

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Neurobiologijos magistro programos II kurso studentė

Agnė JOKUBAUSKYTĖ

Magistrinis darbas

**Mikroglijos parakrinių veiksnių poveikis smegenų kraujagyslių  
endotelio barjerinėms savybėms**

Vadovas: dr. Augustas Pivoriūnas

Vilnius 2024

**Mikroglijos parakrinių veiksmų poveikis smegenų kraujagyslių endotelio barjerinėms savybėms**

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

Agnė Jokubauskytė

/parašas/

Darbo vadovas:

Leisti/neleisti gintis:

Dr. Augustas Pivoriūnas

/parašas/

*Įrašo data*

## TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS .....	7
1.1. Kraujo-smegenų barjeras.....	9
1.2. Kraujo-smegenų barjero modeliavimas in vitro .....	12
1.3. Mikroglia .....	14
1.4. Ekstraląstelinės vezikulės .....	16
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	19
2.1. Medžiagos ir aparatūra .....	19
2.1.1. Ląstelės .....	19
2.1.2. Medžiagos .....	19
2.1.3. Prietaisai.....	21
2.1.4. Programinė įranga.....	21
2.2. Ląstelių kultivavimas.....	21
2.2.1. iPKL kultivavimas ir diferenciacija .....	21
2.2.2. Mikroglijos kultivavimas .....	22
2.2.3. SEL ir mikroglijos kokultivavimas.....	22
2.2.4. SEL kultivavimas su ekstraląstelinėmis vezikulėmis ir tirpiaisiais veiksniais .....	23
2.3. Ekstraląstelių vezikulių išskyrimas ir charakterizavimas.....	24
2.4. TEEV matavimai .....	24
2.5. Imunocitochemija .....	24
2.6. Imunobloto analizė .....	25
2.7. Statistinė analizė .....	25
3. REZULTATAI IR APTARIMAS .....	27
3.1. Smegenų endotelio ląstelių charakterizavimas.....	27
3.2. Mikroglijos aktyvacijos analizė.....	29
3.3. Mikroglijos sekretuojamų parakrinių veiksnių poveikis smegenų kraujagyslių endotelio ląstelių barjerinėms savybėms .....	30
3.4. Mikroglijos egzosomų charakterizavimas ir poveikis SEL barjerinėms savybėms .....	33
3.5. Mikroglijos mikrovezikulių charakterizavimas ir poveikis SEL barjerinėms savybėms .....	34
3.6. SEL ir mikroglijos ląstelių tarpusavio sąveikos svarba SEL monosluoksnio barjerinėms savybėms .....	36
IŠVADOS .....	38
SANTRAUKA.....	39
SUMMARY .....	40

LITERATŪRA .....	41
PRIEDAI.....	48
1 priedas.....	49

## SANTRUMPOS

AJ -adhezinė jungtis

AL – Alzheimerio liga

ANXA1 - aneksinas A1

bFGF – bazinis fibroblastų augimo veiksnys

BCA - bicinchoninė rūgštis

BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *Bovine serum albumin*)

CAM – su kapiliarais asocijuojama mikroglia (angl. *Capillary-Associated Microglia*)

CNS – centrinė nervų sistema

CSF1R – kolonijas stimuliuojančio veiksnio 1 receptorių (angl. *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*)

DAM – su liga siejama mikroglia (angl. *Disease-associated microglia*)

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindolas

DMEM - Dulbecco'o modifikuota Eagle ląstelių mitybinė terpė

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

EV – ekstraląstelinės vezikulės

GJ – glaudžioji jungtis

hESFM – žmogaus endotelio ląstelių terpė be serumo (angl. *Human Endothelial Serum Free Medium*)

HSP70 – karščio šoko baltymas 70 (angl. *Heat Shock Protein 70*)

IBA1 – jonizuota kalcijį prijungianti adaptoriaus molekulė 1 (angl. *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*)

IFN $\gamma$  – gama interferonas

IL-1 $\beta$  – interleukinas 1 beta

iPKL – indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės

I $\kappa$ B $\alpha$  - branduolio faktoriaus kapa B inhibitorius

KLRL – kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelės

LPS – lipopolisacharidas

KSB – kraujo-smegenų barjeras

MFG-E8 - pieno riebalų globuliniškas-EGF veiksnio 8 baltymas (angl. *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*)

MGnD – mikroglijos neurodegeneratyvinis fenotipas

MHC-I - didysis audinių suderinamumo kompleksas I (angl. *major histocompatibility complex I*)

MV - mikrovezikulės

MVB – multivezikuliniai kūneliai (angl. *multivesicular bodies*)

NF-κB – branduolio faktorius kapa B

NGVV – neurogliovaskulinis vienetas

NTA – nanodalelių sekimo analizė (angl. *nanoparticle tracking analysis*)

p – reikšmingumo lygmuo

PBS – fosfatinis buferinis druskų tirpalas (angl. *Phosphate Buffered Saline*)

PBST - fosfatinio buferinio tirpalo ir Tween-20 (0,18 %) tirpalas

RA – retinoinė rūgštis

RIPA – radioimunoprecipitacijos analizė

ROCK – Rho-kinazė (angl. *Rho-associated protein kinase*)

SDS – natrio dodecilsulfatas

SEL – smegenų endotelio ląstelės

STAT1 - signalus perduodantis ir transkripcija aktyvuojantis baltymas 1 (angl. *Signal Transducer And Activator Of Transcription 1*)

TEEV – transendotelinė elektrinė varža

TEMED – tetrametiletilendiaminas

TMEM119 – transmembraninis baltymas 119

TNFα - navikų nekrozės faktorius alfa (angl. *Tumor necrosis factor alpha*)

TSG101 - navikų jautrumo genas 101 (angl. *Tumor susceptibility gene 101*)

VV – veikimo vienetas

ZO – zonula okludinas

## IVADAS

Centrinės nervų sistemos (CNS) funkcionavimui užtikrinti reikalinga griežtai reguliuojama mikroaplinka. Kraujo-smegenų barjeras (KSB) kontroliuoja molekulinis mainus tarp smegenų parenchimos ir kraujotakos, bei užkerta kelią toksinų, patogenų, uždegiminių veiksnių patekimui į CNS. Tokiu būdu yra palaikoma homeostazė, būtina normaliam CNS funkcionavimui (Pivoriūnas and Verkhatsky, 2021). Įvairaus masto KSB sutrikimai lydi visas ūmines ir lėtines neurologines ligas. KSB funkcijos sutrikimas stebimas jau ikiklinikinėse kai kurių lėtinių neurodegeneracinių ligų stadijose, todėl gali būti traktuojamas, kaip ankstyvas patogenetinis šių ligų veiksnys (Sweeney *et al.*, 2019).

KSB yra daugiakomponentė struktūra, kurios pagrindą sudaro smegenų kraujagyslių endotelio ląstelės (SEL). SEL jungiančios glaudžiosios (GJ) ir adhezinės jungtys (AJ) efektyviai riboja polinių medžiagų difuziją į smegenų parenchimą. SEL, kartu su pericitais, astrocituais, neuronais ir mikroglija formuoja neurogliovaskulinį vienetą (NGVV) (Yu, Ji and Shao, 2020). Astrocitų, pericitų ir kitų supančių ląstelių sekretuojami parakrininiai veiksniai kontroliuoja KSB formavimąsi ir palaikymą bei AJ ir GJ jungčių susidarymą (Kadry, Noorani and Cucullo, 2020; Pivoriūnas and Verkhatsky, 2021).

Mikroglijos ląstelės yra CNS reziduojančios imunokompetentinės ląstelės. Fiziologinėmis „ramybės“ sąlygomis mikroglijos ląstelės savo išsišakojusiomis ataugomis nuolat „skanuoja“ tam tikrą smegenų parenchimos regioną. Uždegiminiai veiksniai ir (ar) CNS audinio pažeidimas aktyvuoja mikroglijos ląsteles, kurios eliminuoja žalingus veiksnius, taip pat kontroliuoja patį uždegimo procesą (Borst, Dumas and Prinz, 2021). Aktyvuotų mikroglijos ląstelių fenotipas ir funkcinės savybės labai varijuoja ir priklauso nuo aktyvuojančio faktoriaus, anatominio smegenų regiono ir kitų veiksnių (Paolicelli *et al.*, 2022).

Apie mikroglijos ir KSB sąveiką fiziologinėmis sąlygomis žinoma labai nedaug. Neseniai buvo parodyta, kad mikroglijos ląstelės gali tiesiogiai kontaktuoti su NGVV ląstelėmis ir lokaliai reguliuoti smegenų kraujotaką (Gullotta *et al.*, 2023). Tačiau šiuo metu nėra žinoma, kaip fiziologinėmis sąlygomis mikroglijos sekretuojami parakrininiai veiksniai veikia NGVV komponentus ir KSB barjerines savybes. Kita vertus, įvairių patologijų metu aktyvuota mikroglija sekretuoja uždegiminius citokinus ir chemokinus, kurie didina KSB pralaidumą (Mayer and Fischer, 2024).

Atsižvelgus į tai buvo iškeltas baigiamojo magistrinio darbo tikslas: palyginti ramybės ir uždegiminės mikroglijos sekretuojamų parakrininių veiksnių poveikį smegenų kraujagyslių endotelio ląstelių barjerinėms savybėms.

Tikslui pasiekti buvo suformuluoti šie uždaviniai:

1. Žmogaus indukuotas pluripotentes ląsteles (iPKL) diferencijuoti į SEL, jas charakterizuoti ir panaudoti KSB *in vitro* modeliavimui;
2. Įvertinti mikroglijos sekretuojamų parakrinių veiksnių poveikį SEL monosluoksniu barjerinėms savybėms fiziologinėmis sąlygomis;
3. Ištirti uždegiminės mikroglijos sekretuojamų parakrinių veiksnių poveikį SEL monosluoksniu barjerinėms savybėms.

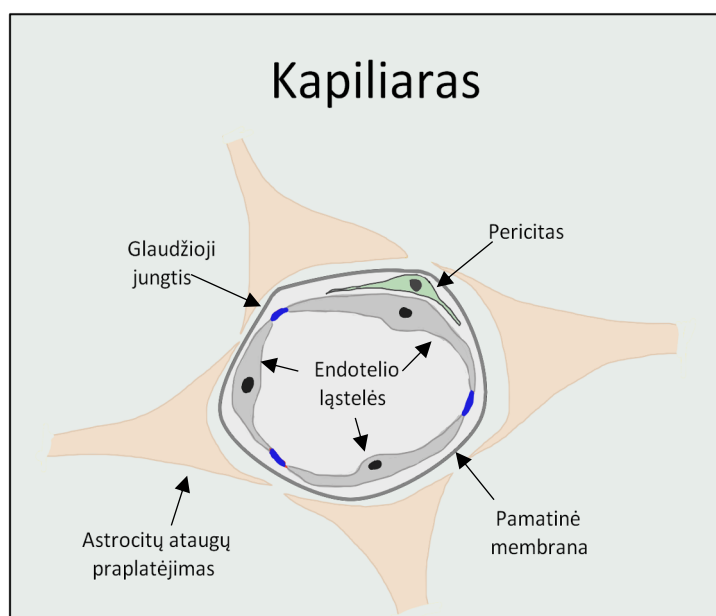


# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Kraujo-smegenų barjeras

Normaliam CNS funkcionavimui palaikyti reikalinga griežtai kontroliuojama mikroaplinka. Dėl šios priežasties egzistuoja biologinių barjerų sistema. Žinduoliuose skiriami kraujo-smegenų (KSB), kraujo-smegenų skysčio ir voratinklinio dangalo (angl. *arachnoid*) barjerai. Šie barjerai lokalizuoti skirtingose CNS vietose ir, nors skiriasi savo kompozicija, jų veikimo principas yra panašus: glaudžiai išsidėstę ląsteliniai ir neląsteliniai komponentai veikia kaip selektyviai pralaidus filtras, apribojantis molekulių pernašą ir užkertantis kelią nereikalingų medžiagų bei patogenų patekimui į parenchimą (Pivoriūnas and Verkhatsky, 2021).

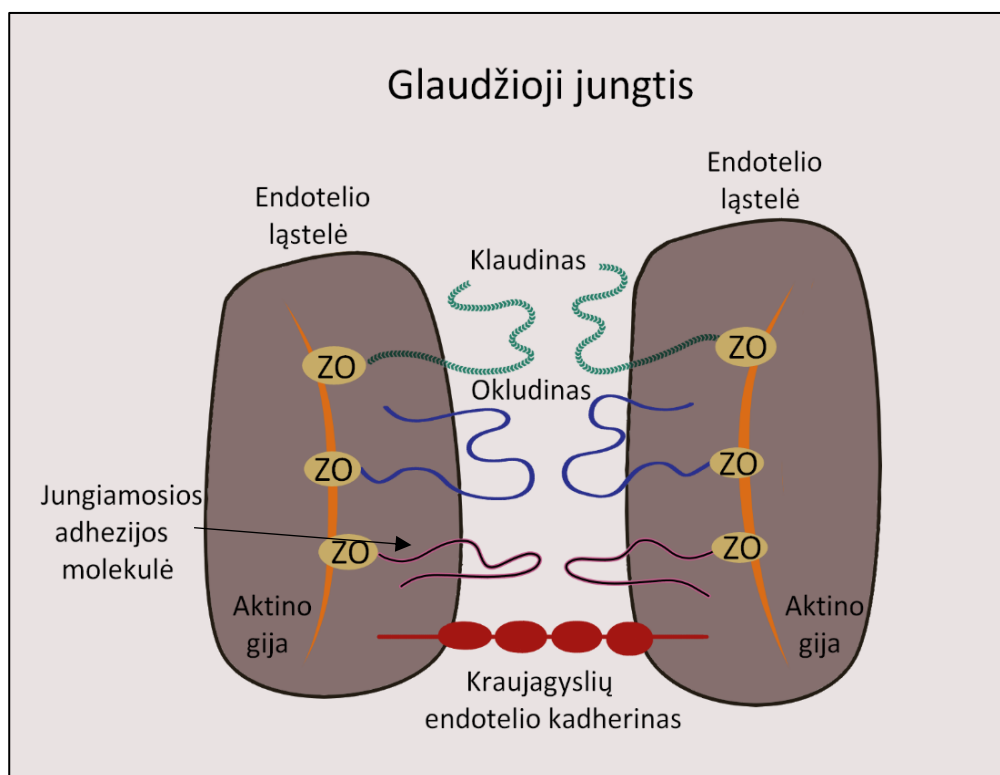
KSB formuoja specializuotą kraujagyslių tinklas, kurio paviršiaus plotas pas žmogų siekia maždaug 15-25 m<sup>2</sup> (Wong *et al.*, 2013). Jis riboja medžiagų apykaitą tarp parenchimos ir kraujo, taip palaikydamas CNS homeostazę (Kadry, Noorani and Cucullo, 2020). Esminė KSB anatominė ir funkcinė struktūra yra neurogliovaskulinis vienetas (NGVV), jį formuoja įvairių tipų ląstelės ir



1.1.-1 pav. Kapiliarų NGVV komponentai.

užląstelinis užpildas. NGVV kompozicija priklauso nuo kraujagyslių tipo, tačiau pagrindinės sudedamosios dalys yra smegenų endotelio ląstelės (SEL), pericitai, kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelės (KLRL), astrocitai, neuronai ir pamatinė membrana. Šie komponentai yra išsidėstę sluoksniais eilės tvarka (1.1.-1 pav.). Pačiame centre yra išsidėsčiusios SEL, kurios formuoja kraujagyslių vamzdelį. Kapiliaruose virš jų išsidėsto pericitai, o stambesnėse kraujagyslėse – kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelės. Iš išorės šią struktūrą gaubia astrocitai. SEL ir astrocitu sekretuojami veiksniai formuoja endotelio ir parenchiminę pamatines membranas (Yu, Ji and Shao, 2020; Pivoriūnas and Verkhatsky, 2021).

SEL savo morfologija, struktūra ir funkcijomis skiriasi nuo periferinių kraujagyslių endotelio. SEL pasižymi suplota forma (kapiliaruose skersmuo siekia 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  (Cornford *et al.*, 1998)), lygiu paviršiumi ir dideliu mitochondrijų skaičiumi (Doll *et al.*, 2015). Taip pat SEL demonstruoja didesnę glaudžiųjų (GJ) ir adhezinių jungčių (AJ) raišką su audiniui specifiniais baltymais (Vorbrodt and Dobrogowska, 2004), neturi kraujagyslėms būdingų fenestrų (Risau, 1998), pasižymi žemu pinocitiniu aktyvumu bei didesne aktyvios pernašos mechanizmų raiška (Stamatovic, Keep and Andjelkovic, 2008). Šių savybių visuma nulemia selektyvią medžiagų pernašą į smegenų parenchimą. GJ ir AJ formuojasi tarp endotelio ląstelių ir riboja tarpląstelinę molekulių pernašą. GJ formuoja fizinį barjerą, kuris filtruoja difunduojančias molekules pagal jų dydį (Vorbrodt and Dobrogowska, 2004). GJ sudarytos iš citoplazminių (*zonula occludens* arba ZO baltymų) ir membraninių (okludino, kludino, jungiamosios adhezijos molekulės (angl. *junctional adhesion molecule*) baltymų kompleksų (Kadry, Noorani and Cucullo, 2020) (1.1.-2 pav.). Kludinas ir okludinas yra svarbūs KSB pralaidumui. Išveiklinus abu šiuos baltymus arba vien tik kludiną-5, nustatytas padidėjęs KSB pralaidumas didesnėms molekulėms (Nitta *et al.*, 2003; Keaney and Campbell, 2015). Išveiklinus tik okludiną pokyčiai nepastebėti (Saitou *et al.*, 2000) ir tai galėtų reikšti, kad kiti GJ komponentai kompensuoja šio baltymo trūkumą. Jungiamosios adhezijos



**1.1.-2 pav.** Tarp SEL susiformuojančių glaudžiųjų jungčių molekulinė sandara.

molekulės yra svarbios leukocitų migracijai, o ZO baltymas suriša visus GJ sudarančius baltymus į GJ kompleksus ir juos sujungia su citoplazmos skeleto baltymais (Stamatovic, Keep and

Andjelkovic, 2008). AJ membraninių baltymų kompleksams priskiriami kraujagyslių endotelio kadherinas, užtikrinantis KSB sandarumą, ir nervinis kadherinas, kuriuo SEL sąveikauja su pericitais. KSB transląstelinė molekulių pernaša, t.y., pernaša per ląstelę, kertant plazminę membraną, yra reguliuojama pačių SEL (Vorbrot and Dobrogowska, 2004). Mažos (< 400 Da) lipofilinės molekulės, tokios kaip etilo alkoholis, laisvai pereina SEL ir patenka į smegenų parenchimą bei išeina iš jos (Pardridge, 2012). Kitų medžiagų apykaitą reguliuoja endotelinių ląstelių transporto sistema. Į smegenis molekulės patenka per specialius nešiklius, receptorius bei jonų siurblius, o atgal į kraują iš parenchimos medžiagos pašalinamos ATP siurbliais (Daneman and Prat, 2015; Kadry, Noorani and Cucullo, 2020).

Pericitai ir KLRL yra perivaskulinio tipo ląstelės (Sweeney and Foldes, 2018). Kaip minėta, pericitai dengia kapiliarus, o KLRL – arterijas, arterioles, venas ir venules (Pivoriūnas and Verkhatsky, 2021). Pericitai yra randami viso kūno smulkiosiose kraujagyslėse, bet CNS kapiliarų padengimas pericitais yra didžiausias (Mathiisen *et al.*, 2010). Jie turi ilgas ataugas, siekiančias iki 80 μm ir tai lemia, kad vienas pericitas gali dengti kelias endotelines ląsteles vienu metu, tačiau padengtumas nėra vientisas – pericitai dengia tik dalį kapiliarą formuojančių endotelio ląstelių (Berthiaume *et al.*, 2018). Pericitų gebėjimas susitraukti/atsipalaiduoti, manoma, yra svarbus kraujo tėkmės reguliacijai, kuri priklauso nuo neuronų energetinių poreikių (Peppiatt *et al.*, 2006). Arterijose ir venose KLRL išsidėstymas skiriasi. Arterijose KLRL sudaro vientisą verpstės formos sluoksnį, gaubiantį endotelio ląsteles ir beveik neturintį ataugų. Venose KLRL nėra taip tankiai išsidėsčiusios turi daug plonų ataugų, lyginant su arterijomis (Armulik, Genové and Betsholtz, 2011). Tarp SEL ir perivaskulinių ląstelių yra įsiterpusi pamatinė membrana, tačiau ląstelės gali sąveikauti tarpusavyje per membranoje esančias poras (Sweeney and Foldes, 2018). Smegenų perivaskulinės ląstelės gali būti mezoderminės ir neuroektoderminės kilmės (Girolamo *et al.*, 2021). Dėl šios priežasties skiriasi ir jų funkcinės savybės. Pericitai ir KLRL yra būtinos efektyviam GJ formavimuisi ir padeda reguliuoti transląstelinius medžiagų srautus (Holmgren *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2018).

Astroцитai yra neuroektoderminės kilmės ląstelės, palaikančios CNS homeostazę. Iš visų glijos ląstelių astroцитų skaičius ir morfologinė įvairovė yra didžiausia, tačiau nepriklausomai nuo to, atliekamos funkcijos išlieka panašios (Zhou, Zuo and Jiang, 2019). Astroцитai reguliuoja sinapsių skaičių (Chung, Allen and Eroglu, 2015), kalcio koncentraciją už ląstelės ribų, jonų ir neuromediatorių apykaitą, maistinių medžiagų tiekimą neuronams bei CNS imuninius procesus (Gee and Keller, 2005). Be to, astroцитai yra svarbus struktūrinis-funkcinis NGVV komponentas. Astroцитų ataugų praplatėjimai (angl. *endfeet*) dengia apie 99 procentus kraujagyslių paviršiaus (Mathiisen *et al.*, 2010), tačiau su SEL tiesiogiai nekontaktuoja dėl jas skiriančios pamatinės membranos (Xu, Nirwane and Yao, 2019). Su SEL astroцитai sąveikauja parakrininiu būdu, sekretuodami augimo

veiksnius, morfogenus, citokinus bei ekstraląstelines vezikules (EV) (Spampinato *et al.*, 2019).

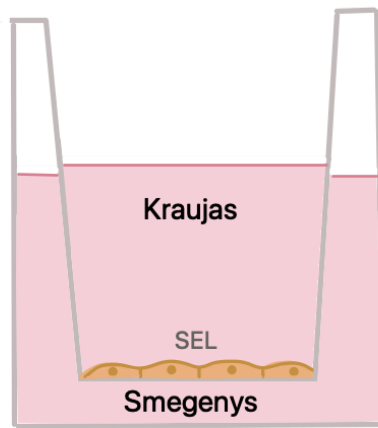
Pagrindiniai užląstelinio užpildo komponentai yra SEL formuojama endotelio pamatinė membrana ir astrocitų formuojama parenchiminė pamatinė membrana. Šios membranos susidaro tarp SEL ir astrocitų ataugų praplatėjimų (Pivoriūnas and Verkhatsky, 2021). Pamatinės membranos skiriasi savo kompozicija: endotelio pamatinė membrana yra sudaryta iš fibronektino, kolageno-IV, perlekano, laminino-411, laminino-421 ir laminino-511, o parenchiminę pamatinę membraną sudaro fibronektinas, agrinas, lamininas-111 ir lamininas-211. Pamatinės membranos veikia kaip atraminės NGVV struktūros, užtikrinančios glaudžius ryšius tarp ląstelių ir kaip papildomas barjerinis sluoksnis, užkertantis kelią nereikalingų molekulių patekimui į parenchimą (Xu, Nirwane and Yao, 2019).

Kadangi CNS neturi energijos rezervuarų, griežta kraujotakos reguliacija yra būtina normaliam neuronų funkcionavimui. Neuronai sekretuoja vazoaktyvius veiksmus (acetilcholiną, gama amino sviesto rūgštį, azoto oksidą, dopaminą ir kt.), kurie gali tiesiogiai reguliuoti kraujagyslių skersmenį). Be to, neuronai gali netiesiogiai, per specifinius taikinius, kontroliuoti KSB pernašą, užtikrindami efektyvų reikalingų maisto medžiagų ar aminorūgščių patekimą į CNS (Lok *et al.*, 2007).

NGVV komponentų visuma nulemia KSB funkcijas ir tiriant kiekvieno iš šių sandaros elementų sutrikimus, galima analizuoti jų poveikį KSB savybėms bei įtaką specifiniams sutrikimams.

## 1.2. Kraujo-smegenų barjero modeliavimas *in vitro*

KSB modeliavimas *in vitro* padeda geriau suprasti NGVV komponentų tarpusavio sąveiką ir yra labai svarbus vystant taikomuosius vaistų pernašos tyrimus (Wu *et al.*, 2023). Kuriant KSB modelius *in vitro*, yra svarbu pasiekti kuo didesnę jų panašumą į gyvų sistemų KSB. Kaip jau minėta, viena svarbiausių funkcinių KSB savybių yra mažas pralaidumas daugumai molekulių. Šią KSB savybę geriausiai atspindi transendotelinė elektrinė varža (TEEV), kurią užtikrina SEL ląstelių GJ ir AJ. TEEV atsiranda dėl endotelio ląstelių sluoksnio pasipriešinimo jonų srautui: kuo aukštesnė elektrinė varža, tuo sandaresnis ląstelių sluoksnis, o didelis šio sluoksnio pralaidumas lemia žemas TEEV reikšmes (Benson, Cramer and Galla, 2013). TEEV gali būti išmatuota palaiptinai, formuojantis SEL monosluoksniui ir jo nepažeidžiant, dėl to šis tyrimas yra vienas dažniausiai naudojamų, norint įvertinti sukurto KSB modelio kokybę. TEEV yra matuojamas kultivuojant endotelio ląsteles ant specialių *Transwell* įdėklų su pusiau pralaidžia membrana. Tokie įdėklai patalpinami į šulinėlius, kur ant membranos paviršiaus terpėje yra užsėjamos endotelio ląstelės, o šulinėlis po įdėklu yra papildomas ta pačia terpe, tik be ląstelių (1.2-1 pav.). Taip yra imituojamos fiziologinės KSB sąlygos: skyrius virš membranos su ląstelėmis yra luminalinė ertmė (kraujagyslių spindis), o terpė po įdėklu – abluminalinė KSB pusė (smegenų ertmė). Abiejuose skyriuose



**1.2.-1 pav.** KSB modelis, sukurtas naudojant *Transwell* įdėklą. Įdėklo vidinė pusė imituoja kapiliaro spindį, o ertmė po įdėklu - smegenų parenchimos aplinką.

patalpinant po elektroda, perduodantį srovę ir matuojantį įtampą, varža apskaičiuojama pagal Omo dėsnį (Raut *et al.*, 2021):

$$R = U/I;$$

čia  $R$  = varža [ $\Omega$ ],  $U$  – įtampa [V],  $I$  – srovės stipris [A].

Lippmann *et al.* indukuotų pluripotentinių kamieninių ląstelių (iPKL) pagrindu sukurto KSB modelio TEEV siekė  $\sim 850 \Omega \times \text{cm}^2$  (Lippmann *et al.*, 2012). Tobulinant šį protokolą, diferenciacijos metu iPKL ląstelės buvo paveiktos retinoine rūgštimi (RA) (Lippmann *et al.*, 2014). Toks pakeitimas pakėlė KSB modelio TEEV iki  $\sim 3000 \Omega \times \text{cm}^2$ . Nors modelis ir buvo akivaizdžiai patobulintas, vis dar išliko tam tikri trūkumai. Pavyzdžiui, didžiausia pasiekama TEEV vertė išliko maždaug perpus žemesnė nei rezultatai gaunami *in vivo* modeliuose ( $\sim 8000 \Omega \times \text{cm}^2$ ) (Erickson, Wilson and Banks, 2020). Šios problemos sprendimui 2019 metais Neal *et al.* aprašė diferenciacijos protokolą, kuriame nėra naudojamas serumas (Neal *et al.*, 2019). Serumai, dėl kintančios ir aiškiai neapibrėžtos savo sudėties, galėjo lemti tai, kad *in vitro* modeliai neišlaiko vienodų savybių, atliekant skirtingus eksperimentus. Nenaudojant serumo diferenciacijos metu, SEL monokultūrų TEEV gali pasiekti iki  $8000 \Omega \times \text{cm}^2$  reikšmes, kurios mažai kito tarp skirtingų eksperimentų, naudojant įvairias iPKL linijas. Be monokultūrinių SEL modelių buvo kuriami ir kombinuotų kultūrų modeliai, kuriuose iš iPKL diferencijuotos SEL sąveikauja su kitais NGVV ląstelių tipais (Appelt-Menzel *et al.*, 2017; Canfield *et al.*, 2017). Šie modeliai taip pat kuriami naudojant *Transwell* įdėklus, bet šiuo atveju abluminaliname skyriuje (šulinėlyje po įdėklu su SEL) yra kultivuojamos astrocitų, pericitų ar neuronų kultūros. Per porėtą membraną šios ląstelės sąveikauja su SEL, išskiria parakrininius veiksnius. Nustatyta, kad kombinuotų ląstelių kultūrų modeliai ne tik pagerina barjerines KSB savybes, bet ir lemia lėtesnį šių savybių praradimą. gali demonstruoti didesnes TEEV reikšmes

(> 6000  $\Omega \times \text{cm}^2$ ), tačiau tarp tokio tipo modelių galimas ir didesnis variabilumas (Delsing *et al.*, 2020).

Naujausi aprašyti KSB modeliai pasitelkia mikroskysčių metodus, dar kitaip vadinamus tridimensiniais arba 3D modeliais. Šie modeliai siekia tiksliau atkartoti kraujagyslių morfologiją, veikdami ląsteles hidrostatiiniu slėgiu (Herland *et al.*, 2016). Hidrostatinis slėgis yra sukeltas kraujo tėkmės pro KSB formuojančias kraujagysles, jis priklauso nuo kraujagyslės skersmens, skysčio klampumo ir tėkmės greičio. Šių modelių bazę sudaro atraminis matriksas, ant kurio išsidėsčiusios SEL gali augti 3D konformacijoje, formuojant vamzdelį (Delsing *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2022). Astrocitai, pericitai gali būti kultivuojami tiesioginiame kontakte su SEL, taip atkartojant natūraliai egzistuojančias sąveikas. Tuomet, pasitelkus mikroskysčių technologiją, galima imituoti kraujo tėkmę ir kartu su ja – hidrostatinį slėgį (Wasielewska *et al.*, 2020). Šis metodas buvo sėkmingai panaudotas modeliuojant Alzheimerio ligos (AL) KSB (Shin *et al.*, 2019).

Taigi, nors su kiekvienais metais KSB modelių protokolai tobulėja ir tampa vis sudėtingesni, dėl kainos, paprastumo ir lengvo pritaikymo skirtingiems tyrimams, originalus Lippmann'o protokolas ir jį sekę patobulinimai, vis dar išlieka plačiausiai naudojamu metodu kuriant KSB modelius *in vitro*.

### 1.3. Mikroglia

Mikroglia yra imunokompetentinės ląstelės, sudarančios maždaug 5 - 12 % visų smegenų ląstelių populiacijos (Malm, Jay and Landreth, 2015). Mikroglia aptinkama visoje CNS, tačiau populiacijos nėra tolygiai pasiskirsčiusios - gausiausiai mikroglia randama didžiųjų smegenų (angl., *telencephalon*) regionuose, o rečiausias pasiskirstymas rombinėse smegenyse (angl., *rhombencephalon*) (Lawson *et al.*, 1990). Ilgą laiką buvo diskutuojama dėl mikroglijos kilmės. Pradžioje buvo manoma, kad šios ląstelės yra kilusios iš mezodermos, vėliau buvo siūlyta ektoderminės kilmės hipotezė. Galiausiai 1999 metais nustatyta, kad mikroglia gali būti aptinkama pelių smegenyse jau aštuntą embriogenezės dieną (E8) (Alliot, Godin and Pessac, 1999). Šiuo metu manoma, kad mikroglia yra kilusi iš makrofagų, susiformavusių trynio maiše ankstyvosios hematopoezės metu (Paolicelli *et al.*, 2022). Mikroglijos pirmtakai į besiformuojančias žmogaus smegenis migruoja maždaug 4.5-5.5 nėštumo savaitę (Andjelkovic *et al.*, 1998).

Mikroglia yra vienas dinamiškiausių ląstelių tipų sveikose suaugusio žmogaus smegenyse. Šios ląstelės pasižymi labai skirtinga morfologija ir atliekamomis funkcijomis. Išskirtinis mikroglijos požymis yra gebėjimas atsinaujinti, t.y., mikroglia gali atstatyti ženkliai sumažėjusią savo CNS populiaciją per maždaug 1 savaitę. Toks populiacijos atsinaujinimas yra endogeninis ir nereikalauja išorinių resursų kaip kamieninės ląstelės ar iš kaulų čiulpų gaunamos mieloidinės ląstelės (Bruttger

*et al.*, 2015). Anksčiau manyta, kad mikroglija gali būti skirstoma į „ramybės“ būsenos ir „aktyvuotą“ mikrogliją, tačiau su laiku išaiškėjo, kad toks skirstymas nėra tikslus – mikroglija yra nuolatos aktyvi, bet priklausomai nuo esamų fiziologinių sąlygų keičia savo būseną ir skirtingai reaguoja į CNS mikroaplinkos pasikeitimus (Paolicelli *et al.*, 2022). Mikroglija turi daug paviršiaus receptorių, kurie lemia šių ląstelių jautrumą aplinkos pokyčiams (Cai *et al.*, 2022). Suaugusio sveiko žmogaus mikroglijos ląstelių savybės daugiausiai priklauso nuo jų lokalizacijos ir šalia išsidėsčiusių kitų ląstelių (Bachiller *et al.*, 2018). Mikroglijos ląstelių ataugos nuolatos juda ir tikrina aplinką. Įvykus CNS pažeidimams, mikroglija pereina į reaktyvią būseną, kuri gali būti labai įvairi, priklausomai nuo pažeidimo tipo, lokacijos ir daug kitų kintamųjų (Paolicelli *et al.*, 2022).

Mikrogliai yra būdinga specifinių genų raiška. Tačiau vieno žymens raiška dar neleidžia tiksliai identifikuoti mikroglijos, dėl didelės šio ląstelių tipo būsenų įvairovės. Nepaisant to, pagrindiniais mikroglijos žymenimis laikomas PU.1 transkripcijos veiksnys, jonizuota kalcij prijungianti adaptoriaus molekulė 1 (IBA1), purinerginis receptorių P2YR12, transmembraninis baltymas 119 (TMEM119) ir kolonijas stimuliuojančio veiksnio receptorių (CSF1R) (Paolicelli *et al.*, 2022). Nauji genų raiškos analizės metodai parodė, kad mikroglija gali demonstruoti būsenas, siejamas su tam tikromis specifinėmis patologijomis. Pavyzdžiui, su liga siejama mikroglijos būseną (DAM) ir mikroglijos neurodegeneratyvinis fenotipas (MGnD) aptinkami AL modeliuose (Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017).

Mikroglijos funkcijos apima neuronų, glijos ląstelių formavimosi procesus, fagocitozę, įvairių tirpiųjų veiksnių sekretavimą (Prinz *et al.*, 2021). Mikroglijos svarbą CNS demonstruoja tyrimai su pacientais, turinčiais CSF1R mutaciją. Heterozigotinės mutacijos siejamos su mikroglijos populiacijos sumažėjimu bei baltosios medžiagos atrofija. Tai lemia progresuojančius kognityvinius ir judesio sutrikimus, demensiją ir ankstyvą mirtį (Chitu, Gökhan and Stanley, 2022). Abiejų alelių mutacijos lemia visišką mikroglijos neturėjimą, smegenų vystymosi sutrikimus, hidrocefaliją ir ankstyvą mirtį (Guo *et al.*, 2019).

Angiogenezės metu mikroglijos pirmtakai atlieka svarbias funkcijas formuojantis kraujagyslių tinklui: nustatyta, kad PU.1 raiškos nedemonstruojančių pelių užpakalinėse smegenyse perinataliniu laikotarpiu ženkliai sumažėjo kraujagyslių išsišakojimų (Fantin *et al.*, 2010). Suaugusiose smegenyse mikroglijos ląstelės gali būti išskiriamos į su kapiliarais asocijuojamą mikrogliją (CAM) (Bisht *et al.*, 2021). CAM populiacijos yra sukongcentruotos ant kapiliarų ir sudaro maždaug trečdalį visų mikroglijos ląstelių populiacijos. Fiziologinėmis sąlygomis šis mikroglijos tipas gali reguliuoti smegenų kraujotaką kontaktuodamas su kitais NGVV elementais ir skatindamas kraujagyslių susitraukimą (Császár *et al.*, 2022).

Neurodegeneracinių ligų metu mikroglija gali atlikti dvejopą vaidmenį. Reaguodama į pažeidimą

ir vykdydama fagocitozę ji gali padėti išvalyti neuronų nuolaužas, bet kartu gali sekretuoti molekules, kurios skatina ligos progresavimą, inicijuodamos neurowždegiminius procesus (Cai *et al.*, 2022). Nustatyta, kad esant sisteminiui uždegimui, mikroglia migruoja link KSB ir iš pradžių atlieka apsaugines funkcijas, tačiau ilgainiui įgauna reaktyvų fenotipą ir pradeda vykdyti KSB komponentų fagocitozę. Taip pažeidžiamos barjerinės funkcijos ir vyksta nekontroliuojamas medžiagų patekimas į CNS parenchimą, sukeliantis neurowždegimą (Haruwaka *et al.*, 2019). Manoma, kad aktyvuotos mikroglijos poveikis KSB vyksta per uždegiminių veiksnių poveikį SEL GJ baltymų raiškai. Nustatyta, kad mikroglijos sekretuojami uždegiminiai citokinai, navikų nekrozės faktorius alfa (TNF $\alpha$ ) ir interleukinas 1 beta (IL-1 $\beta$ ), sutrikdo KSB vientisumą, ką pažymi okludino, kladino-5 ir zonula okludinas-1 (ZO-1) raiškos susilpnėjimas (Mayer and Fischer, 2024). Be to, iširta, kad SEL paveikus IL-1 $\beta$  ir vėliau kultivuojant šių ląstelių kokultūras su mikroglia, stebima padidėjusi uždegiminių genų raiška mikroglijos ląstelėse. Toks IL-1 $\beta$  poveikis nebuvo stebimas paveikus izoliuotas mikroglijos kultūras (Krasnow *et al.*, 2017). Tai parodo, kad tarp SEL ir mikroglijos gali vykti abipusė komunikacija, kurios metu sustiprinamas uždegiminis atsakas.

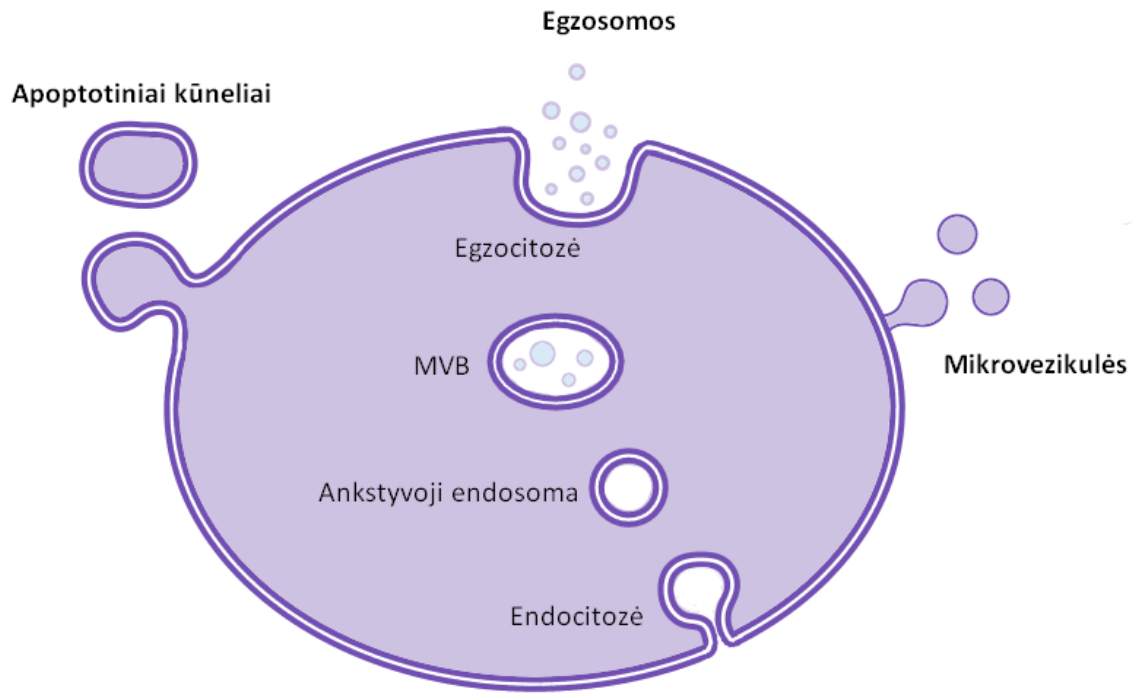
Svarbu plačiau iširti, kokie mechanizmai lemia balansą tarp apsauginių ir uždegimą skatinančių mikroglijos funkcijų. Tai suteiktų daugiau informacijos apie jos poveikį KSB savybėms bei galimą rolę neurodegeneracinių ligų metu.

#### 1.4. Ekstraląstelinės vezikulės

Ekstraląstelinės vezikulės (EV) – tai visų ląstelių tipų sekretuojamos mažos (< 5  $\mu$ m skersmens), apvalios formos pūslelės, apgaubtos fosfolipidų dvisluoksnio, primenančio plazminę membraną. Ląstelės sekretuoja EV į užląstelinę ertmę, kur vezikulės gali laisvai judėti ir sąveikauti su kitomis ląstelėmis, pernešdamos bioaktyvias medžiagas (El Andaloussi *et al.*, 2013). Dėl lipofilinės sudėties ir nedidelio dydžio, EV gali lengvai pereiti KSB. Ant EV membranos yra išsidėstę įvairūs receptoriai, signaliniai baltymai, sukibimo molekulės, o citozolyje gali būti pernešami įvairūs baltymai, RNR, augimo veiksniai. Pagal dydį, susidarymo mechanizmą, ir žymenų raišką EV skirstomos į tris grupes: egzosomas, mikrovezikules (MV) ir apoptotinius kūnelius (Akers *et al.*, 2013) (1.4.-1 pav.).

Egzosomos yra mažiausios (10-200 nm skersmens) EV (Gurung *et al.*, 2021). Jos formuojasi per endosominį kelią, iš pradžių susidarant ankstyvosioms endosomoms, kurios ilgainiui subręsta į multivezikulinius kūnelius (MVB) (Isola and Chen, 2017). Multivezikulinių kūnelių viduje kaupiasi intraluminalinės pūslelės (angl. *intraluminal vesicles*, ILV). Šios pūslelės yra išleidžiamos į užląstelinę ertmę, MVB susiliejus su ląstelės membrana egzocitozės metu. Prie ankstyvosios endosomos susidarymo ir užpildymo proceso gali prisideda ir Goldžio kompleksas bei endoplazminis





**1.4.-1 pav.** Skirtingų tipų EV biogenezės ir sekrecijos mechanizmų schema.

tinklas (Gurung *et al.*, 2021).

Mikrovezikulės yra 100-1000 nm skersmens, nereguliarios formos EV (Gurung *et al.*, 2021). Savo dydžiu iš dalies persidengia su egzozomomis, dėl to pagrindinis skirtumas tarp šių dviejų vezikulinių komponentų yra jų biogenezė (Akers *et al.*, 2013). Mikrovezikulės susidaro pumpuravimosi būdu, kuomet pūslelės tiesiogiai atsiskiria nuo ląstelės, plazminei membranai išlinkus į išorę (Isola and Chen, 2017; Gurung *et al.*, 2021).

Apoptotinių kūnelių skersmuo siekia virš 1000-5000 nm. Šios pūslelės itin heterogeniškos, kadangi susidaro ląstelei žūstant apoptozės būdu. Ląstelei apoptuojant, visas jos turinys fragmentuojasi, todėl apoptotiniuose kūneliuose gali būti aptinkami bet kokie šiai ląstelei būdingi komponentai, kaip įvairios organelės, DNR ar baltymai. Šie kūneliai užląstelinėje ertmėje atpažįstami makrofagocitų ir yra fagocituojami, siekiant išvengti uždegiminio atsako (Gurung *et al.*, 2021; Phan *et al.*, 2021).

EV yra svarbios KSB reguliacijoje. Pūslelės gali paveikti barjero vientisumą, pralaidumą ir jo funkcijas tiek fiziologinėmis, tiek patologinėmis sąlygomis (Hosseinkhani *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024). Skirtingų ląstelių tipų sekretuojamos EV perneša bioaktyvias molekules, kurios, per sąveikas su SEL ir aplinkinėmis ląstelėmis, gali paveikti KSB savybes. Taip pat, EV dalyvauja komunikacijoje tarp CNS ir periferinės kraujotakos, tokiu būdu reguliuodamos smegenų homeostazę ir atsaką į sisteminius stimulus (Saint-Pol *et al.*, 2020).

Mikroglijos sekretuojamos EV kol kas yra mažai ištirtos, tačiau yra pademonstruota jų reikšmė AL progresavime. Pavyzdžiui, atrasta, kad MGnD būsenos mikroglija sekretuoja ypač didelius EV kiekius, reaguojant į amiloidų ir tau patologijas (Clayton *et al.*, 2021). Šios EV perneša p-tau, kas galimai lemia beta-amiloidų kaupimąsi ir tolimesnį AL progresavimą. AL ir išsėtinės sklerozės pacientų smegenų skystyje taip pat rastas padidėjęs mikroglijos sekretuojamų mikrovezikulių skaičius. Pacientams skyrus FTY720, vaistų naudojamą išsėtinės sklerozės terapijoje, mikrovezikulių kiekis smegenų skystyje sumažėjo (Verderio *et al.*, 2012). Mikroglijos sekretuojamų EV poveikis KSB kol kas nėra ištirtas, bet žinant mikroglijos svarbą CNS vystymosi metu ir jos rolę tiek KSB homeostazės palaikymo, tiek barjerinių struktūrų pažaidos procesuose (Aires *et al.*, 2021; D’Anca *et al.*, 2021), galima manyti, kad EV potencialiai yra vienas iš mikroglijos mechanizmų sąveikai su KSB.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos ir aparatūra

#### 2.1.1. Ląstelės

- Indukuotų žmogaus pluripotentinių kamieninių ląstelių linija MBE 2960, dovanota prof. dr. Alice Pebay (Melburno universitetas, Australija);
- Imortalizuota žmogaus mikroglijos ląstelių linija (SV40), piršta iš „ABM“;
- Indukuotų žmogaus pluripotentinių kamieninių ląstelių linija BIONi010-C-4, piršta iš Europos indukuotų pluripotentinių kamieninių ląstelių banko.

#### 2.1.2. Medžiagos

##### Priemonės ląstelių kultivavimui:

- 5, 10 ml serologinės pipetės („GenFollower Biotech“);
- 6, 24 šulinėlių lėkštelės („TPP“);
- 10, 200, 1000 µl antgaliai („Scientific Specialties“);
- 24 šulinėlių lėkštelės įdėklai („Sarstedt“);
- 25, 75, 150 cm<sup>2</sup> flakonai („TPP“);
- 35 mm skersmens Petri lėkštelės („VWR International“);
- Akutazė („Capricorn Scientific“);
- B27 papildas („Thermo Fisher Scientific“);
- Beseruminė žmogaus endotelio ląstelių terpė (hESFM) („Thermo Fisher Scientific“);
- Centrifuginiai mėgintuvėliai 15 ir 50 ml („Th. Geyer“);
- Dulbecc'o modifikuota Eagle ląstelių mitybinė terpė (DMEM), papildyta GlutaMAX („Thermo Fisher Scientific“);
- DMEM/F12 terpė („Thermo Fisher Scientific“);
- Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) 0,5 M („Thermo Fisher Scientific“);
- Essential 6 terpė („Thermo Fisher Scientific“);
- Essential 8 terpė („Thermo Fisher Scientific“);
- Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) („Santa Cruz Biotechnology“);
- Y27632 („Merck Group“);
- Ląstelių skaičiavimo kameros („VWR International“);
- Matrigelis („Corning“);
- Pelės uodegos kolagenas-I („Thermo Fisher Scientific“);
- Penicilinas-streptomicinas („Thermo Fisher Scientific“);
- Retinoinė rūgštis („Merck Group“);

- Tripsinas-EDTA 0,25 % („Thermo Fisher Scientific“);
- Veršelio embriono serumas („Thermo Fisher Scientific“);
- Žmogaus placentos kolagenas-IV („Merck Group“);
- Žmogaus plazmos fibronektinas („Merck Group“).

Priemonės analizei:

- 12 mm skersmens dengiamieji stikliukai („Paul Marienfeld“);
- 40 % akrilamido/Bis tirpalas („Bio-Rad Laboratories“);
- Acetonas („Labochema“);
- Amonio persulfatas („Bio-Rad Laboratories“);
- Ependorfiniai mėgintuvėliai („Th. Geyer“);
- Etanolis („Gintarinė vaistinė“);
- Filtrai; 0,1 μm („TPP“);
- Imunobloto ryškinimo substratas („Bio-Rad Laboratories“);
- Jaučio serumo albuminas, pH 7,0 („Merck Group“);
- Laštelių lizės buferis („Thermo Fisher Scientific“);
- Metanolis („Merck Group“);
- Montavimo terpė su 4',6-diamidino-2-fenilindolu (DAPI) („Abcam“);
- Natrio dodecilsulfatas („AppliChem“);
- Objektiniai stikliukai („Gerhard Menzel“);
- Parafilm plėvelė („Pechiney“);
- Pernešimo buferis („Bio-Rad Laboratories“);
- Pierce™ bicinchoninės rūgšties (BCA) baltymų koncentracijos nustatymo rinkinys („Thermo Fisher Scientific“);
- Pincetas („Carl Roth“);
- Polivinildenfluorido membranos („Bio-Rad Laboratories“);
- Proteazių ir fosfatazių inhibitorių koktelis („Thermo Fisher Scientific“);
- Radioimunoprecipitacijos analizės (RIPA) buferis
- Skalpelis („Carl Roth“);
- Storas (2,5 mm) filtrinis popierius („Thermo Fisher Scientific“);
- Tetrametiletildiaminas („Bio-Rad Laboratories“);
- Tris-HCl („Bio-Rad Laboratories“);
- Tween-20 („Santa Cruz Biotechnology“).

### 2.1.3. Prietaisai

- Baltymų pernašos ant membranos prietaisai Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories);
- Centrifuga (Merck Group);
- Elektroforezės aparatas Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories);
- Imunobloto vaizdinimo aparatas Chemi-Doc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories);
- Inkubatorius (Binder);
- Konfokalinis mikroskopas Leica TCS SP8 (Leica Microsystems);
- Laminarinė traukos spinta MSC advantage 1.8 (Thermo Fisher Scientific);
- Mini centrifuga/Vortex purtyklė FVL2400N (Novolab);
- Nanodalelių analizės aparatas Nanosight LM10 (Spectris);
- Žiedinė maišyklė Rocher-Shaher (Biosan);
- Šildoma vandens vonelė (Biosan);
- Šviesinis mikroskopas Eclipse TS 100 (Nikon);
- Transendotelinės elektrinės varžos matavimo prietaisai cellZscope (nanoAnalytics GmbH);
- Ultracentrifuga Sorvall LYNX 6000, rotorius T298 × 50 (Thermo Fisher Scientific).
- Transendotelinės elektrinės varžos matavimo prietaisai Millicell® ERS-2

### 2.1.4. Programinė įranga

- Graph Pad Prism 8.0.1 (Graph Pad Software);
- ImageLab Software (Bio-Rad Laboratories);
- Leica Application Suite X (Leica Microsystems).

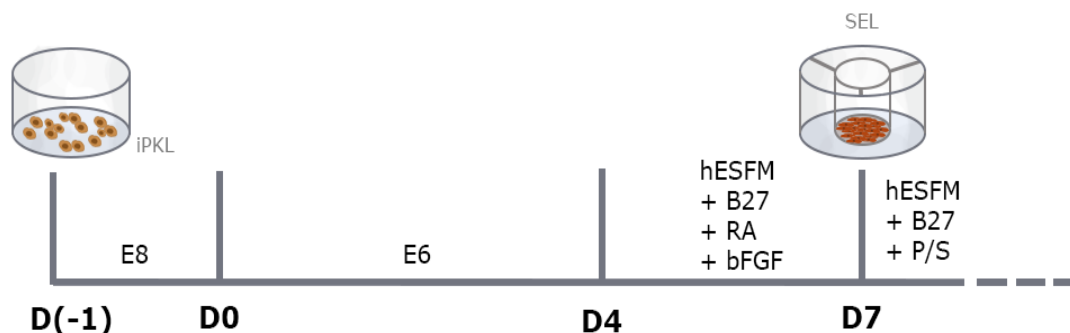
## 2.2. Ląstelių kultivavimas

### 2.2.1. iPKL kultivavimas ir diferenciacija

Prieš iPKL persėjimą kultivavimo indai padengti matrigelį skiedžiant santykiu 1:200 DMEM/F12 terpėje ir inkubuojant 2 val. kambario temperatūroje arba 4 °C per naktį. iPKL buvo palaikomos E8 terpėje, kuri buvo keičiama kas 24 val. Ląstelės buvo persėjamos joms pasiekus 80 % konfluenciją: du kartus praplaunamos su 0,5 mM EDTA-PBS tirpalu ir, trečią kartą užpylus EDTA tirpalu, ląstelės inkubuojamos 3-4 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos EDTA tirpalas nusiurbiamas ir užpilama augimo terpė. Ląstelės atkabinamos nuo lėkštelės pasinaudojant terpės srove iš pipetės ir persėjamos į šviežią kultūros terpę, papildytą 5 μM ROCK inhibitoriaus Y-27632.

iPKL diferenciacija paremta Neal et al. protokolu (Neal et al. 2019) (2.2.-1 pav.). iPKL persėjamos ant matrigeliu padengtų lėkštelių (tankis – 15 800 ląstelių/cm<sup>2</sup>) į E8 terpę, papildytą

10  $\mu$ M Y-27632. Diferenciacija inicijuojama po 24 val., pakeičiant augimo terpę į E6. E6 terpė buvo keičiama kas 24 val., 4 dienas. Penktą dieną po persėjimo, terpė pakeista į hESFM, papildytą su 20 ng/ml bFGF, 10  $\mu$ M RA ir 0,25x B-27. Po 48 val. ta pati terpė vėl pakeičiama. Kitą dieną ląstelės



**2.2.-1 pav.** iPKL diferenciacijos į SEL schema. D(-1) dieną ląstelės persėjamos diferenciacijai; D0 dieną pakeičiama E6 terpė, kurioje ląstelės auginamos keturias dienas; D4 dieną pakeičiama hESFM terpė, papildyta B27, retinoine rūgštimi ir bFGF; D7 dieną ląstelės persėjamos ant įdėklų ir toliau auginamos priklausomai nuo eksperimento.

buvo persėtos: vieną kartą praplautos su PBS ir inkubuotos su akutaze 10-30 min. 37°C temperatūroje. Gauta ląstelių suspensija buvo centrifuguojama 300 × g greičiu, 3 min. Ląstelės resuspenduotos hESFM terpėje, papildytoje 0,25x B-27, 50 U/ml penicilino ir 50  $\mu$ g/ml streptomicino, tuomet persėjamos ant poliesterio membranų *Transwell* įdėkluose (0,33 cm<sup>2</sup>, 0,4  $\mu$ m porų dydis), kurios padengtos 400  $\mu$ g/ml IV tipo kolageno ir 100  $\mu$ g/ml fibronektino tirpalu.

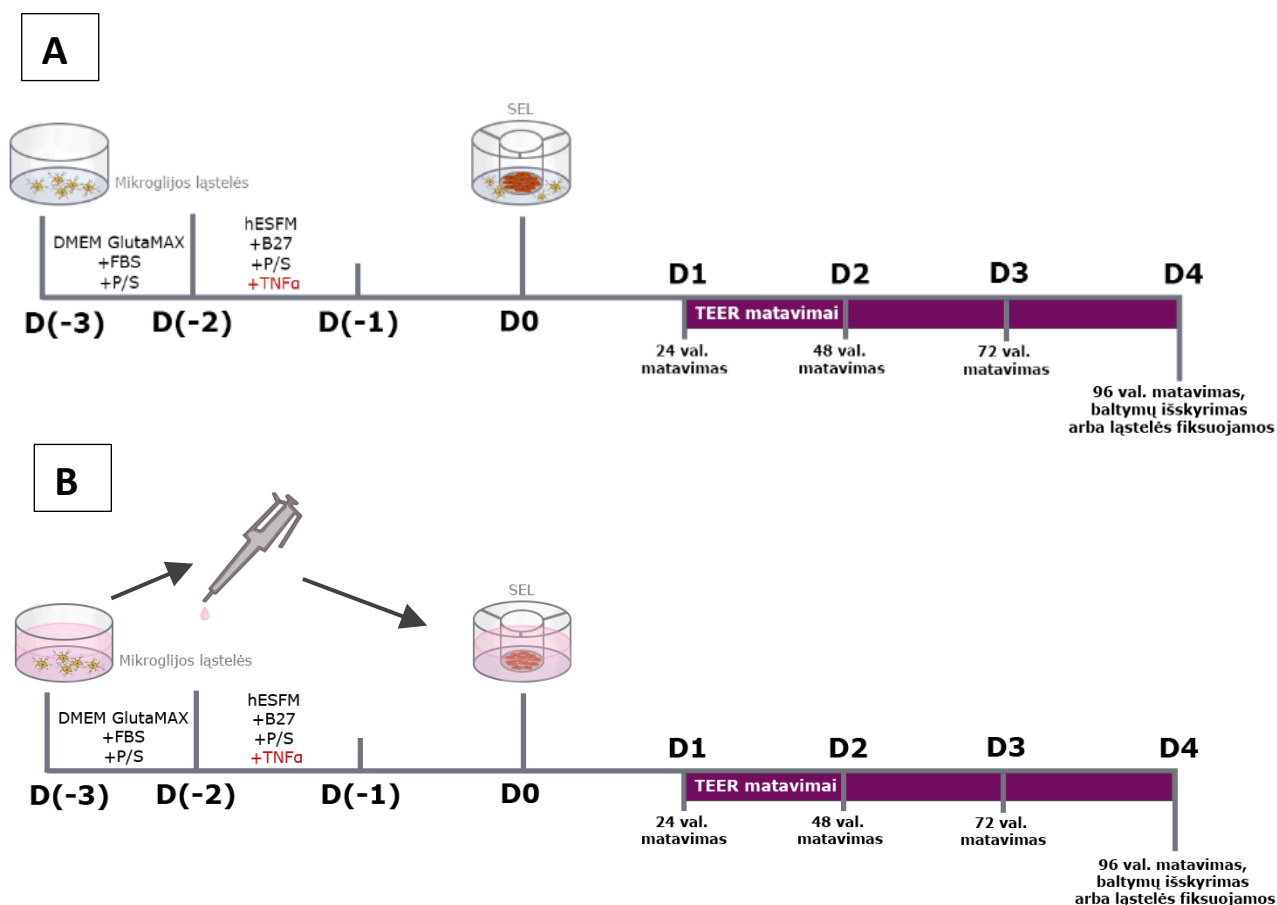
### 2.2.2. Mikroglijos kultivavimas

Mikroglijos ląstelės buvo palaikomos DMEM-GlutaMAX terpėje su 10 % FBS, 100 U/ml penicilino ir 100  $\mu$ g/ml streptomicino. 80 % konfluenciją pasiekusi mikroglija praplauta su 37 °C temperatūros PBS ir disocijuota su 0,25 % tripsino-EDTA tirpalu ~ 3 min. Tripsinas neutralizuotas dvigubu tūriu auginimo terpės ir ląstelių suspensija centrifuguota 1500 rpm greičiu, 3 min. Supernatantas nupiltas, nusėdusios ląstelės suspenduotos reikiamame auginimo terpės tūryje ir gauta suspensija išpilstyta į kultivavimo indus palaikymui. Prieš persėjimą kultivavimo indai padengti 0,15 mg/ml I tipo kolageno ir 0,02 M acto rūgšties tirpalu ir inkubuoti 1 valandą kambario temperatūroje. Po inkubacijos flakonai 3 kartus plauti su PBS. Tyrimams naudotos kultūros iki 12 pasažo.

### 2.2.3. SEL ir mikroglijos kokultivavimas

Mikroglijos ląstelės buvo sėjamos į 24 šulinėlių lėkštelę. Tankis - 10 000 ląstelių į šulinėlį. Kitą dieną mikroglijos kultivavimo terpė pakeista į hESFM su 0,25x B-27, 50 U/ml penicilino,

50 µg/ml streptomicino ir 20 ng/ml TNFα. Po 48 val įdėklai su SEL ląstelėmis (aprašyta 2.2.1 poskyryje) buvo perkelti į šulinėlius su mikroglija, nekeičiant juose esančios terpės.



**2.2.-2 pav.** D(-3) dieną persėjama mikroglija; D(-2) pakeičiama SEL kultivavimo terpė su TNFα; D0 dieną įdėklai su užsėtomis SEL patalpinami į šulinėlius su mikroglija (A) arba tik su supernatantu, nusiurbtu nuo kultivuotos mikroglijos (B); nuo D1 iki D4 dienos kas 24 val. atlikti TEEV matavimai. Po paskutinio matavimo iš SEL ir mikroglijos išskiriami baltymai imunobloto analizei arba endotelio monosluoksnis fiksuojamas imunocitochemijos analizei.

Kas 24 val. buvo atliekami TEEV matavimai, paskutinis matavimas atliktas praėjus 96 valandoms nuo SEL patalpinimo į šulinėlius su mikroglija. Eksperimento schema pateikta 2.2.-2, A pav.

#### 2.2.4. SEL kultivavimas su ekstraląstelinėmis vezikulėmis ir tirpiaisiais veiksniais

Šie eksperimentai buvo atliekami analogiškai, kaip kokultūrų kultivavimas, aprašytas 2.2.3 poskyryje, bet su pakeitimais D0 dieną. EV eksperimentuose 1 veikimo vienetas (VV) arba  $3,65 \cdot 10^8$  išskirtų egzosomų ar mikrovezikulių (žr. aprašymą 2.3 skyriuje) buvo įpilta į šviežiai pakeistą hESFM terpę su 0,25x B-27, 50 U/ml penicilino, 50 µg/ml streptomicino, esančią po įdėklu su SEL. Tirpiųjų veiksnių eksperimentuose D0 dieną buvo nusiurbta kultivuotos mikroglijos terpė (kultivuota taip pat kaip aprašyta 2.2.3 poskyryje) ir įpilta į šulinėlį po įdėklu su SEL (2.2.-2, B pav.).

TEEV matavimai atlikti taip pat, kaip aprašyta 2.2.3 poskyryje.

### 2.3. Ekstraląstelinių vezikulių išskyrimas ir charakterizavimas

EV išskyrimas atliktas pagal anksčiau aprašytą metodą (Théry et al. 2006) su keliais pakeitimais. EV rinkimui žmogaus mikroglija buvo 4 dienas kultivuota terpėje be serumo EV. Renkant aktyvuotos mikroglijos EV, 72 val. prieš supernatanto surinkimą, ląstelės paveiktos 20 ng/ml TNF $\alpha$ . Surinkti supernatantai išvalyti nuo pašalinių komponentų ultracentrifugacijos metodu: centrifuguojant 300  $\times$  g greičiu 10 min. pašalintos negyvos ląstelės ir 2000  $\times$  g – 10 min pašalintos ląstelių nuolaužos. Toliau centrifuguojant 20 000  $\times$  g greičiu 30 min. surinktos mikrovezikulės ir 100 000  $\times$  g greičiu 70 min - egzomosos. Visi centrifugavimo etapai atlikti 4  $^{\circ}$ C temperatūroje. Mikrovezikulės ir egzomosos praplautos 4  $^{\circ}$ C PBS ir dar kartą centrifuguotos tais pačiais nustatymais. Galiausiai suspenduotos 4  $^{\circ}$ C PBS ir saugomos -80  $^{\circ}$ C temperatūroje.

Kiekybinis EV įvertinimas atliktas nanodalelių sekimo analizės (NTA) metodu su *NanoSight* aparatu, esančiu VU Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute, Eukariotų genų inžinerijos skyriuje. Prieš matavimus EV mėginiai 100 kartų praskiedžiami su PBS.

### 2.4. TEEV matavimai

TEEV matavimai buvo atlikti rankiniu arba automatiniu būdu. Rankiniu būdu TEEV matavimai buvo atliekami trečią dieną po ląstelių užsėjimo ant *Transwell* įdėklų. Matavimai atlikti naudojant Millicell ERS-2 elektrinės varžos sistemą, matavimai buvo atliekami kiekviename įdėkle trijose skirtingose vietose. TEEV ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ) apskaičiavimui, tuščio įdėklo vidutinė elektrinė varža (gauta tokiu pačiu būdu matuojant ląstelėmis neužsėtą įdėklą su atitinkama terpe) buvo atimama iš vidutinės reikšmės, gautos išmatavus įdėklus su SEL ir gautą rezultatą padauginus iš įdėklo paviršiaus ploto (Kriaučiūnaitė *et al.*, 2021). Rankiniu būdu matavimai buvo atliekami keturis kartus kas 24 val.

Automatiniams matavimas užsėti įdėklai buvo iš karto sudedami į CellZscope TEEV matavimo aparatą ir inkubuoti 37  $^{\circ}$ C temperatūroje. Buvo nustatyta TEEV matavimus atlikti kas valandą. Automatiniai matavimai buvo atliekami 120 valandų periode.

### 2.5. Imunocitochemija

GJ baltymų raiškos tyrimams įdėklų membranos su diferencijuotomis SEL buvo išpjautos ir fiksuotos 1:1 metanolio-acetono tirpalu 10 min. -20  $^{\circ}$ C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai plauti po 3 kartus kambario temperatūros PBS, blokuoti su 1 % galvijų serumo albuminu (angl. *bovine serum albumin*, BSA) 30 min. kambario temperatūroje ir per naktį inkubuoti su pirminiais antikūnais



prieš klaudina-5, okludina ir ZO-1, skiestais blokavimo tirpale (žr. 1 priedą). Kitą dieną mėginiai plauti 3 kartus su PBS ir inkubuoti su antriniais antikūnais, konjuguotais su fluorescuojančia žyme Alexa Fluor santykiu 1:1000 (žr. 1 priedo 2 lentelę), 1 val. kambario temperatūroje, tamsoje. Po inkubacijos mėginiai buvo plaunami su PBS 3 kartus. Įdėklo membranos ant objekcinio stikliuko dėtos ląstelių augimo puse aukštyn ir ant jų užlašinta montavimo terpė (angl. *mounting medium*) su branduolius dažančiu DAPI. Galiausiai uždėtas dengiamasis stikliukas.

Mėginiai vizualizuoti konfokaliniumi mikroskopu *Leica TCS SP8* (naudoti Argon 488 nm ir DPSS 561 nm lazeriai), panaudojant  $\times 63$  imersinį aliejaus objektyvą.

## 2.6. Imunobloto analizė

Ląstelės buvo 3 kartus plautos kambario temperatūros PBS ir lizuotos RIPA tirpale su proteazių ir fosfatazių inhibitoriais 15 min. ant ledo. Lizatai surinkti į mėgintuvėlius, sukratyti (vortex) ir patalpinti į ledą dar 10 min. Po inkubacijos lizatai buvo centrifuguojami  $18\ 000 \times g$  greičiu 20 min.  $4\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje. Supernatantai buvo skiedžiami su denatūruojančiu Laemmli tirpalu ir kaitinti 5 min.,  $95\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje. Baltymų kiekis buvo nustatytas spektrofotometriškai, panaudojus BCA rinkinį. Vienodi baltymų kiekiai buvo užnešti ant 4-10 % poliakrilamido gelio ir išfracionuoti elektroforetiškai panaudojant mini-PROTEAN Tetra cell aparatą (130 mV įtampą). Iš gelio baltymai buvo pernešami ant polivinilideno difluorido membranos su  $0,2\ \mu\text{m}$  dydžio poromis naudojant pusiau sausą *Trans-Blot Turbo* pernašos sistemą. Nustatyta 25 V įtampa, 1 A srovė ir 30 min. trukmė. Po pernešimo, membranos buvo 1 valandą blokuojamos su 5 % BSA kambario temperatūroje. Pirminiai antikūnai (žr. 1 priedą, 1 lentelę) buvo skiesti blokavimo tirpalu pagal gamintojo rekomendaciją ir inkubuoti per naktį. Membranos 3 kartus plautos su PBS, turinčiu 0,18 % nejoninio surfaktanto Tween-20 (PBST). Naudoti antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze (angl. *horseradish peroxidase*). Antriniai antikūnai (žr. 1 priedo 2 lentelę) buvo skiedžiami su PBST 1:2000 santykiu ir užpilami ant membranos 1 val. inkubacijai kambario temperatūroje. Membrana praplaunama 5 kartus su PBST ir baltymai detektuojami panaudojant sustiprintos liuminescencijos (angl. *enhanced chemiluminescence*) substratą *ChemiDoc MP* prietaise.

## 2.7. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta iš 1 - 4 eksperimentų duomenų. Rezultatai pateikti kaip vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. Daugiau nei 2 grupių skirstinio padėties palyginimui naudota vienfaktorė ANOVA arba dvifaktorė ANOVA, jeigu duomenys statistiškai reikšmingi, taikytas Tukey daugybinių palyginimų testas. Skirtumai vertinami kaip statistiškai patikimi, kai  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ . Statistinė analizė atlikta naudojant *GraphPad Prism*

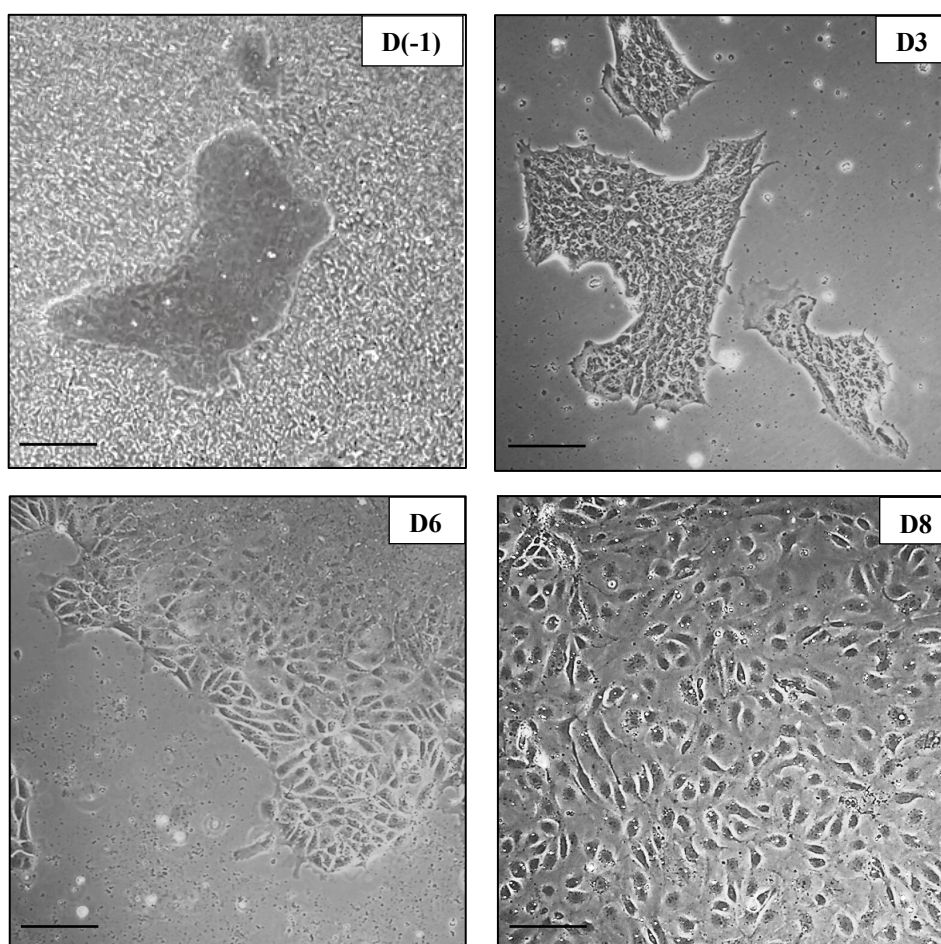
programą (10.2.3 wersija).

### 3. REZULTATAI IR APTARIMAS

#### 3.1. Smegenų endotelio ląstelių charakterizavimas

Žmogaus KSB *in vitro* modelio charakterizavimui bei tolimesniems tyrimams buvo naudotos indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės. iPKL diferenciacija į smegenų endotelio ląsteles (SEL) buvo vykdoma pagal (Neal et al. 2019) protokolą (plačiau skyriuje Metodai) (3.1.-1 pav.).

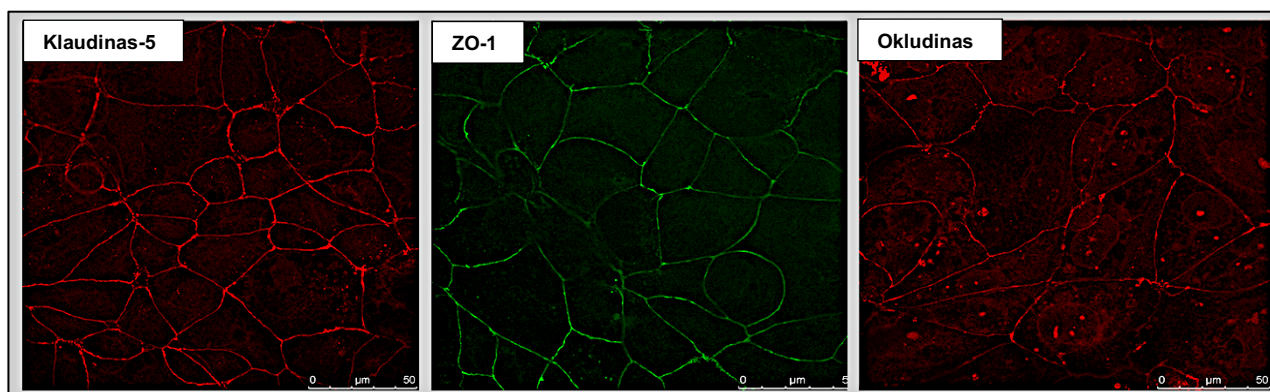
Proceso eigoje diferencijuojančių iPKL kolonijų morfologija ėmė keistis – pradėjo formuotis dantyti kraštai, ląstelės pradėjo didėti ir įgauti kuboidinę formą (3 diena). 6 diferenciacijos dieną kolonijos ėmė lietus, pradėjo formuotis monosluoksnis. 7 dieną mišri diferencijuotų ląstelių kultūra persėjama ant selektyviu substratu padengtų auginimo indų ir taip atrenkamos tik endotelio ląstelės, kurios sekančią dieną (D8) jau formuoja monosluoksnį, pasižymintį tipiška kuboidine endoteliocitams būdinga morfologija (3.1.-1 pav.).



**3.1.-1 pav.** Morfologiniai MBE 2960 iPKL ląstelių pokyčiai diferenciacijos į SEL metu (2.2.-1pav.). D(-1) nuotrauka daryta prieš persėjant ląsteles diferenciacijai, D3 – ketvirta diferenciacijos diena, D6 – septinta diferenciacijos diena, D8 – diferencijuotų ląstelių monosluoksnis praėjus 24 val. po persėjimo. Skalė – 200  $\mu$ m.

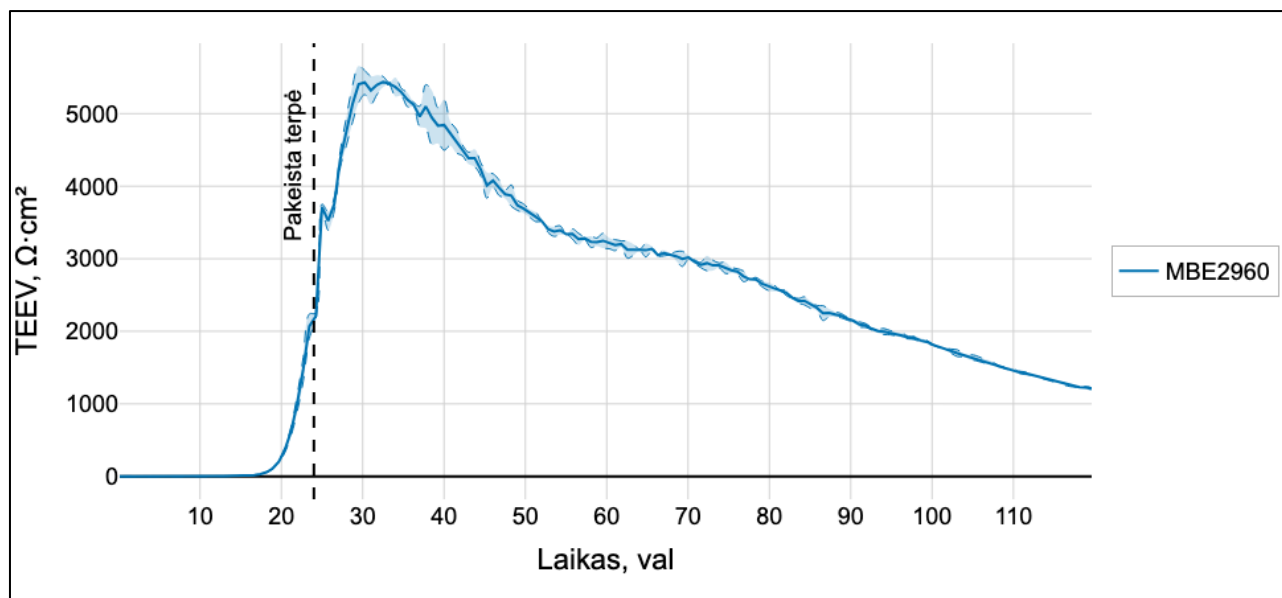
SEL užtikrina barjerinę funkciją glaudžiai kontaktuodamos tarpusavyje. Šiuos kontaktus formuoja glaudžiosios ir adhezinės jungtys. Klaudinas-5, ZO-1 ir okludinas yra svarbiausi KSB glaudžiųjų jungčių (GJ) baltymai.

Imunocitocheminiai tyrimai patvirtino aukštą klaudino-5, ZO-1 ir okludino raiškos lygį SEL monosluoksniuose (3.1. 2 pav.).



**3.1.-2 pav.** SEL imunofluorescentinis charakterizavimas. SEL monosluoksnis dažytas antikūnais prieš GJ baltymus: klaudina-5, ZO-1 ir okludina. Pateiktos reprezentatyvios nuotraukos. Skalė – 50 µm.

Transendotelinės elektrinės varžos matavimai leidžia funkciškai įvertinti SEL ląstelių barjerines savybes. 3.1.-3 pav. pateikta kreivė parodo kaip kinta TEEV vertės nuo pat SEL ląstelių užsėjimo, kuomet reikšmės artimos 0, ir jau susiformuojant monosluoksniui ties ~ 22 matavimo val. (> 1000 Ω x cm<sup>2</sup>). Pakeitus terpę, TEEV kilo ir po ~ 30 val. pasiekė maksimalias reikšmes, kurios laikėsi iki 35 val, ir po to prasidėjo laipsniškas TEEV mažėjimas (3.1.-3 pav.). Aukščiausios TEEV



**3.1.-3 pav.** Iš APOE 3/3 iPKL linijos diferencijuotų SEL automatiniai matavimai. 24 matavimo valandą buvo pakeista auginimo terpė (pažymėta juoda brūkšnine linija). Mėlyna kreivė parodo matavimo vidurkį, o abipus kreivės esantis šviesiai mėlynas fonas žymi standartinį matavimų nuokrypį.

vertės siekė iki  $5439 (\pm 73) \Omega \times \text{cm}^2$  - tokios reikšmės yra artimos rodikliams registruotiems *in vivo* (Wolff *et al.*, 2015).

Apibendrinant, gauti duomenys rodo, kad diferencijuotos SEL pasižymi smegenų kraujagyslių endoteliui būdinga morfologija, aukšta GJ baltymų raiška ir geromis barjerinėmis savybėmis, todėl yra tinkamas KSB *in vitro* modelis mikroglijos parakrininių veiksnių poveikio tyrimams.

### 3.2. Mikroglijos aktyvacijos analizė

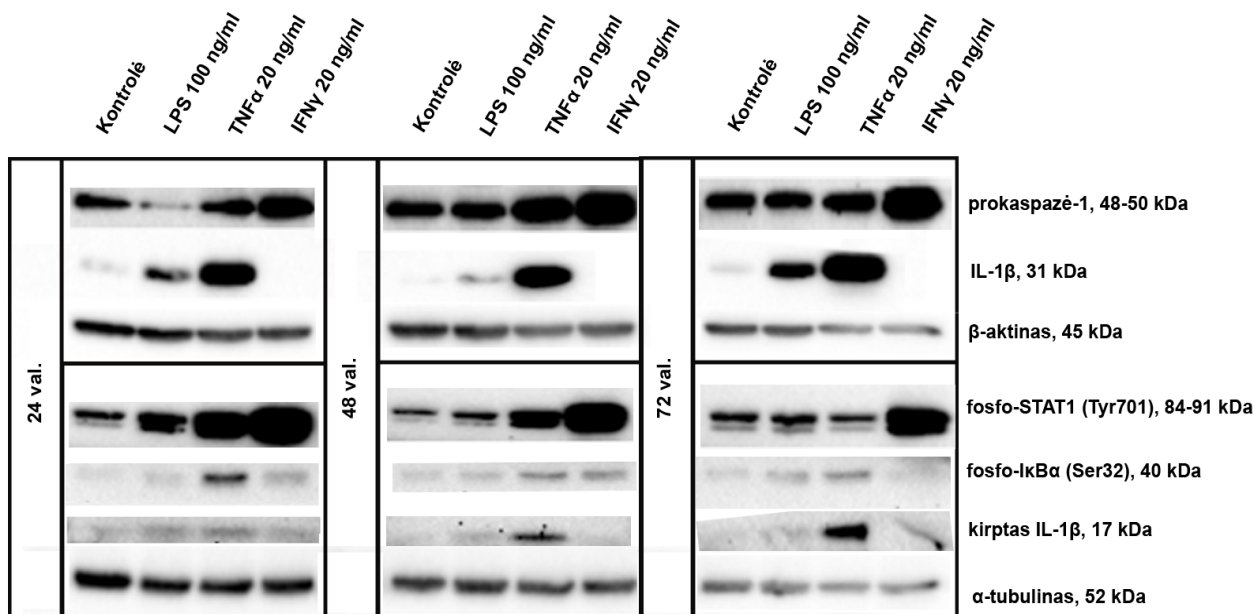
Įvairūs žalingi veiksniai, taip pat jų sąlygojami nervinio audinio pažeidimai indukuoja uždegiminį atsaką ir aktyvuoja mikroglijos ląsteles. Aktyvuotos mikroglijos ląstelės eliminuoja žalingus veiksnius ir kontroliuoja patį uždegimo procesą. Aktyvuota mikroglija fagocituoja žuvusias ir pažeistas ląsteles, taip pat sekretuoja uždegimą reguliuojančius parakrininius veiksnius (Mayer and Fischer, 2024). Daugėja duomenų, kad aktyvuotos (uždegiminės) mikroglijos ląstelės yra labai heterogeniškos (Paolicelli *et al.*, 2022). Manoma, kad molekulinis ir funkcinis mikroglijos heterogeniškumas priklauso nuo uždegimą indukuojančio veiksnio prigimties bei nuo audinio mikroaplinkos savybių (skirtingų smegenų sričių mikroglija nevienodai reaguoja į tą patį žalingą veiksni) (Woodburn, Bollinger and Wohleb, 2021).

Šiame darbe buvo siekiama įvertinti ir palyginti aktyvuotos ir neaktyvuotos žmogaus mikroglijos sekretuojamų parakrininių veiksnių poveikį KSB funkcinėms savybėms. Visų pirma, reikėjo parinkti veiksni, kuris padėtų užtikrinti efektyvią mikroglijos aktyvaciją. Tyrėme tris aktyvacijos veiksnius: lipopolisacharidą (LPS), navikų nekrozės faktorių alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) ir gama interferoną ( $\text{IFN}\gamma$ ). Mikroglijos baltymai buvo išskirti po poveikio praėjus 24, 48 ir 72 val., atlikta su mikroglijos aktyvacija susijusių baltymų raiškos imunobloto analizė (3.2.-1 pav.).

LPS (100 ng/ml) neveikė prokaspazės-1, fosforilinto  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Ser32) ir sekretuojamo (kirpto) interleukino  $1\beta$  ( $\text{IL-1}\beta$ ) raiškos, tačiau padidino fosfo-STAT1 (signalus perduodančio ir transkripciją aktyvuojančio baltymo 1) ir neaktyvaus  $\text{IL-1}\beta$  pirmtako (31 kDa) raišką (3.2.-1 pav.).

$\text{TNF}\alpha$  (20 ng/ml) padidino prokaspazės-1 raišką po 48 val, taip pat ženkliai sustiprino tiek neaktyvaus, tiek sekretuojamo  $\text{IL-1}\beta$  raišką.  $\text{TNF}\alpha$  paskatino branduolio faktoriaus kapa B ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) inhibitoriaus ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) fosforilinimą (Ser32).  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Ser32) fosforilinimas skatina šio baltymo ubikvitilinimą, tokiu būdu palengvindamas  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  translokaciją į branduolį ir uždegimą reguliuojančių genų raišką (Mathes *et al.*, 2008).  $\text{TNF}\alpha$  taip pat aktyvavo STAT1 signalinį kelią (3.2.-1 pav.).

Poveikis  $\text{IFN}\gamma$  (20 ng/ml) ženkliai padidino prokaspazės-1 raišką, taip pat stipriausiai ir ilgiausiai aktyvavo STAT1 signalinį kelią (3.2.-1 pav.).



**3.2.-1 pav.** Su mikroglijos aktyvacija susijusių baltymų imunobloto analizė. Baltymų prokaspazės-1, IL-1 $\beta$ , fosfo-STAT1 (Tyr701), fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) ir kirpto IL-1 $\beta$  raiška analizuota mikroglija paveikus 100 ng/ml LPS, 20 ng/ml TNF $\alpha$  ir 20 ng/ml IFN $\gamma$ . Baltymai išskirti praėjus 24, 48 ir 72 val. po poveikio.

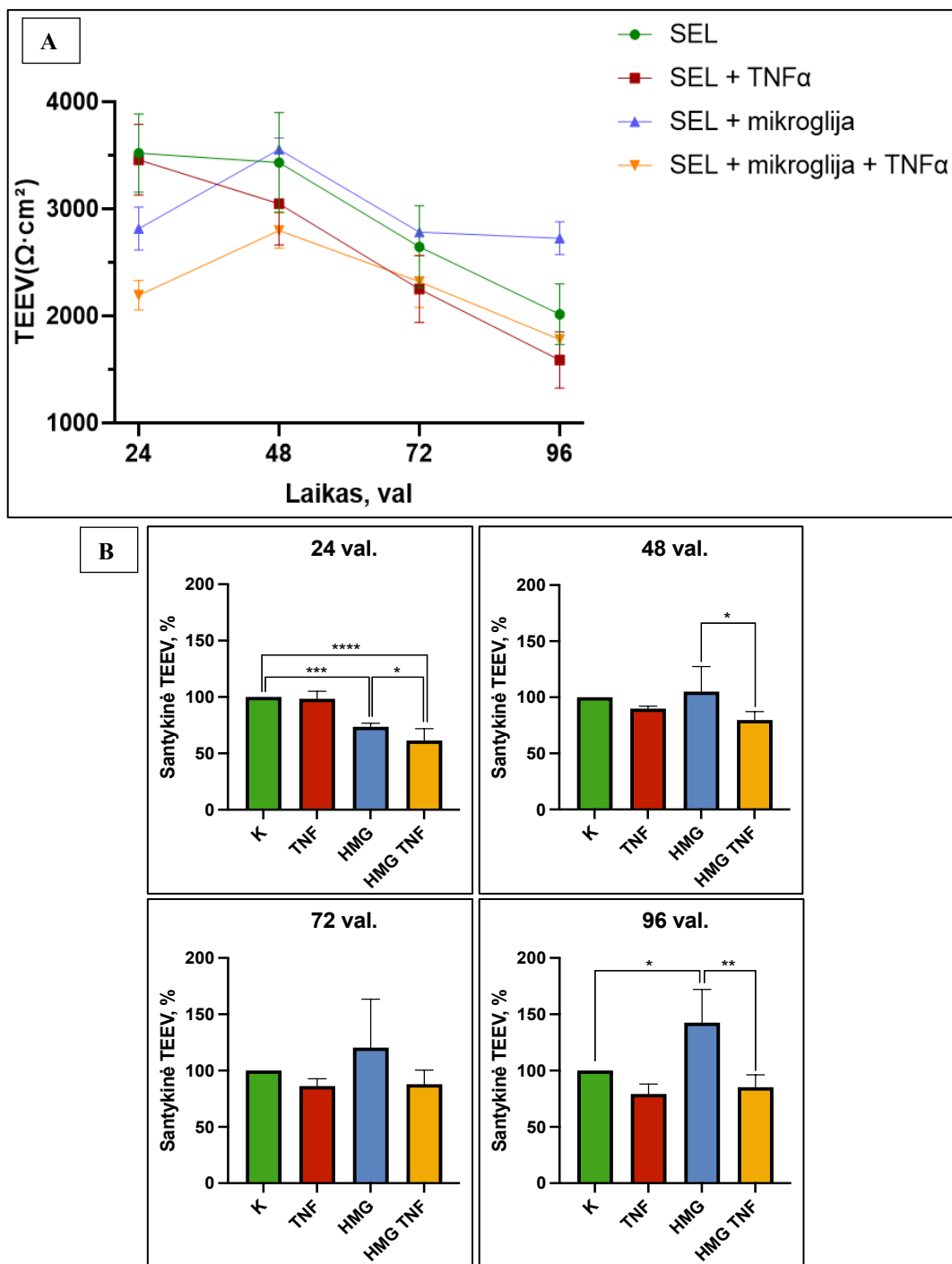
Gauti duomenys rodo, kad skirtingi uždegimo veiksniai nevienodai veikia mikroglijos uždegiminį atsaką. Nustatyta, kad TNF $\alpha$  efektyviausiai indukavo uždegiminį atsaką mikroglijos ląstelėse, kadangi aktyvavo NF- $\kappa$ B, STAT1 ir inflamasiomų signalinius kelius. Atsižvelgus į tai, tolimesniems eksperimentams pasirinktas būtent šis uždegimo veiksnys.

### 3.3. Mikroglijos sekretuojamų parakrinių veiksnių poveikis smegenų kraujagyslių endotelio ląstelių barjerinėms savybėms

Toliau tirta, kaip neaktyvuotos (toliau „ramybės“) ir uždegiminės (aktyvuotos su 20 ng/ml TNF $\alpha$ ) mikroglijos sekretuojami parakrininiai veiksniai veikia SEL barjerines savybes.

SEL ir mikroglijos ląstelės buvo kokultivuojamos 4 dienas, TEEV reikšmės buvo matuojamos po 24, 48, 72 ir 96 val. nuo kokultivavimo pradžios (3.3.-1, A pav). Gauti duomenys rodo, kad kokultivavimas su mikroglija fiziologinėmis sąlygomis statistiškai reikšmingai padidina TEEV vėlyvosiose kokultivavimo stadijose (3.3.-1, B pav). Lyginant su kontrolinėmis SEL monokultūromis, po 96 val, kokultūrose su „ramybės“ mikroglija (HMG) registruota 43 % didesnė TEEV. Šis rezultatas rodo, kad fiziologinėmis sąlygomis kokultivavimas su mikroglija padeda ilgesnį laiką palaikyti aukštas TEEV reikšmes. Tuo tarpu, uždegiminė mikroglija neigiamai veikė SEL barjerines savybes. Lyginant su kontrolinėmis monokultūromis, kokultivavimas su uždegimine mikroglija po 24, 48 ir 96 val statistiškai patikimai sumažino TEEV 38 %, 20 % ir 15 % (3.3.-1, B pav). Lyginant su fiziologinėmis sąlygomis kokultivuota mikroglija, uždegiminė mikroglija po 24,

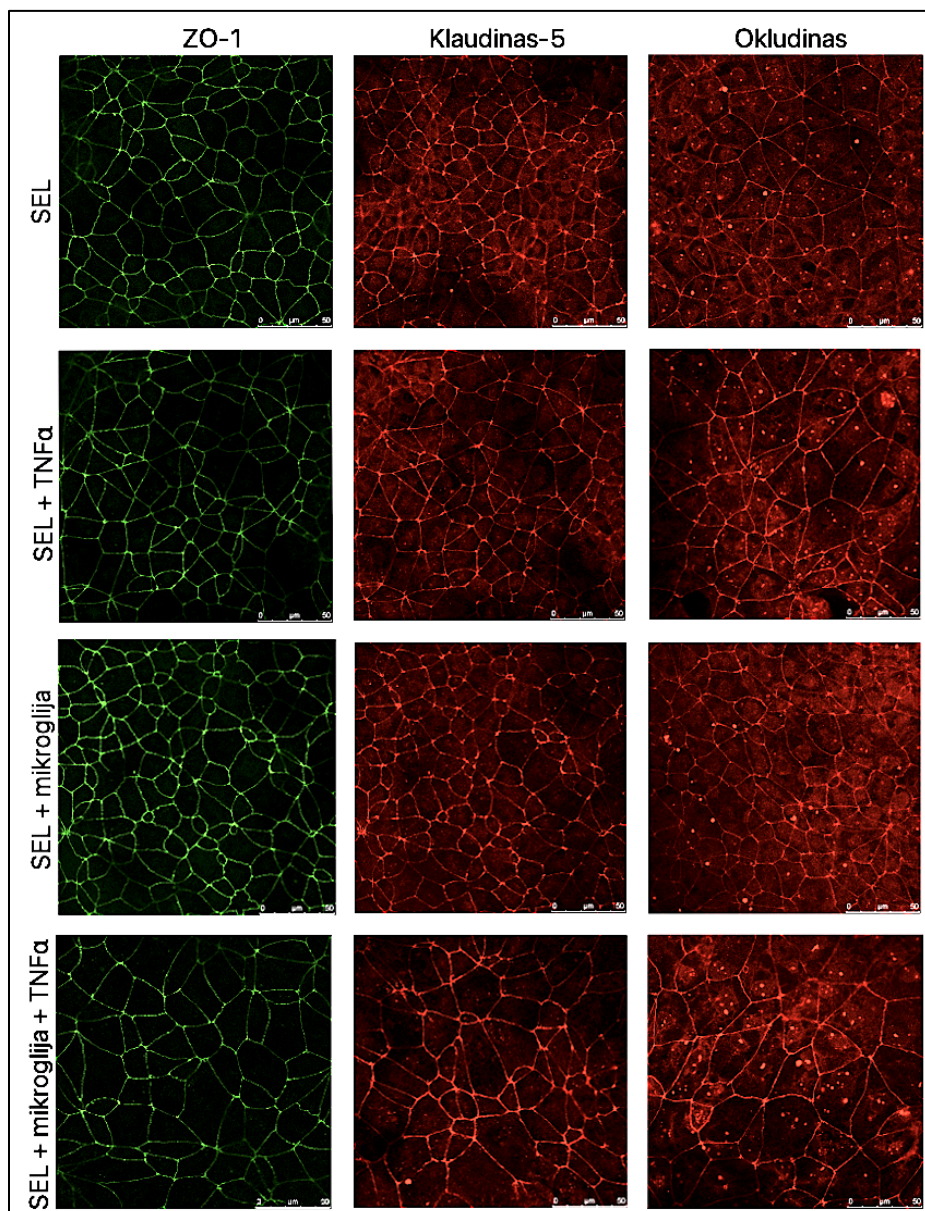
48 ir 96 val statistiškai patikimai sumažino TEEV reikšmes 12 %, 25 % ir 58 %.



**3.3.-1 pav.** Mikroglijos ir TNF $\alpha$  poveikis SEL TEEV vertėms. A - kreivė, parodanti TEEV pokytį viso eksperimento metu; B – kiekvieno TEEV matavimo santykinų verčių palyginimas priklausomai nuo poveikio. Statistinė analizė atlikta su vienfaktore ANOVA ir Tukey testu, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . K – SEL monosluksnis, TNF – SEL monosluksnis paveiktas TNF $\alpha$ , HMG – SEL monosluksnio ir mikroglijos kokultūra, HMG TNF – SEL monosluksnio ir mikroglijos kokultūra paveikta TNF $\alpha$ ; n = 4.

Po TEEV matavimų, buvo atliekama imunocitochemijos analizė, kurios metu tirta GJ baltymų raiška. SEL monosluksnyje buvo analizuojamas ZO-1, kludinas-5 ir okludinas. Nustatytos nežymios variacijos tarp skirtingose sąlygose kultivuotų SEL GJ baltymų raiškos intensyvumo.

Nepaisant to, šie rezultatai neleidžia daryti vienareikšmiškų išvadų.



**3.3.-2 pav.** GJ baltymų, ZO-1, klaudino-5 ir okludino, raiška SEL monosluoksnyje skirtingomis sąlygomis: kontrolinės sąlygos, SEL paveiktos 20 ng/ml TNF $\alpha$ , SEL augintos kokultūroje su mikroglija ir kokultūros 20 ng/ml TNF $\alpha$  sąlygomis. Pateiktos reprezentatyvios nuotraukos. Skalė - 50  $\mu$ m.

TEEV matavimų rezultatai rodo, kad fiziologinėmis sąlygomis, „ramybės“ būsenos mikroglija sekretuoja parakrininius veiksnis, kurie gerina SEL barjerines savybes. Šie duomenys leidžia manyti, kad fiziologinėmis sąlygomis mikroglijos sekretuojami parakrininiai veiksniai gali būti svarbūs KSB funkcijos palaikymui. Tuo tarpu, po aktyvacijos TNF $\alpha$ , uždegiminė mikroglija neigiamai veikė SEL barjerines savybes. Akivaizdu, kad šį rezultatą sąlygojo pakitę uždegiminės mikroglijos sekretuojamų parakrininių veiksnių profiliai. Tolimesni palyginamieji proteominiai tyrimai padės identifikuoti parakrininius veiksnis nulėmusius aukščiau aprašytus efektus.

Ląstelių sekretomą formuoja vezikuliniai (egzosomos ir mikrovezikulės) ir nevezikuliniai

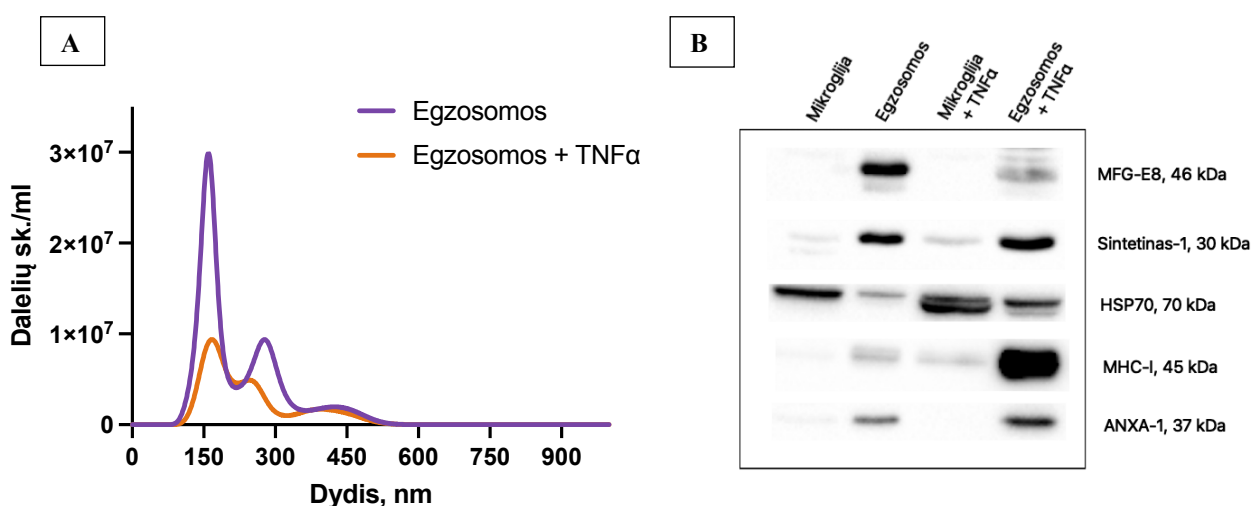


komponentai. Terminas „parakrininiai veiksniai“ apima abu šiuos sekretomo komponentus (Pinho *et al.*, 2020). Todėl toliau tirtas, ekstraląstelių vezikulių (EV) poveikis SEL barjerinėms savybėms.

### 3.4. Mikroglijos egzosomų charakterizavimas ir poveikis SEL barjerinėms savybėms

Egzosomos yra mažiausios ekstraląstelinės vezikulės, kurias sekretuoja visos ląstelės (Gurung *et al.*, 2021). Jos išskiriamos į užląstelinę ertmę ir, pernešdamos įvairius bioaktyvius junginius ar kontaktuodamos su ląstelių paviršiuje esančiomis molekulėmis, perduoda informaciją, taip dalyvaudamos komunikacijoje tarp ląstelių (Zou, Peng and Liu, 2021). Be to, egzosomų turinys atspindi sekretuojančių ląstelių būseną (Hamzah *et al.*, 2021). Žinant tai, nuspręsta išskirti mikroglijos egzosomas fiziologinėmis ir uždegiminėmis sąlygomis ir jomis paveikti turimą SEL monosluoksnį, o gautus rezultatus palyginti su kokultūrose stebėtomis reikšmėmis.

Ruošiantis eksperimentui, egzosomos diferencinio ultracentrifugavimo būdu (Théry *et al.*, 2006) buvo surinktos iš terpės, kurioje 3 dienas buvo kultivuojama mikroglija. Tuomet buvo atlikta nanodalelių sekimo analizė (3.4.-1, A pav.), kurios metu nustatytas egzosomų dydžio pasiskirstymas ir koncentracija.



**3.4.-1 pav.** Mikroglijos sekretuojamų egzosomų charakterizavimas. A – nanodalelių sekimo analizė, parodanti dalelių pasiskirstymą pagal dydį ir koncentraciją (dalelių suspensija skiesta 100 kartų), B – egzosomų žymenų analizė imunobloto metodu.

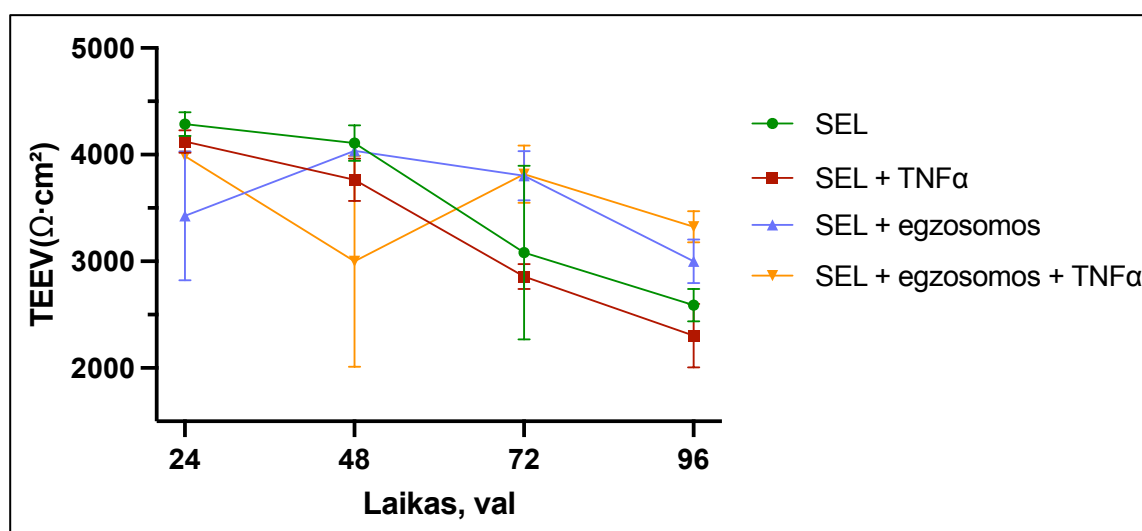
NTA rezultatai parodė, kad didžioji dalis išskirtų dalelių patenka į egzosomoms būdingus dydžio rėmus (10 – 200 nm (Gurung *et al.*, 2021)), su didžiausiu piku ties 150 nm dydžio dalelėmis. Iš uždegiminių mikroglijos ląstelių išskirtas mažesnis egzosomų kiekis ir pasiskirstymas ne toks ryškus, tačiau daugiausiai aptikta ~ 170 nm dalelių, kurios taip pat atitinka literatūroje aprašytą egzosomų dydį (Gurung *et al.*, 2021).

Charakterizavimui taip pat atlikta imunobloto analizė, kurios metu analizuoti EV paviršiaus žymenys: pieno riebalų globulinas-EGF veiksnio 8 baltymas (MFG-E8), sintetinas-1, karščio šoko

baltymas 70 (HSP70), didysis audinių suderinamumo kompleksas I (MHC-I) ir aneksinas A1 (ANXA-1) (3.4.-1, B pav). Fiziologinėmis sąlygomis, išskirtose egzosomose stebėta visų šių žymenų raiška. Uždegimo sąlygomis egzosomų MFG-E8 raiška susilpnėjo, sintetino-1 raiška išliko panaši, o HSP70, MHC-I ir ANXA-1 raiška padidėjo.

Sėkmingai charakterizavus egzosomas, buvo atliktas eksperimentas, aprašytas 2.2.4. poskyryje. Į šulinėlį po įdėklu buvo įpilta egzosomų suspensija su  $3,65 \cdot 10^8$ , kas pagal ankstesnius laboratorijoje darytus tyrimus, prilyginama 1 VV. Pirmas TEEV matavimas atliktas praėjus parai po poveikio ir kartotas kas 24 val. dar 3 kartus.

Pagal gautus rezultatus nebuvo stebėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tirtų sąlygų (3.4.-2 pav.). Neaktyvuotos mikroglijos egzosomos nežymiai padidino TEEV vertes, tačiau, kitaip nei TNF $\alpha$  paveiktose kokultūrose, egzosomos išskirtos iš uždegiminių mikroglijos kultūrų TEEV verčių nemažino – anaipol jos buvo didžiausios 72 val. ir 96 val. Šie rezultatai rodo, kad „ramybės“ ir



**3.4.-2 pav.** Mikroglijos sekretuojamų egzosomų poveikis SEL TEEV vertėms. Pateikti vieno eksperimento rezultatai, standartinis nuokrypis skaičiuojamas iš trijų techninių pakartojimų.

uždegiminės mikroglijos sekretuojamos egzosomos nėra atsakingos už efektus, kurie buvo stebėti SEL ir mikroglijos kokultūrose. Atsižvelgus į tai, toliau buvo tirtas stambesnių EV – mikrovezikulių poveikis.

### 3.5. Mikroglijos mikrovezikulių charakterizavimas ir poveikis SEL barjerinėms savybėms

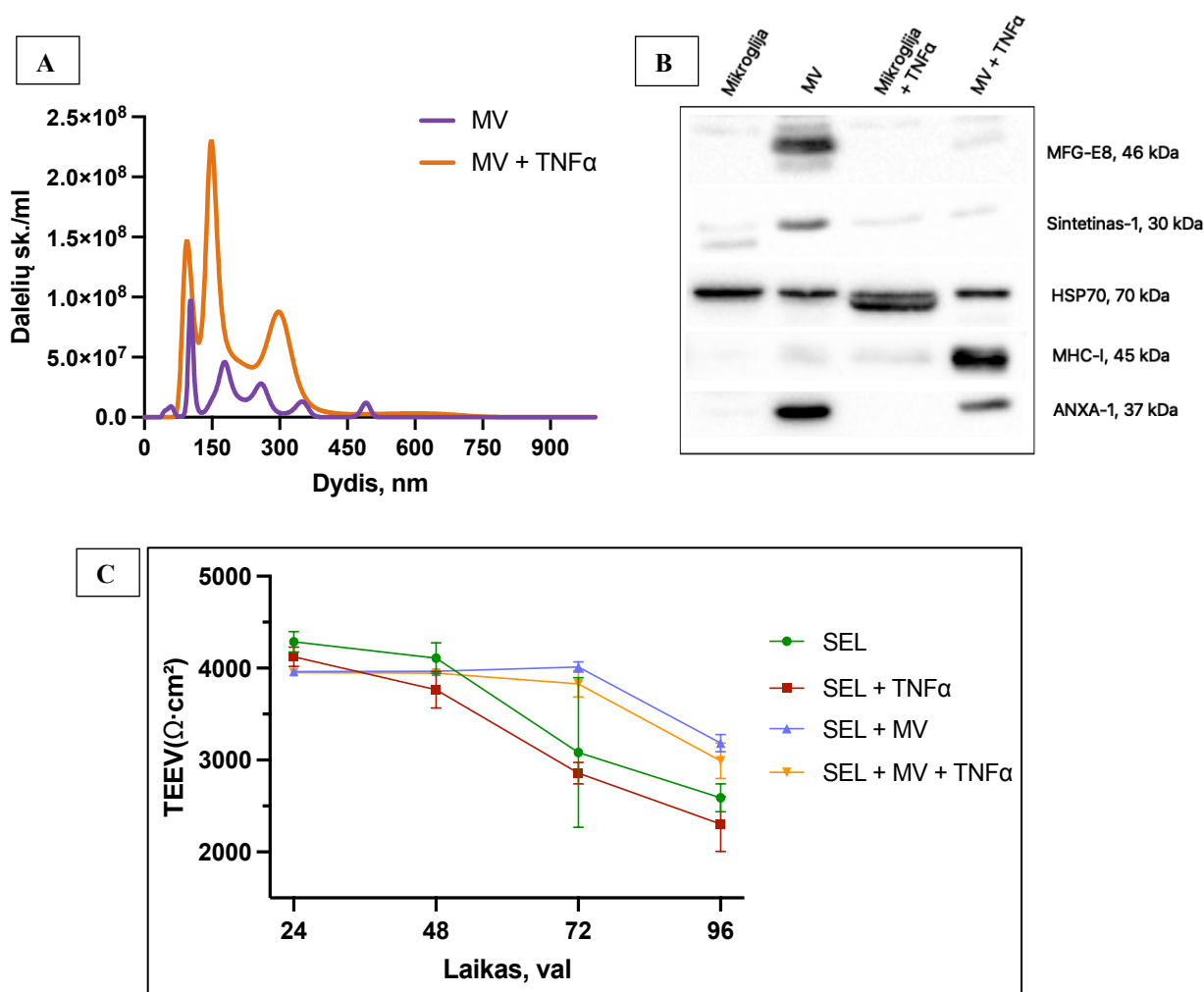
Yra žinoma, kad mikrovezikulės, kaip ir egzosomos, dalyvauja tarpląstelinėje komunikacijoje, perneša specifinius, baltymus, lipidus, mRNR (Verderio *et al.*, 2012). Taip pat, mikrovezikulių pasiskirstymas organizme bei CNS yra siejamas su įvairių neurodegeneracinių ligų vystymusi (Sproviero *et al.*, 2019).

Mikrovezikulės buvo išskiriamos surenkant centrifugavimo būdu 20.0000 g frakcijas (žr. 2.3.

skyrių). Mikrovezikulių charakterizavimas buvo atliekamas lygiai taip pat, kaip ir su egzosomomis: iš pradžių dalelių dydis ir koncentracija nustatyta NTA metodu, o paviršiaus žymenis analizuoti atliekant imunobloto analizę (3.5.-1 pav.).

Lyginant su išskirtomis egzosomomis (3.4.-1 pav.) mikrovezikulių dydžių pasiskirstymas rodė daugiau pikų ties skirtingais dalelių dydžiais (3.5.-1, A pav.). Uždegiminėmis sąlygomis gautų mikrovezikulių frakcija buvo gausesnė nei fiziologinėmis sąlygomis išskirtų MV. „Ramybės“ mikroglijos MV dominuoja ~ 120 nm dydžio dalelės, o uždegiminės mikroglijos MV kreivė demonstruoja didžiausią piką ties ~ 150 nm dydžio dalelėmis. Žinant, kad MV dydis gali siekti 100 – 1000 nm, gauti rezultatai atitinka mikrovezikulių apibūdinimą literatūroje (Gurung *et al.*, 2021).

Imunobloto analizė atlikta naudojant tuos pačius paviršiaus žymenis, kaip ir charakterizuojant egzosomas (3.5.-1, B). Šiuo atveju fiziologinėmis sąlygomis buvo stebima visų šių žymenų raiška, o



**3.5.-1 pav.** Mikroglijos sekretuojamų mikrovezikulių charakterizavimas. A – nanodalelių sekimo analizė, parodanti dalelių pasiskirstymą pagal dydį ir koncentraciją (dalelių suspensija skiesta 100 kartų), B – mikrovezikulių žymenų analizė imunobloto metodu, C - Mikroglijos sekretuojamų mikrovezikulių poveikis SEL TEEV vertėms. Pateikti vieno eksperimento rezultatai, standartinis nuokrypis skaičiuojamas iš trijų techninių pakartojimų.

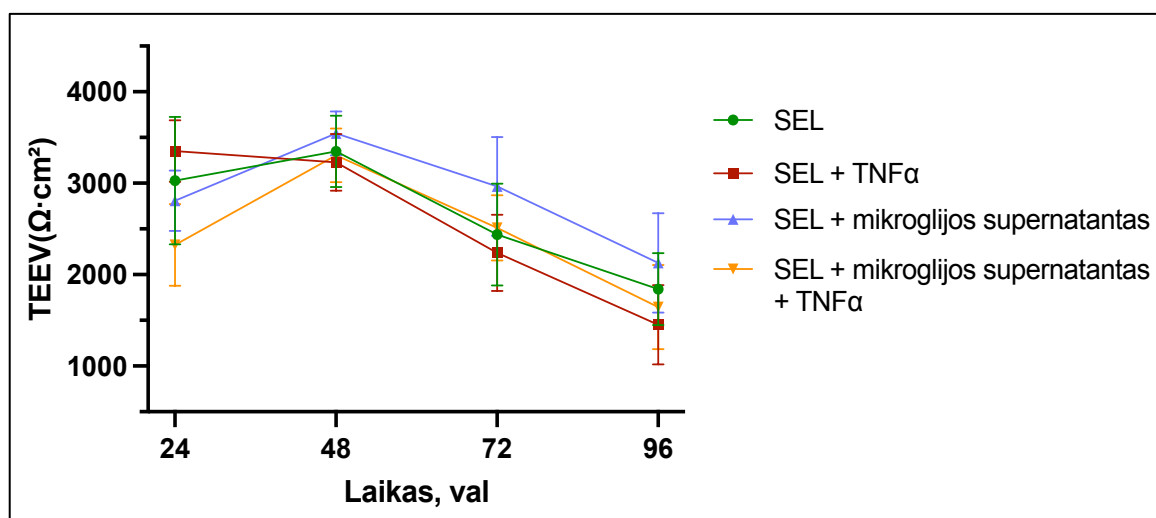
uždegiminėmis sąlygomis suintensyvėja MHC-I, bet, kitaip nei egzosomose, susilpnėja MFG-E8, sintetino-1 ir ANXA-1 raiška, o HSP70 raiška išlieka panaši, nepriklausomai nuo sąlygų.

Toliau tirtas MV poveikis SEL barjerinėms savybėms. Vietoje egzosomų, į po įdėklų esančią terpę buvo įpiltas 1 VV mikrovezikulių. Rezultatai pateikti 3.5.-1 pav., C. Kaip ir egzosomų atveju, nebuvo stebimi statistiškai reikšmingi skirtumai tarp sąlygų, tačiau pagal kreivę, galime stebėti pakilusias mikrovezikulėmis paveiktų SEL TEEV vertes 72 val. po poveikio. Vis dėlto, šie skirtumai akivaizdžiai sumažėjo praėjus dar 24 val. Tokiu būdu, kaip ir eksperimente su egzosomomis, fiziologinėmis ir uždegimo sąlygomis mikroglijos sekretuojamos mikrovezikulės neveikia SEL barjerinių savybių.

Gauti duomenys rodo, kad vezikuliniai mikroglijos sekretomo komponentai (egzosomos ir mikrovezikulės) neveikia SEL barjerinių savybių. Tai reiškia, kad efektus, kurie buvo stebėti kokultivuojant SEL ir mikrogliją, lėmė tirpūs (nevezikuliniai) sekretomo komponentai.

### 3.6. SEL ir mikroglijos ląstelių tarpusavio sąveikos svarba SEL monosluoksniui barjerinėms savybėms

Kokultūros modelyje gali vykti dvikryptė komunikacija tarp mikroglijos ir SEL, t.y. SEL sekretuojami parakrininiai veiksniai gali įtakoti mikroglijos sekretomą. Siekdami išsiaiškinti, ar dvikryptė komunikacija su SEL buvo būtina mikroglijos sąlygojamiems efektams kultivuotos SEL monosluoksnių monokultūros su supernatantais, surinktais nuo „ramybės“ ir aktyvuotos mikroglijos. Nors statistiškai patikimi skirtumai negauti, bendros tendencijos buvo panašios, kaip ir kokultūrų atveju – „ramybės“ mikroglijos supernatantai gerino SEL monosluoksnių barjerines savybes, o aktyvuotos mikroglijos blogino. Šie duomenys leidžia manyti, kad mikroglijos sekretuojamų



3.6.-1 pav. Mikroglijos parakrininių veiksnių ir TNF $\alpha$  poveikis SEL monokultūrų TEEV vertėms. Statistinė analizė atlikta su vienfaktore ANOVA ir Tukey testu; n = 3.

parakrinių veiksnių sąlygojami efektai nepriklauso nuo SEL ir mikroglijos ląstelių tarpusavio sąveikos.

## IŠVADOS

1. Iš iPKL diferencijuotų SEL monosluoksnių barjerinės savybės pasižymi KSB būdinga aukšta TEEV ir GJ baltymų kludino-5, okludino ir ZO-1 raiška;
2. Fiziologinėmis sąlygomis mikroglijos sekretuojami parakrininiai veiksniai gerina SEL monosluoksnių barjerines funkcijas;
3. Uždegiminės mikroglijos sekretuojami parakrininiai veiksniai slopina SEL monosluoksnių barjerinę funkciją.

## SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

AGNĖ JOKUBAUSKYTĖ

### **Mikroglijos parakrinių veiksnių poveikis smegenų kraujagyslių endotelio barjerinėms savybėms**

Kraujo-smegenų barjeras (KSB) kontroliuoja molekulinį mainus tarp smegenų parenchimos ir kraujotakos, bei užkertą kelią toksinų, patogenų, uždegiminių veiksnių patekimui į centrinę nervų sistemą. KSB yra daugiakomponentė struktūra, kurios pagrindą sudaro smegenų kraujagyslių endotelio ląstelės (SEL), kurios kartu su pericitais, neuronais, astrocitais ir mikroglia formuoja neurogliovaskulinį vienetą. Šiuo metu yra mažai žinoma apie mikroglijos poveikį KSB funkcinėms savybėms fiziologinėmis sąlygomis. Šiame darbe palygintas „ramybės“ ir uždegiminės mikroglijos sekretuojamų parakrinių veiksnių poveikis smegenų kraujagyslių endotelio ląstelių barjerinėms savybėms.

KSB *in vitro* modeliui naudotos SEL, diferencijuotos iš žmogaus indukuotų pluripotentinių kamieninių ląstelių. Kokultivavimo eksperimentai parodė, kad fiziologinėmis sąlygomis (neaktyvuota, „ramybės“) mikroglia statistiškai reikšmingai padidino SEL monoslouksnių transendotelinę varžą vėlyvosiose kokultivavimo stadijose. Tuo tarpu, uždegimine mikroglia (aktyvuota su 20 ng/ml navikų nekrozės faktoriu  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) neigiamai veikė SEL barjerines savybes. Gauti rezultatai rodo, kad „ramybės“ ir uždegiminės mikroglijos sekretuojamos ekstraląstelinės vezikulės (egzosomos ir mikrovezikulės) nėra atsakingos už efektus, kurie stebėti SEL ir mikroglijos kokultūrose. Mikroglijos sekretuojamų parakrinių veiksnių sąlygojami efektai taip pat nepriklauso nuo SEL ir mikroglijos ląstelių tarpusavio sąveikos.

Gauti rezultatai rodo, kad „ramybės“ būsenos mikroglia sekretuoja parakrinius veiksnis, kurie gerina SEL barjerines savybes. Šie duomenys leidžia manyti, kad fiziologinėmis sąlygomis mikroglijos sekretuojami parakrininiai veiksniai gali būti svarbūs KSB funkcijos palaikymui.

## SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER

AGNĖ JOKUBAUSKYTĖ

### **The effect of paracrine factors released by microglia on the barrier properties of brain endothelium**

Blood-brain barrier (BBB) controls the molecular exchange between the brain parenchyma and blood circulation, and prevents the entry of toxins, pathogens, inflammatory factors into the central system. The BBB is a multicomponent structure based on brain microvascular endothelial cells (BMECs), which, together with pericytes, neurons, astrocytes, and microglia, form the neurogliovascular unit. Currently, little is known about the effect of microglia on the functional properties of the BBB under physiological conditions. In this thesis the effects of microglial paracrine factors on the barrier properties of brain microvascular endothelial cells were compared in physiological and inflammatory conditions.

BMECs differentiated from human induced pluripotent stem cells were used for *in vitro* models of BBB. Co-cultivation experiments showed that physiological (non-activated, "resting") microglia statistically significantly increased the transendothelial resistance of BMEC monolayer at late stages of co-cultivation. Meanwhile, inflamed microglia (activated with 20 ng/ml tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) negatively affected the barrier properties of BMEC. Our results indicate that extracellular vesicles (exosomes and microvesicles) secreted by „resting“ and activated microglia are not responsible for the effects we observed in BMEC and microglia co-cultures. In addition, the effects mediated by microglial paracrine factors were also not dependent on interactions between BMEC and microglia.

The obtained results show that microglia in the "resting" state secrete paracrine factors that improve the barrier properties of BMEC. This data suggests that under physiological conditions microglial paracrine factors may be important in maintaining the functionality of the BBB.



## LITERATŪRA

1. Aires, I.D. *et al.* (2021) ‘Microglial Extracellular Vesicles as Vehicles for Neurodegeneration Spreading’, *Biomolecules*, 11(6), p. 770. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11060770>.
2. Akers, J.C. *et al.* (2013) ‘Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies’, *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>.
3. Alliot, F., Godin, I. and Pessac, B. (1999) ‘Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain’, *Developmental Brain Research*, 117(2), pp. 145–152. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3).
4. Andjelkovic, A.V. *et al.* (1998) ‘Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study’.
5. Appelt-Menzel, A. *et al.* (2017) ‘Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluri- and Multipotent Stem Cells’, *Stem Cell Reports*, 8(4), pp. 894–906. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.021>.
6. Armulik, A., Genové, G. and Betsholtz, C. (2011) ‘Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises’, *Developmental Cell*, 21(2), pp. 193–215. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.
7. Bachiller, S. *et al.* (2018) ‘Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, p. 488. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>.
8. Benson, K., Cramer, S. and Galla, H.-J. (2013) ‘Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond’, *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), p. 5. Available at: <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-5>.
9. Berthiaume, A.-A. *et al.* (2018) ‘Dynamic Remodeling of Pericytes In Vivo Maintains Capillary Coverage in the Adult Mouse Brain’, *Cell Reports*, 22(1), pp. 8–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.016>.
10. Bisht, K. *et al.* (2021) ‘Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PANX1-P2RY12 coupling in mice’, *Nature Communications*, 12(1), p. 5289. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25590-8>.
11. Borst, K., Dumas, A.A. and Prinz, M. (2021) ‘Microglia: Immune and non-immune functions’, *Immunity*, 54(10), pp. 2194–2208. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>.
12. Bruttger, J. *et al.* (2015) ‘Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System’, *Immunity*, 43(1), pp. 92–106. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.012>.
13. Cai, Y. *et al.* (2022) ‘Microglia in the Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimer’s Disease and Related Therapeutic Targets’, *Frontiers in Immunology*, 13, p. 856376. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856376>.
14. Canfield, S.G. *et al.* (2017) ‘An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial

- cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells', *Journal of Neurochemistry*, 140(6), pp. 874–888. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.13923>.
15. Chen, J. *et al.* (2018) 'CD146 is essential for PDGFR $\beta$ -induced pericyte recruitment', *Protein & Cell*, 9(8), pp. 743–747. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0484-5>.
  16. Chitu, V., Gökhan, Ş. and Stanley, E.R. (2022) 'Modeling CSF-1 receptor deficiency diseases – how close are we?', *The FEBS Journal*, 289(17), pp. 5049–5073. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.16085>.
  17. Chung, W.-S., Allen, N.J. and Eroglu, C. (2015) 'Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), p. a020370. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>.
  18. Clayton, K. *et al.* (2021) 'Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model', *Molecular Neurodegeneration*, 16(1), p. 18. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00440-9>.
  19. Császár, E. *et al.* (2022) 'Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions', *Journal of Experimental Medicine*, 219(3), p. e20211071. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20211071>.
  20. D'Anca, M. *et al.* (2021) 'Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: Role in the Pathogenesis and Potential Usefulness as Biomarkers and Therapeutic Tools', *Cells*, 10(7), p. 1733. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10071733>.
  21. Daneman, R. and Prat, A. (2015) 'The Blood–Brain Barrier', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), p. a020412. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>.
  22. Delsing, L. *et al.* (2020) 'Models of the blood-brain barrier using iPSC-derived cells', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 107, p. 103533. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103533>.
  23. Doll, D.N. *et al.* (2015) 'Mitochondrial Crisis in Cerebrovascular Endothelial Cells Opens the Blood–Brain Barrier', *Stroke*, 46(6), pp. 1681–1689. Available at: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009099>.
  24. El Andaloussi, S. *et al.* (2013) 'Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities', *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), pp. 347–357. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd3978>.
  25. Erickson, M.A., Wilson, M.L. and Banks, W.A. (2020) 'In vitro modeling of blood–brain barrier and interface functions in neuroimmune communication', *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), p. 26. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00187-3>.
  26. Fantin, A. *et al.* (2010) 'Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction', *Blood*, 116(5), pp. 829–840. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257832>.
  27. Gee, J.R. and Keller, J.N. (2005) 'Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(6), pp. 1145–1150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.004>.

28. Girolamo, F. *et al.* (2021) 'Neural crest cell-derived pericytes act as pro-angiogenic cells in human neocortex development and gliomas', *Fluids and Barriers of the CNS*, 18(1), p. 14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00242-7>.
29. Gullotta, G.S. *et al.* (2023) 'Microglia and the Blood–Brain Barrier: An External Player in Acute and Chronic Neuroinflammatory Conditions', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), p. 9144. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24119144>.
30. Guo, L. *et al.* (2019) 'Bi-allelic CSF1R Mutations Cause Skeletal Dysplasia of Dysosteosclerosis-Pyle Disease Spectrum and Degenerative Encephalopathy with Brain Malformation', *The American Journal of Human Genetics*, 104(5), pp. 925–935. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.03.004>.
31. Gurung, S. *et al.* (2021) 'The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling', *Cell Communication and Signaling*, 19(1), p. 47. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>.
32. Hamzah, R.N. *et al.* (2021) 'Exosome Traceability and Cell Source Dependence on Composition and Cell-Cell Cross Talk', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), p. 5346. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22105346>.
33. Haruwaka, K. *et al.* (2019) 'Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation', *Nature Communications*, 10(1), p. 5816. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13812-z>.
34. Herland, A. *et al.* (2016) 'Distinct Contributions of Astrocytes and Pericytes to Neuroinflammation Identified in a 3D Human Blood-Brain Barrier on a Chip', *PLOS ONE*. Edited by M.A. Deli, 11(3), p. e0150360. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150360>.
35. Holmgren, L. *et al.* (1991) 'Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression', *Development*, 113(3), pp. 749–754. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.113.3.749>.
36. Hosseinkhani, B. *et al.* (2023) 'Cerebral microvascular endothelial cell-derived extracellular vesicles regulate blood – brain barrier function', *Fluids and Barriers of the CNS*, 20(1), p. 95. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00504-6>.
37. Isola, A.L. and Chen, S. (2017) 'Exosomes: The Messengers of Health and Disease', *Current Neuropharmacology*, 15(1), pp. 157–165. Available at: <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160825160421>.
38. Kadry, H., Noorani, B. and Cucullo, L. (2020) 'A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity', *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), p. 69. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>.
39. Keaney, J. and Campbell, M. (2015) 'The dynamic blood–brain barrier', *The FEBS Journal*, 282(21), pp. 4067–4079. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.13412>.
40. Keren-Shaul, H. *et al.* (2017) 'A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease', *Cell*, 169(7), pp. 1276–1290.e17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>.

41. Krasemann, S. *et al.* (2017) ‘The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases’, *Immunity*, 47(3), pp. 566-581.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>.
42. Krasnow, S.M. *et al.* (2017) ‘Amplification and propagation of interleukin-1 $\beta$  signaling by murine brain endothelial and glial cells’, *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), p. 133. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0908-4>.
43. Lawson, L.J. *et al.* (1990) ‘Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain’, *Neuroscience*, 39(1), pp. 151–170. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W).
44. Li, Y. *et al.* (2024) ‘Extracellular Vesicles Maintain Blood-Brain Barrier Integrity by the Suppression of Caveolin-1/CD147/VEGFR2/MMP Pathway After Ischemic Stroke’, *International Journal of Nanomedicine*, Volume 19, pp. 1451–1467. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S444009>.
45. Lippmann, E.S. *et al.* (2012) ‘Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells’, *Nature Biotechnology*, 30(8), pp. 783–791. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt.2247>.
46. Lippmann, E.S. *et al.* (2014) ‘A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources’, *Scientific Reports*, 4(1), p. 4160. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep04160>.
47. Lok, J. *et al.* (2007) ‘Cell–cell Signaling in the Neurovascular Unit’, *Neurochemical Research*, 32(12), pp. 2032–2045. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9342-9>.
48. Malm, T.M., Jay, T.R. and Landreth, G.E. (2015) ‘The Evolving Biology of Microglia in Alzheimer’s Disease’, *Neurotherapeutics*, 12(1), pp. 81–93. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0316-8>.
49. Mathes, E. *et al.* (2008) ‘NF- $\kappa$ B dictates the degradation pathway of I $\kappa$ B $\alpha$ ’, *The EMBO Journal*, 27(9), pp. 1421–1421. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.91>.
50. Mathiisen, T.M. *et al.* (2010) ‘The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction’, *Glia*, 58(9), pp. 1094–1103. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.20990>.
51. Mayer, M.G. and Fischer, T. (2024) ‘Microglia at the blood brain barrier in health and disease’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, p. 1360195. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1360195>.
52. Neal, E.H. *et al.* (2019) ‘A Simplified, Fully Defined Differentiation Scheme for Producing Blood-Brain Barrier Endothelial Cells from Human iPSCs’, *Stem Cell Reports*, 12(6), pp. 1380–1388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.05.008>.
53. Nitta, T. *et al.* (2003) ‘Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5–deficient mice’, *The Journal of Cell Biology*, 161(3), pp. 653–660. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>.
54. Paolicelli, R.C. *et al.* (2022) ‘Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads’,

- Neuron*, 110(21), pp. 3458–3483. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>.
55. Pardridge, W.M. (2012) ‘Drug Transport across the Blood–Brain Barrier’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(11), pp. 1959–1972. Available at: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>.
  56. Peppiatt, C.M. *et al.* (2006) ‘Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes’, *Nature*, 443(7112), pp. 700–704. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05193>.
  57. Phan, T.K. *et al.* (2021) ‘Pannexin-1 channel regulates nuclear content packaging into apoptotic bodies and their size’, *PROTEOMICS*, 21(13–14), p. 2000097. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.202000097>.
  58. Pinho, A.G. *et al.* (2020) ‘Cell Secretome: Basic Insights and Therapeutic Opportunities for CNS Disorders’, *Pharmaceuticals*, 13(2), p. 31. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph13020031>.
  59. Pivoriūnas, A. and Verkhratsky, A. (2021) ‘Astrocyte–Endotheliocyte Axis in the Regulation of the Blood–Brain Barrier’, *Neurochemical Research*, 46(10), pp. 2538–2550. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03338-6>.
  60. Prinz, M. *et al.* (2021) ‘Microglia and Central Nervous System–Associated Macrophages—From Origin to Disease Modulation’, *Annual Review of Immunology*, 39(1), pp. 251–277. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-110159>.
  61. Raut, B. *et al.* (2021) ‘An Open-Source Add-On EVOM® Device for Real-Time Transepithelial/Endothelial Electrical Resistance Measurements in Multiple Transwell Samples’, *Micromachines*, 12(3), p. 282. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi12030282>.
  62. Saint-Pol, J. *et al.* (2020) ‘Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles’, *Cells*, 9(4), p. 851. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9040851>.
  63. Saitou, M. *et al.* (2000) ‘Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands’, *Molecular Biology of the Cell*. Edited by W.J. Nelson, 11(12), pp. 4131–4142. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131>.
  64. Shin, Y. *et al.* (2019) ‘Blood–Brain Barrier Dysfunction in a 3D In Vitro Model of Alzheimer’s Disease’, *Advanced Science*, 6(20), p. 1900962. Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.201900962>.
  65. Spampinato, S.F. *et al.* (2019) ‘Astrocyte-Derived Paracrine Signals: Relevance for Neurogenic Niche Regulation and Blood–Brain Barrier Integrity’, *Frontiers in Pharmacology*, 10, p. 1346. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01346>.
  66. Sproviero, D. *et al.* (2019) ‘Leukocyte Derived Microvesicles as Disease Progression Biomarkers in Slow Progressing Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients’, *Frontiers in Neuroscience*, 13, p. 344. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00344>.
  67. Stamatovic, S., Keep, R. and Andjelkovic, A. (2008) ‘Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to Open the Blood Brain Barrier’, *Current Neuropharmacology*, 6(3), pp. 179–192. Available at: <https://doi.org/10.2174/157015908785777210>.
  68. Sweeney, M. and Foldes, G. (2018) ‘It Takes Two: Endothelial-Perivascular Cell Cross-Talk in Vascular Development and Disease’, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, p. 154. Available

at: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00154>.

69. Sweeney, M.D. *et al.* (2019) 'Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back', *Physiological Reviews*, 99(1), pp. 21–78. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>.
70. Théry, C. *et al.* (2006) 'Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids', *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1). Available at: <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
71. Tran, M. *et al.* (2022) 'Human mini-blood–brain barrier models for biomedical neuroscience research: a review', *Biomaterials Research*, 26(1), p. 82. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00332-z>.
72. Verderio, C. *et al.* (2012) 'Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation', *Annals of Neurology*, 72(4), pp. 610–624. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.23627>.
73. Vorbrodt, A.W. and Dobrogowska, D.H. (2004) 'Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels'.
74. Wasielewska, S.C. *et al.* (2020) 'Modeling the Blood–Brain Barrier to Understand Drug Delivery in Alzheimer's Disease', in Neurochemistry Laboratory, Department of Psychiatry, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Charlestown, MA, USA and X. Huang (eds) *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Exon Publications, pp. 117–134. Available at: <https://doi.org/10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch7>.
75. Wolff, A. *et al.* (2015) 'In Vitro Blood–Brain Barrier Models—An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(9), pp. 2727–2746. Available at: <https://doi.org/10.1002/jps.24329>.
76. Wong, A.D. *et al.* (2013) 'The blood-brain barrier: an engineering perspective', *Frontiers in Neuroengineering*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>.
77. Woodburn, S.C., Bollinger, J.L. and Wohleb, E.S. (2021) 'The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress', *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), p. 258. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02309-6>.
78. Wu, D. *et al.* (2023) 'The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), p. 217. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>.
79. Xu, L., Nirwane, A. and Yao, Y. (2019) 'Basement membrane and blood–brain barrier', *Stroke and Vascular Neurology*, 4(2), pp. 78–82. Available at: <https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198>.
80. Yu, X., Ji, C. and Shao, A. (2020) 'Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders', *Frontiers in Neuroscience*, 14, p. 334. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00334>.
81. Zhou, B., Zuo, Y. and Jiang, R. (2019) 'Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases', *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6), pp. 665–673. Available at:

<https://doi.org/10.1111/cns.13123>.

82. Zou, J., Peng, H. and Liu, Y. (2021) 'The Roles of Exosomes in Immunoregulation and Autoimmune Thyroid Diseases', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 757674. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.757674>.

## **PRIEDAI**

1. 1 priedas, Naudoti antikūnai.



**1 lentelė.** Analizei naudoti pirminiai antikūnai.

<b>Taikinys</b>	<b>Katalogo nr.</b>	<b>Gamintojas</b>	<b>Skiedimas</b>
ANXA-1	# 3299	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
HSP70	# 4876	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
IL-1 $\beta$	# 12703	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
Kirptas IL-1 $\beta$	# 83186	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
MFG-E8	# sc-8029	Santa Cruz Biotechnology, JAV	1:500
MHC-I	# sc-55582	Santa Cruz Biotechnology, JAV	1:500
pI $\kappa$ B $\alpha$	# 2859	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
Prokaspazė-1	# 3866	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
pSTAT1 (Tyr701)	# 9167	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
Sintetinas-1	# 27964	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000
$\alpha$ -tubulinas	# 32-2500	Thermo Fisher Scientific, JAV	1:1000
$\beta$ -aktinas	# 8457	Cell Signaling Technology, JAV	1:1000

**2 lentelė.** Analizei naudoti antriniai antikūnai.

<b>Naudoti antikūnai</b>	<b>Katalogo nr.</b>	<b>Gamintojas</b>	<b>Skiedimas</b>
Antrinis antikūnas prieš pelę konjuguotas su Alexa Fluor 488	# A21200	Thermo Fisher Scientific, JAV	1:1000
Antrinis antikūnas prieš pelę konjuguotas su krienų peroksidaze	# 31430	Thermo Fisher Scientific, JAV	1:2000
Antrinis antikūnas prieš triušį konjuguotas su Alexa Fluor 594	# A21441	Thermo Fisher Scientific, JAV	1:1000
Antrinis antikūnas prieš triušį konjuguotas su krienų peroksidaze	# 7074	Thermo Fisher Scientific, JAV	1:2000