio. Ankstyvoji endosoma yra orientuota netoli ląstelės membranos ir gali būti arba nukreipta atgal bei su ja susiliesti, arba vystytis į vėlyvąją endosomą, dar vadinamą daugiavezikuliniu kūneliu (DVB)⁴³. DVB sudaro vėlyvosios endosomos lipidinis bisluoksnis ir nuo jo į vidų atsipumpuravusios membraninės pūslelės, žinomos kaip intraluminės vezikulės (ILV)⁴⁴. ILV gaubia ląstelės citozolio fragmentus kartu su jame tarpstančiais baltymais, lipidais ir RNR (**3 pav. A**).

ILV nėra vienalytės. Jos skiriasi dydžiu bei lipidine membranos sudėtimi^{45,46}. Tikėtina, kad ILV heterogeniškumą lemia vystymosi kelias. Iki šiol yra žinomi trys skirtingi ILV formacijos keliai, kurie susiję su transportiniu endosominio sortingo kompleksu (ESCRT), tetraspaninų mikrodomenais ir ceramido lemiamą mikrodomenų segregacija.

Pirmiausia su ILV vystymusi buvo susietas ESCRT⁴⁷. ESCRT – tai didelis molekulinis variklis, sudarytas iš mažesnių baltymų kompleksų: ESCRT-0, ESCRT-1, ESCRT-2, ESCRT-3 ir Vps4⁴⁸. ESCRT sudaro ESCRT I ir ESCRT II – reikalingi membranos segmento išlinkimui ir ESCRT III – reikalingas ILV atsiskyrimui nuo membranos. ESCRT III yra sujungti su ESCRT I ir su ESCRT II per Alix baltymą (**3 pav. B**). Šis kompleksas daugiausiai atsakingas už ubikvitilintų baltymų prijungimą⁴⁹.



3 pav. Egzosomų susidarymas ir sekrecija³⁸

Nors ESCRT molekulinis variklis laikomas pagrindiniu ILV susidarymo veiksnio, įrodyta, kad egzosomos gali formuotis ir nuo ESCRT nepriklausomais keliais⁵⁰. Lipidinių plaustų ir tetraspaninų sankaupų sąlygoti ILV susidarymo keliai priskiriami nuo ESCRT nepriklausomų kelių kategorijai.

Lipidų plaustus sudaro glikosfingolipidai ir baltymų receptoriai, suskirstyti į vadinamuosius glikoproteinų mikrodomenus. Manoma, kad jie svarbūs ILV susidarymui⁵¹. Lipidinių plaustų komponentą ceramidą sfingomielino sintazė verčia į sfingomieliną. Pastarąjį sfingomielino kinazė metabolizuoja iki sfingozino 1 fosfato, kuris prisijungia prie su slopinančiu G baltymu (Gi, angl. inhibitory G protein) susijusio receptoriaus. Dėl šios sąveikos disocijuoja Gi subvienetai Gai ir βγ bei pagaminama ATP energija, reikalinga ILV susidarymui^{52,53}.

Kiti, vadinamieji tetraspaniniais praturtinti mikrodomenai (TPM) yra susiję su baltymų nukreipimu į ILV ir endosomos membranos įlinkimu (**3 pav. B**). Pagrindiniai, su baltymų nukreipimu į egzosomas siejami tetraspaninai yra CD82, CD63, CD9, CD81, CD37 ir CD53.

Kiekvieno tetraspanino funkcija pagrindinai siejama su tam tikrų baltymų nukreipimu ir skiriasi priklausomai nuo ląstelių rūšies⁵⁴.

Egzosomos išsekretuojamos į ekstraląstelinę erdmę po MVB susiliejo su plazmine ląstelės membrana. Rab GTPazės yra žinomos kaip už membraninį transportą atsakingi veiksniai. Manoma, kad kelios jų – Rab11, Rab35, Rab27a, Rab27b, Rab7 – yra susijusios ir su egzosomų

atpalaidavimu į ląstelės išorę. Rab GTPazės dalyvauja šiame procese nuo kalcio priklausomame kelyje⁵⁵. Padidėjusi Rab GTPazių ekspresija ir viduląstelinio Ca²⁺ kiekis, skatina MVB susiliejimą su plazmine membrana ir, tuo pačiu, egzosomų sekreciją.

Egzosomos yra svarbus tarpląstelinės sąveikos įrankis – donorinėje ląstelėje esančios baltymų, RNR ir kitos molekulės yra nukreipiamos į sekrecines pūsleles, pastarosios išskiriamos į tarpląstelinę ertmę ir yra perduodamos kitoms ląstelėms parakrininiu arba endokrininiu keliu. Parakrininiu keliu egzosoma veikia netoliese esančias ląsteles. Endokriniškai egzosoma gali numigruoti didelius atstumus per organizmo cirkuliaciją ir patekti į kitus audinius ir organus⁵⁶.

Manoma, kad egzosomos į recipientinę ląstelę patenka ne spontaniškai, bet yra specifiskai nukreipiamos.

Į recipientinę ląstelę egzosoma gali patekti endocitozės būdu arba tiesiogiai su ja susiliejant. Susiliejant egzosomos tiesiogiai patenka į recipientinę ląstelę pernešdama baltymus, RNR ir signalines molekules. Egzosomų endocitozė gali vykti skirtingais būdais (nuo klatrino priklausoma endocitoze, nuo caveolino priklausoma endocitoze, nuo lipidinių plaustų priklausoma endocitoze, makropinocitoze, fagocitoze) ir tai gali priklausyti nuo endocituojančios ląstelės tipo bei jos fiziologinės būsenos⁵⁷. Egzosomų molekulės, tokios kaip transferino receptoriai, TNFR, MFG-E8, integrinai ir tetraspaninai taip pat gali afiniškai susijungti su ląstelės – taikinio arba ekstraląstelinio matrikso ligandais ir inicijuoti viduląstelinius signalinius kelius.

Lipidinis bisluoksnis su membraniniais ir transmembraniniais baltymais apgaubia egzosomų turinį – viduląstelinius baltymus ir RNR. Egzosomose gali būti randama didelė įvairovė baltymų bei skirtingų tipų RNR ir daugelis jų yra būdingi visoms egzosomoms, nepriklausomai nuo to, iš kokių ląstelių jos buvo išsekretuotos (**4 pav**).

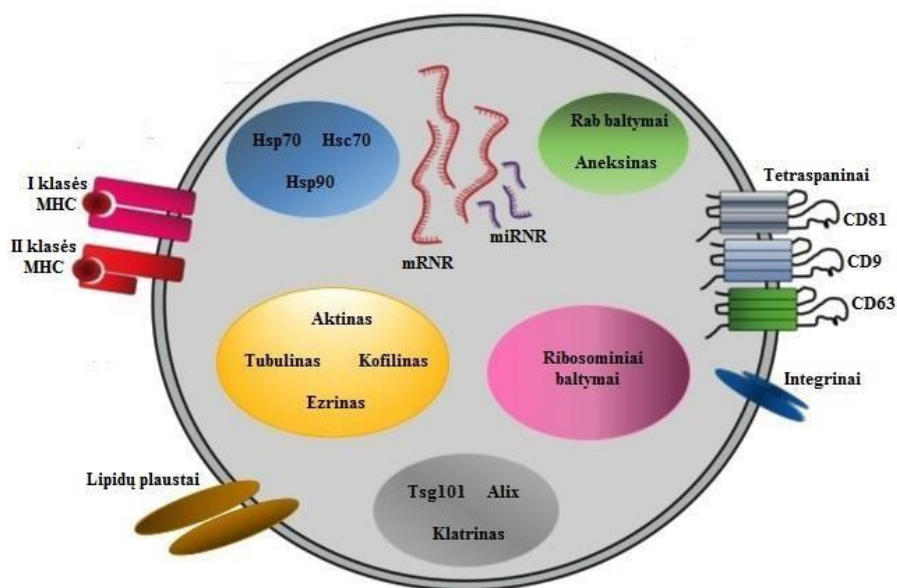
Dažniausiai eukariotų egzosomose aptinkami lipidai yra fosfatidilcholinai, fosfatidiletanolaminai, sfingomielinai, fosfatidilinozitolis, cholesterolis, lizofosfatidilcholinai, fosfatidinė rūgštis, ceramidai ir FS^{58,59}. Daugelis jų sudaro lipidinius plaustus ir yra svarbus membranos išlinkimui susidarant endosomai ir ILV⁶⁰.

Yra žinoma apie 4400 egzosominių baltymų, iš kurių pastovūs yra membraniniai baltymai – tetraspaninai (CD9, CD63, CD81, CD82, CD151) ir integrinai, kurie tarnauja kaip adhezijos molekulės. Visos egzosomos taip pat turi karščio šoko baltymų (Hsc70, Hsc90), reikalingų baltymų sulankstymui ir antigeninio peptido surišimui. ESCRT molekulinio variklio baltymai (Alix, TSG101) yra laikomi egzosomoms būdingais žymenimis. Taip pat visos egzosomos turi

цитоскелето baltymų (aktino, kofilino, tubulino, miozino) ir su membranos susiliejimu susijusių baltymų (aneksinų I, II, IV, V, VI, Rab5, Rab7, Rabp1B, RabGDI)⁶¹. Rab5, kaip ir Alix bei TSG101, tarnauja kaip egzomosų atpažinimo molekulės. Egzomos turi ir specifinių baltymų, kurie priklauso nuo ląstelės tipo ir būsenos.

Visuminė RNR analizė rodo, kad egzomose aptinkamos daugelio tipų RNR, įskaitant koduojančias ir nekoduojančias RNR. Didžiausią dalį visų RNR egzomose sudaro mikroRNR (miRNR, ~67 procentus). Įdomu, kad skirtingų tipų ląstelių egzomose randamų miRNR sąstatas labai panašus. Išanalizavus egzomų miRNR iš skirtingų šaltinių, daugelis jų sutapo^{62,63,64}, pavyzdžiui, miR125b, miR99a, miR100, miR92 ir kt.

Egzomų lipidomo, proteomos ir transkriptomo duomenis galima rasti integruotoje duomenų bazėje ExoCarta⁶⁵.



4 pav. Antigeną pateikiančios ląstelės egzomos sudėtis⁶¹

Egzomas sekretuoja prokariotiniai ir eukariotiniai organizmai. Dėl šios priežasties jos aptinkamos jūros ir gėlame vandenyje, dirvožemyje, ore, dulkėse⁶⁶, fermentuotose maisto produktuose⁶⁷. Egzomos gali būti išskirtos iš visų biologinių skysčių: CSF, nosies gleivinės sekreto, kraujo, šlapimo, pieno, seilių ir kt⁵⁶. Tam tikras kūno skystis bus praturtintas konkrečių ląstelių egzomomis, pavyzdžiui, tulžyje egzomas sekretuoja kepenų ir tulžies pūslės ląstelės,

sinoviniame skystyje – makrofagai ir t.t. Egzosomų sudėtis kinta priklausomai nuo fiziologinės ląstelės būsenos, todėl biologinio skysčio egzosomų sudėtis gali įspėti apie ląstelės pakitimus ligos atveju.

1.6. Egzosomų neuroprotekcinis poveikis

Egzosomų sudėtis priklauso nuo ląstelės tipo ir jos fiziologinės būsenos. Dėl to CNS vykstančiuose procesuose egzosomos gali tarpininkauti kaip promotoriai arba slopikliai. Atlikti tyrimai rodo, kad MKL, dendritinių ląstelių ir indukuotų pluripotentinių ląstelių sekretuojamos egzosomos galėtų būti sėkmingai panaudojamos kaip neurouždegimą slopinantys ir neuronų atsinaujinimą skatinantys veiksniai⁶. Tuo tarpu, egzosomos, kurias sekretuoja neurodegeneracinių ligų pažeistos CNS ląstelės, prisideda prie ligos plitimo parakrininiu būdu pernešdamos žalingus, ligą lemiančius veiksnius. Kadangi egzosomų sudėtis pakinta tam tikros ligos atveju, jas galima panaudoti kaip diagnostinį žymenį.

Egzosomos išskirtos iš MKL pasižymi daugeliu tų pačių savybių kaip ir pačios MKL: perneša uždegimą mažinančius citokinus, augimo faktorius, reguliuoja imuninį atsaką, skatina audinių vystymąsi ir regeneraciją. Be to, egzosomos pasižymi tinkamu profiliu medicininiam taikymui – yra netoksiškos, stabilios, susijusios su daugeliu biologinių procesų. Dėl šių priežasčių MKL gali būti pakeistos egzosomis ir taikomos gydymui, taip išvengiant imuninės atmetimo reakcijos ir kitos su ląsteline terapija susijusios rizikos⁶⁸.

Be to, smegenys nuo periferinės kraujotakos apsaugoti selektyviu hematoencefaliniu barjeru, todėl daugelis vaistų negali jo pereiti. Nors egzosomų migracijos į smegenis mechanizmas nėra žinomas, įrodyta, kad jos gali pereiti hematoencefalinį barjerą po intraveninio pristatymo arba per kvėpavimo takų gleivinę⁶⁹. Tai paskatino tyrėjus vystyti naujos kartos neuroprotekcinės priemonės egzosomų pagrindu.

MKL egzosomos yra specifinės ir gali būti atskirtos nuo kitų ląstelių egzosomų. Nustatyti MKL egzosomų paviršiaus žymenys yra adhezijos molekulės – CD29, CD44, CD73, CD90³². Daugelis MKL egzosomų mažoji RNR (miRNR) yra pre-RNR formoje. Viena svarbiausių yra miR-133b⁶⁸. Nustatyta, kad šią miRNR pernešančios MKL egzosomos paskatina neuronų ir astrocitų regeneraciją.

Daugelis su tyrimų, atliktų su MKL egzozomomis įrodė jų neuroprotekcinį poveikį. Vieno iš tyrimų metu nustatyta, kad DPKL sekretuojami neurotrofiniai veiksniai padidina trišakio nervo ir stuburo smegenų neuronų išgyvenamumą⁷⁰. Identifikuoti neurotrofiniai faktoriai NGF, GDNF, BDNF daugiausia yra mRNR pavidalo. Toliau DPKL terapinės savybės įrodytos tiriant dopaminerginius neuronus apoptuojančius dėl 6-OHDA poveikio⁷¹. Tyrėjai atkreipia dėmesį, kad DPKL sekreciniai veiksniai teigiamai veikia ne specifiskai – jie pagerino tiek trišakio nervo, tiek stuburo smegenų neuronų, taip pat dopaminerginių neuronų išgyvenamumą.

Kita tyrėjų grupė 6-OHDA veiktus dopaminerginius neuronus inkubavo su DPKL mikrovezikulėmis ir egzozomomis. Nurodyta, kad tik egzozomos reikšmingai sumažino apoptuojančių neuronų kiekį. Svarbu pastebėti, kad šio tyrimo metu tik 3D ląstelių kultūrų egzozomos turėjo terapinį poveikį, kai, tuo tarpu, 2D kultūrų egzozomos neuronų apoptozės nesustabdė. Tai rodo, kad egzozomų sudėtis priklauso nuo ląstelių auginimo sąlygų.

Kuriant efektyvesnes terapines priemones, svarbu, kad be visų natūraliai esamų biologiškai aktyvių molekulių, egzozomos gali būti pakrautos įvairiomis medžiagomis, pažymėtos paviršiaus ligandais ir/ar receptoriais, kreipiančiais egzozomas į ląstelę taikinį. Keletas tokių eksperimentų in vivo parodė, kad egzozomos gali slopinti mikroglijos aktyvaciją uždegimo metu. Eksperimentiniai LPS sukulto neurouždegimo, autoimuninio encefalito ir glioblastomos modeliai pademonstravo kurkuminu ir STAT3 slopikliais įkapsuliuotų egzozomų terapinį poveikį, pasireiškiantį mikroglijos ląstelių sumažėjimu ir susilpnėjusiomis autoimuninėmis reakcijomis. To pačio eksperimento metu parodyta, kad egzozomos intranazaliniu būdu greitai patenka į smegenis ir sąveikauja tiek su aktyvios būsenos, tiek su ramybės būsenos mikroglija⁶⁹.

Kiti tyrėjai naudojo egzozomas įkapsuliuotas katalaze – fermentu skaidančiu vandenilio peroksidą. Gauti rezultatai rodo, kad egzozomos sumažino aktyvuotų makrofagų ROS kiekį. Šis tyrimas įspėja, kad egzozomos panašiai gali veikti ir mikrogliją neurouždegimo metu. Tą patvirtino kita eksperimento dalis, kai pelėse veiktose 6-OHDA, katalaze modifikuotos egzozomos sumažino mikroglijos ląstelių ir apoptuojančių dopaminerginių neuronų kiekį¹⁷.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir aparatūra

2.1.1. Ląstelės

- Imortalizuota žmogaus mikroglijos ląstelių linija SV40 (*Applied Biological Materials*);
- 6 metų amžiaus vaiko pieninio danties pulpos kamieninės ląstelės (PDPKL; bioetikos leidimas: Nr. 6B-08-173);
- Žmogaus nervinių kamieninių ląstelių linija ReNcell VM (*EMD Millipore*).

2.1.2. medžiagos

Ląstelių kultivavimui:

- FBS (angl. *fetal bovine serum*, „Thermo Fisher“;
- penicilinas–streptomocinas („*Biological Industries*“);
- DMEM (angl. *dulbecco 's modified eagle 's medium*, „*Life technologies*“); □ kolagenas („*Life technologies*“);
- tripsinas–EDTA 0,25 % (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid* „*Life technologies*“);
- plastikiniai auginimo flakonai („*TPP*“);
- GEM (angl. *global eukaryotic microcarriers*, „*Global Cell Solutions*“);
- mėgintuvėliai *LeviTubes* („*Global Cell Solutions*“);
- plastikiniai mėgintuvėliai („*TPP*“)
- magnetas *BioMagnet 3D Cell Culture Validated* („*Global Cell Solutions*“);
- amfotericinas B („*Biological Industries*“)
- FVS („*Hyclone*“);
- kolagenazės („*Biochrom*“);
- *Neurobasal* terpė („*Life Technologies*“);
- B27 („*Life Technologies*“);
- FGF-2 („*Life Technologies*“);
- EGF („*Life Technologies*“);
- akutazės tirpalas *StemPro Accutase* („*Gibco*“);
- ECL (angl. *enhanced chemiluminescence*) reagentų rinkinys („*Pierce*“);
- lėkštelės su šulinėliais („*TPP*“).

Imunoblotui:

- polivinildifluorido membranos *Trans-Blot Turbo Transfer Pack* („*BIO-RAD*“);
- poliakrilamido geliai („*BIO-RAD*“);
- PBS (angl. *phosphate buffered saline*, „*Biochrom*“);
- tween20 („*BIO-RAD*“);

- albuminas pH 7,0 („Applichem“);
- baltymų žymuo *PageRuler Prestained Protein Ladder* („Thermo Fisher“);
- benzonazė („Merck“);
- krienų peroksidaze („Pierce“);
- antikūnai („Cell Signaling“)

Kitos medžiagos:

- proteazių inhibitorių mišinys („SIGMA“);
- proteazių mišinys *Complete* („Roche“)
- *Petri* lėkštelėje („TPP“);
- 5(6)-TAMRA dažo („Thermo Fisher“);
- silikono insertai („Ibidi“); □ kalceinas („Thermo fisher“);
- GM-CSF (angl. *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*); □ M-CSF (angl. *Macrophage-colony stimulating factor*);
- LPS („Sigma–Aldrich“).

Rinkiniai:

- RNR išskyrimo rinkinys *miRNeasy Mini kit* („Qiagen“);
- Kopijinės DNR sintezės rinkinys *Maxima First strand cDNA synthesis Kit* („Thermo Fisher“);
- TL–PGR reakcijos rinkinys *Maxima SYBR Green qPCR master mix* („Thermo Fisher“);
- miRNR TL–PGR rinkinys *TaqMan Advanced MicroRNA Assay* („Applied Biosystems“);
□ miRNR TL–PGR rinkinys *TaqMan Fast Advanced Master Mix* („Applied Biosystems“).

2.1.3. Aparatūra

- inkubatorius („BINDER“);
- bioreaktorius („Hamilton“);
- centrifūga („Sigma“); □ šildoma vonelė („BIOSAN“);
- optinis mikroskopas („NIKON“);
- forezės aparatas Mini–PROTEAN 3 („BIO–RAD“);
- baltymų pernešimo aparatas *Trans – Blot Turbo* („BIO–RAD“);
- imunobloto vaizdinimo aparatas *ChemiDoc MP Imaging System* („BIO–RAD“);
- orbitalinė maišyklė *Rocher–Shaher* („BIOSAN“);
- ultracentrifūga *Sorvall LYNX 6000* („Thermo Fisher“);
- TL–PGR aparatas *CFX96 Real-Time System* („BIO–RAD“)
- termocikleris *Combi–Spin FVL 2400* („BIO–SAN“);
- konfokalinis mikroskopas *Leica SP8* („Leica Microsystems“)
- nanodalelių analizės aparatas *Nanosight LM10*;
- spektrofotometru *NanoPhotometer* („Implen“)

2.2. Metodai

2.2.1. Mikroglijos ląstelių kultivavimas ir aktyvacija

Prieš naudojimą mikroglijos auginimo terpė DMEM su 10% fetalinio jaučio serumo ir antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu centrifuguojama 100 000 g santykinė išcentrinė jėga 6 val. 4 °C temperatūroje (pašalinamos egzomos) ir filtruojama per 0,22 µm filtrą.

Mikroglijos ląstelės suspenduojamos 37 °C auginimo terpėje DMEM su 10 % fetalinio jaučio serumo ir antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu ir užsėjamos kolagenu dengtuose 25 cm² plastikiniuose flakonuose. Ląstelės auginamos inkubatoriuje, 37°C temperatūroje, drėgnoje, 5 % CO₂ atmosferoje. Terpė keičiama du kartus per savaitę. Ląstelėms pasiekus ~80 % konfluenciją, jos persėjamos. Prieš persėjimą auginimo terpė nusiurbima, ląsteles plaunamos 37°C PBS tirpalu, užpilamos 0,05 % tripsino-0,02 % EDTA tirpalu ir inkubuojamos ~3 min. 37 °C inkubatoriuje. Ląstelėms atkibus nuo flakono dugno, tripsino neutralizavimui užpilamas trigubas tūris 37 °C auginimo terpės su serumu. Ląstelių suspensija centrifuguojama 362 g santykinė išcentrinė jėga 3 min. kambario temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 37 °C auginimo terpėje ir išpilstomos į naujus flakonus.

Prieš poliarizaciją mikroglijos ląstelės persėjamos į kolagenu dengtas 24 šulinėlių lėkšteles, 100 000 ląstelių/ml tankumu (ląstelių skaičius nustatytas panaudojant ląstelių skaičiavimo kamerą) ir auginamos 4-5 d. inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje, drėgnoje, 5 % CO₂ atmosferoje.

M1 poliarizacija. Į mikroglijos ląstelių kultūrą pridedama 5 ng/ml GM-CSF ir inkubuojama 48 val. Po inkubacijos nuo ląstelių kultūros susiurbima pusė terpės, pakeičiama šviežia terpe su 5 ng/ml GM-CSF ir inkubuojama 72 val. Toliau į ląstelių kultūrą pridedama 20 ng/ml INF-γ ir inkubuojama 1 val. Po inkubacijos pridedama 100 ng/ml LPS ir inkubuojama dar 48 val.

M2 poliarizacija. Į mikroglijos ląstelių kultūrą pridedama 25 ng/ml M-CSF ir inkubuojama 48 val. Po inkubacijos nuo ląstelių kultūros susiurbima pusė terpės, pakeičiama šviežia terpe su 25 ng/ml M-CSF ir inkubuojama 72 val. Toliau į ląstelių kultūrą pridedama 20 ng/ml IL-4, 20 ng/ml IL-13 ir inkubuojama 24 val. Po inkubacijos pridedamas tas pats kiekis IL-4, IL-13 ir inkubuojama dar 24 val.

M0 mikroglija. Dalis mikroglijos ląstelių nepoliarizuojama, tačiau jos auginamos tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir poliarizuojamos ląstelės kolagenu dengtuose 24 šulinėlių lėkštelėse.

2.2.2. Žmogaus pieninio danties pulpos ląstelių išskyrimas ir kultivavimas

Prieš naudojimą ląstelių auginimo terpė DMEM su 10% fetalinio jaučio serumo ir antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu centrifuguojama 100 000 g santykinė išcentrinė jėga 6 val. 4 °C temperatūroje (pašalinamos egzomosos) ir filtruojama per 0,22 µm filtrą.

Po iškritimo pieninis dantis laikomas 4°C temperatūroje auginimo terpėje su antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu ne ilgiau nei 24 val. Prieš MKL išskyrimą pieninis dantis tris kartus plaunamas steriliu PBS tirpalu su antibiotikais: 200 VV/ml penicilinu, 200 µg/ml streptomycinu ir 2,5 µg/ml amfotericinu B.

Danties pulpa iš pulpos kameros pašalinama mechaniškai, naudojant sterilią adatą. Pulpos audinys susmulkinamas mechaniškai, suspenduojamas 3 U/ml I tipo kolagenazės tirpale ir 30 min. inkubuojamas inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje. Suspensija skiedžiama 1:10 santykiu auginimo terpėje ir centrifuguojama 250 g santykinė išcentrinė jėga, 15 min. kambario temperatūroje.

Pašalinus supernatantą, nuosėdų frakcija suspenduojama su 5 ml auginimo terpės DMEM su 10 % FVS , 2 mM glutamino, 1mM natrio pirofosfato, 1 g/l gliukozės ir antibiotikais: 100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino bei išsėta į 25 cm² flakoną. Kitą dieną sena terpė pašalinama, ląstelės plaunamos 37 °C DMEM terpe ir auginamos DMEM terpėje su 10 % FVS ir antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu. Ląstelės kultivuojamos inkubatoriuje su 5 % CO₂, 37 °C temperatūroje.

Kas 3–4 dienas nuo ląstelių surenkami supernatantai egzosomų skyrimui. Ląstelėms pasiekus apie 80 % konfluenciją, jos persėjamos. Prieš persėjimą auginimo terpė nusiurbima, ląsteles plaunamos PBS tirpalu, užpilamos 0,05 % tripsino–0,02 % EDTA tirpalu ir inkubuojamos ~2 min. inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje. Ląstelėms atkibus nuo flakono dugno, užpilamas trigubas tūris auginimo terpės su serumu neutrazituoti tripsiną. Ląstelių suspensija centrifuguojama 500 g santykinė išcentrinė jėga 5 min, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos auginimo terpėje ir išpilstomos į naujus flakonus.

Dalis ląstelių auginamos 3D sąlygomis. Tokiu atveju ląstelės perkeliama ant kultivavimui naudojamų bioreaktorių *BioLevigator*. Bioreaktoriuje ląstelės auginamos *LeviTube* mėgintuvėliuose, ant lamininu dengtų alginato mikronešiklių GEM.

Prieš naudojimą, mėgintuvėlyje esantys mikronešikliai GEM du kartus plaunami DMEM terpe be priedų, terpė pašalinama mėgintuvėlį laikant ant magneto. Plovimas kartojamas du kartus. Į *LeviTube* mėgintuvėlį įpilama 900 µl auginimo terpės ir 300 µl paruoštų GEM. Į tą patį

mėgintuvėlį įpilama 1,8 ml ląstelių suspensijos, kurioje yra 8×10^5 ląstelių (ląstelių skaičius nustatytas panaudojant ląstelių skaičiavimo kamerą).

Pasirenkama eksperimento programa „*Inoculation*“ ir mėgintuvėlis su ląstelėmis įdedamas į bioreaktorių. Po 4 val. į mėgintuvėlį įpilama 18 ml auginimo terpės. Pakeičiama eksperimento programa „*Culture*“.

Kas 3–4 dienas nuo PDPKL kultūrų, auginamų ant mikronešiklių GEM, surenkami supernatantai (po ~15 ml iš kiekvieno *LeviTube* mėgintuvėlio) egzosomų skyrimui, patalpinus mėgintuvėlį ant magneto.

2.2.3. Žmogaus nervinių kamieninių ląstelių ReNcell VM kultivavimas ir apoptotinių kūnelių generavimas

ReNcell VM yra komercinė imortalizuotų žmogaus nervinių pirmtakų ląstelių linija, galinti diferencijuoti į neuronus ir glijos ląsteles. *ReNcell VM* ląstelės buvo imortalizuotos retrovirusinės transdukcijos būdu, panaudojant *v-myc* onkogeną. Ši linija auga sudarydama monosluoksnius ant indų, kurių paviršius dengtas 20 µg/ml lamininu.

Ląstelės išsėjamos ant iš anksto paruoštų flakonų (mažiausiai 4 val. inkubuotų 20 µg/ml laminino–*Neurobasal* terpės tirpale) *Neurobasal* terpėje su 1/50 B27, 2 mM gliutaminu, antibiotikais, 20 ng/ml FGF-2 ir 20 ng/ml EGF. Terpė buvo keičiama du kartus per savaitę.

Ląstelės buvo persėjamos jų atkabinimui nuo plastiko paviršiaus panaudojant akutazės tirpalą.

Generuojant AK *ReNcell VM* ląstelės buvo atkabintos nuo substrato inkubuojant su akutazės tirpalu 37 °C temperatūroje, 5 min. Ląstelių suspensija perkelta į *Neurobasal* terpę (be priedų) ir *Petri* lėkštelėje veikta UV šviesa 20 min. Susiformavę AK plauti kambario temperatūros PBS tirpalu ir centrifuguoti 2000 g santykinę išcentrinę jėgą, 7 min. Gautos nuosėdos suspenduojamos 5 ml kambario temperatūros PBS tirpale, į suspensiją įdedama 5 µl sta 5(6)-TAMRA dažo, sumaišoma ir inkubuojama 15 min. tamsoje, 37 °C temperatūroje. Nudažyti AK 3 kartus plaunami 4 °C 40 ml PBS tirpalu ir centrifuguojami 2000 g santykinę išcentrinę jėgą, 7 min. Nuosėdos suspenduojamos 1 ml DMEM tirpale su 10 % FVS (be egzosomų). AK skaičius nustatytas panaudojant ląstelių skaičiavimo kamerą.

2.2.4. Egzosomų išskyrimas diferencinio ultracentrifugavimo metodu iš PDPKL

Egzomos iš PDPKL ląstelių supernatantų buvo išskiriamos diferencinio centrifugavimo būdu. Ląstelių supernatantai centrifuguojami 300 g santykinė išcentrinė jėga, 10 min, 4°C temperatūroje (pašalinamos negyvos ląstelės). Gautas supernatantas centrifuguojamas 2000 g santykinė išcentrinė jėga, 10 min, 4°C temperatūroje (pašalinamos ląstelių nuolaužos). Tada supernatantas centrifuguojamas 20 000 g santykinė išcentrinė jėga, 30 min, 4°C (pašalinama mikrovezikulių frakcija). Supernatantas surenkamas ir ultracentrifuguojamas 100 000 g santykinė išcentrinė jėga, 70 min, 4°C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o gautos nuosėdos suspenduojamos 1000 µl PBS tirpale, papildomai užpilamos 4°C PBS tirpalu iki mėgintuvėlio viršaus ir vėl ultracentrifuguojamos 100 000 g santykinė išcentrinė jėga, 70 min, 4°C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o egzomosos suspenduojamos 80 µl PBS tirpale ir laikomos -70 °C temperatūroje.

2.2.5. Egzosomų dozavimas

Eksperimentams naudojamos egzomosų dozės buvo nustatomos naudojant veikimo vienetus (VV). 1 VV – egzomosos išskirtos iš supernatanto, kuris buvo surinktas nuo 2D sąlygomis kultivuotų PDPKL ląstelių (atitinkančių subkonfluenciją/konfluenciją 37.5 cm² kultivavimo indo plote) ir atitinkamai nuo 3D sąlygomis augintų ląstelių (50 ml mėgintuvelyje).

2.2.6. Mikroglijos ląstelių inkubacija su egzosomomis

Po poliarizacijos (M0, M1 ir M2) į mikroglijos kultūras pridedama po 1 VV egzomosomų vienam šulinėliui. Inkubacija vykdoma 6 valandas. Lygiagrečiai kontroliniai mikroglijos mėginiai inkubuojami su PBS tirpalu. Po inkubacijos ląstelės lizuojamos, skiriama RNR ir baltymai.

2.2.7. Nanodalelių analizė

Egzomosų mėginiams buvo atliekama nanodalelių analizė (NTA, angl. *nanoparticle tracking analysis*) aparatu *Nanosight LM10* (Jungtinis gyvybės mokslų centras, Eukariotų genų inžinerijos laboratorija).

2.2.8. Mikroglijos migracijos tyrimas

Prieš migracijos aktyvumo tyrimą, į 50 µg/ml kolagenu dengtose 24 šulinėlių lėkštelese pritvirtinami silikoniniai insertai su dviem kameromis. Į kiekvieną šulinėlį sėjama po 10 000 M0, M1, M2 mikroglijos ląstelių (po 5000 į vieną kamerą) ir auginama 1 d. inkubatoriuje, 37°C temperatūroje, drėgnoje, 5% CO₂ atmosferoje. Į dalį šulinėlių pridedama 1VV egzosomų, į kontrolinius šulinėlius dedamas atitinkamas kiekis PBS tirpalo.

Ląstelių migracija vertinama konfokaliniu mikroskopu. Inserto laukelyje pasirenkamas 1000 µm x 500 µm dydžio langelis. Migracija stebima 24 val., fiksuojant kadrus kas 6 min. Kas 2 val. skaičiuojamos į langelio zoną numigravusios ląstelės. Skaičiavimai atliekami trijuose regėjimo laukeliuose.

2.3.9. Mikroglijos fagocitinis aktyvumas

Prieš fagocitinio aktyvumo tyrimą, M0, M1, M2 mikroglijos ląstelės persėjamos į kolagenu dengtas 24 šulinėlių lėkštes, po 10 000 ląstelių viename šulinėlyje ir auginamos 1 d. inkubatoriuje, 37°C temperatūroje, drėgnoje, 5% CO₂ atmosferoje. Tada į dalį šulinėlių pridedama 1VV egzosomų ir inkubuojama 6 val, atitinkamai į kontrolinius mėginius pridedama PBS tirpalo. Po inkubacijos ląstelės dažomos kalceinu praskiestu santykiu 1:1000.

AK dažyti TAMRA dažu pridedami į mikroglijos kultūrų šulinėlius santykiu 3:1 ir inkubuojami 2 val. Mikroglijos fagocitinis aktyvumas įvertinamas konfokaliniu mikroskopu. Žalia ir raudona fluorescencija sužadinama skirtingais lazeriais, vykdomas skenavimas Z ašyje. Ląstelės stebimos 2,5 val. fiksuojant kadrus kas 10 min. Fagocitinis aktyvumas (FA) įvertinamas pagal formulę: bent vieną apoptotinę kūnelį fagocitavusios ląstelės/visos ląstelės x 100 %. Skaičiavimai atliekami trijuose regėjimo laukeliuose. AK internalizavimas kiekvienu atveju patvirtinamas tiriant skenavimo metu gautus pjūvius Z ašyje.

2.2.10. RNR išskyrimas

Totalinė ląstelių RNR buvo išskirta naudojant miRNeasy Mini kit rinkinį pagal gamintojo nurodymus. Mikroglijos ląstelės plaunamos 37 °C temperatūroje PBS tirpalu ir lizuojamos auginimo flakone 350 µl Qiazol reagentu /2 cm² flakono paviršiui. Mėginys inkubuojamas 5 min.

kambario temperatūroje. Lizatas perkeliamas į mėgintuvėlį, pridedama 1/5 turio chloroformo. Mėgintuvėliai supurtomi ir inkubuojami 2–3 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 12 000 g santykinė išcentrinė jėga, 10 min., 4 °C temperatūroje. Atskirta vandeninė fazė sumaišoma su etanolio (0,5 ml etanolio/1 ml Qiazol reagento). Supylus į RNeasy mini kolonėlę ir nucentrifugavus 8000 g santykinė išcentrinė jėga 15s, prie membranos prikibusi RNR plaunama RWT ir RPE buferiais ir eliuojama 50 µl vandeniu be RNazių. RNR koncentracija ir grynumas patikrinamas spektrofotometriškai, nustatant 260/280 bangos ilgių santykius.

2.2.11. Kopijinės DNR sintezė ir tikro laiko PGR

Vandenyje ištirpinta RNR (1 µg), po poveikio DNaze, buvo konvertuota į kDNR panaudojant *Maxima First strand cDNA synthesis Kit* pagal gamintojo nurodymus. Bendras reakcijos tūris buvo 35 µl.

Tikro laiko PGR (TL–PGR) reakcija atliekama *Maxima SYBR Green qPCR master mix* pagal gamintojo nurodymus. 25 µl reakcijos tūriui buvo naudojama 0,25 µl kDNR ir 0,2 µM kiekvieno pradmens (**2 lentelė**). Reakcijos vykdoma 10 min. aktyvuojant 95 °C temperatūroje, po to vykdant 40 ciklą po 15s – 95 °C, 30s – 55 °C ir 30s – 72 °C temperatūroje. PGR produkto specifiškumas analizuojamas lydimosi kreivės programa (95 °C temperatūra 30 s ir lydimosi analizė atlikta nuo 55 °C iki 95 °C, keliant temperatūrą kas 0,5 °C per 5 s). kDNR kiekis buvo normalizuotas pagal vienodai ekspresuojamo HPRT (angl. *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*) geno kiekį. Kiekybinė PGR (kPGR) buvo atlikta naudojant *CFX 96 PGR* sistema su *CFX Manager 3.1* programa (*Bio-Rad, Hercules, CA*) programą remiantis $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu. Visi eksperimentai pakartoti tris kartus, duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis.

2 lentelė. TL–PGR pradmenų sekos

#	Genas	Pradmens seka (Fw) 5' – 3'	Pradmens seka (Rev) 5' – 3'
1	ARG1	GAAGTGGACAGACTAGGAATTG	CAGTAGCTGGTGTGAAAGATG
2	CCL2	CCTCCAGCATGAAAGTCTCTG	TCTGCACTGAGATCTTCCTATTG
3	CD11b	GAGTTCAATCCCAGGGAAGTG	GTCACAACACTCTGGATCTGTC
4	iNOS	TACAGCAAGGGCTTCAGG	TCGTACAGGTGCATCGTG
5	CD206	TACAGCAAGGGCTTCAGG	TCGTACAGGTGCATCGTG
6	IFNβ	AGGCTTCTGCATTACCTGAAGG	GGCTAGGCGATCTTCAGTTTCG
7	IL1β	TACAGCAAGGGCTTCAGG	TCGTACAGGTGCATCGTG

8	IL6	GATGCTTCCAATCTGGATTC	CTGGCTTGTTCTCACTAC
9	PRRX1	GAGTGCAGGTGTGGTTTCAG	GAGCAGGACGAGGTACGATG
10	SOCS1	CTTCCTGGTGCGCGACAG	GTAGTGCTCCAGCAGCTC
11	TGFβ	GACATCAAAAGATAACCACTCTG	CGTCTGCTGAGGCTCAAG
12	TNF	CCTGGTATGAGCCCATCTATCTG	TAGTCGGGCCGATTGATCTC
13	TREM2	GAAGGTCCTGGTGGAGGTG	GCATCCTCGAAGCTCTCAG
14	CD14	GAAGACTTATCGACCATGGAG	CTCCACCTCTACTGCAGAC
15	TLR4	CCTGTGCAATTTGACCATTG	AAGCATTCCCACCTTTGTTG
16	TLR2	GGCCAGCAAATTACCTGTGT	TTCTCCACCCAGTAGGCATC
17	VEGFA	TGGATCCATGAACCTTCTGCT	GAATTCACCGCCTCGGCTTGTC
18	HPRT	GGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA	AGGCTCATAGTGCAAATAAACAGT

2.2.12. Mažosios RNR kopijinės DNR sintezė ir TL–PGR

Pradiniam mažosios RNR (miRNR) ekspresijos kiekybiniam įvertinimui TL–PGR metodu naudojamos mikroplokštelės *custom miScript miRNA PCR Array* kartu su *miScript PCR* sistema. Tirtų miRNR sąrašas pateiktas **3 lentelėje**. Normalizavimui naudotas SNORD68 (NR_002450).

Nustačius į poveikį egzosomomis ar į mikroglijos atyvaciją reaguojančias miRNR, vėlesni tyrimai atlikti naudojant *TaqMan Advanced MicroRNA Assay* sistemą. Normalizavimui naudotas stabiliai ekspresuojanti mir-188b-5p miRNR.

3 lentelė. Tirtų miRNR sąrašas

#	Brandžios miRNR ID	miRNR nr. duomenų bazėje	#	Brandžios miRNR ID	miRNR nr. duomenų bazėje
1	hsa-miR-125-5p	MIMAT0000423	13	hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437
2	hsa-miR-124-3p	MIMAT0000422	14	hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255
3	hsa-miR-101-3p	MIMAT0000099	15	hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084
4	hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	16	hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419
5	hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	17	hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086
6	hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	18	hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257
7	hsa-miR-451a	MIMAT0001631	19	hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449
8	hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	20	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784
9	hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	21	hsa-miR-188-5p	MIMAT0000457
10	hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	22	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076
11	hsa-miR-4291	MIMAT0006922	23	hsa-miR-711	MIMAT0012734
12	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	24	hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341

Naudojant *TaqMan Advanced MicroRNA Assay* sistemą reakcijai naudojama 10ng RNR.

kDNR sintezės metu miRNR buvo poliadenilinama, 5' gale prijungtas adaptorius ir nuo modifikuotos RNR atliekama atvirkštinė transkripcija susintetinant kDNR. Po sintezės kDNR amplifikuota. Reakcija buvo vykdoma 10 min. aktyvuojant 95 °C temperatūroje, po to vykdant 14 ciklų po 3 s – 95 °C, 30 s – 60 °C. Paskutinė reakcija vykdoma 10 min., 99 °C temperatūroje. Amplifikuota kDNR buvo naudojama iškart arba laikoma -70°C temperatūroje.

RT–PGR reakcijoms buvo naudojamas *TaqMan Fast Advanced Master Mix*. 20 µl reakcijoje naudota 5 µl amplifikuotos kDNA ir 1 µl *TaqMan Advanced MicroRNA Assay* pradmenų. Polimerazinėje grandininėje reakcijoje po 20 s inkubacijos 95°C temperatūroje buvo vykdomi 40 PGR ciklų: 3 s – 95 °C, 30 s – 60°C.

Kiekybinė TL–PGR buvo atlikta naudojant *CFX 96 PGR* sistema su *CFX Manager 3.1* programa programą remiantis $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu.

2.2.13. Baltymų išskyrimas iš mikroglijos ląstelių

Ląstelės plaunamos šaltu PBS (pH 7,3) tirpalu du kartus ir lizuojamos lizės buferiu (1% NP40, 1% natrio dezoksicholato, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA, 1X proteazių mišiniu *Complete*, 1mM PMSF, 1mM Na3VO4, 5 mM NaF) 30 min., 4 °C temperatūroje. Į gautą lizatą pridedama 2,5 VV/ml benzonazės ir homogenizuojama per 21 G adatą. Centrifuguojama 15 000 g santykinė išcentrinė jėga, 30 min., 4 °C temperatūroje. Supernatantas saugomas -70°C temperatūroje.

2.2.14. Elektroforezė

Į 100 µl baltymų lizatą pilama 12,5 l 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 30 l 10 % SDS, 20 l 0,5 M DTT, 20 l glicerolio ir 5 l 0,5 % bromfenolio mėlio, mėginiai inkubuojami 5 min., 95 °C temperatūroje ir iš karto naudojami elektroforezei arba saugomi -70 °C. SDS/PAGE elektroforezei buvo naudojami 10 % SDS–poliakrilamido geliai, elektroforezės buferis (25 mM bazinio Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS) ir elektroforezės aparatas *Mini Protean*. Elektroforezė srovės stiprumas 30 mA/geliui, laikas 1,5 val.

2.2.15. Baltymų pernešimas ant membranos ir imuninė baltymų analizė

Po SDS/PAGE elektroforezės baltymai buvo pernešami ant *Immobilon* PVDF membranos naudojant pusiau sausos sistemos aparatą *Trans-Blot Turbo*. Baltymų pernešimas vykdomas 3min., srovės stiprumas 1300 mA.

PVDF membranos inkubuojamos blokavimo tirpale (5 % albumino, ištirpinto PBS tirpale, turinčio 0,18 % Tween–20) 1 val. kambario temperatūroje, po to plaunamos su PBS tirpalu, turinčiu 0,18 % Tween-20 (PBS–Tween–20) tris kartus ir inkubuojamos su pirminiais antikūnais (**4 lentelė**) pagal gamintojo nurodymus, per naktį 4 °C temperatūroje ant orbitalinės maišyklės. Po to membranos plaunamos su PBS–Tween-20 tirpalu tris kartus po 5 min. ir inkubuojamos su antriniais antikūnais (**4 lentelė**), konjuguotais su krienų peroksidaze, praskiestais su PBS–Tween–20 tirpalu, 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos membranos buvo plaunamos penkis kartus po 5 min. su PBS–Tween–20 ir analizuojamos naudojant ECL reagentus, pagal gamintojo nurodymus.

4 lentelė. Naudojami antikūnai

#	Antikūnas	Reaguoja su	Izotipas
1	Phospho-Stat1 (Tyr701)	H, M, R	Rabbit
2	Phospho-Stat3 (Tyr705)	H, M, R	Rabbit IgG
3	Phospho-Stat6 (Tyr641)	H	Rabbit
4	Stat1	H, M, R	Rabbit
5	Stat3	H, M, R	Rabbit IgG
6	Stat6	H, M, R	Rabbit IgG
7	Anti-rabbit konjuguotas su krienų peroksidaze	R	Goat

*H, Human; M, mouse; R, Rabbit, IgG, imunoglobulinas G

2.2.16. Statistinė analizė

Šiame darbe aprašyti eksperimentai buvo kartoti tris kartus (jei nepažymėta kitaip). Statistinei analizei dviems grupėms palyginti naudojamas Stjudento t testas. Kelių grupių palyginimams atlikta vieno koeficiento dispersijos analizė (ANOVA). Skirtumai vertinami kaip patikimi, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Įvairūs patogeniniai veiksniai aktyvuoja CNS mikroglijos ląsteles. Didėja uždegiminių (M1 tipo) ląstelių fagocitinis aktyvumas, jos produkuoja uždegiminius citokinus, chemokinus, reaktyvius deguonies radikalus ir kt. Uždegimo slopinimui ir rezoliucijai yra svarbios M2 tipo mikroglijos ląstelės (sekretuoja priešuždegiminius citokinus IL-4, IL-10, IL-13, TGF β).

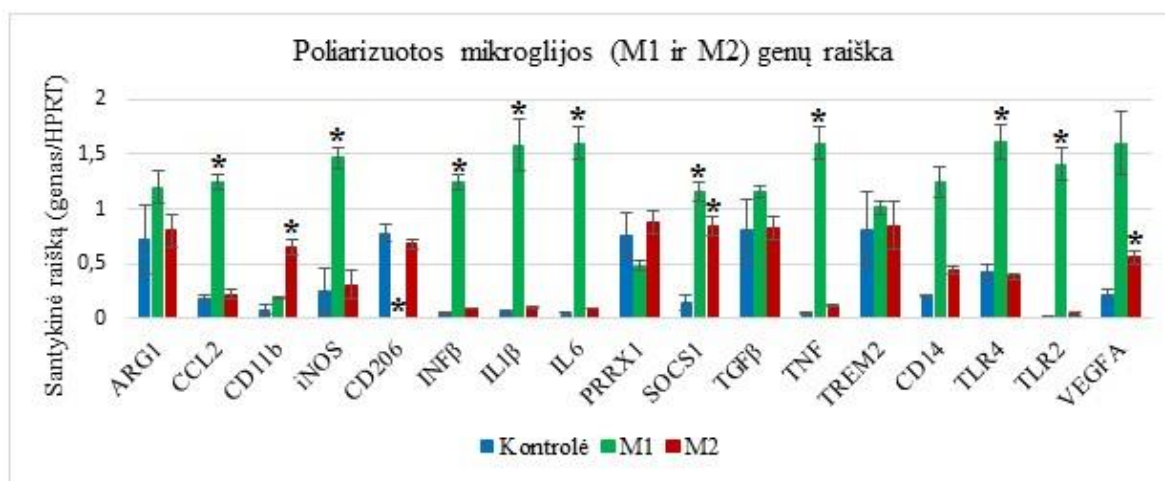
Šiuo metu žmogaus mikroglijos ląstelių *in vitro* eksperimentiniai modeliai dar naudojami labai retai, didžioji darbų dalis yra atliekama su eksperimentinių gyvūnų ląstelėmis. Todėl siekiant įvertinti galimą priešuždegiminį PDPKL sekretuojamų egzosomų poveikį šiame darbe naudojama komercinė žmogaus mikroglijos immortalizuota ląstelių linija.

Šiuo tikslu buvo vertinamas M1 ir M2 mikroglijos atsakas į uždegiminę aktyvaciją ir PDPKL egzosomų poveikį, tiriant būdingus genus, miRNR, baltymų ekspresiją ir fagocitinį bei migracinį aktyvumą.

3.1. Mikroglijos uždegiminė aktyvacija

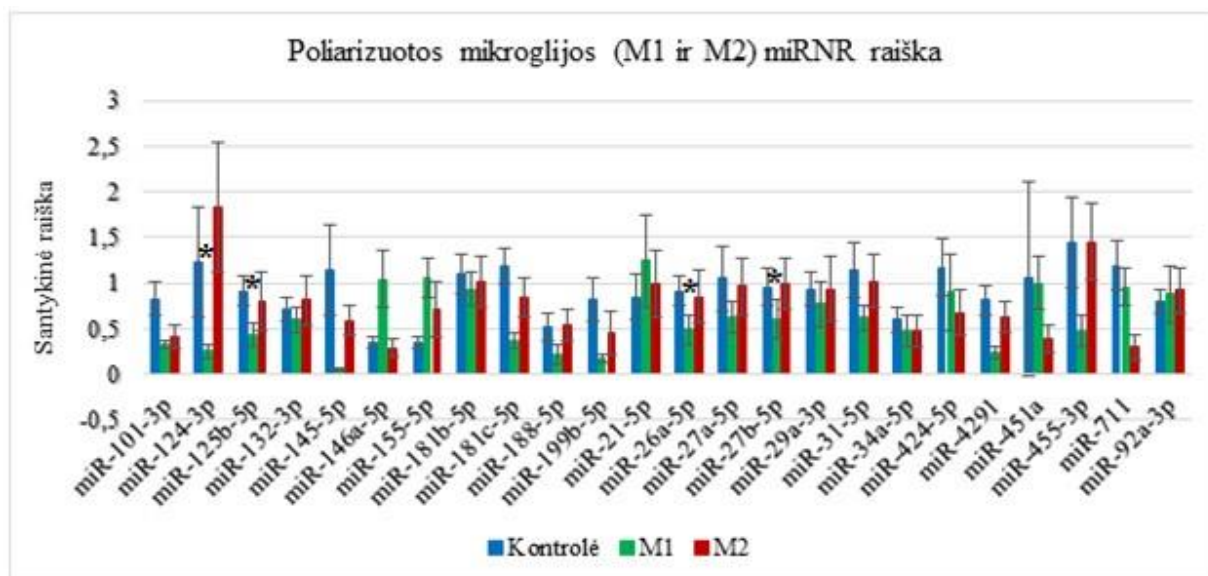
Naudojant eksperimentinių gyvūnų ląstelių kultūras buvo atlikta daug tyrimų padedančių suprasti, kaip funkcionuoja mikroglijos ląstelės. Tačiau eksperimentinių gyvūnų ir žmogaus mikroglijos ląstelės skiriasi proliferacijos galimybėmis, genų raiška, atsaku į uždegiminius stimulus. Dėl šių priežasčių, daugelis tyrimų atliktų su laboratoriniais gyvūnais ar jų ląstelių linijomis, vėliau pritaikyti klinikiniuose tyrimuose su žmonėmis neparodė norimo rezultato⁷². Norint kurti efektyvias priemones neurouždegimui gydyti, svarbu, kad eksperimentinis modelis kuo labiau atspindėtų realių pacientų CNS vykstančius molekulinis ir biocheminius pokyčius.

Pirmame šio eksperimento etape imortalizuota žmogaus mikroglijos ląstelių linija buvo poliarizuota naudojant anksčiau aprašytą protokolą⁷³. Po aktyvacijos iš mikroglijos ląstelių buvo išskirta RNR, kuri naudota nustatyti pasirinktų genų ir miRNR pokyčius TL–PGR metodu. Genų ekspresijos ir miRNR lygis tirtas naudojant specifinius pradmenis kartu su fluorescuojančiu DNR dažu *SybrGreen*. Grafike (5 pav) patekti duomenys rodo, kad M1 ląstelėse labai padidėjo uždegiminių atsakui būdingų genų raiška. Nustatytas uždegiminio chemokino CCL2, iNOS, IFN β , IL1 β , IL6, TNF α , TLR4, TLR2 genų raiškos padidėjimas. Taip pat nustatyta, kad M2 ląstelėse padidėjo VEGFA raiška, kai tuo tarpu M1 ląstelėse CD206 geno ekspresijos iš viso nepavyko detektuoti. CD206 yra „klasikinis“ M2 mikroglijos žymuo⁷⁴. SOCS1 geno raiška padidėjo tiek M1, tiek M2 fenotipo mikroglijoje.



5 pav. Genų raiška ramybės būsenos (kontrolinėse) ir poliarizuotose M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse; * – $p < 0,05$

Toliau šiame etape buvo tiriami neurouždegimo procesui svarbių miRNR ekspresijos pokyčiai mikroglijos M1 ir M2 ląstelėse. Grafike (6 pav) parodyta, kad M1 ląstelėse padaugėjo uždegiminių atsakui būdingos miR-155-5p raiška, tačiau sumažėjo neaktyvuotai M0 bei M2 mikroglijai būdingos miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-26a-5p, miR-27b-5p raiška.



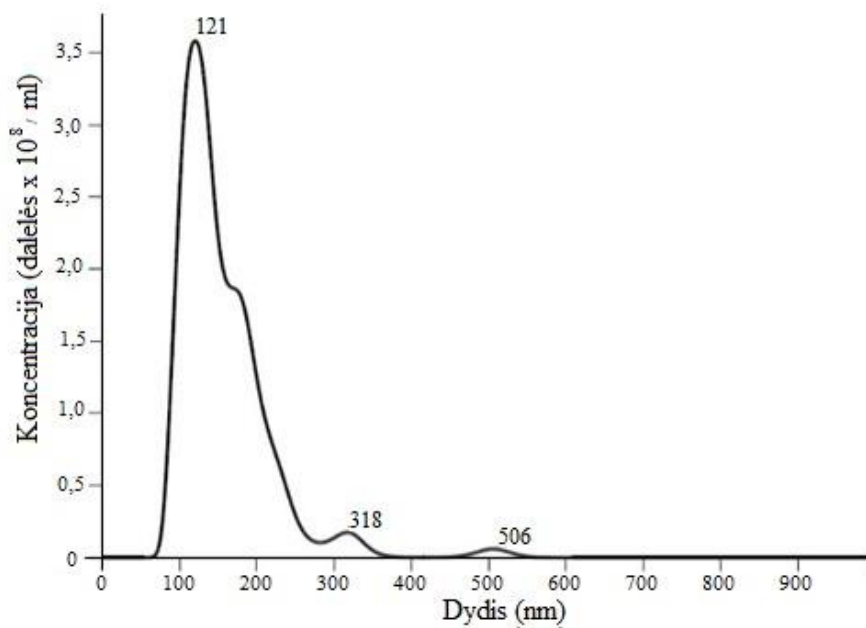
6 pav. MiRNR raiška ramybės būsenos (kontrolinėse) ir polarizuotose M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse;
* – $p < 0,05$

Šiame skyriuje apžvelgti genų raiškos tyrimų rezultatai patvirtina, kad naudojamas *in vitro* polarizavimo protokolas padeda efektyviai indukuoti M1 ir M2 imunofenotipą žmogaus mikroglijos ląstelėse.

3.2. Ekstraląstelių vezikulių išskyrimas iš žmogaus pieninio danties pulpos MKL supernatantų

Eksperimentų metu egzomosos buvo dozuojamos naudojant empiriškai pasirinktus veikimo vienetų (VV). 1 VV atitinka egzosomų kiekį, kuris buvo išskirtas iš supernatanto, surinkto nuo 3D sąlygomis 72 val. kultivuotų PDPKL ląstelių. Sutinkama, kad visi dabartiniu metu naudojami egzosomų dozavimo metodai (empirinis, baltymo koncentracijos matavimas, bei nanodalelių analizės (NTA, angl. *nanoparticle tracking analysis*) turi trūkumų ir ne visada tiksliai atitinka realų egzosomų kiekį mėginyje⁷⁵. Panaudojant NTA metodą (instrumentas *Nanosight LM10*) retrospektyviai buvo ištirti kai kurie egzosomų mėginiai ir nustatyta, kad empiriniai VV proporcingai atitinka nanodalelių kiekį.

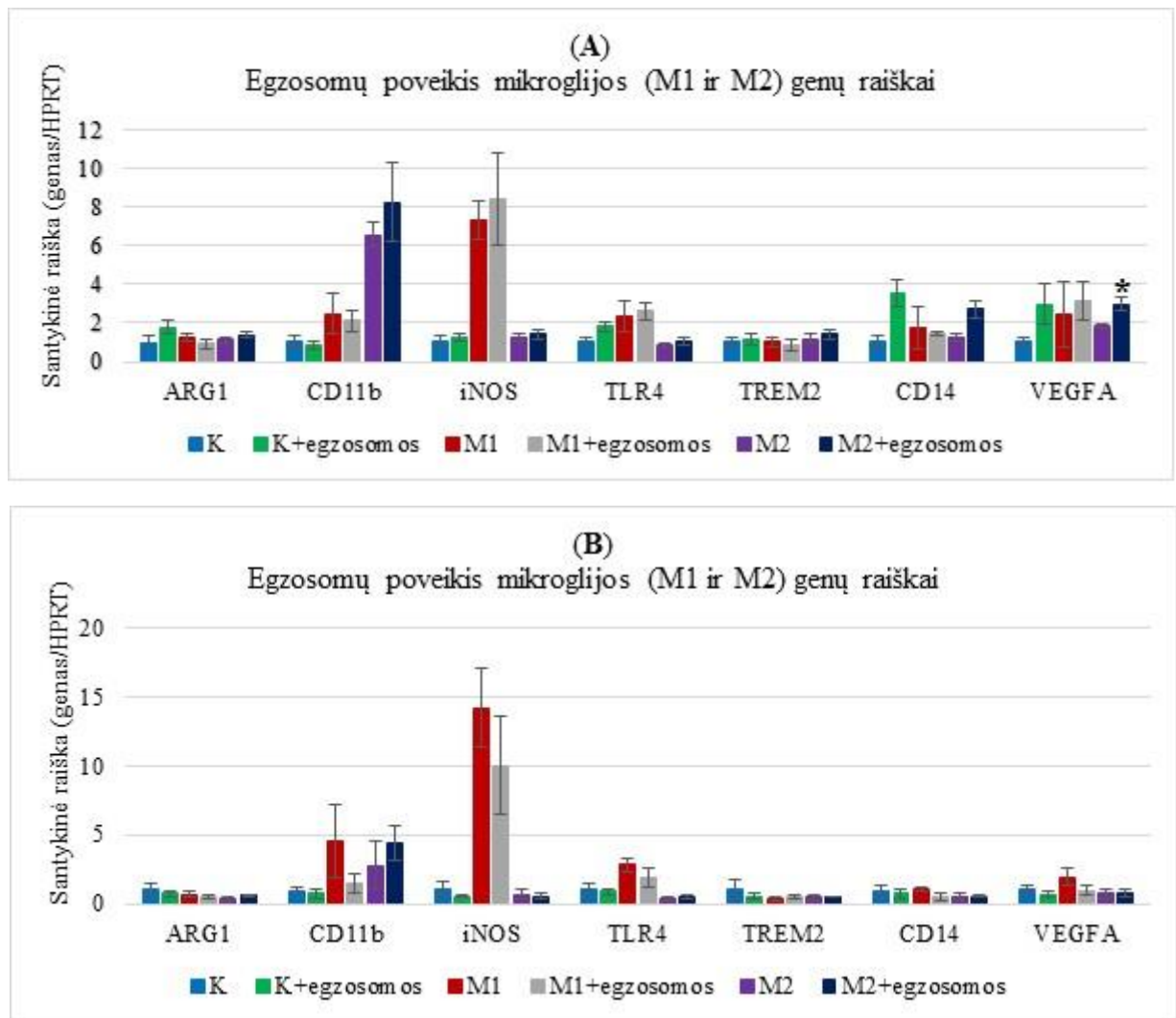
Gauti duomenys rodo, kad PDPKL supernatantų, centrifuguotų 100 000 g santykinė išcentrinė jėga, gautos egzomosos daugiausia yra 121 nm diametro (**7 pav**). Šie rezultatai atitinka prieš tai aprašytus rezultatus tiriant MKL egzomas⁷⁶.



7 pav. Iš PDPKL išskirtų egzosomų NTA analizė

3.3. Ekstraląstelinų vezikulių poveikis mikroglijos genų ir mikroRNR ekspresijai

Toliau buvo tiriama, kaip egzosomos veikia tam tikrų genų ir mikro RNR ekspresiją neaktyvuotose (M0), taip pat M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse. M0, M1, M2 mikroglijos ląstelės buvo 6 val. veiktos egzosomomis (1 VV). Išskirta RNR naudota nustatyti pasirinktų genų ir miRNR ekspresijos pokyčiams. Genų ekspresija tirta TL–PGR metodu naudojant specifinius pradmenis ir fluorescuojantį DNR dažą *SybrGreen*. Rezultatai rodo, kad egzosomų poveikis tų pačių genų ekspresijai gali būti skirtingas. Atsižvelgus į tai, kaip egzosomos veikia genus–taikinius rezultatai suskirstyti į dvi grupes (**12 pav. A, B**). Kiekvienos grupės duomenys buvo gauti susumavus dviejų nepriklausomų (pagal efektus genams–taikiniams) eksperimentų duomenis. Analogiškai pateikti ir miRNR ekspresijos duomenys (**13 pav. A, B**).

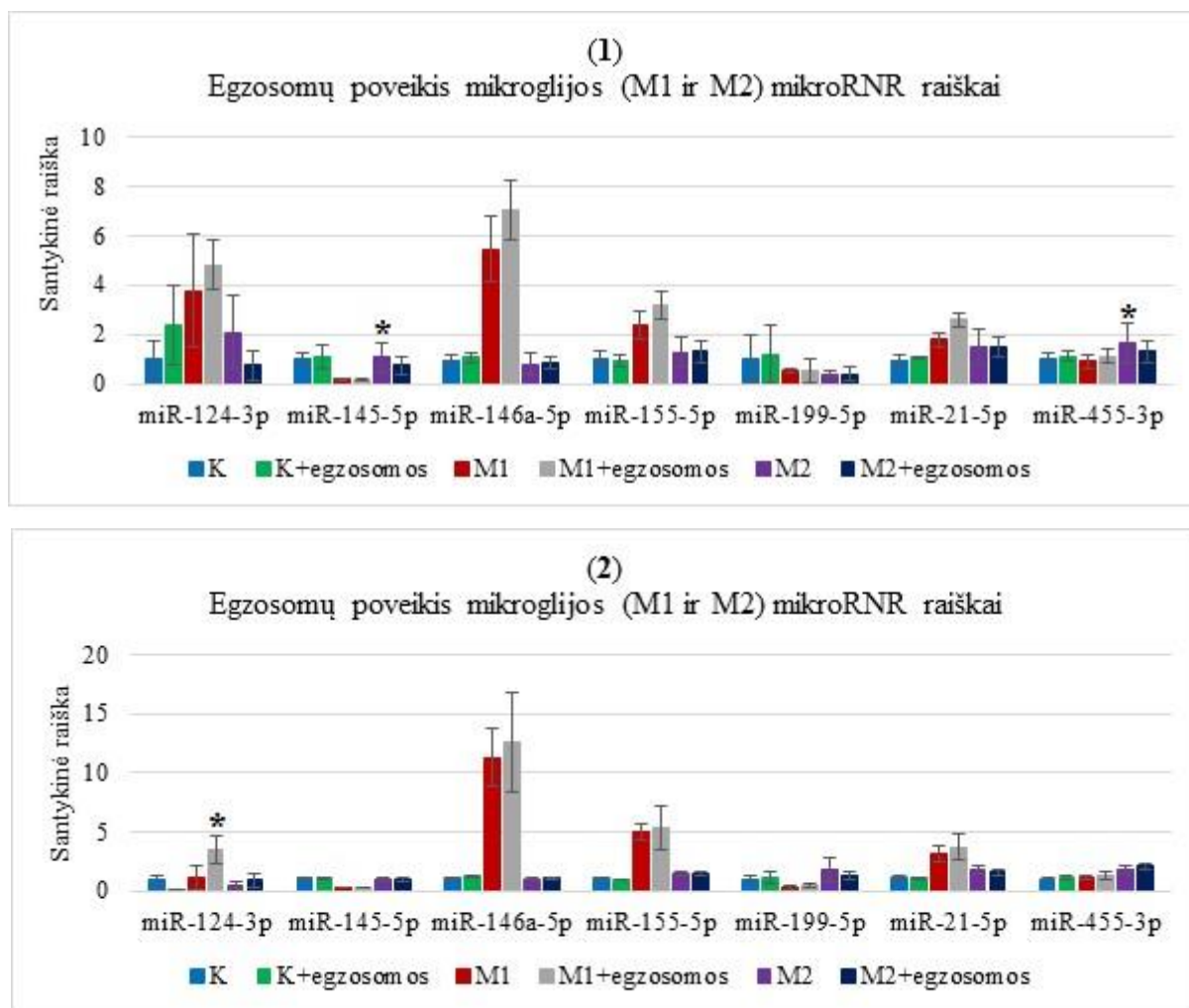


12 pav. Egzosomų poveikis genų raiškai M0, M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse; * – $p < 0,05$

Lygindami skirtingų eksperimentų grupių (12 pav. A, B) rezultatus galima matyti, kad egzozomos priešingai veikia tam tikrų genų ekspresiją (pvz. CD14, TLR4, VEGFA). Tikėtina, kad šiuos skirtumus galėjo lemti dvi priežastys.

Pirmiausia skirtumus galėjo nulemti eksperimentams naudotų egzozomų molekulinio sąstato skirtumai, taip pat skirtingas egzozomų kiekis. Yra žinoma, kad egzozomų molekulinis sąstatas yra labai sudėtingas ir keičiasi priklausomai nuo ląstelių kilmės, jų kultivavimo sąlygų (amžiaus, donoro, išorinių stimulų ir t.t.)⁷⁵. Šiame eksperimente naudotos egzozomos išskirtos iš tos pačios PDPKL linijos, tačiau jų sąstato skirtumus galėjo įtakoti skirtingas ląstelių pasažas ir kultūros tankis (egzozomos buvo renkamos nuo tų pačių, tačiau skirtingo pasažo ląstelių, kultūros tankis svyravo tarp subkonfluencijos/konfluencijos), bei skirtinga egzozomų saugojimo trukmė. Kita priežastis – galimai naudotas skirtingas egzozomų kiekis.

Skirtumus galėjo lemti ir tai, kad įvairiuose eksperimentuose naudotos skirtingų pasažų žmogaus mikroglijos ląstelės. Ši priežastis yra mažiau tikėtina, kadangi skirtingų eksperimentų grupėse registruoti beveik identiškų genų (neparodyta) ir miRNR (**13 pav**) raiškos pokyčiai.



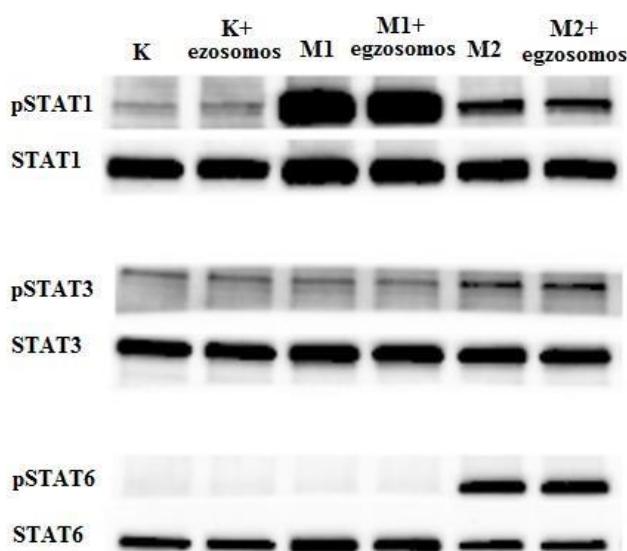
13 pav. Egzosomų poveikis miRNR raiškai M0, M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse; * – $p < 0,05$

Pavyzdžiui, nustatyta, kad egzosomos įtakojo tik miR-124-3p raišką bei skirtingose eksperimentų grupėse nustatyti priešingus miR-124-3p raiškos pokyčiai. Literatūros duomenimis miR-124-3p yra vienas svarbiausių mikroglijos uždegiminio atsako reguliatoriai⁷⁷. Tuo tarpu, kitų miRNR ekspresijos pokyčiai skirtingose eksperimentinėse grupėse beveik nesiskyrė (**13 pav. A, B**). Todėl pirmoji priežastis (skirtingas egzosomų molekulinis sąstatas ir galimai skirtingas naudotų egzosomų kiekis) geriau paaiškina gautus rezultatus.

3.4. EV poveikis JAK/STAT signaliniam keliui žmogaus mikroglijos ląstelėse

JAK/STAT signalinis kelias atsakingas už ląstelės dauginimosi, diferenciacijos, migracijos ir apoptozės mechanizmus. Šį signalinį kelią gali indukuoti įvairūs citokinai ir augimo veiksniai. Imuninėse ląstelėse JAK/STAT signalo perdavimo kaskada signalizuojama esant pažeidimui ar infekcijai, taip pat uždegimo metu⁷⁸.

Prieš JAK/STAT signalinio kelio tyrimą, ląstelės buvo poliarizuotos M1 ir M2 kryptimis pagal aprašytą protokolą. Baltymai išskirti iš ramybės būsenos (K), veiktų egzosomomis (K+egzosomos), poliarizuotų į M1 (M1), M1 veiktų egzosomomis (M1+egzosomos), poliarizuotų į M2 (M2), bei M2 veiktų egzosomomis (M2+egzosomos). Visais atvejais poveikio egzosomomis trukmė buvo 6 val, dozė – 1VV. Ląstelių baltymų lizatai buvo frakcionuoti elektroforetiškai *Mini-PROTEAN TGX* geliuose ir pernešti ant membranos. Naudoti pirminiai antikūniai prieš nefosforilintus ir fosforilintus STAT1, pSTAT1, STAT3, pSTAT3, STAT6 ir pSTAT6 baltymus.



14 pav. Imunobloto JAK/STAT signalinio kelio analizė mikroglijos ląstelėse veiktose egzosomomis

Uždegimo mediatoriai (IL6, IFN α , IFN γ) paskatina STAT1 transkripcijos faktoriaus aktyvaciją (tirozino fosforilinimą) ir jo genų – taikinių transkripciją. Gauti duomenys rodo, kad M1 mikroglijos ląstelėse STAT1 signalinis kelias yra aktyvuotas (**14 pav**). Nebuvo aptikta ženklesnės STAT3 aktyvacijos M1 ir M2 ląstelėse. Literatūros duomenimis, STAT6 transkripcijos faktoriaus signalinis kelias yra specifiskai aktyvuojamas M2 mikroglijos ląstelėse¹, tą rodo ir šiame darbe pateikti baltymų aktyvacijos tyrimo duomenys (**14 pav**).

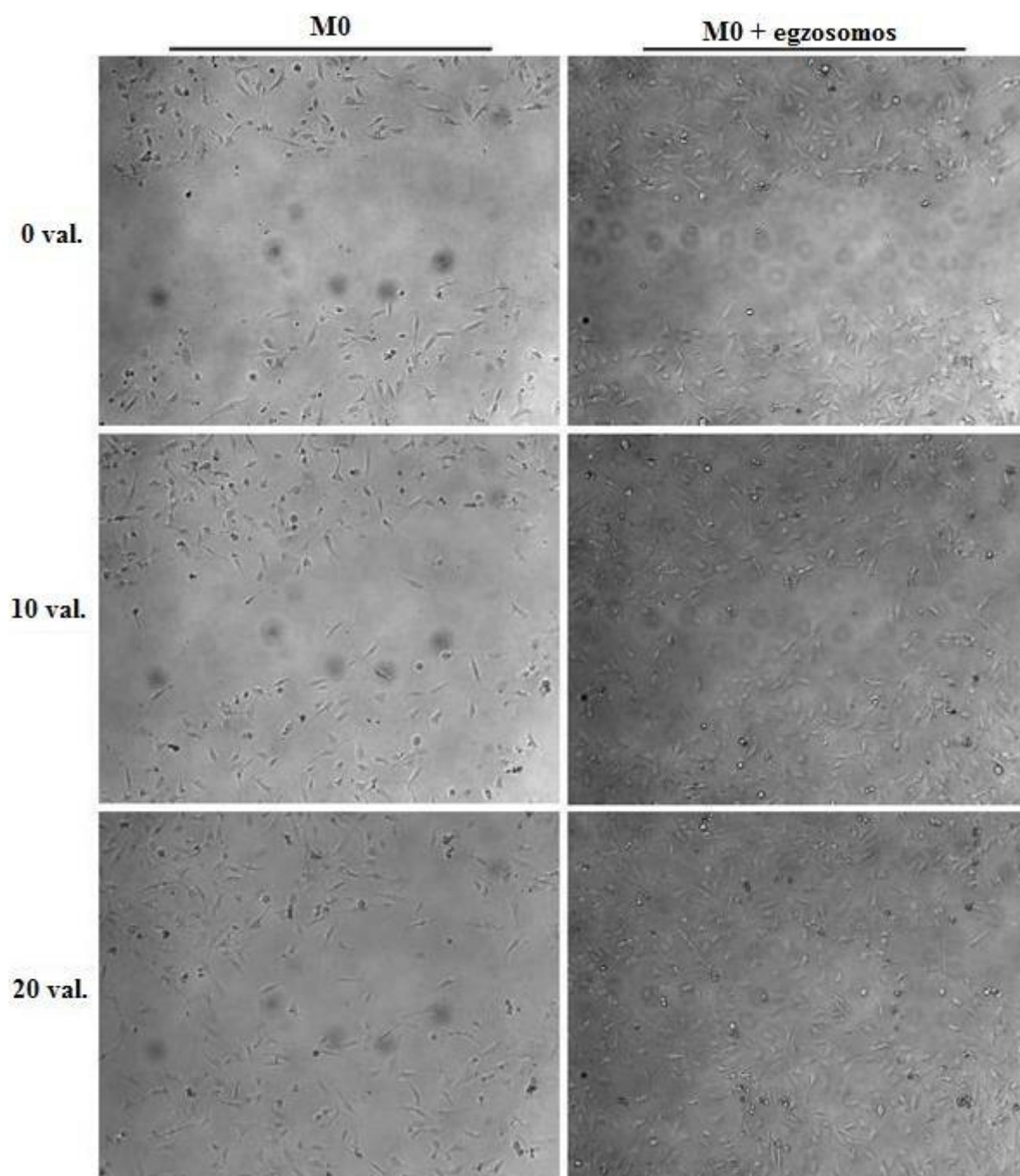
Įvertinus pirmame rezultatų skyriuje gautus rezultatus (genų ir miRNR raiška) ir imunobloto (**14 pav**) analizės rezultatus, matyti, kad mikroglijos poliarizavimo metodas veikia efektyviai tiek genų ekspresijos, tiek baltymų lygmenyje.

JAK/STAT signalinio kelio baltymų aktyvacijai (**14 pav**) egzosomos matomų pokyčių neindukavo.

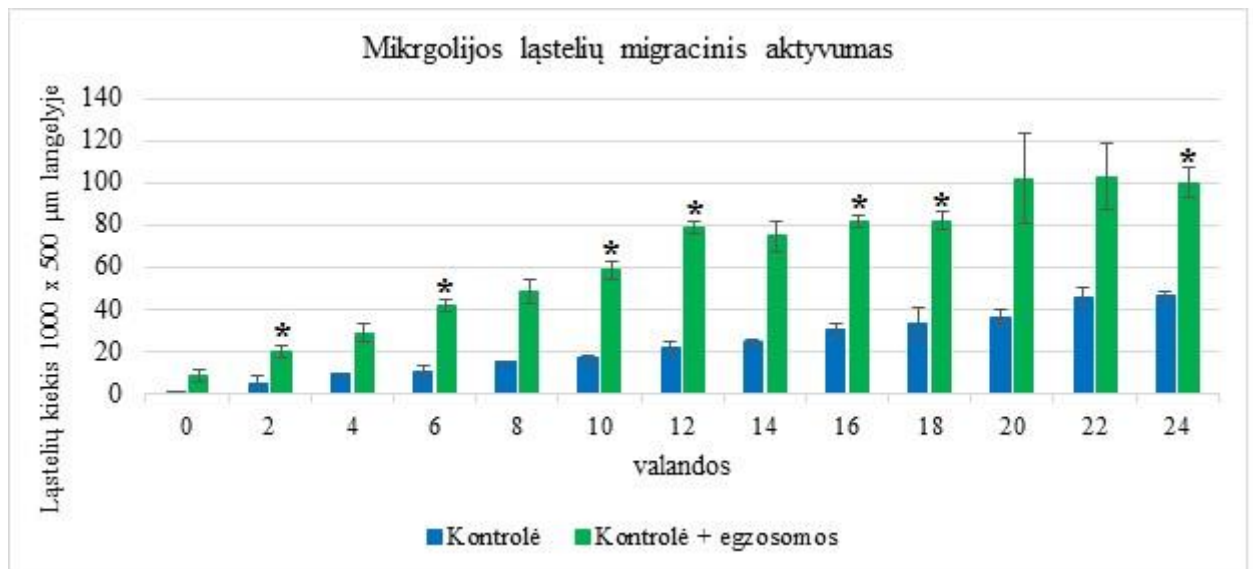
3.5. Ekstraląstelinių vezikulių poveikis mikroglijos ląstelių migracijai ir fagocitiniam aktyvumui

Toliau šiame darbe buvo nagrinėjama, kaip egzosomos veikia M0 mikroglijos ląstelių migraciją. Šiuo tikslu ląstelės buvo tiriamos panaudojant gyvų ląstelių vaizdinimo sistemą *Leica SP8* stebint, kaip greitai ląstelės užpildo 500 μm tarpą šulinėlio paviršiuje. Kontrolinės mikroglijos ląstelės (neinkubuotos su egzosomomis) ir su egzosomų doze 1 VV inkubuotos ląstelės buvo stebimos 24 val. Pateiktose nuotraukose (**pav 8**) parodoma, kad mikroglijos ląstelių inkubuotų su egzosomomis didesnis migracinis aktyvumas išryškėja jau po 10 val. Po 20 val. mikroglija inkubuota su egzosomomis, visiškai užpildo 500 μm tarpą, priešingai nei kontrolinės ląstelės.

Kiekybinė analizė buvo atlikta pasirenkant 1000 μm x 500 μm langelį ir skaičiuojant į jį migravusias ląsteles. Skaičiuojama kas 2 val, trijose šulinėlio zonose (**9 pav**). Gauto rezultatai rodo, kad PDPKL sekretuojamos egzosomos skatina mikroglijos ląstelių migraciją. Reikšmingi skirtumai pasireiškėjo jau 2–3 inkubacijos val., o 6 val. inkubacijos su egzosomomis imigravusių ląstelių skaičius buvo net 3.8 karto didesnis nei kontrolinių.



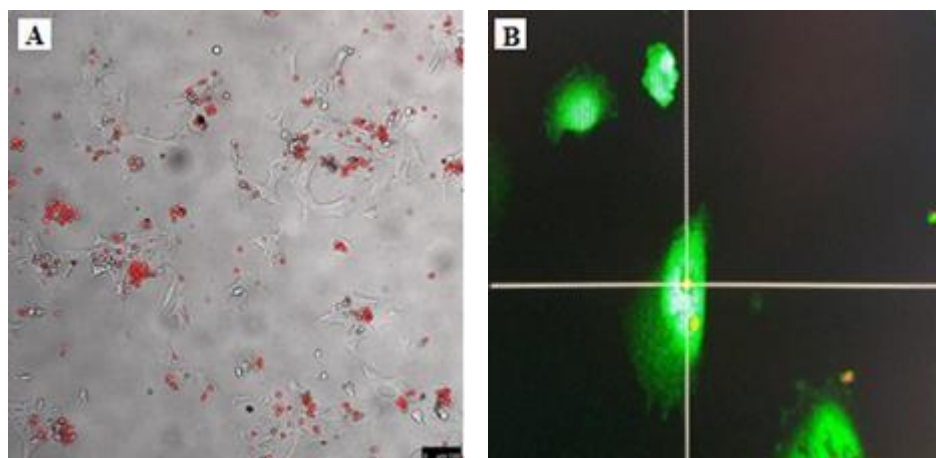
8 pav. Ramybės būsenos mikroglijos (kontrolinės) ir ramybės mikroglijos mikroglijos ląstelių veiktų egzozomomis kokybinis migracijos įvertinimas



9 pav. Ramybės būsenos mikroglijos (kontrolinės) ir ramybės būsenos mikroglijos ląstelių veiktų egzosomomis kiekybinis migracijos įvertinimas; * – $p < 0,05$

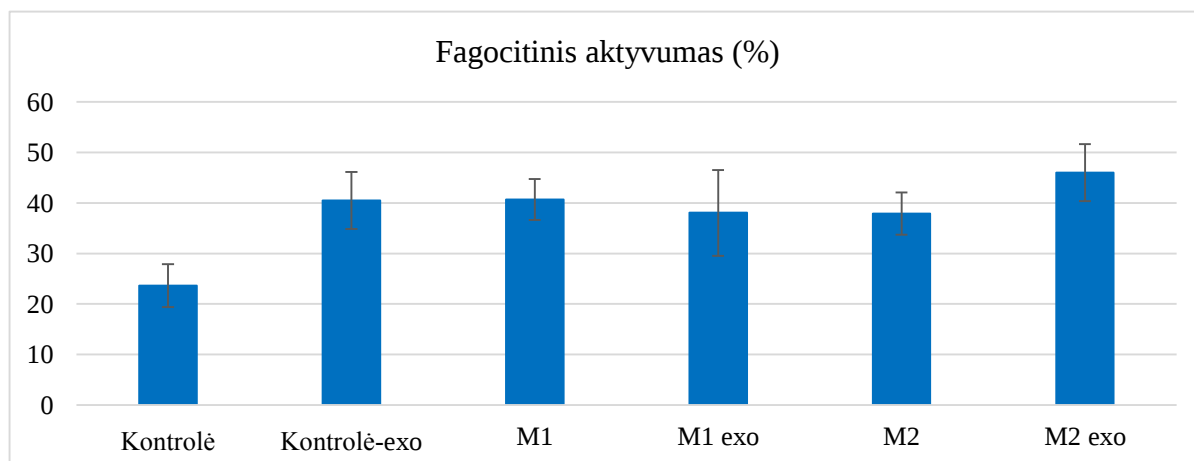
Toliau buvo tirta, kaip DPKL sekretuojamos egzomosos veikia žmogaus mikroglijos ląstelių funkcinį aktyvumą. Šiuo tikslu buvo įvertinta, kaip egzomosos veikia M0, M1 ir M2 ląstelių fagocitinį aktyvumą. Fagocitozės aktyvumo tyrimams naudotas eksperimentinis modelis – fluoresnuojančiu dažu žymėti AK, generuoti iš žmogaus dopaminerginių neuronų pirmtakų. Šis modelis geriau atspindi realias sąlygas, nei rutiniškai naudojamas zimošanas, ar žymėtos latekso dalelės.

AK buvo dažyti raudonai fluorescuojančiu TAMRA dažu ir inkubuoti su mikroglijos ląstelėmis. Gyvų ląstelių vizualizavimas buvo vykdomas panaudojant konfokalinę mikroskopą *Leica SP8 Leica Microsystems*. Nuotraukose (**10 pav**) pateiktas bendras vaizdas (**A**) ir AK internalizavimas patvirtinamas vykdant skenavimą ZY ašyje (**B**). Žalia spalva atitinka ląsteles dažytas kalceinu, raudona – AK dažytus TAMRA dažu.



10 pav. Žmogaus mikroglijos ląstelių fagocitinio aktyvumo tyrimas

Gyvų ląstelių vizualizavimas buvo vykdomas panaudojant konfokalinį mikroskopą *Leica SP8*. Kiekybiniai eksperimentai buvo vykdomi regėjimo lauke suskaičiuojant visas ląsteles, taip pat ląsteles fagocitavusias bent po vieną AK. Skaičiuota trijose kiekvieno šulinėlio zonose. Fagocitinis aktyvumas (FA) buvo skaičiuojamas pagal formulę: $FA = \text{Fagocitavusios ląstelės} / \text{visos ląstelės} \times 100 \%$. Pateikiami dviejų nepriklausomų eksperimentų rezultatai (**11 pav**).



11 pav. AK fagocitavusių ląstelių kiekis procentais

Gauti duomenys rodo, kad egzosomos ženkliai (16.9 %) padidino M0 mikroglijos ląstelių fagocitinį aktyvumą. Įdomu, kad poveikis egzosomomis šiek tiek sumažino M1 ląstelių fagocitinį aktyvumą (2.7 %), tačiau 8 % padidino M2 ląstelių fagocitinį aktyvumą.

Pastaraisiais metais daugėja duomenų, kad mikroglijos fagocitinis aktyvumas gali būti svarbus veiksnys lėtinių neurodegeneracinių ligų patogenezėje. Greitas ir efektyvus pažeistų ir apoptavusių ląstelių, taip pat toksiškų depozitų eliminavimas padeda palaikyti audinio homeostazę ir lėtina neurodegeneraciją⁷⁹.

Apibendrinant, šiame tyrime buvo nustatyta, kad DPKL sekretuojamos egzosomos veikia žmogaus mikroglijos ląstelių funkcines savybes. Šie duomenys rodo, kad egzosomos skatina mikroglijos ląstelių migraciją ir fagocitinį aktyvumą.

4. IŠVADOS

1. Šiame darbe naudojamas *in vitro* poliarizavimo protokolas padeda efektyviai indukuoti M1 ir M2 imunofenotipą žmogaus mikroglijos ląstelėse;
2. Iš pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių (PDPKL) supernatantų išskirtų egzosomų mėginių empiriniai veikimo vienetai proporcingai atitinka nanodalelių kiekį;
3. PDPKL sekretuojamos egzosomos veikia uždegimą (ARG1, iNOS, VEGFA), fagocitozę (CD11b, TREM2) bei nespecifinį imuninį atsaką (CD14, TLR4) reguliuojančių genų ir miR-124-3p bei miR-145-5p raišką M0, M1 ir M2 žmogaus mikroglijos ląstelėse;
4. PDPKL sekretuojamos egzosomos neveikia STAT1, STAT3 ir STAT 6 baltymų aktyvacijos M0, M1 ir M2 mikroglijos ląstelėse;
5. PDPKL sekretuojamos egzosomos veikia žmogaus mikroglijos ląstelių funkcines savybes: skatina mikroglijos ląstelių migraciją ir fagocitinį aktyvumą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Orihuela, R., McPherson, C. A. & Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 649–665 (2016).
2. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
3. Wang, Y., Chen, X., Cao, W. & Shi, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* **15**, 1009–16 (2014).
4. Ibarretxe, G. Neural crest stem cells from dental tissues: A new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int.* **2012**, (2012).
5. Kalra, H., Drummen, G. P. C. & Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing. (2016). doi:10.3390/ijms17020170
6. Jarmalavičiūtė, A. & Pivoriūnas, A. Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **113**, 816–822 (2016).
7. Buzsáki, G. & Mizuseki, K. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 264–78 (2014).
8. Haim, L. Ben & Rowitch, D. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* (2016). doi:10.1038/nrn.2016.159
9. Yeung, M. S. Y. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell* **159**, 766–774 (2014).
10. Spassky, N. Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *J. Neurosci.* **25**, 10–18 (2005).
11. Manuscript, A. Resistant to Regulation. **39**, 19–34 (2014).
12. Kaur, C. & Ling, E. A. Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat. (Basel)*. **142**, 118–25 (1991).
13. Yokoyama, A., Yang, L., Itoh, S., Mori, K. & Tanaka, J. Microglia, A Potential Source of Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes. *Glia* **45**, 96–104 (2004).

14. Bennett, M. L. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E1738–E1746 (2016).
15. Torres-Platas, S. G. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J. Neuroinflammation* **11**, 12 (2014).
16. Karperien, A., Ahammer, H. & Jelinek, H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–18 (2013).
17. Haney, M. J. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J. Control. Release* **207**, 18–30 (2015).
18. Walker, F. R. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain. Behav. Immun.* **37**, 1–14 (2014).
19. Brown, G. C. & Neher, J. J. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol. Neurobiol.* **41**, 242–247 (2010).
20. Perry, V. H., Nicoll, J. A. R. & Holmes, C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat. Publ. Gr.* **6**, 193–20117 (2010).
21. Mattson, M. P. addendum: Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **431**, 107–107 (2004).
22. Braak, H. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197–211 (2003).
23. Eisen, A. Amyotrophic lateral sclerosis: A 40-year personal perspective. *J. Clin. Neurosci.* **16**, 505–512 (2009).
24. McGeer, P. L. & McGeer, E. G. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve* **26**, 459–470 (2002).
25. Rubinsztein, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**, 780–786 (2006).
26. Saresella, M. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **11**, 23 (2016).
27. Kielian, T. Toll-like Receptors: Roles in Infection and Neuropathology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **336**, 1–14 (2009).

28. Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P. & Abbracchio, M. P. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* **32**, 79–87 (2009).
29. Husemann, J., Loike, J. D., Anankov, R., Febbraio, M. & Silverstein, S. C. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: Their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* **40**, 195–205 (2002).
30. Fung, A., Vizcaychipi, M., Lloyd, D., Wan, Y. & Ma, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. *Brain Res.* **1446**, 144–155 (2012).
31. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7 (2006).
32. Sarvar, D. P., Shamsasenjan, K. & Akbarzadehlaleh, P. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: New opportunity in cell-free therapy. *Adv. Pharm. Bull.* **6**, 293–299 (2016).
33. Xiao, L. & Tsutsui, T. Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. *Hum. Cell* **26**, 91–96 (2013).
34. Petrovic, V. & Stefanovic, V. Dental tissue--new source for stem cells. *ScientificWorldJournal.* **9**, 1167–1177 (2009).
35. Herberts, C. a, Kwa, M. S. G. & Hermesen, H. P. H. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J. Transl. Med.* **9**, 29 (2011).
36. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–93 (2009).
37. Zahra, S., Anderson, J. A. M., Stirling, D. & Ludlam, C. A. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* **152**, 688–700 (2011).
38. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* **113**, 1–11 (2013).
39. El Andaloussi, S. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 347–57 (2013).
40. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).

41. Kivinen, K., Kallajoki, M. & Taimen, P. Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* **311**, 62–73 (2005).
42. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
43. McMahon, H. T. & Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 517–533 (2011).
44. Edgar, J. R., Eden, E. R. & Futter, C. E. Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. (2013).
doi:10.1111/tra.12139
45. Brouwers, J. F. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *Proteomics* **13**, 1660–1666 (2013).
46. Kobayashi, T. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J. Biol. Chem.* **277**, 32157–32164 (2002).
47. Katzmann, D. J., Babst, M. & Emr, S. D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145–155 (2001).
48. Schmidt, O. & Teis, D. The ESCRT machinery. *Curr. Biol.* **22**, R116–R120 (2012).
49. Vaccari, T. Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *J. Cell Sci.* **122**, 2413–2423 (2009).
50. Pires, R. A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments. *Structure* **17**, 843–856 (2009).
51. Gassart, A. De, Ge, C. & Fe, B. Lipid raft – associated protein sorting in exosomes. *Proteins* **102**, 4336–4344 (2003).
52. Trajkovic, K. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
53. Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L. & Nakamura, S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.* **4**, 2712 (2013).
54. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* **5**, 442 (2014).

55. Parkinson, K. Calcium-dependent regulation of Rab activation and vesicle fusion by an intracellular P2X ion channel. *Nat. Cell Biol.* **16**, 87–98 (2014).
56. Yáñez-Mó, M. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. vesicles* **4**, 27066 (2015).
57. Abels, E. R. & Breakefield, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 301–312 (2016).
58. Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* **66**, 30–41 (2017).
59. Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. & Record, M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* **89**, 205–212 (2007).
60. Helms, J. B. & Zurzolo, C. Lipids as targeting signals: Lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **5**, 247–254 (2004).
61. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
62. Chen, T. S. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **38**, 215–224 (2009).
63. Huang, X. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* **14**, 319 (2013).
64. Collino, F. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* **5**, (2010).
65. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. & Simpson, R. J. ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1241–1244 (2012).
66. Biller, S. J. Membrane vesicles in sea water: heterogeneous DNA content and implications for viral abundance estimates. *ISME J.* 1–11 (2016). doi:10.1038/ismej.2016.134
67. Perez-Bermudez, P., Blesa, J., Soriano, J. M. & Marcilla, A. Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2016). doi:10.1016/j.ejps.2016.09.022
68. Yu, B., Zhang, X. & Li, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4142–4157 (2014).

69. Zhuang, X. Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol. Ther.* **19**, 1769–1779 (2011).
70. Nosrat, I. V., Widenfalk, J., Olson, L. & Nosrat, C. A. Dental Pulp Cells Produce Neurotrophic Factors, Interact with Trigeminal Neurons in Vitro, and Rescue Motoneurons after Spinal Cord Injury. *Dev. Biol.* **238**, 120–132 (2001).
71. Nosrat, I. V., Smith, C. A., Mullally, P., Olson, L. & Nosrat, C. A. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2388–2398 (2004).
72. Smith, A. M. & Dragunow, M. The human side of microglia. *Trends Neurosci.* **37**, 125–135 (2014).
73. Harms, A. S. & Tansey, M. G. Isolation of murine postnatal brain microglia for phenotypic characterization using magnetic cell separation technology. *Methods in Molecular Biology* **1041**, (2013).
74. Kierdorf, K. & Prinz, M. Factors regulating microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–8 (2013).
75. Tkach, M. & Thery, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232 (2016).
76. Sokolova, V.. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **87**, 146–150 (2011).
77. Ponomarev, E. D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A. M. & Weiner, H. L. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α –PU.1 pathway. *Nat. Med.* **17**, 64–70 (2011).
78. Kaplan, M. H. STAT signaling in inflammation. *Jak-Stat* **2**, e24198 (2013).
79. Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 209–216 (2014).