



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Ula Marija Statkevičiūtė

Makrofagų atsako į SARS-CoV-2 S baltymą tyrimas

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos studijų programa

Darbo vadovė

Dr. Asta Lučiūnaitė

Darbas atliktas

Imunologijos skyriuje, Biotechnologijų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete

Vilnius, 2025

TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS	4
1.LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1Imuninė sistema ir jos ląstelės.....	6
1.1.1 Makrofagų funkcijos.....	9
1.1.2 Makrofagų tipai	11
1.1.3 THP-1 ląstelės.....	12
1.2 Citokinai ir chemokinai	13
1.3 Fagocitozė	18
1.4 Virusai.....	21
1.4.1 Į virusus panašios žmogaus poliomos viruso dalelės.....	21
1.4.2 SARS-CoV-2 S baltymas	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	27
2.1 Ląstelių kultivavimas.....	27
2.2 Citokinų sekrecijos analizė.....	27
2.3 LDH testas	28
2.4 Western bloto analizė	29
2.5 Baltymo žymėjimas pHrodo dažu	30
2.6 Netiesioginė ELISA	30
2.7 Ląstelių veikimas pHrodo žymėtais baltymais	31
2.8 Ląstelių su VLP pHrodo poveikiu dažymas ir matavimas tėkmės citometru	31
2.9 Ląstelių veikimas imuniniais kompleksais.....	32
2.10 Duomenų analizė	33
3. REZULTATAI	34
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	44
IŠVADOS.....	49
LITERATŪROS SĄRAŠAS	50
SANTRAUKA	59
SUMMARY	60

SANTRUMPOS

CKR – chemokinių receptoriai

CXCL8 – interleukinas – 8

DAMP – organizme susidariusios, su pavojaus signalu susijusios molekulinės struktūros

ELISA – imunofermentinė analizė

IL-1 β – interleukinas 1 β

LDH – laktato dehidrogenazė

LPS – lipopolisacharidas

mAb – monokloniniai antikūnai

PAMP – su patogenais asocijuotos molekulinės struktūros

PMA – forbol-12-myristato-13-acetatas

PRR – molekulinės struktūros atpažįstantys receptoriai

RBD – receptorių surišantis domenas

S baltymas – SARS-CoV-2 viruso koduojamas spyglio baltymas

TNF – naviko nekrozės faktorius

VLP – į virusus panašios dalelės

IVADAS

Imuninė sistema - tai visuma ląstelių ir aktyviųjų molekulių apsaugančių organizmą nuo svetimų antigenų (Marshall et al., 2018). Makrofagai yra vieni iš imuninės sistemos fagocitų esančių organizmo audiniuose. Pagrindinės šių ląstelių imuninės funkcijos yra citokinų gamyba, fagocitozė, infekuotų ląstelių lizė ir antigeno pateikimas T ląstelėms (Faas ir de Vos, 2020). 1980 metais buvo aprašyta THP-1 žmogaus leukemijos monocitinių ląstelių linija, kuri plačiai naudojama monocitų ir makrofagų funkcijoms, mechanizmams, signaliniams keliams, maistinių medžiagų ir vaistų pernašos tyrimams (Chanput et al., 2014). THP-1 monocitus paveikus lipopolisacharidu (LPS), yra aktyvuojamas NF- κ B transkripcijos faktorius, kuris yra atsakingas už genų raišką, lemiančią uždegiminių chemokinių ir citokinų išskyrimą (Liu et al., 2018). Vienas iš tokių chemotaktinių citokinų yra CXCL8, dar žinomas kaip interleukinas-8. Šis chemokinas sukelia neutrofilų sutelkimą į uždegimo, infekcijos ar sužalojimo vietas (Xiong et al., 2022), taip pat skatina audinių atstatymą, kraujotakos atkūrimą po organų transplantacijos ir žaizdų gijimą (Cambier et al., 2023). Įvairūs chemokinių receptoriai (CKR), tarp jų ir CCR5, yra labai svarbūs koordinuojant ląstelių migraciją ir išsidėstymą ir dalyvauja daugelio infekcinių ir uždegiminių ligų procesuose (Zhang et al., 2021). Citokinai interleukinas-1 β (IL-1 β) ir naviko nekrozės faktorius (TNF- α) taip pat yra svarbūs uždegiminių reakcijų mediatoriai. Šie citokinai sveikame organizme atlieka svarbias homeostatines funkcijas, pavyzdžiui, reguliuoja maitinimąsi, miegą ir temperatūrą, taip pat dalyvauja kai kurių uždegiminių ir autoimuninių ligų patogenezėje (Ren ir Torres, 2008; Adegbola et al., 2018).

2019 metais COVID-19 pandemiją sukėlė sunkų ūminį kvėpavimo takų sindromą, sukeliantis virusas, žinomas kaip koronavirusas 2 (SARS-CoV-2). SARS-CoV-2 virusas plinta oru ir infekuoja žmogaus kvėpavimo takų ląsteles. Dažnesniais atvejais užsikrėtus šiuo virusu pasireiškia į peršalimą panašūs simptomai, o retesniais atvejais SARS-CoV-2 sukelia ūmų kvėpavimo sutrikimo sindromą (ARDS) bei sunkią pneumoniją, todėl šie simptomai yra atsakingi už aukštą mirtingumą (Zhu et al., 2020). Šio viruso genome koduojamas spyglio (S) baltymas lemia SARS-CoV-2 patekimą į organizmą jungiantis prie žmogaus angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2) (Hikmet et al., 2020). Kai virionas prisitvirtina prie plaučių kvėpavimo takų epitelio sluoksnių, sulenкта epitelio ląstelių membrana palengvina spyglio baltymo ir ACE2 jungimąsi, viruso šeiminingo atpažinimą, prisitvirtinimą bei invaziją (Hu et al., 2021). Atlikti

tyrimai rodo, jog SARS-CoV-2 S baltymas gali sukelti uždegimą (Frank et al., 2021), tačiau kituose moksliniuose straipsniuose minima, jog ląstelių veikimas tik S baltymu nesukelia uždegiminių citokinų sekrecijos (Hoepel et al., 2021). Dėl skirtingų moksliniuose straipsniuose pateiktų rezultatų, siekėme ištirti S baltymo uždegimines savybes makrofaguose.

Darbo tikslas: Įvertinti, ar SARS-CoV-2 S baltymas sukelia uždegiminį atsaką makrofagų tipo ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

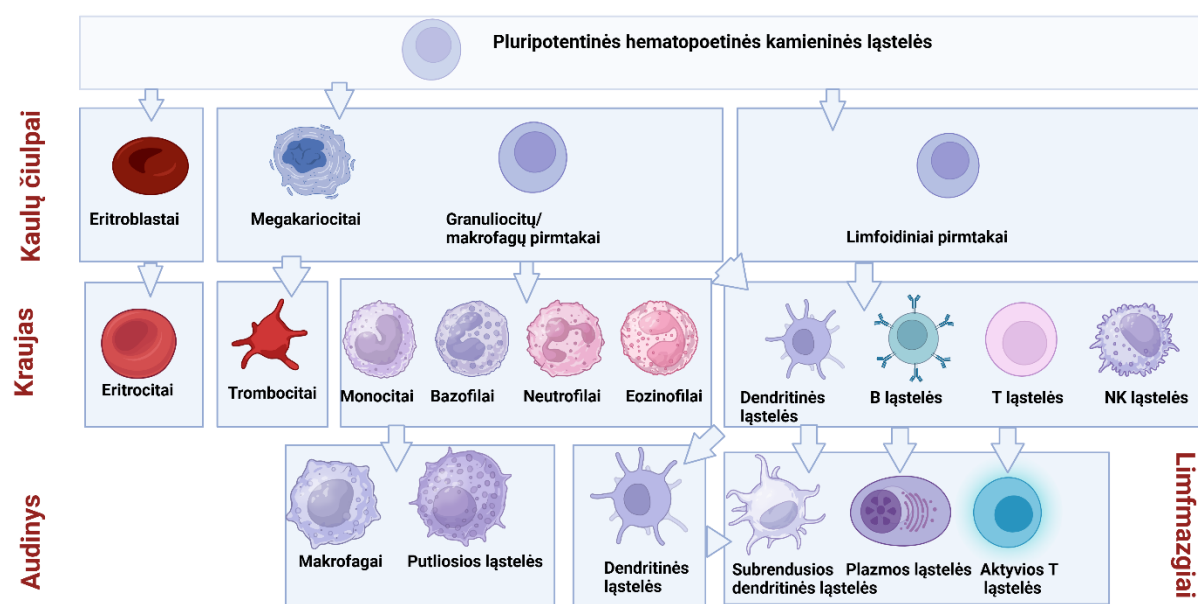
1. Įvertinti chemokino CXCL8 sekreciją THP-1 makrofaguose.
2. Nustatyti SARS-CoV-2 S baltymo sukiamą uždegiminių molekulių sekreciją THP-1 makrofaguose.
3. Nustatyti ar SARS-CoV-2 S baltymas yra fagocituojamas makrofagų tipo ląstelių.
4. Ištirti chemokinų receptoriaus CCR5 raišką makrofagų ląstelių paviršiuje, naudojant tėkmės citometrijos metodą
5. Nustatyti ar SARS-CoV-2 S baltymo ir antikūnų kompleksai, vadinami imuniniais kompleksais, patenka į THP-1 makrofagus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Imuninė sistema ir jos ląstelės

Imuninė sistema, tai visuma ląstelių ir aktyviųjų molekulių apsaugančių odą, kvėpavimo takus, žarnyną ir kitas sritis nuo svetimų antigenų, pavyzdžiui, mikrobus (bakterijų ir grybelių), virusų, vėžinių ląstelių ir toksinų (Marshall et al., 2018). Ją sudaro 2 dalys: įgytas ir įgimtas imuninis atsakas. Įgimtas imuninis atsakas yra pirmoji gynybos nuo infekcijų linija, kuriai priklauso monocitai, makrofagai, dendritinės ląstelės, granulocitai (neutrofilai, eozinofilai ir bazofilai), taip pat įgimtos limfoidinės ląstelės (ILC) bei NK ląstelės. Baltieji kraujo kūneliai kartu su kraujyje randamomis ląstelėmis, tokiais kaip raudonieji kraujo kūneliai, pernešantys deguonį, trombocitai, atliekantys kraujo krešėjimo funkciją pažeistuose audiniuose yra kilę iš kaulų čiulpų kamieninių kraujodaros ląstelių, vadinamų pluripotentinėmis ląstelėmis (Janeway et al., 2001). Iš šių ląstelių taip pat formuojasi mieloidinių ląstelių pirmtakai, kurie vėliau virsta imuninės sistemos ląstelėmis, tokiais kaip granulocitai, dendritinės ląstelės, putliosios ląstelės ir makrofagai. Makrofagai yra vieni iš imuninės sistemos fagocitų tipų ir yra plačiai paplitę organizmo audiniuose. Jie yra subrendusi monocitų forma, kuri cirkuliuoja kraujyje ir migruodama į audinius nuolat diferencijuojasi (Lendeckel et al., 2022). Kitos apsauginės ląstelės, tokios kaip dendritinės ląstelės, yra specializuotos priimti antigeną ir pristatyti jį limfocitams. Nesubrendusios dendritinės ląstelės migruoja iš kraujo, jos yra fagocitinės bei makropinocitinės, praryjančios daug aplinkinio ekstraląstelinio skysčio, bet susidūrusios su patogenais, jos greitai subręsta ir migruoja į limfmazgius (**1 pav.**) (Strizova et al., 2023). Pagrindinės įgimtojo imuniteto ląstelių funkcijos yra citokinų gamyba, fagocitozė, infekuotų ląstelių lizė ir antigenų pateikimas T ląstelėms (Faas ir de Vos, 2020). Fagocitai yra skirstomi į du pagrindinius ląstelių tipus: neutrofilus ir makrofagus. Abi šios ląstelės fagocituoja mikrobus ir žudo juos įvairiais baktericidiniais keliais, tačiau be fagocitinių savybių, neutrofiluose yra granulių ir fermentų, padedančių pašalinti patogeninius mikrobus. Skirtingai nuo neutrofilų, makrofagai yra ilgaamžės ląstelės, kurios ne tik atlieka fagocitozės vaidmenį, bet ir dalyvauja pateikiant antigeną T ląstelėms. Kitos imuninės sistemos ląstelės, tokios kaip eozinofilai irgi turi fagocitinių savybių ir atlieka svarbų vaidmenį naikinant parazitus, kurie dažnai yra per dideli, kad būtų fagocituojami. Kartu su putliosiomis ląstelėmis ir bazofilais jie taip pat kontroliuoja mechanizmus, susijusius su alergija ir astma (Marshall et al., 2018). Šios ląstelės atpažįsta mikrobams būdingas struktūras - su patogenais asocijuotas

molekulines struktūras (*angl. Pathogen associated molecular patterns, PAMPs*), pavyzdžiui, LPS arba flageliną. Jos taip pat atpažįsta ir eukariotų ląstelėms priklausančias molekules, pavyzdžiui, organizme susidariusias, su pavojaus signalu susijusias molekules struktūras (*angl. damage associated molecular patterns, DAMPs*). PAMP ir DAMP atpažinimui įgimtosios imuninės sistemos ląstelės turi specifinius receptorius vadinamus molekulinės struktūros atpažįstančiais receptoriais (PRR), iš kurių geriausiai žinomi yra TLR (Akira et al., 2006). Po ligando atpažinimo TLR aktyvuoja viduląstelinis signalinius kelius, kurie lemia ląstelių proliferaciją ir citokinių gamybą (Vasquez ir Zorro, 2013).



1 pav. Imuninės ląstelės ir jų kilmė. Visos kaulų čiulpuose esančios ląstelės yra kilusios iš pluripotentinių hematopoietinių kamieninių ląstelių, kurios vėliau yra diferencijuojamos į raudonuosius ir baltuosius kraujo kūnelius bei imuninės sistemos ląsteles. Iliustracija sukurta su BioRender programa (licenzijos nr. LJ27RGQL6I).

Įgytojo imuniteto vystymąsi skatina įgimtojo imuninio atsako procesai, kurie yra svarbūs, kai įgimtas imunitetas perduoda signalą, dėl esamų patogenų, įgytojo imuniteto ląstelėms ir šios sunaikina infekcijų sukėlėjus. Pagrindinės įgytojo imuninio atsako funkcijos yra specifinių nesavų antigenų atpažinimas, atskiriant juos nuo savų antigenų taip pat imuninės atminties, galinčios

greitai pašalinti konkretų patogeną, jei vėliau įvyktų infekcija, susidarymas. Šiam imunitetui priklauso antigenui specifinės T ląstelės, kurios aktyvuojamos per APC, ir B ląsteles, kurios diferencijuojasi į plazmines ląsteles, gaminančias antikūnus (Bonilla et al., 2010).

T ląstelės atsiranda iš kaulų čiulpuose esančių kraujodaros kamieninių ląstelių ir po migracijos subręsta užkrūčio liaukoje (**1 pav.**). Šios ląstelės ant savo membranos turi keletą unikalių antigenų surišančių receptorių, vadinamų T ląstelių receptoriais (TCR). Kiekviena T ląstelė turi vieno tipo TCR ir, jei gauna tinkamus signalus, gali greitai daugintis ir diferencijuotis. Yra žinoma, jog T ląstelėms, kad atpažintų konkretų antigeną, reikia APC, dažniausiai dendritinių ląstelių, bet taip pat makrofagų, B ląstelių, fibroblastų ir epitelio ląstelių, poveikio (Marshall et al., 2018). APC paviršiuje yra baltymų grupė, vadinama pagrindiniu audinių suderinamumo kompleksu (MHC). MHC skirstomi į I klasės, kuri randama ant visų ląstelių su branduoliu, arba II klasės, kuri randama tik ant tam tikrų imuninės sistemos ląstelių, įskaitant makrofagus, dendritines ląsteles ir B ląsteles. I klasės MHC molekulės pateikia endogeninius antigenus paverstus peptidais, o ant APC esančios II klasės molekulės pateikia T ląstelėms egzogeninius antigenus. Endogeniniai antigenai yra tie, kurie aptinkami ląstelės viduje, egzogeniniai antigenai jungiasi prie išorinių receptorių ir patenka endocitozės arba fagocitozės būdu. MHC baltymai rodo antigenų fragmentus, kai ląstelė yra užkrėsta viduląsteliniais patogenais, pavyzdžiui, virusu, arba fagocituoja svetimus baltymus ar organizmus (Bonilla et al., 2010). T ląstelės turi daugybę unikalių TCR, kurie gali prisijungti prie specifinių svetimų peptidų. Šios ląstelės suaktyvėja, kai susiduria su APC, kurios suvirškinusios antigeną pateikia tinkamus fragmentus, prisijungusius prie MHC molekulių. T ląstelių cirkuliacija per limfinę sistemą ir kraujotaką padidina galimybę šioms ląstelėms susidurti su APC, turinčiomis atitinkamą peptidų MHC kompleksą. MHC ir antigeno kompleksas aktyvuoja TCR, o T ląstelė išskiria citokinus, kurie toliau kontroliuoja imuninį atsaką. Šis antigeno pateikimo procesas skatina T ląsteles diferencijuotis pirmiausia į citotoksines T ląsteles (CD8⁺ ląsteles) arba T pagalbines (Th) ląsteles (CD4⁺ ląsteles). CD8⁺ ląstelės dalyvauja naikinant svetimkūnius, pavyzdžiui, virusus bei užkrėstas ląsteles. Jos aktyvuojamos TCR sąveikaujant su peptidu, prisijungusiu prie MHC I klasės molekulių. Citotoksinės T ląstelės sukuria efektorines ląsteles, kurios išskiria medžiagas, sukeliančias taikinio ląstelių apoptozę. Pasibaigus infekcijai, dauguma efektorinių ląstelių žūsta ir yra pašalinamos fagocitų, tačiau keletas šių ląstelių išlieka kaip atminties ląstelės, kurios gali greitai diferencijuotis į efektorines ląsteles, kai vėliau susiduria su tuo pačiu antigenu. CD4⁺ Th ląstelės atlieka svarbų vaidmenį nustatant ir

sustiprinant imuninį atsaką. Šios ląstelės neturi citotoksinio ar fagocitinio aktyvumo ir negali tiesiogiai naikinti infekuotų ląstelių ar šalinti patogenų, tačiau jos tarpininkauja imuniniame atsake, nurodydamos kitoms ląstelėms atlikti šias funkcijas. Th ląstelės aktyvuojamos TCR atpažinus antigeną, prisijungusį prie II klasės MHC molekulių. Aktyvintos Th ląstelės išskiria citokinus, kurie daro įtaką daugelio tipų ląstelių, įskaitant jas aktyvuojančias APC, veiklai (Marshall et al., 2018).

B ląstelės diferencijuojasi iš kaulų čiulpuose esančių kraujodaros kamieninių ląstelių (**1pav.**) ir subrendusios palieka kaulų čiulpus, o jų membranoje yra unikalūs antigeną surišantis receptoriai. Skirtingai nei T ląstelės, B ląstelės gali atpažinti antigenus tiesiogiai, be APC, naudodamos unikalūs antikūnus, išreikštus jų ląstelių paviršiuje. Pagrindinė šių ląstelių funkcija - gaminti antikūnus prieš svetimus antigenus, todėl jos turi toliau diferencijuotis ir tam tikromis aplinkybėmis B ląstelės taip pat gali veikti kaip APC. Aktyvuotos svetimų antigenų, kuriems jos turi atitinkamą specifinį receptorių, ląstelės dauginasi ir diferencijuojasi į antikūnus išskiriančias plazmines ląsteles arba atminties B ląsteles (Murphy et al., 2007). Šios ląstelės gamina didelį kiekį antikūnų (IgA, IgD, IgE, IgG and IgM), kurie patenka į kraujotaką ir audinius bei veiksmingai apsaugo nuo patogenų. B ląstelės, atsižvelgiant į jų funkciją gaminti antikūnus, vaidina svarbų vaidmenį humoralinio imuninio atsako metu, priešingai nei vykstant ląsteliniui imuniniui atsakui, už kurį daugiausiai atsakingos T ląstelės (Schroeder et al., 2010).

1.1.1 Makrofagų funkcijos

Makrofagai yra įgimtojo imuniteto ląstelės, esančios kiekviename audinyje ir būtinos homeostazei užtikrinti bei yra pirmoji gynybos linija prieš patogenus ir vėžines ląsteles (Watanabe et al., 2019). Kaip ir dauguma kitų imuninės sistemos ląstelių, makrofagai yra kilę iš pluripotentinių kraujodaros kamieninių ląstelių, susidarančių kaulų čiulpuose, išskyrus audiniuose reziduojančius makrofagus, kurie yra kilę iš eritromielodinių pirmtakų hematopoetinių ląstelių (Lendeckel et al., 2022, Hoeffel ir Ginhoux, 2018). Priklausomai nuo audinio, kuriame jie yra, makrofagai yra skirtingos struktūros, pavyzdžiui Kupferio ląstelės kepenyse arba Langerhanso ląstelės odoje. Suaugus, nesant stimuliuojančių veiksnių, cirkuliuojantys monocitai iš esmės nepapildo audiniuose reziduojančių makrofagų populiacijos. Suaugusio žmogaus daugelyje audinių reziduojantys makrofagai yra ląstelių, atsiradusių vystymosi metu ir cirkuliuojančių monocitų, mišinys, tačiau dėl pailgėjusios gyvenimo trukmės dauguma audinių makrofagų

atkeliauja iš cirkuliacijos (Lendeckel et al., 2022, Ginhoux et al., 2016). Monocitų diferenciacija į makrofagus gavus specifinius signalus yra sudėtingas procesas, kuriame dalyvauja įvairūs augimo veiksniai ir citokinai arba nuo kontakto priklausoma ląstelių sąveika, kuri priklauso nuo konkretaus audinio ar organo (Strizova et al., 2023). Makrofagai padeda apsisaugoti nuo patogenų ir pašalinti senstančias ar žuvusias ląsteles, taip pat atlieka svarbias funkcijas audinių homeostazėje ir atstatyme, pavyzdžiui žaizdų gijime ir raumenų regeneracijoje (Gordon ir Pluddemann, 2017). Jie taip pat dalyvauja geležies, bilirubino, kalcio, lipidų ir aminorūgščių apykaitoje ir padeda palaikyti pastovią šių medžiagų apykaitą organizme. Makrofagai atlieka svarbų vaidmenį audiniuose, kuriuose jie paprastai yra vienintelės esančios imuninės ląstelės. Akyse, sąnariuose, pieno liaukose ir kiaušidėse reziduojantys makrofagai palaiko audinių vientisumą integruodami iš audinių gaunamus signalus ir perduodami nurodymus kaimyninėms stromos ląstelėms (Mosser et al., 2021). Makrofagai taip pat randami žmogaus motinos piene, kur jie prisideda prie kūdikio virškinamojo trakto homeostazės ir atlieka reguliacines funkcijas, kurios svarbios kontroliuojant uždegimą (Panahipour et al., 2019).

Makrofagai yra svarbi pirmosios gynybos linijos dalis. Infekcijos, uždegimo ar audinių pažeidimo metu jie reaguoja į chemotaktinius signalus ir migruoja į pažeistą audinį ar uždegimo vietą, kur, vykstant fagocitozės procesui, praryja patogenus ir ląstelių liekanas. Šis procesas įvyksta fagolizosomose, kurios susidaro fagosomoms susiliejus su lizosomomis. Šis skaidymas ne tik padeda pašalinti patogeną ir išvalyti uždegimo vietą, bet ir palengvina gautų peptidų pateikimą specifinės imuninės sistemos ląstelėms, tokioms kaip T arba B limfocitai (Lendeckel et al., 2022). Makrofagai taip pat turi daugybę receptorių, atpažįstančių PAMP ir DAMP, susijusių su audinių pažeidimais. Įvykus šių molekulių prisijungimui prie receptorių, perduodami signaliniai keliai, sukeliantys genų raiškos pokyčius (Dalby et al., 2020). Dėl šių genų raiškos pokyčių susiformuoja M1 makrofagai, kurie yra uždegiminės prigimties. Net maži įprastinės organizmo būsenos pasikeitimai sukelia uždegiminių M1 makrofagų populiacijos susidarymą. Taip pat šios ląstelės sekretuoja įvairius uždegiminius citokinus ir chemokinus (Hamidzadeh et al., 2016, Mosser et al., 2021). Veikiant įvairiems stimuliuojantiems veiksniams, pavyzdžiui audinių pažeidimo atveju, iš kaulų čiulpų per chemokinų gradientus pritraukiama daug uždegiminių monocitų, makrofagų pirmtakų. Tokiais atvejais migruojančių makrofagų skaičius viršija audiniuose reziduojančių makrofagų skaičių ir dėl tokių priežasčių išsiskiriantys augimo veiksniai ir citokinai skatina

migruojančius ir reziduojančius makrofagus patirti esminius fenotipinius ir funkcinius pokyčius (Davies et al., 2013).

1.1.2 Makrofagų tipai

Įvairiuose audiniuose esantys makrofagai poliarizuoja priklausomai nuo aplinkos pokyčių ir formuoja skirtingus makrofagų tipus, pavyzdžiui, M1 makrofagus ir M2 makrofagus. Ant bakterijų membranų esantis lipopolisacharidas (LPS) gali paskatinti makrofagų poliarizaciją į M1 fenotipą, o interleukinas 4 (IL-4) gali paskatinti makrofagų poliarizaciją į M2 fenotipą (Yunna et al., 2020). M1 makrofagai reaguoja į uždegiminius procesus ir gamina su uždegimu susijusius veiksnius, tokius kaip IL-6, IL-12 ir naviko nekrozės faktorius (TNF) (Murray et al., 2014). Diferenciacija į M1 makrofagus taip pat priklauso nuo augimo veiksnių: granuliocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GM-CSF) ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (M-CSF). M1 makrofagai gali išskirti didelį kiekį uždegiminių citokinų IL-1 β , IL-6, TNF- α ir IFN γ , o IL-12 sekrecija gali paskatinti Th1 diferenciaciją. Didelis indukuojamos azoto oksido sintazės (iNOS) kiekis sukelia didelio azoto oksido kiekio susidarymą. Pastarasis kartu su reaktyviosiomis deguonies formomis (ROS) tarpininkauja viduląsteliname patogenų naikinimo procese (Kovacevic et al., 2017, Yamane ir Leung, 2016). M2 tipo makrofagai dalyvauja prieš uždegiminiuose procesuose bei atkuria pažeistus audinius, gamina daug prieš uždegiminių citokinų, tokių kaip IL-10 ir TGF- β bei atlieka svarbų vaidmenį slopinant uždegiminę reakciją (Murray et al., 2014, Strizova et al., 2023). Yra žinomi keli M2 makrofagų tipai: M2a, M2b, M2c, M2d (1 lentelė).

1 lentelė. Makrofagų tipai ir jų skirtumai.

Makrofagų tipas	Kas juos diferencijuoja	Kuo jie pasižymi
M1	LPS, GM-CSF, M-CSF	Aukšta IL-1 β , IL-6, TNF- α ir IFN γ molekulių sekrecija
M2a	IL-4 ir IL-13	Didele CD206 raiška
M2b	Imuniniai kompleksai ir TLR	Didele CD86 raiška
M2c	IL-10 ir gliukokortikoidai	Didele CD163 raiška
M2d	Adenozino receptoriai ir IL-6	Dalyvauja audinių atstatyme, pasižymi didele IL-10, VEGF,

		CCL5, CXCL10 ir CXCL16 molekulių sekrecija
--	--	--

M2a makrofagai, kuriuos indukuoja IL-4 ir IL-13, reguliuoja audinių atstatymą ir žaizdų gijimą bei pasižymi didele manozės receptoriaus (CD206) raiška, todėl gali fagocituoti apoptotines ląsteles ir ląstelių nuolaužas (Zhang et al., 2016). M2b makrofagai indukuojami reaguojant į imuninius kompleksus ir į TLR agonistus, tokius kaip LPS, ir gamina didelį kiekį priešuždegiminių, IL-10, ir uždegiminių, CCL1, molekulių. Šie makrofagai, išreiškiantys didelį CD86 kiekį, taip pat gali būti svarbūs antigeno pateikimui (Yue et al., 2017, Strizova et al., 2023). Į M2c makrofagus diferencijuoja IL-10 ir gliukokortikoidai, jie dalyvauja vėlyvosiose imuninių reakcijų fazėse ir kovoja su uždegiminiais procesais. Šie makrofagai taip pat pasižymi didele receptoriaus CD163 raiška, kuris vaidina svarbų vaidmenį šalinant haptoglobino ir hemoglobino kompleksus (Huang et al., 2018, Strizova et al., 2023). Paskutinis M2 makrofagų tipas - M2d susidaro stimuliuojant adenosino receptorių agonistais nepriklausomai nuo IL-4Ra signalo. Šie makrofagai yra susiję ne tik su audinių atstatymu, bet ir su vėžinių ląstelių invazija *in vitro* (Nikovics et al., 2020 ir Cao et al., 2015). M1/M2 makrofagų tipai gali pasižymėti persidengiančiomis savybėmis priklausomai nuo jų vietos audinyje bei signalinio kelio (Strizova et al., 2023).

1.1.3 THP-1 ląstelės

1980 metais Shigeru Tsuchiya su kolegomis aprašė žmogaus THP-1 ląstelių liniją (Tsuchiya et al., 1980). Ankstyvieji tyrimai rodo, kad THP-1 ląstelės savo morfologija ir diferenciacijos savybėmis yra panašios į pirminius monocitus bei makrofagus. Šios ląstelės yra pavienės, apvalios, turinčios aiškių monocitų žymenų (Qin, 2012). THP-1 yra žmogaus leukemijos monocitinių ląstelių linija, kuri plačiai naudojama monocitų ir makrofagų funkcijoms, mechanizmams, signaliniams keliams, maistinių medžiagų ir vaistų pernašai tirti (Chanput et al., 2014). Paveikus forbol-12-myristato-13-acetatu (PMA) THP-1 ląstelės prikimba prie auginimui skirtų plokštelių ir diferencijuojasi į makrofagų fenotipo ląsteles. Jos pasižymi ryškiomis morfologinėmis savybėmis - plokščios ir ameboidinės formos, kaip ir makrofagai. Diferenciacija su PMA lemia ryškesnį fenotipą su geresniu prikibimo lygiu prie plokštelių paviršiaus, mažesniu proliferacijos ir aukštesniu fagocitozės lygiu bei didesne CD11b ir CD14 ląstelių paviršiaus

žymenų raiška, lyginant su kitomis klasikinėmis diferencijavimui skirtomis medžiagomis - $1\alpha, 25$ -dihidroksi vitaminu D3 ($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ir M-CSF. Todėl su PMA paveiktos THP-1 ląstelės paprastai naudojamos makrofagų funkcijai tirti (Qin, 2012).

Makrofagai yra plastiškos ir nevienalytės ląstelės, nes dėl diferenciacijos mechanizmų skiriasi jų reakcija į dirgiklius ir lokalizacija audiniuose. Skirtingi CD4^+ T ląstelių tipai, atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant makrofagų diferenciaciją į skirtingus fenotipus. Su PMA diferencijuoti THP-1 makrofagai gali būti poliarizuojami į M1 arba M2 tipo fenotipus, naudojant tuos pačius dirgiklius, kurie taip pat aptinkami ir žmogaus organizme. Nustatyta, kad poliarizuojant THP-1 makrofagus padidėjo kelių M1 genų žymenų ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-12, IL-6 ir IL-8) ir M2 fenotipo žymenų (MRC-1, dektinas-1 ir DC-SIGN) reguliavimas (Chanput et al., 2014). THP-1 ląstelių linija yra plačiai naudojama kaip žmogaus monocitų ir makrofagų *in vitro* modelis atliekant uždegiminių ligų tyrimus. Yra žinoma, jog uždegiminiai monocitai žmogaus organizme yra diferencijuojami į makrofagus infekcijos vietoje. *In vitro* eksperimentuose šių ląstelių aktyvaciją galima pasiekti stimuliuojant THP-1 uždegimo aktyvatoriais, pavyzdžiui, LPS arba prouždegiminiais citokinais (Liu et al., 2018, Chanput et al., 2014). THP-1 monocitus paveikus LPS, yra aktyvuojamas NF- κ B transkripcijos faktorius, kuris yra atsakingas už genų raišką, lemiančią ląstelių proliferacijos, diferenciacijos, migracijos ir išgyvenimo aktyvinimą bei chemokinių ir citokinių išsiskyrimą (Liu et al., 2018). Imuninių procesų tyrimams pradinuose etapuose prasmingiausia naudoti *in vitro* ląstelių liniją, nes ji leidžia sumažinti genetinės variacijos poveikį, etinių klausimų keliamus apribojimus bei donorų pasiekiamumą ir prieinamumą. Bendrų kultūrų sistemos *in vitro* arba *ex vivo* sąlygomis gali būti žingsnis į priekį siekiant imituoti *in vivo* ir tam gali būti naudojamos THP-1 makrofagų kultūros su adipocitais, žarnyno ląstelėmis, dendritinėmis ląstelėmis ir T ląstelėmis (Chanput et al., 2014).

1.2 Citokinai ir chemokinai

M1 poliarizuoti makrofagai atlieka svarbų vaidmenį kovojant su virusinėmis infekcijomis, taikydami įvairias strategijas: per susidariusias reaktyvias O ir N formas (ROS ir RNS), aktyvindami imunines ląsteles bei skatindami uždegiminių citokinių ir chemokinių sekreciją (Strizova et al., 2023). Citokinai yra itin didelė uždegiminių ir priešuždegiminių veiksmų grupė, kuri yra suskirstyta į pogrupius pagal jų struktūrinę homologiją arba jų receptorius. Chemokinai yra citokinių šeimos baltymai, kurių bendra funkcija yra skatinti ląstelių migraciją. Chemokinai

reguliuoja kryptingą leukocitų migraciją ir aktyvaciją uždegiminių ir homeostatinių procesų metu, priklausomai nuo laiko ir vietos. Taip pat, chemokinais vaidina svarbų vaidmenį vykstant angiogenezei, navikų augimui ir metastazių formavimui, kraujo susidaryme, organogenezei, ląstelių išgyvenimui, proliferacijai, diferenciacijai ir daugeliui kitų procesų (Cambier et al., 2023). Chemokinais pagal savo biologinį aktyvumą priskiriami dviem kategorijoms: homeostazės palaikymui ir uždegimo iniciacijai. Homeostatiniai chemokinais dalyvauja palaikant normalią imuninės sistemos veiklą ir ląstelių paskirstyme hematopoiezės metu, o uždegiminiai yra gaminami infekcijų metu arba kaip atsakas į kitą uždegiminį stimulą. Citokino ar chemokino ligandui prisijungus prie jam giminio receptoriaus, vyksta jo aktyvinimas. Šis procesas sukelia signalinę kaskadą, reguliuojančią įvairias ląstelių funkcijas – fagocitozę, citokinų sekreciją, proliferaciją, apoptozę, angiogenezę bei proliferaciją (Ramesh et al., 2013).

Vienas iš chemotaktinių citokinų yra CXCL8, dar žinomas kaip interleukinas-8, kurį sekretuoja epitelio ląstelės ir makrofagai. Šis chemokinas sukelia neutrofilų sutelkimą į uždegimo, infekcijos ar sužalojimo vietas. Biologinis CXCL8 poveikis pasireiškia per jo prisijungimą prie dviejų su G baltymais susietų receptorių - CXCR1 ir CXCR2, kurie paprastai būna išreikšti monocituose, granulocituose ir endotelio ląstelėse bei nuo netipinio receptoriaus ACKR1 bei glikozaminoglikanų (Xiong et al., 2022, Horn et al., 2020). Reaguodami į chemokinus chemokinių receptoriai (CKR) yra labai svarbūs koordinuojant ląstelių migraciją ir išsidėstymą ir dalyvauja daugelio infekcinių ir uždegiminių ligų, taip pat navikų formavimosi ir metastazavimo procesuose. Chemokinių sistema yra sudėtingas tinklas, kuriame 23 CKR atpažįsta 50 chemokinių žmogaus ląstelėse. CKR ir chemokinių atpažinimas pasižymi gausia įvairove, nes vienas CKR jungiasi su daugeliu chemokinių, o vienas chemokinas atpažįsta tik kelis receptorių. Taip pat yra nustatyta, kad kai kurie CKR, įskaitant CCR5, gali aktyvuoti tolesnius signalinius kelius, nesant agonistui, todėl šios šeimos receptorių funkcijos moduliavimas tampa dar sudėtingesnis (Zhang et al., 2021). CXCL1-3 ir CXCL5-8 yra žmogaus neutrofilus pritraukiantys ir aktyvinantys chemokinais, o CXCL8 yra gausiausiai gaminamas citokinas. Neutrofilų patekimas iš kraujo į uždegimo vietą vyksta koordinuotai. Šio proceso metu vyksta neutrofilų patekimas per aktyvuotą endotelį, toliau chemoatraktantų receptoriai aktyvuojami ligandais, receptoriai suaktyvina integrinus ir įvyksta glaudus endotelio sukibimas. Vėliau neutrofilai iš kraujotakos persikelia per endotelį ir toliau juda link didelės chemoatraktantų koncentracijos uždegimo apimtuose audiniuose. Veiksmingam uždegimui neutrofilų įdarbinimui *in vivo* būtina CXCL8 imobilizacija ant GAG arba

proteoglikanų ir sąveika su CXCR1 ir CXCR2, kad būtų sukelta migracija (Cambier et al., 2023). Chemokinas CXCL8 ne tik reguliuoja neutrofilų aktyvaciją, bet ir tam tikromis sąlygomis reguliuoja chemotaksį ir aktyvina leukocitus. Taip pat yra atsakingas už IL-13/IL-4 stimuliuojamų monocitų, CD8⁺ T limfocitų ir putliųjų ląstelių aktyvaciją. Be to, CXCL8 gali reguliuoti neimuninių ląstelių migraciją ir skatinti ragenos neovaskuliarizaciją *in vivo*. CXCL8 ir kitų neutrofilus pritraukiančių chemokinių gamyba pažeistose epitelio ląstelėse ir trombocituose palaiko neutrofilų migraciją į žaizdos vietą, kad būtų pašalinti patogenai bei ląstelių liekanos. Kadangi CXCL8 gali reguliuoti neimuninių ląstelių migraciją ir angiogenezę, šis chemokinas skatina audinių atstatymą, kraujotakos atkūrimą po organų transplantacijos ir žaizdų gijimą (Barkaway et al., 2021, Cambier et al., 2023).

Interleukinas-1 β (IL-1 β) yra vienas iš pagrindinių uždegiminio atsako mediatorių. Šis citokinas gali būti sekretuojamas keratinocitų, fibroblastų, endotelio, neuronų, imuninių ląstelių ir sveikame organizme atlieka svarbias homeostatines funkcijas, pavyzdžiui, reguliuoja maitinimąsi, miegą ir temperatūrą (Ren ir Torres, 2008). Jis susidaro kaip neaktyvus pirmtakas, vadinamas pro-IL-1 β , reaguojant į PRR. Pro-IL-1 β reikškos iniciacija paprastai yra pradinis etapas ir šis procesas efektyviai neskatina molekulių sekrecijos. Užkrėsta ląstelė turi susidurti su kitu PAMP arba DAMP, kad paskatintų aktyvios IL-1 β molekulės sekreciją (Lopez-Castejon ir Brough, 2011). Pro-IL-1 β molekulė yra suardoma uždegiminės proteazės kaspazės-1. Kaspazė-1 aktyvuojama prisijungus prie daugiabaltyminio komplekso, vadinamo inflamosoma, sudaryto iš adaptorinių molekulių, sensoriaus ir prokaspazės-1 (Schroder et al., 2010, Malik ir Kanneganti, 2017). IL-1 β sekrecijos mechanizmui gali turėti įtakos stimulo tipas ir stiprumas, geriausiai žinomas ir plačiausiai naudojamas veiksnys yra išorinis ATP. Ši molekulė veikia per P2X7 receptorių ir sukelia nuo kaspazės-1 priklausomą IL-1 β išsiskyrimą (Lopez-Castejon ir Brough, 2011). Toks toksinas kaip nigericinas, taip pat sukelia nuo NLRP3 priklausomą IL-1 β išsiskyrimą (Nakanishi et al., 2018, Lopez-Castejon ir Brough, 2011). Yra žinoma, jog šis citokinas yra transliuojamas poliribosomose, kurios yra susijusios su citoskeletu, o ne su membrana. Didžioji dauguma IL-1 β molekulių LPS aktyvuotuose monocituose lokalizuojasi citozolyje, o jų sekrecija vyksta keliais mechanizmais (Zhang et al., 2015). Pirmasis jų yra autofagija - tai mechanizmas, kai citozolyje esančios pažeistos organelės ar baltymai uždaromi į dvigubos membranos struktūrą, vadinamą autofagosoma. Vėliau šios pūslelės susijungia su lizosomomis, suformuodamos autolizosomas, dėl to jų turinys suardomas proteolitiškai. Makrofagus paveikus LPS yra sukeliamas IL-1 β patekimas

į autofagosomas. Kai autofagija slopinama išsiskiria IL-1 β , o kai aktyvinama – suardomas (Harris et al., 2011). Kitas kelias, kuriuo dalis ląstelių gali sekretuoti IL-1 β , yra mikrovezikulų išsiskyrimas iš plazminės membranos. Mikrovezikulės, turinčios IL-1 β pasišalina prieš lipidui, fosfatidilserinui, pasislinkus į išorinį plazminės membranos sluoksnį. Mikrovezikulėse esantis citokinas yra biologiškai aktyvus ir gali būti išskiriamas po sąlyčio su IL-1 receptorių (IL-1RI) turinčiomis ląstelėmis. Trečiasis mechanizmas, kuriuo molekulės yra sekretuojamos, makrofagų žuvimo metu, yra per egzomas (Qu et al., 2009). Piroptozė yra prouždegiminė ląstelių žūtis forma, dėl kurios užsikrėtęs makrofagas žūsta pats ir kartu išskiria uždegiminius citokinus, pavyzdžiui, IL-1 β ir kitą kaspazės-1 substratą IL-18. Makrofagų piropnozės metu susiformuoja poros plazminėje membranoje ir sukelia osmosinę ląstelių lizę, kurią galima slopinti glicinu, tačiau porų formavimasis ir IL-1 β išsiskyrimas nesustabdomas. Šios nuo kaspazės-1 priklausomos poros gali būti kanalas, kuriuo IL-1 β patenka į užląstelinę erdvę (Bergsbaken et al., 2009). Taigi, IL-1 β yra stiprus uždegiminis citokinas, kurį gamina įgimtos imuninės sistemos ląstelės. Jis gaminamas be signalinės sekos ir nesiremia įprastiniu baltymų sekrecijos keliu, o naudoja vieną ar daugiau netradicinių sekrecijos būdų (Lopez-Castejon ir Brough, 2011).

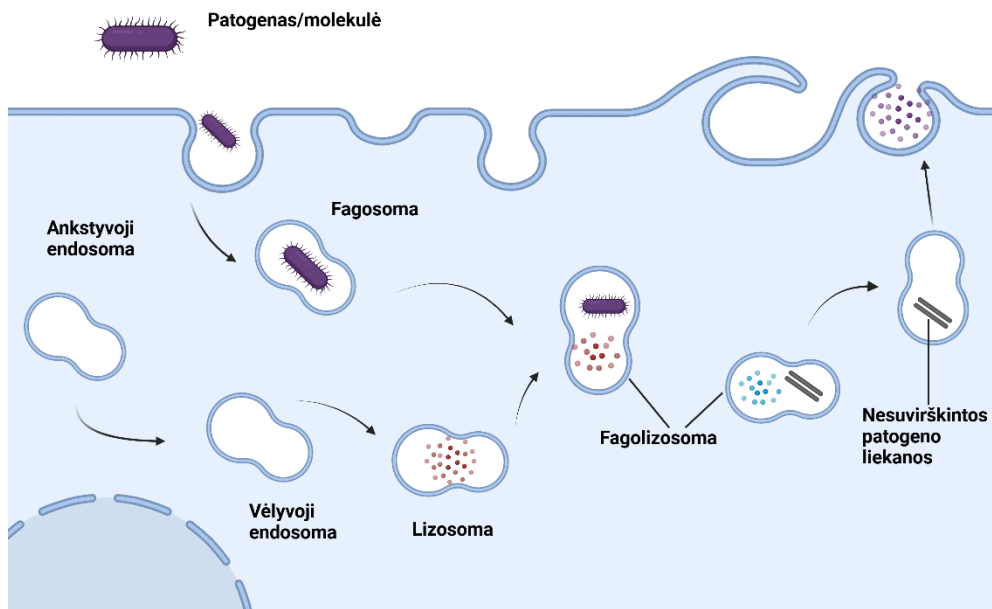
Nors IL-1 β būtinas kovojant su infekcijoms, jis taip pat prisideda prie pažeidimų lėtinių ligų metu, todėl IL-1 β išsiskyrimo mechanizmai yra gydymo mechanizmų taikiny. Yra žinoma jog molekulių sintezė ir sekrecija yra glaudžiai susiję procesai, todėl veiksmingiausias būdas slopinti IL-1 β išsiskyrimą yra per kaspazę-1. Peptidiniai inhibitoriai, atitinkantys IL-1 skilimo vietą, yra veiksmingi ir plačiai naudojami blokuojant IL-1 β išsiskyrimą (Dinarello, 2010). Sulfonilo karbamido vaistas gliburidas slopina ATP sukeltą IL-1 β išsiskyrimą, silpnindamas NLRP3 inflamomosos veiklą. Gliburidas taip pat slopina IL-1 β kaupimąsi sekrecinėse lizosomose. Lizosominės membranos plyšimas ir katepsino B aktyvumas yra svarbūs NLRP3 inflamomosų aktyvumui palaikyti reaguojant į kai kuriuos dirgiklius, tad katepsino B slopinimas susilpnina IL-1 β sekreciją. Taip pat šio citokino sekreciją slopina baltymų fosfatazės inhibitorius okadaino rūgštis, anijonų pernašos inhibitoriai, alkilinantys agentai, histonų deacetilazės inhibitoriai bei daugelis kitų. Todėl citokino IL-1 β slopinimo mechanizmų tyrimai, galėtų būti potencialūs kovojant su lėtinėmis ligomis (Lopez-Castejon ir Brough, 2011).

Citokinas, TNF- α , taip pat yra svarbus uždegiminių reakcijų mediatorius ir dalyvauja kai kurių uždegiminių ir autoimuninių ligų patogenezėje. Šio citokino sekreciją daugiausia sukelia

aktyvuoti makrofagai, T limfocitai ir NK ląstelės. Yra žinoma, jog jis pats gali sukelti daugybės įvairių uždegiminių molekulių išsiskyrimą (Jang et al., 2021). TNF- α egzistuoja tirpios ir transmembraninės formos. Transmembraninis TNF- α (tmTNF- α) yra susintetintas pirmtakas, kurį turi apdoroti TNF- α konvertuojantis fermentas (TACE) ir su membrana susieta dezintegrinų metaloproteinazė tam, kad šis citokinas būtų išskirtas kaip tirpus TNF- α (sTNF- α) (Jiang et al., 2017). sTNF- α yra svarbus įvairioms biologinėms funkcijoms per 1 tipo receptorių (TNFR1) ir 2 tipo receptorių (TNFR2) kaip ir transmembraninis TNF- α . TNFR1 yra išreikštas visuose žmogaus audiniuose ir yra pagrindinis TNF- α signalinis receptorių. TNFR2 paprastai išreiškiamas imuninėse ląstelėse ir palengvina biologinį atsaką (Jang et al., 2021). TNF- α prisijungia prie savo receptorių, daugiausia TNFR1 ir TNFR2 ir perduoda molekulinis signalus biologinėms funkcijoms, tokioms kaip uždegimas ir ląstelių žūtis, vykdyti (Pobezinskaya ir Liu et al., 2012). TNFR1 receptoriaus aktyvinimas paskatina skirtingų signalinių kompleksų formavimąsi, kurie sukelia skirtingas ląstelines reakcijas. Formuojantis I kompleksui aktyvuotas TNFR1 prisijungia prie TRADD bei sąveikauja su įvairiais komponentais, tokiais kaip RIPK1, TRAF2/5, cIAP1/2 (Holbrook et al., 2019). Yra žinoma, kad I komplekso signalinis kelias skatina uždegimą, audinių, ląstelių išlikimą ir dauginimąsi bei imuninę apsaugą nuo patogenų. Skirtingai nuo I komplekso, kuris yra surenkamas plazminėje membranoje, kiti kompleksai yra surenkami citoplazmoje. Komplexą Ila sudaro TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2, pro-kaspazė-8 ir Fas baltymas, o prie IIb komplekso sudėties dar prisideda RIPK3. Abiejų Ila ir IIb kompleksų, kurie dar yra vadinami apoptosomomis, susidarymas aktyvuoja kaspazę-8 ir sukelia apoptozę. Susidarymo metu TNFR2 kartu su TRAF1, cIAP1 ir cIAP2 pritraukia TRAF2 bei leidžia aktyvuoti NF- κ B, MAPK ir baltymų kinazę B. Pats TNFR2 daugiausia susijęs su homeostatinėmis bioaktyviosiomis funkcijomis, tokiomis kaip audinių regeneracija, ląstelių proliferacija ir išgyvenamumas. Taip pat žinoma, kad šis kelias sukelia uždegimines reakcijas ir šeimininko gynybą nuo patogenų. Pats TNFR1 yra būtinas citotoksiniui ir uždegiminiui TNF- α atsakui sukelti, o TNFR2 gali daugiausia dalyvauti ląstelių aktyvavacijoje, migracijoje ir proliferacijoje (Jang et al., 2021). Fiziologiniu požiūriu TNF- α yra svarbi normalaus imuninio atsako dalis. Šis citokinas gali suaktyvinti imuninės sistemos reguliavimą, tačiau netinkama arba per didelė TNF- α gamyba gali būti žalinga ir sukelti ligą. Per didelė citokino sekrecija skatina reumatoidinio artrito, uždegiminių žarnyno ligų ir psoriazės vystimąsi. Taigi TNF- α yra ne tik uždegiminių reakcijų mediatorius, bet ir galima jį priskirti prie pagrindinių įvairių patologijų vystymosi veiksmų (Adegbola et al., 2018).

1.3 Fagocitozė

Endocitozė - tai procesas, kurio metu ląstelės internalizuoja įvairias medžiagas, baltymus ir ląstelių dalis. Žinomi 4 pagrindiniai endocitozės būdai: (1) nuo klaritino priklausoma endocitozė, (2) nuo kaveolino priklausoma endocitozė (3) pinocitozė ir (4) fagocitozė. Pinocitozė yra daugumos žinduolių ląstelių ekstraląsteliniam skystyje esančių mažų dalelių patekimas (Ding ir Xiang, 2018). Klaritino valdoma endocitozė vyksta tuomet, kai klaritino baltymai prisijungia prie specifinių receptorių, o nuo kaveolino priklausoma endocitozė vyksta dėl ant plazminės membranos susidariusių pumpurų – kaveolių (Kawahata ir Fukunaga, 2023). Fagocitozė yra labai svarbus ląstelinis procesas, kurio metu įgimtosios imuninės sistemos ląstelės pašalina ląstelių liekanas, įskaitant negyvas ląsteles ir patogeninius mikroorganizmus (**2 pav.**) (Rennick et al., 2021).

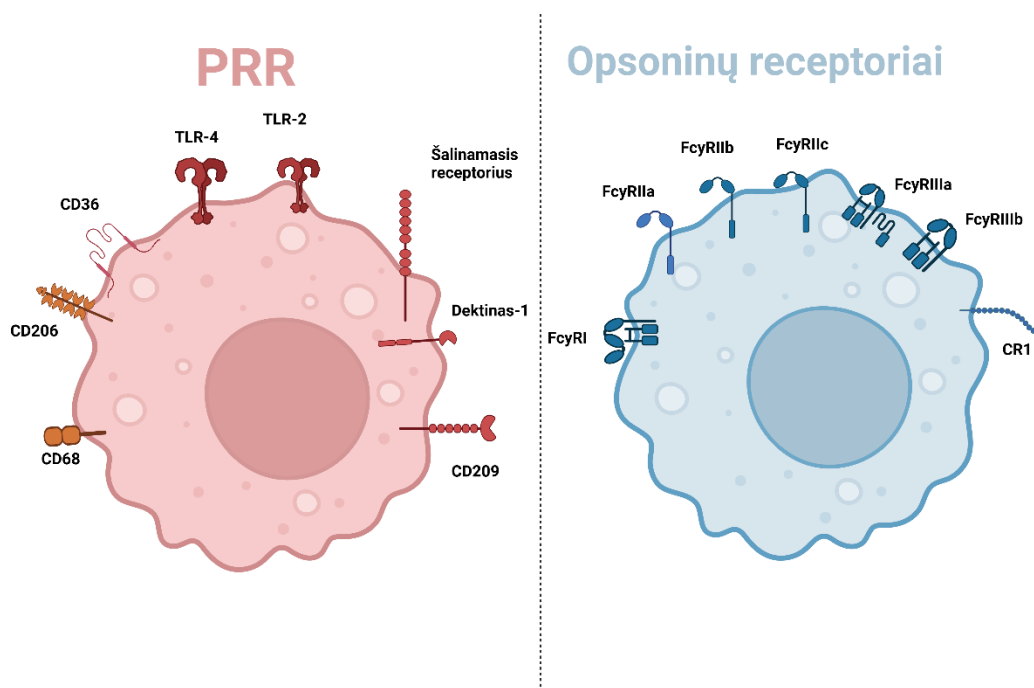


2 pav. Fagocitozės procesas. Patekęs į ląstelę patogenas yra apgaubiamas dvimembranės struktūros vadinamos fagosoma. Fagosoma kartu su patogenu susijungia su lizosoma ir suformuoja struktūrą vadinamą fagolizosoma. Nesuvirškintos patogeno liekanos yra pašalinamos iš ląstelės egzocitozės būdu. Iliustracija sukurta su BioRender programa (licenzijos nr. VX27MLHDEM).

Fagocitozė yra pradedama, kai specifiniai receptoriai, tokie kaip šalinamieji (*angl.scavenger*) receptoriai, susiriša su dalelėmis, pavyzdžiui, antikūnais, komplemento komponentais, tam tikrais oligosacharidais. Daleles arba mikroorganizmus apgaubia sandari membrana, kuri plečiasi aplink molekulę, kol ją visiškai uždaro ir atsiskiria nuo plazminės membranos (Lim et al., 2017). Tam, kad Src šeimos kinazių aktyvacija būtų ilgalaikė, reikia, kad pagrindinės fosfatazės, pavyzdžiui, CD45 ir CD148, būtų pašalintos iš fagocitozės vietos. Šis procesas priklauso nuo glaudaus makrofagą gaubiančios fagosominės membranos prigludimo bei aktino polimerizacijos ir integrinų. Signalinis tinklas sustiprina fagosominės taurės membranos ryšį su fagocituojama dalele, o CD45 ir CD148 fosfatazių pašalinimas pagreitina fagocitinės taurės plėtimąsi. Membranos išsiplėtimas ir fagosomos formavimasis priklauso nuo aktino citoskeleto, kuomet aktino filamentai depolimerizuojasi. Tai priklauso nuo kelių mažųjų GTPazių, įskaitant Cdc42, Rac ir RhoA, veikiančių kartu su tokiais efektoriais kaip WASP ir Arp2/3, kad būtų sukurtas aktino tinklas. Aktino pertvarkymas taip pat priklauso nuo trumpalaikių membranos lipidų pokyčių (Rennick et al., 2021). FcγR valdomos fagocitozės metu Rho GTPazės skatina F-aktino polimerizaciją, taip reguliuodamos citoskeleto dinamiką ir darydamos įtaką ląstelių poliariškumui bei judrumui. Kadangi fagolizosomų formavimuisi reikia, kad išnyktų fagosomą supanti F-aktino struktūra, Rho GTPazės dalyvauja šiame procese. Taip pat, Syk kinazė, kuri tarpininkauja FcγR signaliniam keliui, sustabdo F-aktino pertvarkymą aplink fagosomas, taip pagreitindama fagosomų susiliejimą su lizosomomis. Kai fagosoma bręsta, šis procesas apima daugybę sudėtingų membranos judėjimo etapų, Rab GTPazių veikimą, nuo mikrotubulių priklausomą judėjimą per dineiną ir dinaktiną, autofagosominio mechanizmo elementų įdarbinimą ir selektyvų su membrana susijusių komponentų paėmimą iš besiformuojančių fagolizosomų (Poloamina, 2023). Rab GTPazės yra baltymai atliekantys svarbų vaidmenį bręstant fagosomai. Rab5 dalyvauja ankstyvajame fagosomų brendime, reguliuodama susiliejimą su endosomomis, o Rab7 leidžia susidaryti vėlyvosios fagosomoms, lemiančioms fagolizosomų susidarymą. Kita GTPazė - Rab20 reguliuoja fagosomų brendimą FcγR valdomos fagocitozės metu (Prashar et al., 2017).

Makrofagai turi Fc (FcR) ir komplemento receptorius (**3 pav.**), kurie atpažįsta opsoninus, tokius kaip imunoglobulinai, CRP, SAP ir komplemento baltymai. Imunoglobulinai yra gerai žinomos molekulės, atpažįstančios svetimus mikroorganizmus. Imunoglobulinų struktūrą sudaro dvi sunkiosios ir dvi lengvosios grandinės. Fab fragmentas, kuris jungia antigeną ir Fc fragmentą,

prisijungusį prie fagocitų patogenų atpažinimo receptorių. Imunoglobulinas G (IgG) atlieka svarbų vaidmenį imuniniame atsake, nes suaktyvina klasikinį komplemento sistemos kelią makrofaguose. Taip pat imunoglobulino A (IgA) sąveika su Fc alfa receptoriais (Fc α Rs) tarpininkauja makrofagų fagocitozėje (Schroeder et al., 2010).



3 pav. Makrofagų receptoriai, kurie dalyvauja fagocitozės procese. Yra 2 makrofagų receptorių tipai: PRR ir opsoninų receptoriai. Iliustracija sukurta naudojant BioRender programą (licenzijos nr. BS27S0VA4T).

FcγR atpažįsta ir jungiasi su IgG, o Fc α R atpažįsta ir jungiasi su IgA. FcR valdoma fagocitozė sukelia internalizaciją klatrinu dengtose duobutėse ir pūslelėse bei patekimą į endosomas ir lizosomas. Ne visi FcR perduoda signalus, tačiau tiems, kurie tai atlieka reikia ITAM arba ITIM domenų - ITAM kelias yra uždegiminis, o ITIM kelias - prieš uždegiminis. Šiam receptoriui taip pat reikia ubikvitilino, kad galėtų dalyvauti fagocitozėje (Poloamina, 2023). Komplemento receptoriai pirmiausia atpažįsta ir jungiasi su komplemento baltymais. Nors yra keletas komplemento receptorių, tačiau nustatyta, jog tik CR3, CR4 ir CRIg yra ant makrofagų. CR3 ir CR4 dalyvauja fagocitozėje, leukocitų judėjime ir migravime, sinapsių formavime ir kostimuliacijoje. Kaip ir daugelio receptorių atveju, kitos biomolekulės gali turėti įtakos

komplemento receptorių raiškai ar funkcijai. Pavyzdžiui, Pyk2 yra būtinas CR3 valdomam fagocitozės procesui, nes prisideda prie fagocitozės skatinančių signalų koordinavimo už CR3, o vitaminas D reguliuoja CR1g raišką ir jo fagocitinį aktyvumą (Ray et al., 2018, Poloamina, 2023). CR3 (integrinas Mac-1) yra veiksmingiausias fagocitinis receptorių, kuris makrofaguose inicijuoja kitokio tipo fagocitozės nei dalyvaujant antikūnų Fcγ receptoriams. Jo medijuojama fagocitozė pasižymi tuo, kad dalelė nugrimzta į ląstelės membraną, o aplink ją nesusidaro pseudopodijos. Taip pat dalyvaujant FcγR naudojamas aktino citoskeletas, o CR fagocitozės metu - aktino ir mikrovamzdelių citoskeletas. Komplemento fagocitozės metu F aktino pertvarkymas priklauso nuo GTPazės Rho, bet ne nuo Rac ar Cdc42 aktyvacijos. Aktyvi Rho skatina aktino polimerizaciją dviem mechanizmais. Pirmiausia, Rho stimuliuoja Rho kinazę, kuri fosforilina ir aktyvuoja mioziną II. Tada miozinas aktyvuoja Arp2/3 kompleksą, kuris skatina aktino susitelkimą fagocitinėje taurėje. Antrasis mechanizmas - Rho gali paskatinti mDia1 ir polimerizuoto aktino kaupimąsi fagocitinėje taurėje. Taip pat, mDia1 tiesiogiai jungiasi su CLIP-170 baltymu ir užtikrina ryšį su mikrotubulių citoskeletu, būtinu CR valdomai fagocitozei (Querol ir Rosales, 2020). Taigi, fagocitozė yra esminis patogenų ir apoptotinių ląstelių pašalinimo procesas, kurį efektyviausiai atlieka profesionalūs fagocitai. Šią funkciją palaiko PAMP ir opsoninų bei PRR sinergija, kuri lemia fagosomų, lizosomų formavimąsi, ubikvitilinimą, fosforilinimą ir fosfolipidų pertvarkymą membranoje (Poloamina, 2023).

1.4 Virusai

1.4.1 Į virusus panašios žmogaus poliomos viruso dalelės

Į virusus panašios dalelės (VLP) - tai iš viruso baltymų sudarytos dalelės, imituojančios viruso struktūrą. Jose nėra viruso genetinės medžiagos, todėl jos negali infekuoti viruso šeimininko. VLP yra nanostruktūros, kurios gali būti sintetinės iš rekombinantinių virusinių baltymų, kurie yra randami įvairiose sistemose, įskaitant žinduolius, augalus, vabzdžius ir bakterijas. Šios dalelės taip pat gali būti naudojamos kaip įvairių biologinių, nanomedžiagų nešikliai (Nooraei et al., 2021). Polimerizuojant skirtingus viruso kapsidės baltymus susidaro VLP, kurių geometrinė simetrija paprastai būna ikosaedrinė, sferinė arba lazdelinė struktūros, priklausomai nuo to, iš kurio viruso ji buvo gauta. VLP paprastai galima suskirstyti į skirtingas grupes pagal jų struktūrinį sudėtingumą, o kapsidės baltymai gali būti išsidėstę vienu, dviem arba trimis sluoksniais. Kitos negu vieno sluoksnio VLP gali turėti daugiau nei vieną struktūrinį baltymą. VLP struktūra, sudaryta iš vieno baltymo, yra palyginti paprasta nei sudaryta iš kelių

baltymų. VLP, gauta iš ŽIV-1 ir gripo virusų, turi lipidų sluoksnį, kuriame yra viruso paviršiaus antigenų, supančių kapsidės struktūrą, o tai atspindi lipidinį apvalkalą, esantį natūralioje viruso dalelėje. Šios struktūros yra labai gerai organizuotos ir dėl savo geometrijos primena su patogenais susijusius struktūrinius modelius (PASP), kuriuos gali veiksmingai atpažinti imuninės sistemos ląstelės (Mohsen et al., 2018). Pagal lipidinio apvalkalo buvimą ar nebuvimą VLP dalelės yra skirstomos į du pagrindinius tipus: VLP su apvalkalu ir be apvalkalo. Taip pat pagal tai, ar juose esantys baltymai, suskirstyti į vieną sluoksnį ar kelis (Nooraei et al., 2021). Su apvalkalu esantys VLP turi matricinį baltymą, prie pat šeimininko lipidinės membranos, į kurią įsiterpia viruso glikoproteinai (Chroboczek et al., 2014). Į lipidinę membraną gali būti įterptas vienas ar daugiau glikoproteinų inkarų, kurie paprastai yra pagrindiniai tiksliniai antigenai, atpažįstami imuninės sistemos. Paprasčiausią VLP modelį sudaro vienos kapsidės VLP struktūra, pavyzdžiui, žmogaus papilomos viruso (ŽPV) VLP vakcinos. Šios paprastos VLP sudarytos iš vieno kapsidės baltymo, kuris gali būti išreikštas tiek eukariotinėse, tiek prokariotinėse sistemose. VLP dalelių įvairovė daro jas funkciškai skirtingas. Jos gali būti sukurtos taip, kad neštų polivalentines antigenines struktūras, kurios taip pat gali pristatyti antigeninius junginius į konkrečius tikslinius audinius. Šios dalelės buvo sėkmingai naudojamos kaip pagalbinės medžiagos stipriam imuniniam atsakui sukelti. Pasirinkus tinkamus VLP tipus, galima stimuliuoti ir įgimtąjį, ir įgytąjį imunitetą bei yra įrodyta, kad VLP pagrindu sukurtos vakcinos be jokių adjuvantų stimuliuoja humoralinį ir ląstelinį imunitetą per I ir II klasės MHC molekules (Nooraei et al., 2021).

2007 metais poliomos virusas (PyV) KI buvo aprašytas kaip tikėtinas žmogaus kvėpavimo takų infekcijų sukėlėjas (Caldeira et al., 2019). Šie virusai - tai maži virusai, pasižymintys didele šeimininkų įvairove ir skirtinga patologija. Jie gali transformuotis ląstelių kultūroje, kai kurie pasižymi navikiniu aktyvumu gyvūnų organizme. PyV priklauso *Polyomaviridae* šeimai, kuriai būdinga nedidelis, žiedinės, dvigrandės DNR genomai, kurio dydis yra apie 5 kbp. Šiuo metu *Polyomaviridae* šeimą sudaro 98 virusų rūšys, dauguma jų priskiriami keturioms gentims pagal LT baltymo filogenetinį ryšį: Alfa-, Beta-, Gama- ir Delta- polioma virusai (Calvignac-Spencer et al., 2016). Šios šeimos nariai užkrečia kai kuriuos stuburinius gyvūnus, taip pat virusų sekų rasta ropliuose ir nariuotakojuose (Torres, 2020). Virusų genomą sudaro viena reguliavimo ir dvi transkripcijos sritys. Nekoduojančioje kontrolinėje srityje (NKKR) yra viruso replikacijos pradžia ir ankstyvųjų bei vėlyvųjų genų promotoriai. Kaip ir kituose virusuose, ankstyvoji sritis koduoja baltymus, dalyvaujančius genomo replikacijoje arba atliekančius reguliacines funkcijas (didysis ir

mažasis naviko antigenai, LT ir ST), o vėlyvoji sritis koduoja struktūrinius baltymus (pagrindiniai viruso kapsidės baltymai 1 ir 2, VP1 ir VP2). Be to, kelių poliomavirusų genomuose yra ir kitų atvirų skaitymo rėmelių (ORF), tačiau jų raiška ir funkcijos daugeliu atvejų lieka nežinomos (Moens et al., 2017). Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, 50-80 % pasaulio gyventojų vaikystėje užsikrečia polioma virusais. Šių virusų ir jų antigenų poveikis įgimtam imunitetui visą gyvenimą nėra iki galo išaiškintas (Maloney et al., 2013).

1.4.2 SARS-CoV-2 S baltymas

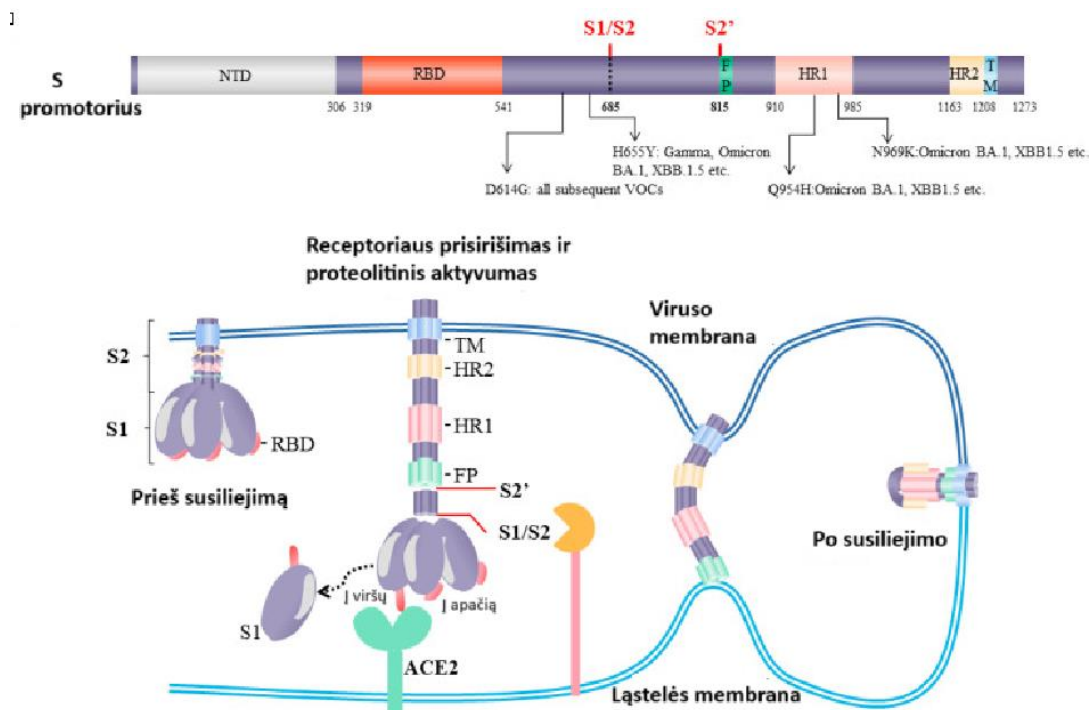
Sunkus ūminis kvėpavimo takų sindromas, žinomas kaip koronavirusas 2 (SARS-CoV-2) yra COVID-19 pandemijos sukėlėjas. SARS-CoV-2 virusas plinta oru ir infekuoja žmogaus kvėpavimo takų ląsteles. Dažnesniais atvejais užsikrėtus šiuo virusu pasireiškia į peršalimą panašūs simptomai, taip pat galima prarasti skonio ir kvapo pojūčius. Retesniais atvejais SARS-CoV-2 sukelia ūmų kvėpavimo sutrikimo sindromą (ARDS) bei sunkią pneumoniją, todėl šie simptomai yra atsakingi už aukštą mirtingumą (Zhu et al., 2020). Nors pasaulyje sukurta ir patvirtinta ne viena SARS-CoV-2 vakcina, tačiau jos tik ribotai stabdo viruso plitimą. Atsiradę nauji SARS-CoV-2 variantai kelia nuolatinę grėsmę vakcinų veiksmingumui (Yu et al., 2023).

SARS-CoV-2 yra viengrandinis RNR virusas, turintis apvalkalą. Jo genomus koduoja keturis struktūrinius baltymus: spyglio (S baltymas), apvalkalo, nukleokapsidės ir membranos. Šie struktūriniai baltymai, susijungę į virionus, palaiko viruso RNR perdavimą į ląstelės šeimininkės citoplazmą, tam, kad vėliau galėtų vykti viruso replikacija (Yu et al., 2023). SARS-CoV-2 patekimo į organizmą procesą pirmiausia lemia struktūrinis S baltymas, kuris jungiasi prie žmogaus angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2). Šis fermentas yra išreikštas viršutiniuose kvėpavimo takuose ir taip pat jis randamas kituose žmogaus organuose, pavyzdžiui, virškinamajame trakte, širdyje, inkstuose ir reprodukciniuose audiniuose. S baltymui prisijungus prie ACE2, vyksta jo proteolizė. Suskaidytas S baltymas persitvarko, kad sukeltų viruso ir šeimininko membranų susiliejimą ląstelės paviršiuje (Hikmet et al., 2020, Shang et al., 2020). Yra žinoma, kad membranos lenkimo sukeliamas tempimo jėga dalyvauja ląstelių kontakto ir endocitozės procesuose. Šie du fiziologiniai procesai yra panašūs į virusų prisitvirtinimą prie šeimininko ląstelių ir patekimą į jas. Kai virionas prisitvirtina prie plaučių kvėpavimo takų epitelio sluoksnių, sulenkta epitelio ląstelių membrana palengvina spyglio ir ACE2 jungimąsi, viruso šeimininko atpažinimą, prisitvirtinimą bei invaziją (Hu et al., 2021). Patekęs į taikinio ląsteles,

viruso RNR genomas yra gretai transliuojamas į efektorines molekules, o struktūriniai baltymai prieš patekdamį ant plazminės membranos patiria sudėtingus procesus tam, kad subręstų. Citoplazmoje esantys nestruktūriniai baltymai (NSP), tokie kaip NSP7, NSP8, NSP12 ir NSP13, sudaro nuo RNR priklausomos RNR polimerazės (RdRp) kompleksą, skirtą viruso genomo sintezei. Kitos efektorinės molekulės, nukreiptos į membranos organeles, sutrikdo ląstelių homeostatinius procesus, kad palengvintų virusų dauginimąsi (Yu et al., 2023). Įvairūs atlikti tyrimai rodo, jog SARS-CoV-2 baltymai gali veikti kaip PAMP ir sukelti uždegiminį atsaką per TLR, įskaitant TLR2 ir TLR4. TLR receptoriai, kuriais pasižymi įgimtosios imuninės sistemos ląstelės ir gali veikti kaip PRR. S baltymas prisijungia prie TLR4 ir sukelia uždegiminį atsaką THP-1 tipo ląstelėse (Frank et al., 2021).

Iš visų SARS-CoV-2 koduojamų baltymų S baltymai yra atsakingi už viruso prisijungimą prie šeimininko ląstelių paviršiuje esančių receptorių, membranų susiliejimą ir viriono susirinkimą. Šio viruso spyglio glikoproteinas yra I klasės sintezės baltymas, kurio suaktyvinimui reikalingas šeimininko receptoriaus prisijungimas. Prisijungus prie taikinio ląstelės receptoriaus, S baltymas patiria didelius konformacinius pokyčius tam, kad pasikeistų tarpinė struktūra, sujungianti viruso ir ląstelės membraną. Galiausiai spyglio sukelta membranų sintezė yra būtina tolesniam viruso RNR genomo perdavimui (Walls et al., 2020). Sulankstyti ir subrendę S baltymai sudaro homotrimerus, o po to sujungiami į virionus. Šie baltymai turi S1/S2 jungtį, kurią brendimo metu šeimininko ląstelės gali suskaidyti į S1 (N-galinį) ir S2 (C-galinį) subvienetus (Yu et al., 2023). SARS-CoV-2 S1 subvienete yra receptorių jungiantis domenas (RBD), kuris atpažįsta žmogaus ACE2. Taškinės mutacijos, įvykusios spyglio RBD, gali dar labiau padidinti S baltymo prisijungimo prie šio fermento afiniškumą. Yra kelios RBD konformacijos: aukšty (angl. “up”) – žymi receptoriui prieinamą būseną, o žemyn (angl. “down”) – receptoriui neprieinamą būseną. Aukšty konformacija yra palankesnė sąveikai su ACE2 arba ACE2 blokuojančiais neutralizuojančiais antikūnais, o žemyn konformacija maskuoja ACE2 sąveikos sąsajas ir slepia galimus antigen epitopus (Henderson et al., 2020). RBD konformacijas gali papildomai reguliuoti glikanai, riebalų rūgštys arba atskiros S1 subvienetų mutacijos, pavyzdžiui, aminorūgščių pakeitimas arba pakitęs hidrofobiškumas. Nepaisant struktūrinių pokyčių S1 subvienetas gauna patekimo signalą, kai prisijungia tikslinės ląstelės receptorių, ir paverčia jį S2 subvieneto aktyvinimo signalu (Yu et al., 2023). S2 subvienete yra konservatyvios sritys, kurios katalizuoja membranų susiliejimą. Vidinis sintezės peptidas yra hidrofobinis su membrana sąveikaujantis

baltymas, kuris suaktyvėja tik įsijungus receptoriui bei atsiradus proteolitiniam aktyvumui (Benton et al., 2020). Išlaisvintas sintezės peptidas sąveikauja su tikslinės ląstelės plazminė membrana, kad viruso membrana būtų pritvirtinta prie tikslinės ląstelės. Tam, kad būtų užbaigtas sintezės procesas, S2 iš esmės pakeičia savo struktūrą, daugiausia dėl heptadų pasikartojimo 1 (HR1) domeno pertvarkymo (**4 pav.**) Kadangi, S2 struktūrinis persitvarkymas katalizuoja viruso ir ląstelės membranų susiliejimą, yra labai svarbu, kada ir kur įvyksta S2 subvieneto struktūriniai pokyčiai (Walls et al., 2017).



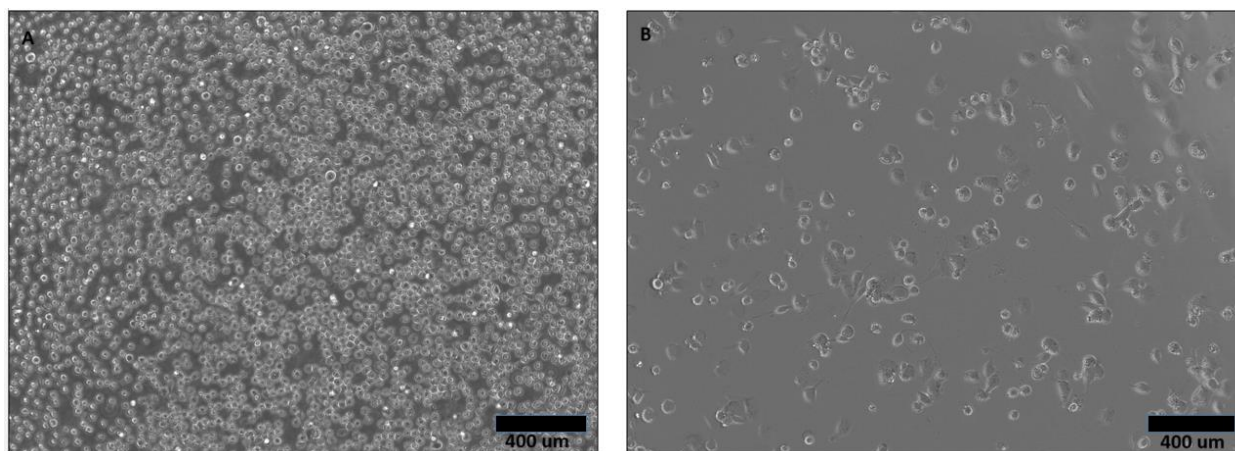
4 pav. SARS-CoV-2 spyglio homotrimeras atpažįsta tikslinės ląstelės ACE2, po to vyksta proteolitinė aktyvacija S1/S2 ir S2 vietose, kad būtų pradėtas konformacinis persitvarkymas. S2 skilimo metu atsiskiria sintezės peptidas (FP), kuris įsitvirtina ant tikslinės ląstelės membranos. Vėliau S2 struktūriniai pokyčiai sudaro sąlygas susidaryti spiralinei sąveikai tarp HR1 ir HR2 domenų. Ši sąveika galiausiai lemia viruso ir šeimininko membranų susiliejimą - tokiu būdu viruso genomai patenka į užkrėstas ląsteles. Iliustracija yra adaptuota iš Yu et al., 2023.

SARS-CoV-2 S1 subvienetas sukelia uždegimą, o pilno ilgio baltymas – uždegiminių citokinų raišką bei gali veikti kaip PAMP (Frank et al., 2021), tačiau kituose moksliniuose straipsniuose minima, jog ląstelių veikimas tik S baltymu nesukelia uždegimo ir citokinų sekrecijos. Prieš-SARS-CoV-2 IgG sukeliamas uždegimas priklauso nuo prieš-spyglio baltymo IgG titrų ir nuo mažo šio antikūno fukozilinimo. Sumažėjęs IgG fukozilinimas padidina afiniškumą FcγRIII. Uždegiminį atsaką, sukeltą anti- spyglio baltymo IgG, galima nuslopinti naudojant Syk slopiklį R406. Nuo Syk priklausomo FcγR signalinio kelio stimuliavimas sukelia žmogaus makrofagų metabolinį perprogramavimą, kuris pastebimas ir COVID-19 sergančiuose pacientuose (Hoepel et al., 2021). Taigi, tokie tyrimai yra pagrindas ateityje tirti S baltymo uždegiminį poveikį ląstelėse bei pritaikyti SARS-CoV-2 virusu sergančių pacientų gydyme.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Ląstelių kultivavimas

Žmogaus makrofagų ląstelių kultūros buvo paruoštos diferencijuojant THP-1 ląstelių liniją, gautą iš dr. Lino Mažučio grupės (Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas; **5 pav**). Ląstelės buvo užsėtos į plokštelę naudojant Gibco RPMI 1640 terpę (katalogo nr. 11875093), papildytą 10 % FBS ir 1 % P/S (Lot 2441842) ir diferencijuotos į makrofagus naudojant 100 ng/ml PMA (#P1585, Sigma). Po 48 valandų diferenciacijos terpė buvo pakeista šviežia terpe be PMA ir ląstelės paliktos ramybės periodui dar 24 valandas. Po šio periodo ląstelės tampa diferencijuotomis į makrofagų tipo ląsteles. Po diferenciacijos, jos buvo aktyvinamos su 100 ng/ml LPS (#5969-42-01) ar kitais veiksniais beseruminėje RPMI terpėje 24 valandas.



5pav. Monocitai su RPMI terpe (A), monocitai diferencijuoti į THP-1 makrofagus su PMA po 48 valandų (B). Nuotraukos padarytos naudojant EVOS FL Auto fluorescencinį mikroskopą, padidinimas 20x.

2.2 Citokinų sekrecijos analizė

Citokinų sekrecijai įvertinti naudojamas „sumuštinio“ tipo imunofermentinės analizės (ELISA) metodas. Tiriama CXCL8 (IL-8, katalogo nr. 900-T18, Peprotech), TNF- α (katalogo nr. 88-7346-88, Invitrogen), IL-1 β (katalogo nr. 88-7261-88, Invitrogen) sekrecija, naudojant molekulių nustatymo rinkinius ir atliekant matavimus pagal gamintojo nurodytas rekomendacijas. Tyrimas buvo atliekamas su ELISA 96 šulinėlių MaxiSorp plokštelėmis (katalogo nr. 442404,

Nunc). Pirmiausia plokštelėse sorbuojami pirminiai antikūnai su imobilizacijos buferiniu tirpalu. Plokštelės inkubuojamos 30 minučių kambario temperatūroje ant purtyklės ir per naktį laikomos 4°C temperatūroje. Kol vyksta inkubacija yra paruošiamas plovimo buferinis tirpalas (PBS ir 0,05% Tween) ir ELISA skiedimo tirpalas. Kitą dieną plokštelės yra plaunamos 3 kartus su plovimo buferiniu tirpalu, po kiekvieno plovimo leidžiant plokštelėms pastovėti apie 1 minutę. Plokštelės blokuojamos su ELISA skiedimo tirpalu ir inkubuojamos kambario temperatūroje 1 valandą. Kol vyksta inkubacija yra paruošiami žmogaus IL-8, IL-1 β ir TNF- α standartai, ištirpinant juos dejonizuotame vandenyje. Plokštelės yra plaunamos 3 kartus su plovimo buferiniu tirpalu. Toliau dedamas atitinkamas kiekis standarto ELISA skiedimo tirpale, kad būtų gauta 8 taškų kalibracinė kreivė. Į kitus šulinėlius dedami mėginiai, o kaip kontrolė - ELISA skiedimo tirpalą, plokštelės inkubuojamos per naktį 4 °C temperatūroje. Plokštelės yra plaunamos 3 kartus su plovimo buferiniu tirpalu. Paruošiami aptikimo antikūnai ir pilami į šulinėlį. Inkubuojama 1 valandą. Plokštelės yra plaunamos 3 kartus su plovimo buferiniu tirpalu, po kiekvieno plovimo leidžiant plokštelėms pastovėti apie 1 minutę. Dedamas avidino-peroksidazės (HRP) konjugatas ir inkubuojama 30 minučių. Plokštelės yra plaunamos 6 kartus su plovimo buferiniu tirpalu. Pašalinus plovimo tirpalą, į plokštelės pilama TMB tirpalo į kiekvieną šulinėlį, plokštelės yra laikomos pagal poreikį iki 20 minučių. Tuomet reakcija yra stabdoma pilant į kiekvieną šulinėlį pusę TMB tūrio 3,6% sieros rūgšties tirpalo. Tuomet skenuojamos plokštelės, ties 450 nm šviesos sugertimi ir 620 nm fono lygiu, toliau iš signalo atimama foninė vertė. Galutinė baltymo koncentracija mėginyje yra apskaičiuojama iš 2 mėginių pakartojimų vidurkio, padauginto iš skiedimo kartų. Koncentracijos vertė paskaičiuojama iš standartinės kreivės.

2.3 LDH testas

Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas atliekant laktato dehidrogenazės (LDH) nustatymo testą. Ląstelių žūtis metu išskiriamas LDH, tad LDH kiekis ląstelių supernatante įvertina ląstelių gyvybingumą. Po diferenciacijos ląstelės yra plaunamos ir veikiamos 300 μ l beserumine Gibco RPMI 1640 (katalogo nr. 11875093) terpe, dalis mėginių veikiami S baltymu 10 μ g/ml (Lot S204-CHO-F, Baltymas). Kiti šulinėliai paliekami be poveikio, jie naudojami kaip kontroliniai mėginiai, o į paskutinius 2 šulinėlius yra dedama 15 μ l 0,1% Triton X-100/PBS – teigiama kontrolė. Po poveikio yra surenkama ląstelių augimo terpė ir centrifuguojama 10 minučių 600G ir perkeliama

į naują mėgintuvėlį ant ledo. Dalis terpės naudojama LDH nustatymo testui, o likusi dalis yra užšaldoma -20°C . 50 μl mėginio dedama į plokštelę ir pridedama 50 μl dažo su katalizatoriumi (santykiu 1:45). Plokštelė uždengiama ir 30 minučių inkubuojama 37°C . Reakcija stabdoma pilant į kiekvieną šulinėlį 50 μl stabdymo tirpalo. Tuomet skenuojamos plokštelės, ties 450 nm šviesos sugertimi. Ląstelių gyvybingumas yra apskaičiuojamas pagal procentus nuo kontrolės. Mėginio signalo vertė dalinama iš teigiamos kontrolės signalų vidurkio ir dauginama iš 100.

2.4 Western bloto analizė

Po poveikio LPS buvo surinkta ląstelių augimo terpė. Iš šulinėlių nusiurbiamo terpė į atskirus mėgintuvėlius ir naudojama Western bloto tyrimuose arba užšaldoma -20°C . Pradžioje paleidžiama Tris–Gly–SDS elektroforezė su paruoštais ląstelių lizatų mėginiais. Po elektroforezės gelis, membrana (NC, #LC2000, Invitrogen), filtravimo popierėliai bei kempinės pamerkiami į pernešimo buferinį tirpalą. Modulyje reikiama tvarkama sudėliojamos kempinės, gelis, membrana, pašalinami oro burbuliukai ir užpilama pernešimo buferio iki katodo ribos ir nustatoma 15 V (180mA) 1 valandą. Po imunoblotingo membrana blokuojama su 5% BSA TBS (Tris-buferinis fiziologinis tirpalas, katalogo nr. #28379) 1 valandą ir inkubuojama per naktį su pirminiais CXCL8 antikūnais (1:1000, 3% BSA/TBST (Tris-buferinis fiziologinis tirpalas su 0,05 % Tween[®]20) ir 0,05% NaN_3 , Rabbit anti- CXCL8, #27095-1-AP, Proteintech) 4°C . Kitą dieną membrana yra plaunama TBST plovimo tirpale 3 kartus po 5 minutes. Tuomet membrana yra inkubuojama 1 valandą su antriniais antikūnais (Goat anti-rabbit-HRP IgG (H+L) Human IgG-Adsorbed Antibody #170-6515, BioRad) ir vėliau plaunama TBST plovimo tirpale 3 kartus po 5 minutes. Galiausiai membrana inkubuojama su substratu (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, #34577, Thermo Fisher Scientific) 5 minutes ir atliekama chemoluminescencinė analizė signalui įvertinti. Po skenavimo membrana dedama plautis TBST plovimo tirpale 3 kartus po 5 minutes ir inkubuojama 1 valandą su pirminiais įnešimo kontrolės antikūnais (Beta Actin Loading Control Monoclonal Antibody (BA3R), #MA5-15739, Thermo Fisher Scientific). Tuomet vėl plaunama bei ant jos uždedami fluorescuojantys antriniai antikūnai (Goat anti-mouse IgG Dylight 680, Lot VH311825, Invitrogen), su kuriais inkubuojama 45 minutes ir membrana dar kartą atplaunama bei atliekama chemoluminescencinė analizė.

2.5 Baltymo žymėjimas pHrodo dažu

Fagocitozės tyrimui virusiniai baltymai buvo pažymėti fluorescencine pHrodo žyme, kuri fluorescuoja esant rūgštiniui pH – lizosomose. Pirmiausia, ištirpinamas 100 µg *Green* pHrodo iFL (katalogo nr. P35373) dažo 15 µl DMSO. Ištirpintas dažas yra centrifuguojamas 5 minutes 20 000 G. Į mėgintuvėlį su jau esamu baltymu yra įdedama pHrodo dažo, inkubuojama 1 valandą kambario temperatūroje, apsaugant nuo šviesos. Vėliau nesureagavęs dažas pašalinamas iš konjugato dializės būdu. Mėginiai yra perkeliama į dializės mėgintuvėlius (katalogo nr. 71505-3, Merck) ir patalpinami į butelį su dializės buferiniu tirpalu bei laikomi per naktį ant magnetinės maišyklės šaltam kambarielyje. Kitą dieną mėginiai praskiedžiami 8 M guanidino-HCl tirpalu maždaug iki 0,1 mg/ml koncentracijos. Toliau matuojama fluoroforo sugertis ir mėginiai su NanoDrop esant 280 nm bangos ilgiui ir apskaičiuojama baltymų koncentraciją bei žymėjimo laipsnį (DOL). DOL (*angl. The degree of labeling*) - tai vidutinis dažo molekulių, sujungtų su baltymo molekule skaičius, kurį galima apskaičiuoti pagal gamintojo nurodytą formulę:

$$\text{DOL} = \text{pHrodo}^{\text{TM}} \lambda_{\text{max}} \times \text{skiedimas} / \epsilon_{\text{dažo}} \times \text{baltymo mėginyje koncentracija}$$

2.6 Netiesioginė ELISA

Įvertinti pHrodo dažų žymėtų S, Omicron ir VLP baltymų buvimą pagamintame pHrodo-baltymo konjugate buvo naudojama netiesioginė imunofermentinė ELISA. 96 šulinėlių Nerbe ELISA (katalogo nr. 10-111-0000) plokštelėje sorbuojama 5 µg/ml pHrodo-baltymo konjugato buferiniame tirpale 0,05M NaHCO₃ (pH 9,5) per naktį 4°C temperatūroje. Kitą dieną plokštelė plaunama plovimo buferiniu tirpalu ir blokuojama 1 valandą kambario temperatūroje su 2% BSA PBS tirpalu. Po blokavimo į šulinius dedami anksčiau laboratorijoje sukurti antikūnai: pelės monokloniniai antikūnai (MAb) anti-KIPyV 1.2 mg/ml (klonas #5G8/F8) ir pelės (MAb) anti-S 1 mg/ml (klonas #11E11) antikūnai (skiedimas 1:1000), o į kitą plokštelę dedami Sb#15 1 mg/ml (katalogo nr. Ab02013-10.159, Absolute antibody), CR3022 1 mg/ml (katalogo nr. Ab01680-10.0, Absolute antibody), Sb#14 1 mg/ml (katalogo nr. Ab02012-10.159, Absolute antibody) ir Sb#68 1 mg/ml (katalogo nr. Ab02017-10.159, Absolute antibody) žmogaus anti-S antikūnai ir plokštelės paliekamos inkubuotis 1 valandą. Vėliau plokštelė plaunama ir dedama ožkos antikūnų, aptinkančių pelės antikūnus, ir HRP konjugatas (katalogo nr. 31430, Thermo Fisher Scientific) skiedimu 1:5000 ir laikoma 30 minučių. Plokštelė vėl plaunama su plovimo buferiniu tirpalu.

Nusausinus plokštelę pilama TMB tirpalo į kiekvieną šulinėlį ir laikoma pagal poreikį iki 20 minučių. Tuomet reakcija yra stabdoma pilant į kiekvieną šulinėlį pusę TMB tirpalo. Galiausiai plokštelė skenuojama, ties 450 nm šviesos sugertimi ir 620 nm fono lygiu, toliau iš signalo atimama foninė vertė.

2.7 Ląstelių veikimas pHrodo žymėtais baltymais

Ląstelės užsėjamos ir diferencijuojamos 96 šulinėlių Nunc plokštelėje (katalogo nr. 167574) $0,03125 \times 10^6$ /šul. tankiu 200 μ l per šulinėlį. Po diferenciacijos ląstelės yra veikiamos fagocitozės slopikliu cytochalazinu D skiedimu 1:500 (pradinė koncentracija 5 mg/ml (katalogo nr. #PHZ1063)). Ląstelės su slopikliu palaikomos 30 minučių ląstelių inkubatoriuje ir tuomet dedamas pHrodo dažų žymėto baltymo poveikis. Su poveikiu ląstelės yra laikomos 2-4 valandas ir mikroskopuojamos. Po mikroskopavimo atliekamas ląstelių fiksavimas 4% PFA 100 μ l per šulinėlį ir paliekama 15 minučių. Po to atliekamas permeabilizavimas su Triton X-100 tirpalu, dedama 100 μ l per šulinėlį ir paliekama 10 minučių. Galiausiai atliekamas blokavimas su 2% BSA D-PBS tirpalu į kurį dedami pirminiai antikūnai (Mouse MAb anti-KIPyV 1.2 mg/ml (klono nr. #5G8/F8), Mouse MAb anti-S 1 mg/ml (klono nr. #11E11) santykiu 1:200 ir plokštelė paliekama per naktį šaldytuve. Kitą dieną plokštelėje nusiurbiami pirminiai antikūnai, šulinėliai praplaunami 200 μ l D-PBS. Ant mėginių uždedami antriniai antikūnai (1:1000). Į plokštelę dedamas Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (katalogo nr. #R37115) antrinis antikūnas ir inkubuojama 30 minučių apsaugant nuo šviesos. Galiausiai nusiurbiami antikūnai, šulinėliai praplaunami pora kartų su D-PBS ir mėginiai mikroskopuojami EVOS FL Auto fluorescenciniu mikroskopu naudojant GFP, TxRed ir TRANS kubus.

2.8 Ląstelių su VLP pHrodo poveikiu dažymas ir matavimas tėkmės citometru

Ląstelės yra užsėjamos ir diferencijuojamos 12 šulinėlių plokštelėje, $0,5 \times 10^6$ /šul. tankiu, 1,5 ml per šulinėlį. Po diferenciacijos atliekamas poveikis jau su beserumine terpe, galutinis poveikio tūris 500 μ l šulinėliui. Į 2 šulinėlius dedama terpės su VLP, pažymėto *Green* pHrodo dažų. Kiti šulinėliai paliekami kaip kontrolė. Ląstelės su poveikiu yra laikoma ląstelių inkubatoriuje per naktį (apie 24 valandas). Kitą dieną mėginiai dedami į ledo vonelę. Nusiurbus mėginių terpes, jos yra užšaldomos -20°C . Į šulinėlius įpilama D-PBS ir ląstelės su gremžtuku

švelniai atkabinamos ir surenkamos į 96 šulinėlių ELISA plokštelę su „U“ formos šulinėliais (katalogo nr. 650061). Plokštelė centrifuguojama 10 minučių 600G. Po centrifugavimo užpilama dažymo buferinio tirpalo (PBS su 2% BSA) ir dar kartą nucentrifuguojama. Toliau ant mėginių dedamas *Human True Stain FcX*, kuris sukurtas taip, kad blokuotų nepageidaujamą dažymą, susijusį su FcR, ir netrukdytų specifiskam žmogaus ląstelių dažymui antikūnais (katalogo nr. 422302) santykiu 1:50 ir 0,5 ul IgG2B antikūno 500 µg (katalogo nr. MAB0041) bei 15minučių inkubuojama. Kol mėginiai blokuojasi yra paruošiami 2 tirpalai: izotipinei kontrolei ir dažytiems mėginiams. Į izotipinės kontrolės mėgintuvėlį yra dedama 1 µl pelės antikūnų IgG2b kappa izotipo blokavimui (katalogo nr. REF 12-4732-81, Invitrogen), Alexa Fluor 647 Mouse IgG1, Isotype Ctrl (katalogo nr. 400130) ir 50 µl dažymo buferinio tirpalo. Į mėgintuvėlį, dažytiems mėginiams dedama Alexa Fluor anti-human CD83, (katalogo nr. 305316), X Human CCR5 Mouse mAb – Alexa Fluor 405 (katalogo nr. FAB184V), Anti-Hu CD86 (B7-2)(REF 12-0869-42, Invitrogen) ir 200 µl dažymo buferinio tirpalo. Plokštelė inkubuojama 30 minučių, apsaugant nuo šviesos. Po inkubacijos, yra naudojamas 5 µl 7-AAD gyvybingumo dažo (katalogo nr. Ref 00-6993-50, eBioscience) ir palaikoma 10 minučių. Šis dažas nepatenka į gyvybingas ląsteles ir jungiasi prie dvigubos DNR grandinės, įsiterpdamas tarp bazių porų G-C turtingose srityse. Po inkubacijos su 7-AAD plokštelės yra praplaunamos su dažymo buferiniu tirpalu ir nucentrifuguojamos 300G 5 minutes. Nusiurbus supernatantą, ląstelės suspenduojamos su D-PBS ir matuojamos tėkmės citometru BD FACS Symphony A1.

2.9 Ląstelių veikimas imuniniais kompleksais

Ląstelės buvo užsėjamos $0,0625 \times 10^6$ /šul tankiu 200 µl per šulinėlį ir diferencijuojamos 8 w µ-slide šulinėlių plokštelėje (katalogo nr. 80806, Ibidi). Po diferenciacijos poveikis buvo daromas su beserumine terpe, galutinis tūris šulinėliui 125 µl. S baltymas, žymėtas pHrodo dažu, sumaišomas su antikūnais. Tyrimo buvo naudojami Sb#15 1 mg/ml (katalogo nr. Ab02013-10.159, Absolute antibody), CR3022 1 mg/ml (katalogo nr. Ab01680-10.0, Absolute antibody), Sb#14 1 mg/ml (katalogo nr. Ab02012-10.159, Absolute antibody) ir Sb#68 1 mg/ml (katalogo nr. Ab02017-10.159, Absolute antibody) antikūnai, kurie sumaišyti su S baltymu buvo palaikomi 30 minučių termostate imuninių kompleksų suformavimui. Į 1 šulinėlį dedamas tik S baltymas su terpe, o kitas šulinėlis paliekamas kaip kontrolė. Uždėtas poveikis ant ląstelių buvo laikomas 2 valandas. Likus 30 minučių iki poveikio pabaigos į kiekvieną šulinėlį įdėta 5 µl *Cell Mask Deep*

Red plazminės membranos dažo (5 mg/ml, katalogo nr. C10046, Invitrogen). Po poveikio šulinėliai praplaunami 200 µl *Live cell imaging solution* (#A14291DJ, Invitrogen) ir mikroskopuojami su Leica SP8 konfokaliniu mikroskopu.

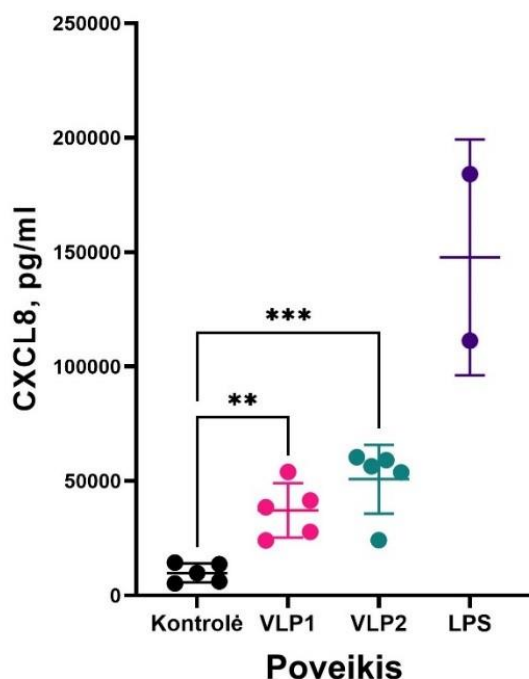
2.10 Duomenų analizė

Gautų duomenų analizė ir grafinis vaizdavimas buvo atliktas naudojant analizės programą GraphPad Prism. Buvo atlikti parametrinės statistikos ANOVA ir t testai. Tėkmės citometrijos duomenys buvo analizuojami naudojant FlowJo – v10.8.1 programą. Literatūros šaltiniai sudėti naudojantis Mendeley programa.

3. REZULTATAI

3.1 Chemokino CXCL8 sekrecijos tyrimo rezultatai

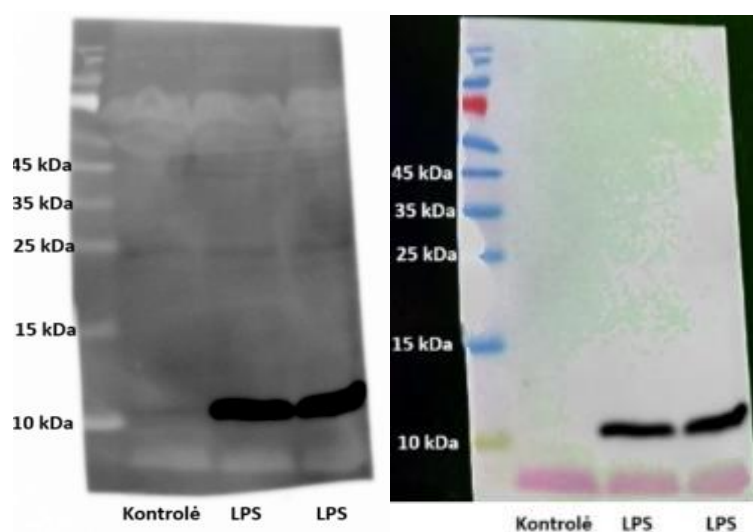
Pirmiausia buvo siekiama ištirti chemokino CXCL8 sekreciją THP-1 makrofaguose. Tam buvo naudojamas kontrolinis mėginys (tik ląstelių augimo terpė) bei stebimas poliomos viruso antigenų ir klasikinės uždegiminės molekulės LPS poveikis. Virusiniais antigenais buvo pasirinktos KI ir MC poliomos virusų į virusus panašios dalelės (VLP1 ir VLP2), žinant, kad jos sukelia uždegiminį signalą (Lučiūnaitė et al., 2022). Buvo nustatyta, jog ląstelės veikiamos VLP1 sekretuoja chemokiną CXCL8 (37203 pg/ml) vidutiniškai 3 kartus daugiau lyginant su kontroliniu mėginiu (14548 pg/ml) ir 5 kartus daugiau - veikiamos VLP2 (50793 pg/ml). Nustatyti statistiškai reikšmingi pokyčiai tarp kontrolinių bei VLP1 ir VLP2 mėginių ($p = 0,01$ ir $p = 0,001$). Didžiausią poveikį chemokino CXCL8 sekrecijai turėjo LPS (vidurkis 147741 pg/ml), juo veikiamos ląstelės sekretavo CXCL8 vidutiniškai 10 kartų daugiau nei kontrolinės ląstelės (**6 pav**).



6 pav. Chemokino CXCL8 sekrecija į makrofagus diferencijuotose THP-1 ląstelėse. Ląstelių augimo terpė buvo naudojama kaip kontrolinis mėginys, o virusiniais antigenais buvo pasirinktos KI ir MC poliomos virusų į virusus panašios dalelės - VLP1 ir VLP2. Žvaigždutės simboliai žymi

reikšmingus skirtumus tarp poveikių (** $p = 0,01$; *** $p = 0,001$), atliktas parametrinės statistikos ANOVA testas.

Taip pat siekiant įvertinti ar THP-1 ląstelės, paveiktos LPS, sekretuoja CXCL8 buvo nustatyta chemokino sekrecija surinktose terpėse. Mėginuose, kurie buvo paveikti LPS, buvo gautas stiprus signalas, tačiau kontroliniame mėginyje, jo detekcija buvo silpna (**7 pav**). Šie rezultatai parodė, kad THP-1 makrofagų tipo ląstelės gali sekretuoti didelį kiekį chemokino CXCL8.

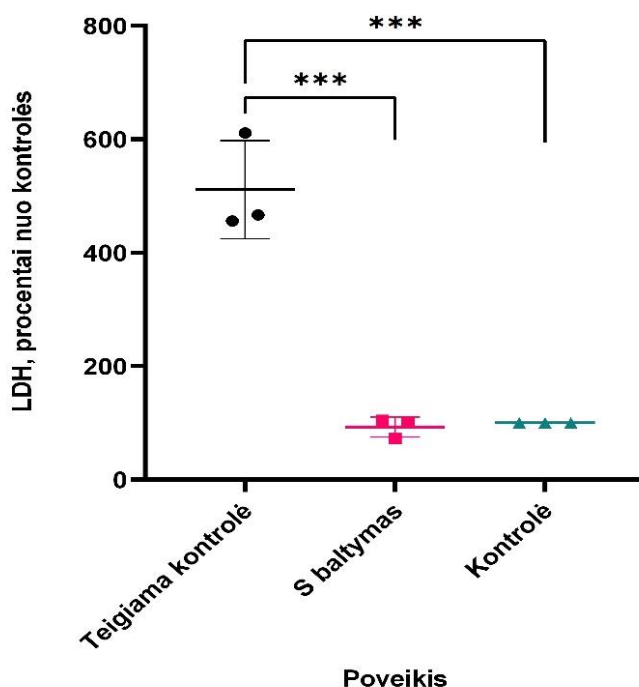


7 pav. Chemokino CXCL8 sekrecija į makrofagus diferencijuotose THP-1 ląstelių augimo terpėse po poveikio LPS, naudojant Western blo to analizę. Mėginiai buvo veikiami 24 valandas LPS. Atlikus chemoluminescencinę analizę signalui įvertinti buvo nustatyta chemokino juostelė maždaug ties 10 kDa.

3.2 S baltymo sukeliama uždegiminių molekulių sekrecijos tyrimo rezultatai

Siekiant įvertinti THP-1 makrofagų atsaką į S baltymą, pirmiausia buvo ištirtas S baltymo citotoksiškumas, atliekant fermento laktato dehidrogenazės (LDH) aktyvumo testą. Nustatyta, kad S baltymas nesukėlė didesnio LDH išskyrimo į ląstelių augimo terpę lyginant su kontrole. Ląstelės išskyrė fermentą vidutiniškai 5,5 karto mažiau nei lyginant su teigiama kontrole (511,24%) bei

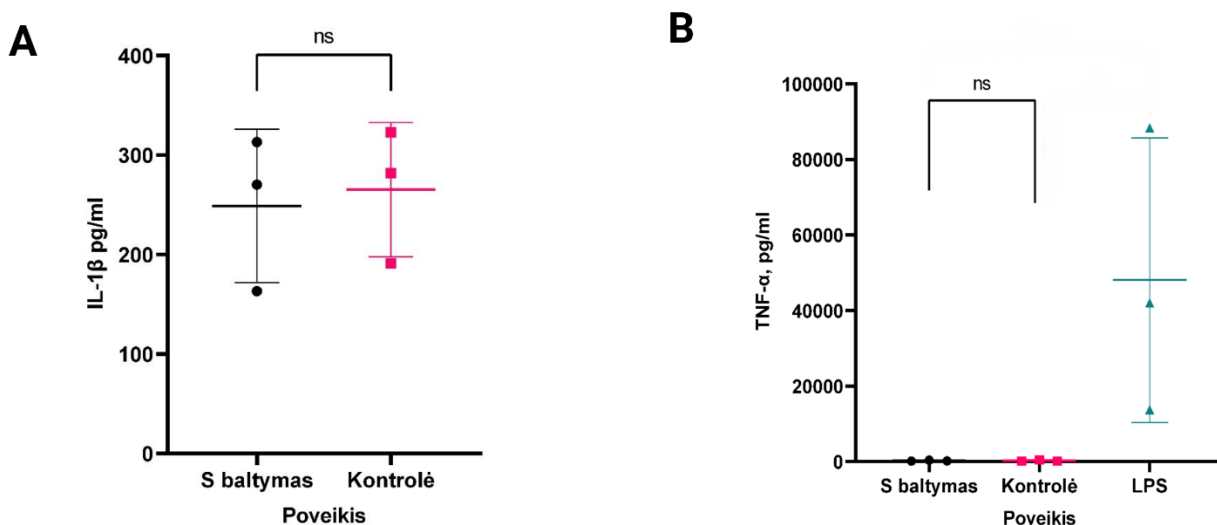
gauti rezultatai buvo panašūs į kontrolinius mėginius (100%) (**8 pav**). Taigi, S baltymas nėra citotoksiškas.



8 pav. S baltymo citotoksiškumo įvertinimas pagal LDH išsiskyrimą į makrofagus diferencijuotoms THP-1 ląstelėms. Ląstelės, veiktos tik augimo terpe buvo naudojamos kaip kontrolinis mėginys, o ląstelės paveiktos Triton X-100/PBS tirpalu kaip – teigiama kontrolė. Žvaigždutės simboliai žymi statistiškai nereikšmingus skirtumus tarp poveikių (**p = 0,0001), atliktas parametrinės statistikos t testas.

Toliau buvo tiriama S baltymo sukeliamą uždegimą sukelenčių molekulių sekrecija. Tyrimo metu buvo pasirinktos 2 uždegiminės mokelulės – IL-1 β ir TNF- α . Įvertinus citokino IL-1 β sekreciją buvo nustatyta, jog S baltymas nesukelia šio citokino sekrecijos lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų (**9 pav**). Taip pat buvo tiriama kito citokino, TNF- α , sekrecija. Kaip teigiama kontrolė naudota uždegimą sukelianti molekulė, LPS. LPS sukėlė aukštą šio citokino sekreciją (vidurkis 48065,3 pg/ml). Ląstelėse, veiktose S baltymu, TNF- α sekrecija nebuvo sukelta kaip ir kontrolinėse ląstelėse (**9 pav**). Šie

rezultatai rodo, kad mūsų naudotas pilno ilgio S baltymas nesukelia uždegiminių molekulių sekrecijos makrofaguose.

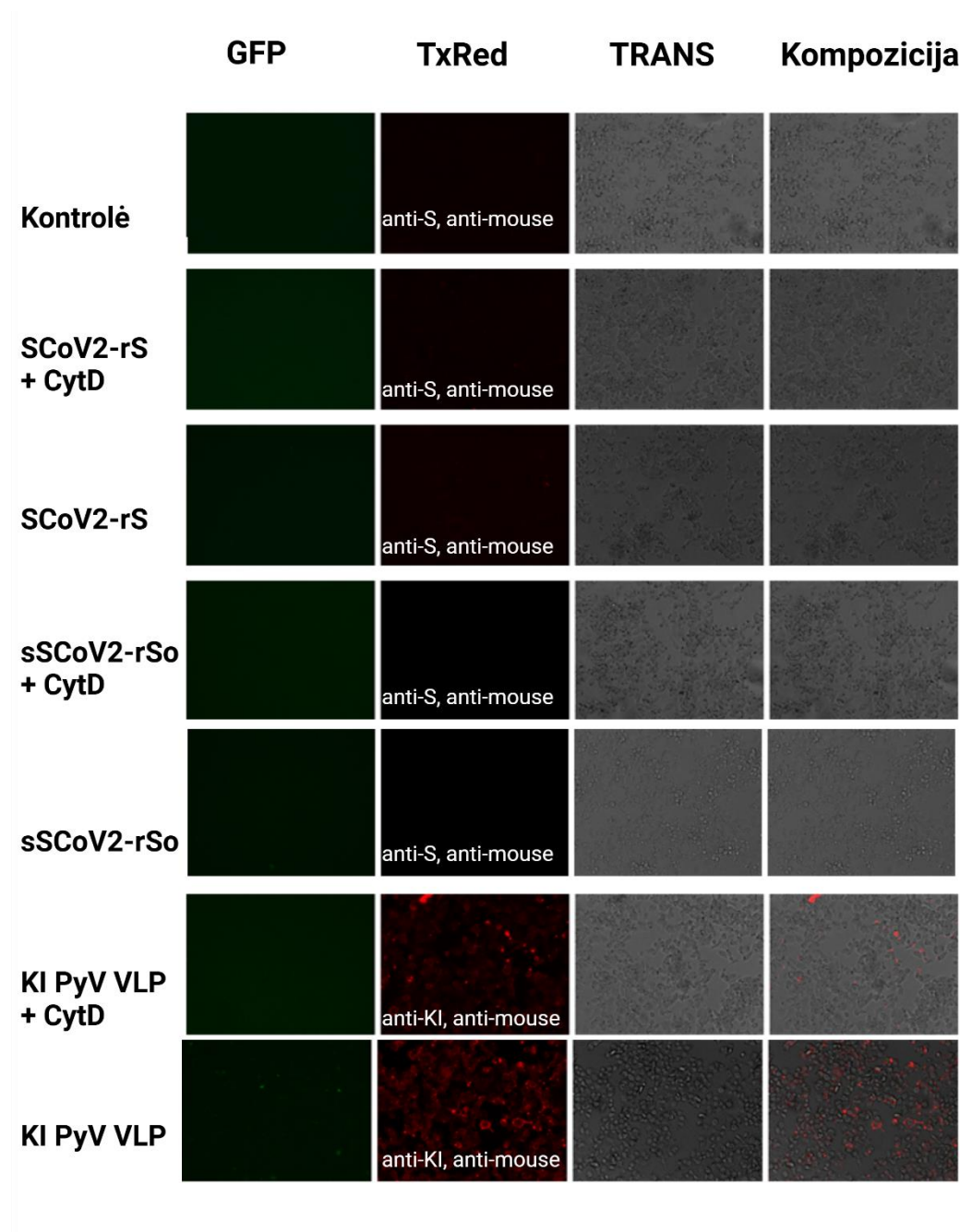


9 pav. Uždegiminių citokinų sekrecija į makrofagus diferencijuotose THP-1 ląstelėse. Po 24 valandų poveikio buvo surinkta ląstelių augimo terpė ir naudota citokinų sekrecijos analizei: (A) IL-1β, (B) TNF-α. Kontrolinės ląstelės buvo veiktos tik ląstelių augimo terpe. Ląstelės buvo veikiamos 20 μg/ml SARS-CoV-2 S baltymu. “ns” simboliai žymi statistiškai nereikšmingus skirtumus tarp poveikių.

3.3 S baltymo fagocitozės THP-1 ląstelėse tyrimo rezultatai

Nustačius, jog S baltymas nesukelia uždegiminių molekulių sekrecijos, toliau tyrėme, ar S baltymas patenka į ląsteles. Tam buvo naudojami *Green* pHrodo dažų žymėti SARS-CoV-2 S ir omicron viruso atmainos S baltymai. Fagocitozės metu S baltymai turėtų patekti į lizosomas, kuriose yra rūgštinis pH. Esant tokiai terpei *Green* pHrodo fluoroforas fluorescuoja. Tiriant *Green* pHrodo signalą, jis nustatytas tik teigiamos kontrolės ląstelėse su VLP poveikiu (**10 pav**). Toliau tiriant ar S baltymas nepatenka į THP-1 ląsteles buvo atlikta imunocitocheminė analizė. Nustatyta, jog antikūnais dažytos ląstelės po poveikio S baltymais, nepasižymėjo fluorescencija kaip ir

kontrolinės ląstelės. Eksperimento metu kaip teigiama kontrolė buvo naudojamos VLP, kurios patenka į ląsteles. Taip pat buvo pastebėta, jog naudojant fagocitozės slopiklį, signalo intensyvumas buvo mažesnis. Šie rezultatai rodo, kad S baltymas, priešingai nei kitas virusinis antigenas, VLP, nepatenka į THP-1 makrofagų vidų.

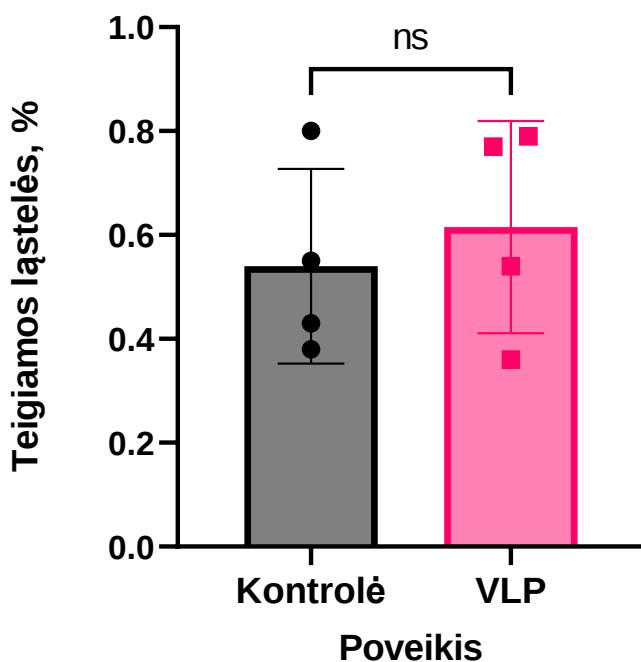


10 pav. Green pHrodo dažų žymėtų SARS-CoV-2 S (SCoV2-rS) ir omicron viruso atmainų (sSCoV2-rSo) S baltymų ir KI PyV VLP baltymų fluorescencinis signalas THP-1 makrofagų tipo

ląstelėse be ir su fagocitozės slopikliu – cytochalazinu D (CytD). Ląstelės veikiamos 10 µg/ml S baltymu buvo laikomos 4 valandas, kaip teigiama kontrolė buvo pasirinktas kitas virusinis antigenas KI PyV VLP. Atliekant imunocitocheminę analizę ląstelės buvo dažomos pirminiais antikūnais prieš virusinį baltymą ir paskui antriniais antikūnais, kurie aptinka pelės antikūnus, konjuguotais su fluoroforu AlexaFluor 568. Mėginių nuotraukos buvo daromos su EVOS FL Auto fluorescenciniu mikroskopu naudojant GFP, TxRed ir TRANS kubus. GFP – Green pHrodo signalas, TxRed – Alexa AlexaFluor 568 signalas.

3.4 Makrofagų aktyvinimo žymens CCR5 raiškos tyrimo rezultatai

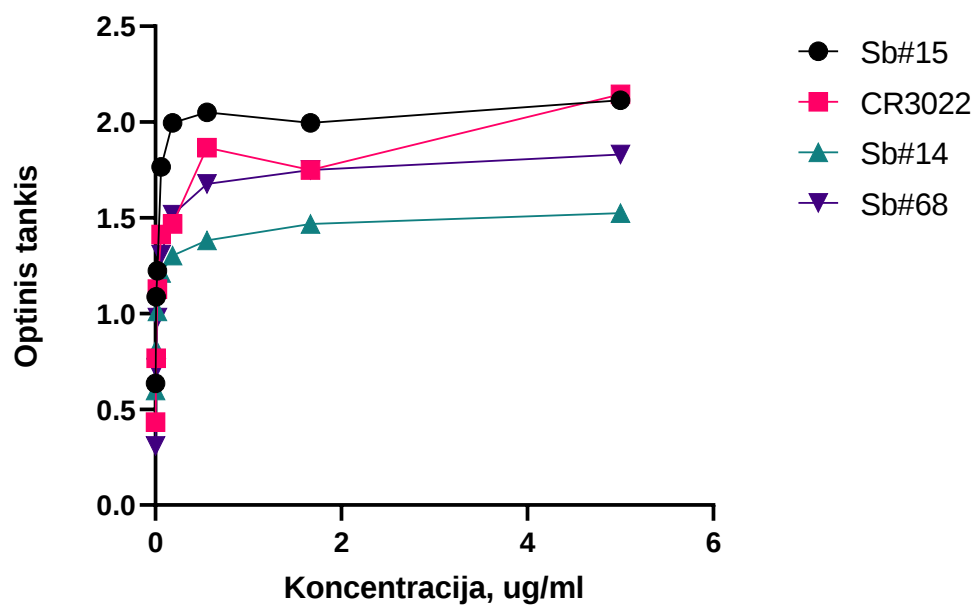
Siekdami įvertinti ar virusinis antigenas VLP padidina chemokino receptoriaus CCR5 raišką THP-1 makrofaguose buvo naudojamas tėkmės citometrijos metodas vertinant ląstelių populiacijas. Palyginus kontrolines ląsteles su izotipine kontrole buvo pastebėta, jog nevyko CCR5 žymens raiška. Vėliau palyginus ląsteles, veiktas VLP, su kontrolinėmis ląstelėmis nustatyta, jog virusinis antigenas neturėjo reikšmės makrofagų žymens CCR5 raiškai ląstelių paviršiuje (**11 pav**). Taigi, mūsų tirtuose THP-1 makrofaguose nebuvo nustatyta CCR5 raiškos pokyčių.



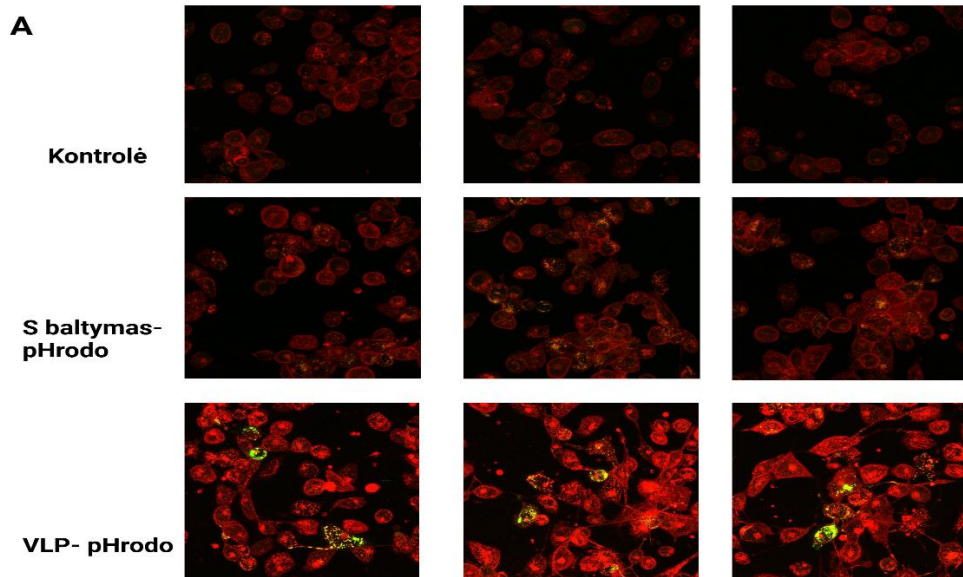
11 pav. Makrofagų aktyvinimo žymens CCR5 raiškos tyrimas THP-1 makrofagų tipo ląstelėse. Ląstelės buvo veikiamos 10 µg/ml virusiniu antigenu VLP 24 valandas. Mėginiai buvo dažomi 7AAD gyvybingumo dažų ir ląstelių populiacijos analizuojamos naudojant tėkmės citometrijos metodą. „ns“ simboliai žymi statistiškai nereikšmingus skirtumus tarp poveikių ($p = 0,6080$), atliktas parametrinės statistikos t testas.

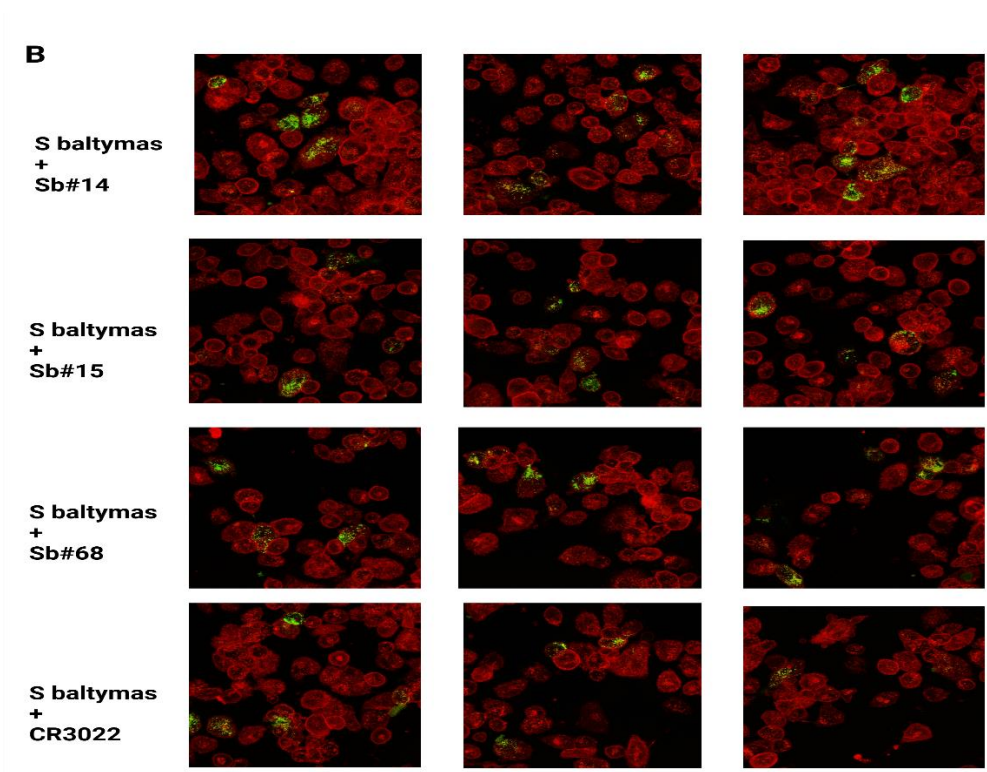
3.5 Žmogaus antikūnų ir S baltymo imuninių kompleksų poveikio THP-1 makrofagams tyrimas

Toliau buvo tiriama ar S baltymui specifiniais antikūnais opsonizuotas S baltymas patenka į THP-1 makrofagus. Pirmiausia buvo įvertinta įsigytų antikūnų, specifinių S baltymui, sąveika su S baltymu imunofermentinės analizės metodu. Įvertinus antikūno-antigeno sąveikas mėginyje, buvo nustatyta, jog stipriausia sąveika pasižymėjo S baltymas su Sb#15 antikūnas, o silpniausia su Sb#14 antikūnu (**12 pav**). Toliau nustatė, jog gauti antikūnai jungiasi prie S baltymo buvo vertinamas imuninių kompleksų patekimas į THP-1 makrofagus. Žinant, jog VLP yra fagocituojamas, ląstelės po poveikio šiuo virusiniu antigenu buvo naudojamos kaip teigiama kontrolė. Po 3 valandų ląstelėse, veiktose tik S baltymo-pHrodo konjugato, buvo pastebimas silpnas fluorescencinis signalas, šiek tiek didesnis nei kontrolinėse ląstelėse. Stebint S baltymo, opsonizuoto skirtingais žmogaus antikūnais, poveikį, buvo stebėtas stiprus fluorescencinis signalas pavienėse ląstelėse visais atvejais (**13 pav**). Taigi, buvo nustatyta, jog S baltymas patenka į THP-1 ląsteles imuninių kompleksų su žmogaus antikūnais pavidalu.



12 pav. Žmogaus antikūnų, specifinių S baltymui, ir S baltymo sąveikos įvertinimas. Įsigytų žmogaus antikūnų Sb#14, Sb#15, Sb#68 ir CR3022 sąveikos su S baltymu nustatytos naudojant ELISA metodą.





13 pav. Žmogaus antikūnais opsonizuoto S baltymo, žymėto *Green* pHrodo dažų, patekimas į THP-1 tipo makrofagus. Ląstelės po 3 valandų poveikio 20 µg/ml S-pHrodo konjugato buvo fotografuojamos naudojantis konfokaliu mikroskopu. Raudonas signalas žymi nudažytas ląstelių plazmines membranas, o žalias – baltymo signalą. (A) dalyje vaizduojami kontrolinis, S baltymo žymėto *Green* pHrodo dažų ir teigiamos kontrolės mėginys – VLP, žymėtas pHrodo dažų, (B) S baltymo žymėto *Green* pHrodo dažų ir žmogaus antikūnų Sb#14, Sb#15, Sb#68 ir CR3022 kompleksai.

Nustačius, jog S baltymas patenka į THP-1 tipo ląsteles imuninių kompleksų su žmogaus antikūnais pavidalu, buvo vertinama aktyvinimo žymens CCR5 raiška ląstelėse, taikant tėkmės citometrijos metodą. Lyginant dažytas kontrolines ląsteles (0,23%) su izotipine kontrole (0,23%), nebuvo nustatyta CCR5 raiška ląstelių paviršiuje (**2 lentelė**). Tokie duomenys patvirtina anksčiau gautus rezultatus, jog THP-1 tipo makrofagai nepasižymėjo receptoriaus CCR5 raiška.

2 lentelė. CCR5 raiška ląstelių paviršiuje. Į analizę buvo įtrauktos tik gyvos ląstelės. MFI – fluorescencinio signalo intensyvumo vidurkis, teigiamos ląstelės – teigiamų ląstelių kiekis procentais.

Poveikis/ žymuo	Izotipinė kontrolė	Kontrolė	Žuvusių ląstelių kontrolė	S baltymas	S+ Sb#14	S+ Sb#15	S+ Sb#68	S+ CR3022
CCR5 MFI	1085	1113	1052	1097	1090	1071	1053	1106
CCR5 teigiamos ląstelės	0,23 %	0,23 %	0,22 %	0,12 %	0,21 %	0,050%	0,9 %	0,17 %

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Siekdami įvertinti CXCL8 sekreciją, nustatėme, jog ląstelės veikiamos virusiniu antigenu VLP, sekretuoja chemokiną kelis kartus daugiau nei kontrolinės ląstelės. Kitų laboratorijos kolegų atliktame tyrime (Lučiūnaitė et al., 2022) buvo siekiama nustatyti, kaip įvairūs virusiniai antigenai sukelia uždegimo procesus makrofaguose. Šiame eksperimente taip pat buvo naudojama THP-1 ląstelių linija diferencijuota į makrofagų tipo ląsteles. Veikiant KIPyV VLP virusinėmis dalelėmis buvo pastebėta, jog padidėjo citokinų (TNF- α ir IL-6) sekrecija bei ląstelių aktyvacija, tačiau didžiausias uždegiminis atsakas buvo gautas ląstelėse, paveiktose MCPyV VLP. Panašūs rezultatai buvo gauti ir mūsų tyrime, kai didžiausią chemokino CXCL8 sekreciją lėmė poveikis MC virusiniu antigenu. Kaip teigiamą kontrolę naudojome uždegiminę molekulę LPS, nes yra žinoma, jog ji sukelia uždegiminių citokinų ir chemokinų raišką. Ubanako su kolegomis atliktame tyrime (Ubanako et al., 2019) THP-1 tipo makrofagai buvo paveikti trimis skirtingomis LPS koncentracijomis. Gauti tyrimo rezultatai patvirtina mūsų darytą išvadą, jog LPS sukelia kelis kartus didesnę IL-8 sekreciją lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Pirminiuose monocituose poveikis LPS sukelia metabolinį pokytį, panašų į Varburgo efektą. Patvirtindami CXCL8 sekreciją toliau atlikome Westernbloto analizę, kurios metu mūsų tikslinis baltymas buvo matomas ląstelių augimo terpėje. Kitų mokslininkų atliktame tyrime (Shao et al., 2023) apie prieš vėžinių ląstelių vaidmenį imuniniame atsake buvo naudojami THP-1 ląstelių lizatai. Mokslininkai analizės metu pastebėjo stiprią chemokino sekreciją. Kaip teigiamą kontrolę naudodami ląsteles paveiktas LPS, po poveikio buvo mėginiuose buvo matoma daug didesne CXCL8 sekrecija nei kontroliniuose mėginiuose. Tokie rezultatai mums rodo, jog kontroliniuose mėginiuose galėjo būti per maža baltymo koncentracija ir mėginius reikėtų tirti tam tikrais laiko momentais, kai ląstelės nėra spėjusios išsekretuoti chemokino.

Ištyrę klasikinės uždegminės molekulės LPS ir virusinių antigenų sukeltą IL-8 sekreciją, toliau stengiamės nustatyti SARS-CoV-2 S baltymo citotoksiškumą. Pirmiausiai atliktas LDH testas, neparodė jokio šio baltymo citotoksiškumo - mažiausias citotoksinis poveikis buvo nustatytas ląstelėse, paveiktose S baltymu. Berger (Berger et al., 2017) su kolegomis atliko LDH testą su ta pačia ląstelių linija, kurią naudojome ir mes, tačiau ląstelės buvo paveiktos Nanopleks nanodalelėmis. Šių mokslininkų darbe buvo naudojamos kelios skirtingos nanodalelių koncentracijos ir ląstelės veikiamos 2,4,16 ir 24 valandas. Mūsų tyrime poveikis S baltymu THP-

1 ląstelėm buvo daromas 24 valandas. Po 48 valandų Berger pastebėjo, kai nanodalelių koncentracija buvo nuo 2,19 iki 17,5 ug/ml, tai neturėjo jokios įtakos ląstelių gyvybingumui, kaip ir mūsų naudota 10 ug/ml koncentracija. Mokslininkam padidinus poveikio koncentraciją iki 35 ug/ml buvo pastebėtas 18% padidėjęs LDH išsiskyrimas iš ląstelių. Palaikius poveikį 4 valandas, rezultatai statistiškai nesiskyrė nuo 48 valandų, o didžiausias LDH išsiskyrimas (122%) buvo pastebėtas paveikus ląsteles 16 valandų 70 ug/ml koncentracija. Gauti rezultatai buvo 2 kartus didesni, nei mūsų atliktame eksperimente. Norėdami pilnai ištirti S baltymo citotoksiškumą, reikėtų ląsteles veikti keliais skirtingais laiko periodais bei koncentracijomis. Jiehao Cai 2023 metais su kolegomis (Jiehao et al., 2023) ištyrė S baltymo poveikį plaučių epitelio ląstelėm (BEAS-2B) ir fibroblastams (MRC-5). Poveikis buvo daromas keliomis skirtingomis baltymo koncentracijomis ir buvo atliekama MTT analizė – įvertinti ląstelių gyvybingumą. Skirtumas tarp LDH ir MTT yra toks, jog LDH yra pagrįstas fermento išsiskyrimu po membranos pažeidimų, o MTT analizė remiasi fermentiniu virsmu mitochondrijose. Gautuose rezultatuose buvo nustatyta, jog paveikus ląsteles 10-500 ng/ml baltymo koncentracija, ląstelių gyvybingumas buvo panašus kaip ir kontrolinėse ląstelėse. Nežymus sumažėjimas buvo pastebėtas paveikus MRC-5 ląsteles 1000-2000 ng/ml koncentracijomis ir parodė mažą S baltymo citotoksiškumą. Lyginant su mūsų eksperimentu duomenys buvo gauti panašūs (~100%) , nors autoriai tyrė baltymo citotoksiškumą skirtingais laiko periodais. Taigi, naudojant kito tipo ląsteles ir gyvybingumo nustatymo metodą buvo pastebėtas nežymus S baltymo citotoksiškumas, tad norint įsitikinti šio baltymo poveikį THP-1 ląstelėm galima būtų naudoti MTT analizę.

Nustatę, jog mūsų tyrime S baltymas neturi citotoksinio poveikio THP-1 tipo makrofagams, norėjome ištirti, ar jis sukelia uždegiminių molekulių sekreciją. Tyrime naudojome 2 uždegimines molekules: IL-1 β ir TNF- α . Frank su kolegomis (Frank et al., 2021) tyrė hipotezę, jog S baltymas gali veikti kaip PAMP ir sukelti uždegiminį atsaką. Tyrimas skirtingai nuo mūsų tyrimo autoriai naudojo žiurkes ir žiurkių mikroglijos ląsteles. Ląstelės po poveikio S baltymu sekretavo 2 kartus daugiau IL-1 β (130 pg/ml) ir TNF (160 pg/ml) lyginant su mūsų tyrimo metu gautais duomenimis, kai abiejų citokinų raišką buvo nepadidėjusi kaip ir kontroliniuose mėginiuose. Frank iš dalies įrodo, jog poveikis S1 baltymu sukėlė neurouždegiminį poveikį pagumburio, hipokampo ir priekinės žievės vietose. Taip pat praėjus 24 valandoms padidino mikroglijos ir smegenų makrofagų aktyvumo žymenų, astrocitų aktyvumą, PRR ir uždegiminių citokinų genų raišką. Tačiau poveikis šiuo baltymu neturėjo įtakos žiurkių elgesiui, mitybai ir

miegui kaip įprastai būna organizmui kovojant su uždegimu. Kitų mokslininkų atliktame tyrime su BEAS-2B ir MRC-5 ląstelėmis (Jiehao et al., 2023) buvo pastebėta 2 kartus (100 pg/ml) didesnė TNF- α sekrecija nei lyginant su kontroliniais mėginiais BEAS-2B ląstelėse. Įvertinus uždegiminio citokino raišką MRC-5 ląstelėse ji buvo 1,5 karto didesnė (200 pg/ml) nei kontroliniuose mėginiuose. Lyginant citokinų TNF- α ir IL-1 β sekreciją mūsų tyrime su kitų mokslininkų darbais buvo nustatyta maždaug 200 kartų mažesnė raiška. Tokie rezultatai galėjo būti gauti, dėl per trumpo poveikio laiko ir per mažos S baltymo koncentracijos. Tačiau ne visuose tyrimuose yra nustatoma S baltymo sukeliama uždegiminių molekulių raiška. 2021 metais Hoepel su kolegomis (Hoepel et al., 2021) atliktame tyrime naudojo M2 žmogaus makrofagus įvertinti antikūnų vaidmenį kovojant prieš S baltymą. Imuninių ląstelių aktyvinimui IgG antikūnais būtinas imuninio komplekso susidarymas, todėl buvo formuojami S - IgG kompleksai. Stimuliuojant 24 valandas vien tik S baltymu, nesukėlė citokinų sekrecijos, o veikiant IgG ir S baltymo imuniniais kompleksais sukėlė nedidelę IL-1 β , IL-6 ir TNF raišką. Šių mokslininkų gauti rezultatai ištyrus citokinų sekreciją atitiko mūsų gautus rezultatus ir nesiskyrė nuo kontrolinių mėginių. Tačiau jų rezultatai parodė 400 kartų didesnę (400 ng/ml) chemokine CXCL8 raišką nei mūsų gauti duomenys. Hoepel gauti duomenys buvo taip pat patvirtinti naudojant pirminius alveolinius žmogaus makrofagus stimuliuojamus 24 valandas. IL-1 β sekrecija veikiant S baltymu su serumu buvo maždaug kartu didesnė (0,25 ng/ml) nei mėginiuose tik su S baltymu ir 250 kartų didesnė nei mūsų gauti tyrimo duomenys. Norint nustatyti, ar S baltymas sukelia uždegiminių citokinų raišką, tolimesniuose tyrimuose reikėtų naudoti didesnes S baltymo koncentracijas, stimuliuoti skirtingais laiko tarpais ir tirti jo poveikį kartu su serumu.

Nustatę, jog mūsų atliktame tyrime S baltymas nesukelia citokinų raiškos, toliau buvo tiriama, ar jis patenka į ląstelę ir yra fagocituojamas. Yra žinoma, jog THP-1 makrofagai pasižymi padidėjusiomis fagocitinėmis savybėmis po diferenciacijos su PMA (Kurylina et al., 2018). Kurylina su kolegomis siekė ištirti THP-1 ląstelių fagocitinį plastiškumą diferenciacijos metu. Tam buvo naudojami lateksiniai rutuliukai, padengti įvairiais ligandais. Gauti duomenys parodė po 1 valandos žymėtų rutuliukų sankaupą plazminės membranos paviršiuje ir citoplazmoje. Monocitų tipo ląstelės pasižymėjo mažiausiu fagocitiniu aktyvumu – į jas pateko 0 arba nuo 1 iki 5 rutuliukų. Patros ir Ray (Patra ir Ray, 2022) atliktame tyrime buvo naudojami THP-1 makrofagai, kurie buvo stimuliuojami S baltymu su ST2825 slopikliu ir tik S baltymu, bei stebimas jų fagocitinis aktyvumas. Stipriausiai vykdoma fagocitozė buvo nustatyta ląstelėse, kurios buvo

paveiktos S baltymu be slopiklio, tačiau signalas buvo matomas ir mėginiuose su slopikliu. Šie duomenys neatitiko mūsų gautų rezultatų, nes po poveikio nebuvo matomas fluorescencinis signalas mėginiuose su S baltymu. Kitų mokslininkų (Garcia-Nicolas et al., 2023) atliktame tyrime buvo naudojami iš monocitų kilę makrofagai (MDM). Buvo išsikelta hipotezė, jog SARS-CoV-2 negali užkrėsti MDM ląstelių. Atsižvelgiant į tai, kad COVID-19 pacientų limfmazgiuose makrofagai buvo pažymėti virusiniu antigenu, mokslininkams kilo klausimas, ar tai galėjo atsirasti dėl SARS-CoV-2 užkrėstų ląstelių fagocitozės. Tačiau po 72 valandų stimuliacijos nebuvo pastebėtas GFP fluorescencinis signalas, šie duomenys sutapo su mūsų gautais rezultatais, jog S baltymas nepatenka į ląstelę. Mūsų ir kitų mokslininkų rezultatai įrodo, jog įprastai vienas S baltymas nepatenka į ląstelę. Taigi, norint ištirti baltymo fagocitozę tyrime reikėtų stebėti imuninių kompleksų, sudarytų iš S baltymo ir antikūnų, patekimą į ląsteles.

Tirdami CCR5 raišką ląstelių paviršiuje nustatėme, jog THP-1 ląstelės nepasižymėjo šio receptoriaus raiška. 2021 metais Chen su kolegomis (Chen et al., 2021) atliko tyrimą su monocitais vertinant, kokią įtaką turi bronchopulmoninė displazija, lėtinė plaučių liga, CCR5 receptoriams. Mokslininkai taip pat naudodami tėkmės citometrijos metodą nustatė, jog šio receptoriaus raiška buvo žymiai padidėjusi sergančių žmonių mėginiuose. padidėjęs CCR5 kiekis skatina makrofagų agregaciją plaučiuose ir IL-1 β gamybą taip pat slopinant CCR5, sumažėjo uždegiminis atsakas. Taigi, norint įvertinti CCR5 raišką THP-1 makrofagų paviršiuje, ateityje šias ląsteles galima veikti skirtingais virusiniais antigenais bei molekulėmis stimuliuojančiomis uždegiminį atsaką.

Siekdami nustatyti, ar S baltymas gali patekti į ląsteles opsonizavus žmogaus antikūnais, tyrime toliau naudojome THP-1 tipo ląsteles ir žmogaus antikūnus prieš S baltymą. Monokloniniai antikūnai (mAb) turintys potencialą medijuoti infekciją buvo tie, kurie taikėsi į receptorių surišančią domeną (RBD). Suzanne Pickering su kolegomis (Pickering et al., 2024) atliktame tyrime buvo naudojami pirminiai žmogaus makrofagai (HEK293T/17, THP-1 ir Vero-E6) siekiant išsiaiškinti, ar antikūnai gali būti veiksmingi infekcijos mediatoriai. Šie mokslininkai savo darbe taip pat kaip ir mes naudojo mAb CR3022. S baltymas buvo inkubuojamas su antikūnais 48 valandas, prieš atliekant eksperimentus. Dauguma RBD specifinių antikūnų pasižymėjo gebėjimu skatinti nediferencijuotų THP-1 ląstelių infekciją, tokie pat rezultatai buvo gauti ir mūsų tyrime po 24 valandų poveikio naudojant 4 skirtingus žmogaus antikūnus. Pickering atliktas tyrimas patvirtina mūsų gautą išvadą, jog nesant antikūnams THP-1 ląstelėse S baltymo patekimas nebuvo

nustatytas. Tam, kad patvirtintų savo gautus rezultatus mokslininkai atliko tą patį eksperimentą ir su PMA diferencijuotomis THP-1 ląstelėmis. Taigi, mūsų ir šių mokslininkų darbai patvirtina, jog vienas S baltymas negali patekti į ląsteles, tačiau imuninių kompleksų su antikūnais pavidalu yra pastebimas šio baltymo patekimas į THP-1 tipo makrofagus.

Taigi, palyginus gautus rezultatus su moksliniuose straipsniuose aprašytais duomenimis, matome, jog įprastai SARS-CoV-2 S baltymas nepasižymi citotoksiškumu, nesukelia uždegiminių molekulių sekrecijos ir negali patekti į THP-1 ląsteles ne imuninio komplekso pavidalu.

IŠVADOS

1. Buvo nustatyta chemokino CXCL8 raiška THP-1 makrofaguose; po poveikio LPS ląstelės sekretavo šį chemokiną 1,6 karto daugiau nei kontrolinės ląstelės bei jo raiška buvo nustatyta atlikus imunobloto analizę.
2. Tirtas SARS-CoV-2 S baltymas nesukėlė uždegiminių molekulių sekrecijos THP-1 makrofaguose.
3. Nustatyta, jog SARS-CoV-2 S baltymas nėra fagocituojamas makrofagų tipo ląstelių.
4. Nebuvo nustatyta CCR5 raiška THP-1 ląstelių paviršiuje.
5. Buvo nustatyta, jog SARS-CoV-2 S baltymo ir jo kompleksai su antikūnais patenka į ląsteles priešingai nei vienas S baltymas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adegbola, S. O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A., & Tozer, P. (2018). Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2244.
2. Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801.
3. Barkaway, A., Rolas, L., Joulia, R., Bodkin, J., Lenn, T., Owen-Woods, C., Reglero-Real, N., Stein, M., Vázquez-Martínez, L., Girbl, T., Poston, R. N., Golding, M., Saleeb, R. S., Thiriot, A., von Andrian, U. H., Duchene, J., Voisin, M. B., Bishop, C. L., Voehringer, D., ... Nourshargh, S. (2021). Age-related changes in the local milieu of inflamed tissues cause aberrant neutrophil trafficking and subsequent remote organ damage. *Immunity*, 54(7), 1494-1510.e7.
4. Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2020). Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, 588(7837), 327–330.
5. Berger, E., Breznan, D., Stals, S., Jasinghe, V. J., Gonçalves, D., Girard, D., Faucher, S., Vincent, R., Thierry, A. R., & Lavigne, C. (2017). Cytotoxicity assessment, inflammatory properties, and cellular uptake of Neutraplex lipid-based nanoparticles in THP-1 monocyte-derived macrophages. *Nanobiomedicine*, 4, 1849543517746259.
6. Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(2), 99–109.
7. Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2).
8. Cai, J., Ma, W., Wang, X., Chang, H., Wei, Z., Li, J., & Zeng, M. (2023). The spike protein of SARS-CoV-2 induces inflammation and EMT of lung epithelial cells and fibroblasts through the upregulation of GADD45A. *Open Medicine*, 18(1), 20230779.
9. Caldeira, D. B., de Souza Luna, L. K., Watanabe, A., Perosa, A. H., Granato, C., & Bellei, N. (2019). The occurrence of polyomaviruses WUPyV and KIPyV among patients with severe respiratory infections. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 133–137.

10. Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., & Ehlers, B. (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*, 161(6), 1739–1750.
11. Cambier, S., Gouwy, M., & Proost, P. (2023). The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cellular & Molecular Immunology* 2023 20:3, 20(3), 217–251.
12. Cao, W., Peters, J. H., Nieman, D., Sharma, M., Watson, T., & Yu, J. (2015). Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *British Journal of Cancer*, 113(5), 738.
13. Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45.
14. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *The components of the immune system*.
15. Chen, Z., Xie, X., Jiang, N., Li, J., Shen, L., & Zhang, Y. (2021). CCR5 signaling promotes lipopolysaccharide-induced macrophage recruitment and alveolar developmental arrest. *Cell Death & Disease* 2021 12:2, 12(2), 1–14.
16. Chroboczek, J., Szurgot, I., & Szolajska, E. (n.d.). *Virus-like particles as vaccine*. Retrieved January 12, 2025.
17. Dalby, E., Christensen, S. M., Wang, J., Hamidzadeh, K., Chandrasekaran, P., Hughitt, V. K., Tafuri, W. L., Arantes, R. M. E., Rodrigues, I. A., Herbst, R., El-Sayed, N. M., Sims, G. P., & Mosser, D. M. (2020). Immune complex-driven generation of human macrophages with anti-inflammatory and growth-promoting activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 205(1), 102.
18. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, 14(10), 986.
19. Dinarello, C. A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140(6), 935.
20. Ding, X., & Xiang, S. (2018). Endocytosis and human innate immunity. *Journal of Immunological Sciences*, 2(1), 65–70.
21. Faas, M. M., & de Vos, P. (2020). Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165845.

22. Frank, M. G., Nguyen, K. H., Ball, J. B., Hopkins, S., Kelley, T., Baratta, M. v., Fleshner, M., & Maier, S. F. (2021). SARS-CoV-2 spike S1 subunit induces neuroinflammatory, microglial and behavioral sickness responses: Evidence of PAMP-like properties. *Brain, Behavior, and Immunity*, 100, 267.
23. García-Nicolás, O., Godel, A., Zimmer, G., & Summerfield, A. (2023). Macrophage phagocytosis of SARS-CoV-2-infected cells mediates potent plasmacytoid dendritic cell activation. *Cellular and Molecular Immunology*, 20(7), 835.
24. Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449.
25. Gordon, S., & Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biology*, 15(1), 53.
26. Hamidzadeh, K., Christensen, S. M., Dalby, E., Chandrasekaran, P., & Mosser, D. M. (2016). Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annual Review of Physiology*, 79, 567.
27. Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S. G., O'Shea, A., Sharp, F. A., Lambe, E. M., Creagh, E. M., Golenbock, D. T., Tschopp, J., & Kornfeld, H. (2011). Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9587–9597.
28. Henderson, R., Edwards, R. J., Mansouri, K., Janowska, K., Stalls, V., Gobeil, S., Kopp, M., Hsu, A., Borgnia, M., Parks, R., Haynes, B. F., & Acharya, P. (2020). Controlling the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Conformation. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*.
29. Hikmet, F., Méar, L., Edvinsson, Å., Micke, P., Uhlén, M., & Lindskog, C. (2020). The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Molecular Systems Biology*, 16(7), 9610.
30. Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cellular Immunology*, 330, 5–15.
31. Hoepel, W., Chen, H. J., Geyer, C. E., Allahverdiyeva, S., Manz, X. D., de Taeye, S. W., Aman, J., Mes, L., Steenhuis, M., Griffith, G. R., Bonta, P. I., Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Golebski, K., Jonkers, R. E., Larsen, M. D., Linty, F., Nouta, J., ... den Dunnen, J. (2021). High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-

- CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. *Science Translational Medicine*, 13(596), 8654.
32. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., & McDermott, M. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-111.
 33. Horn, L. A., Fousek, K., & Palena, C. (2020). Tumor plasticity and resistance to immunotherapy. *Trends in Cancer*, 6(5), 432.
 34. Hu, W., Zhang, Y., Fei, P., Zhang, T., Yao, D., Gao, Y., Liu, J., Chen, H., Lu, Q., Mudianto, T., Zhang, X., Xiao, C., Ye, Y., Sun, Q., Zhang, J., Xie, Q., Wang, P. H., Wang, J., Li, Z., ... Chen, W. (2021). Mechanical activation of spike fosters SARS-CoV-2 viral infection. *Cell Research*, 31(10), 1047.
 35. Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H. B. (2018). Activating THP1-derived macrophage in vitro. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1784, 119.
 36. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719.
 37. Jiang, Y., Yu, M., Hu, X., Han, L., Yang, K., Ba, H., Zhang, Z., Yin, B., Yang, X. P., Li, Z., & Wang, J. (2017). STAT1 mediates transmembrane TNF-alpha-induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. *Cell Death and Differentiation*, 24(4), 660.
 38. Kovacevic, Z., Sahni, S., Lok, H., Davies, M. J., Wink, D. A., & Richardson, D. R. (2017). Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(5), 995–999.
 39. Kurynina, A. v., Erokhina, M. v., Makarevich, O. A., Sysoeva, V. Y., Lepekha, L. N., Kuznetsov, S. A., & Onishchenko, G. E. (2018). Plasticity of Human THP–1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 83(3), 200–214.
 40. Lendeckel, U., Venz, S., & Wolke, C. (2022). Macrophages: shapes and functions. *Chemtexts*, 8(2), 12.

41. Lim, J. J., Grinstein, S., & Roth, Z. (2017). Diversity and versatility of phagocytosis: Roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY), 268894.
42. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189. *LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation.* (n.d.). Retrieved January 12, 2025.
43. Lučiūnaitė, A., Dalgėdienė, I., Žilionis, R., Mašalaitė, K., Norkienė, M., Šinkūnas, A., Gedvilaitė, A., Kučinskaitė-Kodžė, I., & Žvirblienė, A. (2022). Activation of NLRP3 Inflammasome by Virus-Like Particles of Human Polyomaviruses in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 13, 831815.
44. Malik, A., & Kanneganti, T. D. (2017). Inflammasome activation and assembly at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(23), 3955.
45. Maloney, C. D. R. S. R., Jensen, S., Gil-Rivas, V., & Goolkasian, P. (2013). Latent viral immune inflammatory response model for chronic multisymptom illness. *Medical Hypotheses*, 80(3), 220–229.
46. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(2), 1–10.
47. Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S., & Lauber, C. (2017). Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 18–38.
48. Mohsen, M. O., Gomes, A. C., Vogel, M., & Bachmann, M. F. (2018). Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System. *Vaccines*, 6(3).
49. Mosser, D. M., Hamidzadeh, K., & Goncalves, R. (2020). Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology* 2020 18:3, 18(3), 579–587.
50. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's immunobiology. 7th ed. New York: Garland Science; 2007.

51. Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20.
52. Nakanishi, A., Kaneko, N., Takeda, H., Sawasaki, T., Morikawa, S., Zhou, W., Kurata, M., Yamamoto, T., Akbar, S. M. F., Zako, T., & Masumoto, J. (2018). Amyloid β directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system. *Inflammation and Regeneration*, 38(1), 27.
53. Nikovics, K., Morin, H., Riccobono, D., Bendahmane, A., & Favier, A. L. (2020). Hybridization-chain-reaction is a relevant method for in situ detection of M2d-like macrophages in a mini-pig model. *FASEB Journal*, 34(12), 15675–15686.
54. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology* 2021 19:1, 19(1), 1–27.
55. Panahipour, L., Kochergina, E., Kreissl, A., Haiden, N., & Gruber, R. (2019). Milk modulates macrophage polarization in vitro. *Cytokine*, 1(2), 100009.
56. Patra, T., & Ray, R. (2022). Bystander effect of SARS-CoV-2 spike protein on human monocytic THP-1 cell activation and initiation of prothrombogenic stimulus representing severe COVID-19. *Journal of Inflammation (London, England)*, 19(1).
57. Pickering, S., Wilson, H., Bravo, E., Perera, M. R., Seow, J., Graham, C., Almeida, N., Fotopoulos, L., Williams, T., Moitra, A., Winstone, H., Nissen, T. A. D., Galão, R. P., Snell, L. B., Doores, K. J., Malim, M. H., & Neil, S. J. D. (2024). Antibodies to the RBD of SARS-CoV-2 spike mediate productive infection of primary human macrophages. *Nature Communications* 2024 15:1, 15(1), 1–17.
58. Pobezinskaya, Y. L., & Liu, Z. (2012). The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*, 11(5), 871.
59. Poloamina, V. I., & Poloamina, V. I. (2023). *Regulation of Phagocytosis in Macrophages*.

60. Prashar, A., Schnettger, L., Bernard, E. M., & Gutierrez, M. G. (2017). Rab GTPases in immunity and inflammation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(SEP), 296153.
61. Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221(1), 2–11.
62. Qu, Y., Ramachandra, L., Mohr, S., Franchi, L., Harding, C. v., Nunez, G., & Dubyak, G. R. (2009). P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(8), 5052–5062.
63. Ramesh, G., Maclean, A. G., & Philipp, M. T. (2013). Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators of Inflammation*, 2013, 480739.
64. Ray, T. D., Mekasha, S., Liang, Y., Lu, B., Ram, S., & Ingalls, R. R. (2018). Species-specific differences in regulation of macrophage inflammation by the C3a-C3a receptor axis. *Innate Immunity*, 24(1), 66–78.
65. Ren, K., & Torres, R. (2008). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), 57.
66. Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–832.
67. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21).
68. Shao, Y., Lan, Y., Chai, X., Gao, S., Zheng, J., Huang, R., Shi, Y., Xiang, Y., Guo, H., Xi, Y., Yang, L., & Yang, T. (2023). CXCL8 induces M2 macrophage polarization and inhibits CD8⁺ T cell infiltration to generate an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer. *The FASEB Journal*, 37(10), e23173.
69. Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L. K., & Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clinical Science (London, England : 1979)*, 137(15), 1067.
70. Torres, C. (2020). Evolution and molecular epidemiology of polyomaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 79, 104150.

71. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171–176.
72. Ubanako, P., Xelwa, N., & Ntwasa, M. (2019). LPS induces inflammatory chemokines via TLR-4 signalling and enhances the Warburg Effect in THP-1 cells. *PLoS ONE*, 14(9), e0222614.
73. Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, 11, 531655.
74. Vásquez, G., & Zorro, S. (2013). *Toll-like receptors and autoimmunity*.
75. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veasley, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6.
76. Walls, A. C., Tortorici, M. A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch, B. J., Rey, F. A., & Veasley, D. (2017). Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(42), 11157–11162.
77. Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. v., & Budinger, G. R. S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(7), 2619–2628.
78. Xiong, X., Liao, X., Qiu, S., Xu, H., Zhang, S., Wang, S., Ai, J., & Yang, L. (2022). CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 723846.
79. Yamane, K., & Leung, K. P. (2016). Rabbit M1 and M2 macrophages can be induced by human recombinant GM-CSF and M-CSF. *FEBS Open Bio*, 6(9), 945.
80. Yu, S., Hu, H., Ai, Q., Bai, R., Ma, K., Zhou, M., & Wang, S. (2023). SARS-CoV-2 Spike-Mediated Entry and Its Regulation by Host Innate Immunity. *Viruses*, 15(3), 639.
81. Yue, Y., Yang, X., Feng, K., Wang, L., Hou, J., Mei, B., Qin, H., Liang, M., Chen, G., & Wu, Z. (2017). M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20. *International Journal of Cardiology*, 245, 228–235.

82. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877, 173090.
83. Zhang, H., Chen, K., Tan, Q., Shao, Q., Han, S., Zhang, C., Yi, C., Chu, X., Zhu, Y., Xu, Y., Zhao, Q., & Wu, B. (2021). Structural basis for chemokine recognition and receptor activation of chemokine receptor CCR5. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–12.
84. Zhang, M. Z., Wang, X., Wang, Y., Niu, A., Wang, S., Zou, C., & Harris, R. C. (2016). IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney International*, 91(2), 375.
85. Zhang, M., Kenny, S. J., Ge, L., Xu, K., & Schekman, R. (2015). Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *ELife*.
86. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727.

VILNIAUS UNIVERSITAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Ula Marija Statkevičiūtė

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

2019 metais COVID-19 pandemiją sukėlė sunkų ūminį kvėpavimo takų sindromą, sukeliantis virusas, žinomas kaip koronavirusas 2 (SARS-CoV-2). Šis virusas plinta oru ir infekuoja žmogaus kvėpavimo takų ląsteles. Įprastais atvejais SARS-CoV-2 pasireiškia kaip peršalimas, tačiau kartais sukelia sunkią pneumoniją, todėl virusas yra atsakingas už aukštą mirtingumą.

Šio baigiamojo darbo tikslas yra ištirti, ar SARS-CoV-2 S baltymas sukelia uždegimą makrofagų tipo ląstelėse. Darbo uždaviniai: įvertinti chemokino CXCL8 sekreciją THP-1 makrofaguose; nustatyti, SARS-CoV-2 S baltymo sukeltą uždegiminių molekulių sekreciją THP-1 makrofaguose; nustatyti, ar SARS-CoV-2 S baltymas yra fagocituojamas makrofagų tipo ląstelių; ištirti chemokinų receptoriaus CCR5 raišką makrofagų ląstelių paviršiuje, naudojant tėkmės citometrijos metodą ir nustatyti, ar SARS-CoV-2 S baltymo ir jų kompleksai su antikūnais, vadinami imuniniais kompleksais, patenka į THP-1 makrofagus.

SARS-CoV-2 S baltymo uždegiminės savybės buvo tiriamos naudojant THP-1 žmogaus leukemijos monocitinių ląstelių liniją. Dėl skirtingų pateiktų rezultatų moksliniuose straipsniuose tyrime buvo siekiama nustatyti uždegiminių molekulių sekreciją, LDH išsiskyrimą ir naudojantis fluorescencine mikroskopijos bei tėkmės citometrijos metodais nustatyti S baltymo patekimą į ląsteles. Gauti rezultatai atskleidė, jog SARS-CoV-2 S baltymas THP-1 makrofagų tipo ląstelėse nesukelia uždegiminių molekulių sekrecijos, nepatenka į ląsteles bei nėra fagocituojamas.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTRE

Ula Marija Statkevičiūtė

Master's thesis

SUMMARY

The global COVID-19 pandemic in 2019 was caused by a severe acute respiratory syndrome virus known as coronavirus 2 (SARS-CoV-2). This virus is airborne and infects human respiratory cells. SARS-CoV-2 normally manifests itself as a common cold, but sometimes causes severe pneumonia, which is responsible for the high mortality rate.

The aim of this thesis is to investigate whether SARS-CoV-2 S protein induces inflammation in macrophage-like cells. Objectives: To assess the secretion of the chemokine CXCL8 in THP-1 macrophages; to determine whether SARS-CoV-2 S protein induces the secretion of inflammatory molecules in THP-1 macrophages; and to determine whether SARS-CoV-2 S protein is phagocytosed by macrophage-like cells; to investigate the expression of the chemokine receptor CCR5 on the surface of macrophage cells using flow cytometry and to determine whether SARS-CoV-2 S protein and its complexes with antibodies, known as immune complexes, are incorporated into THP-1 macrophages.

The inflammatory properties of SARS-CoV-2 S protein were investigated using the THP-1 human leukaemia monocytic cell line. Due to the different results reported in the scientific papers, the study aimed to determine the secretion of inflammatory molecules, the release of LDH and the cellular delivery of the S protein using fluorescence microscopy and flow cytometry. The results showed that SARS-CoV-2 S protein THP-1 does not induce secretion of inflammatory molecules, does not enter cells and is not phagocytosed in macrophage-like cells.