



LIETUVOS SVEIKATOS MOKLSŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

MEDICINOS FAKULTETAS

TVIRTINU:

Medicinos fakulteto dekanas

Prof. dr. Algimantas Tamelis

HAROLDAS SAKAVIČIUS

**MIKROGLIJOS LĄSTELIŲ ŽŪTIES IR AKTYVACIJOS TYRIMAS
NEUROPATHOLOGIJOS ATVEJU**

Bakalauro baigiamasis darbas

Medicininės ir veterinarinės biochemijos studijų programa, valstybinis kodas 6121DX001

Gyvybės mokslų studijų krypties grupė

Biochemijos studijų kryptis

Darbo vadovas(-ė):

dr. Silvija Jankevičiūtė

KAUNAS, 2023

HAROLDAS SAKAVIČIUS

**MIKROGLIJOS LĄSTELIŲ ŽŪTIES IR AKTYVACIJOS TYRIMAS
NEUROPATHOLOGIJOS ATVEJU**

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS, NEUROMOKSLŲ INSTITUTAS,
BIOCHEMIJOS LABORATORIJA

Darbo vadovas(-ė): dr. Silvija Jankevičiūtė _____
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

Darbą atliko bakalaurantas: Haroldas Sakavičius _____
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

KAUNAS, 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	4
SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
ĮVADAS.....	7
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Nervų sistema	9
1.2. Neuroglijos ląstelės.....	9
1.3. Mikroglia	10
1.3.1. Fagocitozė	12
1.3.2. Glutamatas	13
1.4. Mikroglijos ląstelės ir neurouždegimas	14
1.5. Virusai ir virusiniai baltymai.....	15
1.6. COVID-19 ir mikroglijos ląstelių ryšys	15
1.7. Toll-like receptoriai	16
1.7.1. Toll-like 3 ir Poliinozilo-Policitidilo rūgštis (PIC).....	17
1.7.2. Toll-like 7 ir Loksoribinas (LOX)	18
2. TYRIMŲ METODAI.....	20
2.1. Pirminė gryna mikroglijos ląstelių kultūra	20
2.2. Mikroglijos ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu	22
2.3. Mikroglijos ląstelių fagocitinio aktyvumo vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu..	23
2.4. Glutamato kiekio nustatymas mikroglijos ląstelių auginimo terpėje	24
2.5. Mikroglijos ląstelių aktyvacijos vertinimas imunofluorescencijos metodu	26
2.6. Statistinė analizė	28
2.7. Bioetikos komiteto leidimas	28
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	29
4. IŠVADOS.....	36
5. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	37
6. PRIEDAI	42

SANTRUMPOS

- ALD** – adrenoleukodistrofija
- ATP** – adenozintrifosfatas
- BSA** – (angl. *bovine serum albumin*) jaučio serumo albuminas
- CNS** – centrinė nervų sistema
- DAMP** – su pažeidimais susiję molekuliniai modeliai (angl. *Damage-associated molecular patterns*)
- DC** – (angl. *dendritic cells*) dendritinės ląstelės
- DIV** – dienos *in vitro* sąlygomis (angl. *days in vitro*)
- FBS** – (angl. *fetal bovine serum*) fetalinio veršelio serumas
- HRP** – (angl. *horseradish peroxidase*) krienų peroksidazė
- IB4** – izolektino B4 ir AlexaFluor 488 dažų konjugatas
- IFN** – I tipo interferonas
- IRF** – interferonų reguliavimo faktoriai
- KT** – kambario temperatūra
- LOX** – loksoribinas 95%
- LPS** – lipopolisacharidas
- MC** – (angl. *mast cell*) putliosios ląstelės
- MDA5** – (angl. *melanoma differentiation-associated protein 5*) su melanoma susijęs diferenciacijos genas
- MHC** – (angl. *major histocompatibility complex*) didysis histosuderinamumo kompleksas
- NF- κ B** – (angl. nuclear factor κ B) branduolinio veiksnys- κ B
- NO** – azoto monoksidas
- PAMP** – (angl. *pathogen associated molecular patterns*) su patogenais susiję molekuliniai modeliai
- PBS** – (angl. *phosphate-buffered saline*) fosfatinis druskų tirpalas
- PI** – propidžio jodidas
- PIC** – poliinozilo-policitidilo rūgštis
- PNS** – periferinė nervų sistema
- PRR** – (angl. *pattern-recognition receptor*) struktūrų atpažinimo receptoriai
- RiG-I** – (angl. *retinoic acid-inducible gene 1*) retinoinės rūgšties indukuojamas genas
- RLR** – (angl. *retinoic acid-inducible gene-I-like receptor*) į retinoinės rūgšties indukuojamą geną panašus receptoriai
- ssRNR** – (angl. *single-stranded RNA*) viengrandė RNR
- TIR** – Toll-interleukino-1 receptoriai
- TLR** – *Toll-like* receptoriai
- TLR3** – *Toll-like* receptoriai 3
- TLR7** – *Toll-like* receptoriai 7
- TRIF** – (angl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) Toll-interleukino-1 receptoriaus domeno turintis adapteris, indukuojantis interferoną- β
- ŽPV** – žmogaus papilomos virusas

SANTRAUKA

Bakalauro baigiamojo darbo autorius: Sakavičius H.

Tema: „Mikroglijos ląstelių žūtis ir aktyvacijos tyrimas neuropatologijos atveju“

Mokslinis vadovas: dr. Silvija Jankevičiūtė

Atlikimo vieta: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, Neuromokslų institutas, Biochemijos laboratorija

Santraukos turinys:

Vis daugiau epidemiologinių ir mokslinių tyrimų duomenų sieja neurotropinius virusus su pagreitėjusiu smegenų senėjimu ir padidėjusia neurodegeneracinių sutrikimų rizika. Yra įrodymų, kad kai kurie pavieniai virusų baltymai gali praeiti kraujo smegenų barjerą ir taip sukelti neurouždegimą ar kitais būdais sutrikdyti smegenų funkcijas [1].

Žinoma, jog virusų struktūriniai komponentai prisideda prie tokių neurodegeneracinių ligų kaip Parkinsono ar Alzheimerio liga. Taip pat manoma, jog virusų struktūriniai komponentai gali sukelti mikroglijos ląstelių aktyvaciją, skatinti jų proliferaciją bei skatina mikroglijos ląsteles fagocituoti [2]. Tyrimo metu buvo tiriamas skirtingų koncentracijų LOX (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) poveikis grynomis mikroglijos ląstelių kultūroms, esant 24 val. inkubaciniam laikotarpiui.

Tyrimams naudotos grynos pirminės mikroglijos ląstelių kultūros išskirtos iš 5-7 dienų amžiaus, abiejų lyčių *Wistar* veislės žiurkių jauniklių smegenų žievės. Ląstelių gyvybingumas, proliferacija, fagocitinis aktyvumas buvo nustatoma fluorescencinės mikroskopijos metodu. Glutamato kiekis mikroglijos ląstelių augimo terpėje buvo nustatomas spektrofotometriniu metodu. Mikroglijos ląstelių aktyvacijos vertinimas, įvertinant mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymens – Iba1 baltymo raiškos pokyčius ląstelių kultūrose, buvo atliekamas imunofluorescencijos metodu.

Tyrimų metu buvo nustatyta, kad *Toll-like* receptorių (TLR7 ir TLR3) aktyvikliai – LOX ir PIC po 24 val. inkubacijos neturėjo poveikio mikroglijos ląstelių gyvybingumui. Ląstelių inkubacija su didžiausia LOX koncentracija (100µg/ml) skatino ląstelių proliferaciją ir statistiškai reikšmingai padidino mikroglijos ląstelių skaičių (apie 35 proc.), bei pasižymėjo mikroglijos ląstelių fagocitinį aktyvumą didinančiu poveikiu, lyginant su kontroline ląstelių grupe po 24 val. inkubacinio laikotarpio. Nei viena PIC koncentracija (100ng/ml ir 1µg/ml) bei mažesnės LOX koncentracijos (1µg/ml, 10µg/ml) neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio ląstelių skaičiaus kitimui ar fagocitozei. Nustatyta, kad po 24 val. inkubacinio laikotarpio LOX (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) neturėjo poveikio glutamato išsiskyrimui į mikroglijos ląstelių augimo terpę bei nesukėlė Iba1 raiškos padidėjimo mikroglijos ląstelių kultūroje, kas galėtų rodyti galimą mikroglijos ląstelių uždegiminį atsaką ir ląstelių aktyvaciją.

SUMMARY

Author of bachelor thesis: Sakavičius H.

Title: "Investigation of microglia cell death and activation under neuropathological conditions"

Scientific supervisor: PhD Silvija Jankevičiūtė

Work was performed at: Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Neuroscience Institute, Laboratory of Biochemistry.

Summary: Growing epidemiological and experimental evidence suggests that neurotropic viruses are related to accelerated brain aging and an increased risk of neurodegenerative disorders. There is evidence that some proteins shed from viruses can cross BBB and induce neuroinflammation or otherwise impair brain functions funkcijas [1].

It is known that structural components of viruses contribute to neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. It is assumed that structural components of viruses are also considered to induce microglial cell activation and proliferation, and to promote microglial cells phagocytosis [2]. In this study different LOX (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) and PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) were tested.

Pure primary microglial cell cultures prepared from 5–7-day-old *Wistar* rats pups (both sexes) were used in this study. The viability, proliferation, phagocytic activity of the cells were assessed by fluorescence microscopy method. Amount of glutamate microglial cell cultures was determined spectrophotometrically. Assessment of microglial cell activation by evaluating changes in the expression of the microglial cell activation marker – Iba1 protein in cell cultures was performed by immunofluorescence method.

It was found that Toll-like receptors activators (TLR7 and TLR3) – LOX and PIC had no effect on microglial cells viability after 24 h incubation. Cell incubation with the highest concentration of LOX (100µg/ml) stimulated microglial cell proliferation and significantly increased the number of microglia cells (about 35%) and also stimulated phagocytic activity of microglial cell compared to the control group after 24 hours incubation. Neither PIC (100ng/ml and 1µg/ml) nor lower LOX concentrations (1µg/ml, 10µg/ml) had a statistically significant effect on cell number or microglial cells phagocytosis. We also found that microglial cells incubation with LOX (1µg/ml, 10µg/ml and 100µg/ml) and PIC (100ng/ml and 1µg/ml) did not affect the release of glutamate into the microglial cell growth medium after a 24 h incubation period and did not cause an increase of Iba1 expression in microglia cell cultures, which could be indicative of a possible microglial cellular inflammatory response and cellular activation.

IVADAS

Mikroglijos ląstelės – tai įgimtos centrinės nervų sistemos (CNS) parenchimos imuninės ląstelės, kurių apykaita priklauso nuo šių ląstelių proliferacijos. Mikroglijos ekspresuoja įvairius baltymus, todėl jos gali nuolat “suvokti” aplinką ir greitai reaguoti į jos pokyčius. Esant uždegiminėms sąlygoms, pavyzdžiui, CNS virusinei infekcijai, mikroglijos skatina įgimtą ir įgytą imuninį atsaką. Tačiau virusinės infekcijos metu, dėl mikroglijos ląstelių pokyčio bei pakitusios jų sąveikos, gali keistis ir mikroglijos ląstelių vykdoma neuronų sinapsių fagocitozė, kas gali lemti neurokognityvinius sutrikimus [3]. Daugėja įrodymų, kad uždegimo metu mikroglijos ląstelės gali pagreitinti smegenų senėjimą, trikdydamos fiziologinius smegenų atstatymo ir remodeliacijos procesus. Daugelis virusinių infekcijų, įskaitant žmogaus imunodeficito virusą (ŽIV), sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusą 2 (SARS-CoV-2), gripo ir žmogaus herpeso virusus, veikia smegenis ir trikdo mikroglijos funkcijas. Ypač lėtinės virusinės infekcijos, sukeliančios mažo laipsnio neurouždegimą, gali prisidėti prie smegenų senėjimo [4].

Svarbus lėtinių neurodegeneracinių ligų komponentas yra įgimtas uždegiminis CNS atsakas. Mikroglijos ląstelės atlieka svarbų vaidmenį vystantis ir palaikant šį uždegiminį atsaką. Jos pasižymi padidėjusia proliferacija ir aktyvacija [5]. Mikroglijos ląstelės yra labai svarbios CNS būklei ir jos atstatymui. Esant smegenų pažeidimui, mikroglijos ląstelės migruoja į pažeidimo, infekcijos ir neurodegeneracijos vietas, kur gali aktyvuoti kitas ląsteles, daugintis, fagocituoti, šalinti pažeistus audinius [5-7].

Toll-like receptoriai (TLR) atlieka svarbų vaidmenį atpažįstant virusų struktūrinius komponentus ir aktyvinant įgimtą imuninę sistemą. Suaktyvėjus TLR, sukatyvėja prouždegiminių citokinų gamyba, todėl šie receptoriai gali būti svarbūs kaip potencialūs taikiniai, kontroliuojant infekcijas, tokias kaip COVID-19, ankstyvosiose ligų stadijose [7]. Žinoma, kad virusinės infekcijos gali sukelti mikrogliozę ir uždegimą, visgi, mažai žinoma apie TLR receptorių aktyvaciją esant virusinėms infekcijoms. Vis daugiau tyrimų rodo, kad virusų struktūriniai komponentai prisideda prie įvairių neuropatologijų, tokių kaip neurodegeneracinės ligos – Alzheimerio liga, Parkinsono liga, vystymosi, tačiau iki šiol trūksta duomenų, kurie atskleistų su virusu susijusios uždegiminės neurodegeneracijos molekulinis mechanizmus. Siekiant iširti mikroglijos ląstelių vaidmenį įvairių neuropatologijų atvejais ar virusinių infekcijų metu, svarbu įvertinti virusų struktūrinių komponentų vaidmenį šiuose procesuose. Šiam tikslui pasiekti tyrimuose bus naudojama pirminė gryna mikroglijos ląstelių kultūra, kaip modelinė sistema, siekiant iširti TLR3 ir TLR7 aktyviklių, imituojančių virusų RNR, poveikį mikroglijos ląstelėms, kas prisidės prie gilesnio mikroglijos ląstelių aktyvacijos mechanizmų suvokimo įvairių neuropatologijų atvejais.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: nustatyti *Toll-like* receptorių (TLR7 ir TLR3) aktyviklių – loksoribino (LOX) ir poliinozilo-policitidilo rūgšties (PIC), imituojančių virusų RNR, poveikį pirminėms mikroglijos ląstelių kultūroms.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti TLR7 aktyviklio LOX ir TLR3 aktyviklio PIC poveikį mikroglijos ląstelių gyvybingumui ir skaičiaus kitimui grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos.
2. Ištirti TLR7 aktyviklio LOX ir TLR3 aktyviklio PIC poveikį mikroglijos ląstelių fagocitiniam aktyvumui grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos.
3. Nustatyti TLR7 aktyviklio LOX ir TLR3 aktyviklio PIC poveikį glutamato išsiskyrimui į mikroglijos ląstelių auginimo terpę po 24 val. inkubacijos.
4. Įvertinti TLR7 aktyviklio LOX ir TLR3 aktyviklio PIC poveikį mikroglijos ląstelių aktyvacijai grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nervų sistema

Nervų sistema yra sudėtingas tinklas, leidžiantis organizmui sąveikauti su aplinka. Jutiminiai komponentai, aptinkantys aplinkos dirgiklius, ir motoriniai komponentai, užtikrinantys skeleto, širdies ir lygiųjų raumenų kontrolę, taip pat liaukų sekrecijos kontrolę, yra koordinuojami sistemoje, kad priverstų tinkamai motoriškai reaguoti į gautus, saugomus ir apdorotus dirgiklius ar jutiminius signalus. Nervų sistemą sudaro neuronų tinklai, o šių tinklų signalai leidžia mąstyti, kalbėti, jausti, mokytis, atsiminti ir vykdyti visas funkcijas bei suvokti pojūčius. Nustatyta, kad dėl esamų ląstelių plastiškumo mūsų nervų sistemos gali prisitaikyti prie anksčiau nepatirtų situacijų. Nervų sistemą galima suskirstyti į periferinę (PNS) ir centrinę nervų sistemas (CNS). Nervų sistemą sudaro dvi pagrindinės ląstelių grupės – neuronai ir neuroglijos [8, 9]. Neuronai yra specializuotos ląstelės, skirtos priimti dirgiklius iš išorinių šaltinių arba kitų neuronų, kurie gali sukelti ląstelės sužadinimą arba slopinimą. Jei neuronas yra stimuliuojamas, jis perduoda impulsą (veikimo potencialą) išilgai savo ilgų ląstelių ataugų. Kiekvieną neuroną sudaro ląstelės kūnas su branduoliu ir organelėmis. Iš ląstelės kūno išeina daugybė ataugų. Viena iš jų, aksonas, perduoda impulsus tolyn nuo ląstelės kūno ir gali būti labai ilga. Impulsai ląstelės kūną pasiekia viena ar keliomis trumpomis šakotomis ataugėlėmis, vadinamomis dendritais. Neuronai tarpusavyje jungiasi sinapsėmis. Jos paprastai susidaro tarp presinapsinių neuronų aksonų ir postsinapsinių neuronų dendritų ir (arba) ląstelių kūnų. Sinapsės yra specializuotos sritys tarp gretimų neuronų, kuriose dviejų neuronų ląstelių membranas vieną nuo kitos skiria siauras sinapsinis plyšys. Sinapsinį plyšį įveikia neuromediatoriai. Šie cheminiai "pasiuntiniai" išsiskiria iš presinapsinių aksonų, kai veikimo potencialai pasiekia jų galines struktūras. Tada neuromediatorius pereina sinapsinį plyšį, kad prisijungtų prie postsinapsinio neuro receptorių ir jį aktyvuotų [9].

1.2. Neuroglijos ląstelės

Antrą didelę CNS ląstelių grupę sudaro neaktyvios, pagalbinės neuroglijos, kitaip žinomos kaip glijos, ląstelės. Jos skirstomos į astrocitus, palydovines, spindulines, ependimines ląsteles, oligodendrocitus ir mikroglijos ląsteles. Neuroglijos ląstelės yra randamos tiek smegenų pilkojoje, tiek baltojoje medžiagoje ir jų pagrindinė funkcija yra apsaugoti smegenų ląsteles [9, 10]. Egzistuoja keli skirtingi glijos tipai, atliekantys skirtingas funkcijas. Astrocitai CNS sąveikauja ir su kapiliarais, ir su neuronais. Astrocitai atlieka mitybinę funkciją ir aprūpina neuronus maistinėmis medžiagomis,

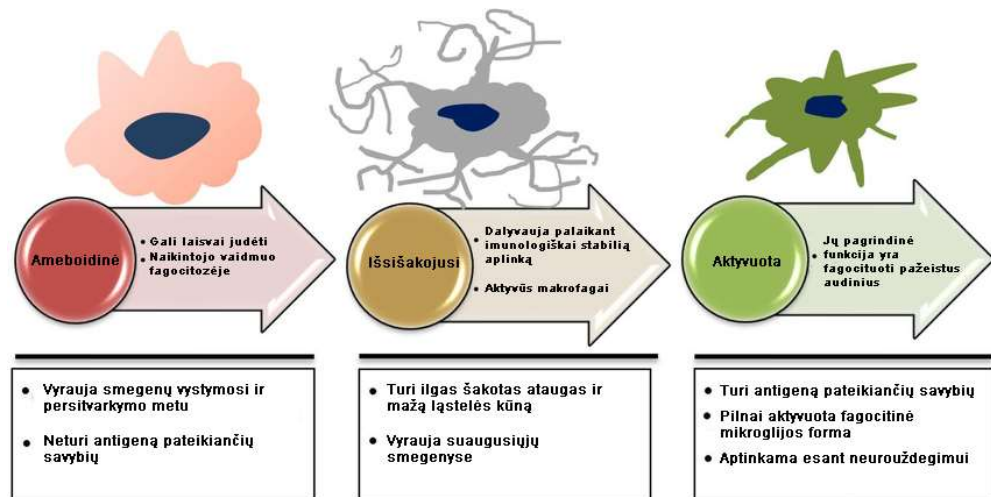
reguliuoja jonų ir cheminių medžiagų koncentraciją tarpląsteliniam skystyje ir suteikia struktūrinę atramą sinapsėms. Astrocitai taip pat sudaro kraujo-smegenų barjerą –struktūrą, kuri užkerta kelią toksinių medžiagų patekimui į smegenis. Palydovinės glijos (angl. *satellite glia*) aprūpina neuronus maistinėmis medžiagomis ir struktūrine parama. Radialinės glijos ląstelės (angl. *radial glia*) tarnauja kaip ramsčiai besivystantiems neuronams, kai jie migruoja į galutines paskirties vietas. Ependiminės ląstelės (angl. *ependymal cells*) iškloja skysčio pripildytus galvos smegenų skilvelius ir centrinį nugaros smegenų kanalą. Jos dalyvauja gaminant smegenų skystį, kuris yra galvos smegenų apsauginė terpė, perneša skystį tarp nugaros smegenų ir galvos smegenų ir yra kraujagyslinio rezginio sudedamoji dalis. Oligodendrocitai sudaro mielino apvalkalus aplink CNS aksonus. Vieną aksoną gali mielinizuoti keli oligodendrocitai, o vienas oligodendrocytas gali aprūpinti mielinu kelis neuronus. Mikroglijos ląstelės valo ir ardo negyvas ląsteles ir saugo smegenis nuo patekusių mikroorganizmų [10].

1.3. Mikroglija

Mikroglijos ląstelės yra svarbiausios CNS imuninės ląstelės, kurios pirmosios reaguoja į smegenų pažeidimus [11]. Jas galima apibūdinti kaip specializuotus makrofagus, gebančius vykdyti fagocitozę, taip apsaugant CNS neuronus [12]. Mikroglijos yra labai judrūs fagocituojantys makrofagai, kurių yra visose suaugusio žmogaus galvos ir nugaros smegenų srityse ir kurie sudaro 10-15 % visų CNS ląstelių. Kaip ir makrofagai likusioje kūno dalyje, mikroglijos naikina ir šalina svetimą medžiagą kaip įgimtos imuninės sistemos dalyvės, naudodamos fagocitinius ir citotoksinius mechanizmus [13]. Metams bėgant, šių ląstelių imuninės funkcijos patraukė dėmesį dėl jų dalyvavimo beveik visuose patologiniuose smegenų procesuose, įskaitant uždegimą, insultą, neurodegeneracines ligas ir virusinę bei bakterinę infekciją. Šie receptoriai teikia signalus, kurie reguliuoja mikroglijos profilio pokyčius iš homeostatinės į aktyvią būseną [14]. Be to, neurodegeneracijos srityse aptiktas mikroglijų pogrupis, vadinamosios su liga susijusios mikroglijos, kurios aptinka pažeidimus, pasireiškiančius su neurodegeneracija susijusiais molekuliniais modeliais (signalais, išsiskiriančiais vykstant neurodegeneraciniams procesams). Sveikų suaugusių žmonių smegenyse glijos ląstelėms priskiriami šie svarbūs procesai: astrocitai veikia pažintinius mokymosi ir atminties procesus, o mikroglijos, kaip įprasta manyti, yra imuninės sistemos elementai. Astrocitai intensyviai dalyvauja su pažinimu susijusiuose procesuose, tokiuose kaip sinapsinio aktyvumo reguliavimas, suaugusiųjų neurogenėzė, aprūpinimas energija palaikant neuronus ir homeostazės palaikymas. Oligodendrocitai taip pat atlieka svarbų vaidmenį pažinimo procesuose. Taigi, nors daugiausia dėmesio skiriama astroцитams ir oligodendroцитams, kad būtų palaikoma ir vykdoma pažintinė funkcija, yra įrodymų, kad mikroglijos taip pat sąveikauja su sinapsiniais ir pažintiniais procesais [15]. Ontogenetiniu požiūriu mikroglijų

populiacija diferencijuojasi iš embrioninio trynio maišelio. Kitas smegenų imunokompetentinių ląstelių šaltinis yra iš periferijos infiltruoti makrofagai. Priešingai nei neuronai, mikroglijos ląstelės turi galimybę visiškai atkurti savo populiaciją suaugusiose smegenyse [14-15].

Mikroglijos taip pat gali veikti kaip antigeną pateikiančios ląstelės ir prisidėti prie uždegimo ir homeostazės mechanizmu, išskirdamos citokinus ir kitas signalines molekules, tokias kaip IL-1, IL-6 arba TNF- α [16]. Mikroglijos ląstelės paprastai skirstomos į tris pagrindines formas: ameboidines mikroglijas, išsišakojusias mikroglijas ir aktyvuotas mikroglijas (1 pav.).



1 pav. Mikroglijos ląstelių formos ir jų palyginimas

(apritaikyta pagal Cai Z., Hussain MD. ir kt.) [17]

Ameboidinės mikroglijos gali laisvai judėti po nervinį audinį kaip fagocitinės ląstelės, tačiau, skirtingai nei aktyvuotos mikroglijos, ameboidinės mikroglijos uždegimo metu neturi antigeną pateikiančių savybių. Šios formos mikroglijos ląstelės daugiausia egzistuoja smegenų remodeliacijos ir brendimo proceso metu [18].

Išsišakojusios mikroglijos ląstelės yra kilusios iš monocitų. Jos dalyvauja palaikant imunologiškai stabilią aplinką. Skirtingai nuo ameboidinių mikroglijos formų, išsišakojusioms mikroglijos ląstelėms būdingos ilgos šakotos ataugos, mažas ląstelės kūnas. Panašiai kaip ir ameboidinės mikroglijos, išsišakojusios mikroglijos taip pat yra praradusios gebėjimą pateikti antigeną. Be to, šakotosios mikroglijos negeba fagocituoti. Jos egzistuoja esant ramybės būsenoje ir neurouždegimo atvejais arba po sužalojimo šakotos mikroglijos gali pereiti į aktyvuotą būseną.

Aktyvuotai būsenai būdingos išsiplėtusios šakotos ląstelės su didesniu ląstelės kūnu ir trumpesniais, storais išsišakojimais [13, 18]. Aktyvuota mikroglija – tai būseną, kai kaskadinės reakcijos nuo šakotos (neaktyvios) formos iki visiškai aktyvios fagocitinės formos vyksta dėl įvairių veiksnių, pavyzdžiui, prouždegiminių citokinių, laisvųjų radikalų, agreguotų baltymų nusėdimo, jonų homeostazės

praradimo, taip pat neurotoksinų ir įgimtos imuninės sistemos disfunkcijos. Aktyvuotos mikroglijos ląstelės gali fagocituoti bei pateikti antigeną. Šių ląstelių pagrindinė funkcija yra fagocituoti pažeistus audinius [13]. Mikroglijos ląstelės reaguoja į audinių pažeidimą arba ligą, naudodamos neurosiuntiklių receptorių ir receptorių, atpažįstančius su pažeidimais susijusius molekulinis modelius (DAMP), pavyzdžiui, adenozintrifosfatą (ATP), ir su patogenais susijusius molekulinis modelius (PAMP), pavyzdžiui, lipopolisacharidą (LPS) ir virusų DNR bei RNR [14].

1.3.1. Fagocitozė

Fagocitozė – tai ląstelinis procesas, kurio metu ląstelės fagocituoja ir pašalina įvairias daleles, įskaitant svetimą medžiagą, mikroorganizmus ir apoptozines ląsteles. Fagocitozė yra esminis audinių pusiausvyros procesas, kurį gali atlikti daugelio tipų ląstelės. Dendritinės ląstelės, makrofagai, mikroglija ir neutrofilai yra vienos iš tokių ląstelių. Šios ląstelės ekspresuoja keletą receptorių, kurie aktyvuoja signalus ląstelėse, sukeldami fagocitozę [19]. Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms mikroglija yra neaktyvi, turi mažą ląstelių kūnelį ir labai išsišakojusias šakotas ataugas. Tačiau, reaguodama į sužalojimą ar patogenus, mikroglija virsta aktyvia fagocituojančia mikroglija, kuri migruoja ir kaupiasi pažeidimo vietoje vykstant procesui, vadinamam chemotaksium. Suaktyvėjusios mikroglijos skiriasi nuo savo ramybės būsenos, nes jos pasižymi įlinkusiomis ataugomis ir ameboidine morfologija, išskiria tiek uždegimą skatinančias, tiek priešuždegimines molekules ir pasižymi stipriu fagocitiniu apoptozinių ląstelių ir nuolaužų šalinimu. Suaktyvėjusios mikroglijos pastebimos sergant beveik visomis neurologinėmis ligomis, įskaitant neurodegeneracines ligas, tokias kaip Alzheimerio liga, Parkinsono liga ir šoninė amiotrofinė sklerozė, infekcines ir uždegimines ligas (pvz., išsėtinė sklerozė), insultą, trauminius ir radiacijos sukeltus smegenų sužalojimus [20].

Mikroglijos yra smegenų fagocitai, daugiausia skirti pašalinti apoptozines ar nekrotines ląsteles ir nesuskaidytus baltymus, pvz., neuromelaniną. Be to, mikroglijos dalyvauja pertvarkant neuronų jungtis, fagocituodamos sinapses, aksonų ir mielino likučius ir tiesiogiai fagocituodamos bakterijas ir virusus kovoja su centrinėmis infekcijomis [20].

Išskirdama citokinus ir turėdama fagocitinių gebėjimų, mikroglija atlieka svarbią CNS apsaugos funkciją ir prisideda prie CNS homeostazės palaikymo. Fagocitozė yra mikroglijos įgimto imuninio atsako dalis ir yra vienas iš mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymenų [1].

1.3.2. Glutamatas

Glutamatas yra dažniausiai aptinkama laisvoji aminorūgštis smegenyse. Atsižvelgiant į tai, buvo nustatyta, kad glutamatas gali aktyvinti bei sužadinti nervines ląsteles ir taip sukelti jų žūtį. Šį poveikį lemia smegenų ląstelių paviršiuje esantys glutamato receptoriai. Didžiausia glutamato koncentracija yra nervų galūnėse esančiose sinapsinėse pūslelėse, iš kurių jis gali išsiskirti egzocitozės būdu [21]. Glutamatas yra pagrindinis aktyvinantis neurosiuntinklis žinduolių CNS, labai svarbus normaliam smegenų funkcionavimui, todėl jo kiekis turi būti griežtai reguliuojamas. Glutamato funkcijos sutrikimai gali sutrikdyti nervų sistemą, o kraštutiniais atvejais gali sukelti nervinių ląstelių žūtį. Nervinių ląstelių funkcijos sutrikimai ir mirtis sukelia pavojingas ligas, įskaitant ataksiją, adrenoleukodistrofiją (ALD), generalizuotą nerimo sutrikimą ir kitus neurologinius bei neuropsichiatrinius sutrikimus. Glutamato klirensas yra būtinas tinkamam sinapsiniam aktyvumui ir siekiant išvengti neuronų pažeidimų dėl pernelyg didelio glutamato receptorių suaktyvėjimo. Glutamato klirensą reguliuoja jaudinančių aminorūgščių pernešėjai (EAAT), atsakingi už didžiąją dalį glutamato pasisavinimo smegenyse [22].

Dėl didelės glutamato koncentracijos smegenyse buvo nelengva pripažinti, kad glutamatas gali veikti kaip dirginantis neuromediatorius. Nors ir buvo įrodyta, kad glutamatas veikia depoliarizuojančiai nugaros smegenų neuronus, jo, kaip neurotransmiterio, statusas buvo pripažintas ne iš karto, nes depoliarizuojantį poveikį galėjo imituoti ir kitos aminorūgštys. Tačiau atradus specifinius glutamato receptorių agonistus ir antagonistus, galiausiai buvo padaryta tvirta išvada, kad glutamatas yra tikras neuromediatorius. Be to, atsižvelgiant į neurosiuntinklio statusą, egzistuoja specifinis mechanizmas, kuriuo inaktyvuojamas receptorių sužadimasis glutamato poveikis, nes buvo nustatyti itin veiksmingi didelio giminingumo glutamato pernešėjai, kurie, kaip nustatyta, pirmiausia yra išreikšti astrocituose. Ekstraląstelinis glutamatas veiksmingai patenka į astrocitus per transporterius, o didėjant ekstraląstelinio glutamato koncentracijai didėja glutamato kiekis astrocituose. Nustatyta, kad iš ekstraląstelinės aplinkos paimtą glutamatą astrocитай metabolizuoja į glutaminą, tačiau papildomai glutamatas gali būti metabolizuojamas oksidaciniu būdu. Šis ekstraląstelinio glutamato virsmas glutaminu yra vadinamojo glutamato-glutamino ciklo dalis. Taigi, glutamato-glutamino ciklas – tai procesas, kurio metu glutamatas yra išskiriamas iš neuronų ir vėliau patenka į astrocitus. Astrocитай išskiria glutaminą, kuris vėl patenka į neuronus ir yra naudojamas kaip pirmtakas glutamato sintezei. Tokiu būdu yra palaikomas reikiamas glutamato ir glutamino kiekis nervų sistemoje [23, 24].

Žinoma, kad mikroglijos ląstelės aktyvacijos metu taip pat gali išskirti glutamatą. Pirmiausia, mikroglijos išskiria ATP ir glutamato receptorius, kurie reguliuoja mikroglijų judėjimą. Po lokaliai pažeistos ATP išsiskyrimas skatina mikroglijos ląstelių aktyvaciją ir aktyvuotos mikroglijos ląstelės migruoja į pažeistos vietą, dauginasi ir fagocituoja ląsteles bei ląstelių komponentus. Tačiau pernelyg didelis mikroglijos suaktyvėjimas gali prisidėti prie lėtinių neurodegeneracinių ligų progresavimo.

Mikroglijos gali išskirti daugybę medžiagų, kurios gali būti žalingos aplinkiniams neuronams, įskaitant glutamatą [25]. Mikroglijoje išsiskiriantis glutamatas gali reguliuoti mikroglijų veiklą, pavyzdžiui, aktyvaciją, migraciją, azoto monoksido (NO) gamybą, citokinų išsiskyrimą ir uždegiminį atsaką, taip pat reguliuoti neuronų, astrocitų ir mikroglijų sąveiką sergant neurodegeneracinėmis ligomis [26].

1.4. Mikroglijos ląstelės ir neuroūdegimas

Neuroūdegimas apibrėžiamas kaip uždegiminis atsakas galvos arba nugaros smegenyse. Ši uždegimą sukelia citokinų, chemokinų, aktyvių deguonies formų ir antrinių mediatorių gamyba. Šiuos mediatorius gamina CNS reziduojančios glijos (mikroglijos ir astrocitai), endotelio ląstelės ir periferinės kilmės imuninės ląstelės. Šios neuroūdegiminės reakcijos turi imuninių, fiziologinių, biocheminių ir psichologinių pasekmių. Be to, neuroūdegimo laipsnis priklauso nuo pirminio dirgiklio ar pažeidimo pasireiškimo priežasčių, trukmės ir eigos. Pavyzdžiui, uždegimas gali sukelti imuninių ląstelių suaktyvėjimą, edemą, audinių pažeidimą ir galimą ląstelių žūtį [27].

Spartesnis smegenų senėjimas dažnai siejamas su sustiprėjusia neurodegeneracija, kuri apima neuronų ląstelių struktūros ir funkcinius sutrikimus ar praradimą dėl medžiagų apykaitos pokyčių, neuronų ląstelių žūtį, neuronų tinklo funkcinių nepakankamumą, neuronų regeneracijos mažėjimą arba minėtų priežasčių visumą. Neurodegeneracija apima funkcinius ir struktūrinius glijos ląstelių pokyčius, dėl kurių atsiranda demielinizacija ir gliozė. Neurodegeneracija sustiprėja dėl neuroūdegimo, kuris labai prisideda prie spartesnio smegenų senėjimo. Neuroūdegimas paprastai siejamas su mikroglijos, smegenyse reziduojančių makrofagų ir įgimtosios imuninės sistemos ląstelių suaktyvėjimu. Neuroūdegimą dažnai sukelia virusinės infekcijos, kurios baigiasi encefalitu, t. y. smegenų uždegiminiu procesu, kuris paprastai apima mikrocirkuliaciją, neuronus ir glijos ląsteles, įskaitant mikroglijas, taip pat smegenų audinio infiltraciją kitomis įgimtos ir įgytos imuninės sistemos ląstelėmis, pavyzdžiui, monocitais, dendritinėmis ląstelėmis, granulocitais ir įvairiomis T limfocitų subpopuliacijomis. Mikroglijos ląstelės yra laikomos vieni pagrindinių neuroūdegimą sukeliančių bei prie neuroūdegimo prisidedančių veiksmų. Taip yra todėl, kad šios įgimtosios imuninės ląstelės atlieka ne tik pirminę CNS imuninę priežiūrą ir į makrofagus panašią veiklą, įskaitant citokinų ir chemokinų gamybą, tačiau taip pat yra atsakingos už didžiąją dalį CNS įgimto imuniteto pajėgumų [28].

1.5. Virusai ir virusiniai baltymai

Virusas gali būti apibūdinamas kaip neląstelinė dalelė arba virionas, kuris užkrečia ląstelę šeimininkę ir joje dauginasi. Virusas turi genomą, sudarytą iš DNR arba RNR, kurį gaubia baltyminė kapsidė. Sudėtingesniuose virusuose apsauginis baltymas gali būti vadinamas galvutės apvalkalu arba šerdine dalele. Skirtingų tipų virusai užkrečia skirtingas specifines šeimininko ląsteles. Bakterijas užkrečiantis virusas vadinamas bakteriofagu. Bakteriofagas T2 užkrečia bakteriją šeimininkę E. coli. T2 ir T4 fagai yra "uodeguotieji" fagai, kurių kapsidė turi uodegą, kuri įterpia viruso genomą į ląstelę šeimininkę. Šeimininko ląstelėje fago genai vadovauja palikuonių virionų gamybai ir surinkimui. Virusai pasišalina, kai ląstelė šeimininkė suyra [29].

Virusų genomai labai skiriasi savo dydžiu: kai kurie virusai koduoja iki maždaug 1000 baltymų (pvz., APMV) arba tik 6-8 baltymus, kaip žmogaus papilomos viruso (ŽPV) atveju. Struktūriniais baltymais dažniausiai yra laikomos virusų kapsidės. Virusų kapsidė yra apvalkalas, sudarytas iš kelių baltymų subvienetų, vadinamų protomerais arba kapsomerais. Kapsidė yra apsauginis apvalkalas aplink viruso genomą. Dažnai DNR arba RNR pagrindu sudarytas genomas yra glaudžiai susijęs su viruso kapsidės apvalkalo baltymais ir sudaro branduolinį baltymų kompleksą. Visi virusų nukleoproteinai gali sąveikauti ir su nukleorūgštimis, ir su kitais baltymais, todėl pasižymi dideliu daugiafunkciškumu. Kai kurių virusų kapsidės yra sudėtingos – nei visiškai ikosaedrinės (briauninės), nei visiškai spiralinės, jose yra papildomų struktūrų, pavyzdžiui, sudėtingų išorinių sienelių arba baltymų uodegėlių. Vienas iš geriausiai ištirtų sudėtingų virusų yra T4 bakteriofagas. Būdingas šio viruso bruožas – ikosaedrinė galvutė, kurią vainikuoja spiralinė uodega. Ši uodegos struktūra baigiasi šešiakampio formos pagrindo plokšte su išplėtomis ir išsikišusiomis baltyminėmis uodegos skaidulomis. Dėl šios uodegos struktūros T4 gali prisitvirtinti prie bakterijos šeimininkės ir, naudodamasis uodega kaip molekulinio švirksčiu, įvesti viruso genomą į ląstelę. Yra žinoma, jog virusai gali prisidėti prie įvairių neuropatologijų vystymosi bei sukelti ar prisidėti prie tokių neurodegeneracines ligų atsiradimo ir/ar vystymosi, kaip Parkinsono ir Alzheimerio liga arba Covid-19 [30-31].

1.6. COVID-19 ir mikroglijos ląstelių ryšys

Nors COVID-19 pirmiausia yra kvėpavimo takų liga, neurologiniai požymiai tapo rimta sergamumo ir mirtingumo priežastimi. Atlikus retrospektyvinį tyrimą Vuhane (Kinija), kuriame dalyvavo 214 hospitalizuotų pacientų, 36,4 proc. pacientų pasireiškė neurologinės ligos, įskaitant galvos skausmą, ataksiją, svaigulį, traukulius ir sąmonės sutrikimus. Jungtinėje Karalystėje atlikto stebėsenos tyrimo metu, kuriame dalyvavo 153 pacientai, rezultatai parodė, kad pakitusi psichikos būklė buvo antra

pagal dažnumą būklė (31 proc. tiriamųjų, iš kurių 6 proc. sirgo encefalitu) [32]. Iš viso 18 % pacientų buvo nustatyta neuropsichiatriinė diagnozė, o 62 % - cerebrovaskulinis pažeidimas (pvz., išeminis insultas), kas parodė, kad su ūmiomis neurologinėmis komplikacijomis dažnai susiduria net ir jaunesni nei 60 metų asmenys. Mikroglijos – svarbiausios imuninės smegenų ląstelės. Dažnai nurodoma, kad šių įgimtų CNS imuninių ląstelių aktyvumas labai skiriasi, ypač atsižvelgiant į žmogaus amžių, sveikatos būklę ir stresą, įskaitant ankstyvojo gyvenimo metu patirtus imuninius iššūkius, tokius kaip trauminiai fiziniai pažeidimai, ankstyvosios infekcijos ar teršalų poveikis. Naujausi duomenys rodo, kad šios neuroninės ląstelės gali atlikti lemiamą vaidmenį COVID-19 infekcijų metu ir gali turėti įtakos ligos sunkumui. Atsižvelgiant į gausėjančius įrodymus, manoma, kad mikroglijos aktyvumas yra dar vienas tikėtinas paaiškinimas, kodėl pastebimi individualūs atsako į COVID-19 skirtumai, taip pat kodėl COVID-19 sergantiems pacientams, ypač vyresnio amžiaus arba sergantiems gretutinėmis ligomis pacientams, pasireiškia sunkesni simptomai. Tai atitiktų „dviejų smūgių“ (angl. *“two hit”*) hipotezę, pagal kurią pirminis stresas, patirtas anksčiau gyvenime (pirmasis smūgis), įjautrina mikroglijos ląsteles, o tai vėliau lemia padidėjusį mikroglijos aktyvumo padidėjimą vėlesnių streso veiksnių (antrojo smūgio) metu. Dėl šio pirminio mikroglijos ląstelių aktyvinimo susidaro vadinamoji „užkrėsta“ (angl. *primed*) mikroglija, kuri po antrojo pažeidimo gali lengviau suaktyvėti iki žalingos hiperaktyvios būsenos [33].

1.7. Toll-like receptoriai

Toll-like receptoriai (TLR) yra labai svarbūs įgimtai imuninei sistemai, nes atpažįsta su patogenais susijusius įvairių mikrobo molekulinis modelius. TLR signalizuoja, įtraukdami specifines adaptorines molekules, dėl kurių suaktyvėja transkripcijos veiksniai: branduolio veiksnys- κ B (NF- κ B) ir interferonų reguliavimo faktoriai (IRF), lemiantys įgimtą imunitetį atsaką. Per pastarąjį dešimtmetį įvairiais metodais, apimančiais genetinius, biocheminius, struktūrinius, ląstelių biologinius ir bioinformacinius tyrimus, buvo išaiškinti tikslūs TLR signalų veikimo mechanizmai. Paaiškėjo, kad TLR signalai yra skirtingi ir atlieka svarbų vaidmenį daugelyje įgimto imuninio atsako į tam tikrus patogenus procesų. Įgimta imuninė sistema, nustatydamą mikrobus, iš pradžių naudojasi struktūrų atpažinimo receptoriais (angl. *pattern-recognition receptors*, PRRs). PRR atpažįsta mikroorganizmams būdingus molekulinis požymius, vadinamus su patogenais susijusiais molekuliniais modeliais (PAMP), ir iš pažeistų ląstelių gautas savaimines molekules, vadinamas su pažeidimais susijusiais molekuliniais modeliais (DAMP). PRR suaktyvina tolesnius signalinius kelius, kurie sukelia įgimtą imunitetą atsaką, gaminant uždegiminius citokinus, I tipo interferoną (IFN) ir kitus mediatorius. Šie procesai ne tik sukelia tiesiogines šeiminingo gynybines reakcijas, pavyzdžiui, uždegimą, bet ir skatina bei organizuoja antigenai būdingus adaptyvius imuninius atsakus [34].

Dabar TLR šeimą sudaro dešimt žmogaus (TLR1-TLR10) ir dvylika pelės (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) receptorių. Toll-like receptorių citoplazminė dalis yra labai panaši į IL-1 receptorių šeimos receptorių citoplazminę dalį ir vadinama Toll/IL-1 receptoriaus (TIR) domenu. Nepaisant šio panašumo, abiejų receptorių ekstraląstelinės dalys yra struktūriškai nesusijusios. IL-1 receptoriui būdingas į Ig panašus domenas, o Toll-like receptorių ekstraląsteliniam domene yra leucino turtingų pasikartojimų. Nustatyta, kad TLR dalyvauja atpažįstant mikroorganizmus. Kiekvienas TLR atpažįsta specifinius mikrobu komponentų modelius [35]. Mikroglijos ląstelės išskiria daug TLR grupės receptorių (nuo TLR1 iki TLR9), todėl tai tik parodo, jog šios ląstelės yra svarbios reguliuojant CNS imuninį atsaką [36]. Daugėja įrodymų, kad Toll-like receptoriai yra susiję su neurodegeneracinėmis ligomis, tokiomis kaip Alzheimerio liga ar Parkinsono liga. Šiuo požiūriu jų raiška mikroglijoje gali moduluoti mikroglijos ląstelių aktyvumą, o tai sukelia apsauginį arba žalingą poveikį neuronams ir kitoms ląstelėms. Todėl TLR gali būti uždegimo ir neurodegeneracinių ligų ryšio tarpininkas [37].

1.7.1. Toll-like 3 ir Poliinozilo-Policitidilo rūgštis (PIC)

Toll-like receptorius 3 (TLR3) yra TLR šeimos narys, tarpininkaujantis transkripcijos būdu indukuojant I tipo interferonus (IFN), uždegiminius citokinus ir chemokinus, taip bendrai sukeliant antivirusinį šeimnininko atsaką. Tyrimai parodė, kad skirtingai nei kiti TLR šeimos nariai, TLR3 yra vienintelis RNR jutiklis, visiškai priklausomas nuo Toll-interleukino-1 receptoriaus (TIR) domeno turinčio adapterio, indukuojančio interferoną- β (TRIF). TLR3 atpažįsta dvigrandę RNR, kuri yra tarpinė viruso replikacijos grandis, ir inicijuoja tolesnę signalų transdukciją, taip padidindamas IFN- α/β ekspresiją ir sukeldamas antivirusinių baltymų sintezę. TLR3 yra plačiai išreikštas neurocituose, imuninėse ląstelėse, fibroblastuose ir įvairiose epitelio ląstelėse. Iš imuninių ląstelių TLR3 ekspresuoja tik dendritinės ląstelės (DC – dendritinės ląstelės), makrofagai ir putliosios ląstelės (MC – putliosios ląstelės). TLR3 lokalizuojasi MC, makrofagų ląstelių paviršiuje ir endosomose. Dendritinės ląstelės yra vienos svarbiausių imuninių ląstelių, gaminančių IFN, įskaitant I tipo IFN (α ir β), kurie yra susiję su virusų šalinimu. TLR3 veikia antigeną pateikiančiose dendritinėse ląstelėse, kad sukeltų limfocitų tarpininkaujamą antigenui specifinį imuninį atsaką. Nustatyta, kad putliosios ląstelės veikia kaip įgimtojo imuniteto apsauginės ląstelės, aktyviai dalyvaujančios infekcijų kontrolės ir šalinimo procese. Putliosios ląstelės ekspresuoja TLR3 molekules ir kitus baltymus, susijusius su ląstelinio antivirusiniu atsaku, pavyzdžiui, IRF3, I ir II tipo IFN receptorius ir audinių suderinamumo komplekso I (MHC I, angl. *major histocompatibility complex*) pagrindinius baltymus [38-39].

Mikroglijos išskiria TLR3 receptorius, kurie atpažįsta su patogenais susijusius molekulinis modelius, pvz. virusų ar bakterijų dvigrandę RNR. Be to, kad TLR3 aktyvinamas infekcijų metu, jis gali

būti susijęs su neurodegeneracija ar psichikos sutrikimais. Atsižvelgiant į tai, kad iš nekrotinių ląstelių išsiskyrusi RNR gali aktyvuoti TLR3, yra manoma, kad iš žūstančių neuronų išsiskyrusi endogeninė nukleorūgštis gali aktyvuoti TLR3 mikroglijoje ir skatinti uždegiminį procesą smegenyse [40].

Polinozino-policitidilo rūgštis (PIC) yra sintetinis dvigubos grandinės RNR analogas ir agonistas, veikiantis į Toll-like receptorių 3 (TLR3) ir į retinoinės rūgšties indukuojamą geną i (RiG-i) panašių receptorių (RLR), įskaitant RiG-i ir su melanoma susijusį diferenciacijos geną 5 (MDA5). PIC poveikis navikų imunoterapijai yra gerai ištirtas jau kelis dešimtmečius. Žinoma, kad PIC gali būti naudojamas kaip vakcinos adjuvantas, siekiant sustiprinti įgimtą ir adaptyvų imuninį atsaką ir pakeisti naviko mikroaplinką. Naujausi tyrimai parodė, kad TLR3 ir RLR signalų aktyvinimas PIC gali tiesiogiai sukelti kai kurių vėžinių ląstelių apoptozę. PIC aktyvina žmogaus įgimtą imuninę sistemą, vėliau reguliuoja adaptyvųjį imunitetą, dėl to pakinta naviko mikroaplinka ir stipriai slopinamas naviko augimas. Neseniai atliktas tyrimas parodė, kad PIC transfekcija gali sumažinti naviko metastazes imunodeficitinėms pelėms, o tai rodo, kad PIC tarpininkaujama antivėžiniam poveikiui nereikia imuninės sistemos aktyvacijos. Be to, PIC gali tiesiogiai sukelti vėžinių ląstelių apoptozę. Šį tiesioginį priešvėžinį PIC poveikį lemia priešvėžinių genų reguliavimas ir ląstelių apoptozės indukcija aktyvuojant pagrindinius su juo susijusius receptorius, pavyzdžiui, TLR3. PIC priešvėžinėje imunoterapijoje tiriamas jau kelis dešimtmečius. Naujausi tyrimai rodo, jog PIC padidina fermentų, dalyvaujančių prostaglandino E2 sintezėje (pvz., ciklooksigenazė-2 ir mikrosominė prostaglandino E sintazė-1), sintezę suaktyvindamas skirtingus mikroglijos signalinius kelius. Šie du fermentai ir jų produktai gali prisidėti prie neuropatologinio poveikio, atsirandančio reaguojant į dvigrandę RNR, ir tai gali būti susiję su TLR3 poveikiu [40-41].

1.7.2. Toll-like 7 ir Loksoribinas (LOX)

Toll-like receptorius 7 (TLR7) – yra endosominis įgimto imuniteto jutiklis, galintis aptikti viengrandinę ribonukleorūgštį. TLR7 sukelta I tipo interferono ir kitų uždegiminių citokinų gamyba yra svarbi antivirusinio imuninio atsako metu. Be to, pakitęs TLR7 raiškos lygis yra susijęs su įvairiais autoimuniniais sutrikimais, o tai rodo, kad šis receptorius atlieka svarbų vaidmenį susiformuojant uždegiminiam atsakui [42]. Toll-like receptorius 7 (TLR7) yra viengrandės RNR (ssRNR, angl. *single-stranded RNA*) receptorius įgimtame imunitete, taip pat reaguoja į guanoziną ir cheminius ligandus, pavyzdžiui, imidazochinolino junginius [43]. Buvo įrodyta, kad TLR7 dalyvauja imuniniame atsake į sintetinius junginius, kurie yra naudojami su virusine infekcija susijusioms ligoms gydyti [44-45].

Moksliniai tyrimai rodo, jog centrinėje nervų sistemoje daugiausiai TLR7 yra išskiriama CNS makrofaguose ir mikroglijoje, lyginant su kitomis CNS ląstelėmis (pvz., astrocituais). TLR7 yra aktyvuojami viengrandės RNR ir centrinėje nervų sistemoje yra svarbūs dėl to, kad jie gali aptikti daugybės virusų ir bakterijų viengrandžius RNR fragmentus [46]

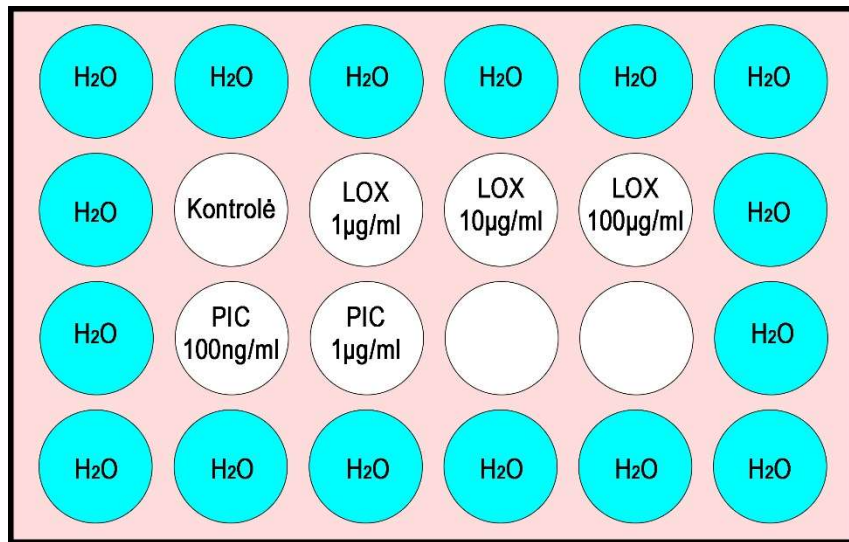
Loksoribinas (7-*alil*-7,8-dihidro-8-okso-guanozinas) – Toll-like receptorių 7 (TLR7) agonistas. Šis junginys yra guanozino analogas [47]. Loksoribinas (LOX) yra guanino ribonukleotido darinys, pasižymintis imunostimuliuojančiu ir imunomoduliuojančiu poveikiu. LOX palengvina pernešimą per plazminę membraną į ląstelės citoplazminę ir veikia viduląsteliniu būdu, apeidamas biocheminius etapus, susijusius su membraninio signalo perdavimo keliu, kurį naudoja antigeninės arba anti-IgM ląstelės B imuninės ląstelės aktyvuoti. Ši medžiaga aktyvuoja Toll tipo receptorių 7 (TLR7), priklausantį su patogenais susijusių molekulinų modelių atpažinimo receptorių TLR šeimai, taip suaktyvindama įgimtą imuninę sistemą. Šiai aktyvacijai reikalingas endosominis brendimas, o atpažįsta tik TLR7. Dėl to loksoribinas skatina ciklines B ląsteles daugintis ir nespecialiai diferencijuotis, o į antigeną reaguojančias B ląsteles – diferencijuotis į antikūnų gamybą, taip žymiai sustiprindamas pagrindinį imuninį atsaką [48]. Guanozino analogas loksoribinas pasižymi antivirusiniu ir antivėžiniu poveikiu pelių gyvūnų modeliuose ir pradėtas naudoti I klinikinių tyrimų fazėje [49]. Yra žinoma, kad LOX stimuliuoja blužnies limfocitų proliferaciją *in vitro* ir padidina antikūnų gamybą prieš avių raudonuosius kraujo kūnelius priklausomai nuo dozės. Šis antikūnų atsako padidėjimas yra ryškesnis esant antigenui, o tai rodo, kad LOX veikia ne tik kaip polikloninis B ląstelių stimulatorius. Loksoribinas gali tiesiogiai sužadinti antigenu stimuliuojamas B ląsteles arba jis gali suteikti signalą B ląstelėms aktyvuoti analogiškai kaip antigenui specifinės T ląstelės. Loksoribino gebėjimas sustiprinti imuninį atsaką į antigenus leidžia manyti, kad jis gali būti naudingas vėžio imunoterapijai [50]. Naujausi tyrimai rodo, jog LOX gali paskatinti citokinų išsiskyrimą iš mikroglijos ir paveikti jos proliferaciją. Kadangi loksoribinas sukelia TLR7 receptorių aktyvaciją, ši medžiaga gali prisidėti prie neuronų pažeidimo smegenyse [51].

2. TYRIMŲ METODAI

2.1. Pirminė gryna mikroglijos ląstelių kultūra

Pirminės grynos mikroglijos ląstelių kultūros buvo išskiriamos iš 5-7 dienų amžiaus, abiejų lyčių *Wistar* veislės žiurkių jauniklių smegenų žievės. Skyrimo procedūrą atliko FELASA leidimą darbui su laboratoriniais gyvūnais turintis asmuo. Skyrimo procedūra buvo atliekama sterilioje aplinkoje, naudojant sterilius chirurginius įrankius. Pirmiausia, atskyrus smegenų pusrutulius nuo likusios smegenų dalies, 4°C temperatūros fosfatiniame druskų tirpale (PBS) buvo pašalinamos kraujagyslės ir smegenų dangalai. Pašalinus kraujagysles bei dangalus, smegenų žievė supjaustoma į mažus audinio gabalėlius ir inkubuojami 15 ml konusiniame mėgintuvėlyje su Verseno tirpalu (Versene, Gibco) ląstelių auginimo inkubatoriuje 5 min., kas minutę pavartant. Po inkubacijos, audinio gabalėliai trituruojami bei resuspenduojami skirtingo diametro pipetėmis, supernatantą perkeliant į sterilų 50 ml konusinį mėgintuvėlį su ląstelių auginimo terpe DMEM GlutaMax (Gibco), papildyta su 10% fetalinio veršelio serumu (FBS) bei 1% penicilino-streptomicino (Gibco) antibiotiko tirpalu. Resuspendavus audinį, ląstelių supernatantas resuspenduojamas bei filtruojamas pro 100µm porų diametro ląstelių koštuvus ir centrifuguojamas 290 g x 5 min. Po centrifugavimo, pašalinamas supernatantas ir ant nusėdusių ląstelių užpilama šiltos, kambario temperatūros (KT) ląstelių auginimo terpės. Ląstelių suspensija resuspenduojama ir ląstelės užsėjamos į ląstelių auginimo flakonus T75 cm², prieš sėjimo procedūrą mažiausiai 2 valandas padengtus vandeniniu poli-L-lizino (Cultrex), tirpalu, santykiu 1:20 bei po inkubacijos atlikus du plovimus su fosfatiniu druskų tirpalu (PBS, Gibco). Eksperimentiniams tyrimams buvo naudojamos 7-14 dienų ląstelių kultūros.

Tyrimuose buvo naudojamos ląstelių auginimo lėkštelės su 24 šulinėliais (2 pav.). Kiekvienas eksperimentinis šulinėlis buvo padengtas vandeniniu poli-L-lizino tirpalu, kurio skiedimo santykis buvo 1:20.



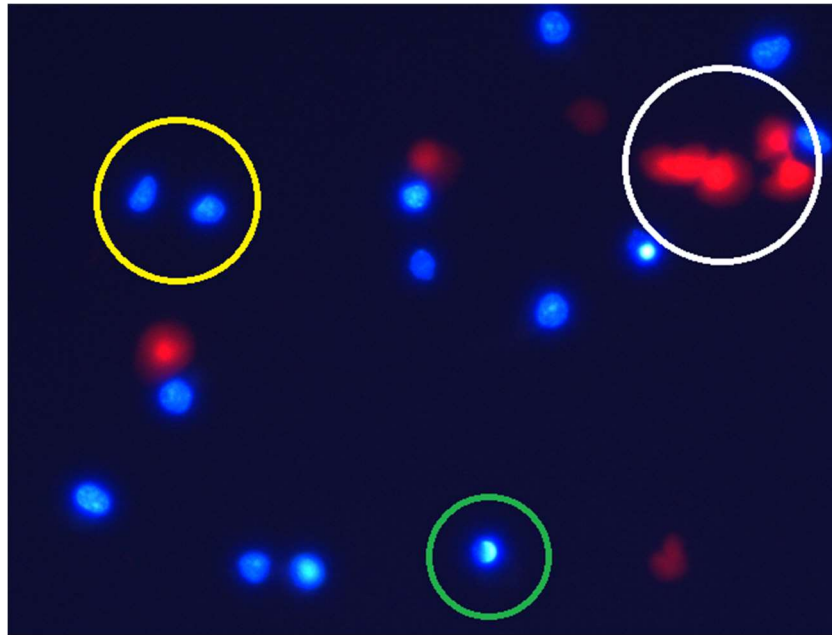
2 pav. Schematinis eksperimentinės lėkštelės šulinėlių užpildymas.

Padengtos lėkštelės buvo inkubuojamos 37°C temperatūroje mažiausiai 2 valandas (dažniausiai inkubacija truko per naktį) ir po inkubacijos 2 kartus plaunamos fosfatinio druskų tirpalu (PBS). Lėkštelės mechaniškai buvo atkeliamos nuo ląstelių auginimo flakonų ir centrifuguojamos 5 minutes 290 x g greičiu kambario temperatūroje. Nucentrifugavus supernatantas buvo pašalintas, o nusėdusios lėkštelės užpildytos nauja mikroglijos ląstelių augimo terpe bei prafiltruojamos pro 100 µm porų dydžio filtrą. Eksperimentuose naudotos 7–14 dienų (DIV) mikroglijos ląstelių kultūros .

Prieš sėjant ląsteles buvo nustatytas jų tankis bei gyvybingumas tripano mėlio testu. Į Eppendorf tipo mėgintuvėlį buvo pilama 20µl ląstelių suspensijos bei 20µl tripano mėlio dažo (santykis 1:1). Ant hemocitometro kameros (Superior Marienfeld) buvo dedamas objektinis stiklelis ir hemocitometras buvo užpildomas ląstelių–tripano mėlio dažų suspensija. Tripano mėlio testas paremtas ląstelių integralumo principu, t.y. esant nepažeistai ląstelių membranai, tripano mėlio dažas nepereina ląstelių membranos ir ląstelės išlieka bespalvės (gyvybingos), tuo tarpu, esant pažeistai ląstelių membranai, dažas patenka į ląstelę ir ją nudažo tamsiai mėlyna spalva, taip ląsteles vertinant kaip žuvusias. Šio testo tikslas: įvertinti ląstelių tankį bei gyvybingumą prieš ląstelių užsėjimą į eksperimentines lėkšteles. Ląstelių tankis bei gyvybingumas tripano mėlio testu buvo vertintas šviesiniu mikroskopu (OLYMPUS CKX41), naudojant 20x padidinimo objektyvą. Gyvos ląstelės buvo skaičiuojamos keturiuose 1x1 mm kameros kvadratuose, kurie yra padalinti į mažesnius 4x4 kvadratus. Gautas ląstelių skaičius (viso 16-oje kvadratu) sumuojamas ir dauginamas iš skiedimų skaičiaus (2) bei vieno kvadrato tūrio dalies mililitre (5000). Tokiu būdu apskaičiuotas ląstelių skaičius viename mililitre terpės. Ląstelės buvo sėjamos 150000 ląst./ml tankiu. Prieš užsėjimą – pašalinamas vandeninis poli-L-lizino (angl. *Poly-L-lysine*) tirpalas iš eksperimentinių lėkštelių, atliekami du plovimai PBS tirpalu ir užsėtos ląstelės inkubuojamos 24 valandas 37°C temperatūroje ląstelių auginimo inkubatoriuje.

2.2. Mikroglijos ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu

Eksperimentams naudojamos grynios mikroglijos ląstelių kultūros, kurios parą buvo inkubuojamos ląstelių auginimo inkubatoriuje (5 proc. CO₂, 37°C) po ląstelių užsėjimo procedūros, toliau buvo veikiamos skirtingų koncentracijų tiriamosiomis medžiagomis – loksoribinu 95% (LOX: 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir poliinozilo-policitidilo rūgštimi (PIC: 100ng/ml ir 1µg/ml) ir inkubuojamos 24 val. ląstelių auginimo inkubatoriuje. Mikroglijos ląstelių gyvybingumas ir skaičiaus kitimas po atitinkamų inkubacijų buvo vertinami fluorescencinės mikroskopijos metodu, naudojant fluorescencinius dažus – propidžio jodidą (PI) (Sigma-Aldrich), Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) ir Izolektino IB4 ir AlexaFluor 488 dažų konjugatą (IB4) (ThermoFisher). Prieš atliekant ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus vertinimą, iš kiekvieno eksperimentinės lėkštelės šulinėlio buvo nusiurbama po 320µl augimo terpės ir įdedami fluorescenciniai dažai: PI (7µM/ml), Hoechst 33342 (4µg/ml) ir IB4 (7ng/ml). Ląstelių vertinimas buvo atliekamas atsižvelgiant į morfologinius ląstelių branduolio pokyčius. Hoechst 33342 dažai nudažo gyvas ir apoptozines ląsteles atitinkamai mėlyna spalva (gyvos ląstelės) ir šviesiai mėlyna-neonine spalvomis (apoptozinės ląstelės). PI dažais buvo vertinama ląstelių žūtis nekrozės būdu, pro mikroskopą stebint raudonos spalvos ląstelių branduolius. IB4 dažai nudažė mikroglijos ląsteles žalia fluorescentine spalva. Mikroglijos ląstelės su atitinkamais fluorescenciniais dažais buvo inkubuojamos 5-10 min. ląstelių auginimo inkubatoriuje (5 proc. CO₂, 37°C) prieš ląstelių vaizdinimo procedūrą. Po inkubacijos, ląstelių pokyčiai buvo stebimi pro fluorescencinį mikroskopą (OLYMPUS IX71). Naudojant kompiuterinę vaizdo analizės programą „ImageProExpress 6.3” buvo fotografuojamos ląstelės iš kiekvieno šulinėlio po 5 taškus, naudojant PhC, DAPI bei FITC filtras, naudojant 20x didinantį objektyvą. Ląstelių vertinimas, skaičiuojant gyvas, nekrozės bei apoptozės būdu žuvusias ląsteles, buvo atliekamas naudojant „ImageJ“ duomenų analizės programą. Ląstelės buvo vertinamos kaip gyvos, jeigu jų branduoliai buvo mėlyni bei homogeniški. Ląstelės, kurių branduoliai buvo raudoni ir nehomogeniški, buvo vertinamos kaip nekrozės būdu žuvusios ląstelės. Apoptozės būdu žuvusių ląstelių branduoliai švytėjo ryškia neonine-mėlyna spalva su chromatino sankauptomis (3 pav.).



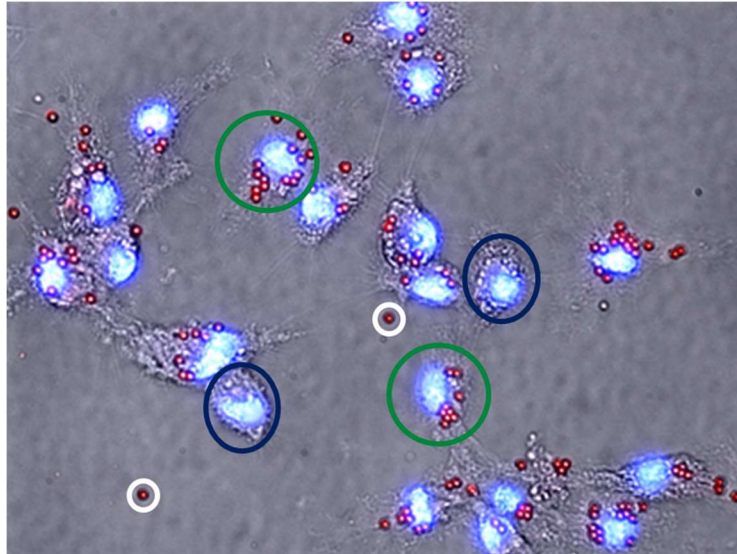
3 pav. Pavyzdinė mikroglijos ląstelių kultūros nuotrauka ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus vertinimui fluorescencinės mikroskopijos metodu

Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos su LOX 1 $\mu\text{g/ml}$. Geltonas apskritimas – gyvų ląstelių branduoliai, baltas apskritimas – nekrozės būdu žuvusių ląstelių branduoliai, žalias apskritimas – apoptozės būdu žuvusių ląstelių branduoliai. DAPI filtro nuotrauka, 20x objektyvas, OLYMPUS IX71 mikroskopas.

2.3. Mikroglijos ląstelių fagocitinio aktyvumo vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu

Po 24 val. inkubacijos su tiriamosiomis medžiagomis (LOX: 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ ir 100 $\mu\text{g/ml}$; ir PIC: 100 ng/ml ir 1 $\mu\text{g/ml}$), buvo atliekama mikroglijos ląstelių fagocitinio aktyvumo (fagocitozės) vertinimo procedūra, t.y. ląstelės inkubuojamos su komerciniais 2 μm dydžio fluorescenciniais karboksilatu padengtais latekso rutuliukais (angl. *Latex Beads*) (Sigma). Į ląstelių auginimo terpę yra dedami fluorescenciniai latekso rutuliukai santykiu 4 $\mu\text{l/ml}$ ir inkubuojama 2 valandas ląstelių auginimo inkubatoriuje. Po 1 valandos 45 minučių inkubacijos ląstelių terpė buvo papildyta Hoechst 33342 dažais (4 $\mu\text{g/ml}$) ir ląstelės inkubuojamos dar 15 minučių (viso 2 val. inkubacinis laikotarpis). Po inkubacijos atliekami 5 plovimai PBS tirpalu (KT), ląsteles švelniai pavartant. Po plovimų atliekamas ląstelių vaizdinimas, naudojant fluorescencinį mikroskopą (OLYMPUS IX71), esant 40x padidinimu. Naudojant vaizdų analizės programą „ImageProExpress 6.3“, fotografuojami 5 ląstelių taškai su fazių kontrasto (PhC) ir DAPI filtrais ir naudojant programą „ImageJ“ buvo vertinamas bendras mikroglijos

ląstelių bei fagocitavusių ląstelių (4 pav.), t.y. ląstelių, kurios fagocitavo latekso rutuliukus, skaičius. Fagocitinių ląstelių skaičius taip pat vertintas ir išreiškiant fagocituotų rutuliukų skaičių per ląstelę.



4 pav. Pavyzdinė mikroglijos ląstelių kultūros nuotrauka fagocitinio aktyvumo vertinimui fluorescencinės mikroskopijos metodu

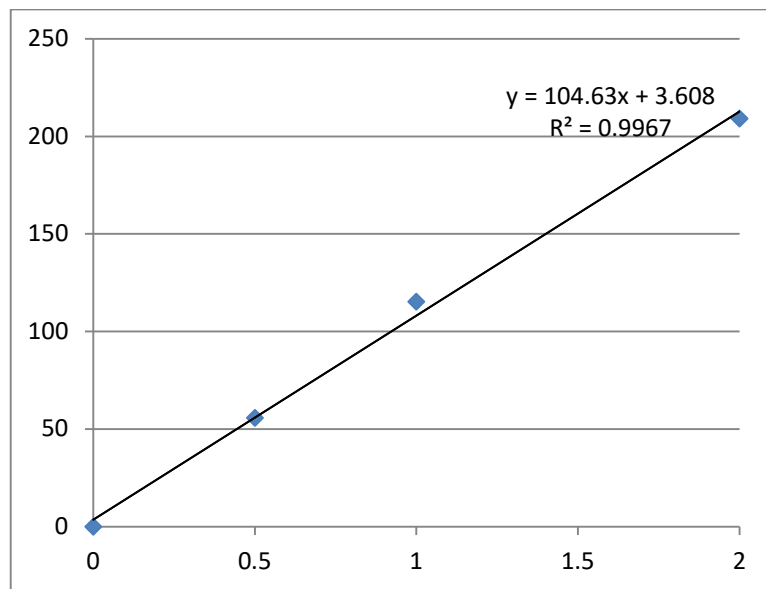
Fagocitozės vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu, naudojant fluorescuojančiu latekso rutuliukus (angl. *latex beads*) grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos su LOX 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Žalios spalvos apskritimai – ląstelės, fagocitavusios latekso rutuliukus; mėlynos spalvos apskritimai – ląstelės, kurios nefagocitavo latekso rutuliukų; baltos spalvos apskritimai – fluorescuojantys latekso rutuliukai. Perdengta fazių kontrasto (PhC) ir DAPI filtrų nuotrauka, 40x objektyvas, OLYMPUS IX71 mikroskopas.

2.4. Glutamato kiekio nustatymas mikroglijos ląstelių auginimo terpėje

Glutamato kiekio nustatymas mikroglijos ląstelių auginimo terpėje buvo vertintas spektrofotometriniu metodu, naudojant komercinį “Invitrogen Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit” rinkinį pagal gamintojo pateiktus protokolus bei rekomendacijas. Šiame rinkinyje pateikiamas itin jautrus metodas nuolatiniam glutamo rūgšties nustatymui arba glutamato oksidazės aktyvumo stebėjimui fluorescenciniame mikroplokštelių skaitytuve arba fluorometre. Šio tyrimo metu L-glutamato rūgštis oksiduojama glutamato oksidazės, susidarant alfa-ketoglutaratui, NH_3 ir H_2O_2 . L-alaninas ir L-glutamato-piruvato transaminazė įtraukiami į reakciją, kad regeneruotų L-glutamato rūgštį transaminuojant alfa-ketoglutaratą, todėl pradinė reakcija vyksta keliais ciklais, o susidaręs H_2O_2 labai

sustiprėja. Vandenilio peroksidas reaguoja su 10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazinu (Amplex Red reagentas) santykiu 1:1 reakcijoje, kurią katalizuoja krienų peroksidazė (HRP), ir susidaro labai fluorescuojantis produktas rezorufinas.

Siekiant įvertinti glutamato kiekį, remiantis gamintojo protokolu buvo ruošiami atitinkamo skiedimo tirpalai (0.5µM, 1µM, 2µM, 5µM, 10µM ir 20µM) standartinės kreivės sudarymui (5 pav.). Pagal gamintojo protokolą, buvo paruoštas 100µM “Amplex Red” reagentas, kurį sudarė 0.25 U/ml fermentas krienų peroksidazė (Horseradish Peroxidase, HRP), 0.08 U/ml L-glutamato oksidazė, 0.5 U/ml L-glutamato-piruvato transaminazė ir 200µM L-alaninas. Į 96 šulinėlių eksperimentinę lėkštelę buvo įpilama mikroglijos ląstelių auginimo terpė po 24 val. inkubacijos su skirtingų koncentracijų tiriamosiomis medžiagomis (LOX ir PIC). Toliau 5 eksperimentinę lėkštelę pilamas paruoštas “Amplex Red” reagentas ir lėkštelė inkubuojama 30 minučių 37°C temperatūroje tamsoje. Po 30 minučių inkubacijos buvo matuojama fluorescencija ląstelių auginimo terpėje, esant 544 nm ir 590nm bangos ilgiams. Po inkubacijos kompiuterine programa “Ascent Software Version 2.6” buvo apskaičiuota ląstelių fluorescencija. Skaičiuojant glutamato koncentraciją, iš gautos fluorescencijos reikėjo atimti neigiamą kontrolę ir tokiu būdu buvo gauta tikroji fluorescencija. Tikrąją fluorescenciją reikėjo lyginti su gauta kalibracine kreive ir tokiu būdu buvo apskaičiuotas glutamato kiekis (koncentracija) mikroglijos ląstelių auginimo terpėje.



5 pav. Kalibracinė kreivė glutamato kiekio nustatymui mikroglijos ląstelių auginimo terpėje

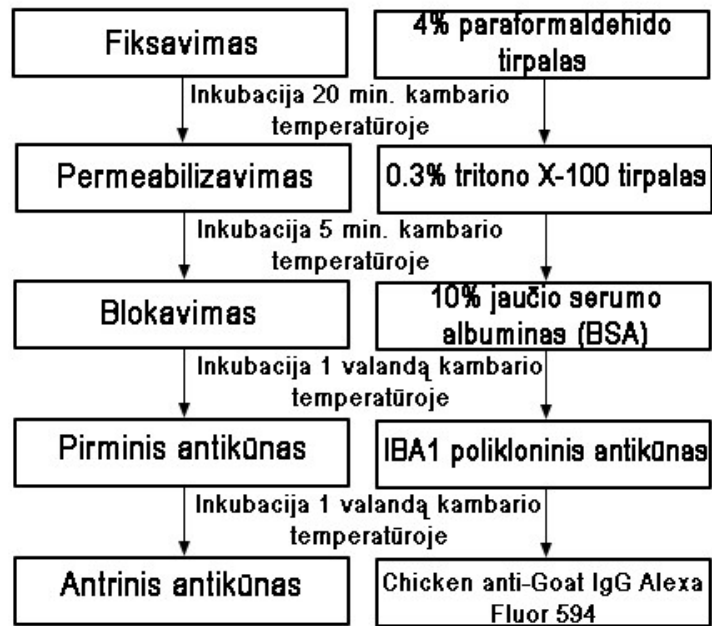
2.5. Mikroglijos ląstelių aktyvacijos vertinimas imunofluorescencijos metodu

Po 24 val. inkubacijos su skirtingų koncentracijų LOX (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) buvo taip pat nustatoma ir mikroglijos ląstelių aktyvacija imunofluorescenciniu metodu (6 pav.), įvertinant mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymens – Iba1 baltymo raiškos pokyčius. Aktyvacija buvo vertinama nustatant ląstelių fluorescencijos intensyvumo pokyčius kultūroje, esant skirtingoms inkubacinėms sąlygoms (LOX ir PIC).

Pirmojo imunofluorescencijos metodo etapo metu buvo atliekamas ląstelių fiksavimas. Fiksavimo tikslas yra išsaugoti ląsteles ir audinių komponentus „gyvos būsenos“, kad atliekant sekančius procedūrinius žingsnius ląstelių morfologija nepakistų [52]. Fiksavimas buvo atliekamas naudojant 4% paraformaldehido tirpalą (KT). Pirmiausia, nuo ląstelių buvo pašalinta ląstelių auginimo terpė ir ląstelės inkubuojamos 20 minučių 4% paraformaldehido tirpalu (KT). Po fiksavimo etapo paraformaldehido tirpalas buvo nusiurbtas ir lėkštelės du kartus plaunamos PBS tirpalu.

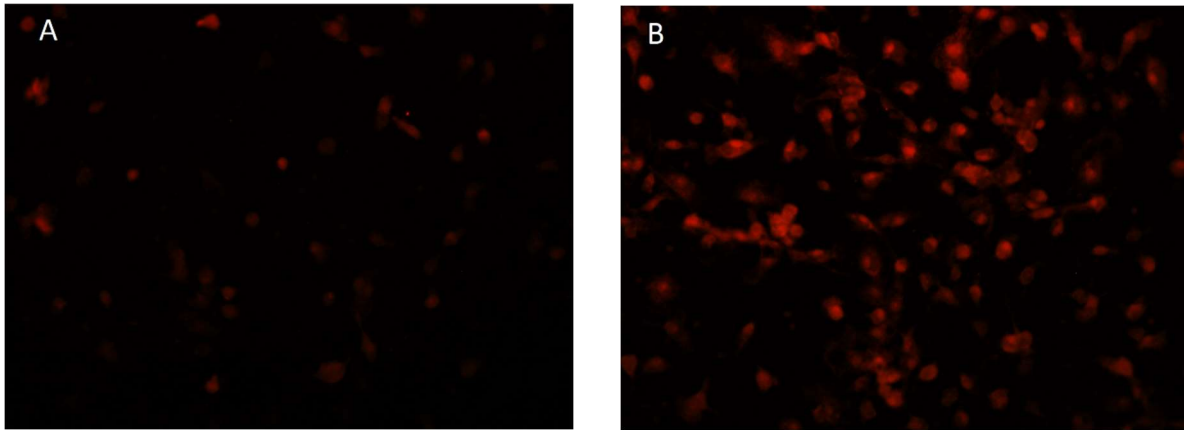
Antrojo etapo metu buvo atliekamas ląstelių permeabilizavimas. Permeabilizavimo metu pašalinama daugiau ląstelės membranos lipidų, kad į ląstelės vidų patektų didelės molekulės, pavyzdžiui, antikūnai [53]. Permeabilizavimas buvo atliktas naudojant 0.3% tritono X-100 tirpalą (Sigma-Aldrich) ir inkubuojant ląsteles 5 minutes KT. Po inkubacijos, šulinėliai vėl buvo plaunami PBS tirpalu.

Trečiasis žingsnis buvo mikroglijos ląstelių blokavimas. Blokavimas paprastai atliekamas tirpalu, kuriame yra baltymų perteklius, sumažinantis nespecifinio prisijungimo kiekį mėginyje. Tai gali būti svarbu, jei pirminis arba antrinis antikūnas yra linkęs sąveikauti su molekulėmis tirpale, kurios nėra tyrimo objektas [53]. Blokavimas atliktas naudojant 10% jaučio serumo albuminą (BSA) (Sigma-Aldrich) ir inkubuojant ląsteles 1 valandą KT.



6 pav. **Imunofluorescencinio dažymo schema mikroglijos ląstelių aktyvacijos vertinimui**

Po inkubacijos buvo dedamas pirminis antikūnas Iba1 (Thermo Fisher). Uždėjus pirminį antikūną (santykiu 1:200), lėkštelė buvo inkubuojama kambario temperatūroje 1 valandą ir po inkubacijos vėl buvo plaunama PBS'u. Po plovimo, buvo dedamas antrinis antikūnas Chicken anti-Goat IgG Alexa Fluor 594 (santykiu 1:200) ir, kartu su antriniu antikūnu dedami IB4 (santykiu 1:500) ir Hoechst 33342 (10 μ g/ml) dažai. Ląstelės inkubuojamos 30 minučių kambario temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės buvo vaizdinamos fluorescenciniu mikroskopu OLYMPUS IX71, naudojant PhC, DAPI, FITC bei TX-RED filtrus. Fotografuojama buvo kiekvieno šulinėlio 5 skirtingi taškai. Naudojant kompiuterinę programą „ImageJ“, buvo pašalinamas nuotraukų fonas ir programiškai įvertinama mikroglijos ląstelių fluorescencijos intensyvumas (7 pav.).



7 pav. **Mikroglijos ląstelių aktyvumo vertinimas imunofluorescencijos metodu.**

Pavyzdinės fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos mikroglijos ląstelių aktyvacijos (Iba1 raiškos) vertinimui po imunofluorescencinio dažymo (mikroskopas OLYMPUS IX71), 20x objektyvas, padidinimas – 500 kartų. **(A)** – kontrolinės mikroglijos ląstelių grupės Iba1 raiškos (fluorescencinio intensyvumo) vertinimas po 24 val. inkubacijos; **(B)** – mikroglijos ląstelių, inkubuotų su tiriamąja medžiaga (LOX 100µg/ml) Iba1 raiškos (fluorescencinio intensyvumo) vertinimas po 24 val. inkubacijos.

2.6. Statistinė analizė

Duomenų analizei, statistiniams, matematiniais skaičiavimams ir grafiniam vaizdavimui naudotos ImageJ ir SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc., JAV) programos. Statistiniam palyginimui naudotas vienfaktorinės dispersinės analizės ANOVA Tukey kriterijus. Skirtumai tarp eksperimentinių duomenų vidurkių laikomi statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

2.7. Bioetikos komiteto leidimas

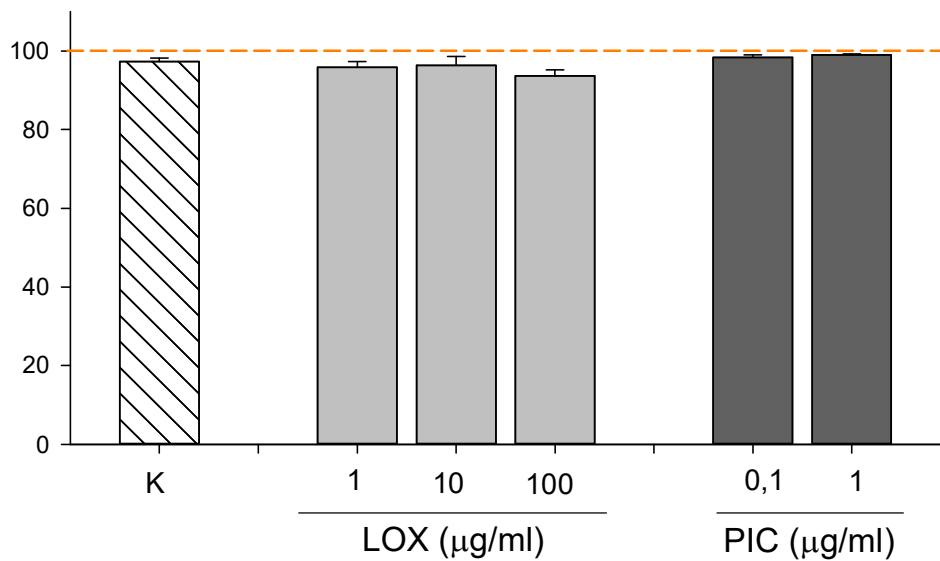
Tyrimas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijoje nuo 2021 rugsėjo iki 2022 m. gruodžio mėnesio. Tyrimui atlikti buvo gautas LSMU Bioetikos komisijos leidimas (priedas Nr. 1) (Nr. BEC-MVB(B)-427).

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Siekiant nustatyti *Toll-like* receptorių 7 ir 3 (TLR7 ir TLR3) aktyviklių, imituojančių virusų RNR – loksoribino (LOX; 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir poliinozilo-policitidilo rūgšties (PIC; 100ng/ml ir 1µg/ml) skirtingų koncentracijų poveikį grynai mikroglijos ląstelių kultūrai, buvo atliktas keturių dalių eksperimentinis tyrimas. Pirmoje tyrimo dalyje buvo nustatomas šių aktyviklių, imituojančių virusų RNR – LOX ir PIC skirtingų koncentracijų poveikis mikroglijos ląstelių kultūros skaičiui ir gyvybingumui, vertinant gyvų ir žuvusių (nekrozės ir apoptozės būdu) ląstelių skaičių po 24 val. inkubacijos 37°C temperatūroje (žr. Metodų dalis 2.2.). Antroje dalyje buvo tiriamas aktyviklių LOX ir PIC skirtingų koncentracijų poveikis mikroglijos ląstelių fagocitiniam aktyvumui, kuris buvo vertinamas, taikant fluorescencinės mikroskopijos metodą, naudojant 2µm dydžio fluorescuojančius latekso rutuliukus, fluorescencinio mikroskopo pagalba skaičiuojant fagocitavusių ir nefagocitavusių mikroglijos ląstelių skaičių bei fagocituotų fluorescencinių rutuliukų skaičių ląstelėje (žr. Metodų dalis 2.3.). Trečioje tyrimo dalyje buvo nustatoma glutamato koncentracija mikroglijos ląstelių augimo terpėje, taikant spektrofotometrinių analizės metodą (žr. Metodų dalis 2.4.). Ketvirtoje tyrimo dalyje, siekiant įvertinti mikroglijos ląstelių aktyvaciją, buvo taikytas imunofluorescencijos metodas. Aktyvacija buvo vertinama nustatant ląstelių fluorescencijos intensyvumo pokyčius kultūroje, taikant imunofluorescencijos pokyčius (žr. Metodų dalis 2.5.).

Siekiant nustatyti loksoribino 95% (LOX; 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) bei poliinozilo-policitidilo rūgšties (PIC; 100ng/ml ir 1µg/ml) skirtingų koncentracijų poveikį mikroglijos ląstelių gyvybingumui, mikroglijos ląstelės 24 val. buvo inkubuojamos su tiriamosiomis medžiagomis ląstelių auginimo inkubatoriuje (5 proc. CO₂, 37°C). Gyvybingumas buvo nustatomas skaičiuojant gyvas ir žuvusias ląsteles ir atitinkamai apskaičiuojant šių ląstelių procentinę dalį.

Įvertinę aktyviklių LOX (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) skirtingų koncentracijų poveikį mikroglijos ląstelėms po 24 val. inkubacinio laikotarpio, nustatyta, kad nei viena tirta koncentracija, lyginant su kontroline ląstelių gurpe, neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio ląstelių gyvybingumui ir jis išliko kontrolinių ląstelių lygyje, daugiau nei 94% (8 pav.).

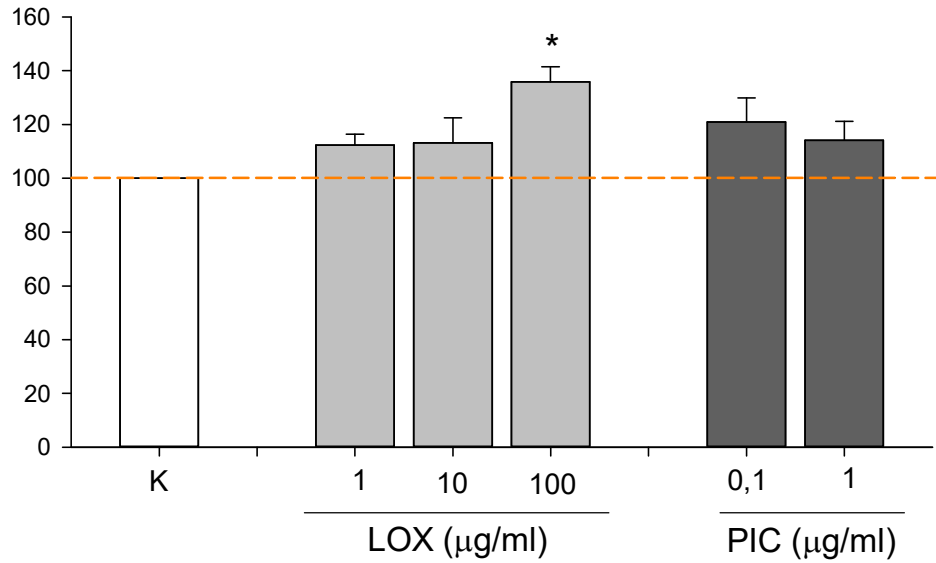


8 pav. Aktyvikių LOX ir PIC poveikis mikroglijos ląstelių gyvybingumui po 24 val. inkubacinio laikotarpio

K – kontrolinė grynos mikroglijos ląstelių kultūros grupė. **LOX** – loksoribinas 95% (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml). **PIC** – poliinozilo-policidilo rūgštis (100ng/ml ir 1µg/ml). One way ANOVA, Tukey testas, n = 5-8.

Siekiant nustatyti loksoribino 95% (LOX; 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) bei poliinozilo-policidilo rūgšties (PIC; 100ng/ml ir 1µg/ml) skirtingų koncentracijų poveikį mikroglijos ląstelių proliferacijai po 24 val. inkubacijos, buvo vertinamas bendras mikroglijos ląstelių skaičius, kontrolinėje grupėje bendrą ląstelių skaičių prilyginant 100 % (9 pav.).

Kaip pateikta 9 pav., po 24 val. mikroglijos ląstelių inkubacijos su tiriamosiomis medžiagomis (LOX ir PIC), tik ląstelių inkubacija su loksoribino 95% (LOX) didžiausia koncentracija (100µg/ml) skatino ląstelių proliferaciją ir statistiškai reikšmingai padidino mikroglijos ląstelių skaičių (apie 35 proc.), lyginant su kontroline ląstelių grupe (9 pav.). Nei viena PIC koncentracija (100ng/ml ir 1µg/ml) bei mažesnės LOX koncentracijos (1µg/ml, 10µg/ml) neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio ląstelių skaičiaus kitimui.



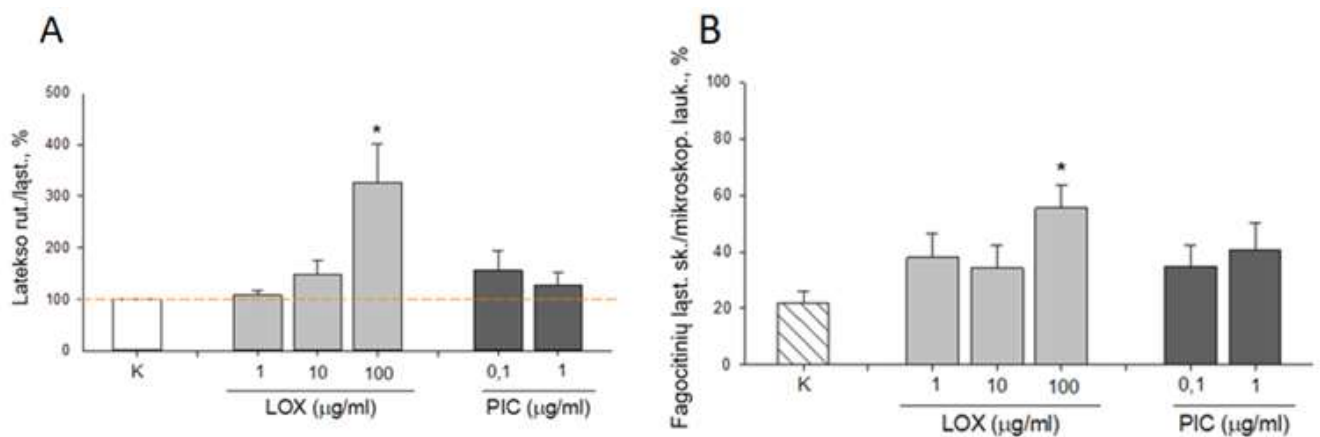
9 pav. Aktyviklių LOX ir PIC poveikis mikroglijos ląstelių skaičiui po 24 val. inkubacinio laikotarpio

K – kontrolinė grynos mikroglijos ląstelių kultūros grupė (100 proc. prilygintas bendras mikroglijos ląstelių skaičius). **LOX** – loksoribinas 95% (1 µg/ml, 10 µg/ml ir 100 µg/ml). **PIC** – poliinozilo-policidilo rūgštis (100 ng/ml ir 1 µg/ml). One way ANOVA, Tukey testas, * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe, $n = 5-8$.

Tai rodo, jog loksoribinas smegenis veikia toksiškai, ko pasekoje suaktyvėja mikroglijos ląstelių proliferacija – vienas iš mikroglijos ląstelių aktyvacijos požymių, kadangi žinoma jog mikroglijos ląstelės yra svarbiausios CNS imuninės ląstelės, kurios pirmosios reaguoja į smegenų pažeidimus. Jas galima apibūdinti kaip specializuotus makrofagus, gebančius vykdyti fagocitozę, taip apsaugant centrinės nervų sistemos neuronus [11-12].

Yra žinoma, jog fagocitozė yra mikroglijos įgimto imuninio atsako dalis ir yra vienas iš mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymenų [20]. Siekiant nustatyti loksoribino 95% (LOX; 1 µg/ml, 10 µg/ml ir 100 µg/ml) bei poliinozilo-policidilo rūgšties (PIC; 100 ng/ml ir 1 µg/ml) skirtingų koncentracijų poveikį mikroglijos ląstelių fagocitiniam aktyvumui, mikroglijos ląstelės su tiriamosiomis medžiagomis buvo inkubuojamos 24 val. ląstelių auginimo inkubatoriuje (5 proc. CO₂, 37°C). Po inkubacijos su tiriamosiomis medžiagomis, į ląstelių auginimo terpę buvo dedami fluorescuojantys latekso rutuliukai ir ląstelės papildomai preinkubuojamos 2 val. ląstelių auginimo inkubatoriuje (5 proc. CO₂, 37°C). Kontrolinės grupės rezultatai buvo prilyginti 100% ir pagal proporciją suskaičiuojama tiriamųjų medžiagų PIC ir LOX latekso rutuliukų per ląstelę skaičius bei fagocitinių ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje procentais.

Kaip pavaizduota 10 pav., didžiausia LOX koncentracija (100 μ g/ml) statistiškai reikšmingai padidino mikroglijos ląstelių fagocitinį aktyvumą, lyginant su kontroline ląstelių grupe. Mikroglijos ląstelės inkubuotos kartu su LOX 100 μ g/ml pasižymėjo didesniu gebėjimu fagocituoti didesnį skaičių latekso rutuliukų (10A pav.), o taip pat triskart padidino ir fagocitinių mikroglijos ląstelių skaičių, lyginant su kontroline ląstelių grupe (10B pav.). Nors buvo stebimas fagocitinių ląstelių skaičiaus padidėjimas su visomis tirtosiomis grupėmis (10B pav.), visgi, nei viena PIC (100ng/ml ir 1 μ g/ml) bei mažesnės LOX koncentracijos (1 μ g/ml, 10 μ g/ml), lyginant su kontroline ląstelių grupe nepadidino fagocituojančių ląstelių skaičiaus ir statistiškai reikšmingo poveikio neturėjo.

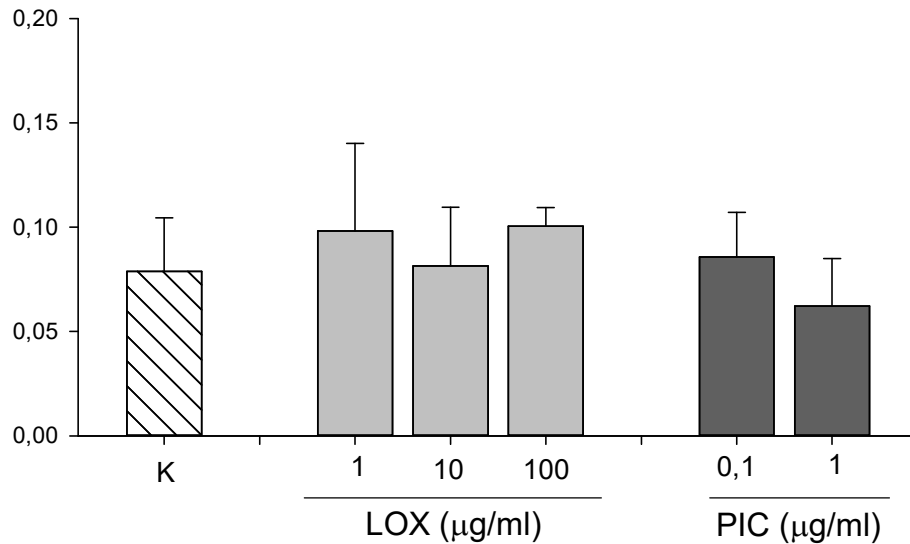


10 pav. Aktyvikių LOX ir PIC poveikis mikroglijos ląstelių fagocitiniam aktyvumui po 24 val. inkubacinio laikotarpio

A – LOX ir PIC poveikis karboksilatu padengtų latekso rutuliukų (2 μ m skersmens) fagocitozei (proc.); **B** – LOX ir PIC poveikis fagocitavusių ląstelių skaičiui (proc.). **K** – kontrolinė grynos mikroglijos ląstelių kultūros grupė (100 proc.). **LOX** – loksoribinas 95% (1 μ g/ml, 10 μ g/ml ir 100 μ g/ml). **PIC** – poliinozilo-policidilo rūgštis (100ng/ml ir 1 μ g/ml). One way ANOVA, Tukey testas, * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe, * – $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe, $n = 5-8$

Yra žinoma, kad mikroglijos ląstelės aktyvacijos metu taip pat gali išskirti glutamatą, kuris taip pat yra laikomas vienu iš mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymenų [25]. Siekiant įvertinti glutamato kiekį ląstelių auginimo terpėje, spektrofotometriniu metodu buvo matuojama mikroglijos ląstelių auginimo terpės fluorescencija ir, lyginant su kalibracine kreive, buvo apskaičiuotas susidariusio glutamate kiekis (koncentracija). Apskaičiuota kontrolinės ląstelių grupės glutamato koncentracija buvo prilyginta 100% ir pagal proporciją buvo apskaičiuojamos tiriamųjų medžiagų (LOX ir PIC) skirtingų koncentracijų (atitinkamai 1 μ g/ml, 10 μ g/ml ir 100 μ g/ml; 100ng/ml ir 1 μ g/ml) procentinės išraiškos.

Remiantis 11 paveikslo duomenimis, buvo nustatyta, kad nei viena tiriamųjų medžiagų LOX ir PIC (atitinkamai 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml; 100ng/ml ir 1µg/ml), lyginant su kontroline ląstelių grupe, neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio glutamato išsiskyrimui į mikroglijos ląstelių auginimo terpę ir glutamato koncentracija išliko kontrolinių ląstelių lygyje (11 pav.).



11 pav. Aktyvikių LOX ir PIC poveikis glutamato išsiskyrimui į mikroglijos ląstelių auginimo terpę po 24 val. Inkubacinio laikotarpio

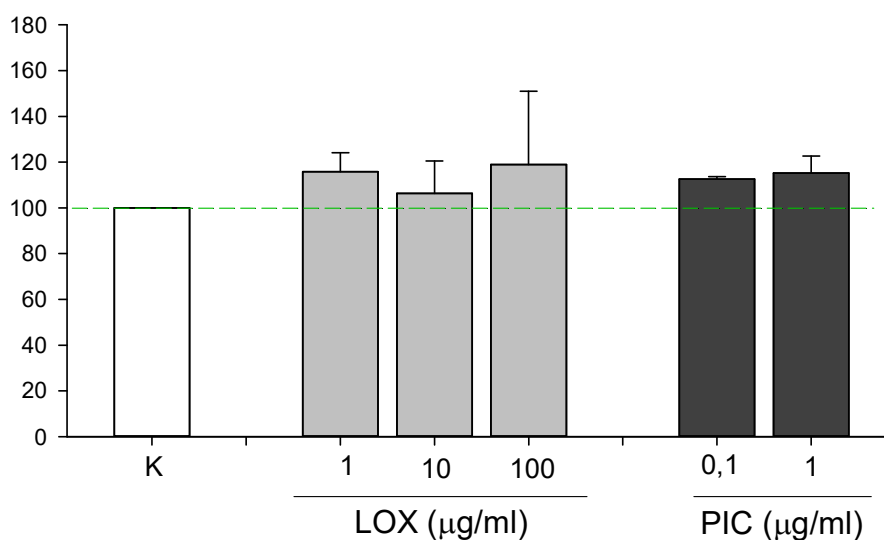
K – kontrolinė grynų mikroglijos ląstelių kultūros grupė. **LOX** – loksoribinas 95% (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml). **PIC** – poliinozilo-policidilo rūgštis (100ng/ml ir 1µg/ml). One way ANOVA, Tukey testas, n = 3.

Randall PA ir kitų mokslininkų atliktas tyrimas su pelėmis parodė, jog paveikus peles poliinozilo-policidilo rūgšties injekcija (PIC; 1ml/kg) buvo stebimas statistiškai reikšmingas glutamato kiekio padidėjimas pelių mikroglijos ląstelių kultūrose [54-56]. Visgi, mūsų atveju, tyrimai buvo atliekami ne tiriamąsias medžiagas tiesiogiai suleidžiant gyvūnams, o kaip modelinę sistemą taikant pirmines ląstelių kultūras bei atitinkamai – mažesnes tiriamųjų medžiagų koncentracijas, kas galėjo lemti, kad statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nebuvo pastebėta ir nebuvo stebimas padidėjęs glutamate išsiskyrimas kultūrose.

Paskutiniojo tiriamojo darbo etapo metu buvo siekiama įvertinti mikroglijos ląstelių aktyvaciją, įvertinant mikroglijos ląstelių aktyvacijos žymens – Iba1 baltymo raiškos pokyčius ląstelių kultūrose. Aktyvacija buvo vertinama nustatant ląstelių fluorescencijos intensyvumo pokyčius kultūroje, taikant imunofluorescencijos metodą. Yra žinoma, jog Iba1 yra vienas iš žymenų, kurio raiškos padidėjimas yra

siejamas su uždegiminio atsako pasireiškimu mikroglijos ląstelėse [57]. Tyrimo metu buvo atliktas ląstelių fiksavimas, permabilizavimas, blokavimas, po šių etapų mikroglijos ląstelės buvo veikiamos pirminiu (anti-Iba1) bei antriniu (Chicken anti-Goat IgG Alexa Fluor 594) antikūnais ir pasitelkinat fluorescencinės mikroskopijos metodą, bei naudojant kompiuterinę programą ImageJ, vertinta bei apskaičiuojama mikroglijos ląstelių fluorescencija (fluorescencijos intensyvumas).

Kaip pateikta 12 paveiksle, po 24 val. inkubacijos, nei viena LOX ir PIC koncentracija (atitinkamai 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml; 100ng/ml ir 1µg/ml), lyginant su kontroline ląstelių grupe, neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio mikroglijos ląstelių aktyvacijai, nebuvo stebimi statistiškai reikšmingi fluorescencijos intensyvumo pokyčiai, .t.y. nei viena tirtoji grupė bei tiriamoji koncentracija nesukėlė Iba1 raiškos padidėjimo mikroglijos ląstelėse, kas galėtų rodyti galimą mikroglijos ląstelių uždegiminį atsaką ir ląstelių aktyvaciją (12 pav.).



12 pav. Aktyviklių LOX ir PIC poveikis mikroglijos ląstelių fluorescenciniam intensyvumui po 24 val. inkubacinio laikotarpio

K – kontrolinė grynų mikroglijos ląstelių kultūros grupė (proc.). **LOX** – loksoribinas 95% (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml). **PIC** – poliinozilo-policidilo rūgštis (100ng/ml ir 1µg/ml). One way ANOVA, Tukey testas, n = 3.

Wegrzyn D ir kitų mokslininkų atliktas tyrimas parodė, jog paveikus pirmines žievės mikroglijos ląsteles PIC rūgštimi (50 µg/ml ir 100µg/ml) ir inkubavus 3 valandas buvo stebimas statistiškai reikšmingas ląstelių fluorescencijos padidėjimas [58]. Mūsų tyrimai, atlikti su mažesnėmis PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) bei LOX koncentracijomis neparodė statistiškai reikšmingo tiriamųjų medžiagų poveikio ląstelių fluorescenciniam aktyvumui, kas galėtų rodyti, kad tik esant didesnėms PIC

ir/ar LOX koncentracijoms, ar ilginant inkubacijos laiką, esant mažoms tirtųjų medžiagų koncentracijoms būtų stebimi fluorescencijos pokyčiai kultūrose. Tai rodo, kad siekiant detaliau iširti TLR aktyviklių – PIC ir LOX poveikį mikroglijos ląstelių aktyvacijai reikia atlikti daugiau papildomų tyrimų su skirtingomis tiriamųjų medžiagų koncentracijomis ir/ar keičiant inkubacijos trukmę.

4. IŠVADOS

1. Skirtingų koncentracijų *toll-like* receptorių (TLR7 ir TLR3) aktyvikliai, imituojantys virusų RNR – loksoribinas (LOX; 1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir poliinozilo-policitidilo rūgštis (PIC; 100ng/ml ir 1µg/ml) neturi poveikio mikroglijos ląstelių gyvybingumui po 24 val. inkubacinio laikotarpio.

2. Didžiausios koncentracijos *toll-like* receptoriaus 7 (TLR7) aktyviklis loksoribinas (LOX 100µg/ml) skatina mikroglijos ląstelių proliferaciją. Mažos LOX koncentracijos (1µg/ml, 10µg/ml) ir skirtingos *toll-like* receptoriaus 3 (TLR3) aktyviklio poliinozilo-policitidilo rūgštis (PIC; 100ng/ml ir 1µg/ml) koncentracijos neturi poveikio mikroglijos ląstelių skaičiui grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos.

3. Didžiausios koncentracijos *toll-like* receptoriaus 7 (TLR7) aktyviklis loksoribinas (LOX 100µg/ml) skatina mikroglijos ląstelių fagocitozę. Mažos LOX koncentracijos (1µg/ml, 10µg/ml) ir skirtingos *toll-like* receptoriaus 3 (TLR3) aktyviklio poliinozilo-policitidilo rūgštis (PIC; 100ng/ml ir 1µg/ml) koncentracijos neturi poveikio mikroglijos ląstelių fagocitiniam aktyvumui grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje po 24 val. inkubacijos.

4. Skirtingų koncentracijų *toll-like* receptorių (TLR7 ir TLR3) aktyvikliai LOX (1µg/ml, 10µg/ml ir 100µg/ml) ir PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) neturi poveikio glutamato išsiskyrimui į mikroglijos ląstelių auginimo terpę po 24 val. inkubacinio laikotarpio.

5. *Toll-like* receptorių (TLR7 ir TLR3) aktyvikliai LOX (1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml) ir PIC (100ng/ml ir 1µg/ml) nesukelė Iba1 raiškos padidėjimo grynoje mikroglijos ląstelių kultūroje, esant 24 val. inkubaciniam laikotarpiui.

5. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. J. Rychert, D. Strick, S. Bazner, J. Robinson, E. Rosenberg, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26 (2010) p. 1139–1145.
2. Fu R, Shen Q, Xu P. Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Molecular Neurobiology* 49, 2014. p. 1422–1434.
3. Chhatbar C, Prinz M. The roles of microglia in viral encephalitis: from sensome to therapeutic targeting. *Cell Mol Immunol.* 2021 Feb;18(2):250-258.
4. Filgueira L, Larionov A, Lannes N. The Influence of Virus Infection on Microglia and Accelerated Brain Aging. *Cells.* 2021 Jul 20;10(7):1836.
5. Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2013 Feb 6;33(6):2481-93.
6. Davis BM, Salinas-Navarro M, Cordeiro MF, Moons L, De Groef L. Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction. *Sci Rep.* 2017 May 8;7(1):1576.
7. Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J Med Virol.* 2021 May;93(5):2735-2739.
8. Ludwig PE, Reddy V, Varacallo M. *Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS).* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
9. Atkinson ME. *Anatomy for Dental Students.* Oxford: Oxford University Press; 2013. P. 109-112.
10. Molnar C, Gair J. *Concepts of Biology -- 1st Canadian Edition.* Bccampus; 2015. P. 655-667.
11. Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Lopes-Araújo A, Santos-Sacramento L, Takeda PY, Anthony DC, Malva JO, Crespo-Lopez ME. What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain? *Cells.* 2019 Oct 22;8(10):1293.
12. Yin J, Valin KL, Dixon ML, Leavenworth JW. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res.* 2017;2017:5150678.
13. Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2014 May;124(5):307-21
14. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020 Aug 6;14:198.
15. Rodríguez-Gómez JA, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, Engskog MKR, Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, Joseph B, Hajji N, Venero JL, Burguillos MA. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells.* 2020 Jul 17;9(7):1717.

16. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2012 Jan 4;87(1):10-20.
17. Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and A β in Alzheimer's disease. Interneto prieiga: https://www.researchgate.net/figure/The-three-forms-of-microglia-and-its-characteristics-Ameboid-microglia-exercise-the_fig1_255731842 [žiūrėta: 2022-11-08].
18. Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci.* 2017 Aug 8;11:235.
19. Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol.* 2020 Jun 2;11:1066.
20. Janda E, Boi L, Carta AR. Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease? *Front Mol Neurosci.* 2018 Apr 27;11:144.
21. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna).* 2014 Mar 1; 121(8):799–817.
22. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO ir kt. *Neuroscience*, 4th ed. Sinauer Associates; 2008. P. 126-133.
23. Sonnewald U, Schousboe A. Introduction to the Glutamate-Glutamine Cycle. *Adv Neurobiol.* 2016;13:1-7.
24. Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients.* 2018 Oct 23;10(11):1564.
25. Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci.* 2013 Apr 19;7:49.
26. Zhang X., Wang D., Zhang B., Zhu J., Zhou Z., Cui L. Regulation of microglia by glutamate and its signal pathway in neurodegenerative diseases, *Drug Discovery Today*, 2020. p. 1074-1085.
27. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016 Oct;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153.
28. Filgueira L, Larionov A, Lannes N. The Influence of Virus Infection on Microglia and Accelerated Brain Aging. *Cells.* 2021 Jul 20;10(7):1836.
29. Domingo E. Virus As Populations: Composition, Complexity, Quasispecies, Dynamics, and Biological Implications. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) Cantoblanco, Madrid, Spain; 2019. P. 193-198.
30. Verdaguer N, Ferrero D, Murthy MR. Viruses and viral proteins. *IUCrJ.* 2014 Oct 14;1(Pt 6):492-504.

31. Xue B, Blocquel D, Habchi J, Uversky AV, Kurgan L, Uversky VN, Longhi S. Structural disorder in viral proteins. *Chem Rev.* 2014 Jul 9;114(13):6880-911.
32. Varatharaj A, Thomas N, Ellul MA, Davies NWS, Pollak TA, Tenorio EL ir kt. Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study. *Lancet Psychiatry.* 2020 Oct;7(10):875-882.
33. Bouayed J, Bohn T. The link between microglia and the severity of COVID-19: The "two-hit" hypothesis. *J Med Virol.* 2021 Jul;93(7):4111-4113.
34. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014 Sep 25;5:461.
35. Takeda, K, Akira S. Toll-Like Receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015 Apr 1; 109:14.12.1-14.12.10.
36. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 61, Issue 11. 2002 Nov. p. 1013–1021.
37. Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2018 Oct 2;12:329.
38. Chen Y, Lin J, Zhao Y, Ma X, Yi H. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2021 Aug 15;22(8):609-632.
39. Zhuang C, Chen R, Zheng Z, Lu J, Hong C. Toll-Like Receptor 3 in Cardiovascular Diseases. *Heart Lung Circ.* 2022 Jul;31(7):e93-e109.
40. de Oliveira AC, Yousif NM, Bhatia HS, Hermanek J, Huell M, Fiebich BL. Poly(I:C) increases the expression of mPGES-1 and COX-2 in rat primary microglia. *J Neuroinflammation.* 2016 Jan 18;13:11.
41. Cheng Y, Xu F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*; 2000. P. 1219-1223.
42. Petes C, Odoardi N, Gee K. The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Front Immunol.* 2017 Sep 4;8:1075.
43. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Krayukhina E, Taoka M, Yamauchi Y ir kt. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity*; 2016 Oct. p. 737-748.
44. Dyavar SR, Singh R, Emani R, Pawar GP, Chaudhari VD, Podany AT ir kt. Role of toll-like receptor 7/8 pathways in regulation of interferon response and inflammatory mediators during SARS-CoV2 infection and potential therapeutic options. *Biomed Pharmacother.* 2021 Sep;141:111794.

45. Kanno A, Yamamoto C, Onji M, Fukui R, Saitoh S, Motoi Y ir kt. Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. *Int Immunol.* 2013 Jul;25(7):413-22.
46. Michaelis KA, Norgard M, Levasseur PR, Olson B, Burfeind KG, Buenafe AC ir kt. Persistent Toll-like receptor 7 stimulation induces behavioral and molecular innate immune tolerance. *Brain, Behavior, and Immunity*; 2019 Nov. p. 338-353.
47. Dzopalic T, Dragicevic A, Vasilijic S, Vucevic D, Majstorovic I, Bozic B, Balint B, Colic M. Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1- and Th-17-polarizing capability. *Int Immunopharmacol.* 2010 Nov;10(11):1428-33.
48. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 135410906, Loxoribine. Interneto prieiga: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Loxoribine> [žiūrėta 2022-07-16].
49. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol.* 2003 Nov;33(11):2987-97.
50. Agarwala SS, Kirkwood JM, Bryant J. Phase I, Randomized, Double-blind Trial of 7-allyl-8-oxoguanosine (Loxoribine). *Advanced Cancer, Cytokines, Cellular & Molecular Therapy*; 2000. P. 171-176.
51. Ifuku M, Hinkelmann L, Kuhrt LD, Efe IE, Kumbol V, Buonfiglioli A ir kt. Activation of Toll-like receptor 5 in microglia modulates their function and triggers neuronal injury. *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Sep 10;8(1):159
52. Geoffrey Rolls, BappSc, FAIMS. Process of Fixation and the Nature of Fixatives. Interneto prieiga: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/> [žiūrėta: 2022-09-25].
53. Preparing Fixed Cells for Labeling. Interneto prieiga: <https://www.thermofisher.com/lt/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/sample-considerations/preparing-fixed-cells-imaging.html> [žiūrėta: 2022-09-05].
54. Randall PA, Vetreno RP, Makhijani VH, Crews FT, Besheer J. The Toll-Like Receptor 3 Agonist Poly(I:C) Induces Rapid and Lasting Changes in Gene Expression Related to Glutamatergic Function and Increases Ethanol Self-Administration in Rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019 Jan;43(1):48-60.

55. Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2012 Jun 18;9:130.
56. Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S et al. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(10):2106-18.
57. Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol Psychiatry*. 2018 Feb;23(2):177-198.
58. Wegrzyn D, Freund N, Faissner A, Juckel G. Poly I:C Activated Microglia Disrupt Perineuronal Nets and Modulate Synaptic Balance in Primary Hippocampal Neurons in vitro. *Front Synaptic Neurosci*. 2021 Feb 23;13:637549.

6. PRIEDAI

1 priedas. Bioetikos centro leidimas atlikti tyrimą.



LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

BIOETIKOS CENTRAS

Kodas 302536989, Tilžės g. 18, LT- 47181, Kaunas, tel.: (8 37) 327233, www.lsmuni.lt, el.p.: bec.registracija@lsmuni.lt

Medicinos akademijos (MA)
Pirmos pakopos studijų programa – Medicininė
ir veterinarinė biochemija
III k. studentui Haroldui Sakavičiui
Darbo vadovė m. d. Silvija Jankevičiūtė
LSMU (MA) Neuromokslų institutas

2022.04.26 Nr. BEC-MVB(B)-427

DĖL PRITARIMO TYRIMUI

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs Haroldo Sakavičiaus pateiktus dokumentus, studento tiriamajam darbui tema „Mikroglijos ląstelių žūties ir aktyvacijos tyrimas neuropatologijos atveju“ pritaria*.

Dr. Žydrūnė Luneckaitė

* Pastaba: šis pritarimas neatleidžia tiriamąjį mokslinį darbą vykdančių asmenų nuo prievolės laikytis Bendrojo duomenų apsaugos reglamento nuostatų ir nuo atsakomybės gauti nacionalinio arba regioninio bioetikos komiteto leidimą, jei toks leidimas būtinas pagal LR Biomediciniųjų tyrimų etikos įstatyme numatytus reikalavimus.

DARBO RĖMIMO, AUTORIAUS INDĖLIO IR GALIMO INTERESŲ KONFLIKTO DEKLARACIJA

Baigiamojo darbo autorius: Haroldas Sakavičius

Mikroglijos ląstelių žūties ir aktyvacijos tyrimas neuropatologijos atveju

Investigation of microglia cell death and activation under neuropathological conditions

Darbas remiamas Medicinos fakulteto lėšomis.

Patvirtinu, kad baigiamasis darbas atliktas ir parašytas savarankiškai, nepažeidžiant kitiems asmenims priklausančių autorinių teisių.

Bakalauranto vardas, pavardė ir parašas: Haroldas Sakavičius

Vadovo vardas, pavardė ir parašas: dr. Silvija Jankevičiūtė

3 priedas. Padėka.

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei dr. Silvijai Jankevičiūtei už patarimus, konsultacijas ir pagalbą ruošiant baigiamąjį darbą.