



Molekulinės biologijos studijų programos magistrantė
Gabrielė Vydmantaitė

Magistro baigiamasis darbas

**Laukinio tipo ir 3Tg-AL astrocitų ekstraląstelių vezikulių poveikis
oksidaciniam stresui ir uždegiminių genų raiškai smegenų endotelio ląstelėse**

Darbo vadovas:

Dr. Augustas Pivoriūnas

Darbo konsultantė:

Dokt. Karolina Kriauciūnaitė

Vilnius, 2021

Gabrielė Vydmantaitė

**Laukinio tipo ir 3Tg-AL astrocitų ekstraląstelinių vezikulių poveikis
oksidaciniam stresui ir uždegiminių genų raiškai smegenų endotelio ląstelėse**

Darbas atliktas Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre,
Kamieninių ląstelių biologijos skyriuje

Darbo vadovas:

Dr. Augustas Pivoriūnas

Darbo konsultantė:

Dokt. Karolina Kriauciūnaitė

Turinys

Santrumpos	5
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Alzheimerio liga	9
1.2. Kraujo – smegenų barjeras.....	10
1.2.1. Kraujo – smegenų barjero endotelio ląstelės.....	11
1.2.2. Kraujo – smegenų barjero <i>in vitro</i> modelis	13
1.2.3. Kraujo – smegenų barjero pokyčiai Alzheimerio ligos metu	14
1.3. Astroцитai.....	15
1.3.1. Astroцитų funkcijos	15
1.3.2. 3Tg-AL modeliai.....	16
1.4. Ekstraląstelinės vezikulės	17
1.4.1. EV biogenezės mechanizmai.....	19
1.4.2. EV patekimas į ląstelę ir jų funkcijos.....	21
1.4.3. EV vaidmuo uždegiminiuose procesuose.....	23
1.5. Oksidacinis stresas.....	24
1.5.1. Oksidacinio streso reguliavimo mechanizmai.....	25
1.5.2. EV poveikis oksidaciniam stresui	26
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	28
2.1. Ląstelės ir medžiagos.....	28
2.2. Metodai	31
2.2.1. Imortalizuotų astroцитų kultivavimas.....	31
2.2.2. EV išskyrimas pakopinio ultracentrifugavimo metodu.....	31
2.2.3. EV dydžio bei koncentracijos analizė ir dozavimas.....	32
2.2.4. Transmisinė elektroninė mikroskopija.....	32
2.2.5. EV „Shotgun“ proteomika ir baltymų funkcinė analizė	33
2.2.6. hCMEC/D3 ląstelių kultivavimas	33
2.2.7. PI3K/Akt signalinio kelio ir genų raiškos tyrimų eksperimentinis planas.....	34
2.2.7. Baltymų išskyrimas iš ląstelių bei EV.....	34
2.2.8. SDS-PAGE elektroforezė ir baltymų imunoblotas	34
2.2.9. RNR išskyrimas.....	35
2.2.10. Kopijinės DNR sintezė ir tikro laiko PGR.....	36

2.2.10.	Oksidacinio streso tyrimų eksperimentinis planas	36
2.2.11.	Mitochondrinių ROS nustatymas	37
2.2.12.	Viduląstelinių ROS nustatymas.....	38
2.2.13.	NRF1/2 signalinio kelio aktyvumo nustatymas reporterinėse ląstelėse	39
2.2.14.	Statistinė analizė	40
3.	REZULTATAI.....	41
3.1.	WT-iAstro ir 3Tg-iAstro ląstelių linijų sekretuojamų EV charakterizavimas.....	41
3.1.1.	EV baltyminių žymenų bei dydžio analizė	41
3.1.2.	EV baltymų funkcinė analizė	42
3.2.	3Tg-EV bei WT-EV poveikis hCMEC/D3 ląstelių uždegiminių genų raiškos reguliavimui.....	44
3.2.1.	3Tg-EV ir WT-EV poveikis PI3K/Akt signalinio kelio aktyvumui	44
3.2.2.	3Tg-EV bei WT-EV poveikis uždegiminių genų raiškai	45
3.3.	3Tg-EV bei WT-EV poveikis ROS produkcijai	48
3.3.1.	Skirtingų tBHP dozių poveikis mitochondrinių ROS lygiui hCMEC/D3 ląstelėse	48
3.3.2.	3Tg-EV ir WT-EV poveikis mitochondrinių ROS produkcijai.....	49
3.3.3.	3Tg-EV ir WT-EV poveikis viduląstelinių ROS produkcijai	50
3.3.4.	3Tg-EV ir WT-EV poveikis NRF1/2 signalinimui	51
	REZULTATŲ APTARIMAS	53
	IŠVADOS.....	55
	SANTRAUKA	56
	SUMMARY	57
	LITERATŪRA	58
	PRIEDAI	67
	1 Priedas.....	67
	2 Priedas.....	67
	3 Priedas.....	68

Santrumpos

- AL- Alzheimerio liga
- ABC – ATP surišantys pernešimo baltymai (angl. *ATP-binding cassette transporters*)
- ATP – adenozino trifosfatas
- ARE – antioksidacinio atsako elementas (angl. *Antioxidant response element*)
- A β - amiloidas beta
- APP- Amiloido pirmtako baltymas
- Akt- baltymų kinazė B
- ALDH1A7 - aldehido dehidrogenazė
- CAT – katalazė (angl. *Catalase*)
- CNS – centrinė nervų sistema
- CCL2 - chemokinių (C-C motyvo) ligandas 2
- COX- ciklooksigenazė
- CD - ląstelių paviršiaus žymuo (angl. *cluster of differentiation*)
- DCFDA- 2,7-dichlorofluorescein diacetatas
- DAMPs – su pažeidimu susiję molekuliniai modeliai (angl. *Damage associated molecular patterns*)
- Drp-1 -su dinaminiu susijęs baltymas (angl. *dynammin-related protein 1*)
- DNR – deoksiribonukleorūgštis
- DMSO- dimetilsulfoksidas
- ESCRT - endosominio skirstymo kompleksai (angl. *Endosomal sorting complex required for transport*)
- EV – ekstraląstelinė vezikulė (angl. *Extracellular vesicles*)
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- FAL- šeiminė AL (angl. *Familial*)
- GABA - gama-amino sviesto rūgštis (angl. *gamma-aminobutyric acid*)
- GLUT1 – gliukozę pernešantis baltymas
- GFAP- glijos fibrilinis rūgštus baltymas (angl. *Glial fibrillary acidic protein*)
- GSK-3 β - glikogeno sintazės kinazė 3 beta
- Hsc70- karščio šoko baltymas 70 (angl. *Heat shock cognate 71 kDa protein*)
- IFN β - interferonas β
- ILV – Intraluminalinės vezikulės

ICAM – adhezijos molekulės (angl. *Intercellular adhesion molecules*)

ISEV - Tarptautinė ekstraląstelių vezikulių draugija (angl. *International Society for Extracellular Vesicles*)

JAM- jungtinės sukibimo molekulės (angl. *Junctional adherens molecule*)

KSB- Kraujo-smegenų barjeras

LRP1 - (angl. *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*)

LPS – lipopolisacharidas

LY294002- PI3K inhibitorius

MVK – multivezikulinis kūnelis

miRNR- mikroRNR

mRNR – matricinė RNR

MKL- mezenchiminės kamieninės ląstelės

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

mTOR- žinduolių rapamicino taikynus (angl. *mammalian target of rapamycin complex 1*)

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

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

NP- stuburo slankstelių *nucleus pulposus* ląstelės

NCE – akies nepigmentuoto ciliarinio epitelio ląstelės

NOX - NADPH oksidazė

NVU - neurovaskuliarus vienetas (angl. *Neurovascular unit*)

NK- neigiamos kontrolės konstruktas

NTA – nanodalelių analizės metodas (angl. *Nanoparticle tracking analysis*)

PAMPs – su patogenais susiję molekuliniai modeliai (angl. *Pathogen associated molecular patterns*)

PM- plazminė membrana

PSEN – presenilinas

PI3K – fosfoinozido 3 kinazė (angl. *Phosphoinositide 3-kinases*)

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *Phosphate buffered saline*)

PVDF - polivinilideno difluoridas

pAkt (Thr) – fosforilintas Akt ties 308 treoninu
pAkt (Ser) – fosforilintas Akt ties 473 serinu
Ref-1/Ape1 - redokso-faktorius 1/AP endonukleazė-1 (angl. *Redox-factor-1/AP endonuclease-1*)
Rab – Ras baltymų superšeimos mažasis G baltymas
RAGE - (angl. *Receptor for advanced glycation end products*)
RNR – ribonukleorūgštis
ROS – aktyvūs deguonies junginiai (angl. *Reactive oxygen species*)
RT-qPCR – kiekybinė atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (angl. *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)
SKEL- smegenų kraujagyslių endotelio ląstelės
SAL- sporadinė AL
SLC – tirpiųjų medžiagų nešikliai (angl. *Solute carriers*)
SOD- superoksido dismutazė
tBHP- Tert-butil hidroperoksidas
TLR – Toll-like receptoriai
TEEV - transendotelinės elektrinė varža
TSG101 – navimo jautrumo genas 101 (angl. *tumor susceptibility gene 101*)
TNF- α - naviko nekrozės veiksnys alfa (angl. *tumor necrosis factor alfa*)
VAMP3 – su vezikulėmis susijęs membraninis baltymas 3 (angl. *Vesicle-associated membrane protein 3*)
VV – veikimo vienetas
WT-iAstro – Laukinio tipo (angl. *wild type*) astrocitai
WT-EV – WT-iAstro sekretuojamos EV
hCMEC/D3 - imortalizuota žmogaus kraujo-smegenų barjero endotelio ląstelių linija (angl. *Blood-Brain Barrier Human Cerebral Microcapillary Cells*)
ZO – zonula okludinas (angl. *Zonula occludens*)
3Tg-AL - trigubos mutacijos AL modelis (angl. *Triple-transgenic AD model*)
3Tg-iAstro – Trigubą AL mutaciją turintys astrocitai
3Tg-EV- 3Tg-iAstro sekretuojamos EV

IVADAS

Alzheimerio liga (AL) yra dažniausiai pasitaikanti neurodegeneracinė demencija pasižyminti β -amiloido bei Tau neurofibrilinių raizginių susikaupimu neuronuose (1). Iki šiol nėra nustatyta tiksli AL atsiradimo priežastis, taip pat nėra efektyvių terapijos metodų.

Naujausių tyrimų rezultatai teigia, kad tiek sporadinės, tiek šeiminės AL ligos pradžia būdinga sutrikusi smegenų kraujotaka bei kraujo-smegenų barjero (KSB) integralumo pokyčiai (2). Pastarąją būklę sunkina bei AL progresavimą skatina oksidacinis stresas ir vietinis uždegimas – procesai, kurie taip pat matomi AL pacientų smegenyse (3).

Centrinėje nervų sistemoje homeostazę palaiko specializuotos glijos ląstelės – astrocitai. Jie padengia smegenų mikrokraujagysles, reguliuoja jų išsiplėtimą priklausomai nuo neuronų aktyvumo (4) bei užtikrina KSB barjerines savybes, kurios ypač svarbios reguliuojant medžiagų srautus tarp kraujo ir galvos smegenų (5). Tyrimai rodo, kad šeiminės AL mutacijas turinčių pelių (3Tg-AL) hipokampo astrocitai (3Tg-iAstro), skirtingai nei laukinio tipo astrocitai (WT-iAstro), nepalaiko glaudžiųjų jungčių funkcijos, tačiau astrocitų-endotelio tarpusavio sąveikos mechanizmas yra mažai tyrinėtas (6).

Smegenyse cirkuliuojančios ekstraląstelinės vezikulės (EV) – ląstelių sekretuojamos fosfolipidiniu dvisluoksniu apgaubtos pūslelės – taip pat siejamos su neurodegeneracinių ligų vystymosi procesais (7). Žinoma, kad jos gali skatinti arba slopinti vietinį smegenų uždegimą bei reaktyvių deguonies junginių (ROS) susidarymą. Dažniausiai, EV poveikis priklauso nuo ląstelių, iš kurių jos kilo, tipo bei fiziologinės būklės (8).

Šio darbo tikslas, ištirti imortalizuotų astrocitų linijų WT-iAstro bei 3Tg-iAstro sekretuojamų EV poveikį oksidaciniam stresui bei uždegimą reguliuojantiems genams žmogaus smegenų endotelio ląstelėse.

Uždaviniai:

1. Charakterizuoti WT-iAstro ir 3Tg-iAstro ląstelių sekretuojamas EV;
2. Įvertinti WT-iAstro ir 3Tg-iAstro kilmės EV poveikį uždegiminių genų raiškai smegenų endotelio ląstelėse;
3. Ištirti WT-iAstro ir 3Tg-iAstro sekretuojamų EV įtaką mitochondrinių bei viduląstelių ROS lygiui smegenų endotelio ląstelėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Alzheimerio liga

Neurodegeneracinės ligos yra didžiulė socialinė ir ekonominė našta visuomenei. Vaistų paiešką vienai jų – Alzheimerio ligai (AL) – Pasaulinė Sveikatos Organizacija paskelbė 2017-2025 laikotarpio prioritetu (9).

AL yra dažniausia su amžiumi susijusi demencija, kuria pastaruoju metu serga apie 50 milijonų žmonių visame pasaulyje (1). Ankstyvieji AL požymiai yra mąstymo bei nesąmoningo elgesio pokyčiai, depresijos simptomai, nuotaikų kaita bei sutrikusi kalba (10, 11). Pacientai, sergantys pažengusia AL stadija, kenčia nuo stipraus atminties praradimo, patiria haliucinacijas bei miršta dėl kvėpavimo sutrikimų, infekcijos ar badavimo (12).

Pagrindiniai molekuliniai AL požymiai yra užląstelinėje erdvėje esančios β -amiloido ($A\beta$) sankaupos bei hiperfosforilinto aksonų baltymo Tau kaupimasis neuronuose (1). Amiloidinė patogenezė prasideda kuomet sutrinka integralaus, plazminėje membranoje esančio, amiloido pirmtako baltymo (APP) skilimas. Sveikame organizme APP skelia α -sekretazė ir yra išlaisvinamas neuroprotektinių funkcijų turintis užląstelinis fragmentas sAPP- α . Po to, membranoje likusią dalį paveikia γ -sekretazė ir sudaro tirpų N-galo fragmentą p3 bei su membrana susijusį C-galo fragmentą (AICD) (13). AL atveju APP skelia β -sekretazė, kuri išlaisvina sAPP- β , o membranoje likusią dalį skelia γ -sekretazė, dėl ko susidaro AICD bei už p3 ilgesnis N-galo fragmentas – $A\beta$. Pastarasis turi savybę agreguotis, dėl ko suformuoja oligomerus, vėliau agreguojasi į sankaupas, galinčias aktyvuoti kinazes, kurios skatina Tau baltymo hiperfosforilinimą ir susikaupimą į netirpius neurofibrilinius raizginius. Šių darinių susidarymas lemia mikroglijos aktyvaciją, kuri paskatina vietinį uždegiminį atsaką ir prisideda prie neurotoksiškumo (14).

Kliniškai, AL yra skirstoma į sporadinę (angl. *Sporadic*, SAL) bei šeimninę (angl. *Familial*, FAL) formas. Pastaroji yra genetiškai paveldima ir pasireiškia 1-5% AL sergančių žmonių. Ji yra susijusi su genų, koduojančių APP bei γ -sekretazės sudėtyje esančių presenilinių (PSEN1 ir PSEN2) mutacijomis. Dėl šių pokyčių APP skilimas yra sutrikdomas ir $A\beta$ koncentracija padidėja. Taip pat yra žinoma, kad vidutiniškai FAL pasireiškia nuo 50 metų, o kai kuriais atvejais net nuo 35, dėl ko ji dar vadinama ankstyvąja AL forma. Nors pasireiškia itin retai, FAL tyrimai yra labai svarbūs nustatant kritinius ligos patogenezės kelius. Dėl šios priežasties remiantis FAL būdingomis mutacijomis yra kuriami gyvūnų modeliai. Skirtingai nei paveldima šios ligos forma, SAL

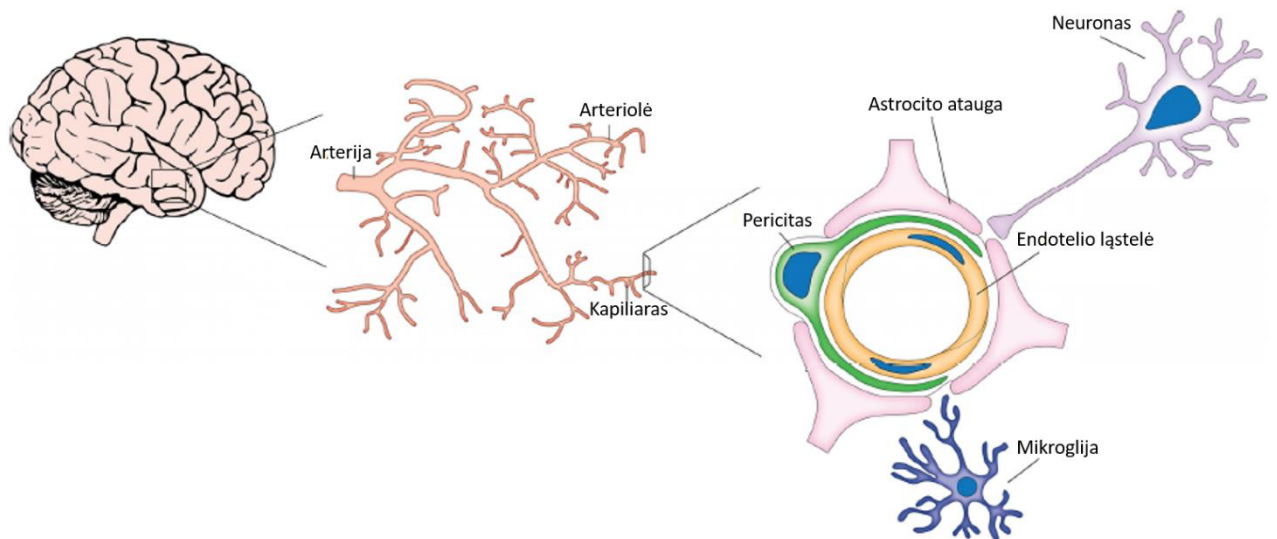
pasireiškia 95% AL pacientų, bei yra laikoma vėlyvąja forma, nes dažniausiai pasireiškia nuo 65 metų. SAL metu A β sankaupų atsiradimo priežastis nėra žinoma. Manoma, kad ją gali lemti galvos trauma, išemija, taip pat aplinkos ar genetiniai veiksniai (1). Šiuolaikinės hipotezės, kuriomis siekiama paaiškinti AL vystymosi mechanizmus apima sutrikusią kalcio homeostazę, mitochondrijų sutrikimus, bei oksidacinį stresą (15).

Daugybės tyrimų rezultatai rodo, kad smegenų kraujagyslių sutrikimas prisideda prie AL atsiradimo bei progresavimo (16, 17). Naujausi duomenys patvirtina nuo amžiaus priklausomą kraujo smegenų barjero (KSB) integralumo praradimą hipokampo srityje sveiko senėjimo metu. KSB irimas yra spartesnis pacientų su lengvu kognityviniu sutrikimu (angl. *Mild cognitive impairment*, MCI), kuris yra laikomas pradine AL stadija (2). Taip pat funkcinių vaizdų tyrimai asmenims su MCI nustatė uždelstą smegenų kraujotakos atsaką ir gliukozės pasisavinimo sumažėjimą, kas taip pat yra susiję su KSB sutrikimu (18, 19) Yra žinoma, kad daugeliu atvejų KSB vientisumą paveikia oksidacinis stresas. Padidėjus reaktyvių deguonies junginių (angl. *Reactive oxygen species*, ROS) kiekiui, pastebimas endotelio funkcijos praradimas, dėl glaudžiųjų jungčių pakitimų. Taip pat ROS sukelti mikrocirkuliacijos pokyčiai gali turėti didelę įtaką smegenų kraujagyslių patofiziologijai dėl sutrikusio kraujospūdžio reguliavimo. Taigi, oksidacinis stresas yra laikomas vienas iš svarbiausių mechanizmų vedančių prie neurovaskulinės disfunkcijos AL patogenezėje (20, 21).

1.2. Kraujo – smegenų barjeras

Žinduolių smegenyse, tarp milijardų neuronų bei glijos ląstelių egzistuoja sudėtinga kraujagyslių sistema. Kolektyviai, ji yra vadinama neurovaskuliniu vienetu (angl. *Neurovascular unit*, NVU) ir yra sudaryta iš: kraujagyslių ląstelių (pericitų ir smegenų kraujagyslių endotelio ląstelių, SKEL), glijos (astrocitų ir mikroglijos) bei neuronų (22). Šios ląstelės taip pat sudaro funkcinį KSB (1.2 pav.), kuris reguliuoja medžiagų išskyrimą bei patekimą į galvos smegenis, kraujotaką bei sinapsinį aktyvumą. Tarpusavyje NVU endotelinės ląstelės suformuoja specializuotą membraną sudarančią kraujagysles. Ji yra pagrindinis KSB komponentas, kuris riboja plazmos komponentų, raudonųjų kraujo kūnelių ir leukocitų patekimą į smegenis (17). Kitos ląstelės – pericitai, astrocitai bei mikroglija yra neatsiejamai svarbūs normaliam KSB funkcionavimui. Pericitai yra palaikomosios ląstelės, svarbios angiogenezės, imuninių ląstelių infiltracijos reguliavime bei užląstelinio užpildo sintezėje (23). Astrocitai glaudžiai sąveikauja tiek su kapiliarų

sienelėmis, tiek su neuronais bei palaiko neuronų medžiagų apytaką, o CNS vietiniai makrofagai - mikroglia sąsajoje su SKEL veikia kaip centrinės ir periferinės homeostazės sutrikimo jutiklis ir yra pirmoji CNS gynybos linija (24) (25).



1.2 pav. Funkcinis kraujo-smegenų barjeras. Adaptuota pagal Rustenhoven J. et al (26)

1.2.1. Kraujo – smegenų barjero endotelio ląstelės

SKEL ląstelės nuo periferijos endotelio skiriasi tuo, kad (i) turi KSB specifinius baltymus, kurie kontroliuoja metabolitų patekimą ir pašalinimą per ląsteles; (ii) neturi fenestracijų (poros periferinėse endotelio ląstelėse, kurios leidžia greitai pasikeisti molekulėmis tarp kraujo ir audinių); (iii) pasižymi mažu vezikulinio transportavimo greičiu, kas užkerta kelią didelių hidrofilinių molekulių pernešimui į CNS (27); (iv) pasižymi dideliu kiekiu mitochondrijų (28) bei (v) turi glaudžiasias jungtis, kurios pasižymi didele elektrine varža, ribojančia srautą tarp gretimų endotelinių ląstelių.

Vieni iš pagrindinių glaudžiųjų jungčių komponentų yra 60-65 kDa baltymai okludiniai. Juos sudaro keturi transmembraniniai duomenai, jungiantys dvi užląstelines kilpas su N ir C galo citoplazminiais domenais. Viena iš užląstelinių kilpų sąlygoja didelę elektrinę varžą, kas yra būdinga glaudžiasias jungtis turintiems audiniams (28). Taip pat svarbūs glaudžiųjų jungčių komponentai yra 20 kDa kladinai. Jie turi keturis membranų kertančius domenų, dvi užląstelines kilpas su įkrautomis aminorūgščių šoninėmis grandinėmis bei citoplazmines uodegas, svarbias

signalo perdavime. Dažniausiai KSB sutinkamas kladinas-5, tačiau taip pat dažnai randama kladino-3, -12. Kiti glaudžiųjų jungčių komponentai yra jungtinės sukibimo molekulės (angl. *Junctional adherens molecule*, JAM). Tai yra transmembraniniai glikoproteinai, priklausantys imunoglobulinų superšeimai. JAM formuoja homotipines sąveikas su kitais JAM ant ląstelių esančių priešais arba heterotipines sąveikas su skirtingais JAM šeimos baltymais taip pat ir kitomis adhezinėmis molekulėmis (27). Yra duomenų, kad JAM užląsteliniai domenai gali būti ląstelės adhezijos baltymų – integrinų šeimos (α L β 2, α M β 2, and α 4 β 1) receptoriai. Šie integrinai yra ekspresuojami cirkuliuojančiuose leukocituose, o tai rodo, kad integrinų ir JAM sąveika yra svarbi leukocitų migracijai per endotelio ląsteles (29). Glaudžiųjų jungčių funkcijai palaikyti taip pat svarbūs adaptoriniai baltymai ZO-1, ZO-2 ir ZO-3. Jie yra su membrana susijusios guanilato kinazės, kurios sujungia glaudžiųjų jungčių baltymus su aktino citoskeletu. ZO-1 yra svarbus endotelinio barjero formavimuisi, VE-kadherino tarpininkaujama ląstelių tamprumui palaikyti bei aktomiozino struktūros palaikymui per F-aktiną. ZO-1 jungiasi su kladiniais, okludiniais bei JAM per PDZ motyvus, taip pat su įvairiais citoskeleto komponentais (27).

Kadangi KSB endotelis pasižymi mažu pralaidumu per gretimų ląstelių jungtis, jis gali kontroliuoti medžiagų transportą išilgai ląstelių. Pagrindiniai pernešimo baltymai išreikšti KSB endotelio ląstelėse yra skirstomi į šalinimo ir maisto medžiagų. Šalinimo transporteriai, tokie kaip MDR1 (angl. *Multidrug Resistant Proteins*), MRP (angl. *MDR associated proteins*) bei BCRP (angl. *Breast Cancer Resistance protein*), pasitelkia ATP hidrolizę savo substratų transportavimui prieš koncentracijos gradientą. Bendrai jie vadinami ABC (angl. *ATP-binding cassette*) šalinimo transporteriai. MDR1 randamas luminalinėje endotelio ląstelės dalyje, nukreiptoje į kraujotaką ir perneša cholesterolį, lipidus, gliukokortikoidus bei peptidus iš smegenų į kraują. Jis pasižymi specifiskumu įvairiems substratams, kas leidžia surišti bei transportuoti ksenobiotikus (30). Maisto medžiagų pernešimo baltymai vykdo judėjimą pagal koncentracijos gradientą. Jie perneša tokias tirpias medžiagas, kaip gliukozę, laktatą, piruvatą, neutralias bei katijonines amino rūgštis per NVU endotelio ląsteles į CNS parenchimą. Bendrai jie vadinami SLC (angl. *Solute carriers*) pernešėjais (30). Dėl struktūrinių ir funkcinių aspektų, SKEL yra svarbiausias modeliuojant bet kokius ląstelių pagrindo KSB *in vitro* modelius, siekiant įvertinti nanodalelių pernešimą ar tirti su KSB susijusias patologijas (31).

1.2.2. Kraujo – smegenų barjero *in vitro* modelis

Pirmieji bandymai išgauti SKEL liniją prasidėjo 1974 metais, kuomet endotelio ląstelės buvo išskirtos iš galvijų smegenų žievės ir sėkmingai kultivuojamos ant nailoninių sietelių (32). Per pastaruosius 30 metų buvo sukurta daugybė *in vitro* KSB modelių, siekiant palengvinti naujų terapinių molekulių kūrimą, tiriant insultą, AL, vėžį bei išsėtinę sklerozę. Transendotelinės elektrinė varža (TEEV) yra pagrindinis KSB funkcinis matas, parodantis SKEL barjero integralumą, tiesiogiai siejamą su glaudžiosiomis jungtimis. Kadangi iš galvijų ir kiaulių pavykdavo išskirti daugiau KSB endotelio ląstelių nei iš smulkiųjų gyvūnų, jos buvo naudojamos dažniau. Tačiau ląstelių skyrimas reikalauja daug laiko, o viena pagrindinių trūkumų – rezultatų neatsikartojamumas (TEEV vertės svyravimai bei ABC bei SLC pernešimo baltymų raiškos pokyčiai tarp atskirų išskyrimų) (31, 33). Siekiant išspręsti šias problemas buvo sukurta imortalizuota žmogaus SKEL linija (angl. *Human cerebral microvasculature endothelial cell line, hCMEC/D3*). Nuo pirminio šios linijos sukūrimo 2005 metais (34), buvo paskelbta daugiau nei 150 ją charakterizuojančių publikacijų ir kol kas ši linija yra laikoma auksiniu standartu *in vitro* modeliavime (35, 36). hCMEC/D3 ląstelių linija buvo gauta iš smilkininės skilties mikrokraujagyslių išskirtų iš epilepsija sergančio žmogaus smegenų. Per pirmąjį ląstelių išsėjimą, jos buvo imortalizuojamos atliekant nuoseklią žmogaus telomerazės ir SV40 T antigeno lentivirusinę transdukciją (34). hCMEC/D3 ląstelėse gausu JAM-A baltymų, taip pat jos ekspresuoja adhezinių bei glaudžiųjų jungčių baltymus: VE-kadheriną, kludiną-3, -5, okludiną bei adaptorinius baltymus – β -kateniną, ZO-1, -2. Be to, šioje ląstelių linijoje buvo nustatyta 144 SLC ir 23 ABC pernešimo baltymų mRNR, o proteomikos duomenys parodė, kad GLUT-1 raiška buvo panašaus lygio kaip pirminių žmogaus smegenų kapiliarų ląstelių. hCMEC/D3 ląstelių linija yra kruopščiai charakterizuotas žmogaus kilmės vieno ląstelių tipo KSB modelis (monokultūra), kuris tinka medžiagų įsisavinimo eksperimentams bei tiriant SKEL endotelio atsaką į patogenus ar neurodegeneracijos patologijų mechanizmus (33, 36).

Norint sukurti labiau organizmo sąlygas primenantį KSB *in vitro*, SKEL ko-kultivavimos kartu su kitomis ląstelėmis – astrocituais arba pericitais. Šiam tikslui yra naudojamos specialios platformos, kuriose pusiau pralaidžia membrana (įterpta inserte) atskiriamos dvi kameros. Priklausomai nuo ląstelių išdėstymo tokioje platformoje išskiriami trys ko-kultivavimo modeliai: kontaktinis ir bekontaktinis bei triguba kultūra (angl. *Triple culture*). Bekontaktinis modelis yra suformuojamas užsėjus SKEL ant inserto viršutinėje kameroje, o

astrocitai (arba pericitai) – apatinėje. Po ko-kultivavimo insertai gali būti atskiriami ir eksperimentai atliekami SKEL arba apatinėje kameroje esančioms ląstelėms. Taigi, toks išdėstymas leidžia tirti NVU ląstelių išskiriamų veiksnių įtaką endotelio ląstelėms arba atvirkščiai. Kontaktinis ko-kultivavimo modelis yra suformuojamas užsėjus astrocitus (arba pericitus) ant apatinės inserto dalies, o SKEL – ant viršutinės. Šis išdėstymas leidžia tiesioginį ląstelių kontaktą, tačiau jų atskyrimas eksperimentų atlikimui yra sudėtingas. Taip pat tyrimuose naudojama triguba kultūra, kuri yra suformuojama iš trijų ląstelių tipų: SKEL sėjama ant inserto viršutinės dalies, pericitai – ant apatinės, o astrocitai – apatinėje kameroje. Šis modelis imituoja ląstelių išsidėstymą NVU ir sudaro sąlygas visų ląstelių tipų sąveikai. Tačiau, dėl šios priežasties triguba kultūra yra sudėtingesnis modelis - reikalauja daug darbo bei įgūdžių (33, 31)

Atlikti tyrimai parodė, kad kontaktinė ko-kultūra su astrocitais ir/ar pericitais padidina hCMEC/D3 TEEV reikšmes bei glaudžiujų jungčių baltymų raišką, lyginant su monokultūra. Taip pat nustatyta, kad hCMEC/D3 modelis su astrocitais labiau padidino TEEV, nei su pericitais (36). Panašūs rezultatai buvo gauti tyrimuose, kuriuose buvo naudojama bekontaktinė ko-kultūra, arba monokultūra paveikta astrocitų kondicionuota terpe. Šie duomenys parodo esminę astrocitų sekretuojamų faktorių reikšmę KSB funkcijos palaikymui (6, 36).

1.2.3. Kraujo – smegenų barjero pokyčiai Alzheimerio ligos metu

KSB pralaidumo padidėjimas leidžia toksiškoms molekulėms, ląstelėms ir mikrobiniais veiksniais iš kraujo patekti į smegenis ir sukelti uždegimą, kas gali inicijuoti neurodegeneraciją (37). Tyrimai parodė, kad KSB sutrikimas gali prisidėti prie A β produkcijos AL metu, nes KSB pažeidimo metu yra aktyvuojamos γ ir β sekretazės, kurios yra reikalingos A β susidarymui (38). Be to, yra įrodymų, kad dėl KSB sutrikimų, A β sankaupos ne tik greičiau produkuojamos, bet ir sunkiai pašalinamos į periferiją. Pagrindinis SKEL ląstelėse A β į smegenis pernešantis baltymas yra RAGE (*angl. Receptor for advanced glycation end products*), o pagrindinis, išnešantis iš smegenų-LRP-1 (*angl. Low density lipoprotein receptor-related protein 1*). AL metu LRP1 raiška yra sumažėjusi, o RAGE – padidėjusi, dėl ko sutrinka normalus A β paskirstymas (39). KSB sutrikimą matomą AL taip pat gali sukelti pro-uždegiminiai faktoriai. Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad chemokinų (C-C motyvo) ligandas 2 (CCL2) gali sukelti glaudžiujų jungčių baltymų bei aktino citoskeleto persitvarkymą, kas lemia KSB integralumo pažeidimą. Be to, CCL2 gali paskatinti leukocitų migraciją į CNS (40). Dar vienas SKEL pažeidžiantis veiksnys AL progresavime -

oksidacinis stresas. Yra žinoma, kad reaktyvios deguonies formos ROS paveikia klaidino-5 produkciją, bei ZO-1 pasiskirstymą, kas lemia sumažėjusią transendotelinę varžą ir padidėjusį KSB pralaidumą (41). Taip pat oksidacinis stresas gali sukelti pokyčius mikrocirkuliacijoje, nes sutrinka nuo endotelio priklausomas azoto oksido ($\bullet\text{NO}$) signalinimas, dėl ko sumažėja jo vazodilatorinės, priešūždegiminės savybės (42).

Manoma, kad už RAGE bei LRP-1 pernešimo baltymų aktyvumo pokyčius, proūždegiminių citokinų sekreciją bei oksidacinį stresą gali būti atsakingos nemažiau svarbios KSB ląstelės – astrocitai, tačiau tikslūs mechanizmai nėra žinomi (43).

1.3. Astrocitai

1.3.1. Astrocitų funkcijos

Astrocitai yra specializuotos glijos ląstelės, kurių pagrindinė funkcija yra palaikyti homeostazę ir suteikti apsaugą neuronams CNS. Priklausomai nuo smegenų srities, astrocitai sudaro 20-40% neuroglijos ląstelių (44). Šios ląstelės yra pagrindinis energijos substratų šaltinis neuronams. Tyrimai rodo, kad neuronai, išskirdami neuromediatorių glutamatą, aktyvina šalia esančių astrocitų glikolizę, kurios produktas laktatas yra pagrindinis energijos substratas neuronams (45). Be to, astrocitai sintetina glutamatą ir aprūpina neuronus glutaminu, kuris yra glutamato ir γ -amino sviesto rūgšties (GABA) pirmtakas (46). Astrocitai palaiko pH, skysčių bei mediatorių homeostazę. Jų membranose gausu pernašos baltymų, pavyzdžiui, Na^+ / H^+ antiporterių, monokarboksirūgščių, bikarbonatų, nešiklių, vakuolinio tipo protonų ATPazių (47). Astrocitų ataugos sąveikauja su neuronų presinapsinėmis ir postsinapsinėmis membranomis ir sudaro „trišalę sinapsę“ (angl. *Tripartite synapse*). Šioms sinapsėms priklausančiose astrocitų ataugose yra didelė neurotransmiterių (glutamato, GABA, glicino) pernešimo baltymų raiška. Į astrocitų citoplazmą patekę neuromediatoriai yra fermentų suardomi iki pirmtakų ir sekretuojami atgal į sinapsę, kur vėl virsta aktyviais mediatoriais (48).

Astrocitai savo ataugomis beveik visiškai padengia smegenų mikrokraujagysles ir priklausomai nuo sinapsinio aktyvumo gali reguliuoti mikrokraujagyslių išsiplėtimą (angl. *Neurovascular Coupling*). Aktyviai veikdami neuronai išskiria neuromediatorių glutamatą, kuris aktyvina metabotropinį glutamato receptorių esantį astrocitų membranoje. Ši aktyvacija skatina inozitolio-3-fosfato susikaupimą ir Ca^{2+} išlaisvinimą, dėl ko aktyvinama fosfolipazė A2 ir per ciklooksigenazės

(COX) kelią aktyvinama prostaglandino E2 produkcija, kas lemia gretimų mikrokraujagyslių išsipėtimą bei skatinamas deguonies ir gliukozės pateikimas nerviniam audiniui (4). Astrocitų ir mikrokraujagyslių sąveika taip pat svarbi KSB integralumo palaikymui. Daugybė tyrimų su ląstelių kultūromis parodė, kad astroцитai palaiko glaudžiausias SKEL jungtis (fizinį barjerą), skatina pernešimo baltymų MDR1 bei GLUT1 raišką, lemia jų lokalizaciją (transporto barjeras) bei palaiko specializuotas fermentų sistemas (metabolinį barjerą) (5).

Taigi, astroцитai atlieka keletą esminių funkcijų, kurios palaiko sveiką CNS: jie tiekia energijos substratus neuronams, palaiko skysčių, jonų bei neurotransmiterių homeostazę, o sąveikaudami su mikrokapiliarais – reguliuoja smegenų kraujotakos intensyvumą bei KSB integralumą. Tyrimai rodo, kad astroцитai taip pat dalyvauja palaikant svarbias smegenų funkcijas, įskaitant motorinę koordinaciją, kontroliuoja miego-pabudimo ciklą, reguliuoja atminį bei atsako už į depresiją panašų elgesį. Reaguodami į pažeidimus (išemiją, traumą, neurodegeneracines ligas, tokias kaip AL), astroцитai patiria didelius molekulinis bei funkcinius pokyčius, dėl kurių praranda įprastas savo funkcijas. Astroцитų sutrikimas buvo pastebėtas trigubos AL mutacijos pelių modeliuose, ankstyvoje AL stadijoje. Šiame modelyje, *in vitro* ir *in vivo* buvo pastebėti astroцитų morfologiniai pokyčiai (sumažėjęs ataugų skaičius, ląstelės kūnas) rodantys astroglijos atrofiją (49). Taip pat šis reiškinys buvo matomas AL sergančių pacientų smegenų mėginiuose po mirties (50).

1.3.2. 3Tg-AL modeliai

Siekiant aiškintis AL mechanizmus bei kurti naujus terapinius metodus buvo sukurti AL gyvūnų modeliai. Amiloidinės kaskados hipotezę atkartojantis ir dažnai naudojamas AL tyrimuose, yra trigubos mutacijos AL modelis (3Tg-AL) (angl. *Triple-transgenic AD*), kuriame yra PSEN1 (PS1_{M146V}) koduojančio geno *knock-in* mutacija bei įterpti APP (APP_{Swe}) ir Tau baltymo (tau_{P301L}) transgenai. 3Tg-AL pelių, kaip ir AL sergančio žmogaus, tam tikrose smegenų dalyse, prieš susikaupiant neurofibriliniams raizginiams, formuojasi užląsteliniai Aβ. Šias mutacijas turinčios pelės pasižymėjo neuronų sinapsinio plastiškumo – ilgalaikės potenciacijos sutrikimais hipokampo srityje, kas lemia susilpnėjusias mokymosi ir atminties galimybes (51). Kitų autorių atlikti proteomikos tyrimai su 3Tg-AL mutacijas turinčių pelių hipokampo srities mitochondrijomis parodė baltymų, susijusių su energijos metabolizmu, apoptoze ir oksidaciniu stresu, pakitusią raišką. Pavyzdžiui, buvo aptikta mitochondrijų dalijimosi procesą reguliuojančio baltymo Drp-1 (angl. *dynamin-related protein 1*) ir superoksido dismutazės komponentų sutrikusi raiška. Taip pat,

buvo rasti I, III ir IV kvėpavimo kompleksų komponentų sutrikimai. Šie pokyčiai mitochondrijose gali lemti jų funkcijos sutrikimus AL mutaciją turinčių pacientų organizmuose (52).

Kadangi sukaupti duomenys tvirtina svarbų astrocitų vaidmenį AL patogenezėje, o hipokampo sritis yra vienas iš svarbiausių smegenų regionų, pažeidžiamų AL metu, mokslininkai sukūrė imortalizuotų hipokampo srities 3Tg-AL ir laukinio tipo (angl. *Wild type control*, WT) astrocitų linijas – 3Tg-iAstro ir WT-iAstro. Atlikti tyrimai su šiomis ląstelių linijomis parodė, kad 3Tg-iAstro pasižymi sumažėjusiu atsumu tarp mitochondrijų ir endoplazminio tinklo, kas sukelia sumažėjusį Ca^{2+} signalinimą mitochondrijose. Manoma, kad tai gali lemti sutrikusias mitochondrijų funkcijas taip pat matomas 3Tg-iAstro ląstelėse: sumažėjęs oksidacinio fosforilinimo pajėgumas, ATP gamyba, aukštas mitochondrinių ROS lygis (15). Kiti tyrimai parodė, kad ko-kultivuojant 3Tg-iAstro kartu su SKEL, glaudžiujų jungčių baltymų ekspresija ir transendotelinė varža nepasikeitė, kai tuo tarpu ko-kultivuojant su WT-iAstro - padidėjo. Šie rezultatai patvirtino sveikų astrocitų esminę funkciją palaikant KSB integralumą, o astrocitų iš 3Tg-AL pelių funkcijos praradimas parodė, kad šios ląstelės išlaiko patologines savybes, susijusias su AL (6).

Yra žinoma, kad KSB ląstelės gali bendrauti ne tik kontaktiniu būdu, bet ir išskirdamos nanopūsleles – ekstraląstelines vezikules (EV), kurių sudėtis bei biologinės savybės priklauso nuo ląstelių, iš kurių jos kilo, jų fiziologinės ar patologinės būsenos. Atlikus tyrimus su sveikų ir 3Tg-AL astrocitų išskiriamomis EV, buvo pastebėta, kad jų veikimas atspindi ląstelių, iš kurių jos kilo, efektus: EV iš 3Tg-iAstro nepalaikė KSB integralumo, priešingai nei EV iš WT-iAstro (6). Nors per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo atlikta daug tyrimų, rodančių EV reikšmę įvairių neurodegeneracinių ligų patogenezėje, tikslus jų veikimas vis dar yra aktyviai tyrinėjamas (7).

1.4. Ekstraląstelinės vezikulės

Tarpląstelinis bendravimas yra esminis daugialąsčių organizmų bruožas. Jis vyksta ląstelėms tiesiogiai pernešant įvairias molekules, kurios būna įkorporuotos į ląstelių išsiriamas pūsleles apgaubtas fosfolipidų dvisluoksniu. Šios pūslelės bendrai vadinamos EV. Jų sekrecija pirmą kartą buvo apibūdinta kaip nereikalingų medžiagų pašalinimo mechanizmas (53). Tačiau per daugiau nei 30 metų tyrėjų surinkti duomenys rodo, kad EV gali vykdyti medžiagų apsikeitimą tarp ląstelių (pernešti nukleino rūgštis, lipidus bei baltymus) ir gali veikti kaip signalinimo priemonė normaliuose homeostatiniuose procesuose arba patologijų metu (54). EV terminas yra naudojamas kalbant apie visas išskiriamas membranines pūseles, tačiau jos yra itin heterogeniškos. Pagal

turimus EV biogenezės duomenis, jas galima skirstyti į tris subpopuliacijas: mikrovezikules (100-1000 nm skersmens), kurios atsiskiria nuo plazminės membranos (PM), egzosomas (30-200 nm), kurios suformuojamos endosominio skirstymo metu bei apoptotinius kūnelius (50-5000 nm), kurie susidaro ląstelei mirštant (55) (1 lentelė). Apoptotinių kūnelių sekrecija vyksta ląstelei žūnant apoptozės būdu buvo žinoma seniai, tačiau naujai atrastų mikrovezikulių ir egzosomų tyrimai šiuo metu yra didžiausias mokslininkų interesas. Daugumoje publikuotų straipsnių tyrinėjančių EV, daugiausia dėmesio yra skiriama potencialioms EV funkcijoms, o ne jų kilmei, dėl to vis dar nėra aišku, kuri EV rūšis yra atsakinga už bet kuri konkretų poveikį. Taip pat dėl persidengiančių dydžių, panašios morfologijos ir kintančios sudėties sunku pilnai charakterizuoti skirtingas EV rūšis bei standartizuoti išskyrimo metodus. Dėl greitai didėjančių EV publikacijų skaičiaus, įsikūrusi Tarptautinė ekstraląstelinių vezikulių draugija (angl. *International Society for Extracellular Vesicles*, ISEV) pateikia minimalius kriterijus EV tyrimams, kurie apima EV atskyrimą, charakterizavimą bei funkcinius tyrimus. Pavyzdžiui, EV charakterizavimui ISEV rekomenduoja pateikti bent tris biomarkerius apimančius šias kategorijas: transmembraniniai baltymai (tetraspaninai, integrinai), citozoliniai baltymai išlikę EV (biogenezės faktoriai, šaperonai, citoskeleto baltymai) bei neigiama kontrolė – su EV išskiriami bet jų struktūroms nepriklausantys baltymai (lipoproteinai, neintegralūs baltymai). Taip pat svarbu charakterizuoti pavienes EV pateikiant elektroninės mikroskopijos nuotraukas bei nustatyti jų dydį ir kiekį naudojant pavienių dalelių analizės technikas, pavyzdžiui, nanodalelių sekimo analizę (angl. *Nanoparticle tracking analysis*, NTA). ISEV pabrėžia būtinybę atsižvelgti į šias rekomendacijas darant tvirtas išvadas apie EV funkcijas bei šitaip skatina patikimesnių ir atsikartojančių rezultatų publikavimą (56).

Rūšis	Dydis	Tankis	Kilmė	Sandara
Mikrovezikulės	100-1000 nm (57)	1.25-1.30 g/mL (58)	Atsiskiria nuo plazminės membranos	Biogenezės faktoriai: TSG101, ALIX, fosfolipazė D. Šaperonai: HSP70, HSP90. Tetraspaninai: CD9, CD81, CD82. Citoskeleto molekulės: Aktinas, tubulinas. Nukleorūgštys: miRNR, mRNA, DNA (ir histonai) (59)
Egzosomos	30-200 nm (57)	1.13-1.19 g/mL (58)	Iš multivezikulinio kūnelio egzocitozės būdu	Biogenezės faktoriai: TSG101, ALIX, sinteninas, ubikvitinas, VPS32. Šaperonai: HSP70, HSP90. Tetraspaninai: CD9, CD81, CD82, CD63, CD53, CD151. Fermentai: peroksidazės, piruvato kinazė, enolazė. Nukleorūgštys: miRNR, mRNA, DNA (ir histonai) (59)
Apoptotiniai kūneliai	50-5000 nm (57)	1.16-1.28 g/mL (58)	Iš plazminės membranos ląstelei mirštant apoptozės būdu	Fosfotidilserinas, ląstelės organelės, chromatinas. (59)

1 Lentelė. Ekstraląstelinių vezikulių klasifikacija. Adaptuota pagal Van Niel G. et al (59), Yuan Z. Et al (58) ir Yong W. et al (57).

1.4.1. EV biogenezės mechanizmai

Egzosomų biogenezė prasideda kuomet nuo PM įlinkimo susiformuoja ankstyvoji endosoma. Brendimo procesas vyksta endosomai keliaujant į ląstelės centrą ir keičiantis jos pernešamo krovinio sudėčiai bei persitvarkant membranai. Tuo pat metu daugiau nei 20 baltymų yra paskirstomi per keturis Endosominio skirstymo kompleksus reikalingus transportui (angl. Endosomal sorting complex required for transport, ESCRT). Sinergistiškai vyksta ir nuo ESCRT nepriklausomas brendimo kelias, tačiau abu jie yra susiję su membranos įlinkių formavimu ankstyvojoje endosomoje – intraluminalinių vezikulių (ILV) susidarymu (60) (1.4.1 pav.). Šio proceso metu į ILV yra surūšiuojami citozoliniai baltymai, nukleorūgštys bei lipidai. Endosoma su ILV yra vadinama multivezikuliniu kūneliu (MVK), kuris gali arba susiliesti su lizosoma ir suirti arba susiliesti su PM ir išleisti ILV kaip egzosomas į užląstelinę erdvę (61).

Nuo ESCRT priklausomos biogenezės metu pirmasis, ESCRT-0, kompleksas atpažįsta ubikvitilintus baltymus endosomos membranos išorėje ir juos sukonzentruoja. Šis kompleksas

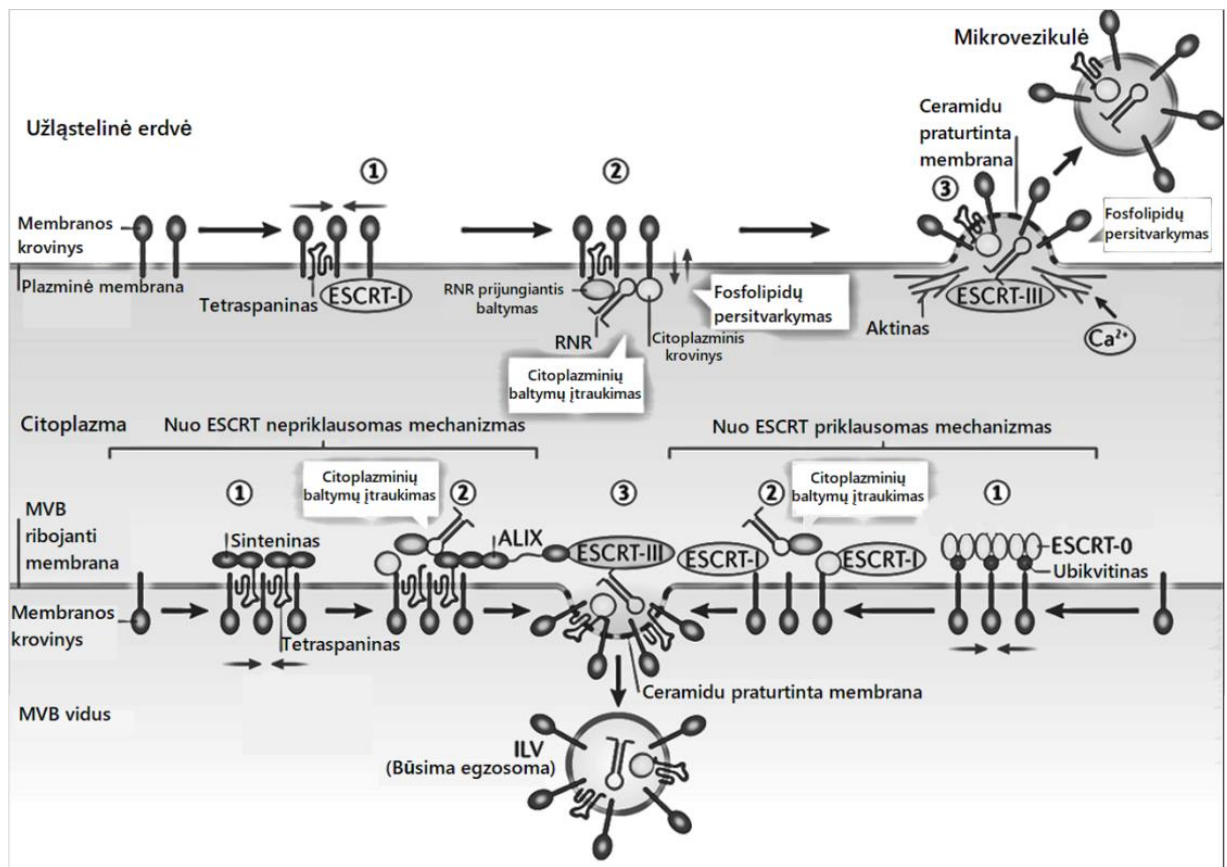
lemia sekančio, ESCRT-I, komplekso prisijungimą. TSG101 (angl. *Tumor susceptibility gene 101*) baltymas, kuris yra vienas iš ESCRT-I komponentų, sąveikauja su ESCRT-0 bei ubikvitilintais membranos baltymais, o kitas komponentas – Vsp28 (angl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog*) sąveikauja su ESCRT-II baltymais. Kartu susijungę ESCRT-I ir -II kompleksai gali paskatinti endosomos membranos įlinkimą ir suformuoti ILV. Jų susijungimas taip pat lemia paskutiniojo, ESCRT-III, komplekso susirinkimą. Šis sukelia ILV atsiskyrimą nuo membranos, kai ESCRT-III pritraukia deubikvitinazes, pašalinančias ubikvitino fragmentus iš ILV krovinio (62). Šis kanoninis ESCRT kelias gali kirstis su kitų baltymų vykdomu ILV generavimu: Baltymas sinteninas kartu su ESCRT aksesoriniu baltymu ALIX (angl. *ALG-2 interacting protein X*) gali sujungti krovinius su ESCRT-III komplekso baltymu Vsp32 (59).

Egzosomų biogenezės mechanizmui, kuris nepriklauso nuo ESCRT, yra svarbus ceramido sintetinimas ant endosomos membranos. Už jo gamybą atsakinga neutrali II tipo sfingomielinazė. Ceramidas sukelia spontanišką membranos įlinkį ir lemia ILV susiformavimą. Taip pat endosominiam skirstymui yra svarbūs membranos baltymai tetraspaninai. Dažniausiai egzosomose sutinkami yra CD63, CD9, CD81 ir CD82. Jie pasižymi kūgio formos struktūra membraninėje srityje ir jų susigrupavimas membranoje skatina membranos įdubimą (59).

Nėra tiksliai žinoma, kaip citozoliniai komponentai yra įtraukiami į egzosomas, tačiau yra manoma, kad tai gali būti susiję su šaperonų, tokių kaip karščio šoko baltymo 70 (angl. *Heat shock cognate 71 kDa protein, Hsc70*) veikimu, kuris gali įtraukti kitus baltymus į egzosomų membraną. Be Hsc70, svarbų vaidmenį rūšiuojant baltymus į egzosomas atlieka Hsp90, 14-3-3 epsilon bei piruvato kinazė M2, kurie yra randami daugumos ląstelių tipų egzosomose (63).

Mikrovezikulių biogenezės mechanizmai vis dar nėra gerai išaiškinti. Kai kurie molekuliniai mechanizmai, veikiantys EV biogenezės etapus yra bendri tiek egzosomų, tiek mikrovezikulių susidarymui. Tai yra ESCRT baltymų veikimas bei ceramido susidarymas veikiant sfingomielinazei. Išimtimi gali būti laikomas membranos fosfolipidų asimetrijos pertvarkymo mechanizmas, kuris yra unikalus mikrovezikulių biogenezei (1.4.1 pav.). Jį vykdo nuo Ca^{2+} priklausomi fermentai – fosfolipidų translokazės, skramblazė, kalpainas, kurie skatina fosfatidilserino išsidėstymą išoriniame ląstelės paviršuje. Tai sukelia fizinį membranos išsilenkimą ir aktino skeleto restruktūrizavimą, kas lemia mikrovezikulių atsiskyrimą (64). Taip pat buvo pastebėta, kad mikrovezikulių sekrecija yra priklausoma nuo ATP valdomų purinerginių P2X7-receptorių, kurie sukelia persitvarkymus ląstelės membranoje. Mechanškai, šis procesas yra susijęs su rūgštinės sfingomielinazės, sintetinančios ceramidą, perkėlimu į membraną (65).

Kadangi mikrovezikulių susidarymui svarbi rūgštinė, o ne neutrali sfingomielinazė, galima daryti prielaidą, kad egzosomų ir mikrovezikulių sekreciją reguliuoja sfingomielinazių šeimos baltymai (59).



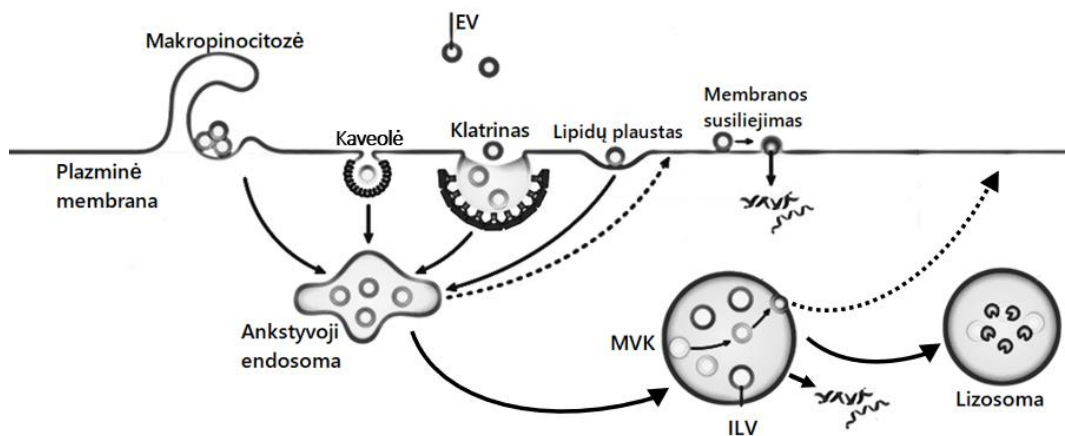
1.4.1 pav. Ekstraląstelių vezikulių biogenezės mechanizmai. Adaptuota pagal Van Niel G. et al (59).

1.4.2. EV patekimas į ląstelę ir jų funkcijos

Remiantis atliktų tyrimų duomenimis yra manoma, kad ląstelių-recipientų specifiškumą tam tikroms EV lemia specifinė sąveika tarp ląstelių PM esančių receptorių ir EV membranoje esančių baltymų. Nors nėra žinomi tikslūs molekuliniai mechanizmai, yra manoma, kad tokių sąveikų tarpininkai gali būti tetraspaninai, integrinai, lipidai lektinai ar užląstelinio užpildo komponentai. Pavyzdžiui, integrinai ant EV gali sąveikauti su ląstelių-recipientų tarpląstelinėmis adhezijos molekulėmis (angl. *Intercellular adhesion molecules*, ICAM) (66). Taip pat egzosominiai tetraspaninai gali sąveikauti su integriniais ląstelės PM ir skatinti susijungimą.

EV prisijungimas gali inicijuoti funkcinį atsaką ląstelėje-recipientėje. Pavyzdžiui, egzosomos iš B limfocitų ir dendritinių ląstelių gali pateikti antigeną T limfocitams ir sukelti specifinį imuninį atsaką (67). EV taip pat gali būt internalizuojamos. SKEL ląstelėse EV patekimas buvo stebimas susidarant kaveolėms, lipidų plaustams, vykstant makropinocitozei bei nuo klatrino priklausomai endocitozei (68, 69) (1.4.2 pav). Kuomet EV internalizuojama, ji patenka ankstyvąją endosomą bei MVK, kuris dažnai nukreipiamas į lizosomą ir suardomas. Šis kelias suteikia svarbų metabolitų šaltinį ląstelėms-recipientėms. Kitais atvejais EV gali to išvengti ir susiliejus su MVK ribojančia membrana išleisti savo turinį į ląstelės-recipientės citoplazmą. Taip pat gali atsitikti EV tiesiogiai susiliejus su ląstelės PM (59). Šis procesas yra svarbus mikroRNR (miRNR) bei matricinės RNR (mRNR) pernešimui ir genų raiškos reguliavimui (70), kai kurių transmembraninių baltymų ar lipidų apsikeitimui tarp ląstelių.

Parodyta, kad EV neurovaskuliniame vienete yra svarbios tarpląstelinio bendravimo tarpininkės. Jos prisideda prie nervinės diferenciacijos ir sinapsių formavimo, o tokio bendravimo sutrikdymas gali itin pakenkti nervų sistemos veiklai (71). Teigiama, kad astrocitų sekretuojamos EV yra vienas reikšmingiausių astrocitų ir aplinkinių ląstelių bendravimo būdų. Įdomu tai, kad normaliomis sąlygomis, taip pat ir nenormaliomis (tokiomis kaip oksidacinis stresas, maistinių medžiagų trūkumas, uždegimas) astrocitų EV gali apsaugoti neuronus ir skatinti neuritų atsinaujinimą. Pavyzdžiui, vienas tyrimas parodė, kad astroцитai patyrę hipertermiją padidina šaperono Hsc70 kiekį, kuris išsiskiria su egzosomomis ir toliau aktyvina su stresu susijusias kinazes, kad sumažintų stresą neuronuose (72). Taip pat žinoma, kad oksidacinio streso metu astrocitų išskirtos EV transportuoja apolipoproteiną, klasikinį neuroprotektinį baltymą ir šitaip palaiko neuronų išgyvenamumą (73). Tačiau taip pat yra įrodymų, kad astrocitų EV gali turėti neigiamą poveikį. Tyrimai rodo, kad astrocitų sekretuojamos EV yra prisidedantys veiksniai AL patogenezėje. Pavyzdžiui, astrocitų kilmės EV yra susijusios su fosforilinto Tau baltymo pernešimu į kitas ląsteles (74). Taip pat astrocitų egzosomos iš AL pacientų plazmos mėginių pasižymi dideliu kiekiu komplemento baltymų bei pro-uždegiminių citokinų (75). Tyrimuose su SKEL ląstelėmis, EV iš 3Tg-iAstro nepalaikė KSB integralumo, kaip tai padarė EV iš sveikų astrocitų (6). Šie duomenys parodo neabejotiną astrocitų bei jų sekretuojamų EV reikšmę AL, tačiau tikslūs mechanizmai lieka nežinomi.



1.4.2 pav. Ekstraląstelinių vezikulių patekimas į ląstelę-recipientę. Adaptuota pagal Van Niel G. et al (59)

1.4.3. EV vaidmuo uždegiminiuose procesuose

Yra duomenų, kad EV gali sukelti uždegimą pernešant su patogenais ar pažeidimu susijusius molekulinis modelius (angl. *Pathogen associated molecular patterns*, PAMPs; angl. *Damage associated molecular patterns*, DAMPs). Beveik visi infekcijos sukėlėjai gali sekretuoti uždegimines EV, kurios ląstelėse-recipientėse gali aktyvinti NF- κ B transkripcijos faktorių ir sukelti pro-uždegiminių citokinų atsaką. EV, susijusios su DAMP, pavyzdžiui, HSP ar baltymu S100, kurie gali būti Toll-like-receptorių (TLR) ligandai, skatina tokių signalinių baltymų kaip ERK, p38, JNK fosforilinimą bei lemia pro-uždegiminių citokinų genų raiškos aktyvinimą (76).

Atliktos studijos rodo, kad EV gali prisidėti prie uždegimo plitimo, nes gali pernešti lipidų tarpininkus, citokinus bei miRNR. Pavyzdžiui, buvo pademonstruota, kad trombocitų EV gali pernešti arachidono rūgštį į kitus trombocitus ir endotelines ląsteles, kas inicijuoja tromboksano A₂ ir COX2 produkciją. Šis pernešimas įrodė EV gebėjimą reguliuoti vietinę mikroaplinką vykdant tarpląstelinę lipidų apykaitą (77). Taip pat manoma, kad EV sekrecija gali būti mechanizmas, kuriuo pernešami baltymai, neturintys nukreipiančio, signalinio peptido, pavyzdžiui, interleukinai 1 β , 18, galektinai-1, -3 (76). Be to, EV pernešama miRNR gali jungtis prie TLR bei aktyvinti NF- κ B. Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad miR-29a bei miR-21 aktyvina interleukino-6 bei naviko nekrozės faktorių pelių organizme per TLR-7 receptoriaus aktyvaciją (76).

Uždegiminiuose keliuose dalyvaujančių genų raišką gali kontroliuoti transkripcijos faktoriai, kuriuos aktyvina oksidacinis stresas. Šiame procese taip pat dalyvauja EV vykdoma medžiagų pernaša, tačiau tikslūs mechanizmai nėra žinomi (8).

1.5. Oksidacinis stresas

Reaktyvūs deguonies junginiai yra biologiškai svarbios molekulės, kurios gali dalyvauti ląstelės signalinime. Jos yra sukuriamos kaip šalutiniai medžiagų apykaitos produktai. Dažniausi ROS yra superoksido radikalas ($O_2^{\cdot-}$), vandenilio peroksidas (H_2O_2), singletinis deguonis (1O_2), hidroksilio radikalas ($OH\cdot$) be to gali būti ir azoto kilmės reaktyvūs junginiai, tokie kaip azoto oksido radikalas ($NO\cdot$) ir peroksinitrinas ($ONOO^-$) (78).

ROS produkcija remiasi į fermentines ir nefermentines reakcijas vykstančias ląstelėse. Fermentinės reakcijos yra susijusios su kvėpavimo grandinės veikimu mitochondrijose, prostaglandinų sinteze, fagocitoze bei citochromo P450 sistema. Tokie fermentai kaip NADPH oksidazė (NOX), ksantino oksidazė ir peroksidazė generuoja superoksido radikalą ($O_2^{\cdot-}$), kuris dalyvaudamas kitose reakcijose sukuria vandeninio peroksido (H_2O_2), hidroksido radikalą ($OH\cdot$) bei kitus ROS. Mažiau reaktyvus junginys - H_2O_2 yra sintetinamas amino rūgščių oksidazės ir ksantino oksidazės. Tačiau reakcijoje, kurioje dalyvauja H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ir reakcijos katalizatoriai Fe^{2+} arba Cu^+ yra sukuriamas hidroksilo radikalas ($OH\cdot$), kuris yra laikomas labiausiai reaktyviu laisvuju radikalu *in vivo*. $NO\cdot$ yra sintetinamas trijų skirtingų azoto oksido sintazių (NOS). Tai yra konstatyvi izoforma endotelio ląstelėse – eNOS, neuronuose – nNOS bei indukuojama izoforma – iNOS. $NO\cdot$ reguliuoja smegenų kraujotaką bei neuronų gyvybingumą, tačiau didelis kiekis eNOS ar iNOS produkuojamas $NO\cdot$ kiekis lemia neurotoksiškumą. Taip pat ROS gali susidaryti nefermentinių reakcijų metu, pavyzdžiui deguonies molekulei sureagavus su organiniu junginiu arba paveikus ląsteles jonizuojančia spinduliuote (78).

Mažą ROS koncentraciją užtikrina ląstelėse esančios antioksidacinės sistemos, tokios kaip yra superoksido dismutazė (SOD), katalazė (angl. *Catalase*, CAT), glutationo peroksidazė (GPx), kurios suriša ir neutralizuoja ROS. Kuomet ląstelėse sutrinka oksidacijos/redukcijos reakcijų balansas ir antioksidacinės sistemos nepajėgia neutralizuoti ROS, ląstelės patiria oksidacinį stresą. Jo metu susikaupę hidroksilo radikalai ($OH\cdot$) paveikia jautrias polinesočias riebalų rūgštis ir pakeičia jų struktūrą, o susidarę peroksilo radikalai toliau paveikia kitas rūgštis, sukeldami grandininę reakciją (3). Taip pat $OH\cdot$ oksiduoja baltymus, paveikia jų funkcijas, bei sukelia DNR pažeidimus.

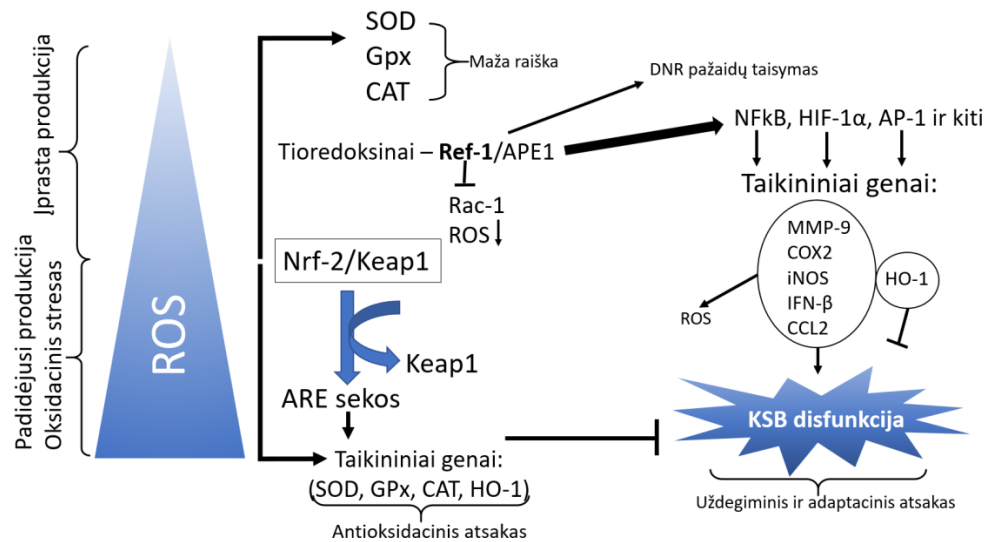
1.5.1. Oksidacinio streso reguliavimo mechanizmai

Oksidacinio streso metu KSB funkcija ir integralumas priklauso nuo įvairių oksidacijai/redukcijai jautrių sistemų, kurios veikia esant skirtingiems ROS lygiams. Kuomet ląstelėje sintetinamas mažas kiekis ROS, trys SOD izoformos suriša $O_2^{\cdot-}$, suformuodamos H_2O_2 , kuris yra pašalinamas veikiant GPx ir CAT. Kuomet ROS lygis ląstelėje padidėja, yra aktyvuojamos papildomos sistemos, t.y. tioredoksinai ir transkripcijos faktorius Nrf-2 (79) (1.5.1 pav).

Oksidacijai/redukcijai jautrūs baltymai tioredoksinai sąveikauja su bifunkciniu – redokso-faktoriumi 1/AP endonukleaze-1 (angl. *Redox-factor-1/AP endonuclease-1*, Ref-1/Ape1), kuris be oksidacijos/redukcijos reakcijų signalinimo, dalyvauja DNR pažaidų taisyme. Aktyvuotas Ref-1/Ape1 kaupiasi branguolyje ir redukuoja kai kurių transkripcijos faktorių oksiduotus cisteino radikalus. Keli iš Ref-1/Ape1 paveikiamų transkripcijos faktorių yra NFkB, HIF-1a, AP-1. Toks Ref-1 poveikis lemia didesnę jų gebėjimą prisijungti prie DNR ir aktyvuoti tolimesnius genus, pavyzdžiui, antioksidantą hemo-oksigenazę-1 (HO-1), metaloproteinazę-9 (MMP9), COX2, iNOS, citokinus interferoną β (IFN β), monocitų chemoatraktantą CCL2 (80, 81) . Jie dalyvauja uždegime bei adaptacinėje reakcijoje į oksidacinį stresą, tačiau taip pat gali lemti KSB integralumo praradimą. Be to, vienas aktyvintas Ref-1 gali redukuoti viduląstelinius ROS, nes užslopina mažąją GTPazę Rac-1.

Nrf-2 reguliuoja antioksidacinių baltymų (SOD, GPx, CAT, HO-1) sintezę. Normaliomis sąlygomis Nrf-2 yra išskiriamas į citoplazmą, kur yra susijungęs su represoriniu baltymu Keap-1. Kuomet ROS lygis padidėja, Nrf-2 atsiskiria nuo Keap-1 ir translokuojasi į branduolį, kur prisijungia prie antioksidacinio atsako elemento (ARE) sekų taikininiuose genuose ir padidina jų transkripciją (79) (1.5.1 Pav.). Taip pat manoma, kad Nrf-2 gali paskatinti anti-uždegiminių mediatorių sintezę, aktyvinti proteosomą bei kitus transkripcijos faktorius susijusius su mitochondrijų biogeneze (82).

Taigi, oksidacijos/redukcijos reakcijoms jautrūs signaliniai baltymai ir jų aktyvinami transkripcijos faktoriai veikia kartu, kad išlaikytų viduląstelinę pro-oksidantų ir anti-oksidantų homeostazę (79). Manoma, kad šiame ROS balanso palaikyme taip pat dalyvauja EV, kurios gali pernešti ROS surišančius arba juos produkuojančius fermentus.



1.5.1 pav. Kraujo-smegenų barjero funkcija reguliuojama oksidacijai/redukcijai jautrių sistemų, kurios veikia skirtinguose ROS lygiuose. Adaptuota pagal Lehner C. et al (79).

1.5.2. EV poveikis oksidaciniam stresui

EV ir ROS yra glaudžiai susiję ne tik dėl to, kad EV gali padidinti arba sumažinti ROS kiekį, bet ir dėl to, kad ROS yra susiję su EV produkcija. Yra manoma, kad pro-oksiduojančios sąlygos sukelia EV išsiskyrimą. Tai parodė eksperimentai, kurių metu neutrofilus paveikus NOX, NOS-2 inhibitoriais buvo užslopinta EV sekrecija. Taip pat pastebėta, kad navikinėse ir senstančiose ląstelėse, kurios pasižymi sutrikusia oksidacijos/redukcijos reakcijų pusiausvyra ir padidėjusiu ROS kiekiu, matomas didesnis sekretuojamų EV kiekis (8).

Daugybę studijų parodė, kad EV tiesiogiai paveikia ROS kiekį ląstelėse. Jos gali pernešti ROS surišančius antioksidacinius fermentus (Gpx, SOD, CAT, peroksiredoksinius, glutationo S transferazę), taip pat ir ROS produkuojančius - NOX. Be to, EV turi įtakos ROS lygiui netiesiogiai. Šis poveikis sukliamas kuomet į EV įtraukiamos signalinės molekulės, kurios gali modifikuoti genų raišką, susijusią su oksidacijos/redukcijos procesų reguliavimu, kas paveikia ląstelinį ROS kiekį. Tyrimas su T limfocitų EV parodė, kad jos ne tik perneša antioksidacinius fermentus (CAT bei dvi SOD izoformas), bet ir paskatina SOD-1 raišką žmogaus virkštelės endotelio ląstelėse, o šis EV poveikis apsaugo ląsteles nuo apoptozės (83). Tyrimas su makrofagų egzosomomis parodė, kad jos neša NOX, tačiau šiuo atveju jo susintetinti ROS neigiamų efektų nesukelė, bet priešingai – skatino neuritų ataugimą ir aksonų regeneraciją po pažeidimo pelių organizme. Buvo parodyta, kad

egzosomos, patekusios į pažeistą aksoną mikrotubulėmis yra nešamos į neuronų kūną, kur ROS oksiduoja ir inaktyvuoja fosfatazę PTEN, kas lemia PI3K-pAkt signalinimą ir regeneracinį aksono ataugimą (84). Tačiau šoninės amiotrofinės sklerozės modelyje buvo pastebėta, kad astrocitų sekretuojamos EV gali prisidėti prie šios ligos progresavimo. Šiame tyrime astrocitų EV buvo gausu mutantinio SOD-1 baltymo. Šios EV sukėlė motorinių neuronų mirtį padidindamos proūždegiminių citokinų sekreciją bei oksidacinį stresą mikroglijos ląstelėse (85).

Tiesioginis ar netiesioginis EV gebėjimas reguliuoti ROS produkciją priklauso nuo EV sekretuojančių ląstelių tipo bei jų fiziologinės būklės. Tikslūs molekuliniai mechanizmai, kuriuos EV aktyvina ląstelėse-recipientėse žinomi nėra, tačiau žinoma, kad ROS gamybą gali sumažinti – NOX raiškos arba NF-kB kelio slopinimas, o padidinti NF-kB, JNK bei fosfoinozitido-3 kinazės/Akt (PI3K/Akt) signalinių kelių aktyvacija (8). Pastarasis kelias yra itin svarbus signalo perdavime bei biologiniuose procesuose, tokiuose kaip proliferacija, apoptozė bei metabolizmas. Įprastai jis aktyvinamas kuomet aktyvuojamos receptorinės tirozino kinazės, integrinai bei citokinų receptoriai. Tada aktyvuojama PI3K, kuri lemia fosfatidilinozitolio(3,4,5)-trifosfato (PIP3) susidarymą membranoje. PIP3 pritraukia baltymus, turinčius plekstrino homologijos (PH) domeną, kurį savo sudėtyje turi Akt bei jo aktyvatorius - nuo fosfoinozitido priklausoma kinazė (angl. *Phosphoinositide-dependent kinase-1*, PDK1). Jis fosforilina Akt ties 308 treoninu (angl. *Threonine*, pAkt(thr)) ir jį aktyvina. Teigiama, kad pilnai Akt aktyvacijai reikalingas mTOR 2 kompleksas (mTORC2), kuris fosforilina Akt ties 473 serinu (pAkt(ser)) (86), tačiau taip yra tyrimų rodančių, kad pastarasis nėra būtinas pilnai aktyvacijai ir kad pAkt(thr) yra patikimesnis Akt aktyvumo biologinis žymuo (87, 88). Yra duomenų, EV iš nosiaryklės karcinomos ląstelių gali pernešti PI3K katalitinį subvienetą ir aktyvinti PI3K/Akt signalinį kelią. Taip pat žinoma, kad EV iš tinklainės pigmento epitelio ląstelių perneša pAkt(thr) (89). Neįprastas PI3K/Akt signalinimas skatina NOX aktyvaciją ląstelėse bei mitochondrijų bioenergetikos sutrikimus, kas lemia superoksido $O_2^{\cdot-}$ bei vandenilio peroksido sintezę (90).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Ląstelės ir medžiagos

- Komerčinė, imortalizuota žmogaus kraujo-smegenų barjero endotelio ląstelių linija (angl. *Blood-Brain Barrier Human Cerebral Microcapillary Cells*, BBB hCMEC/D3)(Merck-Milipore);
- Laukinio tipo (WT) ir trigubą Alzheimerio ligos mutaciją (APP^{swe}/Tau-P301L/ PS1-M146V) turinčių pelių (3Tg-AL) imortalizuotų astrocitų linijos (atitinkamai WT-iAstro ir 3Tg-iAstro) iš hipokampo srities. WT-iAstro ir 3Tg-iAstro ląstelių linijas sukūrė dr. Dmitry Lim vadovaujama mokslinių tyrimų grupė Italijos Rytų Pjemonto universitete, Farmacijos mokslų fakultete (91).
- Stabili hCMEC/D3 linija, transdukuota reporteriniais vektoriais, kurie koduoja indukuojamo antioksidacinio atsako promorių ir jonvabalių liuciferazės konstrukta. Šios ląstelių linijos transdukcija bei stabilių linijų atranka atlikta IMC doktorantės Justinos Pajarskienės.

Medžiagos ląstelių kultivavimui

- WT-iAstro ir 3Tg-iAstro kultivavimui: DMEM-GlutaMAX™ terpė („Thermo Fisher Scientific“); veršelio embriono serumas (angl. *Fetal bovine serum*, FBS) („Thermo Fisher Scientific“); penicilinas–streptomocinas („Biological Industries“)
- hCMEC/D3 kultivavimui: EndoGro terpė („Milipore“); EndoGro terpės priedai: EndoGro™ terpės papildas - EndoGroLS, rekombinantinis žmogaus epidermio augimo veiksnys (angl. k. *recombinant human epidermal growth factor*, rhEGF), askorbo rūgštis, hidrikortizono hemisukcinatas, L-glutaminas, heparino sulfatas („Milipore“), fibroblastų augimo veiksnys FGF2 (angl. *Fibroblast growth factor*) („Thermo Fisher“); I tipo kolagenas (angl. *Collagen I, rat tail*) („Thermo Fisher Scientific“);
- Tripsinas-EDTA 0,25% („Life technologies“);
- PBS (angl. *phosphate buffered saline*, „Biochrom“);
- Plastikiniai audinių kultūrų indeliai („TPP“);
- Plastikiniai mėgintuvėliai („TPP“);
- 6, 24, 96 šulinėlių lėkštelės („TPP“);
- Fast-Read® 102 ląstelių skaičiavimo kameros;
- Dimetilsulfoksidas (DMSO) („Sigma“);

- Puromicinas (*Sigma-Aldrich*“);
- Ditiotreitolis („*Tacros Bioscience*“);
- Adenozintrifosfatas („*Sigma-Aldrich*“).

Medžiagos EV ir ląstelių baltymų imunobloto analizei:

- Medžiagos poliakrilamido gelio paruošimui: TRIS-HCl, SDS (*sodium dodecyl sulfate*), 40% akrilamido/bis tirpalas (angl. *Acrylamide/bis solution*) (“*BIO-RAD*”), Tetrametiletilendiaminas (TEMED) (angl. *Tetramethylethylenediamine*), Amonio perosulfatas (APS) (angl. *Ammonium Persulfate*) (“*Thermo fisher Scientific*”);
- Polivinilfluorido membranos Trans-Blot Turbo Transfer Pack (“*BIO-RAD*”);
- Tween-20 (“*BIO-RAD*”); Baltymų žymuo *PageRuler Prestained Protein Ladder* („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Metanolis (“*Thermo Fisher Scientific*“);
- TG-SDS elektroforezės buferinis tirpalas (25mM Tris, 192 mM glicino, 0.1% SDS) (“*BioRad*”);
- Jaučio serumo albuminas (BSA) (angl. *Bovine serum albumin*), pH 7.0 (“*Applichem*”);
- Proteazių mišinys *Pierce RIPA* („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Proteazių inhibitorių mišinys („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Antikūnai: („*Cell Signaling*“, „*Santa Cruz*“, „*Thermo Fisher Scientific*“);
- *Western Blot* analizės rinkinys *Clarity Western ECL substrate* („*BioRad*“);
- *Western Blot* pernešimo buferis („*BioRad*“);
- Baltymų buferinis tirpalas *Laemmli sample buffer* (“*BIO-RAD*”);
- Krienų peroksidazė (“*Pierce*”);
- Parafilm plėvelė („*Merck*“);
- Fosfotidilinozitolio 3-kinazės inhibitorius LY294002 („*Cell Signaling*“)

Medžiagos genų raiškos tyrimams:

- RNR išskyrimui: QIAzol lizės reagentas („*Qiagen*“); chloroformas, izopropanolis, vanduo be nukleazių („*Thermo Fisher Scientific*“)
- Kopijinės DNR sintezės rinkinys su dsDNaze (angl. *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase*) („*Thermo Fisher Scientific*“);

- Tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos (angl. *Quantative real time polymerase chain reaction*, qPGR) reakcijos rinkinys (angl. *Maxima SYBR Green qPCR master mix*) („*Thermo Fisher Scientific*“).

Medžiagos oksidacinio streso tyrimams:

- MitoSOX™ red („*Invitrogen*“)
- 12mm diametro stikliukai ląstelių kultivavimui („*Carl Roth*“);
- Paraformaldehidas (PFA) („*Merck*“)
- Objektyviniai stikleliai („*Thermo fisher scientific*“);
- Montavimo terpė („*Dako*“);
- DCFDA / H2DCFDA - viduląstelių ROS nustatymo rinkinys („*Abcam*“);
- 96 šulinėlių juodos, fluorescencijai skirtos lėkšelės („*Greiner*“);
- Tert-butil hidroperoksidas („*Sigma Aldrich*“).

Aparatūra:

- Inkubatorius („*BINDER*“);
- Laminarinė traukos spinta MSC advantage 1.8 („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Centrifuga („*Sigma*“);
- Mini centrifuga/Vortex purtyklė FVL-2400N („*Novolab*“);
- Šildoma vonelė („*BIOSAN*“);
- Mikroskopas *Eclipse TS 100* („*NIKON*“);
- Elektrofrezės aparatas Mini-PROTEAN 3 („*BIO-RAD*“);
- Baltymų pernešimo aparatas Trans – Blot Turbo („*BIO-RAD*“);
- Imunobloto vaizdinimo aparatas ChemiDoc MP Imaging System („*BIO-RAD*“);
- Orbitalinė maišyklė Rocher – Shafer („*BIOSAN*“);
- Ultracentrifuga *Sorvall LYNX 6000*, rotorius T29-8x50 („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Nanodalelių analizės aparatas *Nanosight LM10*;
- Absorbcijos skaitytuvas Asys UVM340 („*Biochrom*“);
- Konfokalinis mikroskopas „*Leica TCS SP8*“;
- Transmisinis elektroninis mikroskopas Morgagni 268 („*FEI company*“)
- Fotometras *NanoPhotometer Pearl* („*Implen*“);
- Fluorimetras *Fluoroscans Ascent* („*Thermo Fisher Scientific*“);

- Plokštelių skaitytuvas *Spark* („*Tecan*“);
- qPCR detekcijos sistema *CFX96* („*BioRad*“);
- Vakuminis koncentratorius *Concentrator Plus* („*Eppendorf*TM“);
- Plokštelių skaitytuvas *Spark* („*Tecan*“).

2.2. Metodai

2.2.1. Imortalizuotų astrocitų kultivavimas

WT-iAstro ir 3Tg-iAstro ląstelės auginamos DMEM- GlutaMAXTM terpėje su 10% FBS ir 100 U/ml penicilino/100 µg/ml streptomicino. Kuomet ląstelės pasiekia 80% konfluenciją, jos yra persėjamos. Iš auginimo flakono išsiurbiamą auginimo terpę ir praplaunama su 37 °C fosfatiniu buferiniu tirpalu (angl. *Phosphate buffered saline*, PBS). Ląstelių atkabinimui nuo indelio paviršiaus naudojamas 0,25% tripsino-EDTA tirpalas. Su juo auginimo indelis inkubuojamas ~3 min. 37 °C inkubatoriuje. Astroцитams atkibus, tripsinas neutralizuojamas dvigubu 37 °C auginimo terpės tūriu, o surinkus ląstelių suspensiją, ji centrifuguojama 5 min., 200 g, kambario temperatūroje. Tuomet nupilamas supernatantas ir ląstelių sankaupa suspenduojama auginimo terpėje. Ląstelės sėjamos į 150 cm² audinių kultūrų indelius EV skyrimui, linijos palaikymui į 75 cm² arba eksperimentams į 24 šulinėlių lėkštes (atitinkamai užpilamos 16 ml, 8 ml, 0,5 ml terpe).

Prieš sėjant astroцитus EV išskyrimui, paruošta auginimo terpė yra ultracentrifuguojama 100 000 g, 6 val., 4°C temperatūroje ir filtruojama per 0,1 µm filtrą. Tokiu būdu yra pašalinamos FBS kilmės EV. Šia terpe ląstelės suspenduojamos po centrifugavimo, sėjamos į 150 cm² audinių kultūrų indelius ir užpilamos 16ml terpe. Jos auginamos 72 valandas 37 °C temperatūros inkubatoriuje, drėgnoje, 5 % CO₂ atmosferoje. Linijų saugojimui ląstelės šaldomos auginimo terpėje su 10% DMSO.

2.2.2. EV išskyrimas pakopinio ultracentrifugavimo metodu

Po 72 val., kuomet iAstro ląstelių linijų konfluencija siekia 80-90 %, jų auginimo terpė surenkama ir centrifuguojama 300 g, 10 min. Tokiu greičiu centrifuguojant nusodinamos ir pašalinamos ląstelės. Antrojo etapo metu terpė centrifuguojama 2000 g, 10 min., tuomet yra

pašalinamos ląstelių nuolaužos. Po to centrifuguojama 20 000 g, 30 min. ir pašalinami biopolimerų agregatai ir apoptotiniai kūneliai bei mikrovezikulės. Gautame supernatante esančios EV nusodinamos ultracentrifuguojant 100 000 g, 70 min. Po šio etapo EV sanauka praplaunama 4°C PBS bei dar kartą ultracentrifuguojama 100 000 g, 70 min. Šis centrifugavimas reikalingas EV frakcijos praploplovimui, grynumo užtikrinimui. Galiausiai, EV peletas suspenduojamas 80µl 4 °C temperatūros PBS tirpale. Visi centrifugavimo etapai atliekami 4°C temperatūroje. Suspensija laikoma -80 °C temperatūroje iki panaudojimo.

2.2.3. EV dydžio bei koncentracijos analizė ir dozavimas

EV išskirtos iš WT-iAstro ir 3Tg-iAstro (atitinkamai WT-EV ir 3Tg-EV) buvo analizuotos *Nanosight LM10*, Gyvybės mokslų centre, Eukariotų genų inžinerijos laboratorijoje. EV mėginams buvo taikyta NTA analizė, kurios tikslas yra nustatyti mėginyje esančių dalelių dydį ir koncentraciją. Prieš analizę EV mėginiai iš skirtingų skyrimų buvo perkeliami į vieną mėgintuvėlį, o matavimui EV su PBS praskiedžiamos 50 kartų. Visuose eksperimentuose naudojama EV dozė – 1 veikimo vienetas (VV), kuris, remiantis NTA rezultatais, atitinka $3,65 \cdot 10^8$ dalelių. Pagal ankstesnius laboratorijos duomenis, šis EV kiekis laikomas optimaliu bei turinčiu biologinį poveikį (94).

2.2.4. Transmisinė elektroninė mikroskopija

EV analizė buvo atliekama Gyvybės mokslų centre, Eukariotų genų inžinerijos laboratorijoje naudojant transmisinę elektroninę mikroskopą *FEI Morgagni 268*, vaizdų analizei naudota iTEM 5.0 programine įranga. Pirmiausia, morfologijos išlaikymui, PBS suspenduotos EV fiksuojamos 2% paraformaldehido-PBS tirpalu ant ledo, 40 min. Kiti etapai atliekami kambario temperatūroje, ant parafilm plėvelės. EV adsorbavimui speciali Formvar-carbon varinė plokštelė uždedama ant 10 µl EV lašo ir inkubuojama 20 min. Po to plokštelė praplaunama PBS bei mėginiai pakartotinai fiksuojami 5 min. uždėjus ją ant 30 µl 1% glutaraldehido tirpalo lašelių. Po inkubacijos plokštelė praplaunama vandeniu. Kontrasto didinimui tarp EV ir fono, mėginiai inkubuojami tamsoje ant 30 µl, 2% uranilacetato lašelių, 5 min bei galiausiai paliekami išdžiūti ore, 5 min.

2.2.5. EV „Shotgun“ proteomika ir baltymų funkcinė analizė

„Shotgun“ tipo proteominė EV analizė, kurioje kombinuojama didelio efektyvumo skysčių chromatografija bei masių spektrometrija (LC-MS/MS), buvo atlikta dr. Dmitry Lim mokslinių tyrimų grupės Italijos Rytų Pjemonto universitete, Farmacijos mokslų fakultete. LC-MS/MS buvo naudojama micro-LC Eksigent Technologies (Dublinas, JAV) sistema.

Panaudojus FunRich v.3.1.3. programinę įrangą buvo atlikta funkcinė genų ontologijos (GO) analizė. Analizės metu genų simboliai (baltymų pavadinimai) buvo gauti iš juos atitinkančių UniProt prisijungimo (angl. *Accession*) kodų ir priskirti duomenų bazėje esantiems UniProt *Rodents* (Taxon ID: 9989) GO terminams, kurie apibūdina baltymų funkcijas trimis aspektais: Molekulinės funkcijos (apibūdina baltymų aktyvumą ar funkciją molekuliniam lygyje), ląstelinė funkcija (nurodo vietą ląstelėje, kur geno produktas atlieka savo funkciją) ir biologiniai procesai (apibūdina platesnį biologinį vaidmenį ar „biologinę programą“, kurioje veikia baltymas). Pateikti rezultatai rodo procentinę dalį baltymų, kurie buvo priskirti tam tikram GO terminui iš viso WT-EV arba 3Tg-EV duomenų rinkinio. Statistinis patikimumas parodo, ar GO terminas yra reikšmingai praturtintas minėtuose duomenų rinkiniuose. Atliekant statistinę analizę panaudota *Bonferroni* korekcija.

2.2.6. hCMEC/D3 ląstelių kultivavimas

hCMEC/D3 kultivuojamos EndoGro™ terpėje, kurioje yra 0,2 % EndoGro™ terpės papildas, 5 ng/ml rhEGF, 10 mM L-glutamino, 1 µg/ml hidrokortizono hemisukcinato, 0,75 U/ml heparino sulfato, 50 µg/ml askorbo rūgšties ir 5% FBS. Prieš terpės naudojimą pridedama 1 ng/ml FGF-2. Ląstelės auginamos iki 80-90% konfluencijos, tada persėjamos. Prieš sėjant, ląstelių auginimo indai padengiami I tipo kolagenu-PBS 1:19 tirpalu. Padengti auginimo indai valandai inkubuojami 37 °C inkubatoriuje. Ląstelių atkabinimui nuo paviršiaus naudojamas 0,25% tripsino-EDTA. Užpylus jo, auginimo indas inkubuojamas ~3 min. 37 °C inkubatoriuje. Ląstelėms atkibus, tripsinas neutralizuojamas dvigubu tūriu 37 °C paruoštos auginimo terpės. Ląstelių suspensija centrifuguojama 3 min., 300 g, kambario temperatūroje. Supernatantas nupilamas, ląstelių sanakaupa suspenduojama pasirinktame auginimo terpės tūryje ir išpilstoma į naujus auginimo indelius. Ląstelės sėjamos į 25 cm² audinių kultūrų indelius linijos palaikymui arba eksperimentams į 6, 24 ar 96 šulinėlių lėkšteles ir atitinkamai užpilamos 5 ml arba 2 ml, 0,5 ml, 0,2 ml terpe. hCMEC/D3

auginamos inkubatoriuje, 37 °C temperatūroje, 5% CO₂ atmosferoje. Terpė keičiama, kas tris dienas. Linijų saugojimui ląstelės šaldomos auginimo terpėje su 10% DMSO.

2.2.7. PI3K/Akt signalinio kelio ir genų raiškos tyrimų eksperimentinis planas

hCMEC/D3 ląstelės kultivuojamos iki 100% konfluencijos. Eksperimento dieną, auginimo terpė pakeičiama bei ląstelės, pagal poveikius, skirstomos į dvi grupes. Viena grupė ląstelių paveikiama PI3K inhibitoriumi LY294002 (50 μM), kuris užslopina Akt fosforilinimą. Kita ląstelių grupė LY294002 neveikiama, bet į terpę buvo dedamas atitinkamas kiekis DMSO. Po 30 min inkubacijos su LY294002, abi ląstelių grupės buvo paveikiamos 1 VV WT-EV arba 3Tg-EV. Akt fosforilinimo tyrime ląstelės lizuojamos po 20 min, o genų raiškos eksperimentuose – po 12 ir 24 val.

2.2.7. Baltymų išskyrimas iš ląstelių bei EV

Prieš ląstelių lizavimą, nusiurbiamą terpę, bei praplaunama su PBS 3 kartus. Lizavimui naudojamas *Pierce* RIPA, kuris sumaišomas su 1X proteazių inhibitorių kokteiliu. Su šiuo tirpalu inkubuojama 15 min. ant ledo. Lizatai nugramdomi nuo šulinėlio, patalpinami į mėgintuvėlius, kurie sukrotomi *Vortex* purtykle, vėliau mėgintuvėliai inkubuojami 10 min. ant ledo. Šių etapų metu ląstelės lizuojamos ir į tirpalą išlaisvinami baltymai. Po inkubacijos, centrifuguojama 18 000 g, 20 min, 4 °C temperatūroje, o supernatantai perkeliama į naują mėgintuvėlį. Baltymų koncentracija matuojama fotometru *NanoPhotometer Pearl*. EV lizavimui, į suspensiją pridedama pusė jos tūrio *Pierce* RIPA tirpalo su 1X proteazių inhibitorių kokteiliu. Su šiuo tirpalu inkubuojama 30 min. ant ledo. Po inkubacijos mėgintuvėliai sukrotomi *Vortex* purtykle ir laikomi 10 min. ant ledo. Galiausiai pamatuojama baltymų koncentracija fotometru *NanoPhotometer Pearl*. Ląstelių bei EV lizatai gali būti saugomi -20 °C arba iškart naudojami natrio dodecil sulfato–poliakrilamido gelio (SDS-PAGE) elektroforezėje.

2.2.8. SDS-PAGE elektroforezė ir baltymų imunoblota

Baltymai išskirti iš ląstelių arba EV yra sumaišomi su *Laemmli sample* buferiu, kuris denatūruoja baltymus ir suteikia jiems neigiamą krūvį. Su juo inkubuojama 5 min., 95 °C

temperatūroje. Elektroforezei paruošiamas gelis, kurio komponentai yra: Dvigubai distiliuotas vanduo (ddH₂O), 10 % SDS ir 40 % akrilamido/Bis tirpalas. 4% Koncentruojančiam geliui ruošti naudojamas 0,5 M Tris-HCl, kurio pH 6,8, o 10% frakcionuojančiam – 1,5M Tris-HCl, kurio pH 8,8. Gelio polimerizacijai sukelti įpilama tetrametiletilendiamino (TEMED) ir amonio perosulfato (APS). Elektroforezė atliekama naudojant *Mini Protein* („Bio-Rad“) prietaisus. Į surinktą konstrukciją užpilamas elektroforezės TG-SDS buferinis tirpalas (25 mM bazinio Tris, 192 mM glicino ir 0,1 % SDS). Elektroforezė atliekama naudojant 150V įtampą.

Baltymai po elektroforezės pernešami ant *Immobilon* polivinilideno difluorido (PVDF) membranos naudojant pusiau sausos sistemos aparatą *Trans-Blot Turbo*. Iš pradžių PVDF membrana suvilgoma metanolyje, vėliau 15 min inkubuojama pernešimo buferyje (25 mM Tris, 192 mM glicino, 20% (v/v) metanolio, pH 8,3). Ant PVDF membranos dedamas gelis, jie patalpinami tarp dviejų 2,45 mm storio filtrinių lapelių ir dedami į *Trans-Blot Turbo* kasetę. Pernešimas vyksta 30 min., kuomet srovės stiprumas 1 A, o įtampa - 25 V. Po baltymų pernešimo, PVDF membrana inkubuojama 1 valandą blokavimo tirpale (5% BSA, ištirpintas PBS tirpale, kuriame yra 0,18% Tween-20) kambario temperatūroje, ant vartyklės. Toliau membrana inkubuojama su pirminiais antikūnais, kurių skiedimai, molekulinė masė nurodyta 1 priedo, 1 lentelėje. Po inkubacijos membrana plaunama tris kartus su PBS-Tween 20 ir valandą inkubuojama su antriniais antikūnais (1 priedas, 2 lentelė). Galiausiai membrana praplaunama 5 kartus su PBS-Tween 20 ir naudojant ECL (angl. *enhanced chemiluminescence*) reagentus, pagal gamintojo instrukcijas, membranos analizuojamos naudojant *ChemiDoc MP Imaging* aparatą.

2.2.9. RNR išskyrimas

Prieš RNR skyrimą, ląstelės praplaunamos 4 °C PBS. Į 10cm² šulinėlio plotą pilamas 1ml Qiazol reagent, kuris lizuoja ląsteles bei denatūruoja visus baltymus. Lizatai perkeliama į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius ir inkubuojami 5 min., kambario temperatūroje. Po to į juos pilama 200 µl chloroformo, kuris sudaro gradientą, leidžiantį atskirti fazes. Mėgintuvėliai purtomi 15 sek. ir 3 min inkubuojami kambario temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 12 000g, 15 min., 4 °C ir viršutinė fazė, kurioje yra RNR, perkeliama į kitą mėgintuvėlį. Atskirta fazė sumaišoma su 500 µl izopropanoliu, kuris lemia RNR precipitaciją ir mėginiai inkubuojami 10 min., po kurių centrifuguojami 12 000 g 10 min., 4 °C. Gauta RNR sanaupta suspenduojama 1ml 70% etanoliu, kuris RNR sukonzentruoja. Tuomet mėginiai sukrotomi bei centrifuguojami 7500 g, 5min, 4 °C. Šis

etapas iš viso atliekamas 2 kartus. Galiausiai RNR sankaupa džiovinama *EppendorfTM Concentrator Plus*, pasirinkus V-AL (*vacuum-alcoholic*) režimą. Išdžiovinta RNR sankaupa suspenduojama 23 μ l vandenyje be nukleazių. Koncentracija bei grynumas matuojami fotometru *NanoPhotometer Pearl*, nustatant 260/280 bei 260/230 bangos ilgių santykius.

2.2.10. Kopijinės DNR sintezė ir tikro laiko PGR

Kopijinės DNR (kDNR) sintezė bei tikro laiko atvirkštinės transkripcijos PGR (angl. *Real time Quantitative Reverse Rranscription PCR*, RT-qPGR buvo atlikti naudojant rinkiniu *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase* („*Thermo fisher scientific*“) ir *Maxima SYBR Green qPCR master mix* („*Applied Biosystems*“) pagal gamintojų instrukcijas.

1 μ g išskirtos RNR buvo naudojama kDNR sintezei 20 μ l reakcijos mišinyje. Iš pradžių, genomines DNR pašalinimui, kDNR buvo paveikiama dvigubos-grandinės DNaze (dsDNse), 2 min, 37°C, po to – atvirkštine transkriptaze, kuri vykdo kDNR sintezę. Reakcijos temperatūrinis režimas: 10 min. 25 °C, 30 min. 65 °C ir 5 min. 85 °C. kDNR buvo saugoma -20°C.

RT-qPGR reakcijai buvo naudojama 0,3 μ l kDNR ir 0,2 μ M kiekvieno pradmens (2 priedas, 1 lentelė) 25 μ l mišinyje. Ši reakcija buvo vykdoma šį temperatūrinį režimą: 10 min. pirminė denatūracija 95 °C temperatūroje, po to 40 ciklų po 15 sek. – 95 °C, 30 sek. – 55 °C ir 30 sek. – 72 °C temperatūroje. Produkto specifškumas patikrinamas atlikus lydimosi kreivės programą: 95 °C temperatūra 30 sek., tuomet temperatūra keliama nuo 55 iki 95°C, kas 0.5°C per 5 sek. RT-qPGR buvo atlikta naudojant detekcijos sistemą *CFX96* su *BioRad CFX Manager 3.1* programa. Rezultatai apskaičiuojami taikant lyginamąjį C_T metodą, kuomet transkripto kiekis apskaičiuojamas pagal formulę $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Tiriamųjų genų raiška buvo normalizuojama pagal atskaitos geną HPRT (angl. *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*), kuris ląstelėje išreiškiamas vienodai

2.2.10. Oksidacinio streso tyrimų eksperimentinis planas

Mitochondrinių, viduląstelių ROS bei NRF1/2 signalinio kelio tyrimams kaip teigiama kontrolė buvo naudojamas tert-butyl hidroperoksidas (tBHP), ląstelėse sukeliantis oksidacinį stresą. Šių tyrimų metu poveikiai ląstelėms buvo atliekami vienodai: eksperimento dieną pakeičiama auginimo terpė ir ląstelės suskirstomos į šešias grupes: (i) kontrolė (PBS), (ii) 6 val poveikis WT-EV, (iii) 6 val. poveikis 3Tg-EV, (iv) 6 val poveikis 400 μ M tBHP poveikis, (v) 1 val išankstinis

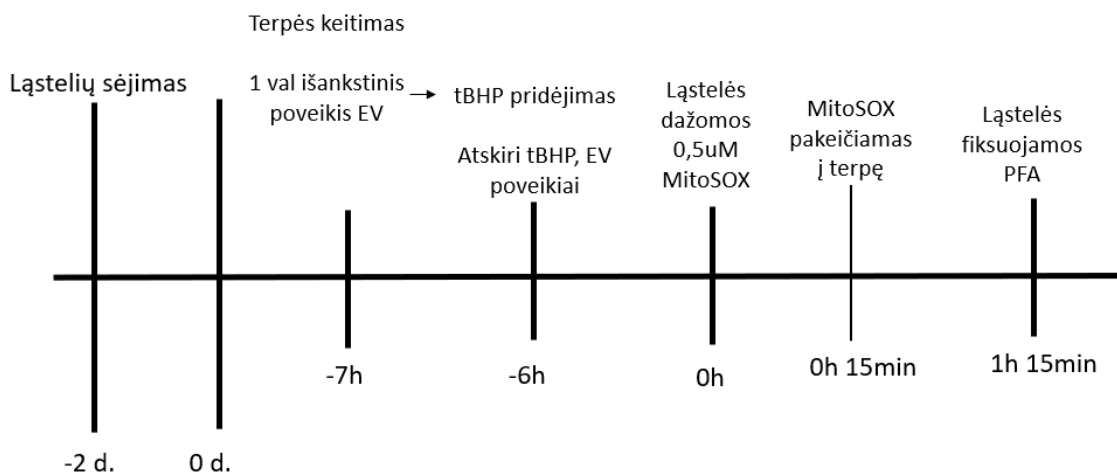
poveikis WT-EV+ 6val su 400 μ M tBHP (vi) 1 val išankstinis poveikis 3Tg-EV + 6 val. su 400 μ M tBHP. Po 6 val. inkubacijos buvo atliekamos procedūros priklausomai nuo metodo.

2.2.11. Mitochondrinių ROS nustatymas

Mitochondrinių ROS nustatymui buvo naudojamas fluorescencinis dažas „MitoSOX“. Jis yra sudarytas iš hidroetidino (HE) sujungto su trifenilfosfonio grupe (TPP+), kuri nukreipia junginį į mitochondrijas. Kai „MitoSOX“ patenka į mitochondrijų vidų, superoksidas oksiduoja HE, o jo produktas skleidžia fluorescencinę šviesą prie 510 nm bangos ilgio (92). Yra duomenų, kad dažnai HE dariniai reaguoja su intraląstelinėmis oksidoreduktazėmis ar citochromais bei sukuria signalą, kuris rodo ne tik superoksido susidarymą. Optimizuojant mitochondrijų ROS aptikimą ir vaizdinimą, „MitoSOX“ dažas buvo sužadinanamas ne su 510 nm, o su 396 nm bangos ilgiu, gaunant specifiskesnę, būtent $O^{\bullet-2}$ produkto, fluorescenciją (93). Taigi, tyrimo metu, „MitoSOX“ fluorescencija buvo sužadinama 405 nm bangos ilgiu (turimu lazeriu, artimiausiu 396 nm bangos ilgiui).

Mitochondrinių ROS nustatymo eksperimentams, hCMEC/D3 ląstelės buvo auginamos ant kultivavimo stikliukų iki monoslouksnio. Naudojant „MitoSOX“ buvo aiškinamasi, koks EV inkubacijos laikas bei kokia tBHP, koncentracija (100, 200, 300, 400 ar 500 μ M) turi didžiausią efektą mitochondrijų ROS lygiui.

Eksperimentiškai parinkus hCMEC/D3 inkubacijos laiką su EV (6 val) ir tBHP koncentraciją [400 μ M], kiti eksperimentai buvo atliekami pagal schemą (2.2.11 pav.). Po inkubacijos su poveikiais (kaip nurodyta 2.2.10), ląstelės 15 min. buvo inkubuojamos auginimo terpėje su MitoSOX [0,5 μ M], 37°C. Po to, terpė buvo pakeičiama ir ląstelės dar valandą inkubuojamos 37°C temperatūroje. Galiausiai, ląstelės buvo fiksuojamos su 4% PFA-PBS tirpalu, su kuriuo buvo inkubuojama 20 min., kambario temperatūroje, tamsoje. Tuomet, vieną kartą praplovus su PBS, kultivavimo stikliukai su ląstelėmis buvo uždedami ant *Dako* montavimo terpės, užlašintos ant objektinio stiklelio. Taip paruošti mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje. Mėginiai analizuojami konfokaliniu *Leica TCS SP8* mikroskopu, naudojant Diode 405 nm lazerį. Nuotraukos darytos su 40x imersiniu objektyvu. Fluorescencijos intensyvumo kiekybinis įvertinimas buvo atliktas naudojant ImageJ vaizdų apdorojimo programą.

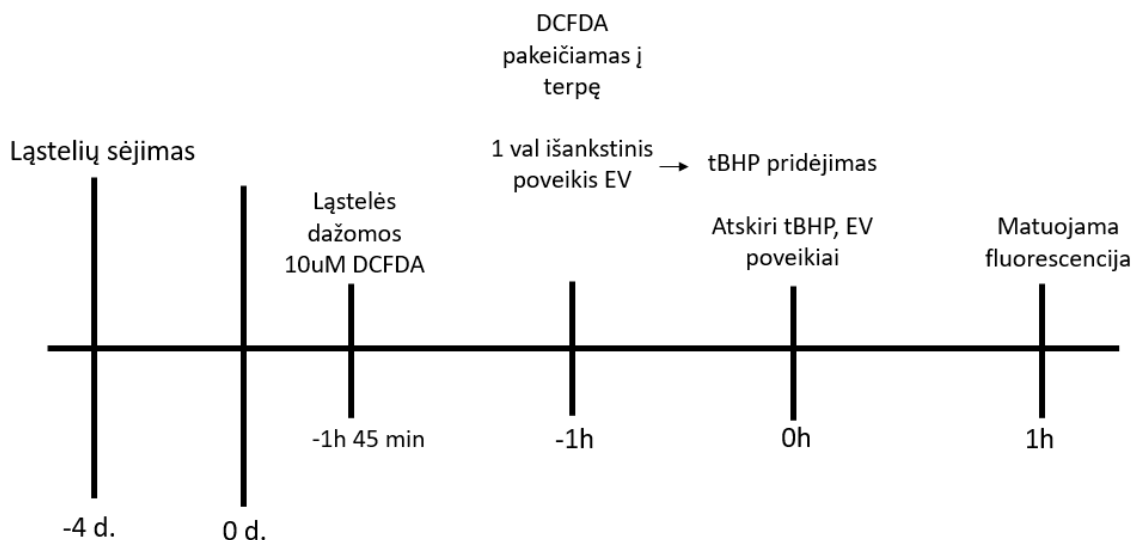


2.2.11 pav. Mitochondrinių ROS nustatymo eksperimento schema

2.2.12. Viduląstelių ROS nustatymas

Viduląstelių hidroksilo, peroksilo ir kitų ROS nustatymui buvo naudojamas 2,7-dichlorofluorescein diacetatas (DCFDA). Šis junginys difunduoja į ląstelę, kur yra deacetilinas į nefluorescuojantį junginį, kuris vėliau yra oksiduojamas ROS iki fluorescuojančio 2,7-dichlorofluoresceino (DCF). Jo susikaupimas išmatuojamas vertinant fluorescencijos intensyvumą esant 538 nm bangos ilgiui, kai mėginys sužadinamas esant 485nm. Eksperimentai buvo atliekami naudojant *DCFDA/H2DCFDA - Cellular ROS Assay* rinkinį („Abcam“), pagal gamintojų instrukcijas.

hCMEC/D3 ląstelės buvo auginamos tamsioje 96-šulinėlių plokštelėse iki monosluoksniu. Eksperimentai buvo atliekami pagal schemą (2.2.12 pav.): ląstelės 45 min buvo inkubuojamos auginimo terpėje su DCFDA [10 μM], 37°C. Po to terpė buvo pakeičiama ir ląstelės paveikiamos EV, tBHP arba jų kombinacija, kaip nurodyta 2.2.10. Fluorescencija buvo matuojama fluorimetru *Fluoroscans Ascent*, kas valandą.



2.2.12 pav. Viduląstelinių ROS nustatymo eksperimento schema.

2.2.13. NRF1/2 signalinio kelio aktyvumo nustatymas reporterinėse ląstelėse

Nrf1/2 kelio tyrimams buvo naudojama stabili hCMEC/D3 linija, transdukuota lentivirusinėmis dalelėmis *Cignal Lenti Reporter* („QIAGEN“). Į šias ląsteles buvo įterpti konstruktai, kurie koduoja jonvabalių liuciferazės baltymą, atsparumą puromicinui bei turi indukuojamo antioksidacinio atsako promotorių. Taip pat, buvo naudojamos hCMEC/D3 transdukuotos neigiamos kontrolės (NK) konstruktu, kuriame ARE elementas pakeistas minimaliu promotoriumi (TATA dėžutės elementais). Lyginant liuciferazės raišką tarp ARE ir NK transdukuotų ląstelių, buvo įvertinama transdukcijos kokybė, poveikio efektas bei foninis reporterinio baltymo aktyvumas. hCMEC/D3 ląstelės buvo auginamos 96-šulinėlių plokštelėse iki monosluoksnio. Eksperimentai buvo atliekami analogiškai pagal schemą (2.2.11 pav.), poveikiai atlikti kaip nurodyta 2.2.10. Po 6 val. inkubacijos ląstelės buvo du kartus praplaunamos su PBS ir 10 min. lizuojamos (lizės buferio sudėtis: Tris-HCl 0,1M, Tris-bazė 0,04M, NaCl 75mM, MgCl₂ 3 mM ir Triton X-100 0,25%). Praėjus 10 min., ląstelių lizatas buvo perkeliamas į baltas 96-šul. plokšteles, ant jo užpilamas substrato buferis (5mM Ditiotreitolis, 0,15 mM adenozintrifosfatas ir 20ng/ml liuciferinas skiesti lizės buferyje). Liuminescencija buvo matuojama *Spark* plokštelių skaitytuvu („Tecan“).

2.2.14. Statistinė analizė

Eksperimentiniai duomenys, iš trijų (jei nenurodyta kitaip) nepriklausomų biologinių pakartojimų, pateikti kaip vidurkiai su standartinėmis vidurkio paklaidomis (angl. *Standart error of means*, SEM). Lyginant daugiau negu dvi grupes, sugrupuotas pagal vieną kategorinį kintamąjį, atlikta vienfaktorė ANOVA (angl. *One-way analysis of variance*), o sugrupuotas pagal du – atlikta dvifaktorė ANOVA, taikytas Tukey testas. Statistiškai patikimi skirtumai laikomi tada, kai $p < 0,0001$; $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. Statistinė analizė atlikta naudojant *GraphPad Prism* 8.0.1 programą.

3. REZULTATAI

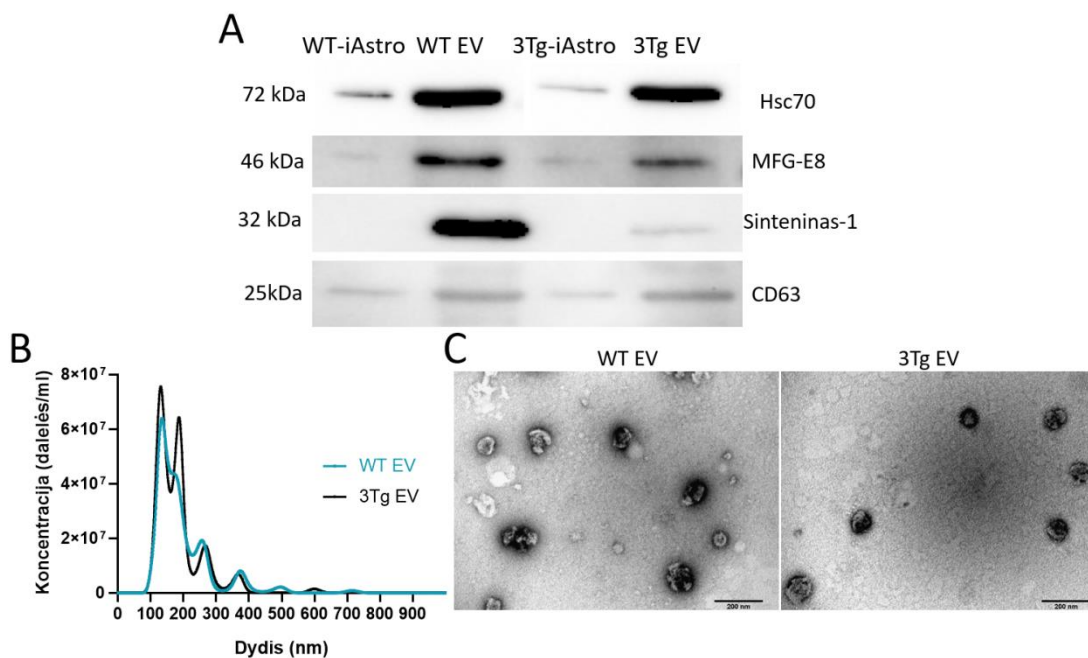
Yra žinoma, kad astrocitų, iš 3Tg-AL pelių modelio, sekretuojami veiksniai turi didelę įtaką KSB integralumo palaikymui. Tai parodė tyrimai su bekontakte ko-kultūra, kuomet 3Tg-iAstro nepalaikė glaudžiųjų jungčių baltymų funkcijos SKEL, kaip tai padarė WT-iAstro. Vienas iš pagrindinių komunikavimo būdų tarp astrocitų ir SKEL yra per sekretuojamas EV, kurios yra laikomos ląstelių „veidrodiniais atspindžiais“. Tyrimuose su EV iš 3Tg-iAstro (3Tg-EV) bei EV iš WT-iAstro (WT-EV) buvo pastebėta, kad 3Tg-EV turėjo tokį patį poveikį SKEL, kaip ir ląstelės, iš kurių jos kilo (6). Šiame darbe buvo aiškinamasi, kokius poveikius, susijusius su oksidaciniu stresu ir uždegiminių genų aktyvacija, turi WT-EV ir 3Tg-EV hCMEC/D3 ląstelėms.

3.1. WT-iAstro ir 3Tg-iAstro ląstelių linijų sekretuojamų EV charakterizavimas

EV buvo išskirtos pakopinio ultracentrifugavimo būdu, kuris yra laikomas klasikiniu EV izoliavimo metodu bei, pagal 2017 metų duomenis, buvo naudotas 60 % visų publikuotų straipsnių susijusių su EV tyrimais (94, 95). Remiantis ISEV rekomendacijomis, EV charakterizavimui buvo atlikta EV biomarkerių analizė, koncentracijos bei dydžio nustatymas. Taip pat buvo atliktas proteominis EV tyrimas naudojant „Shotgun“ masių spektrometrijos metodą, o gautų duomenų įvertinimui buvo atlikta funkcinė EV baltymų praturtinimo analizė.

3.1.1. EV baltyminių žymenų bei dydžio analizė

Baltyminių žymenų analizei WT-iAstro, 3Tg-iAstro ląstelės ir iš jų išskirtos EV buvo sulizuotos bei tiriamos baltymų imunobloto metodu (angl. *Western Blot*). Tiek EV, tiek ląstelių iš kurių jos kilo, lizatuose, buvo nustatyti Hsc70 (72 kDa), MFG-E8 (46 kDa), Sinteninas-1 (32 kDa) bei CD63 (25 kDa), kurie yra būdingi EV populiacijai (Pav. 3.1.1 A.). Šių baltymų raiška buvo stipriau išreikšta EV, nei ląstelių lizatuose, kas įrodo, kad jos yra praturtintos analizuojamais baltymais.



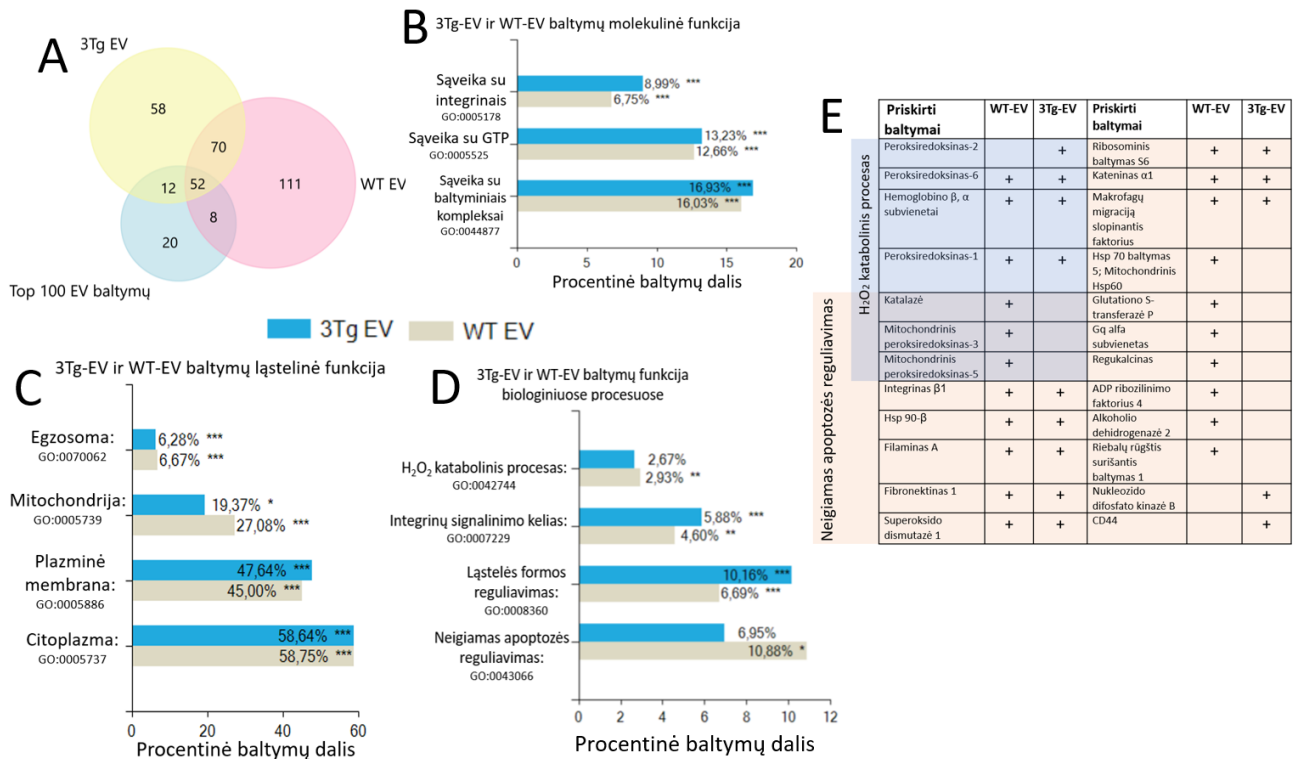
3.1.1 pav. EV charakterizavimas. *A- 3Tg-iAstro, WT-iAstro ląstelės bei jų EV buvo sulizuotos ir atlikta baltymų imuninė analizė su antikūnais prieš Hsc70, MFG-E8, Sintetinas-1 bei CD63. B- 3Tg-EV bei WT-EV dydis bei koncentracija buvo nustatyta NTA metodu naudojant NanoSight LM10. Nurodytas 3 matavimų vidutinis pasiskirstymas. C- Transmisinės elektronų mikroskopijos metodu atliktos EV nuotraukos.*

WT-EV ir 3Tg-EV dydis bei koncentracija buvo nustatyta NTA metodu, kuris remiasi tipišku dalelių judėjimu pagal Brauno dėsnį ir šviesos išsklaidymu, kuomet dalelės apšviečiamos lazeriu. Ši analizė parodė, kad abiejų tipų EV dydis buvo labai panašus (pikai matomi ties ~130 nm), tačiau 3Tg-EV turėjo dar vieną piką ties 187 nm (Pav. 3.1.1 B). Transmisinės elektronų mikroskopijos (TEM) metodu atlikta pavienių dalelių analizė parodė dubenėlio formos (angl. *Cup-shaped*) morfologiją (Pav. 3.1.1. C), kuri yra būdinga EV (96) bei patvirtino NTA metodu nustatytą EV dydį.

3.1.2. EV baltymų funkcinė analizė

EV „Shotgun“ proteominė analizė buvo atlikta dr. Dmitry Lim mokslinių tyrimų grupės Italijos Rytų Pjemonto universitete, Farmacijos mokslų fakultete. Šios analizės metu WT-EV ir 3Tg-EV lizatuose buvo identifikuoti atitinkamai 241 ir 192 baltymai, kuriems buvo atlikta funkcinė terminų genų ontologijos (GO) analizė. Šios analizės metu duomenų rinkiniai (WT-EV ir 3Tg-EV identifikuoti baltymai) buvo susiejami su GO terminais (angl. *Terms*), kurie naudojami

apibūdinti baltymų funkcijas. GO terminai yra skirstomi į šias klases: molekulinė funkcija, ląstelinė funkcija ir biologiniai procesai (97). GO klasifikavimas buvo atliktas naudojant FunRich v3.1.3 programinę įrangą (98). Paveikslo 3.1.2 B, C, D grafikuose pavaizduota, kokia dalis EV baltymų buvo priskirta konkreitiems GO terminams (detalesnė informacija 3 priede, 1 lentelėje).



3.1.2 pav. Funkcinė EV baltymų analizė. A- Venn tipo diagrama apibūdinanti bendrus baltymus identifikuotus 3Tg-EV, WT-EV mėginiuose ir Vesiclepedia duomenų bazėje, kurioje patalpintas Top 100 EV baltymų sąrašas (99). B, C, D – EV baltymai priskirti GO terminams ir suklasifikuoti pagal molekulinę, ląstelinę bei biologinę funkcijas. Kiekvienam terminui nurodyta jam priskirta procentinė baltymų dalis iš viso WT-EV (241) arba 3Tg-EV (192) duomenų rinkinio. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ ir *** $p < 0,001$ rodo statistškai patikimai praturtintus GO terminus. E- EV baltymai priskirti H₂O₂ katabolinio proceso bei Neigiamo apoptozės reguliavimo terminams.

Ląstelinės funkcijos klasei priskirti terminai rodo, kad WT-EV bei 3Tg-EV buvo praturtintos egzosomų, mitochondrijų, citoplazmos ir PM kilmės baltymais (3.1.2 pav. C). Molekulinės funkcijos klasės terminai nurodo, kad abu EV tipai praturtinti baltymais galinčiais sąveikauti su GTP, integriniais ir baltymniais kompleksais (3.1.2 pav. B), o biologinių procesų terminai siejami su signalo perdavimu (Integrinų signalinimo kelias) ir ląstelės membranos konfigūracijos moduliavimu (Ląstelės formos reguliavimas). Pastebėta, kad kai kurie terminai buvo statistškai

patikimai praturtinti tik WT-EV baltymais. Jie siejami su vandenilio peroksido surišimu (H_2O_2 katabolinis procesas) ir apoptozės slopinimu (Neigiamas apoptozės reguliavimas) (3.1.2. pav. D) – terminais, kuriems buvo priskirta atitinkamai 2,9 % ir 10,8 % WT-EV baltymų. Paveiksle 3.1.2. E pateikiami kai kurie šiems terminams priskiriami baltymai. Matoma, kad didelė dalis ląstelės išgyvenimą skatinančių baltymų (pvz.: regukalcinas, glutationo S transferazė P), bei antioksidacinių savybių turintys (katalazė ir mitochondriniai peroksireroksinai-3, -5) randami tik WT-EV, bet ne 3Tg-EV mėginiuose.

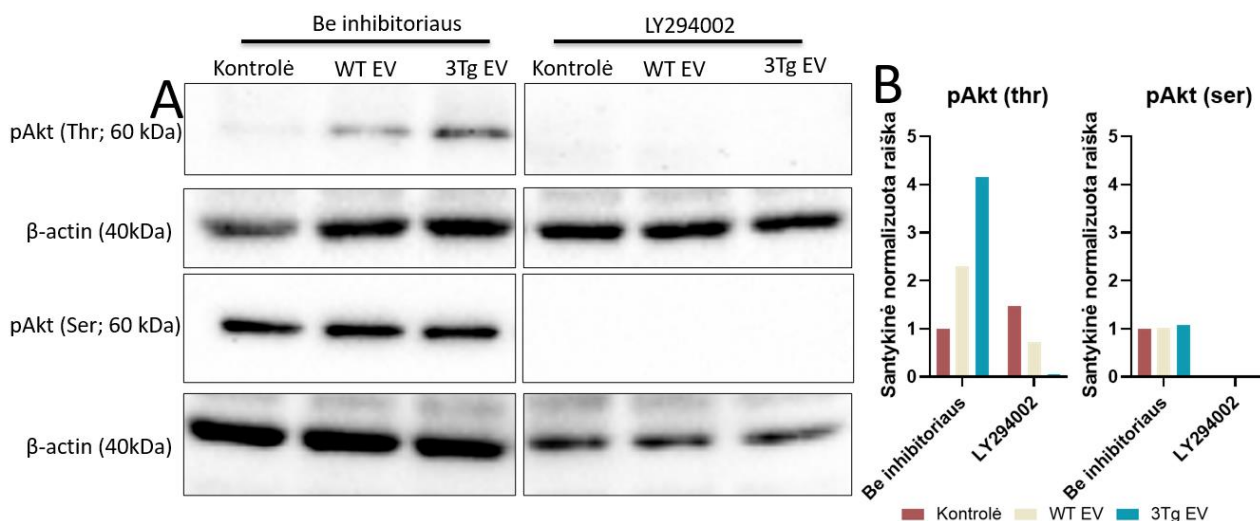
Proteominė analizė parodė, kad tarp WT-EV ir 3Tg-EV identifikuotų baltymų, 122 yra bendri. (3.1.2 pav. A). Taip pat, abiejų tipų EV baltymai buvo palyginti su duomenų bazėje “*Vesiclepedia*” (99) patalpintu sąrašu, kuriame nurodyta 100 baltymų, kurie yra dažniausiai identifikuojami EV (Top 100 EV baltymų). Iš jo, 52 baltymai buvo bendri abiejų tipų EV, 12–tik 3Tg-EV ir 8 – tik WT-EV. Tarp identifikuotų WT-EV ir 3Tg-EV baltymų buvo rasti ALDH1A7 ir glijos fibrilinis rūgštus baltymas (angl. *Glial fibrillary acidic protein*, GFAP), kurie yra astrocitams būdingi baltyminiai žymenys (100).

3.2. 3Tg-EV bei WT-EV poveikis hCMEC/D3 ląstelių uždegiminių genų raiškos reguliavimui

Kadangi tikslus mechanizmas, kuriuo WT-EV ir 3Tg-EV gali sukelti pokyčius SKEL, nėra žinomas, buvo nuspręsta ištirti jų įtaką signalo perdavime. Yra duomenų, įrodančių, kad PI3K/Akt signalinis kelias reguliuoja glaudžiųjų KSB jungčių funkciją (101) bei atlieka svarbų vaidmenį oksidacinio streso, uždegimo procesuose, nes gali reguliuoti su šiais procesais susijusių genų raišką (102, 103). Dėl šios priežasties buvo tiriamas skirtingų EV tipų poveikis šio kelio signalinimui.

3.2.1. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis PI3K/Akt signalinio kelio aktyvumui

hCMEC/D3 30 min veikiamos PI3K inhibitoriumi LY294002 (50 μ M), po to 20 min. inkubuojama su WT-EV arba 3Tg-EV. Po inkubacijos, ląstelės lizuojamos ir baltymų imunobloto metodu (angl. *Western Blot*) tiriamas Akt fosforilinimas ties 473 serinu–pAkt(ser) ir 308 treoninu–pAkt(thr).



3.2.1 pav. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis PI3K/Akt signalinimui hCMEC/D3 ląstelėse. Ląstelės buvo paveiktos PI3K inhibitoriumi LY294002 (50 μ M) 30 min., po to 20 min. inkubuojamos su WT-EV arba 3Tg-EV. Baltymų imunobloto metodu tiriamas Akt fosforilinimas ties 473 serinu–pAkt(ser) ir 308 treoninu–pAkt(thr). **A**-Imunobloto analizė. **B**-densitometrinis įvertinimas atliktas apskaičiuojant pAkt(thr) arba pAkt(ser) juostelės intensyvumo ir β -aktino intensyvumo santykį. Panašūs rezultatai gauti dviejuose biologiniuose pakartojimuose.

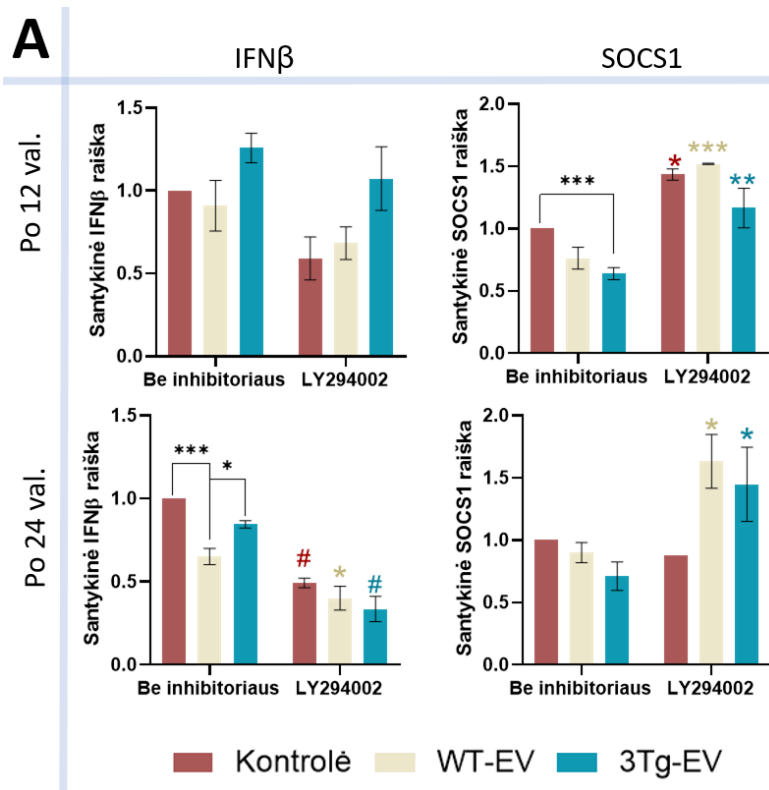
3.2.1 paveiksle galima matyti, kad abiejų tipų EV padidino pAkt (thr) kiekį hCMEC/D3 ląstelėse lyginant su kontrole: WT-EV padidino 2,3, o 3Tg-EV 4,1 karto. Vertinant pAkt (ser) kiekį, EV nesukelė jokių pokyčių. PI3K inhibitorius LY294002 užslopino Akt (ser) bei Akt (thr) fosforilinimą visose grupėse (Kontrolė, WT-EV, 3Tg-EV).

3.2.2. 3Tg-EV bei WT-EV poveikis uždegiminių genų raiškai

Tyrimuose su *in vitro* KSB modeliu buvo parodyta, kad 3Tg-iAstro sekretuoja veiksnius galinčius paveikti SKEL: šios ląstelės, kuomet paveiktos su SKEL kondicionuota terpe, išskyrė uždegiminį chemokiną CCL2, kuris skatina leukocitų migraciją į CNS. Atsižvelgiant į tai, buvo nuspręsta ištirti, kokią įtaką 3Tg-iAstro sekretuojamos EV turi uždegiminių genų aktyvacijai hCMEC/D3 ląstelėse (6). Kadangi ankstesnio eksperimento metu buvo pastebėta, kad WT-EV ir 3Tg-EV aktyvina PI3K/Akt signalinį kelią, taip pat buvo tirta, kaip pakinta EV paveikiamų genų raiška, naudojant PI3K inhibitorių LY294002.

hCMEC/D3 buvo 30 min inkubuojamos su PI3K inhibitoriumi LY294002 (50 μ M), po to 12 ir 24 valandas inkubuojama su WT-EV arba 3Tg-EV. Po inkubacijos ląstelės buvo lizuojamos, išskiriama RNR ir genų raiška analizuojama RT-qPGR metodu. Tyrimui buvo pasirinkti su

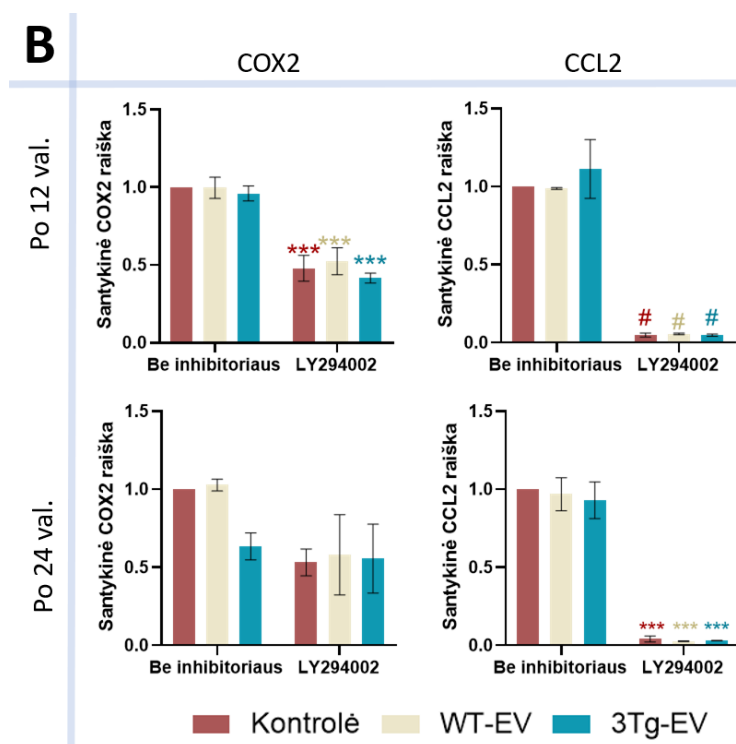
uždegimu susiję genai: IFN β , citokinų signalinimo supresorius 1 (angl. *Suppressor of cytokine signaling 1*, SOCS1), COX2 bei CCL2.



3.2.2 pav. A. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis IFN β ir SOCS1 genų raiškai hCMEC/D3 ląstelėse. hCMEC/D3 buvo paveiktos PI3K inhibitoriumi LY294002 (50 μ M) 30 min., po to 12 arba 24 val. inkubuojamos su WT-EV arba 3Tg-EV. Po inkubacijos ląstelės buvo lizuojamos, išskiriama RNR ir genų raiška analizuojama RT-qPCR metodu. Statistiškai patikima, kai * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,0001$, $n = 2-3$. Reikšmingumo žymėjimai LY29002 grupėje nurodo statistinį patikimumą lyginant su ląstelių grupe „be inhibitoriaus“, kurios atitinkamai paveiktos PBS (kontrolė) arba EV.

Vertinant IFN β raiškos pokyčius grafiškai pavaizduotus 3.2.2 pav. A, matoma, kad lyginant su niekuo neveiktomis hCMEC/D3 ląstelėmis (Kontrolė), WT-EV po 24 val patikimai sumažino šio geno raišką $35 \pm 5\%$ ($n = 3$). Ryškus LY294002 efektas matomas po 24 val, kuomet jis reikšmingai sumažino IFN β raišką $50 \pm 2\%$, o kombinacijoje su WT-EV arba 3Tg-EV atitinkamai sumažino $25 \pm 7\%$ ir $51 \pm 7\%$ ($n = 2$), lyginant su inhibitoriumi nepaveiktomis ląstelėmis. IFN β yra I interferonų tipo citokinas palaikantis uždegimą, kurio produkcija dažniausiai susijusi su TLR aktyvacija bei NF- κ B signalinimu (104). Taigi, WT-EV, kaip ir PI3K/Akt slopinimas, sumažino šio pro-uždegiminio geno raišką.

Vertinant SOCS1 raišką matoma, kad po 12 val 3Tg-EV reikšmingai ją sumažino $36 \pm 5 \%$ ($n = 3$) lyginant su kontrole, kai WT-EV tam įtakos neturėjo (3.2.2 pav. A). Be to, po 12 val inhibitorius LY294002 reikšmingai padidino šio geno aktyvaciją $43 \pm 5 \%$ ($n = 2$) lyginant su kontrole, o kombinacijoje su WT-EV arba 3Tg-EV – atitinkamai padidino 75% ir 52% lyginant su grupe be inhibitoriaus. Po 24 val 3Tg-EV SOCS1 raišką mažinantis efektas išnyko, o inhibitoriaus išliko panašus. SOCS baltymai slopina citokinų signalinimą ir tokiu būdu apsaugo ląstelę nuo užsitęsusio uždegiminių citokinų veikimo (105). Taigi, anti-uždegiminio SOCS1 geno raišką sumažina 3Tg-EV, o PI3K/Akt kelio slopinimas ją padidina, neutralizuodamas 3Tg-EV poveikį.



3.2.2 pav. B. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis COX2 ir CCL2 genų raiškai hCMEC/D3 ląstelėse. hCMEC/D3 buvo paveiktos PI3K inhibitoriumi LY294002 ($50 \mu\text{M}$) 30 min., po to 12 arba 24 val. inkubuojamos su WT-EV arba 3Tg-EV. Po inkubacijos ląstelės buvo lizuojamos, išskiriama RNR ir genų raiška analizuojama RT-qPCR metodu. Statistiškai patikima, kai *** $p < 0,001$; # $p < 0,0001$; $n = 2-3$. Reikšmingumo žymėjimai LY29002 grupėje nurodo statistinį patikimumą lyginant su ląstelių grupe „be inhibitoriaus“, kurios atitinkamai paveiktos PBS (kontrolė) arba EV.

Iš 3.2.2 pav. B pavaizduoto grafiko, galima matyti, kad skirtingo tipo EV statistiškai reikšmingai nepaveikė COX2 ir CCL2 raiškos nei po 12, nei po 24 val. Inhibitorius LY294002 po 12 val patikimai sumažino COX2 raišką labai panašiai su visais poveikiais (kontrolė – $52 \pm 8 \%$, WT-EV – $47 \pm 8 \%$, 3Tg-EV – $54 \pm 3 \%$, $n = 3$). Panašiai, inhibitorius paveikė CCL2 raišką -

nuslopinio ją apie 95% nepriklausomai nuo poveikio EV ir inkubacijos laiko. COX2 geriausiai žinomas dėl savo vaidmens prostaglandinų sintezėje, o CCL2 – reguliuojant makrofagų pritraukimą uždegimo metu. Taigi, šių pro-uždegiminių genų abiejų tipų EV reikšmingai nepaveikė, o PI3K-Akt slopinimas jų raišką sumažino.

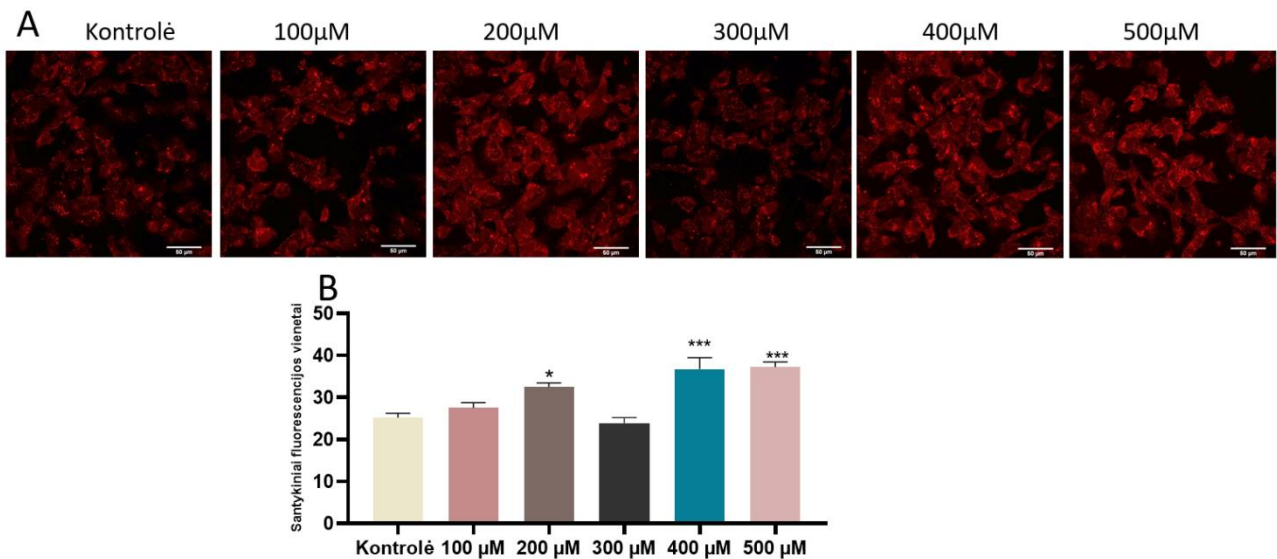
3.3. 3Tg-EV bei WT-EV poveikis ROS produkcijai

Oksidacinis stresas yra svarbus patologinis faktorius AL atveju. Jau ankstyvoje šios ligos stadijoje yra stebima lipidų, baltymų bei DNR oksidacija (3). Su senėjimu susiję procesai skatina mitochondrijų sutrikimus, kas taip pat yra matoma 3Tg-AL pelių modeliuose. Tyrimai parodė, kad 3Tg-iAstro pasižymi sutrikusiu oksidaciniu fosforiliniu, kas skatina mitochondrinių bei viduląstelių ROS produkciją (15). Kaip minėta anksčiau, EV gali tiesiogiai arba netiesiogiai paveikti ROS produkciją ląstelėse-recipientėse (8). Dėl to, šio tyrimo metu buvo vertinamas ROS lygio pokytis bei antioksidacinis atsakas paveikus hCMEC/D3 ląsteles EV iš 3Tg-iAstro arba WT-iAstro.

Mitochondrinių ROS lygis nustatytas naudojant fluorescencinį dažą „MitoSOX“, o viduląstelių ROS lygis nustatytas naudojant DCFDA. Antioksidacinio atsako tyrimui buvo naudotos Nrf1/2 signalinio kelio reporterinių hCMEC/D3 ląstelių linija. Šiuose eksperimentuose, kaip teigiama kontrolė buvo naudojamas tBHP, kuris yra plačiai naudojamas oksidacinio streso induktorius *in vitro*, galintis padidinti ROS kiekį mitochondrijose (106, 107).

3.3.1. Skirtingų tBHP dozių poveikis mitochondrinių ROS lygiui hCMEC/D3 ląstelėse

Norėdami atrinkti tinkamiausią tBHP junginio koncentraciją, kuri sukelia daugiausia mitochondrinių ROS, hCMEC/D3 ląsteles paveikėme 100, 200, 300, 400, 500 μ M tBHP. Ankstesnių eksperimentų metu su EV bei tBHP, ryškiausias efektas buvo matomas po 6 val. (duomenys nepateikti), dėl to tolimesni oksidacinio streso tyrimai buvo atliekami analogiškai.

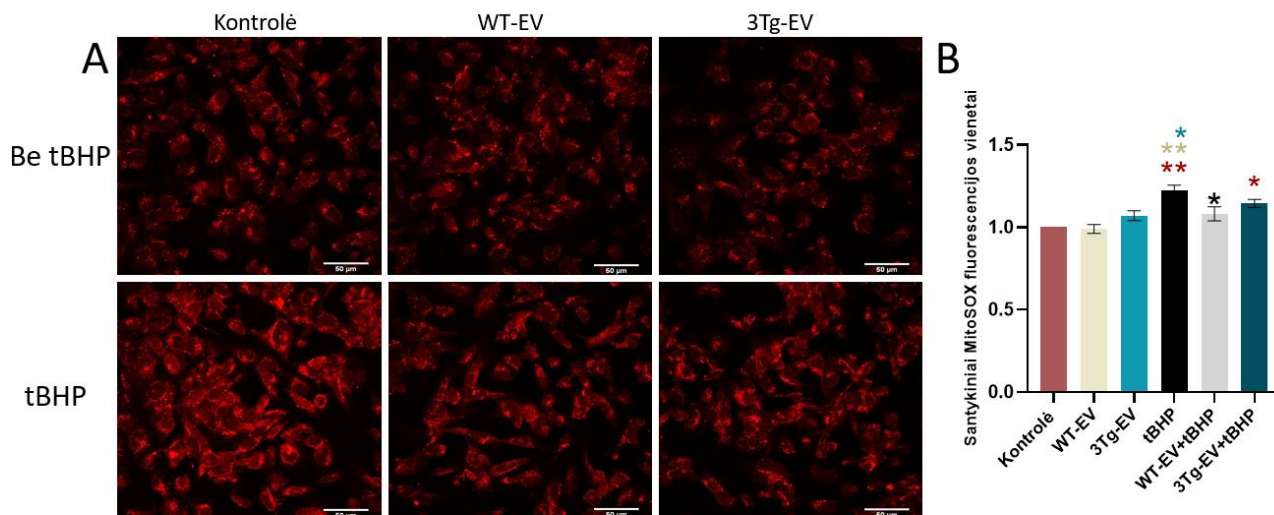


3.3.1 pav. Skirtingų tBHP dozių poveikis mitochondrinių ROS lygiui hCMEC/D3 ląstelėse. Su tBHP (100, 200, 300, 400, 500 μM) buvo inkubuojamos 6 val., po kurių ląstelės buvo dažomos 0,5 μM „MitoSOX“, 15 min., 37°C ir fiksuojamos. Mėginiai buvo vaizdinami konfokaliniu Leica TCS SP8 mikroskopu. A- reprezentacinės nuotraukos. B- Kiekybinis fluorescencijos intensyvumo įvertinimas. Pateikiami 5 nuotraukų fluorescencijos vidurkiai + SEM (nuokrypiai iš techninių pakartojimų). Statistiškai patikima, kai * $p < 0,05$; * $p < 0,001$.**

Gauti rezultatai parodė (3.3.1 pav.), kad 200 μM tBHP reikšmingai padidino „MitoSOX“ fluorescenciją 1,3 karto lyginant su kontrole. Ryškiausias efektas buvo matomas su 400 ir 500 μM, kuomet fluorescencijos stiprumas padidėjo 1,5 karto. Kadangi tarp šių dozių fluorescencija nesiskyrė, tolimesniems eksperimentams buvo nuspręsta naudoti 400 μM tBHP koncentracija.

3.3.2. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis mitochondrinių ROS produkcijai

Atrinkus tinkamą tBHP koncentraciją, tolesnių eksperimentų tikslas buvo įvertinti, koki poveikį WT-EV bei 3Tg-EV turi mitochondrinių ROS lygiui hCMEC/D3 ląstelėse. Eksperimento dieną, ląstelės pagal poveikį buvo suskirstytos į šešias grupes (paveikiamos skirtingų tipų EV, tBHP bei EV ir tBHP kombinacija, kaip nurodyta metodų skiltyje 2.2.10). Po 6 val inkubacijos, ląstelės buvo dažytos MitoSOX [0,5 μM], 15 min, 37°C ir fiksuotos.

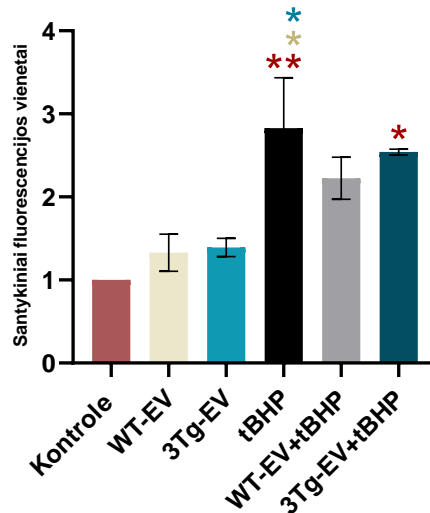


3.3.2 pav. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis mitochondrinių ROS lygiui hCMEC/D3 ląstelėse. Praėjus 6 val. inkubacijai su tBHP, skirtingų tipų EV arba tBHP ir EV kombinacijomis, ląstelės buvo dažomos 0,5 μ M „MitoSOX“, 15 min., 37°C ir fiksuojamos. Mėginiai buvo vaizdinami konfokaliniu Leica TCS SP8 mikroskopu. **A** - reprezentacinės konfokalinės mikroskopijos nuotraukos **B** - Kiekybinis fluorescencijos intensyvumo įvertinimas. $N = 3$. Simbolių (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) spalva rodo reikšmingą skirtumą lyginant su atitinkamos spalvos stulpeliu.

Gauti rezultatai (3.3.2 pav.) rodo, kad tBHP bei 3Tg-EV kombinacija su tBHP reikšmingai padidino „MitoSOX“ švytėjimą atitinkamai 22 ± 3 % ir 14 ± 2 %. Taip pat buvo pastebėta, kad šį efektą reikšmingai nuslopino išankstinis WT-EV poveikis 14 % lyginant su tBHP grupe, kai 3Tg-EV reikšmingo poveikio neturėjo.

3.3.3. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis viduląstelių ROS produkcijai

Viduląstelių ROS nustatymui, ląstelės buvo 45 min. inkubuojamos su 10 μ M DCFDA, tuomet pakeitus terpę, jos buvo suskirstytos į šešias grupes pagal poveikį (žr. Metodai: 2.2.10.). Pirminių eksperimentų metu DCFDA fluorescencija buvo matuojama 6 val., kas valandą ir buvo pastebėta, kad stipriausias fluorescencijos pokytis buvo matomas po 3 val. Dėl šios priežasties tolimesni eksperimentai buvo atliekami ląstelėse su poveikiais inkubuojant 3 val.



3.3.3 pav. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis viduląstelinėms ROS lygiui hCMEC/D3 ląstelėse. Ląstelės su 10 μ M DCFDA inkubuojamos 45 min, tada 3 val inkubuojama su tBHP, skirtingų tipų EV arba tBHP ir EV kombinacijomis. Fluorescencija buvo matuojama fluorimetru Fluoroscant Ascent. $N = 3$. Simbolių (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) spalva rodo reikšmingą skirtumą lyginant su atitinkamos spalvos stulpeliu.

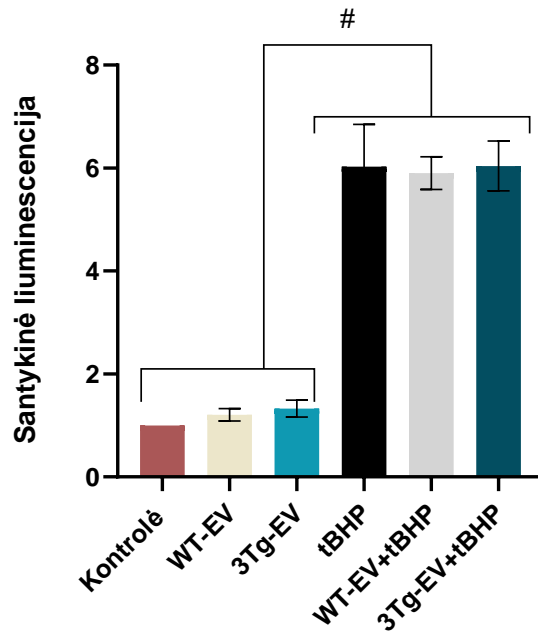
Paveiksle 3.3.3 nurodyti rezultatai rodo, kad tBHP bei 3Tg-EV kombinacija su tBHP reikšmingai padidino DCFDA švytėjimą lyginant su kontrole atitinkamai 2,8 ir 2,5 karto. Tačiau šiuo atveju nei WT-EV nei 3Tg-EV neturėjo poveikio tBHP sukeltam oksidaciniam stresui.

3.3.4. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis NRF1/2 signalinimui

Yra žinoma, kad išankstinis EV poveikis gali aktyvinti pagrindinį antioksidacinio atsako reguliatorių – Nrf2/Keap signalinį kelią ir apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso (108). Dėl šios priežasties toliau buvo aiškinamasi, ar 3Tg-EV ir WT-EV dalyvauja šio kelio aktyvacijoje. Šiam tikslui atlikome eksperimentus su Nrf1/2 signalinio kelio reporterinių hCMEC/D3 ląstelių linija, į kurias įterpti konstruktai, koduojantys jonvabalių liuciferazės baltymą bei turi indukuojamo antioksidacinio atsako promotorių. Kuomet ląstelėse aktyvuojamas Nrf1/2 transkripcijos faktorius, jis rišasi prie antioksidacinio atsako elemento (ARE) ir aktyvuoja reporterinio baltymo (liuciferazės) raišką.

Eksperimento dieną, ląstelės buvo paveikiamos kaip nurodyta Metodų skiltyje 2.2.10. Praėjus 6 val inkubacijai, ląstelės buvo lizuojamos, paveikiamos substrato buferiu ir galiausiai buvo matuojama jų liuminescencija. Ta pati procedūra buvo atliekama NK konstruktais transdukuotomis

ląstelėmis. Lyginant su ARE, NK liuciferazės raiška su visais poveikiais buvo mažesnė, kas parodo, kad foninis liuciferazės aktyvumas labai mažas ir kad jam įtakos neturi naudoti poveikiai.



3.3.4 pav. 3Tg-EV ir WT-EV poveikis NRF1/2 signalinimui. Praėjus 6 val inkubacijai su tBHP, skirtingų tipų EV arba tBHP ir EV kombinacijomis, ląstelės buvo lizuojamos ir paveikiamos substrato buferiu. Liuminescencija matuojama Spark plokštelių skaitytuvu („Tecan“). $N=3$. Statistiškai patikima, kai $\#p < 0,0001$.

Paveikslo 3.3.4 rezultatai rodo, kad tBHP reikšmingai padidino Nrf1/2 signalinio kelio aktyvumą 6 kartus. Vertinant EV poveikį, galima matyti, kad nei įprastomis kultivavimo sąlygomis, nei sukėlus oksidacinį stresą, EV neturėjo poveikio Nrf1/2 signaliniam keliui.

REZULTATŲ APTARIMAS

Mūsų tyrimo metu, pagal ISEV rekomendacijas, buvo charakterizuotos WT-iAstro ir 3Tg-iAstro kilmės EV. Jos pasižymėjo dubenėlio formos morfologija, bei EV populiacijai būdingais baltymineis žymenimis: rasti transmembraniniai CD63 ir sinteninas-1, atliekantys svarbų vaidmenį EV biogenezeje, šaperonas Hsc70 – rūšiuojantis baltymus į EV vidų bei membraninis glikoproteinas MFG-E8, turintis didelį jungimosi aktyvumą prie anijoninių fosfolipidų (109). Palyginus WT-EV ir 3Tg-EV proteominės analizės duomenis su *Vesiclepedia* bazėje patalpintu Top 100 EV baltymų sąrašu (99), 72 iš jų buvo bendri abiejų tipų EV duomenų rinkiniams. Be to, pastebėta, kad jos turi astroцитams būdingų žymenų (GFAP ir ALDH1A7). Nustatytas tiriamųjų EV skersmuo (130-187 nm) atitinka egzozomoms būdingą intervalą (30-200 nm), tačiau taip pat iš dalies persidengia su mikrovezikulių dydžiu (100-1000 nm). Nors EV subpopuliacijoms būdingi panašūs žymenys, sukaupti literatūros duomenys rodo, kad egzozomos būna labiau praturtintos CD63 ir sinteninu-1 (110) nei mikrovezikulės. Taigi, apibendrintai šie rezultatai patvirtina, kad ultracentrifugavimo būdu išskirtos dalelės yra astroцитų kilmės, heterogeniška (egzozomų ir mikrovezikulių) EV populiacija.

Funkcinė EV baltymų analizė parodė, kad WT-EV ir 3Tg-EV rasti baltymai dalyvauja tokiuose biologiniuose procesuose, kaip integrinų signalinimas ir membranos konfigūracijos moduliavimas, kas atitinka žinomas EV funkcijas (111). WT-EV, skirtingai nei 3Tg-EV, buvo praturtintos su apoptozės slopinimu susijusiais bei antioksidacinių savybių turinčiais baltymais. Iš šių rezultatų galima daryti prielaidą, kad WT-EV ir 3Tg-EV dalyvauja svarbiuose procesuose bei dėl nevienodo baltymų sąstato, gali skirtingai paveikti ląstelių atsaką į oksidacinį stresą.

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad abiejų tipų EV aktyvino Akt (Thr) fosforilinimą hCMEC/D3 ląstelėse, tačiau stebėtina, kad 3Tg-EV padidino pAkt (Thr) kiekį du kartus daugiau nei WT-EV. Literatūros duomenimis, pilnai Akt aktyvacijai nėra būtinas Akt(ser) fosforilinimas (87, 88), dėl to remiantis mūsų rezultatais galima teigti, kad EV aktyvina PI3K/Akt signalinimą. Kitų tyrėjų atlikti eksperimentai su AL pacientų smegenų audiniu parodė padidėjusį pAkt (Thr) kiekį (112) bei hiperfosforilintus Akt substratus (tau, GSK3β, mTOR) (113), lyginant su sveiku audiniu, tačiau EV vaidmuo nebuvo tirtas. Tiriant su uždegimų susijusių genų aktyvaciją, buvo pastebėta, kad WT-EV ir 3Tg-EV paveikia skirtingus genus hCMEC/D3 ląstelėse: WT-EV slopina pro-uždegiminio IFNβ raišką, o 3Tg-EV – anti-uždegiminio SOCS1 raišką. Taip pat šių genų raišką iš

dalies reguliuoja PI3K/Akt signalinis kelias, nes jo slopinimas sumažina IFN β raišką, bet padidina SOCS1 raišką. Yra duomenų, kad SOCS1 yra pro-uždegiminės miR-155 taikiny, kuri slopina pastarojo raišką 3Tg-AL pelių hipokampo bei žievės srityse (114). Be to ji yra siejama su EV tarpninkaujamu pernešimu (115), o padidėjęs kiekis yra randama išsėtinės sklerozės pacientų smegenų endotelio ląstelėse (116). 3Tg-EV gali būti susijusiu su miR-155 pernešimu, tačiau šiai hipotezei patikrinti reikalingi tolimesni tyrimai.

Oksidacinio streso tyrimų metu gauti rezultatai parodė, kad išankstinis WT-EV, bet ne 3Tg-EV poveikis sumažino tBHP indukuotą mitochondrinių ROS aktyvaciją, tačiau neturėjo įtakos viduląstelinėms ROS produkcijai. Tai reiškia, kad WT-EV padidina hCMEC/D3 ląstelių atsparumą tBHP sukeltam oksidaciniam stresui mitochondrijose. Kadangi mūsų tyrimuose naudoti metodai nustato skirtingas ROS rūšis, skirtingose ląstelės vietose (MitoSOX – superoksidą mitochondrijose, DCFDA – hidroksilo/peroksilo radikalus citoplazmoje), galima daryti išvadą, kad EV specifiskai paveikia ROS susidarymą tik mitochondrijose. Taip pat galima daryti prielaidą, kad WT-EV pasižymi antioksidacinėmis savybėmis arba mitochondrijas apsaugančiu efektu. Panašūs tyrimai su mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) EV parodė, kad išankstinis jų poveikis apsaugo nuo H₂O₂ sukkelto mitochondrinių ROS produkavimo stuburo slankstelių *nucleus pulposus* (NP) ląstelėse. Šio straipsnio autoriai svarstė, kad MKL EV sukelia tokį efektą papildydamos mitochondrinius baltymus NP ląstelėse, nes jose gausu mitochondrijų kilmės baltymų (117). Šie duomenys iš dalies sutapo su mūsų EV baltymų funkcine analize, nes WT-EV ir 3Tg-EV taip pat buvo praturtintos mitochondriniais baltymais. Kiti tyrimai su nepigmentuoto ciliarinio epitelio (NCE) EV parodė, kad išankstinis jų poveikis apsaugojo trabekulinės tinklo ląsteles nuo sukkelto oksidacinio streso ir lėmė Nrf2/Keap kelio aktyvaciją (108). Mūsų tyrimo metu, EV poveikis nesukėlė Nrf1/2 signalinio kelio aktyvacijos, dėl to galima teigti, kad WT-EV mitochondrinių ROS lygį mažinantis efektas nėra su juo susijęs. GO praturtinimo analizė parodė, kad WT-EV, priešingai nei 3Tg-EV yra praturtintos baltymais turinčiais antioksidacinių savybių, pavyzdžiui, katalaze ir mitochondriniais peroksiredoksinais. Tai gali būti siejama su WT-EV matomu antioksidaciniu efektu, tačiau šios hipotezės įrodymui reikalingi funkciniai minėtų baltymų tyrimai.

Mūsų atlikti tyrimai rodo, kad WT-iAstro ir 3Tg-iAstro sekretuojamos EV pasižymi skirtingais efektais hCMEC/D3 ląstelėse, o jų veikimo mechanizmų supratimas gali prisidėti prie AL patogenezės išaiškinimo.

IŠVADOS

1. Laukinio tipo bei 3Tg-AL astrocitų sekretuojamos ekstraląstelinės vezikulės (atitinkamai WT-EV ir 3Tg-EV) pasižymi egzosomoms ir mikrovezikulėms būdingu dydžiu, morfologija bei baltymiais žymenimis. Abu EV tipai yra praturtinti baltymais susijusiais su signalo perdavimu, membranos moduliavimu, tačiau tik WT-EV praturtintos apoptozės slopinimu pasižyminčiais bei antioksidacinių savybių turinčiais baltymais.
2. WT-EV sumažina uždegiminio IFN β geno, o ir 3Tg-EV – anti-uždegiminio SOCS1 geno raišką smegenų endotelio ląstelėse. Šių genų raiška dalinai reguliuojama per PI3K/Akt signalinį kelią.
3. Išankstinis WT-EV, bet ne 3Tg-EV, poveikis slopina tBHP sukeltą ROS susidarymą mitochondrijose, nepriklausomai nuo Nrf1/2 signalinio kelio, tačiau nepaveikia viduląstelių ROS smegenų endotelio ląstelėse.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

GABRIELĖ VYDMANTAITĖ

Laukinio tipo ir 3Tg-AL astrocitų ekstraląstelių vezikulių poveikis oksidaciniam stresui ir uždegiminių genų raiškai smegenų endotelio ląstelėse

Ankstyvos Alzheimerio ligos (AL) metu pastebimi smegenų kraujagyslių bei kraujosmegenų barjero (KSB) funkcijų sutrikimai. Manoma, kad prie to gali prisidėti oksidacinio streso arba uždegiminiai procesai. Sekretiniai astrocitų veiksniai atlieka svarbų vaidmenį palaikant smegenų endotelio barjerines savybes, dėl to jų funkcijų sutrikimas ankstyvoje AL stadijoje gali būti kritinis KSB pažeidimui. Nėra žinoma, kaip AL paveiktų astrocitų sekretuojamos ekstraląstelinės vezikulės (EV) gali paveikti smegenų endotelio ląsteles. Šių EV veikimo mechanizmų supratimas gali prisidėti prie AL patogenezės išaiškinimo.

Tyrimo metu buvo parodyta, kad sveikų ir šeiminės AL mutacijas turinčių astrocitų sekretuojamos dalelės (atitinkamai WT-EV ir 3Tg-EV), pasižymi egzosomoms ir mikrovezikulėms būdingu dydžiu, morfologija bei baltymineis žymenimis. WT-EV sumažina uždegiminio IFN β geno, o ir 3Tg-EV – anti-uždegiminio SOCS1 geno raišką smegenų endotelio ląstelėse (hCMEC/D3) ir šių genų raiška dalinai reguliuojama per PI3K/Akt signalinį kelią. Oksidacinio streso tyrimuose, išankstinis WT-EV, bet ne 3Tg-EV, sumažina tert-butyl hidroperoksido indukuotą mitochondrinių reaktyvių deguonies junginių (ROS) susidarymą, nepriklausomai nuo Nrf1/2 signalinio kelio, tačiau nepaveikia viduląstelių ROS hCMEC/D3 ląstelėse.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

GABRIELĖ VYDMANTAITĖ

Effects of Wild-Type and 3Tg-AD Astrocyte-derived Extracellular Vesicles on Oxidative Stress and Inflammatory Gene Expression in Brain Endothelial Cells

Cerebrovascular and blood-brain barrier (BBB) dysfunction is observed in early stages of Alzheimer's disease (AD). Studies show that both oxidative stress and inflammation can contribute to BBB impairment but exact mechanisms are unknown. Astrocyte-secreted factors play an important role in maintaining barrier function therefore impairment of these cells in early AD stages may be critical for BBB damage. However, there are no reports on how AD-affected astrocyte-derived extracellular vesicles (EVs) influence brain endothelial cells. Understanding the mechanisms of these EVs may contribute to AD pathogenesis elucidation.

In the present study, secreted vesicles from wild type and Familial AD mutations-affected astrocytes (WT-EVs and 3Tg-EVs respectively) were characterized by size, morphology and biomarkers specific to exosomes and microvesicles. WT-EVs reduce the expression of pro-inflammatory IFN β whereas 3Tg-EVs reduce anti-inflammatory SOCS1 in brain endothelium (hCMEC/D3). Also the expression of these genes is partially regulated by PI3K/Akt signaling pathway. In oxidative stress studies, pre-treatment of WT-EVs, but not 3Tg-EVs, reduces tert-butyl hydroxyperoxide-induced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, independently of Nrf1/2 signaling, but does not affect intracellular ROS in hCMEC/D3 cells.

LITERATŪRA

1. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. Vol. 15, Molecular neurodegeneration. NLM (Medline); 2020. p. 40.
2. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, et al. Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 2015 Jan 21;85(2):296–302.
3. Huang W-J, Zhang X, Chen W-W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed reports* . 2016 May;4(5):519–22.
4. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. Vol. 96, *Neuron*. Cell Press; 2017. p. 17–42.
5. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Vol. 7, *Nature Reviews Neuroscience*. 2006. p. 41–53.
6. Kriaučiūnaitė K, Kaušylė A, Pajarskienė J, Tunaitis V, Lim D, Verkhatsky A, et al. Immortalised Hippocampal Astrocytes from 3xTG-AD Mice Fail to Support BBB Integrity In Vitro: Role of Extracellular Vesicles in Glial-Endothelial Communication. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;
7. Lee JY, Kim HS. Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases: A Double-Edged Sword . Vol. 14, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society; 2017. p. 667–78.
8. Bodega G, Alique M, Puebla L, Carracedo J, Ramírez RM. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. Vol. 8, *Journal of Extracellular Vesicles*. Taylor and Francis Ltd.; 2019.
9. WHO | Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025. WHO. 2017; Available from: http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/action_plan_2017_2025/en/
10. Zubenko GS, Zubenko WN, McPherson S, Spoor E, Marin DB, Farlow MR, et al. A collaborative study of the emergence and clinical features of the major depressive syndrome of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 2003 May;160(5):857–66.
11. Tarawneh R, Holtzman DM. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(5).
12. Kalia M. Dysphagia and aspiration pneumonia in patients with Alzheimer's disease. *Metabolism*. 2003;52(SUPPL. 2):36–8.
13. C. Crdenas-Aguayo M del, C. Silva-Lucero M del, Cortes-Ortiz M, Jimnez-Ramos B, Gmez-Virgilio L, Ramrez-Rodríguez G, et al. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. In: *Neurochemistry* . InTech; 2014.
14. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics . Vol. 14, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd.; 2019. p.

- 5541–54.
15. Dematteis G, Vydmantaitė G, Ruffinatti FA, Chahin M, Farruggio S, Barberis E, et al. Proteomic analysis links alterations of bioenergetics, mitochondria-ER interactions and proteostasis in hippocampal astrocytes from 3xTg-AD mice. *Cell Death Dis* . 2020 Aug 1 ;11(8):1–16.
 16. Sagare AP, Bell RD, Zlokovic B V. Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β -peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10).
 17. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders . Vol. 12, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2011. p. 723–38.
 18. Rombouts SARB, Goekoop R, Stam CJ, Barkhof F, Scheltens P. Delayed rather than decreased BOLD response as a marker for early Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2005 Jul 15;26(4):1078–85.
 19. Hunt A, Schönknecht P, Henze M, Seidl U, Haberkorn U, Schröder J. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease. *Psychiatry Res - Neuroimaging*. 2007 Jul 15;155(2):147–54.
 20. Carvalho C, Moreira PI. Oxidative stress: A major player in cerebrovascular alterations associated to neurodegenerative events . Vol. 9, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2018
 21. Freeman LR, Keller JN. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions . Vol. 1822, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. NIH Public Access; 2012. p. 822–9.
 22. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic B V. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. Vol. 35, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Nature Publishing Group; 2015. p. 1055–68.
 23. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* . 2015 Jan 5;7(1):a020412.
 24. Petzold GC, Murthy VN. Role of astrocytes in neurovascular coupling . Vol. 71, *Neuron*. Cell Press; 2011. p. 782–97.
 25. Thurgur H, Pinteaux E. Microglia in the Neurovascular Unit: Blood–Brain Barrier–microglia Interactions After Central Nervous System Disorders . Vol. 405, *Neuroscience*. Elsevier Ltd; 2019. p. 55–67.
 26. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. Vol. 38, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2017. p. 291–304.
 27. Greene C, Campbell M. Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules . Vol. 4, *Tissue Barriers*. Taylor and Francis Inc.; 2016.
 28. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease . Vol. 57, *Pharmacological Reviews*. 2005. p. 173–85.
 29. McCarty JH. Cell biology of the neurovascular unit: Implications for drug delivery across the blood-

- brain barrier . Vol. 3, Assay and Drug Development Technologies. 2005. p. 89–95.
30. Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: A rhetorical perspective . Vol. 111, *Journal of Neurochemistry*. NIH Public Access; 2009. p. 291–314.
 31. Sharma B, Luhach K, Kulkarni GT. In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery. In: *Brain Targeted Drug Delivery System*. Elsevier; 2019. p. 53–101.
 32. Brendel K, Meezan E, Carlson EC. Isolated brain microvessels: A purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science* (80-). 1974;185(4155):953–5.
 33. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use . Vol. 36, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Nature Publishing Group; 2015. p. 862–90.
 34. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* . 2005 Nov;19(13):1872–4.
 35. Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier . Vol. 10, *Fluids and Barriers of the CNS*. BioMed Central; 2013. p. 16.
 36. Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pilkington GJ. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods* . 2011 Aug 15;199(2):223–9.
 37. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic B V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* . 2018;14(3):133–50.
 38. Erickson MA, Banks WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer’s disease . Vol. 33, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications; 2013. p. 1500–13.
 39. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. Vol. 11, *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 457–70.
 40. Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic A V. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction “opening”: Signaling via Rho and Rho kinase . Vol. 116, *Journal of Cell Science*. *J Cell Sci*; 2003. p. 4615–28.
 41. Song K, Li Y, Zhang H, An N, Wei Y, Wang L, et al. Oxidative Stress-Mediated Blood-Brain Barrier (BBB) Disruption in Neurological Diseases. Vol. 2020, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2020.
 42. Carvalho C, Moreira PI. Oxidative stress: A major player in cerebrovascular alterations associated to neurodegenerative events . Vol. 9, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2018.

43. Cai Z, Qiao PF, Wan CQ, Cai M, Zhou NK, Li Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. Vol. 63, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2018. p. 1223–34.
44. Verkhratsky A, Rodrigues JJ, Pivoriunas A, Zorec R, Semyanov A. Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. Vol. 471, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. Springer Verlag; 2019. p. 1247–61.
45. Mangia S, Simpson IA, Vannucci SJ, Carruthers A. The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *J Neurochem* . 2009 May;109 Suppl 1(Suppl 1):55–62.
46. Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7–35.
47. Liu CY, Yang Y, Ju WN, Wang X, Zhang HL. Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of alzheimer's disease. Vol. 12, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
48. Chow BW, Gu C. The Molecular Constituents of the Blood-Brain Barrier. *Trends Neurosci* . 2015;38(10):598–608.
49. Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodríguez JJ. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* . 2010 May;58(7):831–8.
50. Senitz D, Reichenbach A, Smith TG. Surface complexity of human neocortical astrocytic cells: Changes with development, aging, and dementia. *J Brain Res* . 1995 Jan 1;36(4):531–7.
51. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409–21.
52. Yu H, Lin X, Wang D, Zhang Z, Guo Y, Ren X, et al. Mitochondrial Molecular Abnormalities Revealed by Proteomic Analysis of Hippocampal Organelles of Mice Triple Transgenic for Alzheimer Disease. *Front Mol Neurosci*. 2018;11(March):1–13.
53. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* . 1987 Jul 5;262(19):9412–20.
54. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* . 2015 Jan 1;4(1):27066.
55. Doyle L, Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019 Jul 15;8(7):727.
56. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the

- International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* . 2018 Jan 1;7(1):1535750.
57. Yi YW, Lee JH, Kim SY, Pack CG, Ha DH, Park SR, et al. Advances in analysis of biodistribution of exosomes by molecular imaging . Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
 58. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential . Vol. 9, *Cell and Bioscience*. BioMed Central; 2019.
 59. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles . Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 213–28.
 60. Aheget H, Tristán-Manzano M, Mazini L, Cortijo-Gutierrez M, Galindo-Moreno P, Herrera C, et al. Exosome: A New Player in Translational Nanomedicine. *J Clin Med* . 2020 Jul 26;9(8):2380.
 61. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake . Vol. 36, *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer New York LLC; 2016. p. 301–12.
 62. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery . Vol. 22, *Current Biology*. Cell Press; 2012. p. R116.
 63. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. Vol. 200, *Journal of Cell Biology*. 2013. p. 373–83.
 64. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007 May;21(3):157–71.
 65. Bianco F, Perrotta C, Novellino L, Francolini M, Riganti L, Menna E, et al. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J*. 2009 Apr 22;28(8):1043–54.
 66. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004 Nov 15 ;104(10):3257–66.
 67. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C V., Melief CJM, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):1161–72.
 68. Chen CC, Liu L, Ma F, Wong CW, Guo XE, Chacko J V., et al. Elucidation of Exosome Migration Across the Blood–Brain Barrier Model In Vitro. *Cell Mol Bioeng* . 2016 Dec 1;9(4):509–29.
 69. Yuan D, Zhao Y, Banks WA, Bullock KM, Haney M, Batrakova E, et al. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials* . 2017 Oct 1 [cited 2020 Nov 11];142:1–12.
 70. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* . 2007 Jun 7;9(6):654–9.
 71. Schiera G, Di Liegro CM, Di Liegro I. Extracellular Membrane Vesicles as Vehicles for Brain Cell-

- to-Cell Interactions in Physiological as well as Pathological Conditions. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
72. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Dev Neurobiol* . 2007 Nov;67(13):1815–29.
 73. Pascua-Maestro R, González E, Lillo C, Ganformina MD, Falcón-Pérez JM, Sanchez D. Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress. *Front Cell Neurosci* . 2019 Jan 4;12.
 74. Chiarini A, Armato U, Gardenal E, Gui L, Dal Prà I. Amyloid β -exposed human astrocytes overproduce phospho-tau and overrelease it within exosomes, effects suppressed by calcilytic NPS 2143-Further implications for Alzheimer’s therapy. *Front Neurosci* . 2017 Apr 20;11(APR).
 75. Goetzl EJ, Schwartz JB, Abner EL, Jicha GA, Kapogiannis D. High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Ann Neurol* . 2018 Mar 1;83(3):544–52.
 76. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. Vol. 10, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 356–64.
 77. Barry OP, Praticò D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* . 1997 May 1;99(9):2118–27.
 78. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health . Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2017.
 79. Lehner C, Gehwolf R, Tempfer H, Krizbai I, Hennig B, Bauer HC, et al. Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases . Vol. 15, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc.; 2011. p. 1305–23.
 80. Tell G, Quadrioglio F, Tiribelli C, Kelley MR. The many functions of APE1/Ref-1: Not only a DNA repair enzyme . Vol. 11, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc.; 2009. p. 601–19.
 81. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* . 2012 Feb ;26(3):203–34.
 82. Freeman LR, Keller JN. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions . Vol. 1822, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. NIH Public Access; 2012. p. 822–9.
 83. Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martínez M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2012 Dec 1;53(11):2159–70.
 84. Hervera A, De Virgiliis F, Palmisano I, Zhou L, Tantardini E, Kong G, et al. Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into

- injured axons. *Nat Cell Biol* . 2018;20(3):307–19.
85. Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, Fiordaliso F, Bisighini C, Pasetto L, et al. Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: Implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2013 May 31;288(22):15699–711.
 86. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. Vol. 10, *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd.; 2020. p. 1–12.
 87. Moore SF, Hunter RW, Hers I. mTORC2 protein-mediated protein kinase B (Akt) serine 473 phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets. *J Biol Chem*. 2011 Jul 15;286(28):24553–60.
 88. Vincent EE, Elder DJE, Thomas EC, Phillips L, Morgan C, Pawade J, et al. Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* . 2011 May 24;104(11):1755–61.
 89. Gangoda L, Boukouris S, Liem M, Kalra H, Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic? . Vol. 15, *Proteomics*. Wiley-VCH Verlag; 2015. p. 260–71.
 90. Koundouros N, Pouligiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer . Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2018. p. 160.
 91. Rocchio F, Tapella L, Manfredi M, Chisari M, Ronco F, Ruffinatti FA, et al. Gene expression, proteome and calcium signaling alterations in immortalized hippocampal astrocytes from an Alzheimer’s disease mouse model. *Cell Death Dis*. 2019;10(1).
 92. Ghanian Z, Konduri GG, Audi SH, Camara AKS, Ranji M. Quantitative optical measurement of mitochondrial superoxide dynamics in pulmonary artery endothelial cells. *J Innov Opt Health Sci* . 2018 Jan 1;11(1).
 93. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15038–43.
 94. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques . Vol. 7, *Theranostics*. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 789–804.
 95. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov A V., Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. Vol. 2018, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2018.
 96. Chuo STY, Chien JCY, Lai CPK. Imaging extracellular vesicles: Current and emerging methods . Vol. 25, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd.; 2018. p. 91.
 97. Tipney H, Hunter L. An introduction to effective use of enrichment analysis software. *Hum*

- Genomics . 2010 Feb 1;4(3):202–6.
98. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CYJ, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* . 2015 Aug 1;15(15):2597–601.
 99. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol* . 2012 Dec 18;10(12):e1001450.
 100. Zhang Z, Ma Z, Zou W, Guo H, Liu M, Ma Y, et al. The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
 101. González-Mariscal L, Quirós M, Díaz-Coránguez M. ZO proteins and redox-dependent processes . Vol. 15, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011. p. 1235–53.
 102. Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. Vol. 1851, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V.; 2015. p. 882–97.
 103. Koundouros N, Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer . Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2018. p. 160.
 104. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O’Garra A. Type I interferons in infectious disease . Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 87–103.
 105. Liao NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, et al. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
 106. Kučera O, Endlicher R, Roušar T, Lotková H, Garnol T, Drahotka Z, et al. The effect of tert -butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
 107. Wu C, Zhao W, Yu J, Li S, Lin L, Chen X. Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells. *Sci Rep* . 2018 Dec 1;8(1).
 108. Lerner N, Chen I, Schreiber-Avissar S, Beit-Yannai E. Extracellular Vesicles Mediate Anti-Oxidative Response—In Vitro Study in the Ocular Drainage System. *Int J Mol Sci* . 2020 Aug 25;21(17):6105.
 109. Ooishi T, Nadano D, Matsuda T, Oshima K. Extracellular vesicle-mediated MFG-E8 localization in the extracellular matrix is required for its integrin-dependent function in mouse mammary epithelial cells. *Genes to Cells* . 2017 Oct 1;22(10):885–99.
 110. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2016 Feb 23;113(8):E968–77.
 111. Buzás EI, Tóth E, Sódar BW, Szabó-Taylor K. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles . Vol. 40, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2018. p. 453–64.

112. Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinder M, Tanaka T, Braak H, et al. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. Vol. 105, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2003. p. 381–92.
113. Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 2005 Apr;93(1):105–17.
114. Guedes JR, Custódia CM, Silva RJ, de Almeida LP, de Lima MCP, Cardoso AL. Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 1;23(23):6286–301.
115. Bui TM, Mascarenhas LA, Sumagin R. Extracellular vesicles regulate immune responses and cellular function in intestinal inflammation and repair. Vol. 6, *Tissue Barriers*. Taylor and Francis Inc.; 2018.
116. Lopez-Ramirez MA, Wu D, Pryce G, Simpson JE, Reijerkerk A, King-Robson J, et al. MicroRNA-155 negatively affects blood-brain barrier function during neuroinflammation. *FASEB J*. 2014;28(6):2551–65.
117. Xia C, Zeng Z, Fang B, Tao M, Gu C, Zheng L, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects. *Free Radic Biol Med*. 2019 Nov 1;143:1–15.

PRIEDAI

1 Priedas

Baltymų imunobloto analizei naudoti antikūnai.

Antikūnas	Rūšis	Skiedimas	Masė, kDa	Katalogo nr.	Gamintojas
β-Actin	Triušis	1:1000	45	8457	„Cell Signaling Technology“
Phospho-AKT (Ser473)	Triušis	1:2000	60	4060	„Cell Signaling Technology“
Phospho-AKT (Thr308)	Triušis	1:1000	60	13038	„Cell Signaling Technology“
CD63	Pelė	1:200	26	sc-5275	„Santa Cruz Biotechnology“
Hsc70	Ožka	1:200	70	sc-1059	„Santa Cruz Biotechnology“
MFG-E8	Pelė	1:100	46	sc-217574	„Santa Cruz Biotechnology“
Sytenin-1	Pelė	1:200	33	sc-100336	„Santa Cruz Biotechnology“

1 Lentelė. Baltymų imunobloto analizei naudoti pirminiai antikūnai.

Antikūnas	Skiedimas	Katalogo nr.	Gamintojas
IgG prieš triušį, konjuguota su HRP	1:2000	7074	„Cell Signaling Technology“
IgG prieš ožką, konjuguota su HRP	1:2000	31403	„Thermo Fisher Scientific“
IgG prieš pelę, konjuguota su HRP	1:2000	31430	„Thermo Fisher Scientific“

2 Lentelė. Baltymų imunobloto analizei naudoti antriniai antikūnai.

2 Priedas

RT-qPCR naudoti pradmenys.

	Genas	Pradmens seka (Fw) 5' – 3'	Pradmens seka (Rev) 5' – 3'
1	HPRT	GGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA	AGGCTCATAGTGCAAATAAACAGT
2	IFNβ	AGGCTTCTGCATTACCTGAAGG	GGCTAGGCGATCTTCAGTTTCG
3	CCL2	CCTCCAGCATGAAAGTCTCTG	TCTGCACTGAGATCTTCCTATTG
4	SOCS1	CTTCCTGGTGCGCGACAG	GTAGTGCTCCAGCAGCTC
5	COX2	TAAGTGCGATTGTACCCGGAC	TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT

1 Lentelė. RT-qPCR naudotų pradmenų sekos.

3 Priedas.

Biologiniai procesai/ GO terminas	Duomenų rinkinys	Baltymų skaičius duomenų bazėje ¹	Priskirtų baltymų skaičius ²	Procentinė baltymų dalis, %	p reikšmė ³
Integrinų signalinimo kelias (GO:0007229)	WT-EV	132	11	4.60	0.0013044
	3Tg-EV		11	5.88	0.0001048
Ląstelės formos reguliavimas (GO:0008360)	WT-EV	235	16	6.69	3.022E-05
	3Tg-EV		19	10.16	5.504E-10
Neigiamas apoptozės reguliavimas (GO:0043066)	WT-EV	894	26	10.88	0.0173408
	3Tg-EV		13	6.95	1
Vandenilio peroksido katabolinis procesas (GO:0042744)	WT-EV	39	7	2.93	0.0014369
	3Tg-EV		5	2.67	0.1701871
Molekulinė funkcija/ GO terminas	Duomenų rinkinys	Baltymų skaičius duomenų bazėje ¹	Priskirtų baltymų skaičius ²	Procentinė baltymų dalis, %	p reikšmė ³
Sąveika su integriniais (GO:0005178)	WT-EV	221	16	6.75	7.93E-06
	3Tg-EV		17	8.99	2.63E-08
Sąveika su GTP (GO:0005525)	WT-EV	585	30	12.65	3.83E-09
	3Tg-EV		25	13.22	1.18E-07
Sąveika su baltymais kompleksais (GO:0044877)	WT-EV	1142	38	16.03	1.3E-06
	3Tg-EV		32	16.93	8.19E-06
Ląstelinė funkcija/ GO terminas	Duomenų rinkinys	Baltymų skaičius duomenų bazėje ¹	Priskirtų baltymų skaičius ²	Procentinė baltymų dalis, %	p reikšmė ³
Citoplazma (GO:0005737)	WT-EV	8264	141	58.75	5.6402E-14
	3Tg-EV		112	58.63	1.1741E-10
Mitochondrija (GO:0005739)	WT-EV	2347	65	27.08	1.37341E-12
	3Tg-EV		37	19.37	0.018707683
Plazminė membrana (GO:0005886)	WT-EV	5404	108	45	1.7126E-13
	3Tg-EV		91	47.64	5.56354E-13
Egzosoma (GO:0070062)	WT-EV	149	16	6.66	1.616E-09
	3Tg-EV		12	6.28	2.50476E-06

1 Lentelė. WT-EV ir 3Tg-EV funkcinė genų ontologijos analizė.¹ Baltymų, priskirtų konkrečiam GO terminui, skaičius duomenų bazėje (2020.12.02 UniProt Rodents).² Tiriamų baltymų iš WT-EV (241) ir 3Tg-EV (192) duomenų rinkinių, skaičius priskirtas tam tikram GO terminui iš duomenų bazės. ³Tikimybė, kad tiriamų baltymų skaičius GO termine atitiko duomenų bazės duomenis atsitiktinai. Jei $p < 0.05$, priskirtų baltymų skaičius yra statistiškai patikimas (tikimybė, kad jie buvo priskirti atsitiktinai yra labai maža).