



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Lina Stasinaitytė

**PRIEŠUŽDEGIMINIO EKSTRALĄSTELINIŲ VEZIKULIŲ POVEIKIO
TYRIMAI ŽMOGAUS MIKROGLIJOS LĄSTELĖSE**

**STUDY OF EXTRACELLULAR VESICLES
ANTI-INFLAMMATORY EFFECT IN HUMAN MICROGLIAL
CELLS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2018

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Dr. Jaunius Urbonavičius

(Data)

Lina Stasinaitė

**PRIEŠUŽDEGIMINIO EKSTRALĄSTELINIŲ VEZIKULIŲ POVEIKIO
TYRIMAI ŽMOGAUS MIKROGLIJOS LĄSTELĖSE**

**STUDY OF EXTRACELLULAR VESICLES
ANTI-INFLAMMATORY EFFECT IN HUMAN MICROGLIAL
CELLS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas dr. Augustas Pivoriūnas

(Parašas)

(Data)

Konsultantas

(Moksl. Laipsnis/pedag. Vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas

(Moksl. Laipsnis/pedag. Vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

(Moksl. Laipsnis/pedag. Vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2018

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Bioinžinerijos studijų kryptis

TVIRTINU
Katedros vedėjas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

(Parašas)
Dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentei Linai Stasinaitei

Baigiamojo darbo tema: **Priešuždegiminio ekstraląstelinių vezikulių poveikio tyrimai žmogaus mikroglijos ląstelėse**

patvirtinta 2017m. spalio 26d. dekanų potvarkiu Nr. 443 fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2018m. Gegužės 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

1. Išskirti ir charakterizuoti ekstraląstelines vezikules iš žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių;
2. Generuoti laikinas žmogaus mikroglijos ląstelių NF-κB-sekretuojamos šarminės fosfatazės reporterių linijas;
3. Įvertinti žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių sekretuojamų ekstraląstelinių vezikulių poveikį NF-κB signaliniam keliui žmogaus mikroglijos ląstelėse.

Vadovas
(Parašas)

dr. Augustas Pivoriūnas
(Moksl. laipsnis/pedag.vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)
Lina Stasinaite
(Vardas, pavardė)
2016 spalio 3 d.
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. sk.

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas **Priešuždegiminio ekstraląstelių vezikulių poveikio tyrimai žmogaus mikroglijos ląstelėse**

Autorius **Lina Stasinaite**

Vadovas doc. dr. **Augustas Pivoriūnas**

Kalba



lietuvių



užsienio

Anotacija

Baigiamajame magistro darbe nagrinėjamas galimas mezenchiminių kamieninių ląstelių sekretuojamų ekstraląstelių vezikulių panaudojimas uždegiminei mikroglijos aktyvacijai slopinti. Išnagrinėti pagrindiniai veiksniai, lemiantys žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvaciją, išanalizuoti ląstelių aktyvacijos reguliaciniai mechanizmai bei jų sutrikimai. Akcentuojama NF- κ B signalinio kelio reikšmė imuniniam atsakui bei neurodegeneracinių ligų atsiradimui ir vystymuisi.

Ekstraląstelių vezikulių prieuždegiminio poveikio tyrimui naudojama žmogaus mikroglijos ląstelių reporterinė linija. Pagal reporterinio baltymo (sekretuojamos šarminės fosfatazės) veikimo intensyvumą įvertintas NF- κ B signalinio kelio aktyvumas bei ekstraląstelių vezikulių poveikis jam. Atlikta gautų duomenų statistinė analizė ir įvertinti gauti rezultatai. Aptariamas ekstraląstelių vezikulių poveikis NF- κ B signalinio kelio aktyvumui, poveikio priklausomybė nuo veikimo laiko bei galimi veikimo mechanizmai.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, tyrimo rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 56 p. teksto be priedų, 11 iliustr., 2 lent., 4 grafikai, 69 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: egzozomos, mikroglija, reporterinės ląstelės, NF- κ B signalinis kelias, lėtinis uždegimas, sekretuojama šarminė fosfatazė

Vilnius Gediminas Technical University
Fundamental sciences faculty
Chemistry and bioengineering department

ISBN ISSN
Copies No.

Bioengineering study programme master thesis.

Title: **Study of extracellular vesicles anti-inflammatory effect in human microglial cells**

Author **Lina Stasinaitė**

Academic supervisor **dr. Augustas Pivoriūnas**

Thesis language



Lithuanian



Foreign (English)

Annotation

In this master's thesis we are analyzing extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as possible tool to reduce proinflammatory activation of human microglial cells. We study how human microglial cells are activated, what factors are involved in this process. We focus on how activation of microglial cells is regulated through NF- κ B signaling pathway, as changes in this pathway is associated with neurodegeneration disorders.

To evaluate how extracellular vesicles impacts proinflammatory response we used human microglial reporter cells. Reporter cells express specific protein (secreted alkaline phosphatase) if NF- κ B signaling pathway is activated. Analyzing how function of secreted alkaline phosphatase changes under the effect of extracellular vesicles we evaluated activity of NF- κ B signaling pathway in microglial cells. By studying the results we made the conclusions on how extracellular vesicles changes proinflammatory response in human microglial cells, how this effect changes through time and also discuss the possible working mechanisms.

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

Thesis consist of: 56 p. text without appendixes, 11 pictures, 2 tables 4 graphics, 69 bibliographical entries.

Keywords: exosomes, microglia, reporter cell line, NF- κ B signaling pathway, chronic inflammation, secreted alkaline phosphatase

TURINYS

PAVEIKSLĖLIŲ, LENTELIŲ IR GRAFIKŲ SĄRAŠAS	8
SANTUMPOS	9
ĮVADAS	12
1. Literatūrinė apžvalga	14
1.1. Žmogaus centrinė nervų sistema.....	14
1.2. Mikroglijos ląstelės.....	14
1.3. Mikroglijos ląstelių morfologija ir funkcijos.....	15
1.4. Mikroglijos aktyvaciją lemiantys veiksniai.....	16
1.4.1. Egzogeniniai signalai.....	16
1.4.2. Endogeniniai signalai.....	17
1.5. Mikroglijos aktyvacijos principai.....	18
1.6. NF-κB signalinis kelias.....	20
1.7. NF-κB signalinio kelio aktyvacija.....	21
1.8. Ekstraląstelinės vezikulės.....	23
1.9. Egzosomų sandara.....	24
1.10. Egzosomų biogenezė.....	24
1.11. Egzosomų funkcijos.....	26
1.12. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskiriamos egzosomos.....	26
1.13. Egzosomų panaudojimas ligų gydymui.....	27
2. Medžiagos ir metodai	29
2.1. Medžiagos ir aparatūra.....	29
2.1.1. Ląstelės.....	29
2.1.2. Medžiagos.....	29
2.1.3. Aparatūra.....	31
2.2. Metodai.....	31
2.2.1. Žmogaus PDPKL kultivavimas.....	31
2.2.2. Egzosomų išskyrimas iš PDPKL diferencinio ultracentrifugavimo metodu.....	32
2.2.3. Nanodalelių analizė.....	33
2.2.4. Baltymų išskyrimas iš PDPKL ir jų EV.....	33
2.2.5. SDS/PAGE elektroforezė.....	33

2.2.6. Imuninė baltymų analizė.....	33
2.2.7. Egzosomų dozavimas.....	34
2.2.8. NiFty2-SEAP plazmidės paruošimas eksperimentui.....	34
2.2.8.1. <i>E. coli</i> bakterijų transformacija.....	35
2.2.8.2. Transformuotų <i>E. coli</i> bakterijų atranka.....	36
2.2.8.3. Plazmidės gryninimas.....	36
2.2.8.4. Plazmidės restrikcinė analizė.....	37
2.2.9. Žmogaus mikroglijos ląstelių kultivavimas.....	38
2.2.10. Mikroglijos ląstelių transfekcija.....	39
2.2.11. NF-κB signalinio kelio aktyvumo įvertinimo žmogaus mikroglijos ląstelėse eksperimentas.....	39
2.2.12. Sekretuojamos šarminės fosfatazės aktyvumo įvertinimas.....	39
2.2.13. Statistinė analizė.....	40
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	41
3.1. PDPKL išskiriamų EV charakterizavimas.....	41
3.2. EV poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	42
3.3. TLR4 blokuojančio antikūno poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	43
3.4. LPS poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	43
3.5. EV ir TLR4 blokuojančio antikūno poveikis LPS indukuotam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	44
3.6. EV ir TLR4 blokuojančio antikūno bendras poveikis LPS indukuotam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	46
IŠVADOS.....	50
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	51

PAVEIKSLŲ, LENTELIŲ IR GRAFIKŲ SĄRAŠAS

1 pav. Nervinių ląstelių skirstymas.....	14
2 pav. Mikroglijos ląstelių morfologija. Schematinis ir fotomikrografinis mikroglijos būsenų vaizdas.....	16
3 pav. Egzogeniniai mikroglijos aktyvavimo signalai ir jų receptoriai.....	18
4 pav. Mikroglijos M1 ir M2 poliarizacijos schema.....	20
5 pav. NF- κ B signalinio kelio aktyvacija.....	22
7 pav. Egzosomų biogeneze.....	24
8 pav. Egzosomų struktūra.....	25
9 pav. NiFty2-SEAP plazmidės žemėlapis.....	35
10 pav. Plazmidės NiFty2-SEAP restrikcinė analizė.....	38
11 pav. PDPKL išskiriamų EV charakterizavimas baltymų analizės (A) ir NTA (B) metodais.....	42
1 lentelė. Ekstraląstelių vezikulių klasifikacija.....	23
2 lentelė. Baltyminei analizei naudoti antikūnai.....	34
1 grafikas. PDPKL išskiriamų EV, TLR4 blokuojančio antikūno ir LPS poveikis baziniam NF- κ B signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	44
2 grafikas. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno poveikis LPS indukuotai NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	46
3 grafikas. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno bendras poveikis baziniam NF- κ B signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse.....	47
4 grafikas. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno bendras poveikis LPS indukuotai NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai.....	48

SANTRUMPOS

Arg-1 – arginazė 1

ATP – adenozintrifosfatas

BAFFR – B ląstelės aktyvinančio veiksnio receptorių (angl. *B-cell activating factor receptor*)

BBB – hematoencefalinis barjeras (angl. *blood-brain barrier*)

CC – chemokinas

CCR – chemokinių receptorių

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

CNS – centrinė nervų sistema

Csf – makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. *macrophage colony-stimulating factor*)

CsfR – makrofagų kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių (angl. *macrophage colony-stimulating factor receptor*)

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

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

Hsp – termiško baltymas (angl. *heat shock protein*)

IKK – IκB kinazė (angl. *IκB kinase*)

IL – interleukinas

ILR – interleukino receptorių

Irf8 – interferoną reguliuojantis veiksnys 8 (angl. *interferone regulatory factor 8*)

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

LB – Luria-Bertani bakterijų auginimo terpė (angl. *Luria-Bertani broth*)

LGR – su G baltymu, turinčiu daug leucino pasikartojimų, sujungtas receptorių (angl. *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor*)

LPS – lipopolisacharidas

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

MFG-E8 – pieno riebalų globulinis-EGF veiksnys 8 (angl. *milk fat globule-EGF factor 8 protein*)

MHC – svarbiausias histologinio audinių suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*)

miRNR – mikro RNR

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės (angl. *mesenchymal stem cell*)

mRNR – matricinė RNR

MV – mikrovezikulės (angl. *microvesicles*)

MVB – daugiavezikulinis kūnelis (angl. *multivesicular body*)

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

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

NIK – NF- κ B aktyvinanti kinazė (angl. *Nuclear Factor κ B – inducing kinase*)

NOD – NOD-like receptoriaus

Nrf2 – branduolio veiksnys (eritroidinės kilmės 2) – 2 (angl. *nuclear factor (erythroid – derived 2)-like 2*)

NTA – nanodalelių analizė (angl. *nanoparticle tracing analysis*)

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

PNS – periferinė nervų sistema

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

Pu.1 – transkripcijos veiksnys (angl. *transkription factor PU.1*)

RANK – NF- κ B receptoriaus aktyvatorius (angl. *receptor activator of Nuclear Factor κ B*)

RHD – Rel homologo domenas (angl. *Rel homology domain*)

RIG-1 – RIG-1-like receptorių

Runx1 – su Runt baltymo domenu susijęs transkripcijos veiksnys 1 (angl. *runt-related transcription factor 1*)

SEAP – sekretuojama šarminė fosfatazė (angl. *secreted alkaline phosphatase*)

STAT – signalo perdavimo ir transkripcijos aktyvavimo veiksnys (angl. *signal transducer and activator of transcription*)

TB – bakterijų auginimo terpė (angl. *terrific broth*)

TLR – *toll-like* receptorių

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

TREM – mieloidinių ląstelių ekspresuojamas aktyvinantis receptorių (angl. *triggering receptor expressed on myeloid cells*)

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

IVADAS

Neurodegeneracija – tai progresuojantis neuronų ir jų funkcijų praradimas centrinėje nervų sistemoje (CNS). Neurodegeneracinės ligos dažniausiai siejamos su senėjimo procesais ir pasireiškia vyresniame amžiuje. Pagrindiniai šių ligų simptomai yra kognityvinių ir motorinių organizmo funkcijų sutrikimai. Dažniausiai nustatomos neurodegeneracinės ligos yra Parkinsono liga, Alzheimerio liga, Huntingtono liga bei amiotrofinė lateralinė sklerozė. Nors šių ligų patofiziologija skiriasi, tačiau visoms neurodegeneracinėms ligoms yra būdingas lėtinis CNS audinių uždegimas¹.

Nervinio audinio homeostazę CNS palaiko specifiniai audinių makrofagai – vadinamosios mikroglijos ląstelės². Mikroglijos ląstelės, reaguodamos į audinio būklę, keičia savo būseną. Esant fiziologinėms sąlygoms, mikroglijos ląstelės yra ramybės būsenoje. Tačiau, atsiradus pažeidimui, ląstelės yra aktyvinamos. Skiriami 2 aktyvintos mikroglijos fenotipai. M1 fenotipo ląstelės skatina uždegiminį atsaką pažeidimo vietoje, o M2 fenotipo ląstelės uždegiminį atsaką slopina ir skatina audinio atstatymą³. Su mikroglijos ląstelių aktyvacija glaudžiai susijęs NF-κB signalinis kelias. NF-κB transkripcijos veiksniai reguliuoja genus, atsakingus už uždegiminių citokinų sintezę. Sutrikus signalinio kelio aktyvacijai, mikroglijos ląstelės tampa hiperaktyvios. Padidėjęs uždegiminių citokinų kiekis aktyvina dar daugiau mikroglijos ląstelių. Taip sukeliamas lėtinis CNS uždegimas, kuris ir yra viena iš pagrindinių neurodegeneracinių ligų atsiradimo ir vystymosi priežasčių⁴. Siekiant pristabdyti neurodegeneracinių ligų vystymąsi ir palengvinti jų simptomus, svarbu kurti specifines gydymo terapijas, tikslingai nukreiptas prieš uždegiminę mikroglijos aktyvaciją.

Jau kurį laiką įvairių ligų gydymui, uždegiminių procesų slopinimui naudojamos mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL)⁵. MKL yra atsinaujinančios, multipotentinės ląstelės. Šios kamieninės ląstelės gali būti išskirtos iš įvairių postnatalinių audinių⁶. Pieninio danties pulpos kamieninės ląstelės (PDPKL) yra tokios pačios kilmės kaip ir nervinės ląstelės. Dėl šios priežasties manoma, kad šios KL galėtų būti panaudojamos nervinio audinio pažeidimams gydyti⁷. Ilgą laiką manyta, kad KL migruodamos į pažeidimo vietą ir ten diferencijuodamos tiesiogiai veikia audinio atstatymą. Tačiau ilgainiui nustatyta, kad KL pažeidimą pašalina ne tik per tiesioginį kontaktą, bet taip pat sekretuodamos tirpius veiksnius ir išskirdamos ekstraląstelines vezikules (EV)⁸.

EV tai nedidelės pūslelės, apgaubtos fosfolipidų bisluoksnio ir užpildytos ląstelių citozoliu bei jame esančiomis medžiagomis⁹. Išskiriama keletas EV rūšių, viena iš jų yra egzomosos. Egzomosos susiformuoja endosomose ir yra išskiriamos egzocitozės būdu. Egzomosų dydis varijuoja nuo 30 iki 150 nm, jose yra baltymų, lipidų, RNR fragmentų, mikroRNR. Per organizmo kraujo cirkuliacinę sistemą egzomosos gali veikti nutolusias ląsteles. Dėl savo dydžio egzomosos gali nesunkiai prasiskverbti per kraujo – smegenų barjerą ir tiesiogiai veikti nervinį audinį¹⁰.

Parodyta, kad PDPKL sekretuojamos EV pasižymi neuroprotekciniu poveikiu, tačiau šiuo metu nėra žinoma, kaip EV veikia uždegiminę žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvaciją. Atsižvelgdami į tai suformulavome pagrindinį darbo tikslą.

Darbo tikslas – įvertinti prieš uždegiminį ekstraląstelių vezikulių poveikį žmogaus mikroglijos ląstelėms.

Tiksliui pasiekti iškelti šie uždaviniai:

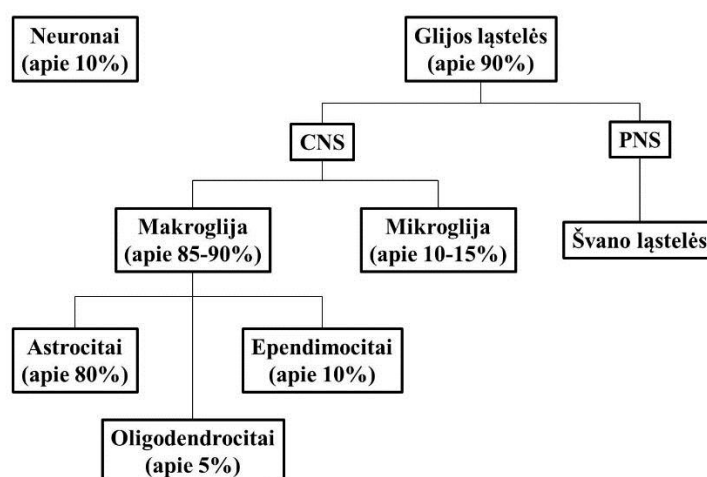
1. Išskirti ir charakterizuoti ekstraląstelines vezikules iš žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių;
2. Generuoti laikinas žmogaus mikroglijos ląstelių NF- κ B-sekretuojamos šarminės fosfatazės reporterių linijas;
3. Įvertinti žmogaus pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių sekretuojamų ekstraląstelių vezikulių poveikį NF- κ B signaliniam keliui žmogaus mikroglijos ląstelėse.

1. Literatūrinė apžvalga

1.1. Žmogaus centrinė nervų sistema

Žmogaus galvos bei nugaros smegenys sudaro centrinę nervų sistemą (CNS). CNS nerviniame audinyje yra išskiriamos 2 pagrindinės ląstelių grupės: neuronai ir glijos ląstelės (1 pav). Neuronai reaguoja į aplinkos dirgiklius ir generuoja elektrinį potencialą, perduodamą nerviniams tinklams. Glijos ląstelės yra pagalbinės, jos padeda neuronams atlikti savo funkciją, taip pat palaiko nervinio audinio vientisumą, homeostazę¹¹. Glijos ląstelės sudaro didžiąją dalį visų CNS ląstelių (~90 %) ir yra skirtingos. Centrinėje nervų sistemoje yra išskiriamos kelios glijos ląstelių rūšys: astrocitai, oligodendrocitai, ependimocitai ir mikroglijos ląstelės¹².

NERVINIO AUDINIO LĄSTELĖS



1 pav. Nervinių ląstelių skirstymas. Visos nervinio audinio ląstelės skirstomos į pagrindines 2 grupes: neuronus ir glijos ląsteles. Glijos ląstelės dar skirstomos į CNS ir PNS ląsteles. CNS ląstelėms priskiriami astrocitai, oligodendrocitai, ependimocitai ir mikroglijos ląstelės, o PNS – Švano ląstelės¹²

1.2. Mikroglijos ląstelės

Pirmą kartą mikroglijos ląstelės buvo aprašytos ispanų neuromokslininko *Rio-Hortega* 'os 1932-aisiais metais. Mikroglijos ląstelės yra vienbranduolės ląstelės, kilusios iš mezodermos. Jų mieloidiniai pirmtakai aptinkami trynio maišelyje ankstyvose embriono vystymosi stadijose (~4 vystymosi savaitę). Ląstelės diferencijuoja ir įgauna ameboidinę

išvaizdą, migruoja į smegenis. Tokios ląstelės yra vadinamos mikrogliaocitais. Po gimimo ameboidinė mikroglija diferencijuojama ir virsta ramybės būsenos mikroglia¹³.

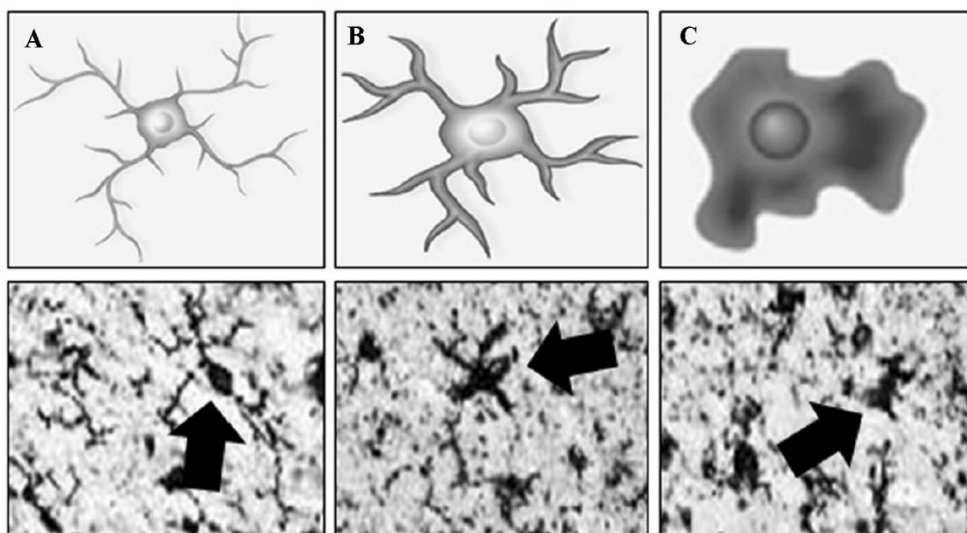
Žmogaus smegenys yra saugomos kraujo – smegenų barjero (angl. *blood – brain barrier*, BBB), kuris riboja periferinių ląstelių bei patogenų patekimą į smegenis. Už CNS nervinio audinio homeostazės palaikymą yra atsakingi specifiniai makrofagai – mikroglijos ląstelės¹⁴. Mikroglijos ląstelės atlieka 2 pagrindines funkcijas: palaiko homeostazę ir sukelia imuninį atsaką į pažeidimą. Mikroglijos ląstelės nuolat „skenuoja“ savo aplinką ir ieško išorinio pažeidimo (patogenų) arba vidinio pažeidimo (pažeistų ar mirštančių ląstelių) signalų. Šie signalai indukuoja mikroglijos atsaką, ląstelės yra aktyvinamos². Yra skiriamos 3 mikroglijos ląstelių būsenos: ramybės, aktyvinta ir fagocitinė.

1.3. Mikroglijos ląstelių morfologija ir funkcijos

Kaip jau minėta, yra skiriamos 3 mikroglijos ląstelių būsenos. Mikroglijos ląstelėms pereinant iš vienos būsenos į kitą, pakinta genų ekspresija, ląstelės keičiasi morfologiškai ir atlieka skirtingas funkcijas (2 pav).

Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms mikroglijos ląstelės yra ramybės būsenoje. Jos turi mažą kūną ir daug šakotų ataugų. Ląstelių ataugose yra gausu receptorių, kurie padeda įvertinti mikroaplinkos būklę. Kiekviena mikroglijos ląstelė veikia griežtai apibrėžtoje teritorijoje, ~50 000 μm^3 . Mikroglijos ląstelės šią teritoriją nuolat tikrina, judėdamos 1,2 – 1,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ greičiu, tuo pačiu metu, ląstelės judina savo ataugėles, jas sutraukdamos ir ištempdamos, ataugėlių ilgis keičiasi 2 – 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ ¹². Bet kokį CNS pažeidimą (infekcinį ar neinfekcinį) lydi uždegimas, kurio metu yra aktyvinamos mikroglijos ląstelės.

Paveikus dirgikliu (patogenu, svetima medžiaga, mirštančių ląstelių išskiriamomis medžiagomis ar virusų ląstelių liekanomis) mikroglijos ląstelės yra aktyvinamos. Ląstelės kinta morfologiškai – įgauna ameboidinę formą, ataugos sutrumpėja, pakinta paviršinių receptorių raiška. Ameboidinės mikroglijos ląstelės telkiasi aplink pažeidimo vietą. Šie fenotipiniai ir morfologiniai pakitimai yra būdingi ląstelei pereinant iš ramybės būsenos į aktyvuotą¹⁵. Manoma, kad mikroglijos ląstelės aktyvacijos piką pasiekia praėjus 3 dienoms nuo uždegimo pradžios. Jei per tiek laiko mikrogliją aktyvinantys stimulatoriai nėra pašalinami, ląstelės gali tapti hiperaktyvios. Mikroglijos hiperaktyvacija gali sukelti lėtinį nervinio audinio uždegimą ir taip nulemti neurodegeneracinės ligos atsiradimą ir vystymąsi¹⁴.



2 pav. Mikroglijos ląstelių morfologija. Schematinis ir fotomikrografinis mikroglijos būsenų vaizdas. Ramybės būsenos ląstelės (A) pasižymi nedideliu kūnu ir plonomis šakotomis ataugėlėmis. Ląstelės paveikus dirgikliu, jos yra aktyvuojamos (B), ląstelės kūnas padidėja, ataugos sutraukiamos, ląstelės išskiria uždegimą skatinančias molekules. Pažeidimui tęsiantis, nervinės ląstelės žūva. Žuvusių ląstelių liekanas pašalina fagocitinę būseną įgavusios mikroglijos ląstelės (C). Tokios ląstelės įgyja ameboidinę formą, neturi ataugų ir pasižymi fagocitiniu aktyvumu¹⁶

1.4. Mikroglijos aktyvaciją lemiantys veiksniai

Mikrogliją aktyvinantys signalai skirstomi į 2 grupes. Išjungimo signalai (anlg. *off – signals*) atsiranda sutrikus signalo perdavimui nerviniame tinkle. Toks pakitimas siejamas su įprastai sintetinamų molekulių struktūriniais ir raiškos pokyčiais. Įjungimo signalai (angl. *on – signals*) yra sukeliama molekulių, atsiradusių dėl ląstelių pažeidimo ar svetimos, invazinės medžiagos¹⁷. Mikroglijos ląstelės gali aktyvinti įvairūs infekciniai veiksniai, tokie kaip prionai, bakterijų išorinės sienelės komponentai ir kt. Esant kraujo – smegenų barjero laidumo sutrikimams, mikrogliją aktyvina kraujyje cirkuliuojančios medžiagos. Mikroglijos ląstelės komunikuoja tarpusavyje. Aktyvintos ląstelės gali inicijuoti greta esančių mikroglijos ląstelių aktyvaciją¹⁸. Mikrogliją aktyvinti gali tiek endogeniniai, tiek egzogeniniai signalai.

1.4.1. Egzogeniniai signalai

Sveikoje suaugusio žmogaus CNS mikroglijos ląstelės sąveikauja su kaimyninėmis glijos ląstelėmis (astrocitais, oligodendrocitais) ir neuronais. Ši sąveika yra lemiamą ląstelių paviršiuje esančių receptorių ir jų ligandų (3 pav). Ligandai gali būti sintetiniai sveikų neuronų, ekspresuojami jų membranose arba gali būti patogeninės kilmės. Šių receptorių

aktyvinimas per aibę uždegiminių molekulių ar patogenų lemia staigų ramybės būsenoje esančios mikroglijos ląstelių virimą į efektorines ląsteles. Toliau pateikiami keli egzogeninių signalų pavyzdžiai.

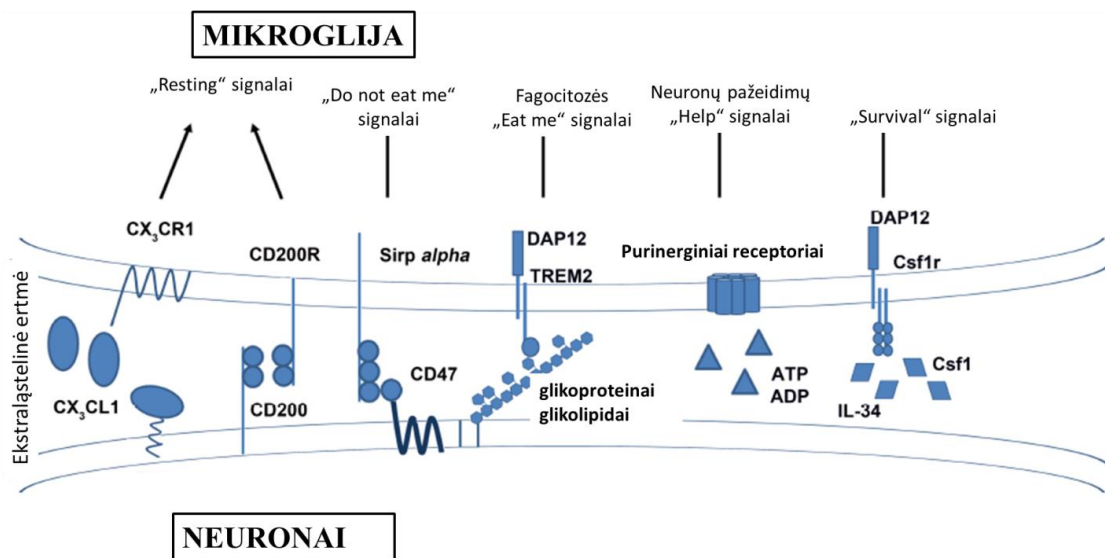
CD200 yra paviršinė neuronų ir glijos ląstelių membranos molekulė. Molekulę apibrėžia du imunoglobuliniai domenai. Šios molekulės receptoriai (CD200R) yra ekspresuojami mikroglijos ląstelių. Ligando ir receptorių sąveika palaiko mikrogliją ramybės būsenoje. Sumažėjus CD200 ligando kiekiui, pažeidžiamas signalas ir mikroglija pereina į aktyvią būseną¹⁹.

Fraktalkinas (CX3CL1) yra ekspresuojamas neuronų ir yra vienas iš signalų, kuris stabdo mikroglijos aktyvinimą. Fraktalkinas palaiko mikroglijos ląsteles ramybės būsenoje, jungdamasis prie specifinių receptorių – CX3CR1²⁰. Trūkstant CX3CR1 mikroglija yra hiperaktyvinama. Sumažėja imuninė tolerancija neuronams, sukeliamas neuronų mirtis, padidėja neurotoksiškumas. Šie pokyčiai yra siejami su neurodegeneracinių ligų vystymusi²¹.

Esant metaboliniam stresui arba pažeidimui mikroaplinkoje padaugėja ATP molekulių. ATP veikia per purinerginius mikroglijos receptorius (pavyzdžiui: P2X4; P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y12). Susijungimas su receptoriais lemia mikroglijos aktyvinimą, sukeliamas staigus atsakas pažeidimo vietoje. ATP taip pat veikia kaip chemotraktantas, pritraukiantis mikroglijos ataugas į pažeidimo vietą²².

1.4.2. Endogeniniai signalai

Visi anksčiau išvardinti veiksniai yra egzogeniniai, reguliuojantys mikroglijos ląsteles per paviršinius receptorius. Tačiau mikroglijos ląstelių augimas ir aktyvinimas yra stipriai kontroliuojamas tam tikrų endogeninių transkripcijos veiksnių, tokių kaip Runx1, Pu.1, Irf8, NF-κB bei Nrf2. Signaliniai keliai, į kuriuos įtraukti šie transkripcijos veiksniai, yra atsakingi tiek už mikroglijos vystymąsi, tiek už normalų jos funkcionavimą. Šių transkripcijos veiksnių reguliavimo sutrikimai gali nulemti mikroglijos morfologinius, funkcinius pokyčius bei netaisyklingą, hiperaktyvaciją²¹.



3 pav. Egzogeniniai mikroglijos aktyvavimo signalai ir jų receptoriai. Mikroglijos ląstelės turi grupę paviršinių receptorių, kurie lemia signalų perdavimą ramybės būsenoje. Daugelis ligandų yra išskiriami neuronų ar ekspresuojami jų membranų paviršiuje. Inhibitorinių receptorių (CX₃CR1, CD200R ir CD17a/Sirp *alpha*) ligandai yra sveikų neuronų paviršiaus molekulės. Signalo praradimas atitinkamai reiškia neuronų integralumo praradimą. Receptoriai (TREM2, purinerginiai receptoriai) yra jautrūs neuronų pažeidimams ir indukuoja fagocitinę priešuždegiminę mikroglijos funkciją. Mikroglijos ir neuronų bendradarbiavimas yra svarbus ir pačios mikroglijos išgyvenamumui. Neuronai atpalaiduoja veiksnius (IL-34 ir Csfl), kurie jungiasi prie CsflR mikroglijos paviršiuje ir veikia ląstelių išgyvenamumą bei proliferaciją²¹

1.5. Mikroglijos aktyvacijos principai

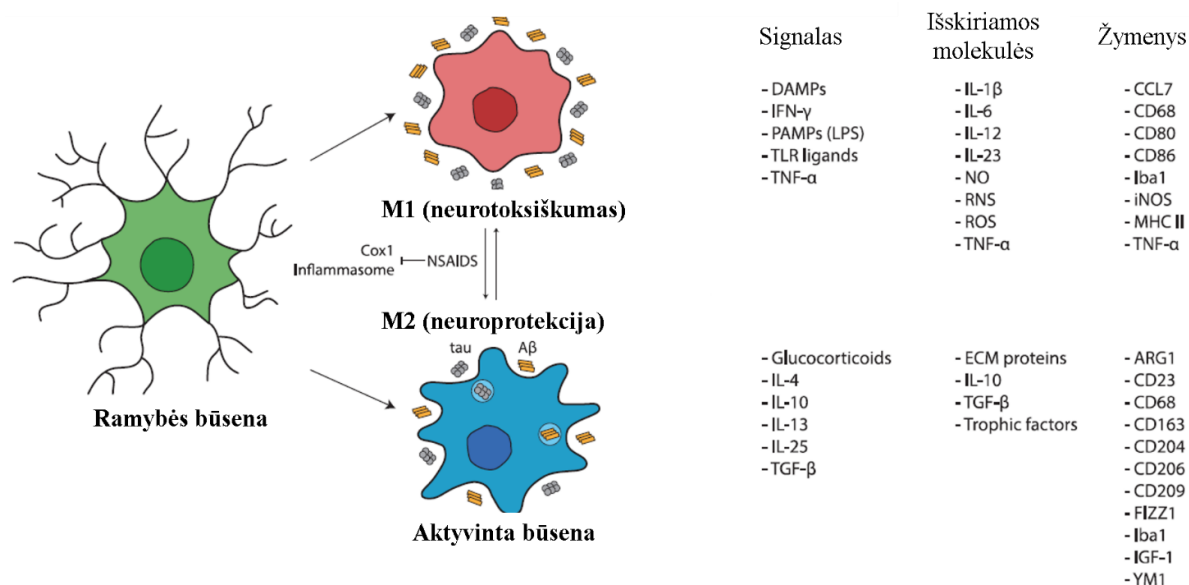
Neurouždegimas yra fundamentinis imuninis atsakas, kurio tikslas – apsaugoti organizmą nuo žalingų endogeninių ir egzogeninių veiksnių. Mikroglijos ląstelės yra specifinės smegenų imuninės ląstelės, kurios pirmosios sureaguoja į infekciją ar audinio pažeidimą, yra aktyvinamos ir sukelia uždegiminį atsaką²³.

Specifiniai audinių makrofagai turi receptorius, kurie atpažįsta molekulinę struktūrą (angl. *pattern recognition receptor*, PRR). Šie receptoriai atpažįsta dviejų tipų molekulinį žymenį: susijusius su patogenu (angl. *pathogen – associated molecular pattern*, PAMP) ir susijusius su pažeistomis, žuvusiomis ląstelėmis (angl. *damage – associated molecular pattern*, DAMP). Yra skiriamos 5 tokios žymenis atpažįstančių receptorių šeimos: *toll-like* (TLR), *RIG-I-like*, *NOD-like*, *C-type lectin like* bei citozoliniai DNR jutikliai²⁴.

Sudirginus mikroglijos ląstelių PRR receptorius ląstelės yra aktyvuojamos. Esant skirtingoms patofiziologinėms sąlygoms, mikroglijos ląstelės gali būti aktyvinamos dviem skirtingais būdais: klasikiniu ir alternatyviu (4 pav)²⁵. Aktyvinant ląsteles klasikiniu būdu, jos įgyja M1 fenotipą. Tokios mikroglijos ląstelės skatina uždegiminių procesus išskirdamos uždegiminius citokinus (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) ir chemokinus (CCL2, CCL20, CCR2). Alternatyvios aktyvacijos metu mikroglijos ląstelės įgyja M2 fenotipą. Tokios ląstelės išskiria prieš uždegiminius citokinus (IL-10, IL-13), jos yra svarbios uždegimo slopinimui ir audinio atstatymui²⁶.

Ląstelių poliarizaciją lemia receptoriaus ir ligando sąveika. Lipopolisacharidas (LPS), kuris yra bakterijų išorinės sienelės komponentas, jungiasi prie ląstelių TLR4 receptoriaus. Tuomet adaptorinių baltymų (MyD88 ir TRIF) pagalba paleidžiama signalinė kaskada. Signalo perdavimo metu, įvykus I κ B α baltymo fosforilinimui ir degradacijai, suaktyvinamas transkripcijos veiksnys NF- κ B²⁷. Klasikinės aktyvacijos metu, padidėja CD86, CD40, MARCO, MHC II paviršiaus žymenų raiška, išauga reaktyvių azoto ir deguonies formų produkcija, bei padidėja uždegiminių citokinių ir chemokinių sekrecija (4 pav)³.

Su specifiniais receptoriais susijungus IL-4 arba IL-10, mikroglija yra aktyvinama alternatyviai ir įgyja M2 fenotipą. Suaktyvinami transkripcijos veiksniai STAT3 ir STAT6. Sukeliamas prieš uždegiminis atsakas. M2 mikroglija išskiria prieš uždegiminius veiksnius (IL-4, IL-6, IL-10, IL-10R2), jos taip pat pasižymi padidėjusiu arginazės 1 (Arg-1) kiekiu, ekspresuoja manozės receptorius CD206³.



4 pav. Mikroglijos M1 ir M2 poliarizacijos schema. Ramybės būsenoje esančios mikroglijos ląstelės gavusios signalą gali būti aktyvinamos 2 būdais ir atitinkamai įgyti 2 skirtingus fenotipus. M1 yra klasikiniu būdu aktyvintos ląstelės, kurios skatina uždegiminius procesus. M2 fenotipo ląstelės yra aktyvintos alternatyviai ir veikia priešingai M1 ląstelėms. M2 ląstelės slopina uždegiminius procesus ir skatina audinio atstatymą. Poliarizacijos kryptį nulemia dirgiklis. M1 ir M2 mikroglijos ląstelės tarpusavyje skiriasi išskiriamomis medžiagomis bei paviršiaus žymenimis²⁸

1.6. NF-κB signalinis kelias

Pirmą kartą NF-κB transkripcijos veiksnys buvo aprašytas 1986-aisiais metais²⁹. Yra dvi pagrindinės priežastys, dėl kurių NF-κB sukėlė didžiulį susidomėjimą. Pirmoji – tai signalinio kelio aktyvacija. Šis kelias yra aktyvinamas įvairių stimulų, tokių kaip bakteriniai, virusiniai, grybeliniai produktai, oksidacinio streso molekulės, uždegiminiai citokinai. Antroji priežastis – tai funkcinė šio signalinio kelio reikšmė. Nustatyta, kad NF-κB tiesiogiai reguliuoja daugiau nei 100 genų – taikinių³⁰.

Žinduolių NF-κB baltymų šeimą sudaro 5 nariai (p50, p52, p65, Rel-B ir c-Rel). Visi šeimos nariai turi Rel homologo (RHD) domeną, kuris yra svarbus DNR prisijungimui ir dimerizacijai³¹. Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms NF-κB veiksnys yra randamas citozolyje, neaktyvios formos, susijungęs su inhibuojančiu IκBα baltyminiu subvienetu. NF-κB aktyvaciją gali sukelti uždegiminiai citokinai, mitogenai, UV spinduliuotė ir oksidacinio streso metu susidarę oksidantai. Aktyvios NF-κB formos gali būti heterodimerai, dažniausiai

sudaryti iš p50 ir p65 narių, arba homodimerai. Aktyvūs dimerai jungiasi prie 10-ties bp sekos genų promotorių κ B srityse ir indukuoja genų ekspresiją³².

NF- κ B signalinis kelias yra glaudžiai susijęs su uždegiminių procesų reguliacija. NF- κ B transkripcijos veiksnys indukuoja uždegiminių genų ekspresiją imuninėse ląstelėse, taip pat reguliuoja šių ląstelių aktyvinimą, diferenciaciją ir funkcionalumą. Žinoma, kad NF- κ B signalinis kelias dalyvauja ir inflamasmų aktyvinime, taip papildomai reguliuodamas uždegiminius procesus. Bet koks nukrypimas nuo normalaus NF- κ B signalinio kelio veikimo yra lėtinio uždegimo bruožas. Dėl to NF- κ B signalinio kelio veikimo principų išaiškinimas galėtų būti tikslingai pritaikytas uždegiminių ligų, tokių kaip neurodegeneracinės ligos, gydymui²⁷.

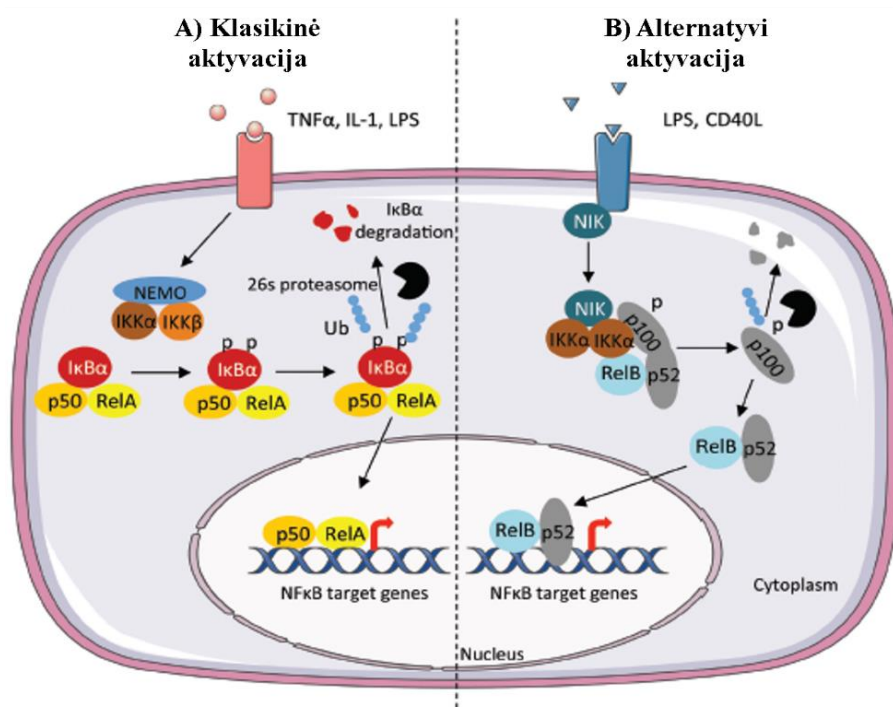
1.7. NF- κ B signalinio kelio aktyvacija

Yra išskiriami 2 NF- κ B signalinio kelio aktyvacijos būdai, lemiantys genų taikinių ekspresiją: klasikinis ir alternatyvus (5 pav).

Klasikinės aktyvacijos metu, NF- κ B signalinis kelias reaguoja į įvairius išorinius stimulus. Signalo perdavimas suaktyvinamas prie specifinių receptorių prisijungus ligandui. Su NF- κ B klasikine aktyvacija siejami tokie receptoriai kaip: citokinų receptoriai, PRR, TNF receptorių (TNFR) superšeimos nariai bei T- ir B- ląstelių receptoriai³³. Receptoriui susijungus su ligandu suaktyvinamas I κ B kinazės kompleksas (IKK). Šį kompleksą sudaryto 3 subvienetai: IKK α , IKK β ir reguliatorinis subvienetas IKK γ (kitaip vadinamas NEMO)³⁴. Aktyvuota kinazė fosforilina inhibitorinį I κ B baltymą per 2 N-gale esančias serino amino rūgštis. Taip I κ B baltymas yra pažymimas ubikvitilinizacijai ir degradacijai 26S proteosomoje. Suirus inhibitoriniam baltymui, NF- κ B transkripcijos veiksnio aktyvūs dimerai perkeliama į ląstelės branduolį, kur jungiasi su genų taikinių promotoriuose esančiomis sekomis ir aktyvina jų transkripciją³⁵.

Alternatyvios aktyvacijos metu NF- κ B signalinis kelias selektyviai reaguoja į specifinius stimulus. Šiems stimulams prisikiriami ligandai, kurie jungiasi su TNFR superšeimos pogrupio receptoriais: LT β R, BAFFR, CD40 bei RANK³⁶. Alternatyvios aktyvacijos metu nevykdoma I κ B inhibitorinio baltymo degradacija. Pagrindinė šio aktyvacijos kelio signalinė molekulė yra NF- κ B indukuojanti kinazė (NIK)³⁷. Ji jungiasi su IKK komplekso α subvienetu. Taip nulemiamas NF- κ B p100 baltymo ubikvitilinizimas ir apdorojimas. Modifikacijų metu yra degraduojama baltymo C-gale esanti struktūra, prijungianti I κ B

molekulę. Taip atsipalaiduoja ir susiformuoja aktyvus NF- κ B p52, kuris jungiasi su RelB baltymu ir sudaro aktyvų dimerą. Šis dimeras yra perkeliamas į ląstelės branduolį, kur kaip ir klasikinės aktyvacijos atveju jungiasi prie genų taikinių promotorinių sekų ir lemia specifinių genų transkripciją³⁶.



5 pav. NF- κ B signalinio kelio aktyvacija. A) Klasikinis aktyvacijos kelias, kurio metu suaktyvinamas IKK kinazės kompleksas. Vykstant fosforilinimui I κ B yra pažymimas ir ubiquitilinas. Atpalaiduojamas NF- κ B transkripcijos veiksnys. B) Alternatyvi aktyvacija, kurios metu veikiant NIK baltymui, keičiama NF- κ B p100 subvieneto struktūra ir taip atpalaiduojamas transkripcijos veiksnys nuo I κ B inhibitorinio baltymo. Aktyvus transkripcijos veiksnys perkeliamas į branduolį, kur jungiasi su DNR specifinėje geno promotoriaus srityje ir skatina geno ekspresiją³⁸

Mikroglijos ląstelių poliarizaciją reguliuoja signalai perduodami per *toll-like* receptorių (TLR). Lipopolisacharidas (LPS), kuris yra bakterijų sienelių sudedamoji dalis, jungiasi prie TLR4 receptoriaus, tuomet padedant adaptoriniams baltymams MyD88 ir TRIF inicijuojama signalinė kaskada. Jos metu suaktyvinamas NF- κ B transkripcijos veiksnys ir indukuojama genų – taikinių transkripcija²⁷.

Klasikinį NF-κB aktyvacinį kelią inicijuoja visi imuninio atsako stimulatoriai. Tuo tarpu alternatyvi aktyvacija vyksta kaip pagalbinis procesas klasikinei aktyvacijai ir padeda reguliuoti adaptyvios imuninės sistemos specifines funkcijas³⁹.

1.8. Ekstraląstelinės vezikulės

Ląstelių tarpusavio komunikacija yra labai svarbi kiekvienam daugialąsčiam organizmui. Ląstelės keičiasi informacija išskirdamos tirpius veiksnius, per tiesioginę sąveiką arba membraninės kilmės vezikulių pagalba⁴⁰. Tokios vezikulės pirmą kartą buvo aprašytos beveik prieš 30 metų. Nuo tada ekstraląstelinės vezikulės (EV) buvo išskirtos iš daugybės ląstelių linijų, tarp kurių ir kamieninės ląstelės, imuninių ląstelių pirmtakai, nervinės ląstelės ir vėžinės ląstelės. Vis daugėja įrodymų, kad EV yra svarbios ne tik reguliuojant normalius fiziologinius procesus, bet ir esant patologinėms sąlygoms⁴¹.

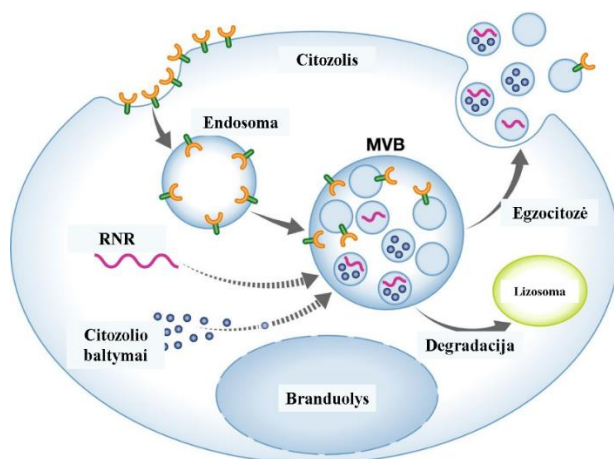
Visos EV gali būti skirstomos į kelias grupes, atsižvelgiant į jų kilmę, biologinę funkciją ir biogenezę. Pagrindinėms EV priskiriamos mikrovezikulės (MV), egzosomos ir apoptotiniai kūneliai (1 lentelė). Be pagrindinių EV yra skiriamos ir papildomos: į egzosomas panašios vezikulės bei membraninės dalelės. Audinio ekstraląstelinėje aplinkoje skirtingos EV yra aptinkamos vienu metu. Ekstraląstelių vezikulių dydis varijuoja nuo 30 nm iki 5 μm. Jos taip pat skiriasi savo biogenezės mechanizmais ir specifiniais žymenimis. Toliau detaliau aptarsime tik EV, vadinamas egzosomomis⁴².

1 lentelė. Ekstraląstelių vezikulių klasifikacija⁴³

Rūšis	Dydis, nm	Kilmė	Sudėtis
Mikrovezikulės	100-1000	Iš plazminės membranos, pumpuravimosi būdu	Aktinas, tubulinas, integrinas β1, miRNR
Egzosomos	30-150	Iš endosomų daugiapūslelinių kūnelių, egzocitozės būdu	Hsp, aktinas, tubulinas, MHC molekulės, CD63, CD81, CD82, CD9, miRNR, mRNR ir kt (žr. pav. Nr. 8)
Apoptotiniai kūneliai	1000-5000	Iš plazminės membranos ląstelei apoptuojant	Aneksinas V, C3b, ląstelės komponentai

1.9. Egzosomų biogenezė

Egzosomos susiformuoja endosomose. Pirmiausia susiformuoja ankstyvoji endosoma. Ankstyvoji endosoma susijungia su endocitinėmis pūslelėmis, kuriose surinktos medžiagos degradacijai, perdirbimui ar egzocitozei⁴⁴. Tokia pirminė endosoma pereina kelias transformacijos stadijas ir virsta vėlyvąja endosoma. Šios transformacijos metu, vezikulėje esančios medžiagos yra perpakuojamos į nedideles pūsleles ir prisitvirtina prie endosomos vidinės membranos pusės. Tokia endosoma vadinama daugiapūsleliniu kūneliu (angl. *multi-vesicular body*, MVB). Vėlyvoji endosoma toliau tikslingai jungiasi su lizosoma, jei medžiagas reikia degraduoti, arba su plazmine membrana. Jei endosoma susijungia su plazmine membrana, viduje buvusios pūslelės yra išskiriamos į ląstelės aplinką, vyksta egzocitozė. Į aplinką išskirtos 30 – 150 nm diametro pūslelės yra vadinamos egzosomomis (7 pav)^{45 46}.

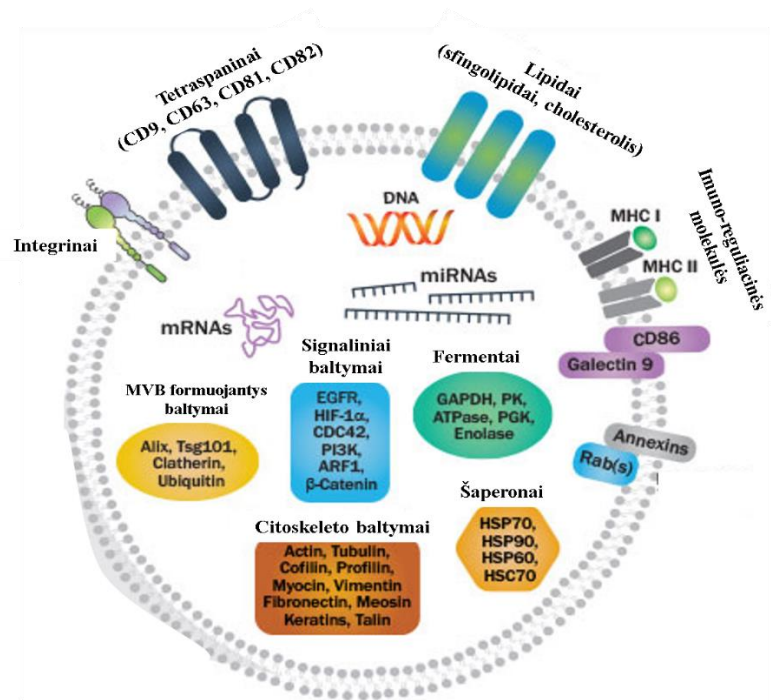


7 pav. Egzosomų biogenezė. Ląstelės plazminė membrana įlinksta, vyksta endocitozė. Susiformuoja ankstyvoji endosoma, užpildyta ekstraląsteliniu skysčiu. Toliau vystosi vėlyvoji endosoma – daugiapūslelinis kūnelis. Daugybinių pūslelių susiformuoja endosomos lipidiniam bisluoksniui linkstant į vidų ir atsipumpuruojant. Vidinės pūslelės yra užpildytos citozoliu ir jame esančiomis medžiagomis: baltymais, lipidais, RNR fragmentais. MVB gali susijungti su lizosoma arba su plazmine membrana. Vykstant egzocitozei, pūslelės yra išskiriamos į ekstraląstelinę ertmę⁴⁷

1.10. Egzosomų sandara

Kaip jau minėta, egzosomos yra 30 – 150 nm diametro pūslelės, ribojamos fosfolipidinio bisluoksniu. Egzosominių pūslelių turinį sudaro įvairios biologiškai aktyvios

medžiagos (8 pav). Egzosomose identifikuota įvairovė skirtingų baltymų, lipidų, taip pat genetinės medžiagos dalelių: DNR fragmentų, mRNA bei regulatorinių mikroRNR^{48 49}.



8 pav. Egzosomų struktūra. Egzosomų sudėtis priklauso nuo ląstelės šeimininkės. Visas egzomas riboja fosfolipidinis bisluoksnis, į kurio sudėtį įeina membraniniai baltymai, lipidai, antigeną pateikiančios molekulės. Egzosomų viduje gausu reguliacinių, signalinių, struktūras formuojančių baltymų, fermentų, taip pat DNR bei RNR fragmentų⁵⁰

Nustatyta, kad egzosomų baltymų sąstatas priklauso nuo to, iš kokių ląstelių jos buvo išskirtos. Egzosomose nustatyti citozolio baltymai, tokie kaip Rab, aneksinai, reguliuojantys membranų citoskeleto dinamiką ir padedantys membranoms susiliesti. Taip pat egzomoms būdingos adhezijos molekulės (CD146, CD9, CD18). Aptinkama ir antiapoptotinių baltymų: tioredoksin peroksidazė II, galektinas 3. Egzosomose nustatomi metaboliniai baltymai: GTPazės, peroksidazės, piruvatų ir lipidų kinazės^{51 42}.

Kaip ir baltymai, egzosomose esantys lipidai priklauso nuo jas išskiriančių ląstelių kilmės. Egzosomų sudėtyje paprastai randama cholesterolio, digliceridų, sfingolipidų, fosfolipidų, glicerolfosfolipidų. Taip pat egzomose nustatyta biologiškai aktyvių lipidų, tokių kaip prostaglandinai ir leukotrienai, aktyvuoti lipidų metabolizmo fermentai, kurie gali generuoti biologiškai aktyvius lipodus⁵².

Egzosomose aptinkama ir genetinės medžiagos: DNR fragmentų, matricinės RNR fragmentų bei mikroRNR, pastaroji sudaro didžiąją dalį egzosomose aptinkamos genetinės medžiagos. Egzosominė mRNR yra susijusi su ląstelių ciklu, augimu, angiogeneze, migracija ar histonų modifikacijomis. mikroRNR yra specifinė, reguliuojanti konkrečių genų ekspresiją ir po-transliacinės modifikacijas. Egzosomose aptinkama daugiau nei 120 skirtingų mikroRNR⁵³.

Egzosomų sudėtis gali kisti. Šie pokyčiai priklauso nuo jas formuojančių ląstelių ir jų būsenos: aktyvumo, streso sąlygų, augimo ciklo stadijos.

1.11. Egzosomų funkcijos

Egzosomos yra svarbi ląstelių tarpusavio komunikavimo priemonė. Donorinės ląstelės į egzomas supakuoja specifines medžiagas (baltymus, lipidus, DNR bei RNR fragmentus). Pūslelės egzocitozės būdu yra išskiriamos į ekstraląstelinę ertmę. Egzosomos gali veikti šalia esančias ląsteles arba gali migruoti per organizmo cirkuliacinę sistemą į kitus organus ar audinius ir paveikti ten esančias ląsteles⁵⁴.

Egzosomos aplinkines ląsteles gali veikti skirtingais būdais. Egzosomų fosfolipidų bisluoksnio molekulės (receptoriai, baltyminiai kompleksai, lipidai, antigeną pateikiančios molekulės) gali jungtis prie recipientinių ląstelių išorėje esančių receptorių ir taip inicijuoti signalinių kelių aktyvaciją. Tokiu būdu perduodama informacija, ląstelėms tiesiogiai nekontaktuojant tarpusavyje. Taip pat egzosomos gali susiliesti su recipientine ląstele vykstant endocitozei. Susiliejęs membranoms, egzosomų viduje supakuotos medžiagos patenka į ląstelės citozolį, o fosfolipidų dvisluoksnis gali įsiterpti į recipientinės ląstelės plazminės membranos sudėtį⁵⁵.

1.12. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskiriamos egzosomos

Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) yra atsinaujinančios, multipotentinės progenitorinės ląstelės, kurios gali būti išskirtos iš įvairių audinių: kraujo, kepenų, amnioninio skysčio, placentos, danties pulpos ir kitų⁶. Klinikiniuose tyrimuose joms skiriama labai daug dėmesio dėl jų daugybinių biologinių funkcijų: daugiakryptės diferenciacijos, audinio atnaujinimo, priešūždegiminio poveikio, imunosupresijos ir neuroprotekcijos⁵⁶. Iš pradžių manyta, kad MKL migruoja į pažeistą audinį, diferencijuoja ir pakeičia pažeistas ląsteles. Vėliau paaiškėjo, kad toks kamieninių ląstelių įsitraukimas į pažeidimo sutvarkymą yra palyginus neryškus. Kadangi žinoma, kad egzosomos dalyvauja

palaikant ląstelių tarpusavio kontaktą, buvo iškelta hipotezė, kad egzomosos gali veikti kaip parakrininiai MKL veiksniai⁸.

MKL išskiria daugiau egzomosų, lyginant su kitomis ląstelėmis. Iš šių kamieninių ląstelių išskirtos egzomosos pasižymi ne tik įprastais paviršiaus žymenimis (CD9, CD81), bet taip pat ir MKL būdingomis paviršiaus adhezijos molekulėmis: CD29, CD44, CD73. Tačiau morfologiškai iš MKL išskirtos egzomosos nesiskiria nuo kitų ląstelių išskiriamų egzomosų. Žmogaus MKL sekretuojamose egzomosose taip pat yra įvairių baltymų, lipidų bei genetinės medžiagos fragmentų, kurių pagalba egzomosos perduoda signalus kitoms ląstelėms⁴³.

Pastaruoju metu intensyviai tiriamos MKL išskiriamų egzomosų terapinio panaudojimo galimybės. Egzomosos, kaip terapijos priemonė, turi keletą svarbių privalumų. Visų pirma, gydymui būtų naudojamos ne pačios ląstelės, o jų išskiriamos medžiagos, taip išvengiant galimo infekcijų pavojaus⁵⁷. Taip pat egzomosos gali prasiskverbti per kraujo – smegenų barjerą ir tiesiogiai veikti nervinį audinį⁵⁸.

1.13. Egzomosų panaudojimas ligų gydymui

Pastaruoju metu daug dėmesio skiriama išaiškinti egzomosų panaudojimo galimybes ligų gydyme. Yra atlikta nemažai tyrimų, parodančių, kad iš kamieninių ląstelių išskirtos egzomosos gali būti panaudojamos širdies, inkstų, vėžio ar neurodegeneracinių ligų gydymui.

R. C. Lai'o atliktas tyrimas parodė, kad iš MKL išskirtos egzomosos gali būti panaudotos miokardo infarkto sukeltam pažeidimui sumažinti. Pirminiai stebėjimai parodė, kad ne pačios kamieninės ląstelės padeda atstatyti pažeistą audinį, didelę reikšmę tam turi jų išskiriamos medžiagos. Remiantis elektorine mikroskopija buvo nustatyta, kad kamieninės ląstelės išskiria ne tik tirpius augimo veiksnius, citokinus, bet ir lipidines pūsleles – egzomasas. Tyrimo metu buvo išgryninta homogeninė egzomosų grupė. Egzomosų poveikis miokardo pažeidimų atstatymui buvo pademonstruotas panaudojant pelių modelį. Nustatyta, kad egzomosos pagerina audinio atstatymą 10 %⁵⁹.

Kita tyrėjų grupė pademonstravo, kad egzomosos gali padėti gydyti Hepatito C. Hepatito C viruso sukeltos ligos yra didelė problema visame pasaulyje, vis dar ieškoma efektyvios, kiekvienam pacientui prieinamos, nebrangios gydymo terapijos. X. Quian'as pademonstravo, kad iš žmogaus MKL išskirtos egzomosos sumažino HCV sukeltą infekciją *in vitro*. Nustatyta, kad infekcija yra sumažinama veikiant virusinę replikaciją. Kamieninių ląstelių išskiriamos egzomosos pasižymi įvairove miRNR, kurios reguliuoja genų transkripciją.

Tyrimo metu buvo įvardintos kelios miRNR (let-7f, miR-145, miR-199a ir miR-221), kurios siejamos su virusinės infekcijos sumažinimu *in vitro*⁶⁰.

MKL išskiriamos egzomosos gali turėti didelės reikšmės ir neurodegeneracinių ligų gydymui. 2012-aisiais metais *H. Xin* 'as atliko tyrimą, kurio metu nustatė, kad iš MKL išskirtos egzomosos padeda atstatyti neuronų ir astrocitų augimą. Buvo nustatyta, kad išskirtose egzomosose yra dideli kiekiai miR-133b. Per egzomas šios reguliacinės miRNR dalelės pernešamos į neuronus ir astroцитus. Ląstelėse miRNR reguliuoja genų veiklą ir skatina ląstelių augimą ir atsinaujinimą⁶¹.

Nustatyta, kad MKL išskiriamos egzomosos veikia uždegiminius procesus. *X. Li* 'as pristatė tyrimą, kurio metu stebėjo, kaip egzomosos veikia nudegimo sukeltus uždegiminius procesus pelių modeliuose. Nustatyta, kad egzomosos uždegiminius procesus slopina, veikdamos NF-κB signalinį kelią per TLR4 receptoriaus reguliaciją. Taip pat buvo pademonstruota, kad poveikį lėmė egzomosose esanti miRNR-181⁶².

Neurodegeneracinių ligų atvejais žmogaus mikroglijos ląstelės dažnai yra hiperaktyvios. Ląstelėse yra padidėjęs NF-κB signalinio kelio aktyvumas, mikroglija negrįžta į ramybės būseną, prasideda lėtinis uždegimas⁶³. Todėl šiame darbe tyrėme, kaip žmogaus PDPKL sekretuojamos EV veikia NF-κB signalinio kelio aktyvumą žmogaus mikroglijos ląstelėse.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos ir aparatūra

2.1.1. Ląstelės

- Komercinė imortalizuota žmogaus mikroglijos ląstelių linija (imortalizuota, panaudojant virusą SV40) (*Applied Biological Materials*);
- 6 metų amžiaus vaiko pieninio danties pulpos kamieninės ląstelės (PDPKL; bioetikos leidimas: Nr. 6B-08-173)

2.1.2. Medžiagos

Ląstelių kultivavimui:

- FBS (angl. *fetal bovine serum*, „Thermo Fisher“);
- penicilinas–streptomicinas („*Biological Industries*“);
- DMEM (angl. *dulbecco's modified eagle's medium*, „Life technologies“);
- MSC NutriStem XF Basal medium (angl. *Xeno and serum – free medium for culture of hMSC's*, „*Biological Industries*“);
- MSC NutriStem XF papildas („*Biological Industries*“);
- kolagenas („*Life technologies*“);
- tripsinas–EDTA 0,25 % (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, „Life technologies“);
- plastikiniai auginimo flakonai („TPP“);
- plastikiniai mėgintuvėliai („TPP“)
- 6, 24 ir 96 šulinėlių lėkštelės („TPP“)

Bakterijų auginimui:

- Fast-media Zeo Agar („*InvivoGen*“);
- Fast-media Zeo TB („*InvivoGen*“);
- Petri lėkštelės („TPP“)

Plazmidės restrikcinė analizė:

- Plazmidė NiFty2-SEAP („InvivoGen“)
- SmaI (10 U/μL) („Thermo Fisher“);
- HindIII (10 U/μL) („Thermo Fisher“);
- Buffer R (10x) („Thermo Fisher“);
- Tango buffer (10x) („Thermo Fisher“);
- TopVision Agarose („Fermentas“);
- 10x TBE buffer („Bio – Rad“);
- 6x DNA Loading Dye („Fermentas“);
- Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus („Fermentas“);
- etidžio bromidas („AppliChem“)

Ląstelių ir EV baltyminių imuninė analizė:

- polivinildifluorido membranos *Trans-Blot Turbo Transfer Pack* („BIO–RAD“);
- poliakrilamido geliai („BIO–RAD“);
- PBS (angl. *phosphate buffered saline*, „Biochrom“);
- Tween-20 („BIO–RAD“);
- albuminas pH 7,0 („Applichem“);
- baltymų žymuo *PageRuler Prestained Protein Ladder* („Thermo Fisher“);
- benzonazė („Merck“);
- krienų peroksidaze („Pierce“);
- antikūnai („Cell Signaling“);
- proteazių inhibitorių mišinys („SIGMA“);
- proteazių mišinys *Complete* („Roche“)

Kitos medžiagos:

- LPS (angl. *Lipopolysaccharides from Escherichia coli*, „Sigma–Aldrich“);
- antikūnas Ms mAb to TLR4 [HTA125] („Abcam“)
- zeocinas („InvivoGen“)

Rinkiniai:

- Plazmidės gryninimo rinkinys *EndoFree Plasmid Maxi Kit* („Qiagen“);

- Mikroglijos ląstelių transfekcijos rinkinys *AmayaTM SG Cell Line 4-D-NucleofectorTM X Kit L (24 RCT)* („Lonza“);
- Sekretuojamos šarminės fosfatazės analizės rinkinys *SEAP-Secreted Alkaline Phosphatase Assay Kit* („OZ Biosciences INC“)

2.1.3. Aparatūra

- inkubatorius („BINDER“);
- centrifūgos 2 -16 K ir 4 K 15 („Sigma“);
- šildoma vonelė („BIOSAN“);
- baltymų pernešimo aparatas *Trans – Blot Turbo* („BIO–RAD“);
- imunobloto vaizdinimo aparatas *ChemiDoc MP Imaging System* („BIO–RAD“);
- mikroskopas *Eclipse TS 100* („NIKON“);
- elektroforezės aparatas *Mini–PROTEAN 3* („BIO–RAD“);
- nanodalelių analizės aparatas *Nanosight LM10*;
- ultracentrifuga *Sorvall LYNX 6000* („Thermo Fisher“);
- fotometrai *NanoPhotometer* („Implen“) ir *BioPhotometer* („Eppendorf“);
- UV transiluminatorius *Gel Doc EZ Imager* („Bio – Rad“);
- absorbcijos skaitytuvas *Asys UVM340* („Biochrom“);
- inkubatorius *Environmental Shaker – Incubator ES-20* („Biosan“);
- nukleofektorius *4D-Nucleofector* („Lonza“)

2.2. Metodai

2.2.1. Žmogaus PDPKL kultivavimas

Po iškritimo pieninis dantis laikomas 4°C temperatūroje, DMEM (D-gliukozės koncentracija 1 g/l) auginimo terpėje su abtbiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu ne ilgiau nei 24 val. Prieš MKL išskyrimą dantis tris kartus plaunamas steriliu PBS tirpalu su antibiotikais: 200 VV/ml penicilino, 200 µg/ml streptomicino ir 2,5 µg/ml amfotericino 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 37 °C temperatūroje. Suspensija praskiedžiama 1:10 santykiu DMEM (1 g/l D-gliukozės) auginimo terpėje, papildytoje 10% FBS, 2 mM glutamino, 1 mM natrio

pirofosfato, 1g/l gliukozės ir antibiotikais 100 VV/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino. Ląstelių suspensija centrifuguojama 250 g, 15 min. kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ląstelių peletas suspenduojamas 5 ml auginimo terpės ir išsėjamas į 25 cm² flakoną. Kitą dieną sena terpė pašalinama, ląstelės 3 kartus plaunamos 37 °C PBS tirpalu. Ant ląstelių užpilama šviežios MSC NutriStem terpės (su antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomicinu). Ląstelės kultivuotos inkubatoriuje, 5 % CO₂ prisotintoje drėgnoje aplinkoje, 37 °C temperatūroje.

Ląstelėms pasiekus apie 80 % konfluenciją, jos persėtos. Pirmiausia nusiurbiamo auginimo terpė, tuomet ląstelės plaunamos PBS tirpalu ir užpilamos 0,05 % tripsino–0,02 % EDTA tirpalu. Ląstelės inkubuojamos 2 min., 37 °C temperatūroje. Ląstelėms atkibus nuo flakono dugno, užpilamas trigubas tūris auginimo terpės su serumu tripsino neutralizacijai. Ląstelių suspensija centrifuguojama 500 g, 5 min, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos auginimo terpėje ir perkeliamos į naujus 150 cm² flakonus. Po 24 valandų auginimo terpė švariai nusiurbiamo, ląstelės praplaunamos 3 kartus PBS tirpalu ir užpilamos šviežia MSC NutriStem auginimo terpe. Ląstelės augintos inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje, 5% CO₂ prisotintoje, drėgnoje aplinkoje. Kas 3–4 dienas nuo ląstelių surinkti supernatantai egzosomų skyrimui.

2.2.2. Egzosomų išskyrimas iš PDPKL diferencinio ultracentrifugavimo metodu

Egzosomos iš PDPKL ląstelių supernatantų buvo išskirtos diferencinio ultracentrifugavimo būdu. Ląstelių supernatantai centrifuguojami 300 g, 10 min., 4 °C temperatūroje (taip pašalinamos negyvos ląstelės). Gautas supernatantas centrifuguojamas 2000 g, 10 min., 4 °C temperatūroje (tokiu būdu yra pašalinamos ląstelių nuolaužos). Tuomet supernatantas centrifuguojamas 20 000 g, 30 min., 4 °C temperatūroje (pašalinama mikrovėzikulių frakcija). Surinktas supernatantas ultracentrifuguojamas 100 000 g, 70 min., 4 °C temperatūroje. Po šio etapo supernatantas pašalinamas, o iškritusios nuosėdos suspenduojamos 1 ml PBS tirpalo. Mėgintuvėlis papildomas 4 °C temperatūros PBS tirpalu. Kartojamas centrifugavimas ultracentrifugoje 100 000 g, 70 min., 4 °C temperatūroje. Po paskutinio centrifugavimo egzosomos suformuoja peletą. Supernatantas labai švariai pašalinamas nuo egzosomų peleto. Egzosomos suspenduotos 100 µl 4 °C temperatūros PBS tirpale, užšaldytos ir laikytos -70 °C temperatūroje iki panaudojimo.

2.2.3. Nanodalelių analizė

PDPKL išskirtos EV buvo analizuotos taikant nanodalelių analizę (angl. *nanoparticle tracking analysis*, NTA). Naudotas *Nanosight LM10* aparatas (Jungtinis gyvybės mokslų centras, Eukariotų genų inžinerijos laboratorija). NTA tikslas – nustatyti EV mišinyje esančių dalelių dydį ir koncentraciją.

2.2.4. Baltymų išskyrimas iš PDPKL ir jų EV

Baltymai iš PDPKL ir jų EV išskirti vykdant lizę. PDPKL ląstelės plaunamos šaltu PBS tirpalu (pH=7,3). Plovimas kartojamas 2 kartus. Toliau ląstelės suardomos lizės buferiniu tirpalu (1 5 NP-40, 1 % natrio dezoksicholato, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH=7,4), 10 mM EDTA, 1X proteazių mišiniu Complete, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF). Lizavimas vykdomas 30 min., 4 °C temperatūroje. Į gautą lizatą pridedama 2,5 VV/ml benzonazės ir homogenizuojama per 21 G adatą. Centrifuguojama 15 000 g, 30 min., 4 °C temperatūroje. Supernatantas saugomas – 70 °C temperatūroje.

Po EV išskyrimo iš PDPKL ląstelių, jos resuspenduotos 100 µl PBS tirpalo. Toliau atliktas EV lizavimas. EV suspensija papildoma 400 µl acetono tirpalo (99,8 %). Paliekama per naktį -20 °C temperatūroje. Suspensija nucentrifuguojama 18 000 g, 15 min. Susiformuoja EV peletas. Peletas nuplaunamas užpilant acetono tirpalo (80 %) ir centifuguojant 18 000 g, 15 min. Plovimas kartojamas 3 kartus. Susidariusios nuosėdos tirpinamos 35 µl 1X SB.

2.2.5. SDS/PAGE Elektroforezė

Į 100 µl ląstelių ir EV lizatų mėginius pilama 12,5 µl 0,5 M Tris/HCl pH=6,8, 30 µl 10 % SDS, 20 µl 0,5 M DTT, 20 µl glicerolio ir 5 µl 0,5 % bromfenolio mėlio. Mėginiai inkubuojami 5 min. 95 °C temperatūroje. Mėginiai iš karto naudojami elektroforezei arba gali būti saugomi -70 °C temperatūroje. SDS/PAGE elektroforezei naudoti 10 % SDS-poliakrilamido geliai, elektroforezės buferis (25 mM bazinio Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS). Elektroforezė atlikta naudojant *Mini Protein* („Bio-Rad“) aparatą. Elektorforezė vykdyta 1,5 valandos, naudojant 30 mA/geliui srovės stiprumą.

2.2.6. Baltymų pernešimas ant membranos ir imuninė baltymų analizė

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

Po baltymų perkėlimo, PVDF membranos inkubuojamos 1 valandą blokavimo tirpale (5 % albumino, ištirpinto PBS tirpale, turinčio 0,18 % Tween-20), kambario temperatūroje. Po inkubacijos membranos nuplaunamos PBS tirpalu, turinčiu 0,18 % Tween-20 (toliau PBS-Tween20). Plovimas kartojamas 3 kartus. Toliau membranos inkubuojamos su pirminiais antikūnais (2 lentelė), pagal gamintojo nurodymus, 4 °C temperatūroje ant orbitalinės maišyklės. Po to membranos plaunamos PBS-Tween20 tirpalu, plovimas kartojamas 3 kartus po 5 minutes. Po nuplovimo membranos inkubuojamos su antriniais antikūnais (2 lentelė), konjuguotais su krienų peroksidaze, praskiestais su PBS-Tween20 tirpalu. Inkubacija vykdoma 1 valandą, kambario temperatūroje. Po inkubacijos membranos plaunamos 5 kartus po 5 minutes su PBS-Tween20 tirpalu. Membranos analizuotos naudojant ECL reagentus, pagal gamintojo nurodymus. Naudoti antikūnai prieš baltymus: Hsp70, Mfg-E8, Sintetinas-1 ir LGR5.

2 lentelė. Baltyminei analizei naudoti antikūnai

#	Antikūnas	Su kuo reaguoja	Izotipas
1	Hsp70	H, M, R, C, D*	Mouse
2	Mfg-E8	H, M, R	Mouse
3	Syntetin-1	H, M, R	Mouse
4	LGR5	H, M, R	Mouse
5	Anti-mouse konjuguotas su krienų peroksidaze	M	Goat

*H – human, M – mouse, R – rat, C – chicken, D – dog

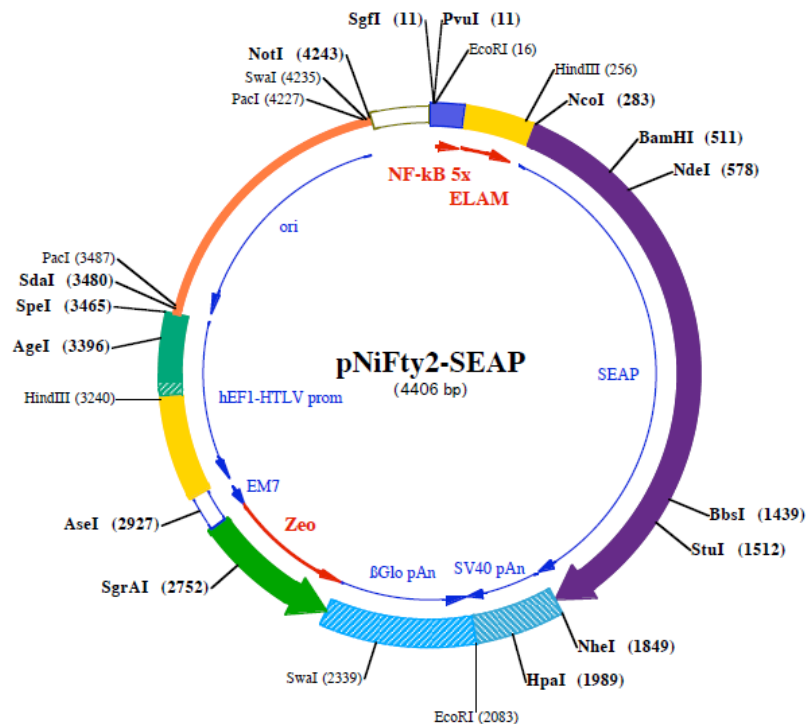
2.2.7. Egzosomų dozavimas

Eksperimentams naudojamos egzomosų dozės buvo nustatomos naudojant veikimo vienetus (VV). 1 VV – egzomos išskirtos iš supernatanto, kuris buvo surinktas nuo 2D sąlygomis kultivuotų PDPKL ląstelių (atitinkančių konfluenciją 37,5 cm² kultivavimo indo plote).

2.2.8. NiFty2-SEAP plazmidės paruošimas eksperimentui

Tyrimui naudota plazmidė NiFty2-SEAP yra sudaryta iš specifinių dalių (9 pav):

- Ori sritis – būtina plazmidės replikacijai bakterijose.
- NFκB-ELAM proksimalinis promotorius – veikia kaip reporterinio geno aktyvatorius.
- Reporterinis sekretuojamos šarminės fosfatazės (SEAP) genas – lemia šarminės fosfatazės sekreciją ląstelėje, suaktyvinus NF-κB signalinį kelią.
- Zeo seka – lemia ląstelės atsparumą antibiotikui zeocinui.



9 pav. NiFty2-SEAP plazmidės žemėlapis. Žemėlapyje nurodomos svarbiausios plazmidės dalys: Ori seka, NF-kB promotoriaus seka, reporterinio SEAP geno seka, Zeo seka, lemianti atsparumą antibiotikui zeocinui. Taip pat žemėlapyje pažymėtos vietos, kurias kerpa specifinės restrikcijos endonukleazės.

2.2.8.1. *E. coli* bakterijų transformacija

Transformacijai panaudotas *E. coli* DH5 α kamienas. Atšaldytos bakterijos užsėjamos į 5 mL LB (*Luria Bertani*) terpės ir auginamos 37 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną 100 μ L naktinės kultūros perkeliama į 4 – 5 ml šviežios LB terpės. Auginama 37 °C temperatūroje ~4 val., kol bakterijų tankis ($\lambda=600$ nm) pasiekia 0,4 – 0,6 optinius vienetus. Auginimas nutraukiamas mėgintuvėlius su kultūromis pamerkus į ledo vonią. Visos tolesnės procedūros atliektos ledo vonioje, naudoti iki 4 °C atšaldyti NaCl ir CaCl₂ tirpalai. Bakterijos surenkamos jas centrifuguojant 0°C temperatūroje 10 min. 2500 aps./min. greičiu. Bakterijos praplaunamos 2 ml NaCl tirpalo. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis, bakterijos resuspenduojamos 2 ml CaCl₂ tirpalo ir inkubuojamos 25 min. Po inkubacijos bakterijos surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas, bakterijos resuspenduojamos 100 – 250 μ L CaCl₂ tirpalo.

Transformuojant kompetentines *E. coli* ląsteles NiFty2-SEAP plazmidėmis, naudota 0,5 μ g/mL DNR koncentracija transformacijos mišinyje. Transformacijai plazmidė sumaišoma su 200 μ L kompetentinių bakterijų, mišinys 30 min. inkubuojamas ledo vonioje, po to 1-2

minutėms pernešamas į 42 °C vandens vonią. Po terminio šoko DNR ir bakterijų mišinys užpilamas kambario temperatūros LB terpe santykiu 1:10 ir inkubuojamas 1 val. 37 °C temperatūroje. Bakterijos surenkamos centrifuguojant 4 min. 4000 aps./min. greičiu, resuspenduojamos tinkamame išsėti LB terpės kiekyje ir išsėjamos.

2.2.8.2.Transformuotų *E.coli* atranka

Po transformacijos bakterijos išsėtos į paruoštas *Petri* lėkšteles su LB agaru terpe. Naudota mažai druskų turinti terpė: 5 g/l mielių ekstrakto, 10 mg/l Triptono, 5 g/l NaCl ir 15 g/l agarozės (pH ~7,5). Norint atrinkti sėkmingai transformuotas bakterijas, naudotas atrankos antibiotikas zeocinas. LB agaru terpėje naudota 25 µg/ml zeocino koncentracija. Bakterijos, kurios po elektroporacijos įsisavino tikslią plazmidę, įgija atsparumą specifiniam antibiotikui zeocinui. Tokios bakterijos išlieka gyvybingos ir gali daugintis. Kitu atveju, bakterijos lieka jautrios antibiotikui ir miršta. *Petri* lėkštelės su užsėtomis transformuotomis *E. coli* bakterijomis laikomos inkubatoriuje prie 37 °C, drėgnoje, 5% CO₂ prisotintoje aplinkoje. Bakterijos augintos per naktį ~16 valandų.

Po atrankos, išgyvenusios bakterijos persėtos. Naudojant kilpelę, paimamas nedidelis kiekis užaugintų bakterijų ir perkeliama į naujai paruoštą *Petri* lėkštelę su LB agaru terpe, papildyta antibiotiku zeocinu (25 µg/ml). Bakterijos paskleidžiamos taip, kad formuotų monoklonines kolonijas. *Petri* lėkštelės laikomos inkubatoriuje per naktį (~16 valandų), 37 °C temperatūroje, drėgnoje, 5% CO₂ prisotintoje aplinkoje. Transformuotos bakterijos saugotos jas užšaldžius 30% glicerolio tirpale, -80 °C temperatūroje.

2.2.8.3.pNiFty2-SEAP plazmidės gryninimas iš *E. coli* bakterijų

Bakterijos iš monokloninės kolonijos užsėtos į skystą TB (angl. *Terrific Broth*) terpę. Auginimo terpę sudaro 12g/l Triptono, 24 g/l mielių ekstrakto, 9,5 g/l KH₂PO₄, 2,2 g/l K₂HPO₄ ir 4 g/l glicerolio. Terpė papildyta zeocino antibiotiku (25 µg/ml).

Pirminė kultūra auginama mėgintuvėliuose pripildytuose 2 – 5 ml TB terpės su atrankos antibiotiku zeocinu. Mėgintuvėliai laikomi inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje, vykstant pastoviam maišymui (300 aps./min). Auginimas vyksta ~8 valandas.

0,5 ml pirminės kultūros perkeliama į kolbą su TB auginimo terpe, papildytą zeocinu. Auginimas vykdytas 16 valandų, inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje, vykstant pastoviam maišymui (300 aps./min). Kai bakterijos pasiekia 3-4 x 10⁹ bakterijų/ml koncentraciją,

auginimas nutraukiamas. Bakterijos atskiriamos centrifuguojant kultūrą 6000 g, 15 min., 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas.

Plazmidės gryninimui panaudotas komercinis rinkinys *EndoFree Plasmid Maxi Kit* („Qiagen“). Metodas paremtas šarmine lize. Po centrifugavimo bakterijų peletas resuspenduojamas 10 ml buferinio tirpalo (50 mM Tris·Cl, 10 mM EDTA ir 10 µg/ml ribonukleazės A, pH=8). Maišoma tol, kol susidaro homogeninė masė. Tuomet pridedama 10 ml šarminio lizės tirpalo (200 mM NaOH, 1 % SDS, pH=12). Mėgintuvėlis švelniai vartomas 4–6 kartus ir inkubuojamas 5 min. kambario temperatūroje. Taip sulizuojamos visos bakterijos. Neutralizacija atliekama naudojant 10 ml kalio acetato tirpalo (3.0 M $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{OO})_2$, pH=5,5). Bakterijų lizatas perkeliamas į specialaus švirkšto šerdėlę, inkubuojama 10 min. Neutralizacijos metu genominė DNR, baltymai, ląstelių nuolaužos suformuoja specifinės baltas, drebučių pavidalo nuosėdas. Inkubacijos metu nusistovi dvi frakcijos: viršutinė – nuosėdų ir apatinė – skysčio. Tai užtikrina kokybišką lizato filtravimą. Po inkubacijos lizatas filtruotas per specialų rinkinyje pridėtą filtrą.

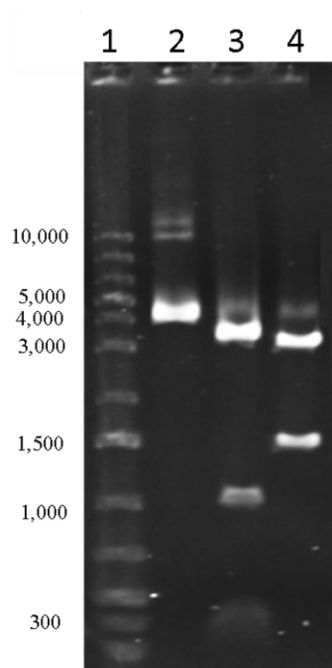
Į nufiltruotą skystį pridedama 2,5 endotoksinų pašalinimo buferinio tirpalo. Lizatas inkubuotas 30 min. ledo vonelėje. Lizatas papildytas 10 ml buferinio tirpalo (760 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% izopropanolio, 0,15% Triton X-100, pH=7). Naudojant kolonėlę lizatas perfiltruojamas. Kolonėlė plaunama 2 kartus, naudojant 30 ml plovimo buferinio tirpalo (1,0 M HCl, 50 mM MOPS, 15% izopropanolio, pH=7.0). Tuomet išplaunama plazmidės DNR, naudojant eliacijos buferinį tirpalą (1,25 M NaCl, 50 mM Tris·Cl, 15% izopropanolio, pH=8.5). Eliuatas surenkamas į sterilų, endotoksinais neužterštą mėgintuvėlį.

Toliau atliktas DNR išsodinimas panaudojant 10,5 ml endotoksinais neužteršto 70% etanolio tirpalo. Centrifuguojama 15 000 g, 30 min., 4 °C temperatūroje. DNR peletas plaunamas 5 ml endotoksinais neužteršto 70% etanolio tirpalo. Dar kartą centrifuguojama 15 000 g, 10 min., 4 °C temperatūroje. Supernatantas švariai pašalinamas nuo DNR peletu. Peletas pradžiovinamas 5 min. Plazmidės DNR suspenduojama endotoksinais neužterštu TE buferiniu tirpalu (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH=8,0). Išskirtos plazmidės koncentracija nustatyta spektrofotometriškai, panaudojant *NanoPhotometer* („Implen“). Nustatyta plazmidės koncentracija 1 025 ng/µl.

2.2.8.4. Plazmidės restrikcinė analizė

Plazmidės DNR sukarpyta naudojant specifines restrikcijos endonukleazes. Pagal plazmidės žemėlapi (9 pav), pasirinktos 2 restrikcijos endonukleazės: SmaI ir HindIII. Šie

fermentai kerpa plazmidės DNR specifinėse vietose ir suskaldo ją į atitinkamo dydžio fragmentus. SmaI pNiFty2-SEAP sukarpo į tris dalis: 3126 bp + 964 bp + 316 bp. HindIII plazmidę kerpa į dvi dalis: 2984 bp ir 1422 bp. Mėgintuvėlyje paruošiamas restrikcijos reakcijos mišinys: 10 µl plazmidės mėginio, 1,5 µl buferinio tirpalo, 0,5 µl atitinkamos restrikcijos endonukleazės ir 3 µl dejonizuoto vandens. Vykdoma inkubacija 1 valandą, 30 °C temperatūroje. Fermentinė reakcija nutraukiama į mėginį įmaišius 6x elektroforezės dažą (2,5 µl). Vykdoma restrikcijos fragmentų elektroforezė 1% agarozės gelyje. Elektroforezė vykdoma esant 9,5 V/cm įtampai, 45 min. Pasibaigus elektroforezei gelis 15 min. laikomas etidžio bromido tirpale (2,5 µg/ml EtBr). Gelis 2 kartus perplaunamas ir fotografuojamas UV šviesoje panaudojant *Gel Doc EZ Imager* („Bio – Rad”) (10 pav).



10 pav. Plazmidės NiFty2-SEAP restrikcinė analizė. Elektroforezės nuotrauka. 1 – standartas; 2 – nekarpyta plazmidė (4406 bp); 3 – karpymas SmaI restriktaze (fragmentai: 3126+964+316 bp); 4 – karpymas HindIII restriktaze (fragmentai: 2984+1422 bp)

2.2.9. Žmogaus mikroglijos ląstelių kultivavimas

Prieš naudojimą mikroglijos auginimo terpė DMEM (D-gliukozės koncentracija 4,5 g/l) su 10% fetalinio jaučio serumo ir antibiotikais: 100 VV/ml penicilinu ir 100 µg/ml streptomycinu centrifuguojama 100 000 g 6 val. 4 °C temperatūroje (pašalinamos egzomosos) ir filtruojama per 0,22 µm filtrą.

Mikroglijos ląstelės suspenduojamos 37 °C auginimo terpėje ir užsėjamos kolagenu dengtuose 25 cm² plastikiniuose flakonuose. Ląstelės auginamos inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje, drėgnoje, 5 % CO₂ prisotintoje atmosferoje. Terpė keičiama du kartus per savaitę.

Ląstelėms pasiekus ~80 % konfluenciją, jos yra persėjamos. Prieš persėjimą auginimo terpė nusiurbama, ląstelės plaunamos 37 °C PBS tirpalu, užpilamos 0,05 % tripsino-0,02 % EDTA tirpalu ir inkubuojamos ~3 min, 37 °C. Ląstelėms atkibus nuo flakono dugno, tripsino neutralizavimui užpilamas trigubas tūris 37 °C auginimo terpės su serumu. Ląstelių suspensija centrifuguojama 1500 aps./min greičiu, 3 min, kambario temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos 37 °C auginimo terpėje ir išpilstomos į naujus flakonus.

2.2.10. Mikroglijos ląstelių transfekcija

Mikroglijos ląstelių transfekcijai atlikti naudotas *Amara SG cell line 4-D-Nucleofector C kit L (24 RCT)* („LONZA“) transfekcijos rinkinys. Prieš atliekant transfekciją paruošiama 24 šulinėlių lėkštelė – šulinėliai padengiami kolagenu. Mikroglijos ląstelės atkabinamos nuo auginimo flakono dugno ir suskaičiuojamos, naudojant ląstelių skaičiavimo kamerą. Vienai transfekcijos reakcijai naudota 0,7 mln ląstelių ir 2 µg plazmidės DNR. Transfekcija atlikta specialiose kiuvetėse, naudojant *4D-Nucleofector* („Lonza“) aparatą. Pairsrinkta transfekcijos programa NIH/3T3. Ląstelės po transfekcijos inkubuojamos 10 min. kambario temperatūroje. Ląstelių suspensija papildoma 1,4 ml auginimo terpės be egzosomų. Ląstelių suspensija išpilstoma po lygiai į 3 šulinėlius paruoštoje 24 šulinėlių lėkštelėje.

2.2.11. NF-κB signalinio kelio aktyvumo įvertinimas žmogaus mikroglijos ląstelėse

Praėjus 6 valandoms po mikroglijos ląstelių transfekcijos, visuose šulinėliuose pakeičiama auginimo terpė. Kur reikia pridedama TLR4 receptorių blokuojančio antikūno (Ab to TLR4 [HTA125], „Abcam“). Naudota antikūno koncentracija 0,5 µg/ml.

Po 12 valandų dar kartą pakeičiama auginimo terpė visuose šulinėliuose. Kur reikia pridedama LPS (koncentracija 5 µg/ml) ir egzosomų (1 VV). Ląstelės auginamos 72 valandas, kas 12 valandų imami mėginiai sekretuojamos šarminės fosfatazės aktyvumui įvertinti.

2.2.12. Sekretuojamos šarminės fosfatazės aktyvumo įvertinimas

Transfekuotose ląstelėse suaktyvinus NF-κB signalinį kelią, prasideda sekretuojamos šarminės fosfatazės (SEAP) sintezė. SEAP skaldo nespaltotą substratą (*4-nitrofenilfosfatą*) iki

geltonos spalvos produkto (*p-nitrofenolato*) šarminiuose tirpaluose. Spalvos pokyčius galima analizuoti kalorimetriškai, matuojant absorbciją prie 405 nm bangos ilgio.

Nuo transfekuotų ir aktyvuotų ląstelių kas 12 valandų (12, 24, 36, 48, 60 ir 72 auginimo valandas) paimta po 70 µl terpės. Šulinėliai iš karto papildyti tokiu pačiu kiekiu 37 °C šviežios auginimo terpės. Surinkti mėginiai centrifuguoti 10 000 aps./min greičiu, 5 min., kambario temperatūroje. Supernatantas perkeltas į švarius mėgintuvėlius ir laikytas -20 °C temperatūroje iki analizės.

Prieš analizę, mėginiai inkubuojami 65 °C temperatūroje, 15 minučių, taip inaktyvinamos kitos fosfatazės. Analizei atlikti naudotas „OZ Biosciences“ *SEAP assay kit*, analizė atlikta remiantis gamintojo nurodymais. Naudojama 96 šulinėlių lėkštelė. Šulinėlis užpildomas 10 µl skiedimo buferinio tirpalo, 20 µl šarminės fosfatazės mėginio, atvėsinto iki kambario temperatūros, ir 200 µl darbinio tirpalo, kurio sudėtyje yra ir SEAP substrato. Inkubuojama 10 minučių, kambario temperatūroje, saugant nuo tiesioginės šviesos. Matuojama kaip pakinta absorbcija šulinėliuose prie 405 nm šviesos bangos ilgio. Matavimams naudotas absorbcijos skaitytuvas Asys UVM340 („Biochrom“).

2.2.13. Statistinė analizė

Šiame darbe aprašyti eksperimentai buvo kartoti 3 kartus. Gauti rezultatai buvo sunormalizuoti pagal kontrolinių ląstelių rezultatus. Reporterinio baltymo (sekretuojamos šarminės fosfatazės) aktyvumas kontrolinėse ląstelėse prilyginamas 1. Vertinamas baltymo aktyvumo pokytis kartais, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Kelių grupių palyginimams atlikta vieno koeficiento dispersijos analizė (ANOVA). Skirtumai vertinami kaip patikimi, kai $p < 0,05$.

3. Tyrimo rezultatai ir jų aptarimas

Tyrimo metu įvertinome PDPKL išskiriamų EV poveikį NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse. Žmogaus mikroglijos ląstelės buvo transfekuotos nukleofektoriumi *4D-Nucleofector* („Lonza“). Į ląsteles įterpta plazmidė NiFty2-SEAP, kurioje NF-κB promotorius sujungtas su reporterinį baltymą (sekretuojamą šarminę fosfatazę, SEAP) koduojančiu genu. Aktyvavus signalinį kelią, ląstelėse prasideda reporterinio baltymo sintezė ir sekrecija. Po transfekcijos ląstelės buvo veikiamos PDPKL išskiriamomis EV, TLR4 blokuojančiu antikūnu (HTA125, „Abcam“) bei LPS. Kas 12 valandų buvo paimti mėginiai ir atlikta sekretuojamos šarminės fosfatazės analizė. Pagal reporterinio baltymo veikimo intensyvumą įvertintas NF-κB signalinio kelio aktyvumas. Gauti rezultatai palyginti tarpusavyje ir su kontrolinėmis ląstelėmis. Kontrolinėmis ląstelėmis laikomos transfekuotos, tačiau ne aktyvuotos ląstelės.

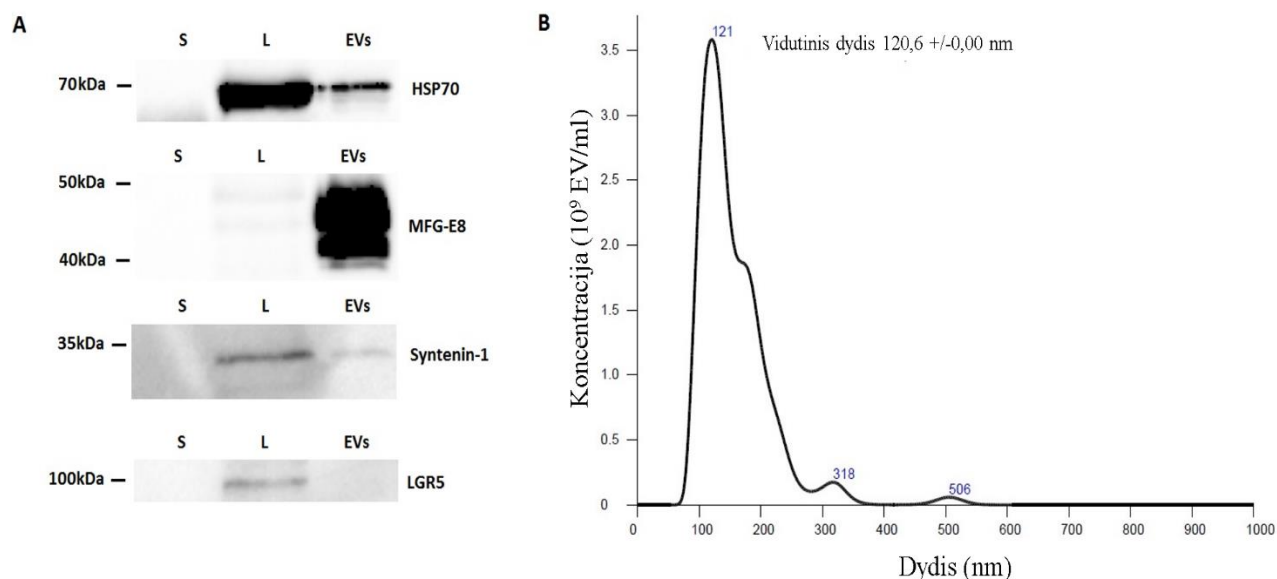
3.1. PDPKL išskiriamų EV charakterizavimas

Eksperimentų metu EV dozavome naudodami empiriškai pasirinktus veikimo vienetus (VV). 1 VV – EV kiekis, išskirtas iš supernatanto, surinkto nuo 2D sąlygomis 72 valandas kultivuotų PDPKL ląstelių 37,5 cm² auginimo plote. Sutinkame, kad EV dozavimo metodai, tokie kaip empirinis, baltymo koncentracijos matavimas, nanodalelių analizės ir kiti, turi trūkumų ir ne visuomet tiksliai atitinka realų EV kiekį mėginyje⁶⁴.

Tyrime panaudojome nanodalelių analizės metodą (angl. *nanoparticle tracing analysis*, NTA) ir ištyrėme PDPKL sekretuojamų EV mėginius. Gauti rezultatai parodė, kad empiriniai VV proporcingai atitinka nanodalelių kiekį. Taip pat nustatėme, kad daugiausia mėginiuose yra EV, kurių diametras yra 121 nm (11 pav).

Toliau atlikome PDPKL išskiriamų EV lizatų baltyminę analizę, taikant Western metodą (angl. *Western blotting*). PDPKL ir jų išskiriamas EV sulizavome ir atlikome SDS/PAGE elektorforezę SDS-poliakrilamido gelyje (10%). Po elektorforezės perkėlėme baltymus ant PVDF membranos, naudojome pusiau sausos sistemos aparatą *Trans-Blot Turbo*. Toliau atlikom baltymų analizę, pagal 3 egzosomų žymenis: Hsp70, MFG-E8 ir sintetinas-1. Neigiamai kontrolei panaudotas LGR5 žymuo. Nustatėme, kad PDPKL išskiriamų EV lizatuose yra Hsp70, MFG-E8 ir sintetinas-1 baltymų (11 pav). Šie baltymai literatūroje nurodomi, kaip specifiniai egzosomų žymenis⁶⁵.

Mūsų gauti rezultatai parodė, kad iš PDPKL išskirtos EV pasižymi egzosomoms būdingu dydžiu 120 nm ir taip pat ekspresuoja specifinius egzosomų baltyminius žymenis Hsp70 (70 kDa), sintetinas-1 (33 kDa) bei MFG-E8 (46 kDa).



11 pav. PDPKL išskiriamų EV charakterizavimas baltymų analizės (A) ir NTA (B) metodais.

Panaudodami nanodalelių analizės metodą nustatėme, kad didžiąją dalį PDPKL išskiriamų EV sudaro 120 nm diametro dalelės. Atlikome baltymų analizę pagal 3 egzosomoms būdingus žymenis: Hsp70 (70 kDa), MFG-E8 (46 kDa) bei sintetiną-1 (33 kDa). Neigiamai kontrolei panaudojome LGR5 (100 kDa) baltymą. Atlikome PDPKL auginimo terpės (S), ląstelių lizatų (L) bei EV lizatų (EVs) mėginiams. Analizė pakartota 3 kartus.

3.2. PDPKL išskiriamų EV poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse

Visų pirma įvertinome PDPKL išskiriamų EV poveikį baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse (1 grafikas). Po transfekcijos ląstelės buvo paveiktos 1VV EV. Nustatėme, kad per pirmąsias 48 valandas EV nedaro įtakos baziniam signalinio kelio aktyvumui. Tačiau praėjus 60 – 72 inkubacijos valandoms EV nežymiai slopina bazinį NF-κB signalinio kelio aktyvumą. Aktyvumas sumažėja 15 %, lyginant su NF-κB signalinio kelio aktyvumu kontrolinėse ląstelėse. Mūsų gauti duomenys parodo, kad PDPKL išskiriamos EV nedaro ryškaus poveikio baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui.

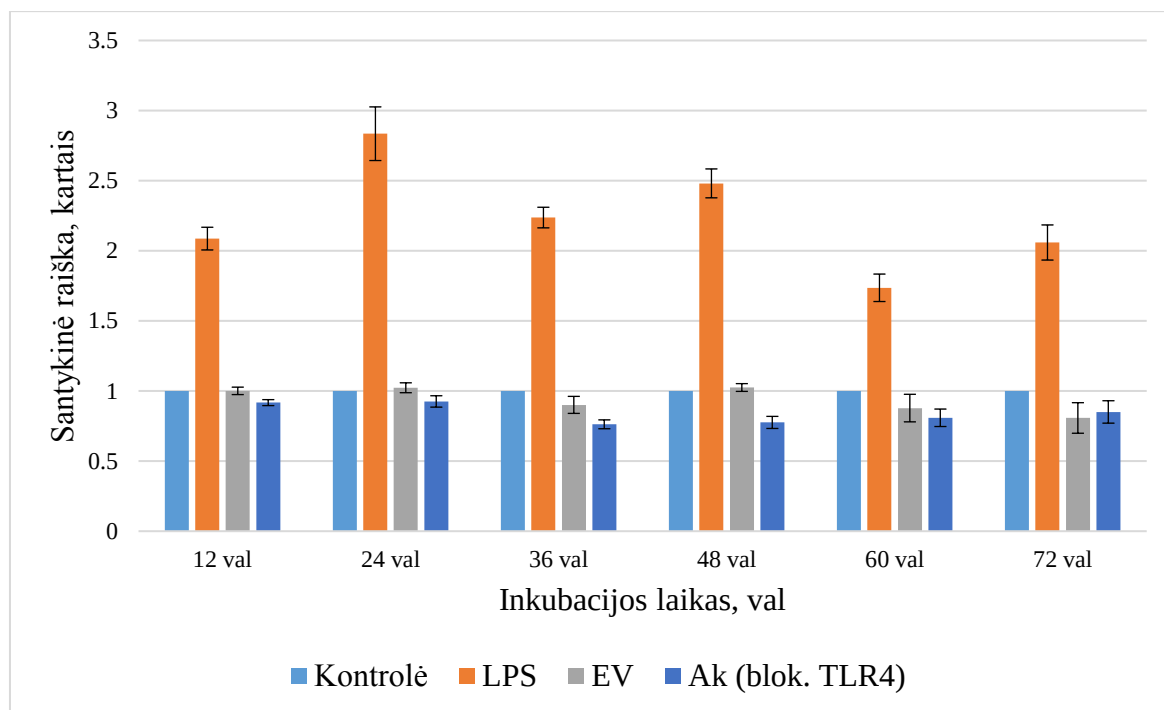
3.3. TLR4 blokuojančio antikūno poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse

Literatūroje teigiama, kad egzozomos gali veikti uždegiminiuosius procesus ląstelėse per TLR4 receptorių, todėl, siekiant geriau įvertinti PDPKL išskiriamų EV poveikį uždegiminiams procesams, atlikome eksperimentą, panaudojant TLR4 blokuojantį antikūną (HTA125, „Abcam“) ⁶⁶. Antikūnas specifiskai jungiasi prie TLR4 receptoriaus ir jį užblokuoja. Dėl to receptoriaus ligandas (LPS) negali prisijungti prie TLR4 ir aktyvuoti NF-κB signalinio kelio ⁶⁷. Tyrimo metu įvertinome TLR4 blokuojančio antikūno poveikį baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui (1 grafikas). Transfekuotas ląsteles paveikėme 0,5 μg/ml antikūno koncentracija. Gauti duomenys rodo, kad antikūnas slopinančiai veikia NF-κB signalinio kelio aktyvaciją. Poveikis labiausiai išryškėja 36 – 48 inkubacijos valandomis, bazinis NF-κB signalinio kelio aktyvumas sumažėja 25 %. Antikūno poveikis NF-κB signalinio kelio aktyvacijai yra ilgalaikis. 60 – 72 inkubacijos valandomis antikūnas slopina NF-κB signalinio kelio aktyvaciją 15 – 20 %. Įdomu tai, kad antikūnas slopina NF-κB signalinio kelio aktyvaciją, net tuomet, kai aplinkoje nėra TLR4 receptoriaus ligando LPS. Taip yra dėl to, kad TLR4 receptorių gali sąveikauti ir būti aktyvuotas ir kitų medžiagų, tokių kaip: fibronektinas, biglikanas, fibrinogenas ir kiti ⁶⁸. Gauti duomenys rodo, kad PDPKL išskiriamos EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas bazinį NF-κB signalinio kelio aktyvumą slopina panašiu stiprumu. Tai leidžia manyti, kad EV veikia NF-κB signalinį kelią per TLR4 receptorių.

3.4. LPS poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse

Žmogaus mikroglijos ląstelės gali būti aktyvuotos įvairių patogenų. Vienas iš jų yra LPS, sudedamoji bakterijų išorinės sienelės dalis. LPS aktyvuoja NF-κB signalinį kelią specifiskai jungdamasis prie TLR4 receptoriaus ⁶⁹. Tyrimo metu transfekuotų žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvacijai panaudotas LPS iš *E. coli* bakterijų. Ląstelės buvo veikiamos 5 μg/ml LPS koncentracija. Įvertinome kaip LPS veikia bazinį NF-κB signalinio kelio aktyvumą (1 grafikas). Gauti duomenys patvirtino, kad LPS skatina NF-κB signalinio kelio aktyvaciją. Taip pat nustatėme, kad LPS poveikis yra ilgalaikis. Stipriausias LPS poveikis nustatytas praėjus 24 inkubacijos valandoms. Lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, NF-κB signalinio kelio aktyvumas po 24 inkubacijos valandų padidėja 2,8 karto. Praėjus 72 inkubacijos valandoms NF-κB signalinio kelio aktyvumas padidėja 2 kartus. Gauti duomenys parodė, kad LPS tikrai aktyvina NF-κB signalinį kelią žmogaus mikroglijos ląstelėse. LPS poveikis yra

ilgalaikis, tačiau ilgėjant inkubacijos laikui, LPS poveikis uždegiminei mikroglijos aktyvacijai silpnėja.



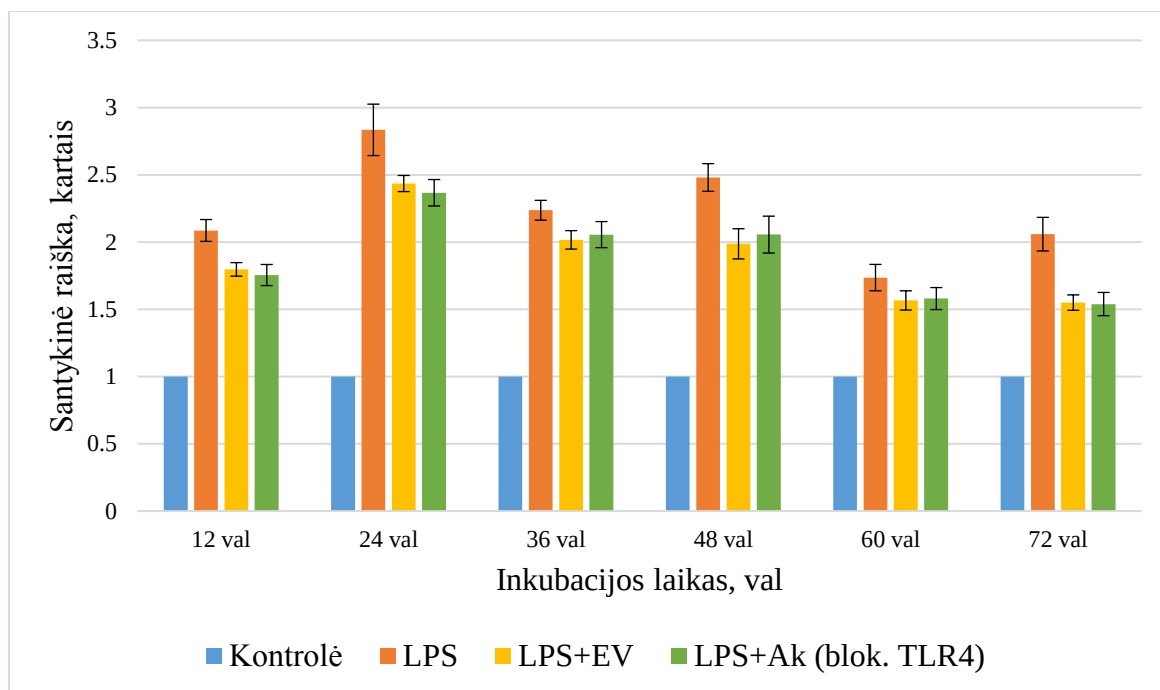
1 grafikas. PDPKL išskiriamų EV, TLR4 blokuojančio antikūno ir LPS poveikis baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse. Į žmogaus mikroglijos ląsteles įterpėme plazmidę NiFty2-SEAP. Praėjus 6 valandoms ląstelės paveiktos TLR4 blokuojančiu antikūnu (0,5 μg/ml), po 12 valandų ląstelės paveiktos LPS (5 μg/ml) ir EV (1 VV). Kas 12 valandų imti auginimo terpės mėginiai ir analizuotas sekretuojamos šarminės fosfatazės aktyvumas. Pagal reporterinio baltymo veikimą įvertinome EV, antikūno ir LPS poveikį baziniam NF-κB signalinio kelio aktyvumui. Gauti duomenys parodė, kad LPS stiprina, o PDPKL išskiriamos EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas slopina bazinį NF-κB signalinio kelio aktyvumą ($p < 0,05$)

3.5. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno poveikis LPS indukuotam NF-κB signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse

Toliau tyrėme, kaip PDPKL išskiriamos egzosomos veikia LPS indukuotą NF-κB signalinio kelio aktyvumą (2 grafikas). Šiuo tikslu ląsteles paveikėme 5 μg/ml LPS ir 1 VV EV. Gauti duomenys parodė, kad EV slopina LPS poveikį NF-κB signaliniam keliui. Svarbu tai, kad EV slopinantis poveikis yra ilgalaikis. Lyginant su tik LPS paveiktomis ląstelėmis, NF-κB signalinio kelio aktyvumas 12 – 36 inkubacijos valandomis sumažėja 20 %. Ryškiausias

EV poveikis užfiksuotas praėjus 48 inkubacijos valandoms. NF- κ B signalinio kelio aktyvumas sumažėja 50 %, lyginant su LPS paveiktomis ląstelėmis. 60 ir 72 inkubacijos valandomis EV slopina LPS poveikį 20 %. Nustatėme, kad PDPKL išskiriamos EV slopina LPS indukuotą žmogaus mikroglijos ląstelių aktyvaciją.

Palyginimui patikrinome, kaip TLR4 receptorių blokuojantis antikūnas veikia LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją žmogaus mikroglijos ląstelėse (2 grafikas). Transfekuotas ląstelės paveikėme 5 μ g/ml LPS ir 0,5 μ g/ml antikūno. Gauti duomenys parodė, kad antikūnas slopinančiai veikia LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją. Antikūno poveikis yra ilgalaikis. 12 – 36 inkubacijos valandomis antikūnas susilpnina LPS poveikį 20 %. Didžiausias antikūno poveikis užfiksuotas praėjus 48 inkubacijos valandoms. Antikūnas susilpnina LPS poveikį NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai 45 %. Praėjus 60 – 72 inkubacijos valandoms antikūnas slopina LPS poveikį NF- κ B signaliniam keliui 20 %. Įsitikinome, kad antikūnas tikrai slopina LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją žmogaus mikroglijos ląstelėse. Gauti duomenys parodė, kad TLR4 blokuojantis antikūnas ir PDPKL išskiriamos EV labai panašiai veikia LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją. Tai leidžia manyti, kad EV veikia NF- κ B signalinį kelią per TLR4 receptorių. EV blokuoja TLR4 receptorių, neleidžia prie jo specifiskai prisijungti LPS, todėl slopinamas NF- κ B signalinio kelio aktyvinimas.

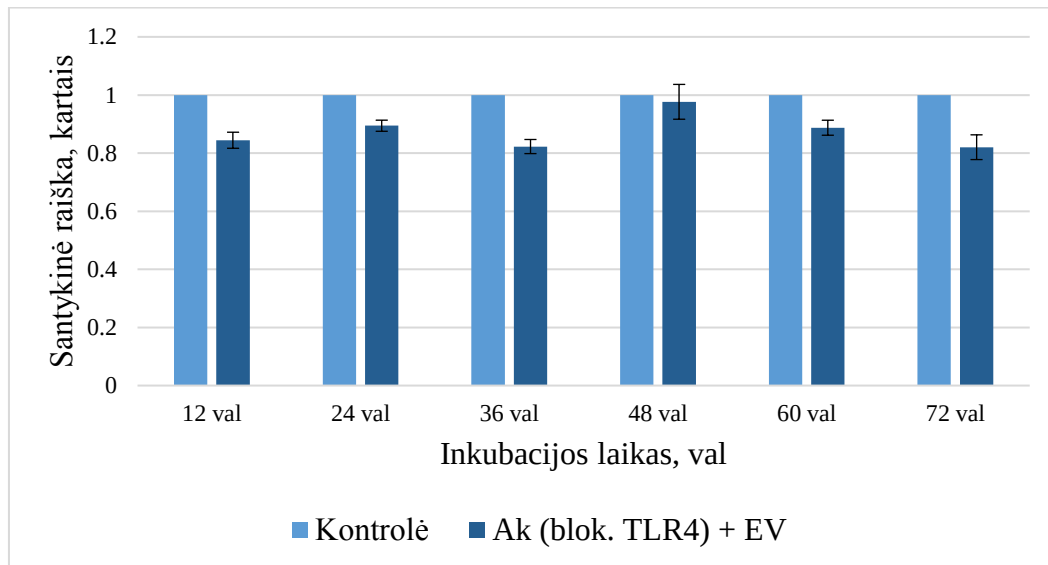


2 grafikas. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno poveikis LPS indukuotai NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai žmogaus mikroglijos ląstelėse. Į žmogaus mikroglijos ląsteles įterpėme plazmidę NiFty2-SEAP. Praėjus 6 valandoms ląstelės paveiktos TLR4 blokuojančiu antikūnu (0,5 μ g/ml), po 12 valandų ląstelės paveiktos LPS (5 μ g/ml) ir EV (1 VV). Kas 12 valandų imti auginimo terpės mėginiai ir analizuotas sekretuojamos šarminės fosfatazės aktyvumas. Pagal reporterinio baltymo veikimą įvertinome EV, antikūno poveikį LPS indukuotai NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai. Gauti duomenys parodė, kad PDPKL išskiriamos EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas slopina LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją ir toks poveikis yra ilgalaikis ($p < 0,05$)

3.6. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno bendras poveikis LPS indukuotam NF- κ B signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse

Nustatėme, kad tiek PDPKL išskiriamos EV, tiek TLR4 blokuojantis antikūnas slopinančiai veikia LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją žmogaus mikroglijos ląstelėse. Todėl toliau tyrėme, kaip EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas LPS indukuotą mikroglijos aktyvaciją veikia kartu. Pirmiausia įvertinome EV ir antikūno bendrą poveikį baziniam NF- κ B signalinio kelio aktyvumui (3 grafikas). Transfektuotas ląsteles paveikėme 0,5 μ g/ml antikūno ir 1 VV EV. Nustatėme, kad NF- κ B signalinio kelio aktyvumas sumažėja 15 % praėjus vos 12 inkubacijos valandų. Ilgėjant inkubacijos laikui, EV ir antikūno slopinantis

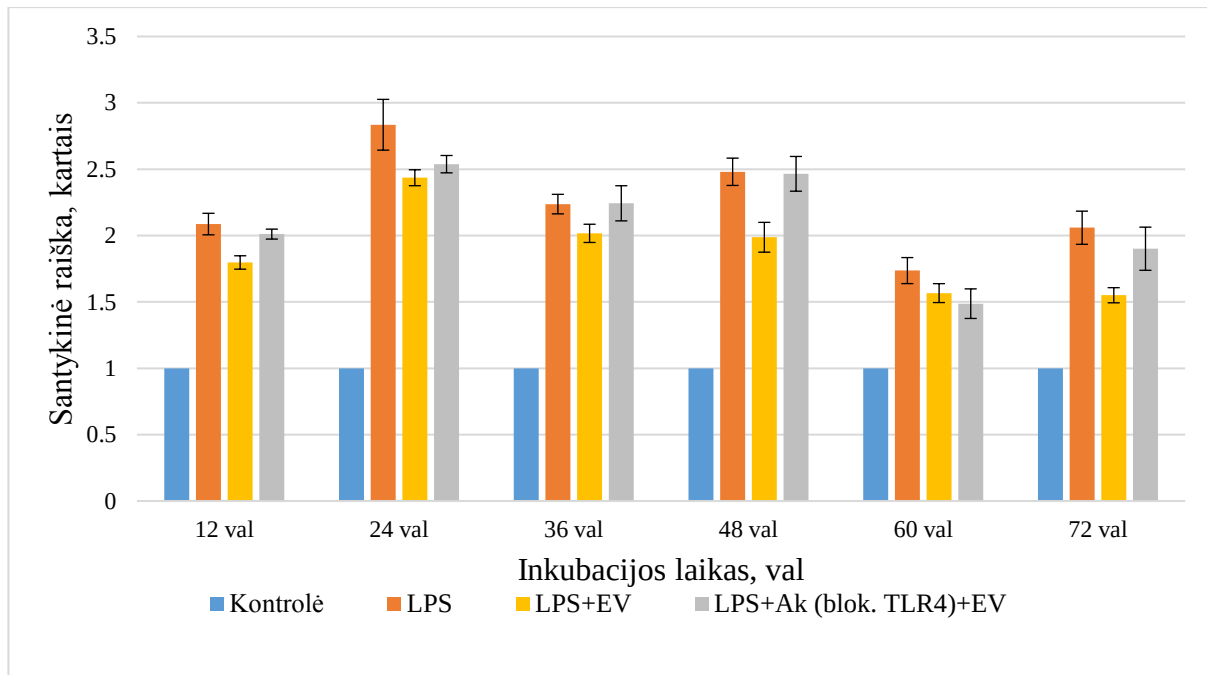
poveikis išlieka. Iki pat 72 inkubacijos valandos bazinis NF- κ B signalinio kelio aktyvumas slopinamas 20 %. Gauti duomenys rodo, kad EV ir antikūnas veikdami kartu nežymiai veikia bazinį NF- κ B signalinio kelio aktyvumą. Panašus bazinio NF- κ B signalinio kelio aktyvumo slopinimas (iki 20 %) buvo nustatytas ir veikiant ląsteles antikūnu bei EV atskirai.



3 grafikas. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno bendras poveikis baziniam NF- κ B signalinio kelio aktyvumui žmogaus mikroglijos ląstelėse. Praėjus 6 valandoms po transfekcijos, ląstelės su įterpta NiFty2-SEAP paveiktos TLR4 blokuojančiu antikūnu (0,5 μ g/ml). Dar po 12 valandų tos pačios ląstelės paveiktos PDPKL išskiriamomis EV (1 VV). Pagal sekretuojamos šarminės fosfatazės veikimą įvertintas EV ir antikūno bendras poveikis baziniam NF- κ B signalinio kelio aktyvumui. Nustatyta, kad EV ir antikūnas slopinančiai veikia NF- κ B signalinį kelią ir toks poveikis yra ilgalaikis ($p < 0,05$)

Toliau tyrėme, kaip PDPKL išskiriamos EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas kartu veikia LPS indukuotą NF- κ B signalinio kelio aktyvaciją (4 grafikas). Transfektuotas ląsteles paveikėme 5 μ g/ml LPS, 0,5 μ g/ml antikūno ir 1 VV EV. Gauti duomenys parodė, kad TLR4 blokuojantis antikūnas mažina slopinantį EV poveikį LPS indukuotai NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai. Įdomu tai, kad šis poveikis ilgalaikis. Praėjus 12 – 36 valandoms LPS poveikis slopinamas vos 10 – 20 %. Praėjus 48 inkubacijos valandoms LPS poveikis slopinamas tik 2 % (tuo tarpu veikiant tik EV tuo pačiu metu LPS poveikis buvo nuslopinamas 50 %). 60 – 72 inkubacijos valandas LPS poveikis NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai slopinamas iki 20 %. Šie duomenys leidžia manyti, kad PDPKL išskiriamos EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas

konkuruoja dėl TLR4 multireceptorinio komplekso komponentų. Tokiu būdu yra dalinai neutralizuojamas slopinantis EV ir antikūno poveikis NF-κB signalinio kelio aktyvacijai.



4 grafikas. PDPKL išskiriamų EV ir TLR4 blokuojančio antikūno bendras poveikis LPS indukuotai NF-κB signalinio kelio aktyvacijai. Praėjus 6 valandoms po transfekcijos, ląstelės su įterpta plazmide NiFty2-SEAP paveiktos TLR4 blokuojančiu antikūnu (0,5 μg/ml). PO 12 valandų tos pačios ląstelės paveiktos LPS (5 μg/ml) ir PDPKL išskiriamomis EV (1 VV). Kas 12 valandų imami auginimo terpės mėginiai ir atliekama reporterinio baltymo analizė. Pagal gautus duomenis įvertinamas bendras antikūno ir EV poveikis LPS indukuotai NF-κB signalinio kelio aktyvacijai. Nustatėme, kad antikūnas mažina EV slopinantį poveikį LPS indukuotai signalinio kelio aktyvacijai ir toks poveikis yra ilgalaikis ($p < 0,05$)

Atlikto tyrimo metu įvertinome PDPKL išskiriamų EV poveikį uždegiminei žmogaus mikroglijos aktyvacijai. Naudodami NF-κB signalinio kelio reporterinę plazmidę NiFty2-SEAP, pagal sekretuojamos šarminės fosfatazės veikimą įvertinome kaip EV ir TLR4 blokuojantis antikūnas veikia LPS indukuotą NF-κB signalinio kelio aktyvaciją. Gauti duomenys parodė, kas iš PDPKL išskirtos EV pasižymi uždegiminę mikroglijos aktyvaciją slopinančiomis savybėmis. Įsitikinome, kad EV slopinančiai veikia LPS indukuotą NF-κB signalinio kelio aktyvaciją. Lygindami rezultatus, gautus ląsteles veikiant EV ir TLR4 blokuojančiu antikūnu, darome prielaidą, kad EV NF-κB signalinį kelią veikia per TLR4

receptorių. Taip pat nustatėme, kad TLR4 blokuojantis antikūnas mažina EV slopinantį poveikį LPS indukuotai NF- κ B signalinio kelio aktyvacijai. Tai leidžia manyti, kad EV konkuruoja su antikūnu dėl TLR4 multireceptorinio komplekso komponentų ir dėl to, TLR4 receptorių nėra taip efektyviai blokuojamas.

IŠVADOS

1. Pieninio danties pulpos kamieninių ląstelių sekretuojamų ekstraląstelių vezikulių vidutinis dydis yra 121 nm. EV būdingi egzosominiai žymenys: Hsp70, MFG-E8 ir sintetinas-1.
2. Naudojant pasirinktą protokolą į žmogaus mikroglijos ląsteles sėkmingai įterpta reporterinė NF- κ B-SEAP plazmidė.
3. PDPKL sekretuojamos EV tik nežymiai keičia bazinį NF- κ B signalinio kelio aktyvumą.
4. EV slopina LPS indukuotą uždegiminę žmogaus mikroglijos aktyvaciją ir šis poveikis yra ilgalaikis. Stipriausiai EV veikia praėjus 48 inkubacijos valandoms, aktyvacija slopinama 50 %.
5. TLR4 blokuojantis antikūnas iki 20 % mažina PDPKL išskiriamų EV slopinantį poveikį LPS indukuotai mikroglijos aktyvacijai ir toks poveikis yra ilgalaikis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*. 2017;10(5):499-502. doi:10.1242/dmm.030205
2. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(8):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a020537
3. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):649-665. doi:10.1111/bph.13139
4. Camandola S, Mattson MP. NF- κ B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(2):123-132. doi:10.1517/14728222.11.2.123
5. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1009-1016. doi:10.1038/ni.3002
6. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi:10.3727/096368910X
7. Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, García-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: A new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/103503
8. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):4142-4157. doi:10.3390/ijms15034142
9. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-228. doi:10.1038/nrm.2017.125
10. Jarmalavičiūtė A, Pivoriūnas A. Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*. 2016;113:816-822. doi:10.1016/j.phrs.2016.02.002
11. Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci*. 2017;11(February):1-17. doi:10.3389/fncel.2017.00024

12. Cras P. *Glial Neurobiology*. Vol 46.; 2008. doi:10.1038/sj.sc.3102138
13. Nagai A, Nakagawa E, Hatori K, et al. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: Expression of cytokines and chemokines. *Neurobiol Dis*. 2001;8(6):1057-1068. doi:10.1006/nbdi.2001.0437
14. Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol*. 2010;41(2-3):242-247. doi:10.1007/s12035-010-8105-9
15. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):354-365. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.014
16. Sumners C, Crews FT, Vetreno RP. Alcohol, Cell Membranes, and Signal Transduction in Brain. 1993;(January). doi:10.1007/978-1-4615-2470-0
17. Neuroglia: Definition, Classification, Evolution, Numbers, Development. *Glial Physiol Pathophysiol*. 2013:73-104. doi:10.1002/9781118402061.ch3
18. Vilhardt F. Microglia: Phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(1):17-21. doi:10.1016/j.biocel.2004.06.010
19. Yi MH, Zhang E, Kang JW, et al. Expression of CD200 in alternative activation of microglia following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Brain Res*. 2012;1481:90-96. doi:10.1016/j.brainres.2012.08.053
20. Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2011;8:9. doi:10.1186/1742-2094-8-9
21. Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci*. 2013;7(April):1-8. doi:10.3389/fncel.2013.00044
22. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-758. doi:10.1038/nn1472
23. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1):1-15. doi:10.1186/1742-2094-11-98
24. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S.

- Macrophage Receptors and Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):901-944. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816
25. Lan X, Han X, Li Q, Yang QW, Wang J. Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(7):420-433. doi:10.1038/nrneurol.2017.69
 26. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence. *Immunity*. 2014;38(4):633-643. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.005.Metabolic
 27. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2(March):17023. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
 28. Bolós M, Perea JR, Avila J. Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol Concepts*. 2017;8(1):37-43. doi:10.1515/bmc-2016-0029
 29. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46(5):705-716. doi:10.1016/0092-8674(86)90346-6
 30. Gilmore T, Keutgens A, Pacifico F, Leonardi A, Wullaert A. 20 years of NF- κ B. 2006;72:1051-1053.
 31. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103-115. doi:10.1038/cr.2010.178
 32. Kim H-J, Kim K-W, Yu B-P, Chung H-Y. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(5):683-692. doi:10.1016/S0891-5849(99)00274-9
 33. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B in defense and disease NF- κ B : a key role in inflammatory diseases. 2001;107(1):7-11. doi:10.1172/JCI11830.NF-
 34. Nishikori M. Classical and Alternative NF-.KAPPA.B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J Clin Exp Hematop*. 2005;45(1):15-24. doi:10.3960/jslrt.45.15
 35. Tu YK, Hong YY, Chen YC. Finite element modeling of kirschner pin and bone thermal contact during drilling. *Life Sci J*. 2009;6(4):23-27. doi:10.1007/82
 36. Shih R-H, Wang C-Y, Yang C-M. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological

- Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci*. 2015;8(December):1-8.
doi:10.3389/fnmol.2015.00077
37. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):1-10. doi:10.1101/cshperspect.a001651
 38. Viennois E, Chen F, Merlin D. NF-κB pathway in colitis-associated cancers. *Transl Gastrointest Cancer*. 2013;2(1):21-29. doi:10.3978/j.issn.2224-4778.2012.11.01
 39. O'Neill, Kaltschmidt. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. 1997;20(6):252-258. doi:10.1016/S0166-2236(96)01035-1
 40. Gho YS, Lee C. Emergent properties of extracellular vesicles: a holistic approach to decode the complexity of intercellular communication networks. *Mol Biosyst*. 2017;13(7):1291-1296. doi:10.1039/C7MB00146K
 41. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347-357. doi:10.1038/nrd3978
 42. György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(16):2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
 43. Weiss L. TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS Concise Review : Wharton ' s Jelly-Derived Cells Are a Primitive. 2008:591-599. doi:10.1634/stemcells.2007-0439
 44. Essandoh K, Fan GC. *Insights into the Mechanism of Exosome Formation and Secretion*. Vol 101. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-800164-6.00001-0
 45. Urbanelli L, Magini A, Buratta S, et al. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel)*. 2013;4(2):152-170. doi:10.3390/genes4020152
 46. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;29(1):116-125. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
 47. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep*. 2015;16(1):24-43. doi:10.15252/embr.201439363

48. Sarkar FH. Pancreatic Disorders & Therapy The Role of Exosomal Cargo in the Regulation of the Biological Complexity of Pancreatic Cancer. 2015;10-13. doi:10.4172/2165-7092.S5e002
49. Clayton A. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci.* 2005;118(16):3631-3638. doi:10.1242/jcs.02494
50. Tamkovich SN, Tutanov OS, Laktionov PP. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2016;10(3):163-173. doi:10.1134/S1990747816020112
51. Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther.* 2017;174:63-78. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.020
52. Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, Yasar S, Dworacki G. Exosomes-structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scand J Immunol.* 2015;81(1):2-10. doi:10.1111/sji.12247
53. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30(1):255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
54. Zomer A, Vendrig T, Hopmans ES, van Eijndhoven M, Middeldorp JM, Pegtel DM. Exosomes. *Commun Integr Biol.* 2010;3(5):447-450. doi:10.4161/cib.3.5.12339
55. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):569-579. doi:10.1038/nri855
56. Tanabe S. Role of mesenchymal stem cells in cell life and their signaling. *World J Stem Cells.* 2014;6(1):24. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.24
57. Urbanelli L, Buratta S, Sagini K, Ferrara G, Lanni M, Carla E. Exosome-based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2015;10-27. doi:10.2174/1574889810666150702124059
58. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhani S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011;29(4):341-345. doi:10.1038/nbt.1807
59. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial

- ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2010;4(3):214-222.
doi:10.1016/j.scr.2009.12.003
60. Qian X, Xu C, Fang S, et al. Exosomal MicroRNAs Derived From Umbilical Mesenchymal Stem Cells Inhibit Hepatitis C Virus Infection. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(9):1190-1203. doi:10.5966/sctm.2015-0348
 61. Xin H, Li Y, Buller B, et al. Exosome-Mediated Transfer of miR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth. ... *Cells.* 2012;30(7):1556-1564. doi:10.1002/stem.1129.Exosome-Mediated
 62. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1-11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8
 63. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(4):193-201. doi:10.1038/nrneurol.2010.17
 64. Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell.* 2016;164(6):1226-1232. doi:10.1016/j.cell.2016.01.043
 65. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(8):E968-E977. doi:10.1073/pnas.1521230113
 66. Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine.* 2016;8:72-82. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.030
 67. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from molecular to nano therapeutics. *Front Physiol.* 2017;8(JUL). doi:10.3389/fphys.2017.00508
 68. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med.* 2010;14(11):2592-2603. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x
 69. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-151. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006

