



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Mikroglijos egzosomų kaip vaistų transporto sistemos efektyvumo tyrimas

Baigiamasis magistro projektas

Akvilė Rudaitytė

Projekto autorė

Dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Mikroglijos egzosomų kaip vaistų transporto sistemos efektyvumo tyrimas

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Akvilė Rudaitytė

Projekto autorė

Dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

Dr. Arūnas Kazlauskas

Recenzentas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Akvilė Rudaitytė

Mikroglijos egzosomų kaip vaistų transporto sistemos efektyvumo tyrimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Akvilės Rudaitytės, baigiamasis projektas tema „Mikroglijos egzosomų kaip vaistų transporto sistemos efektyvumo tyrimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Akvilė Rudaitytė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Rudaitytė, Akvilė. Mikroglijos egzosomų kaip vaistų transporto sistemos efektyvumo tyrimas. Baigiamasis magistro projektas / vadovė dr. Aistė Jekabsonė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: egzosomos, glioblastoma, mikroglija, doksorubicinas, elektroporacija.

Kaunas, 2020. 52 p.

Santrauka

Šio baigiamojo darbo tikslas buvo nustatyti mikroglijos išskiriamų egzosomų efektyvumą panaudojant jas kaip priešvėžinių vaistų pristatymo sistemą. Tikslui pasiekti buvo išskirti šie uždaviniai: 1) išskirti egzosomas iš žmogaus mikroglijos ląstelių ir identifikuoti jas pagal dydį, morfologiją bei specifinius žymenis; 2) stebėti mikroglijos egzosomų patekimą į žmogaus glioblastomos ląsteles; 3) įvertinti natūralių mikroglijos egzosomų poveikį glioblastomos ląstelių gyvybingumui; 4) elektroporacijos būdu įterpti chemoterapinį vaistą doksorubicino hidrochloridą į mikroglijos egzosomas ir nustatyti pakrovimo efektyvumą; 5) įvertinti doksorubicino hidrochloridu pakrautų mikroglijos egzosomų efektyvumą sunaikinant žmogaus glioblastomos ląsteles.

Egzosomų išskyrimas buvo atliekamas išsodinant daleles su polietileno glikolio tirpalu ir centrifuguojant. Siekiant atrinkti optimalias sąlygas egzosomų išskyrimui, mikroglijos ląstelės buvo auginamos beseruminėje terpėje 37°C ir 39°C temperatūrose. Išskirtų egzosomų koncentracija buvo nustatoma pagal bendrą egzosomų baltymo kiekį atliekant spektrofotometrinių Bradfordo metodą. Egzosomų dydis buvo nustatytas naudojant dinaminės šviesos sklaidos analizę, jų morfologija buvo įvertinta taikant transmisinę elektronų mikroskopiją, o egzosomų žymens CD9 koncentracija buvo nustatyta su imunofermeniniu ELISA metodu. Egzosomų patekimas į žmogaus glioblastomos ląsteles buvo stebimas nudažant egzosomas RNR dažų konjuguotu su Alexa Fluor 555 ir vaizdinant fluorescenciniu mikroskopu. Doksorubicino hidrochloridas buvo pakrautas į egzosomas elektroporacijos būdu ir pakrautas vaisto kiekis nustatytas matuojant doksorubicino skleidžiamą fluorescenciją. Doksorubicino hidrochloridu pakrautų ir natūralių mikroglijos egzosomų poveikis žmogaus glioblastomos ląstelėms buvo įvertintas inkubuojant ląsteles su vaistu užpildytomis ir natūraliomis egzosomomis bei laisvu doksorubicino hidrochloridu atitinkamomis koncentracijomis. Gyvybingumas buvo matuojamas po 48 ir 72 valandų inkubacijos naudojant spektrofotometrines analizę bei fluorescencinę mikroskopiją. Fluorescencinių nuotraukų analizė buvo atlikta naudojant *ImageJ* programą. Statistinė duomenų analizė buvo atlikta su *SigmaPlot 14.0* programa.

Nustatyta, kad mikroglijos ląstelės daugiausia egzosomų išskiria, kai yra kultivuojamos beseruminėje terpėje 37°C temperatūroje. Išskiriamų egzosomų dydžio intervalas buvo 60-90 nm ir savo morfologija atitiko egzosomas (apvalios bei ribojamos plazminės membranos). Atlikta ELISA pagal CD9 žymenį papildomai patvirtino, jog išskirtos dalelės yra egzosomos. Buvo nustatyta, kad egzosomos į glioblastomos ląsteles patenka po 2 valandų ir išlieka ląstelių viduje ne mažiau nei 24 valandas. Atlikus glioblastomos ląstelių gyvybingumo tyrimą, veikiant jas su natūraliomis mikroglijos egzosomomis, buvo pastebėta, kad jos, po 72 valandų poveikio, reikšmingai sumažina ląstelių gyvybingumą lyginant su nepaveiktomis ląstelėmis. Elektroporacijos būdu doksorubicino hidrochloridas buvo įterptas į mikroglijos egzosomas. Įterpto vaisto koncentracija buvo 342 ng/ml, o pakrovimo efektyvumas buvo 0.34%. Po 72 valandų inkubacijos su doksorubicino hidrochloridu

užpildytomis egzozomomis, nustatytas statistiškai reikšmingas glioblastomos ląstelių gyvybingumo sumažėjimas lyginant su kontrole, ląstelėmis veiktomis su natūraliomis mikroglijos egzozomomis bei laisvu doksorubicino hidrochloridu.

Rudaitytė, Akvilė. Investigation of efficiency of microglial exosomes as drug delivery system. Master's Final Degree Project / supervisor dr. Aistė Jekabsonė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: exosomes, glioblastoma, microglia, doxorubicin, electroporation.

Kaunas, 2020. 52 pages.

Summary

The main aim of this master thesis project was to investigate microglial exosome potential as chemotherapy delivery vehicle. To accomplish this goal, the following objectives have been set: 1) to isolate exosomes from human microglial cells and characterise them based on their size, morphology and specific markers; 2) to track exosome uptake into human glioblastoma cells; 3) to evaluate the viability of glioblastoma cells after treatment with natural microglial exosomes 4) to load chemotherapy agent doxorubicin hydrochloride into microglial exosomes by using electroporation method and determine drug loading efficiency; 5) to evaluate doxorubicin hydrochloride loaded microglial exosome effectiveness in eliminating human glioblastoma cells.

Exosomes were isolated using precipitation technique with polyethylene glycol and centrifugation. In order to find the optimal conditions for exosome isolation, microglial cells were grown in serum depleted growth media in 37°C and 39°C temperatures. The concentration of isolated exosomes was determined by measuring total exosomal protein concentration by using spectrophotometric Bradford assay. The size of exosomes was measured using dynamic light scattering technique, their morphology was examined using transmission electron microscopy and the concentration of exosomal marker CD9 was assessed using the ELISA method. Exosome uptake into glioblastoma cells was monitored by labelling exosomes with RNA dye conjugated with Alexa Fluor 555 and visualised using a fluorescence microscope. Doxorubicin hydrochloride was loaded into exosomes using the electroporation method and the amount of encapsulated drug was determined by measuring the intrinsic fluorescence of doxorubicin. To evaluate the effect of doxorubicin hydrochloride loaded microglial exosomes and natural microglial exosomes on the viability of human glioblastoma cells, the cells were incubated with drug-loaded and empty exosomes as well as free doxorubicin hydrochloride with appropriate concentrations. The cell viability was measured after 48 and 72 hour incubation using spectrophotometric analysis and fluorescence microscopy. The fluorescence image analysis was performed using *ImageJ* software. Statistical data analysis was performed by *SigmaPlot 14.0* software.

The experiments revealed that microglial cells excrete more exosomes when they are grown in serum depleted media in 37°C temperature. The size range of isolated exosomes was 60-90 nm and their morphology corresponded to a typical exosome (round shape and enclosed with plasma membrane). ELISA CD9 assay further confirmed that isolated particles indeed were exosomes. From exosome uptake studies, it was revealed that exosomes can be internalised by glioblastoma cells in 2 hours and remained inside the cells for 24 hours. Glioblastoma cell viability assay, where the cells were treated with natural microglial exosomes, revealed that after 72 hour treatment the viability was significantly reduced compared to untreated control. Doxorubicin hydrochloride was loaded into exosomes via electroporation. The encapsulated drug concentration was 342 ng/ml and loading efficiency was

0.34%. After 72 hour incubation with doxorubicin hydrochloride loaded exosomes, a statistically significant reduction in glioblastoma cell viability was observed as compared to untreated control, cells treated with natural microglial exosomes and free doxorubicin hydrochloride.

Turinys

Santrumpų sąrašas	10
Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. Egzosomos ir jų biogeneze	12
1.2. Egzosomų sandara	13
1.3. Egzosomų sąveika su ląstelėmis– taikiniai ir patekimo būdai.....	14
1.4. Egzosomų biologinės funkcijos.....	15
1.5. Mikroglijos ląstelių morfologija ir funkcijos.....	15
1.5.1. Mikroglijos egzosomos	16
1.6. Neoplastinių ląstelių savybės	17
1.6.1. Glioblastoma.....	18
1.7. Tradicinė chemoterapija ir tikslinė vėžio terapija	18
1.8. Egzosomų, kaip vaistų pernešimo sistemos, privalumai	19
1.9. Egzosomų išskyrimas ir identifikavimas.....	20
1.10. Vaistų įterpimo į egzosomas būdai.....	20
1.11. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas	21
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	23
2.1. Tyrimams naudotos medžiagos	23
2.2. Imortalizuotos žmogaus mikroglijos ląstelių kultūros kultivavimas.....	23
2.3. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo nustatymas su Tripano mėlio dažu.....	24
2.4. Mikroglijos ląstelių stimuliavimas egzosomų išskyrimui	24
2.5. Egzosomų išskyrimas iš mikroglijos ląstelių mitybinės terpės naudojant polietileno glikolio tirpalą.....	24
2.6. Mikroglijos egzosomų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu	25
2.7. Mikroglijos egzosomų dydžio nustatymas atliekant dinaminės šviesos sklaidos analizę.....	26
2.8. Egzosomų stebėjimas transmisiniu elektronų mikroskopu	26
2.9. Egzosomų charakterizavimas pagal CD9 žymenį ELISA metodu.....	27
2.10. Egzosomų patekimo į glioblastomos ląsteles stebėjimas naudojant fluorescencinę mikroskopiją.....	28
2.11. Doksorubicino hidroklorido įterpimas į egzosomas elektroporacijos metodu	28
2.12. Į egzosomas įterpto doksorubicino hidroklorido koncentracijos nustatymas.....	29
2.13. Žmogaus glioblastomos ląstelių kultivavimas ir veikimas mikroglijos egzosomų ir doksorubicino hidroklorido preparatais	30
2.14. Žmogaus glioblastomos ląstelių, paveiktų mikroglijos egzosomų ir doksorubicino hidroklorido preparatais, gyvybingumo vertinimas.....	31
2.15. Statistinė duomenų analizė	31
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	32
3.1. Mikroglijos ląstelių stimuliacija egzosomų kiekiui padidinti	32
3.2. Mikroglijos egzosomų identifikavimas pagal dydį ir morfologiją.....	33
3.3. Mikroglijos egzosomų identifikavimas pagal CD9 žymenį	34
3.4. Mikroglijos egzosomų patekimas į glioblastomos ląsteles.....	35
3.5. Doksorubicino hidroklorido pakrovimo į mikroglijos egzosomas elektroporacijos būdu efektyvumo nustatymas	36

3.6. Mikroglijos egzosomų su įterptu doksorubicino hidrochloridu poveikis žmogaus glioblastomos ląstelių gyvybingumui	37
3.7. Rezultatų apibendrinimas ir tolesni tyrimai.....	44
Išvados	46
Literatūros sąrašas	47

Santrumpų sąrašas

CNS – centrinė nervų sistema

DMEM – ląstelių auginimo terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DOX – doksorubicino hidrochloridas

EDTA – etileno diamino tetraacto rūgštis (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – imunofermentinis tyrimo metodas (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ESCRT – transportui reikalingas endosominio rūšiavimo kompleksas (angl. *the endosomal sorting complex required for transport*)

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

FBS – veršelio serumas (angl. *fetal bovine serum*)

FDB – fosfatinis druskų buferis

HBSS - Hank's subalansuotas druskos tirpalas (angl. *Hank's Balanced Salt Solution*)

HMC-3 – imortalizuota žmogaus mikroglijos 3 klonu ląstelių linija (angl. *human microglial clone 3 cell line*)

HROG-36 – žmogaus glioblastomos ląstelės (angl. *human glioblastoma cell line*)

ILV – intraluminalinės pūslelės (angl. *intraluminal vesicles*)

KSB – kraujo-smegenų barjeras

MHC II – histosuderinamumo kompleksas II (angl. *major histocompatibility complex II*)

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

PEG – polietileno glikolis

RNR – ribonukleino rūgštis

siRNR – trumpa nekoduojanti RNR (angl. *small interfering RNA*)

TEM – transmisinė elektronų mikroskopija

Įvadas

Dažniausiai pasitaikantys piktybiniai smegenų navikai yra gliomos, iš kurių agresyviausia forma yra glioblastoma, pasižyminti dideliu invazyvumu. Pacientams, kuriems yra nustatomas šio tipo navikas, tikimybė išgyventi 12-15 mėnesių tesiekia vos 26% [1]. Nors šiuo metu yra atrasta nemažai naujų vėžio gydymo būdų, glioblastomos gydymo strategija jau kelis dešimtmečius išliko nepakitusi. Dažniausiai navikas yra pašalinamas chirurginiu būdu ir po to taikoma radioterapija bei chemoterapija. Tačiau šie gydymo būdai yra neefektyvūs, kadangi glioblastoma greitai atsinaujina ir dažnai vėžinės ląstelės įgyja atsparumą vaistams. Taip pat, daugelis potencialių chemoterapinių vaistų, kurie galėtų būti tinkami glioblastomos gydymui, negali patekti į tikslinę vietą dėl kraujo-smegenų barjero. Todėl būtina atrasti naujų būdų glioblastomos gydymui [2].

Egzosomos yra mažos, 40-160 nm dydžio membrininės dalelės, natūraliai susiformuojančios ir išskiriamos iš įvairių organizmo ląstelių. Pagrindinė jų funkcija yra pernešti baltymus, nukleorūgštis, lipidus ir įvairias biomolekules kitoms ląstelėms ir taip dalyvauti tarpląstelinėje komunikacijoje bei sukelti fiziologinius pokyčius ląstelėse. Pastaraisiais metais egzosomos yra vis intensyviau tyrinėjamos kaip galimos vaistų pernešimo sistemos [3]. Įvairūs tyrimai parodė, kad jos yra pranašesnės už sintetinius nanonešiklius, nes ilgiau išlieka stabilios sisteminėje cirkuliacijoje, nesukelia imunologinių reakcijų, gali pereiti įvairius biologinius barjerus [4]. Nustatyta, kad imuninių ląstelių išskiriamos egzosomos gali specifiskai sąveikauti su vėžinėmis ląstelėmis ir jas sunaikinti [5].

Mikroglijos ląstelės yra pagrindinės imuninės ląstelės randamos smegenyse ir jos yra atsakingos už homeostazės palaikymą. Potolicchio su grupe atliktais tyrimais su pelių pirminėmis ląstelėmis bei ląstelių linijomis, įrodė, kad mikroglijos ląstelės išskiria egzosomas [6]. Tačiau iki šiol iš žmogaus mikroglijos ląstelių egzosomos dar nebuvo išskirtos. Kiti tyrimai pademonstravo mikroglijos egzosomų gebėjimą nuslopinti vėžinių ląstelių invazyvumą, panaudojant 3D gliomos modelį [7]. Remiantis šiais ir kitais tyrimų rezultatais, manoma, kad mikroglijos išskiriamos egzosomos galėtų būti potenciali alternatyva glioblastomos gydymui.

Darbo tikslas – nustatyti mikroglijos ląstelių išskiriamų egzosomų efektyvumą panaudojant jas kaip priešvėžinių vaistų pristatymo sistemą.

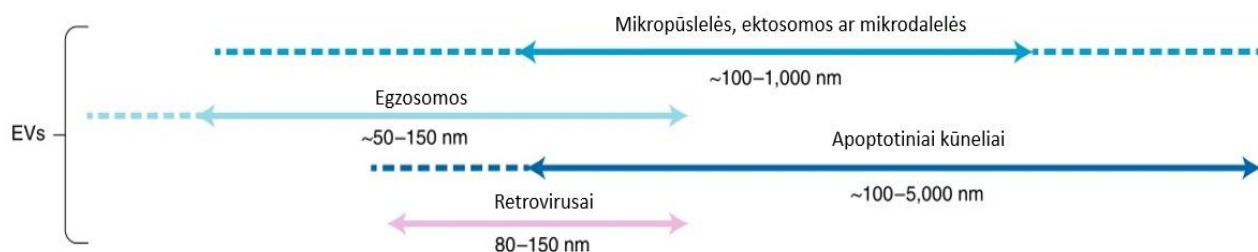
Darbo uždaviniai:

1. išskirti egzosomas iš žmogaus mikroglijos ląstelių ir jas identifikuoti pagal jų dydį, morfologiją ir specifinius žymenis.
2. stebėti mikroglijos egzosomų patekimą į žmogaus glioblastomos ląsteles.
3. įvertinti natūralių mikroglijos egzosomų poveikį glioblastomos ląstelių gyvybingumui.
4. elektroporacijos būdu įterpti chemoterapinį vaistą doksorubicino hidrochloridą į mikroglijos egzosomas ir nustatyti pakrovimo efektyvumą.
5. įvertinti doksorubicino hidrochloridu pakrautų mikroglijos egzosomų efektyvumą sunaikinant žmogaus glioblastomos ląsteles.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Egzosomos ir jų biogenezė

Egzosomos pirmą kartą buvo pradėtos tyrinėti 1983 metais, pastebėjus, kad retikulocitų brendimo į eritrocitus metu, ląstelės į aplinką išskyrė mažas membranines pūsleles. Po kelių metų, mokslinėje literatūroje šios dalelės buvo įvardintos kaip nano-dydžio, endosominės kilmės, membraninės pūslelės, kurios iš ląstelės išskiriamos egzocitozės būdu [8, 9]. Jos, kartu su apoptotiniais kūneliais ir mikropūslelėmis, priklauso ekstraląstelinių pūslelių (angl. *extracellular vesicles, EV*) grupei, tačiau yra mažiausio dydžio dalelės (50–150 nm) (1 pav.). EV sekrecija iš ląstelių yra evoliuciškai konservatyvus procesas, vykstantis prokariotuose ir eukariotuose. Daugialąščiuose organizmuose EV gali būti išgautos iš įvairių biologinių skysčių – kraujo, smegenų skysčio, limfos ir kitų [3]. Dabar žinoma, kad egzosomos yra išskiriamos iš beveik visų organizmo ląstelių tarp kurių yra neuronai, imuninės, epitelio, vėžinės ląstelės, nepaisant to, ar jos auga organizme ar *in vitro* sąlygomis [9].

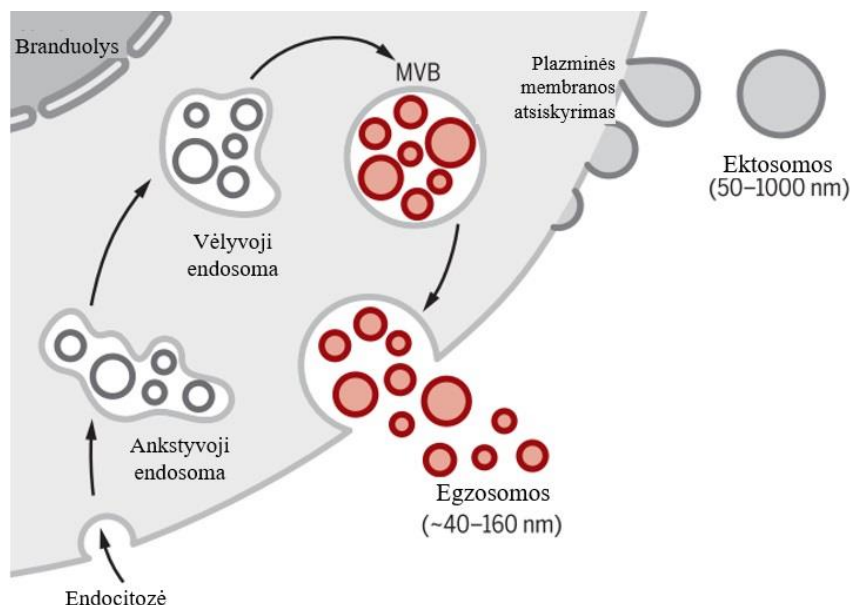


1 pav. Ekstraląstelinių pūslelių tipai ir dydžiai. Adaptuota pagal [10].

Egzosomų biogenezė, priešingai nei kitų EV, kurios susiformuoja iš ląstelės membranos, prasideda ląstelės viduje, endosomų, dinamiškų membraninių pūslelių, brendimo metu (2 pav.). Pirmiausia vyksta endocitozė, kurios metu ląstelės plazminė membrana įlinksta į vidų ir susiformuoja ankstyvoji endosoma. Toliau, po kelių transformacijos žingsnių, ji subręsta į vėlyvąją endosomą. Jos membranoje atsiranda įlinkiai, formuojasi daugiapūslelinis kūnelis (angl. *multivesicular bodies, MVB*), kurio vidų sudaro daugybė intraluminalinių pūslelių (angl. *intraluminal vesicles, ILV*) užpildytų įvairiomis viduląstelinėmis medžiagomis. Toliau, MVB gali susijungti su lizosomomis, jeigu reikalinga medžiagų degradacija. Kitu atveju, MVB gali susilieti su plazmine membrana ir egzocitozės būdu išskirti ILV į ląstelės išorę. Ląstelės išorėje atsidūrusios nanopūslelės vadinamos egzosomomis [3].

Žinomi du MVB formavimosi būdai. Pirmasis yra priklausomas nuo endosominio pasiskirstymo baltymų kompleksų, reikalingų transportui, dar vadinamų ESCRT (angl. *endosomal sorting complex required for transport*), o antrasis nuo jų nepriklausomas [9]. ESCRT mechanizmą sudaro keturi dideli baltymų kompleksai ESCRT-0, -I, -II ir -III kartu su pagalbiniais baltymais. Šis kompleksas reikalingas supakuoti atitinkamas viduląstelines molekules į ILV. ESCRT-0 geba identifikuoti ir pritraukti ubikvitinu pažymėtus transmembraninius baltymus prie endosomos membranos. ESCRT-I ir -II yra svarbūs membranos įlinkimui ir ILV formavimuisi, o ESCRT-III katalizuoja nanopūslelių atsiskyrimą nuo membranos [11]. Nuo ESCRT nepriklausomas MVB susidarymo kelio egzistavimas pagrįstas atliktais tyrimais, kurių metu ESCRT kompleksų pagrindinių subvienetų blokavimas nepakenkė ILV formavimuisi [12]. Manoma, kad šiam procesui reikalingi lipidai, tokie kaip

keramidas, cholesterolis, kurie deformuoja membraną, bei baltymai tetraspaninai ir kt., svarbūs medžiagų rūšiavimui ir jų įtraukimui į egzosomas [12, 13].



2 pav. Egzosomų biogenezė. Adaptuota pagal [3].

Ląstelės homeostazė yra svarbus faktorius galintis tiek teigiamai, tiek neigiamai paveikti egzomosų biogenezę. Atrasta, kad ląstelės augančios stresą keliančiomis sąlygomis padidina egzomosų išskyrimą. Nustatyta, kad radiacijos ar chemoterapiniais agentais paveiktos ląstelės, ar auginamos hipoksijoje, išskyrė daugiau šių nanopūslelių [14].

1.2. Egzosomų sandara

Egzomosų sudėtyje randama įvairių baltymų, lipidų ir nukleorūgščių. Jų sandara atspindi ląstelių, iš kurių jos išskiriamos, sudėtį. Egzosomų membrana yra sudaryta iš fosfolipidų dvisluoksniu ir plazminei membranai būdingų lipidų, tokių kaip sfingomielinas, fosfatidilcholinai, fosfatidilserinas, cholesterolis, keramidas [12]. Šios molekulės ne tik formuoja membraną, kuri suteikia egzomosoms formą ir apsaugo jų turinį nuo aplinkos, bet ir tarpininkauja įvairiose molekulinuose procesuose. Pavyzdžiui, sfingomielinas suteikia membranai tvirtumo, o fosfatidilserinas reikalingas užtikrinti teisingą egzomosos susijungimą su ląstelėmis, signalų perdavimą [15].

Egzomosose gausu baltymų, išsidėsčiusių tiek nanopūslelių viduje, tiek įsitvirtinusių membranoje. Daugelis paviršinių baltymų yra išimtinai randami tik egzomosose ir gali būti naudojami kaip žymenys, leidžiantys jas atskirti nuo mikropūslelių ir kitų ekstraląstelių pūslelių [12]. Dažnai sutinkami transmembraniniai tetraspaninų šeimos baltymai (CD63, CD81, CD9 ir kt.) dalyvaujantys membranų susiliejime, signalų perdavime, medžiagų rūšiavime. Daug randama ir sukibimo molekulių integrinų, kurie reikalingi egzomosoms susijungti su ląstelėmis-taikiniais [9, 12, 16]. Egzosomosose nustatyti citoplazminiai baltymai tokie kaip šiluminio šoko baltymai, baltymai atsakingi

už membranos susiliejimą (Rab GTPazės, aneksinai), citoskeletą sudarantys baltymai (aktinas, tubulinas) [17].

Egzosomos kaupia nukleorūgštis – informacinę RNR, mikroRNR bei kitas nekoduojančias RNR molekules. Atrasta, kad iš šių nanopūslelių išskirta informacinė RNR yra funkcionali ir gali dalyvauti baltymų sintezėje *in vitro* [9]. MikroRNR dalelės turi reguliacinę funkciją, geba prisijungti prie komplementarių sekų informacinės RNR grandinėje ir tokiu būdu slopinti arba aktyvinti transliaciją. Tyrimai atskleidė, jog mikroRNR, esanti egzosomose, gali būti pernešama ląstelėms ir ten veikti genų raišką [18].

1.3. Egzosomų sąveika su ląstelėmis– taikiniai ir patekimo būdai

Egzosomos, išskirtos iš ląstelių, patenka į tarpląstelinę aplinką, kur gali sąveikauti su ląstelėmis-taikiniais, pernešant joms biologiškai aktyvias medžiagas, gebančias sukelti fiziologinius pokyčius ląstelėje [19]. Egzosomos gali dalyvauti trijų tipų signalo perdavime: autokrininiame, sąveikaujant su motinine ląstele, parakrininiame, perduodant signalą kaimyninėms ląstelėms, bei endokrininiame, komunikuojant su toli esančiomis ląstelėmis [20]. Nustatyta, kad šios nanopūslelės gali pereiti per medžiagoms selektyvų kraujo-smegenų barjerą (KSB) ir tokiu būdu iš sisteminės kraujotakos patekti į smegenų ląsteles ir atvirkščiai [21, 22].

Pirmas egzomosų sąveikos su ląstelėmis etapas yra ląstelių-taikinių atpažinimas ir susijungimas su jais. Šiam procesui svarbios paviršinės molekulės, esančios egzomosų plazminės membranos išorinėje pusėje [10]. Tai tetraspaninai, integrinai, lektinai, proteoglikanai, kurie gali prisijungti prie specifinių receptorių, sukibimo molekulių, išsidėsčiusių ląstelių-taikinių membranoje, bei sąveikauti su tarpląstelinės matricos baltymais lamininu ir fibronektinu [23]. Atlikti tyrimai parodė, kad egzomosų sąveika su ląstelėmis gali priklausyti nuo nanopūslelės produkavusių ląstelių tipo. Buvo nustatyta, kad iš pirminės neuronų kultūros išgautos egzosomos išskirtinai sąveikavo su kitais neuronais, o neuroblastomos egzosomos jungėsi prie astrocytų. Tačiau tai galioja ne visiems ląstelių tipams. Nustatyta, jog gimdos kaklelio vėžinės ląstelės gali sąveikauti ir internalizuoti egzosomas, nepriklausomai nuo jas produkavusių ląstelių tipo [18].

Egzosomos į ląsteles gali patekti paprastais ir nespecializuotais procesais, tokiais kaip fagocitozė ar plazminės membranos susiliejimas, taip pat specializuotais, priklausančiais nuo baltymų kompleksų. Fagocitozę vykdo imuninės sistemos ląstelės fagocitai – makrofagai, dendritinės ląstelės ir kitos. Šios ląstelės gali atpažinti fosfatidilserino molekules, kurių gausu egzomosų membranoje. Įvykus fosfatidilserino sąveikai su ląstelės receptoriais, iš plazminės membranos pradeda formuotis pseudopodijos, kurios apgaubia egzosomas ir tokiu būdu ląstelė jas įtraukia į vidų. Tiesioginis egzomos ir ląstelės fosfolipidų dvisluoksnių susiliejimas įvyksta tarpininkaujant paviršiniams baltymams bei lipidams ir tai leidžia pernešti visą egzomosų turinį į ląstelės citoplazmą [22].

Nanopūslelės gali būti įsisavinamos vykstant endocitozei. Nuo baltymo klitrino priklausomai endocitozei vyksti būtina sąveika tarp ligando, esančio egzomosų membranos paviršiuje ir specifinių membraninių ląstelės receptorių. Šis procesas susideda iš nuoseklių, vieno po kito einančių etapų. Egzosomoms prisijungus prie receptorių, pradeda formuotis klitrinu padengta pūslelė, tarpininkaujant adaptorinio baltymo 2 kompleksui. Susidarant šiai pūslelei, ląstelės membrana deformuojasi, atsiranda įduba, apsupta klitrino molekulėmis, ir tada susiformuoja viduląstelinė

pūslelė, kuri vėliau, atsiskyrus kladrino molekulėms, jungiasi su endosomomis ir joms perduoda egzosomų nešamas molekules. Kito tipo endocitozė yra priklausoma nuo membraninio integralinio baltymo kaveolino. Ląstelės plazminėje membranoje randami nedideli membranos įlinkimai, vadinami kaveolėmis, kurie susiformuoja lipidiniuose plausteliuose, turtinguose cholesteroliu, glikosfingolipidais bei kaveolinu. Didelė lokali cholesterolio koncentracija, kaveolino pamatinių subvienetų prisijungimas prie plazminės membranos bei baltymas GTPazė dinaminas 2 katalizuoja kaveolinu dengtą viduląstelinių pūslelių susidarymą ir egzosomų įsisavinimą [14].

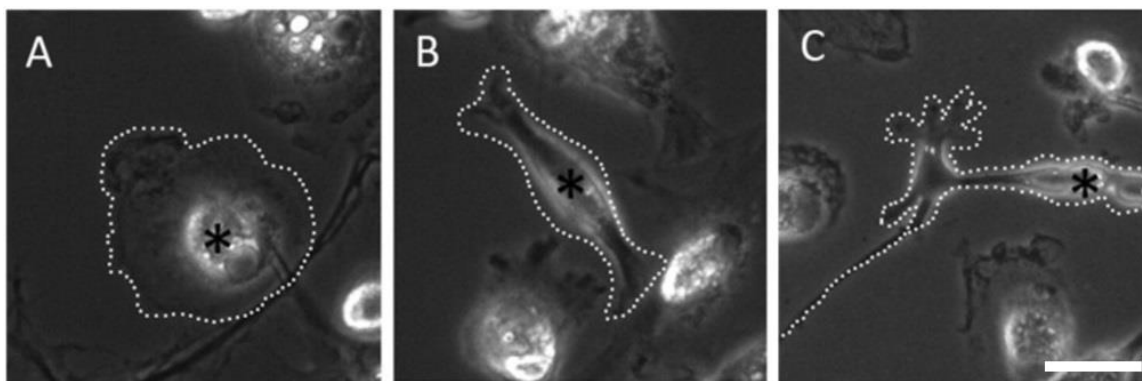
1.4. Egzosomų biologinės funkcijos

Ankščiau buvo manyta, kad egzosomų pagrindinė funkcija yra pašalinti viduląstelinių procesų metu susidariusius šalutinius produktus ir tokiu būdu palaikyti ląstelių homeostazę [24]. Per pastaruosius keletą metų išryškėjo egzosomų svarba dalyvaujant tarpląstelinėje komunikacijoje ir jų vaidmuo fiziologiniuose bei patologiniuose procesuose. Egzosomų funkcijos, kaip ir jų sudėtis priklauso nuo jas sekretuojančių ląstelių tipo. Imuninių ląstelių išskiriamos egzosomos yra imunologiškai aktyvios, savo sudėtyje turinčios citokinų, interleukinų ir kitų signalinių molekulių, kurios dalyvauja reguliuojant tiek įgyto, tiek įgimto imuniteto atsaką. Jos tarpininkauja antigeno pateikimo procese, limfocitų aktyvacijoje, imuninės sistemos slopinime bei priešūždegiminiame poveikyje [25].

Didelis dėmesys skiriamas vėžinių ląstelių išskiriamoms egzosomoms, siekiant išsiaiškinti jų reikšmę onkologiniuose susirgimuose. Jos gali veikti įvairius vėžio vystymosi etapus, tokius kaip naviko augimas, metastazės, atsparumas chemoterapiniams vaistams, angiogenezė, imuninio atsako vengimas, invazyvumas [26]. Nustatyta, jog vėžinės ląstelės į kraujotaką išskiria dvigubai daugiau egzosomų nei sveikos ląstelės, ir tai paskatino egzosomas naudoti kaip vėžio žymenis, siekiant diagnozuoti bei prognozuoti onkologinės ligos eigą [27].

1.5. Mikroglijos ląstelių morfologija ir funkcijos

Mikroglia yra įgimto imunineto ląstelės, priklausančios mononuklearinių makrofagų tipui ir randamos išskirtinai centrinėje nervų sistemoje (CNS). Jos sudaro 5-20% visų CNS glijos ląstelių. Skirtingai nei kitos smegenų ląstelės, mikroglia susiformuoja iš eritro-mieloidinio pirmtako trynio maiše, ankstyvojoje embriogenezės stadijoje, ir vėliau nukeliauja į CNS, kur išlieka visą gyvenimo laikotarpį [28]. Mikroglijos ląstelės reaguodamos į aplinką gali keisti savo formą dėl fibrilinio aktino gijų, sudarančių ląstelės citoskeletą, dinamiško persitvarkymo [27]. Suaugusiame organizme egzistuoja trys pagrindinės mikroglijos morfologinės formos, kurios yra susijusios su ląstelių atliekama funkcija. Ramifikuotos, kitaip ramybės, būsenos mikroglia turi mažą ląstelės kūną nuo kurio išsišakoja daug ataugų (3 pav. (C)). Šie išsikišimai yra judrūs ir nuolatos aktyviai stebi tarpląstelinę aplinką [27, 28] Aptikus pažeidimą ar infekcijos sukėlėją, mikroglia gali aktyvuotis ir įgyti ameboidinę ar pseudopodinę formas (3 pav. (A) ir (B)), pasižyminčias aukštu fagocitiniu aktyvumu bei judrumu. Pseudopodinė mikroglia yra pailgos formos su dviem ataugomis, kurias gaubia vėduoklės formos membrana. Ameboidinė mikroglia savo morfologija yra labiausiai panaši į periferinius makrofagus. Ji turi ovalinės formos kūną, mažai šakotą ataugų, didelį branduolį ir yra apsupta klostuota citoplazma [28, 29].



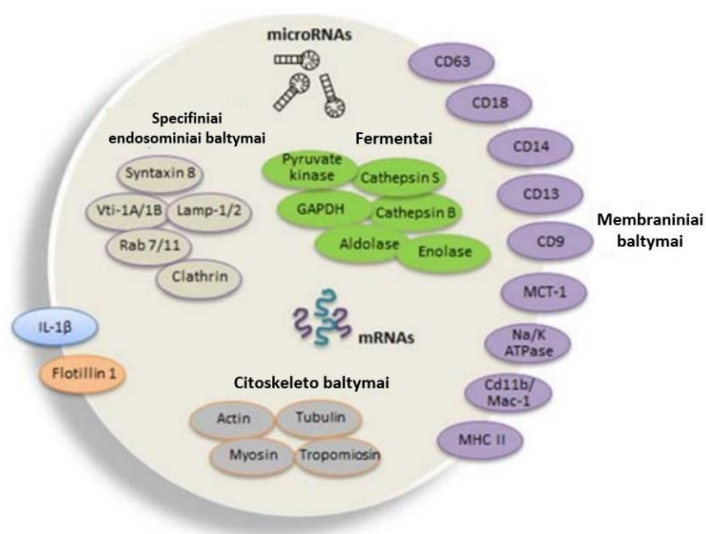
3 pav. Žmogaus pirminės mikroglijos ląstelių morfologinės formos. (A) ameboidinė formą, (B) pseudopodinė forma ir (C) ramifikuota forma. Taškuotos linijos žymi mikroglijos ląstelės ribas, o žvaigždutė rodo ląstelės branduolio vietą. Mastelis 20 μm . Adaptuota pagal [28].

Mikroglia atlieka svarbų vaidmenį neurogenezėje. Besivystančiose ir suaugusiųjų smegenyse ji reguliuoja neuronų skaičių fagocitozės būdu pašalindama neuronų pirmtakus, apoptotinius ar žuvusius neuronus. Taip pat, mikroglia reguliuoja nervinio impulso sklidimą dalyvaujant signalų perdavime sinapsėje ir aksonų pluoštų remodeliacijoje. Kaip pagrindinės smegenų imuninės ląstelės, jos palaiko homeostazę, apsaugo nuo patogenų, endogeninių klaidingai sulankstytų baltymų ir neoplastinių ląstelių [30]. Mikroglia savo ataugomis sveikame smegenų audinyje nuolatos tikrina ją supančią aplinką ir aktyvuojasi esant pažeidimui, infekcijai ar vykstant neurodegeneraciniams procesams. Mikroglia gali turėti skirtingus fenotipus, susijusius su uždegiminiais procesais. M2 fenotipas yra susijęs su priešuždegiminėmis funkcijomis, kurių metu mikroglia išskiria IL-10 ir TGF- β citokinus, pašalina negyvas ląsteles bei skatina audinio gijimą. Priešingai, infekcijos ar pažeidimo atveju, mikroglijos ląstelės polarizuojasi ir įgija M1 fenotipą, siejamą su uždegimą skatinančiomis funkcijomis [31]. Mikroglia yra pagrindinis uždegiminių molekulių šaltinis CNS ir išskiria citokinus, reaktyvius deguonies junginius bei tirpius lipidus. Mikroglijos ląstelių sukeliamas smegenų uždegimas yra atsakas prieš patirtą audinių sužalojimą, tačiau šiam procesui užsitęsęs sukeliama neigiamos pasekmės. Nustatyta, kad netinkamai funkcionuojančios mikroglijos ląstelės yra pagrindinis nervinio audinio uždegimo sukėlėjos ir manoma, kad tai paskatina neurodegeneracinių ligų atsiradimą [6].

1.5.1. Mikroglijos egzosomos

Kaip ir daugelis organizmo ląstelių, mikroglia geba išskirti egzosomas. Tai buvo patvirtinta atliktais tyrimais su pelių pirminėmis mikroglijos ląstelėmis, bei ląstelių linijomis. Atlikti proteomikos tyrimai parodė, kad mikroglijos egzosomos savo sudėtimi yra panašios į dendritinių ląstelių ir B limfocitų išskiriamas egzosomas. Buvo atrasti bendri fermentai, tetraspaninai, šaperonai ir membraniniai receptoriai [29]. Egzosomų biologinis aktyvumas ir sudėtis priklauso nuo mikroglijos ląstelių būsenos, išorinių ir vidinių signalų [6]. 4 paveiksle yra vaizduojama tipinė mikroglijos egzosomų sudėtis. Jos turi tipinius membraninius baltymus, patvirtinančius jų endosominę kilmę. Taip pat, turi histosuderinamumo kompleksą MHC II (angl. *major histocompatibility complex II*) bei fermentą katepsiną S, kurie pavirtina jų kilmę iš antigenų pateikiančios imuninės ląstelės. Mikroglijos

egzosomos turtingos tetraspaniniais CD9, CD63 ir CD81, kurie kartu su CD14 (monocitų/makrofagų žymuo) naudojami jų identifikacijai [30].



4 pav. Tipinė mikroglijos ląstelių išskiriamų egzosomų sudėtis. Adaptuota pagal [30].

1.6. Neoplastinių ląstelių savybės

Vėžys nėra viena liga, o grupė tarpusavyje susijusių ligų, kurias sieja nekontroliuojamas ląstelių dalijimasis ir plitimas į aplinkinius audinius. Vėžį sudaro neoplastinės ląstelės, kilusių iš sveikų organizmo ląstelių, kurių normalios funkcijos pakito dėl patirtų pažeidimų, sutrikusių viduląstelinio mechanizmų ar kitų priežasčių. Išskiriamos 6 pagrindinės neoplastinių ląstelių savybės, kuriomis jos išsiskiria nuo sveikų ląstelių. Vėžinės ląstelės gali gaminti joms reikalingus augimo signalus, faktorius ir tapti nepriklausomos nuo aplinkinių ląstelių. Sveikose ląstelėse jų dalijimosi ciklą griežtai kontroliuoja specialūs baltymai, onkosupresoriai, kurie aptikus DNR pažeidimą ar neigiamus augimo signalus sustabdo šį ciklą. Neoplastinėse ląstelėse šie baltymai yra mutavę ir jos gali pereiti ląstelės dalijimosi ciklo kontrolės taškus nors ir turi defektų. Ląstelės turi limituotą dalijimosi skaičių, kurį pasiekus jos patenka į senėjimo fazę, kurioje jos daugiau nesidalija, bet kuri laiką išlieka gyvybingos iki kol pasiekia kritinę fazę, po kurios ląstelė žūsta apoptozės būdu (programuota ląstelės žūtis). Šis procesas yra kontroliuojamas telomerų (pasikartojančios nukleotidų sekos chromosomų galuose), kurios apsaugo chromosomų galus, tačiau sutrumpėja po kiekvieno ląstelės dalijimosi. Vėžinės ląstelės turi fermentą telomerazę, kuri gali prailginti telomeras ir išvengti ląstelės žūtis. Apoptozės vėžinėms ląstelėms išvengti taip pat padeda padidinta anti-apoptotinių faktorių raiška. Neoplastinės ląstelės turi didelį energijos poreikį, todėl jų metabolizmas yra pakitęs. Sveikos ląstelės energiją gamina aerobinėmis sąlygomis skaidant gliukozę į piruvatą, o šis naudojamas oksidacinam fosforinimui mitochondrijose. Jeigu ląstelei trūksta deguonies, ji energiją gamina gliukozę paverčiant laktatu. Tai yra neefektyvus procesas, bet būtent jis vyksta vėžinėse ląstelėse. Manoma, kad anaerobinė glikolizė neoplastinei ląstelei yra palankesnė, kadangi suteikia tarpinių metabolizmo produktų, kuriuos galima panaudoti kitų biomolekulių sintezei. Daugėjant vėžinių ląstelių joms reikia daugiau maisto medžiagų, deguonies bei pašalinti susidariusius šalutinius produktus. Vėžinėse ląstelėse gali prasidėti procesas vadinamas angiogeneze, kurio metu susiformuoja naujų kapiliarų bei kraujagyslių tinklas. Tai užtikrina pastovų reikalingų augimui medžiagų gavimą [32].

Laikui bėgant vėžinėms ląstelėms pradeda trūkti vietos ir gali prasidėti metastazės procesas. Jis yra daugiapakopis. Pirmiausia, neoplastinės ląstelės turi įgauti tam tikrą savybių rinkinį, leidžiantį joms metastazuotis ir tapti piktybinėmis. Toliau, vėžinės ląstelės turi patekti ir išgyventi sisteminėje kraujotakoje prieš pasiekiant ir kolonizuojant naują audinį. Todėl metastazės procesas yra gana retas ir tikimybė, kad jis bus sėkmingas, yra maža [32].

1.6.1. Glioblastoma

Gliomos yra smegenų navikai, susiformuojantys iš specializuotų CNS ląstelių, vadinamų glijos ląstelėmis. Pagal Pasaulinę Sveikatos Organizaciją, gliomos yra skirstomos į keturias kategorijas I-IV pagal jų histopatologiją ir genetinius pokyčius. Glioblastoma priklauso IV kategorijai ir yra dažniausiai diagnozuojama ir agresyviausia gliomos forma, pasižyminti dideliu invazyvumu. Šis tipas sudaro 70% visų gliomos atvejų ir pacientų tikimybė išgyventi 12-15 mėnesių tesiekia vos 26% [1]. Pagrindinė gydymo strategija yra pašalinti auglį chirurginiu būdu ir po operacijos taikyti adjuvantinę radioterapiją ir chemoterapiją. Tačiau nei vienas iš šių gydymo būdų, vartojamas individualiai ar kaip kombinuotas gydymas, negarantuoja ilgesnio nei 15 mėnesių išgyvenamumo [27]. Sunkų gydymą lemia greitas naviko atsinaujinimas dėl neoplastinių ląstelių įgyto rezistentiškumo chemoterapiniams agentams bei greito naviko plitimo į sveikus audinius [1]. KSB atlieka svarbią smegenų apsauginę funkciją, tačiau taip pat blokuoja daugelio vaistų patekimą. Daugiau nei 98% visų mažos molekulinės masės vaistų negali pereiti per KSB. Taip pat, naujos biologinės terapijos tokios, kaip monokloniniai antikūnai, rekombinantiniai baltymai, vieni negali pereiti per KSB. Tai ženkliai sumažina glioblastomos gydymui galimų vartoti vaistų skaičių [33].

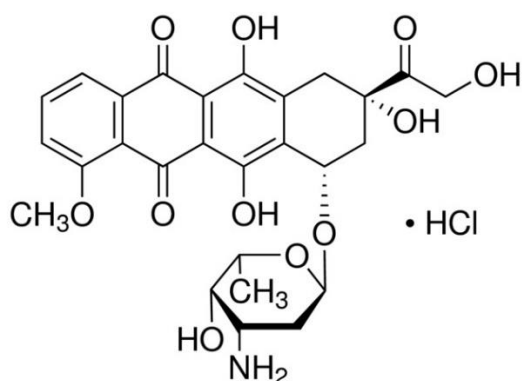
1.7. Tradicinė chemoterapija ir tikslinė vėžio terapija

Keletą dešimtmečių, pagrindiniu vėžio gydymo būdu buvo laikomi citotoksiniai, sistemiškai vartojami chemoterapiniai agentai. Šie vaistai nėra specifiški navikui ir jų vartojimas dažnai sukelia ženklių toksinį poveikį sveikoms ląstelėms. Gydymo citotoksiniais vaistais sėkmingumas priklauso nuo jų skirtingo toksiškumo navikinėms ląstelėms, kurioms paprastai būdingas greitesnis dalijimasis ir didesnė priklausomybė nuo nuolatinio augimui reikalingų biomolekulių pasisavinimo, lyginant su normaliomis ląstelėmis. Chemoterapijos tikslas yra sunaikinti visas vėžines ląsteles esančias organizme, tačiau dažnai ji sukelia ūmius, bet grįžtamus toksinius poveikius sveikam audiniui [34]. Todėl, pacientai dažnai patiria stiprius šalutinius poveikius tokius kaip, kaulų čiulpų funkcijos slopinimas, virškinamojo trakto sutrikimai, susilpnėjęs imunitetas.

Pastaraisiais metais, daugiau dėmesio skiriama tikslinei vėžio terapijai. Ji pagrįsta specifinių molekulių taikinių, esančių ant vėžinių ląstelių, veikimu. Tokio tipo vaistai išskirtinai veikia tik vėžines ląsteles ir neturi citotoksinio poveikio sveikoms ląstelėms. Nanotechnologijos dėka tradiciniai chemoterapiniai vaistai gali būti panaudoti tikslinei terapijai juos įvedant į transporto sistemas, tokias kaip nanodalelės, kurios gali vaistą pernešti į tikslinę veikimo vietą [35].

Vienas iš tradicinės chemoterapijos agentų yra doksorubicinas ir jo hidrochlorido druska (5 pav.). Šis vaistas priklauso antraciklininių antibiotikų grupei ir pirmą kartą, 1970 metais, buvo išgautas iš *Streptomyces peucetius* bakterijos. Jis yra rutiniškai vartojamas įvairių tipų navikams gydyti tokiems,

kaip plaučių, krūties, skrandžio, limfomai, sarkomai. Pagrindinė dokсорubicino vartojimo limitacija yra jo sukeliamas kardiotoksiškumas. Žinomi du pagrindiniai dokсорubicino veikimo mechanizmai, kuriais sukeliama navikinių ląstelių žūtis. Vaistas gali patekti į ląstelės branduolį, kur įsijungia į DNR grandinę ir blokuoja fermento topoisomerezės II veikimą. Šis fermentas reikalingas teisingam DNR grandinių išsivyniojimui DNR pažeidimų taisymo metu. Kai šis procesas yra užblokuojamas, DNR pažeidimas nėra sutaisomas ir ląstelė žūsta. Taip pat, dokсорubicinas gali sukelti laisvųjų radikalų, reaktyvių deguonies junginių gamybą ląstelėje, kurie pažeidžia ląstelės membraną, DNR, sukelia oksidacinį stresą ir ląstelės žūtį apoptozės būdu [36].



5 pav. Dokсорubicino hidroklorido struktūrinė formulė [37].

Dokсорubicinas yra kliniškai veiksmingas gydant daugelį piktybinių navikų, tačiau klinikiniai tyrimai taikant sisteminę dokсорubicino terapiją gliomos gydymui parodė labai ribotą šio vaisto veiksmingumą. Labai didelės dokсорubicino dozės turi būti vartojamos sistemiškai, norint gauti kokią nors terapinę naudą. Tačiau didelės dozės yra labai neurotoksiškos, todėl neveiksmingos gydant piktybinius CNS navikus, tokius kaip glioblastoma. Šis ribotas dokсорubicino veiksmingumas, kai jis skiriamas sistemiškai, gali būti paaiškinamas prastu vaisto patekimu per KSB ir p-glikoproteinų sukeltą vaisto pašalinimą iš smegenų skysčio. Dėl molekulinės hidrofiliškumo ir didelės molekulinės masės, ji yra sulaikoma KSB, todėl negali patekti į smegenis ir tikslią veikimo vietą [38]. Atlikta nemažai *in vitro* bei *in vivo* tyrimų, tiek su žmogaus ląstelėmis, tiek su gyvūnų modeliais, kuriuose nustatyta, kad dokсорubicinas yra toksiškas glioblastomos ląstelėms ir gali būti efektyvus vaistas glioblastomai gydyti [38–41]. Norint sėkmingai panaudoti dokсорubiciną glioblastomos gydymui, jis turi būti įvedamas į nanonešiklius, kurie galėtų pereiti per KSB ir pristatyti vaistą į navikines ląsteles.

1.8. Egzosomų, kaip vaistų pernešimo sistemos, privalumai

Daugelis priešvėžinių chemoterapinių vaistų pasižymi prastais farmakokinetiniais parametrais – mažu tirpumu vandenyje, bloga absorbcija, bei vartojant juos sistemiškai sukelia nepageidaujamus poveikius. Šie vaistai gali būti įvedami į specialias pristatymo mašinas, nano-daleles, siekiant pagerinti šių vaistų veiksmingumą bei sumažinti toksiškumą sveikoms organizmo ląstelėms [16].

Nanonešikliai, sukurti išskirtinai atpažinti ir veikti ląsteles-taikinius, yra perspektyvi piktybinių solidinių navikų gydymo strategija. Dažniausiai naudojami nanonešikliai yra micelės, liposomos ir įvairūs polimeriniai nešikliai. Šie dirbtiniai nešikliai pasižymi trūkumais – greitu klirensu, toksiškumu sveikoms ląstelėms, limituota vaisto pakrovimo talpa ir maža skvarba į organizmo audinius [21]. Siekiant sumažinti ar pašalinti minėtus trūkumus, pastaraisiais metais egzosomos yra

vis intensyviau tyrinėjamos kaip potencialios vaistų pristatymo sistemos. Skirtingai nei minėti nanonešikliai, egzosomos yra natūralios kilmės ir jų viena iš pagrindinių funkcijų yra įvairių biomolekulių pernaša į ląsteles-taikinius. Egzosomų lipidinė dvisluoksnė membrana apsaugo viduje esančias bioaktyvias molekules nuo degradacijos, kurią vykdo RNazės, proteazės ir kiti degradacijos baltymai [26]. Šios nanopūslelės ilgai išlieka stabilios sisteminėje cirkuliacijoje, gali pereiti įvairius biologinius barjerus, išsaugant nepažeistas, terapiškai aktyvias medžiagas. Tyrimai parodė, jog naudojant priešvėžiniais vaistais užpildytas egzosomas galima pasiekti didesnę viduląstelinę vaisto koncentraciją, nei vartojant vaistą sistemškai [4]. Nustatyta, jog šios pūslelės, skirtingai nei sintetinės nano-dalelės, nesukelia imunologinių reakcijų [42] ir organizme gerai toleruojamos, bei jų saugumas patvirtintas *in vitro* ir gyvūnų modeliuose [43].

1.9. Egzosomų išskyrimas ir identifikavimas

Tiriant egzosomas yra svarbu pasirinkti tinkamą išskyrimo metodiką, kadangi nuo jos priklauso mėginio grynumas, egzosomų kiekis. Taip pat, reikia įvertinti kur bus panaudojamas egzosomų mėginys. Jeigu bus naudojamas ligų dignostikai, mėginio grynumas nėra toks svarbus, kaip panaudojant šias daleles terapijai [44]. Itin mažas egzosomų dydis dar labiau komplikuoja šių dalelių tyrimus. Atrasta daug egzosomų išskyrimo būdų, tačiau nei vienas iš jų nėra standartinis. Plačiausiai naudojamas yra ultracentrifugavimas, kurio metu egzosomos yra nusodinamos naudojant didelius centrifugavimo greičius, siekiančius 1 000 000 xg ir daugiau. Tačiau šis metodas turi keletą neigiamų aspektų tokių, kaip reikalingas didelis pirminio mėginio tūris, išskiriamas gana mažas egzosomų kiekis, prastas atsikartojamumas, trunka ilgą laiką [45]. Egzosomos gali būti išskiriamos pagal jų dydį. Tam gali būti pasitelkta ultrafiltracija, kur yra naudojami membraniniai filtrai, turintys tam tikrą porų dydį ir galintys sulaikyti egzosomas, o mėginyje esančias mažesnes daleles pašalinti. Dydžio išskirstymo chromatografija taip pat remiasi panašiu principu ir naudojama egzosomų išgavimui. Dar kitas šių nanopūslelių išskyrimo būdas yra paremtas keičiant egzosomų tirpumą ir išsodinant jas iš biologinio mėginio. Tam tikslui yra naudojami polimerai, tokie kaip polietileno glikolis (PEG), kuris geba surišti vandens molekules ir mažiau tirpius komponentus išstumti iš tirpalo. Šiam metodui nereikia papildomos įrangos, bei gali būti naudojami mažesni mėginių tūriai [46].

Išskyrus egzosomas būtina atlikti jų identifikavimą, patikrinti fizikochemines savybes tokias kaip dydį, tankį, formą. Egzosomų dydžiui matuoti yra naudojama keletas metodų tokių kaip dinaminė šviesos skaidos analizė, tekmės citometrija, elektronų mikroskopija ir kitos. Egzosomos taip pat yra vertinamos pagal jų molekulinis žymenis. Tam yra naudojami imunodetekciniai metodai, tokie kaip imunoblotas (angl. *Western blot*) ir imunofermentinis metodas ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Dažniausiai kaip egzosomų molekuliniai žymenis yra naudojami tetraspaninų šeimos baltymai CD63, CD9, randami beveik visose egzosomose. Galima tirti ir pagal specifinius žymenis, norint identifikuoti egzosomas kilusias iš tam tikro tipo ląstelių [47].

1.10. Vaistų įterpimo į egzosomas būdai

Vaistai į egzosomas gali būti pakraunami pasyviais ir aktyviais būdais. Nuo pasirinkto vaisto įterpimo metodo priklauso egzosomų užpildymo efektyvumas bei pačio vaisto stabilumas egzosomose [48].

Pasyvūs pakrovimo metodai yra paprasti ir nereikalaujantys papildomos įrangos ar cheminių medžiagų. Šiai metodų grupei priklauso inkubacija. Ląstelės gali būti inkubuojamos su norimu vaistu, kurį ląstelės supakuoja į egzomas ir išskiria į mitybinę terpę iš kurios jos yra išskiriamos. Taip pat, pačios egzomos gali būti inkubuojamos kartu su vaistu, kuris patenka į egzomų vidų difuzijos būdu. Pakrovimo efektyvumas priklauso nuo vaistų koncentracijos gradiento ir jų hidrofobiškumo. Didelės hidrofobinio vaisto koncentracijos dažniausiai lemia aukštą vaistų pakrovimo efektyvumą [49]. Paprasta inkubacija buvo sėkmingai panaudota pakrauti keletą vaistinių medžiagų. Priešuždegimiam vaistui kurkumino įterpimui, egzomas su vaistu buvo inkubuotos 5 minutes 22°C temperatūroje, o doksorubicinas buvo įkrautas inkubuoiant 2 valandas, esant 37°C temperatūrai [42]. Šio metodo pranašumas yra tas, kad egzomos membranos vientisumas išlieka nepakitęs, o pagrindinis trūkumas gali būti tai, kad pakraunamas mažas vaisto kiekis.

Aktyvūs vaistų pakrovimo būdai yra taikomi iš ląstelių išskirtoms egzomoms ir reikalauja papildomos šių pūslelių manipuliacijos, kurios metu trumpam suardoma lipidinė membrana ir vaistas gali patekti į egzomų vidų. Sonikavimas priklauso šiai metodų grupei. Procesu metu tirpale esančios dalelės yra agituojamos garso bangų energija. Ultragarso vaisto įkrovimo principas yra tas, kad ultragarso bangos žymiai sumažina egzomų membranos mikroviskoziškumą (paprastai bent du kartus) ir hidrofobinis vaistas gali lengviau patekti per membraną [48]. Kitas metodas yra inkubavimas su saponinu. Ši molekulė yra paviršiaus aktyvioji medžiaga, galinti membranose sudaryti kompleksus su cholesteroliu ir suformuoti poras, padidinant membranos pralaidumą. Atlikti tyrimai parodė, kad hidrofiliųjų molekulių inkubavimas su saponinu yra tinkamas būdas pakrauti jas į egzomas ir padidina pakrovimo efektyvumą 11 kartų lyginant su pasyviais pakrovimo būdais [50]. Elektroporacija yra dar vienas aktyvus terapinių molekulių pakrovimo į egzomas būdas. Šiame metode egzomos ir vaistai yra suspenduojami elektrai laidžiame buferyje ir paveikiami elektriniu lauku, kuris laikinai suardo egzomų fosfolipidinę membraną ir joje susiformuoja trumpalaikės poros. Vaistai gali difunduoti per poras į egzomų vidų. Membranos integralumas yra atstatomas trumpai inkubuoiant jas 37°C temperatūroje. Šis būdas yra tinkamas pakrauti dideles, hidrofiliines vaistų molekules ar nukleotidus, kurie yra per dideli ir negali savaime difunduoti į egzomas [42]. Elektroporacijai naudojami skirtingi elektros įtampos dydžiai, nuo 150 V iki 700 V [15]. Įtampos dydžiai priklauso nuo ląstelių tipo, iš kurių buvo išgautos egzomos, bei nuo atstumo tarp elektrodų, esančių elektroporacijos kiuvetėje. Kiti parametrai lemiantys pakrovimą yra elektros pulso trukmė, egzomų ir vaisto koncentracijos [51].

1.11. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Egzomos dėl jų natūralios kilmės, mažo dydžio (40-160 nm), gebėjimo pereiti biologinius barjerus ir susijungti su specifinėmis ląstelėmis-taikiniais yra tyrinėjamos kaip priešvėžinių vaistų transporto sistemos. Jos gali būti naudingos tiems vėžiniams susirgimams, kurių gydymo galimybės yra ribotos. Glioblastoma yra vienas iš dažniausiai pasitaikančių piktybinių smegenų navikų, kurio gydymas yra sudėtingas dėl naviko augimo vietos. KSB sulaiko beveik visus sistemiškai vartojamus chemoterapinius vaistus ir todėl jie nėra tinkami šio naviko gydymui. Atlikta nemažai tyrimų, kurie nustatė, jog doksorubicinas yra efektyvesnis sunaikinant glioblastomos ląsteles, negu temozolamidas, kuris šiuo metu taikomas kaip standartinė chemoterapija glioblastomai gydyti [39, 41]. Tačiau dėl hidrofiliškumo ir didelio vaisto dydžio jis negali būti vartojamas sistemiškai glioblastomos gydymui.

Pakrovus doksorubiciną į egzosomas, jos galėtų pernešti vaistą per KSB ir pristatyti jį į tikslią veikimo vietą.

Kaip ir kitos organizmo ląstelės, mikroglia išskiria egzosomas. Tačiau iki šiol egzosomų išskyrimui iš mikroglijos ląstelių buvo naudojamos pelių pirminės ląstelės ar ląstelių linijos, bet, kiek žinoma, šios pūslelės nebuvo išskirtos iš žmogaus mikroglijos ląstelių [6, 7, 52]. Mikroglijos ląstelės yra pagrindinės imuninės ląstelės smegenyse, todėl manoma, kad jų išskiriamos egzosomos gali būti tinkamos kaip doksorubicino hidrochlorido pernešimo sistema į glioblastomos ląsteles.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimams naudotos medžiagos

1 lentelė. Naudotų medžiagų sąrašas

Medžiagos pavadinimas	Gamintojas
DMEM + GlutaMAX (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) terpė	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Ham's F-12K (Kaighn's) terpė	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
FBS (angl. <i>fetal bovine serum</i>)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Penicilinas-Streptomicinas	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
OPTI-MEM terpė	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
HBSS (angl. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
GlutaMAX™	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Fluorescencinis dažas BLOCK-iT™ Alexa Fluor™ Red Fluorescent Control	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Polietilenglikolis 6000	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Natrio chloridas	Carl Roth, grynumas $\geq 99.9\%$
Natrio azidas	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 99.5\%$
Dimetil sulfoksidas	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 99.9\%$
Tripiano mėlio tirpalas	Sigma-Aldrich
Bradfordo reagentas	Sigma-Aldrich
Jaučio serumo albuminas	Sigma-Aldrich
Tripsinas-EDTA (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Doksorubicino hidrochloridas	British Pharmacopoeia Commission Laboratory, UK
CD9 ELISA rinkinys	MyBioSource, JAV
D (+)- Sacharozė	Carl Roth, grynumas $\geq 99.5\%$
Amicon® Ultra-0.5ml 10K centrifuginiai filtrai	Merck Millipore
Exosome Spin Columns (MW 3000)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Gene Pulser® elektroporacijos kiuvetės	Bio-Rad, JAV
PrestoBlue™ tirpalas	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
bisbenzimidio H 33342 trihidrochloridas (Hoechst 33342)	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 98\%$
Propidžio jodidas	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 94\%$

2.2. Imortalizuotos žmogaus mikroglijos ląstelių kultūros kultivavimas

Imortalizuota žmogaus mikroglijos linija (HMC-3) buvo įsigyta iš Amerikos ląstelių kultūrų kolekcijos (angl. *American Type Culture Collection (ATCC)*). Siekiant užtikrinti sterilias sąlygas, visi darbai su ląstelėmis buvo atliekami laminarinėje oro srauto spintoje (ESCO Class II BSC,

Singapūras). Ląstelės buvo kultivuojamos DMEM-GlutaMAX mitybinėje terpėje, papildytoje 11.2% filtruotu veršelio serumu (FBS) ir 1% penicilino-streptomicino tirpalu (10000 IU/ml – 10000 µg/ml). Ląstelės buvo sėjamos į 75 cm² ląstelių auginimo indus ir inkubuojamos inkubatoriuje (Heracell Vios 160i, Thermo Fisher Scientific), kuriame palaikoma 37°C temperatūra, 5% CO₂ ir optimali drėgmė. Mitybinė terpė buvo atnaujinama kas 2-3 dienas. Ląstelėms pasiekus apie 80%-90% konfluentiškumą, jos buvo persėjamos į naujus 75 cm² ląstelių auginimo indus. Konfluentiškumas – procentinis ląstelių auginimo indo plotas, kuris yra padengtas prikibusiomis ląstelėmis. Atliekant ląstelių persėjimą, sena mitybinė terpė nupilama ir ląstelių auginimo indas praplaunamas su fosfatiniu druskų buferiu (FDB), siekiant pašalinti visus FBS likučius. Augdamos ląstelės padengia flakono dugną susiformuojant jų monosluoksniui, kuris turi būti suardomas persėjimo metu tam, kad ląstelės atsidurtų suspensijoje. Ląstelės nuo indo paviršiaus buvo atkabintos įpilant 2 ml 0.25% (w/v) tripsino – 0.53 mM EDTA tirpalo ir inkubuojant apie 5 min. 37°C temperatūroje. Ląstelių monosluoksnio suardymas buvo vertinamas šviesiniu mikroskopu (Leica DMi1, Vokietija). Po inkubacijos, tripsinas buvo neutralizuojamas įpilant dvigubai didesnę tūrį mitybinės terpės ir ląstelių suspensija buvo perkelta į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 120xg 5 min. (BioSan Centrifuge LMC-4200R, Latvija). Gautas supernatantas pašalintas, o susidariusi ląstelių sankaupa resuspenduota pasirinktame mitybinės terpės tūryje. Iš ląstelių suspensijos paimamas mėginys ląstelių skaičiui nustatyti, bei įvertinti ląstelių gyvybingumą. Atitinkamas tūris ląstelių suspensijos padalijamas į naujus ląstelių auginimo indus, įpilama mitybinės terpės ir ląstelės toliau auginamos inkubatoriuje, palaikančiame 37°C temperatūrą, 5% CO₂ ir optimalią drėgmę.

2.3. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo nustatymas su Tripano mėlio dažu

Ląstelių gyvybingumui patikrinti yra naudojamas Tripano mėlio dažas. Jis selektyviai nudažo mirusias ląsteles mėlyna spalva, kadangi jos būna praradusios membranos integralumą, o sveikos ląstelės lieka šviesios, nedažytos. Gyvybingų ląstelių skaičius nustatomas naudojant hemocitometrą, turintį dvi kameras, kuriuose išraižyti žinomo dydžio kvadratai. Iš ląstelių suspensijos buvo paimta 20 µl ir sumaišyta su 0.4% Tripano mėlio dažu santykiu 1:1. Mėginys kelis kartus sumaišytas automatine pipete ir patalpintas į Fuchs-Rosenthal tipo hemocitometro (Brand, Vokietija) kamerą taip, kad užpildytų visą kameros plotą. Ląstelės stebėtos šviesiniu mikroskopu ir suskaičiuotos gyvybingos ląstelės visuose kvadratuose. Gauta ląstelių suma buvo padauginta iš 2 (1:1 ląstelių suspensijos ir dažo skiedimas) ir iš 5000 (vieno kvadrato tūrio dalis mililitre). Gautas skaičius yra ląstelių kiekis viename mililitre.

2.4. Mikroglijos ląstelių stimuliavimas egzosomų išskyrimui

75 cm² ląstelių auginimo indai buvo užsėti po 800 000 ląstelių ir jos buvo augintos inkubatoriuje, kuriame buvo palaikoma 37°C temperatūra, 5% CO₂ ir drėgmė. Kitą dieną, augimo terpė buvo pašalinta, flakonai praplauti su FDB ir įpilta nauja beseruminė terpė. Ląstelės buvo inkubuojamos 48 valandas. Dalis flakonų buvo laikomi 37°C temperatūroje, o kita dalis buvo perkelta į 39°C temperatūros inkubatorių (New Brunswick™ Galaxy® 170 S.), palaikančiame 5% CO₂ ir optimalią drėgmę. Po inkubacijos, ląstelių auginimo terpė buvo nurinkta egzosomų išskyrimui.

2.5. Egzosomų išskyrimas iš mikroglijos ląstelių mitybinės terpės naudojant polietileno glikolio tirpalą

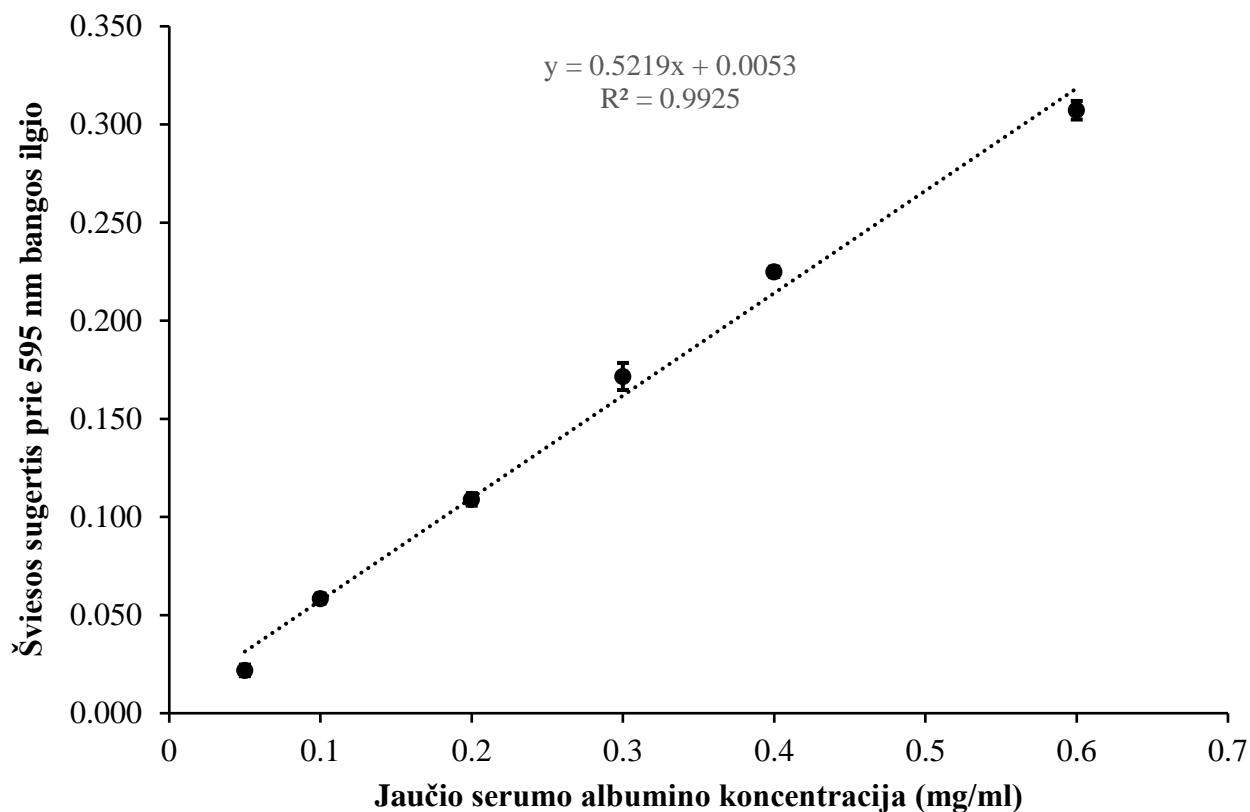
Egzosomų išskyrimui ląstelės 48 valandas buvo auginamos beseruminėje terpėje 75 cm² ląstelių auginimo flakonuose. Ši terpė buvo surenkama ir centrifuguojama 3000 xg greičiu 15 minučių. Šiame

etape buvo pašalintos ląstelių nuolaužos, kurios suformavo nuosėdas mėgintuvėlio dugne. Po centrifugavimo gautas supernatantas buvo išsaugotas ir filtruojamas per 0.22 μm porų dydžio filtrą. Tokiu būdu iš supernatanto buvo pašalintos dalelės didesnės nei 220 nm. Buvo paruoštas 2x polietileno glikolio (PEG) tirpalas, ištirpinant 24% PEG, 1M natrio chloridą ir 1% natrio azidą distiliuotame vandenyje. Paruoštas PEG tirpalas lygiomis dalimis buvo sumaišomas su filtruotu supernatantu ir mėgintuvėlis kelis kartus pavartomas, kol gaunamas homogeniškas tirpalas ir šis buvo inkubuojamas per naktį 2°C-8°C temperatūroje. Sekančią dieną, mėginys buvo centrifuguojamas 3000 xg greičiu 1 valandą 2°C-8°C temperatūroje [53]. Gautas supernatantas buvo atsargiai pašalintas, o nusėdusios egzozomos resuspenduotos 50 μl FDB. Siekiant atskirti egzozomų sankaupas egzozomų suspensija prieš kiekvieną eksperimentą papildomai buvo resuspenduojama 10 min. su insulininiu švirkštu. Toks egzozomų mėginys buvo naudojamas tolimesniems tyrimams arba saugomas -20°C temperatūroje.

2.6. Mikroglijos egzozomų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Egzozomų koncentracija buvo nustatoma pagal bendrą egzozomų baltymų koncentraciją atliekant kolorimetrinį Bradfordo testą. Šis metodas yra pagrįstas Kumasi brilantinio mėlio G-250 gebėjimu selektyviai prisijungti prie bazinių ir aromatinių amino rūgščių baltymo molekulėje ir pH pokytis, iš rūgštinio į bazinį, nulemia spalvos pokytį iš rudos į mėlyną, kurios intensyvumas yra matuojamas spektrofotometru. Siekiant suardyti egzozomų membraną ir išlaisvinti vidinius baltymus, 18 μl egzozomų mėginio buvo sumaišoma su 2 μl 0.1% tritono tirpalu ir inkubuojama 30 min. 2 – 8°C temperatūroje. Po inkubacijos, 10 μl šio mišinio buvo įpilama į 96-šulinėlių lėkštelę kartu su 190 μl Bradfordo reagento ir atsargiai sumaišoma automatine pipete vengiant oro burbuliukų susidarymo bei tiesioginio šviesos poveikio, kurie pakenktų absorbcijos nustatymui. Kaip blankas buvo naudojamas analogiškai paruoštas mėginys, tačiau vietoj egzozomų naudotas FDB. Po 5 min. inkubacijos kambario temperatūroje, šviesos sugertis buvo matuojama plokštelių skaitytuvu prie 595 nm bangos ilgio.

Baltymų kiekio egzozomų mėginyje apskaičiavimui buvo sudaryta Bradfordo metodo standartinė kreivė, pavaizduota 6 paveiksle. Buvo paruošti žinomų koncentracijų jaučio serumo albumino tirpalai: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 mg/ml. Programa MS Excel buvo išvesta linijinė regresija ir pagal gautą formulę, buvo apskaičiuotas bendra baltymo koncentracija egzozomų mėginiuose: $x = \frac{y-0.0053}{0.5219}$; kur x – bendras baltymo kiekis (mg/ml), y – tiriamojo mėginio šviesos sugertis, esant 595 nm bangos ilgiui.



6 pav. Kalibracinė Bradfordo metodo kreivė baltymo kiekio nustatymui analizuojamame mėginyje.

2.7. Mikroglijos egzosomų dydžio nustatymas atliekant dinaminės šviesos sklaidos analizę

Išskirtų mikroglijos egzosomų dydžio nustatymui buvo naudojamas dinaminės šviesos sklaidos metodas ir nanodalelių analizatorius Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Šiame metode, monochromatinė lazerio šviesa yra nukreipiama į kiuvetę, kurioje yra patalpinta egzosomų suspensija. Dalelės išsklaido šviesą, o jų Brauno judesiai sukelia didelius signalo intensyvumo svyravimus, kuriuos galima aptikti įvairiais kampais. Šių svyravimų analizė naudojant automatinės koreliacijos funkciją leidžia gauti difuzijos koeficientą, o dalelių hidrodinaminį skersmenį galima apskaičiuoti naudojant Stokso-Einšteino lygtį. Kadangi egzistuoja tiesioginis ryšys tarp dalelių dydžio ir Brauno judesių greičio arba laipsnio, galima tiksliai nustatyti dalelių dydį, jei yra žinomas tirpalo klampumas, dalelių ir tirpalo refrakcijos koeficientai bei temperatūra [54].

Dalelių dydžio matavimui buvo naudojamos vienkartinės kiuvetės, kuriuose buvo patalpinta apie 0.5 ml egzosomų, resuspenduotų FDB, mėginio. Refrakcijos indeksas egzosomoms buvo 1.38, o FDB 1.33 bei šio buferio klampumas 0.88 cP. Prietaisas atliko 5 atskirus matavimus ir rezultatai buvo apskaičiuoti su Zetasizer programa.

2.8. Egzosomų stebėjimas transmisiniu elektronų mikroskopu

Prieš atliekant transmisinės mikroskopijos (TEM) analizę, buvo atliekamas mėginio paruošimas. Egzosomų mėginys 5 minutes buvo stumdomas insulininio švirkšto adatoje, siekiant atskirti agregavusias egzosomas. Šis mėginys buvo sumaišomas su 4% paraformaldehido tirpalu tūrio/tūrio santykiu 1:1. Šiuo tirpalu buvo padengiami anglimi dengti Formvar metaliniai tinkleliai (Agar Scientific) ir 20 minučių inkubuojama. Po inkubacijos 5 minutes praplaunama su FDB ir tada

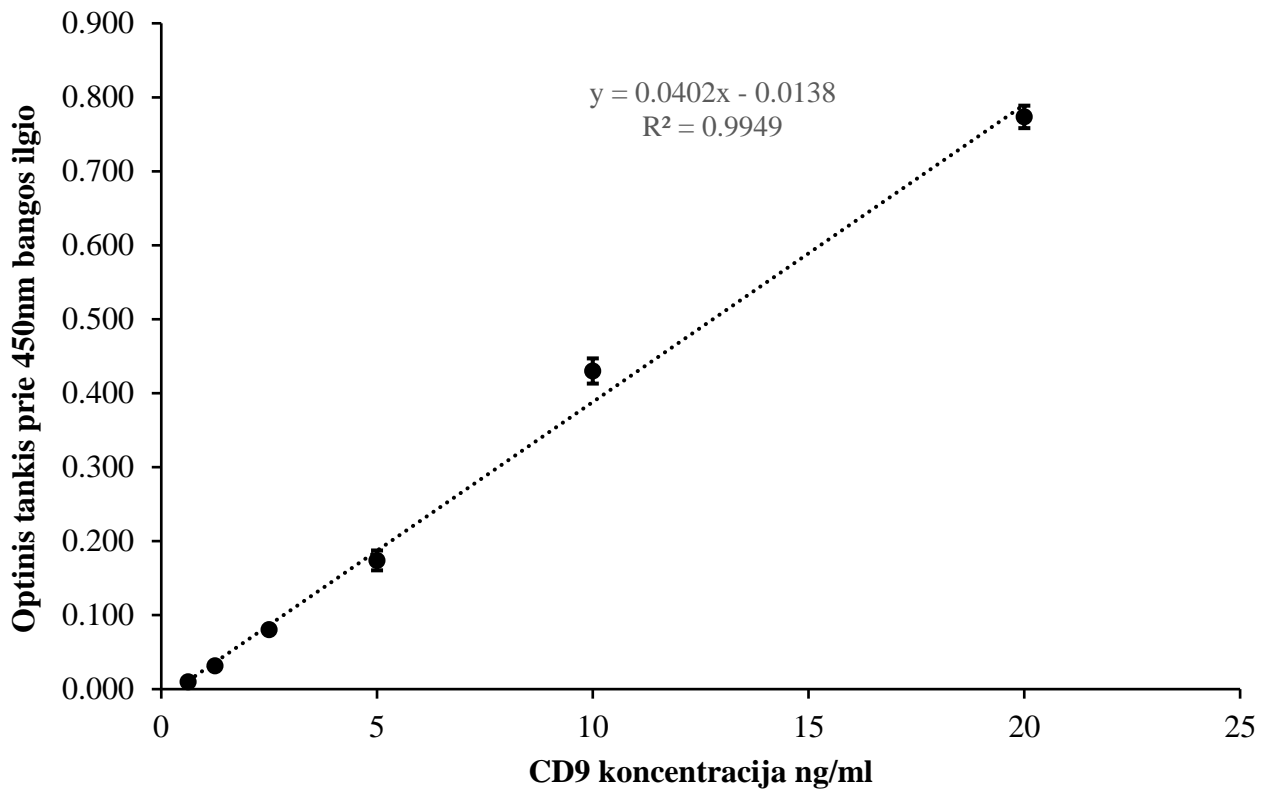
tinkleliai 5 minutes fiksuojami 1.7% glutaraldehido tirpale, 2 kartus po 2 minutes praplaunami dejonizuotame MilliQ vandenyje ir 5 minutes dažomi 2% uranilo acetatu tamsoje. Paskui tinkleliai 10 minučių veikiami tirpalu (šviežiai paruošta 2.25% metilceliuliozė ir 2% uranilo acetatas tūrio/tūrio santykis 4:1). Šis inkubavimas buvo atliktas ant šaldančio stalelio (+1°C). Tinkleliai atsargiai nusausinami ir išdžiovinami laikant juos ant filtrinio popieriaus 10 – 15 minučių. Paruošti preparatai buvo mikroskopuojami transmisiniu elektroniniu mikroskopu Tecnai BIOTwin (FEI, Nyderlandai, Endhovenas) naudojant 80 kV įtampą. TEM pavyzdžių ruošimo ir vaizdinimo darbus atliko jaunesnioji mokslo darbuotoja Aistė Masaitytė iš LSMU MA Anatomijos instituto.

2.9. Egzosomų charakterizavimas pagal CD9 žymenį ELISA metodu

ELISA yra imunofermentinis, kiekybinis metodas skirtas nustatyti buvimą bei pamatuoti norimo antigeno koncentraciją mėginyje. Jis yra pagrįstas antigeno-antikūno sąveika. CD9 yra tetraspaninas, randamas egzomosų membranoje ir naudojamas kaip egzomosų žymuo. Šiame darbe naudota sumuštinio tipo ELISA, kurioje antikūnas prieš CD9 yra imobilizuotas 96-šulinėlių lėkštelės dugne ir įpylus mėginio, jeigu jame CD9 antigenas, įvyks specifinė tarpusavio sąveika. Šiai sąveikai aptikti yra naudojamas antrinis antikūnas, konjuguotas su biotino molekule, o ši jungiasi prie avidino molekulės sujungtos su krienų peroksidazės fermentu. Biotino ir avidino sąveika yra skirta amplifikuoti signalą. Įpylus tetrametilbenzidino reagento, kuris yra krienų peroksidazės fermento substratas, stebimas spalvos pokytis iš bespalvės į mėlyną. Reakcija tarp fermento ir substrato sustabdoma įpylus sieros rūgšties tirpalo ir pastebimas antras spalvos pokytis iš mėlynos į geltoną, kuris yra matuojamas spektrofotometru.

ELISA buvo atlikta naudojant validuotą CD9 ELISA rinkinį ir vykdant gamintojo protokole nurodytas instrukcijas. Buvo naudojama 96-šulinėlių lėkštelė, padengta CD9 antikūnu. Į mėginiui skirtus šulinėlius buvo įpilta 50 μl mėginio ir 100 μl krienų peroksidazės konjugato, o kontroliniai šulinėliai buvo palikti tušti. Lėkštelė buvo uždengiama su membrana ir inkubuojama 60 minučių 37°C temperatūroje. Po inkubacijos, visi šulinėliai buvo praplaunami 4 kartus su 1x plovimo buferiu. Tada, į kiekvieną šulinėlį buvo įpilta po 50 μl chromogeno reagento A ir B, atsargiai sumaišyta ir lėkštelė buvo inkubuota 15 minučių 37° temperatūroje, apsaugant nuo šviesos. Po inkubacijos, į kiekvieną šulinėlį buvo įpilta po 50 μl stop reagento ir praėjus 5 minutėms optinis tankis buvo matuojamas daugiafunkciniu lėkštelių skaitytuvu, esant 450 nm bangos ilgiui.

Kalibracinė kreivė, pateikta 7 paveiksle, buvo sudaryta naudojant žinomos CD9 žymens koncentracijos tirpalus: 0.625, 1.25, 2.5, 10 ir 20 ng/ml. Buvo išvesta linijinė regresija ir gauta formulė, kuri buvo naudojama apskaičiuoti CD9 kiekį egzomosų mėginyje: $x = \frac{y + 0.0138}{0.0402}$; kur x – CD9 žymens koncentracija (ng/ml) mėginyje, y – mėginio šviesos sugertis, esant 450 nm bangos ilgiui.



7 pav. CD9 žymens kalibracinė kreivė naudota nustatyti CD9 kiekį egzosomų mėginyje ELISA metodu

2.10. Egzosomų patekimo į glioblastomos ląsteles stebėjimas naudojant fluorescencinę mikroskopiją

Egzosomų patekimui į ląsteles stebėti egzosomos buvo dažomos su fluorescenciniu dažu konjuguotu su Alexa Fluor 555 (BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Control). Šis dažas yra sudarytas iš trumpo nekoduojančios siRNR (angl. *small interfering RNA*) fragmento, kuris prisijungęs prie komplementarių RNR fragmentų, fluorescuoja raudona spalva. Parą prieš eksperimentą, konfokalinė lėkštutė buvo užsėta su 25 000 ląstelių. Eksperimento dieną, 1 μ l dažo ir 3 μ l lipofektamino (RNAiMAX) buvo ištirpinti 100 μ l Opti-MEM terpėje ir inkubuoti 5 min. 37°C temperatūroje, saugant nuo šviesos. Lipofektaminas yra transfekcijos reagentas, užtikrinantis, kad dažas pateks pro egzosomų membraną. Po inkubacijos, paruoštas dažas buvo sumaišomas su egzosomomis ir toliau inkubuojama apie 1 valandą 37°C temperatūroje.

Prieš paveikiant glioblastomos ląsteles su dažytais egzosomomis, ląstelėms buvo pakeičiama terpė į HBSS (angl. *Hank's Balanced Salt Solution*), papildyta 1% glutaminu (GlutaMAX). Egzosomos buvo uždėtos ant ląstelių ir inkubuojama 37°C inkubatoriuje. Egzosomų patekimas buvo stebimas po 2 ir po 24 valandų naudojant fluorescencinę mikroskopą Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Vokietija) ir pasirinkus TXRED filtrų rinkinį. Nuotraukos buvo apdorotos naudojant *ImageJ* programą.

2.11. Doksorubicino hidroklorido įterpimas į egzosomas elektroporacijos metodu

Doksorubicino hidrokloridas (DOX) į egzosomas buvo bandomas įterpti naudojant elektroporaciją. 1 μ g egzosomų buvo sumaišoma su 100 μ g/ml DOX ir elektroporacijos buferiu (500 mM sacharozės

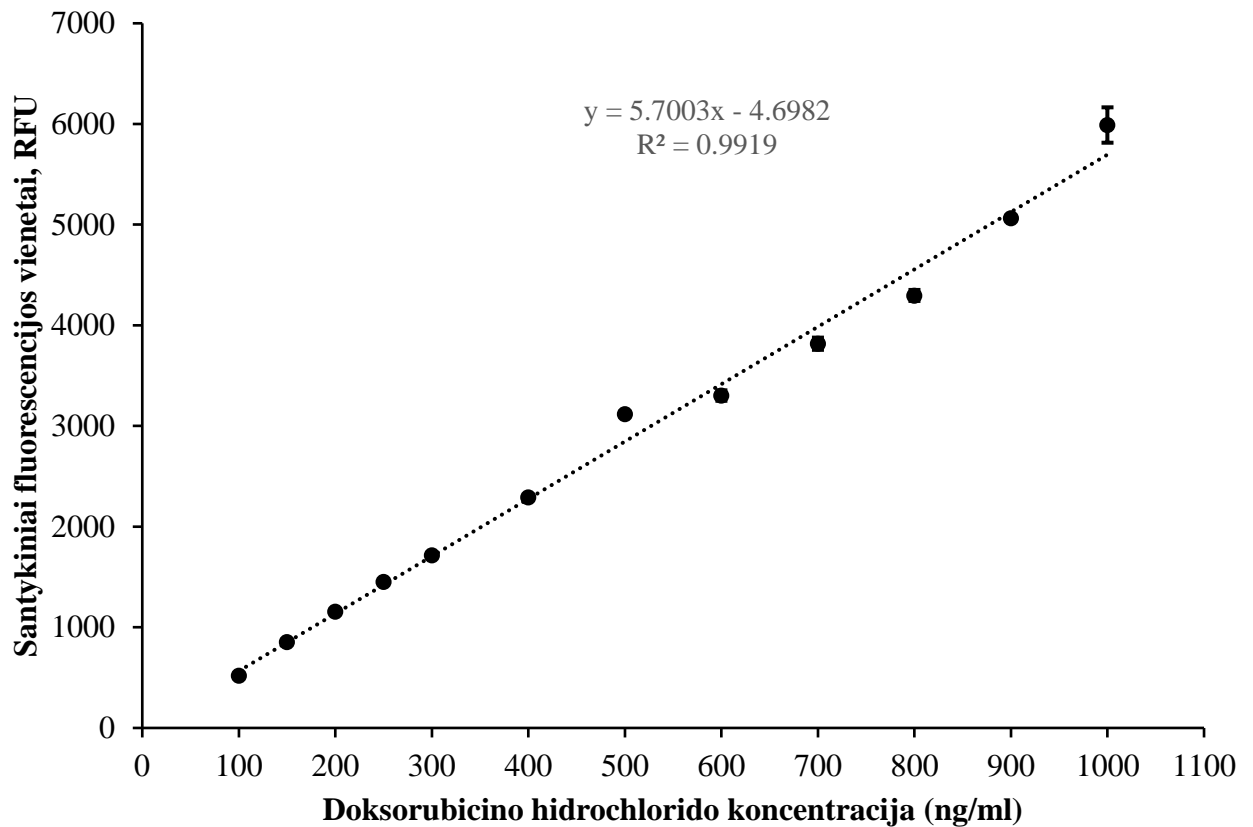
ištirpinta 10% glicerolio tirpale [55]). Tuomet, viskas buvo patalpinta į elektroporacijos kiuvetę, turinčią 0.1 cm tarpą tarp elektrodų ir 80 µl tūrį. Elektroporacija buvo atliekama su Bio-Rad MicroPulser® aparatu, naudojant 600 V įtampos vienkartinį pulsą, trunkantį 0.80 ms. Po elektroporacijos, mėginys buvo surenkamas iš kiuvetės, patalpinamas į Eppendorf mėgintuvėlį ir inkubuojamas 30 minučių 37°C temperatūroje. Šis žingsnis yra labai svarbus, kadangi elektroporacijos metu egzosomų lipidinėje membranoje buvo sukuriamos poros, o inkubacija leido poroms užsiverti ir membranai atsistatyti.

2.12. Į egzomas įterpto doksorubicino hidroklorido koncentracijos nustatymas

Po elektroporacijos, nepatekęs DOX buvo pašalintas išgryninant egzosomų mėginį. Pirmiausia, pradiniam laisvo vaisto pašalinimui buvo naudojami Amicon Ultra-0.5 ml centrifuginiai filtrai. Šie filtrai turi kolonėlę, padengtą celiuliozės membrana, kurios porų dydis yra 10 000 Da, todėl visos dalelės esančios mėginyje mažesnės nei porų dydis yra išplaunamos, o didesnės paliekamos ir sukonzentruojamos kolonėlės dugne. Šie filtrai buvo naudojami pagal gamintojo pateiktą protokolą. Po elektroporacijos, 0.5 ml egzosomų mėginio buvo patalpinta į kolonėlę, kuri buvo įstatyta į mėgintuvėlį ir centrifuguota 14 000 xg greičiu 30 minučių (centrifuga Heraeus Megafuge 16R, Vokietija). Toliau, centrifugacija buvo pakartota 3 kartus ir po kiekvieno centrifugavimo skystis susirinkęs mėgintuvėlyje buvo pašalinamas, o į kolonėlę įpilama apie 0.5 ml FDB. Gautas sukonzentruotas egzosomų mėginys, toliau buvo valomas naudojant Exosome Spin Columns (MW 3000). Šios kolonėlės iš egzosomų mėginio gali pašalinti mažos molekulinės masės (≤ 3000), tokias kaip dažus, oligonukleotidus bei į egzomas nepatekusias vaisto molekules. Viskas buvo atliekama pagal gamintojo nurodytą protokolą. Pirmiausia, kolonėlėje esančio gelio milteliai buvo drėkinami įpylus 650 µl FDB, sumaišius vortex maišykle ir leidus pastovėti kambario temperatūroje 15 minučių. Tada, kolonėlė buvo įstatoma į 2 ml surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguojama 800 xg greičiu 2 minutes tam, kad pašalinti skystį iš kolonėlės. Po centrifugacijos, kolonėlė buvo perkelta į 1.5 ml Eppendorf tipo mėgintuvėlį ir nedelsiant egzosomų mėginys buvo įpiltas į kolonėlės centrą, stengiantis automatinės pipetės antgaliu nepaliesti gelio. Tada, siekiant surinkti išgrynintą egzosomų mėginį, kolonėlė vėl buvo centrifuguojama 800 xg greičiu 2 minutes.

Siekiant nustatyti į egzomas patekusio DOX koncentraciją, reikalinga suardyti egzomas, kad vaistas iš jų išsilaisvintų. Tokiam tikslui, 5 µl išgryninto egzosomų mėginio buvo sumaišyta su 0.5 µl 0.1% tritono tirpalu ir inkubuota 30 minučių 2-8 °C temperatūroje, saugant nuo šviesos. Tada, mėginys buvo atskiestas iki 100 µl su FDB ir mėginiai išpilstyti į juodą, fluorescencijai skirtą, 96-šulinėlių lėkštelę. Fluorescencija buvo matuojama su daugiafunkciniu plokštelių skaitytuvu, sužadinimui naudojant 485 nm bangos ilgį ir emisijai 595 nm bangos ilgį.

Į egzomas įsiterpusio doksorubicino hidroklorido koncentracijai nustatyti buvo paruošta kalibracinė kreivė naudojant žinomos koncentracijos tirpalus: 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ir 1000 ng/ml (8 pav.). Buvo išvesta linijinė regresija ir gauta formulė buvo naudojama apskaičiuoti po elektroporacijos pasikrovusį doksorubicino kiekį egzosomų mėginyje: $x = \frac{y+4.6982}{5.7003}$; kur x – pasikrovusio doksorubicino koncentracija (ng/ml), y – mėginio fluorescencija, sužadinimui naudojant 485 nm, o emisijai 595 nm bangos ilgį.



8 pav. Kalibracinė kreivė, skirta nustatyti doksorubicino hidrochlorido koncentraciją egzosomų mėginyje po elektroporacijos.

DOX pakrovimo efektyvumas buvo apskaičiuotas naudojantis formule: $x = \frac{m_{DOX}}{m_{idėta}} \times 100\%$; kur x – pakrovimo efektyvumas išreikštas procentais; m_{DOX} – pasikrovusio DOX kiekis; $m_{idėta}$ – pradinis DOX kiekis, kuris buvo įdėtas prieš elektroporaciją.

2.13. Žmogaus glioblastomos ląstelių kultivavimas ir veikimas mikroglijos egzosomų ir doksorubicino hidrochlorido preparatais

Žmogaus glioblastomos ląstelių linija (HROG-36) buvo įsigyta iš CLS, Vokietija. Ląstelės buvo kultivuojamos DMEM/F12 augimo terpėje, papildytoje 10% FBS ir 1% penicilino-streptomicino tirpalu (10000 IU/ml – 10000 µg/ml). Ląstelės buvo auginamos 75 cm² ląstelių auginimo induose ir persėjamos esant 80-90% konfluentiškumui. Persėjimo procedūra buvo analogiška, kaip ir mikroglijos ląstelėms (aprašyta 2.2. skyrelyje), tačiau buvo naudojamas 0.05% tripsino-EDTA tirpalas bei ląstelių suspensija centrifuguojama 200 xg greičiu 5 min. Pasirinktas ląstelių skaičius buvo užsėjamas į ląstelių auginimo indą ir auginama inkubatoriuje 37°C temperatūroje, 5% CO₂, optimalioje drėgmėje.

Likus parai iki eksperimento pradžios, HROG-36 ląstelės buvo suskaičiuojamos, naudojant anksčiau aprašytą metodiką (žr. 2.3.) ir sėjamos į 96-šulinėlių lėkštelę, vienam šulinėliui naudojant 3000 ląstelių ir 200 µl mitybinės terpės. Lėkštelė buvo inkubuojama 37°C temperatūroje, 5% CO₂, drėgnoje aplinkoje vieną parą, leidžiant ląstelėms prikibti. Kitą dieną, sena mitybinė terpė buvo pašalinta ir pakeista į naują, kuri buvo papildyta norimais ląstelės veikti preparatais: natūraliomis mikroglijos egzosomomis, laisvu DOX ir DOX pakrautomis egzosomomis. Visų egzosomų preparatų bendro

baltymo koncentracija terpėje buvo 3 µg/ml, o DOX koncentracija terpėje buvo 84 ng/ml. Kontroliniuose šulinėliuose ląstelės buvo neveiktos. Ląstelės šiais preparatais buvo veikiamos 72 valandas, jas inkubuojant 37°C temperatūroje, palaikant 5% CO₂ ir optimalią drėgmę.

2.14. Žmogaus glioblastomos ląstelių, paveiktų mikroglijos egzosomų ir doksorubicino hidroklorido preparatais, gyvybingumo vertinimas

Glioblastomos ląstelių gyvybingumo vertinimas buvo atliktas taikant du skirtingus metodus – spektrofotometriją bei fluorescencinę mikroskopiją.

Spektrofotometrijos analizė buvo atlikta naudojant PrestoBlue reagentą. Pagrindinis šio reagento ingredientas yra oksidacijos-redukcijos indikatorius resazurinas. Jis yra netoksiškas ląstelėms ir gali būti naudojamas sekti ląstelių gyvybingumą realiu laiku. Resazurinas oksiduotoje formoje yra mėlynos spalvos, tačiau patekęs į ląsteles, jis yra metabolizuojamas į redukuotą formą, rezorufiną, kuris yra ryškiai ružavos spalvos. Rezorufino spalvos intensyvumas yra proporcingas gyvybingų ląstelių skaičiui ir gali būti nustatomas matuojant jo šviesos sugertį. Šiame darbe buvo atlikti absorbcijos matavimai praėjus 48 ir 72 valandoms po HROG-36 ląstelių paveikimo su egzosomų preparatais. Buvo paruoštas PrestoBlue tirpalas, skiedžiant jį 1:10 su HBSS be fenolio, papildytu 1% glutaminu. Po 48 valandų, terpė nuo ląstelių buvo nusiurbta ir išsaugota, o vietoj jos į šulinėlius įpilta po 100 µl paruošto PrestoBlue tirpalo. Ląstelės buvo inkubuotos 2 valandas 37°C temperatūroje, 5% CO₂, drėgnoje aplinkoje, saugant nuo šviesos. Spalvos intensyvumas buvo matuojamas plokštelių skaitytuvu prie 570 nm bangos ilgio ir iš gautų šviesos sugerties reikšmių buvo atimtos reikšmės gautos prie 600 nm bangos ilgio. Po to, dažas buvo pašalintas, sena terpė sugrąžinta ir ląstelės buvo auginamos toliau. Atliekant matavimus po 72 valandų inkubacijos, sena terpė buvo visiškai pašalinta. Gauti rezultatai pateikiami kaip šviesos sugerties intensyvumo kontroliniuose pavyzdžiuose procentai.

Taip pat, po 72 valandų inkubacijos gyvybingumas papildomai buvo vertinamas fluorescencinės mikroskopijos būdu. Buvo naudojami du fluorescenciniai dažai, Hoechst 33342 ir propidžio jodidas, kurie sąveikauja su DNR ir nudažo ląstelės branduolius. Propidžio jodidas patenka į branduolio vidų ir fluorescuoja raudonai susijungęs su chromatinu, kai ląstelė nėra gyvybinga ir jos branduolio membrana yra praradusi vientisumą. Hoechst 33342 nėra selektyvus ir gali patekti į visų ląstelių branduolius, nudažydamas juos mėlyna spalva. Dažų tirpalas buvo paruošiamas su FDB, kuriame tiek Hoescht 33342, tiek propidžio jodido galutinė koncentracija buvo 2.5 µg/ml. Ląstelių mitybinė terpė buvo pilnai pašalinama ir įpilama 100 µl dažų tirpalo. Ląstelės buvo inkubuojamos 10-15 minučių kambario temperatūroje ir vaizdinamos fluorescenciniu mikroskopu OLYMPUS IX2-ILL100 (Japonija), naudojant DAPI filtrų rinkinį. Buvo fotografuojami atsitiktinai pasirinkti laukeliai kiekviename šulinėlyje. Gyvų ląstelių branduoliai buvo nusidažę mėlyna spalva, o žuvusių ląstelių – raudona spalva. Gyvybingos ląstelės buvo apskaičiuotos kaip procentas nuo bendro ląstelių skaičiaus laukelyje. Nuotraukų analizė buvo atlikta su *ImageJ* programa.

2.15. Statistinė duomenų analizė

Grafikai buvo nubraižyti naudojant *MS Excel* programą. Kiekvienas eksperimentas buvo atliktas mažiausiai tris kartus ir šiame darbe yra pateikti rezultatų vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. Eksperimentinių duomenų analizė buvo atlikta naudojant *SigmaPlot 14.0* programą. Statistinis rezultatų patikimumas tarp dviejų grupių buvo nustatytas taikant Studento t-testą, o daugiau nei dviems grupėms palyginti buvo naudota vienkryptė dispersinė ANOVA analizė, taikant Bonferonio statistinį kriterijų. Rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0.05$.

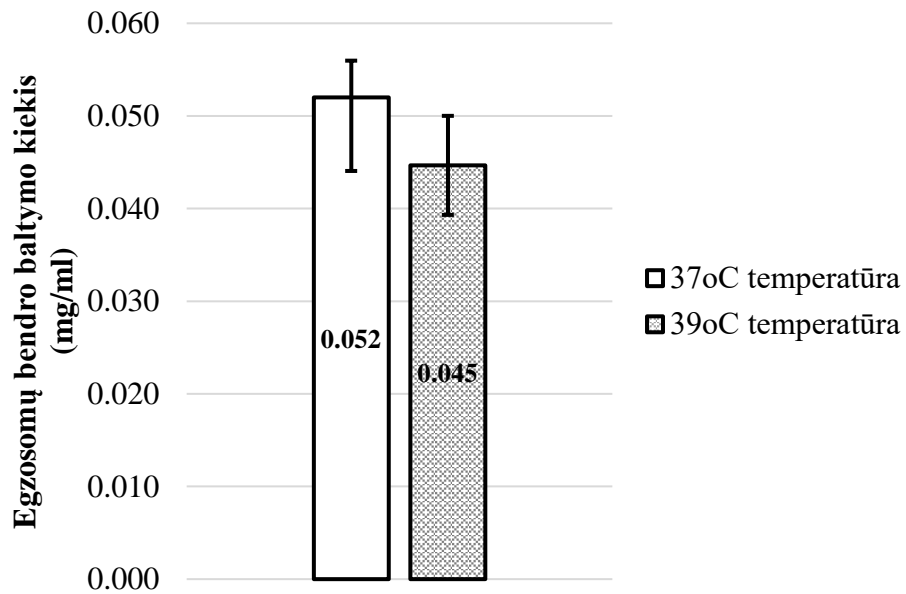
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Mikroglijos ląstelių stimuliacija egzosomų kiekiui padidinti

Viena iš pagrindinių limitacijų tyrimuose su egzosomomis yra jų mažas išskiriamas kiekis. Egzosomų biogeneze yra glaudžiai susijusi su ląstelės fiziologine būseną. Mokslinėje literatūroje minimos įvairios ląstelių auginimo sąlygos, faktoriai, kuriais galima stimuliuoti ląsteles, siekiant, kad jos išskirtų daugiau egzosomų. Nustatyta, kad ląstelės išskiria daugiau egzosomų sukeldamos oksidacinį stresą, auginant hipoksijoje, naudojant beseruminę augimo terpę, veikiant ląsteles agentais, tokiais kaip adenosino trifosfatas, padidinančiais viduląstelinio kalcio koncentraciją [56, 57]. Šie veiksniai įvairius ląstelių tipus veikia skirtingai, todėl kiekvienai ląstelei reikia atrasti optimalias egzosomų išskyrimo sąlygas.

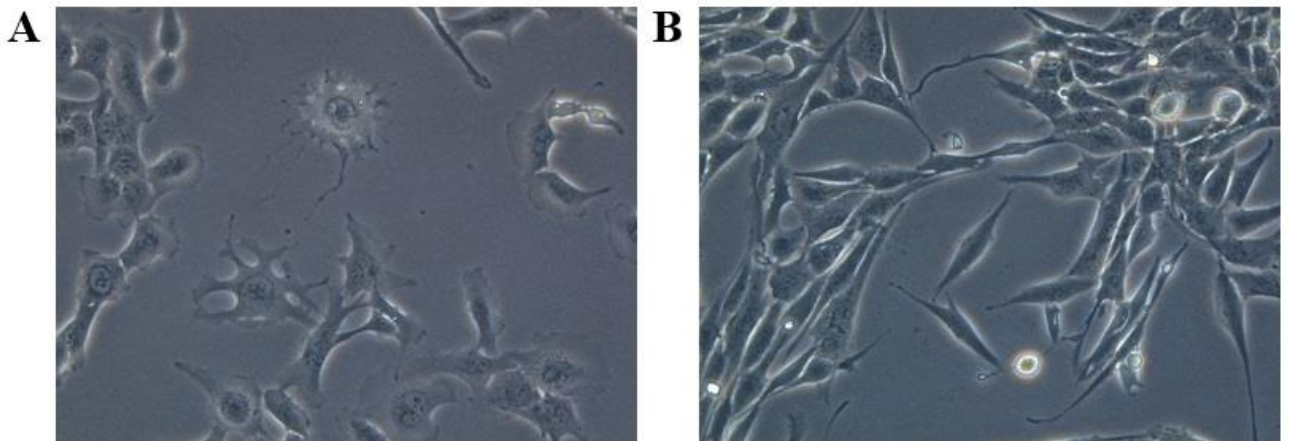
Šiame darbe egzosomų išskyrimui mikroglijos ląstelės buvo auginamos beseruminėje terpėje. Taip pat, papildomai stimuliacijai buvo stebimas temperatūros poveikis ląstelių gebėjimui išskirti egzosomas. Kadangi mikroglijos ląstelės priklauso imuninių ląstelių tipui, buvo manoma, kad pakėlus ląstelių inkubacijos temperatūrą bus imituojama uždegimo sąlyga ir mikroglijos ląstelės aktyvuosis bei išskirs daugiau egzosomų. Buvo nustatyta, kad B ir T limfocitams sukėlus trumpalaikį šiluminį šoką, padidėjo ląstelių išskiriamų egzosomų kiekis [58, 59]. Mikroglijos ląstelėms buvo pasirinkta sukelti šiluminį stresą ir jas kultivuoti 48 valandas 39°C temperatūroje.

75 cm² ląstelių auginimo indai buvo užsėti po 800 000 ląstelių. Po paros mitybinė terpė buvo pakeista į beseruminę terpę ir vienodas kiekis flakonų buvo inkubuojamas 37°C ir 39°C temperatūrose 48 valandas. Po inkubacijos, ląstelių auginimo terpė buvo nurinkta egzosomų išskyrimui. Egzosomų išskyrimas skirtingomis ląstelių auginimo sąlygomis buvo lyginamas pagal bendrą egzosomų baltymo kiekį (mg/ml) nustatytą Bradfordo metodu. Kaip pateikta 9 paveiksle, mikroglijos ląstelės išskyrė daugiau egzosomų (0.052 mg/ml bendro baltymo koncentracija), augdamos 37°C temperatūroje nei 39°C temperatūroje (0.045 mg/ml bendro baltymo koncentracija). Tačiau statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp šių dviejų grupių negauta ($p = 0.394$, reikšminga laikoma $p < 0.05$). Žinoma, kad egzosomų kiekis priklauso ir nuo ląstelių skaičiaus [56]. Nors ir buvo užsėjamas vienodas ląstelių skaičius, kai kuriomis sąlygomis ląstelės galėjo augti sparčiau ir lemti matomą skirtingą išskiriamų egzosomų kiekį.



9 pav. Išskiriamų egzosomų bendras baltymo kiekis auginant ląsteles 37°C ir 39°C temperatūrose. Grafike pateikti trijų skirtingų matavimų vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. N = 3.

Buvo pastebėti mikroglijos ląstelių kultūros morfologiniai pokyčiai pradėjus jas kultivuoti beseruminėje terpėje. Pateiktame 10 paveiksle, A nuotraukoje vaizduojamos ląstelės augintos seruminėje terpėje. Dauguma jų turi gerai matomą branduolį ir daug atsikišusių ataugėlių. Galima teigti, kad ląstelės yra ramybės būsenoje. Priešingai, B nuotraukoje vaizduojamos mikroglijos ląstelės, augintos beseruminėje terpėje, įgija pseudopodinę formą, jų ląstelės kūnas pailgėja, sumažėja ataugėlių. Ši forma yra siejama su mikroglijos aktyvacija [28].

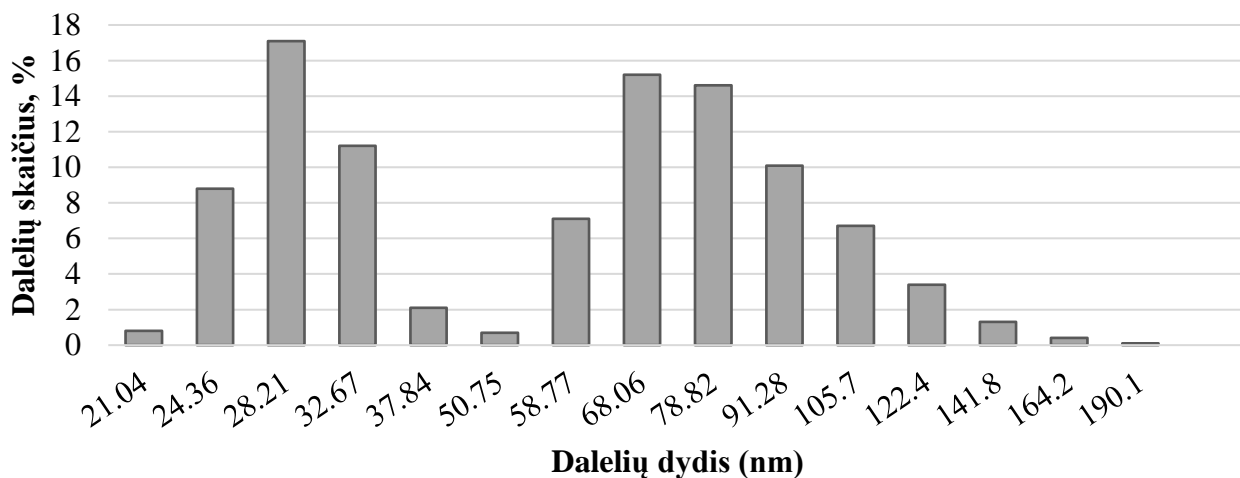


10 pav. Seruminėje ir beseruminėje terpėje kultivuojamų mikroglijos ląstelių morfologija. A nuotraukoje matomos mikroglijos ląstelės augintos seruminėje terpėje, B – mikroglijos ląstelės beseruminėje terpėje. Nuotraukos darytos su šviesiniu mikroskopu, esant 40x padidinimui. N = 3.

3.2. Mikroglijos egzosomų identifikavimas pagal dydį ir morfologiją

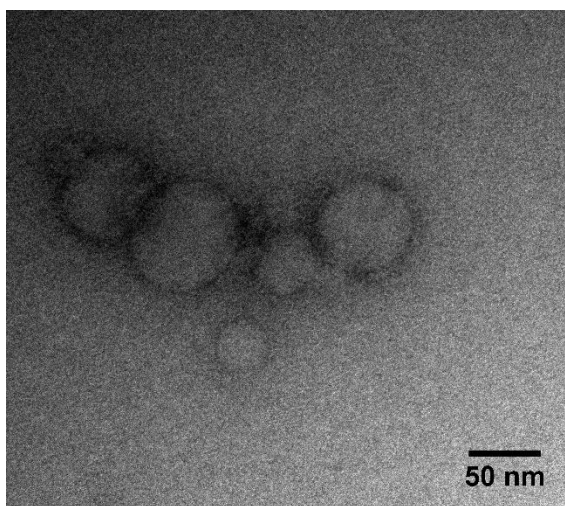
Atlikus mikroglijos egzosomų dydžio analizę su Zetasizer aparatu, nustatyta, kad dalelių dydis yra 60-90 nm ribose (11 pav.). Šios dalelės patenka į mokslinėje literatūroje nurodytas egzosomų dydžio ribas (40-160 nm) [10]. Todėl galima teigti, kad išskirtos dalelės yra egzosomos. Kaip matoma 11

paveiksle pateiktuose rezultatuose, mėginyje taip pat buvo mažesnių dalelių 25 – 30 nm ribose. Šios dalelės nepatenka į literatūroje nurodytą egzosomų dydžio intervalą ir greičiausiai yra pašalinės dalelės, kurios nebuvo pašalintos filtruojant ląstelių terpę su 220 nm porų dydžio filtru.



11 pav. Mikroglijos ląstelių išskiriamų egzosomų dydžio procentinis pasiskirstymas gautas naudojant nanodalelių analizatorių Zetasizer.

Egzosomų morfologijai patikrinti buvo atlikta transmisinė elektronų mikroskopija. Kaip matoma 12 paveiksle, mikroglijos egzosomos turi joms būdingą struktūrą: yra apvalios, ribojamos lipidinės membranos [6]. Taip pat, TEM būdu nustatytas egzosomų dydis yra apie 50 nm ir tai patvirtina dinaminės šviesos sklaidos metodu nustatytą egzosomų dydį.

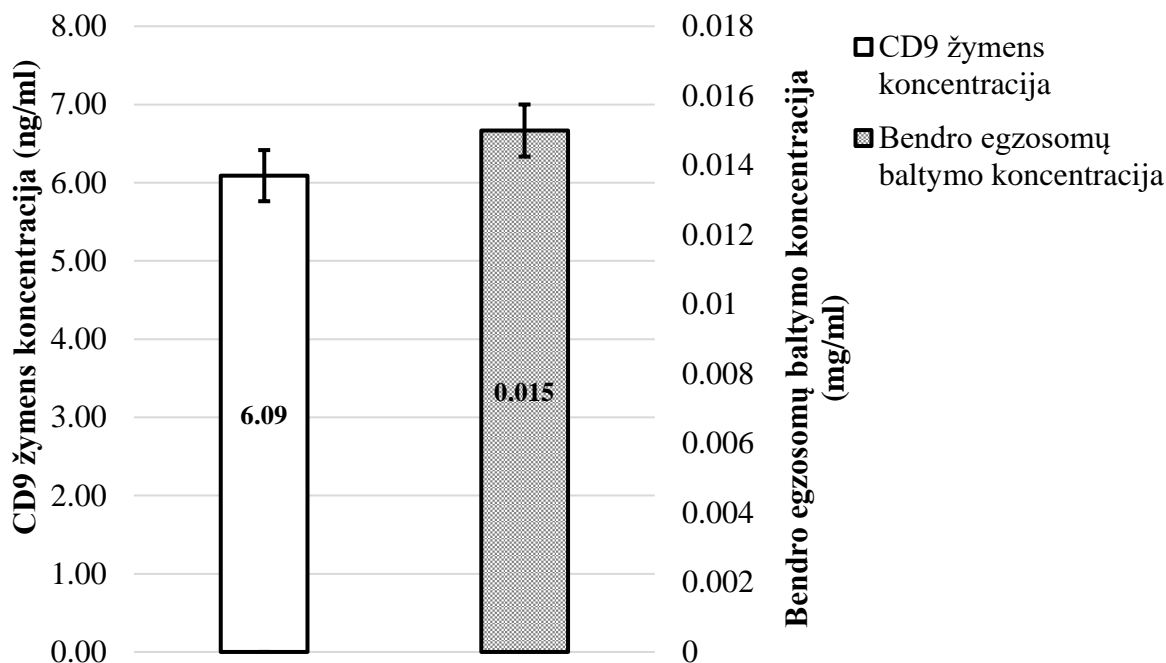


12 pav. Mikroglijos egzosomų morfologija nustatyta su TEM. Mėginio paruošimą ir vaizdinimą atliko jaunesnioji mokslo darbuotoja Aistė Masaitytė iš LSMU MA Anatomijos instituto.

3.3. Mikroglijos egzosomų identifikavimas pagal CD9 žymenį

Siekiant patikrinti, ar iš mikroglijos ląstelių išskirtos dalelės yra egzosomos, buvo atliktas kiekybinis, imunofermeninis ELISA tyrimas. Egzosomoms identifikuoti yra naudojami transmembraniniai

baltymai, tetraspaninai, iš kurių vienas pagrindinių yra CD9. Šio žymens koncentracija egzosomų mėginyje yra pateikta 13 paveiksle.

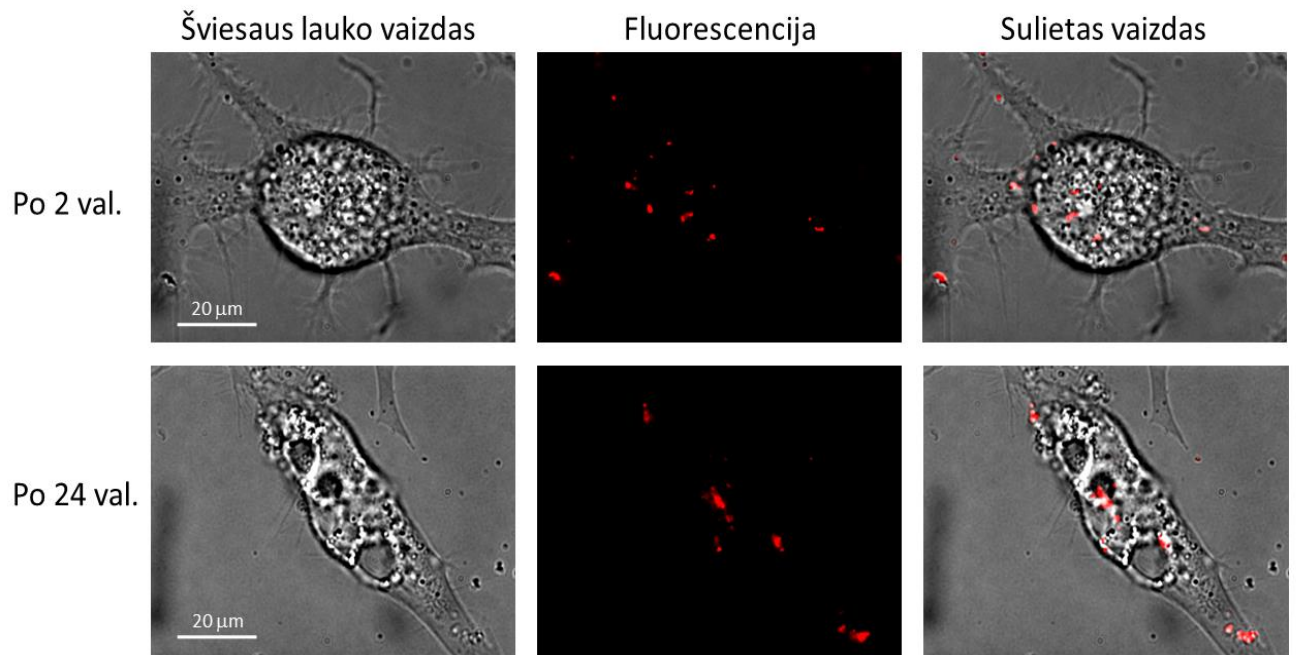


13 pav. CD9 žymens koncentracija (ng/ml) gauta atlikus ELISA, lyginant su bendru egzosomų baltymo kiekiu (mg/ml). Grafike pateikti trijų skirtingų matavimų vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. N = 3.

3.4. Mikroglijos egzosomų patekimas į glioblastomos ląsteles

Tam, kad galima būtų sekti ir vizualizuoti mikroglijos egzosomų patekimą į glioblastomos ląsteles, jos buvo pažymėtos su RNR susirišančiu dažu, konjuguotu su AlexaFluor 555 fluoroforu, kuris sužadintas 555 nm bangos ilgio lazeriu, išspinduliuoja raudonos spalvos šviesą 580 nm bangos ilgiu. Tai galima stebėti naudojant fluorescencinį mikroskopą, TXRED filtru rinkiniu. Ląstelės buvo fotografuojamos naudojant šviesinį mikroskopą.

Egzosomų patekimas buvo stebimas praėjus 2 ir 24 valandoms po egzosomų mėginio uždėjimo ant ląstelių. Kaip pavaizduota 14 paveiksle, jau po 2 valandų ląstelių inkubacijos su egzosomomis, jos gali būti matomos migruojančios į ląstelės vidų, tačiau dar susitelkusios palei ląstelės membraną. Po 24 valandų, egzosomos vis dar matomos ląstelės viduje ir yra susitelkusios šalia ląstelės branduolio. Verta atkreipti dėmesį į pačių ląstelių morfologiją. Po 2 valandų ląstelės atrodo sveikos, matoma daug ataugėlių, ląstelės branduolys apvalus ir didelis. Praėjus 24 valandoms, ląstelė atrodo susitraukusi, matoma mažai ataugėlių, primenanti apoptotinę ląstelę. Galima teigti, kad mikroglijos egzosomos neigiamai paveikia glioblastomos ląstelių gyvybingumą.



14 pav. Mikroglijos egzosomų patekimas į glioblastomos ląsteles. Nuotraukos esančios kairėje pusėje yra ląstelių šviesinės nuotraukos; viduryje – atitinkamai tame pačiame mikroskopiniame lauke darytos fluorescencinės egzosomų nuotraukos, o dešinėje pusėje pateikiamas sulietas vaizdas, kuriame matoma ląstelės morfologija ir raudonai švytinčios egzosomos. N=3. Mastelis yra 20 μm.

3.5. Doksorubicino hidroklorido pakrovimo į mikroglijos egzosomas elektroporacijos būdu efektyvumo nustatymas

Elektroporacijos metodas buvo pasirinktas DOX pakrovimui, kadangi yra vienas iš paprastesnių vaistų pakrovimo į egzosomas būdų. Šio proceso metu, mėginys buvo patalpinamas į specialią kiuvetę, kurioje buvo įtaisyti elektrodai ir tarpas tarp jų buvo 0.1 cm. Tuomet, trumpam buvo sukurtas pasirinkto stiprumo elektrinis laukas. Tokiu būdų egzosomų lipidinėje membranoje suformuotos laikinos poros, pro kurias DOX galėjo patekti į egzosomų vidų. Egzomų membranos atstatymui į pradinį būvį, jos buvo inkubuojamos 30 minučių 37°C temperatūroje. Šiame eksperimente buvo naudojamas vienkartinis 600 V pulsas, trunkantis 0.8 ms ir sukurtas elektrinio lauko stipris buvo 6 kV/cm.

Tokios elektroporacijos sąlygos buvo pasirinktos atsižvelgiant į mokslinę literatūrą. Joje nurodyta, jog egzosomų elektroporacijai dažniausiai yra naudojami elektros įtampos dydžiai, nuo 150 V iki 700 V [15]. Taip pat, buvo remtasi straipsniu, kuriame buvo naudojamas tokio pačio modelio elektroporatorius (MicroPulser, Bio-Rad). Straipsnio autoriai siekė įterpti aukso nanodaleles į bakterijų išskirtas egzosomas [55]. Naudotas elektroporatorius yra pritaikytas veikti tada, kai elektroporuojamo mėginio varža yra ne mažesnė negu 600 omų. Tokiu būdu yra apsaugoma nuo elektros išlydžio. Tuo tikslu, buvo paruoštas straipsnyje naudotas elektroporacijos buferis, kurio varža buvo tinkama efektyviai atlikti egzosomų elektroporaciją.

Po elektroporacijos, į egzomas nepatekęs DOX išvalytas dviem skirtingais filtrais. Pirmiausia, daugiausia į egzomas nepatekusio DOX buvo pašalinta naudojant Amicon ultracentrifuginius filtrus. Tačiau šie filtrai sukcentruoja daleles didesnes nei 10 000 Da, todėl laisvo doksorubicino likučių liko mėginyje. Pilnam neįsiterpusio DOX išvalymui buvo panaudoti Exosome spin columns, kurių veikimas pagrįstas gelio chromatografijos principu. Juose esantis gelis sulaiko mažesnes daleles, o didesnės gali išbėgti iš kolonėlės. Panašų laisvo doksorubicino pašalinimo metodą panaudojo Goh su grupe. Straipsnio autoriai bandė pakrauti doksorubiciną į mieloidinės leukemijos ląstelių nanopūsles naudojant kitus aktyvaus vaisto įterpimo būdus ir neįsiterpusio vaisto likučius šalino su ultracentrifuginiais baltymų koncentratoriais [61]. Po egzosomų mėginių išgryninimo, į egzomas patekusio DOX koncentracija buvo nustatyta pagal doksorubicino fluorescenciją. Naudojant šias elektroporacijos sąlygas į egzomas buvo pakrauta 342 ng/ml DOX ir pakrovimo efektyvumas buvo 0.34% (2 lentelė).

2 lentelė. DOX pakrovimo į egzomas efektyvumas. Pateikiami naudotų egzosomų bei pradinis DOX kiekis. Įterpo į egzomas DOX kiekio ir pakrovimo efektyvumo vidurkiai pateikti su standartiniu nuokrypiu (SN). Rezultatai gauti pakartojus elektroporacijos procesą du atskirus kartus.

Egzosomų kiekis, naudotas elektroporacijai (µg)	DOX kiekis naudotas pakrovimui (µg)	Įterpto DOX kiekis ± SN (µg)	Pakrovimo efektyvumas ± SN (%)
12	100	0.342 ± 0.08	0.34 ± 0.08

Gomari su grupe, naudodami panašias elektroporacijos sąlygas, į mezincheminių stromos ląstelių egzomas pakrovė didesnę DOX kiekį, kuris siekė iki 13 µg [45]. Tačiau straipsnyje nurodytas elektroporacijai naudotų egzosomų kiekis buvo didesnis (100 µg bendro egzosomų baltymo) negu šiame eksperimente. Taip pat, egzosomos buvo išgautos iš kitokio ląstelių tipo, kas taip pat gali lemti skirtingus rezultatus. Vaisto įterpimo į egzomas efektyvumas bei kiekis galbūt galėtų padidėti išbandžius kitokias elektroporacijos sąlygas. Siekiant pagerinti vaisto įterpimą, galima keisti įtampą, pulsų skaičių bei trukmę, kiuvetės dydį, tarpą tarp elektrodų, egzosomų ir vaisto koncentracijas. Nuo elektroporacijos sąlygų priklauso ir lipidinėje membranoje susidariusių porų dydis. Kontroliuojant šiuos parametrus galima padidinti porų dydį, tačiau reiktų atsižvelgti į tai, kad elektroporacijos metu egzosomų membrana yra deformuojama ir didesnės poros gali sukelti egzosomų plyšimą [55].

3.6. Mikroglijos egzosomų su įterptu doksorubicino hidrochloridu poveikis žmogaus glioblastomos ląstelių gyvybingumui

Siekiant įvertinti DOX užpildytų egzosomų efektyvumą sunaikinant glioblastomos ląsteles buvo atlikti gyvybingumo tyrimai. HROG-36 ląstelės buvo veikiamos mikroglijos egzosomomis su įterptu DOX, natūraliomis mikroglijos egzosomomis bei laisvu DOX ir ląstelių gyvybingumas buvo

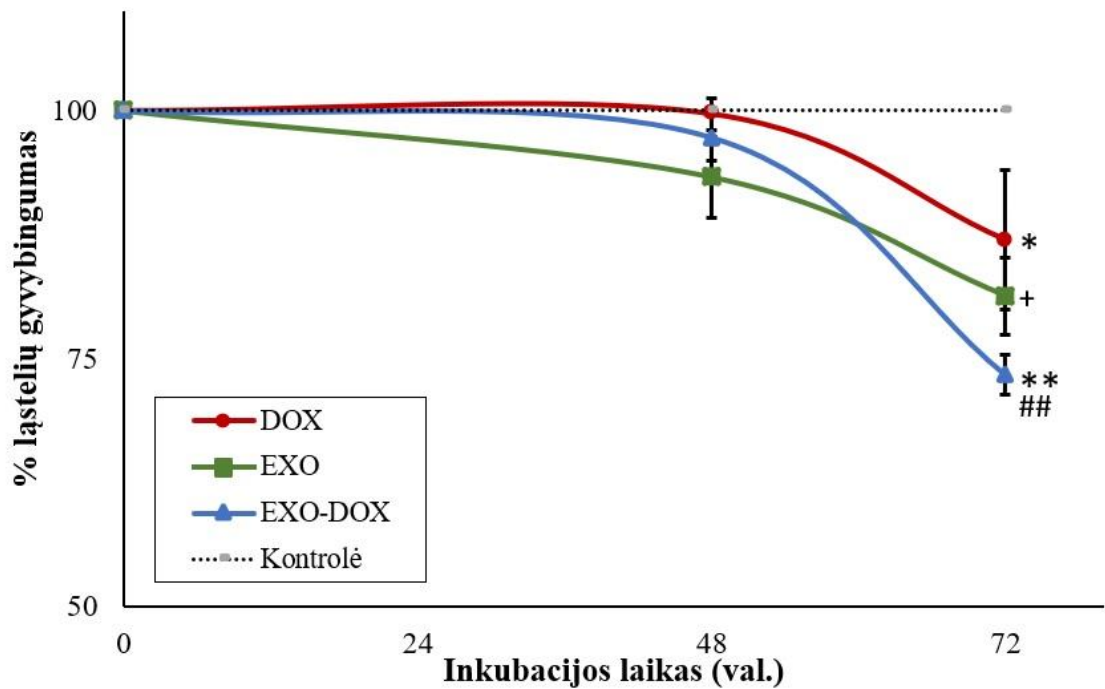
matuojamas po 48 ir 72 valandų inkubacijos. Abu egzosomų preparatai buvo tos pačios egzosomų baltymo koncentracijos (3 µg/ml), taip pat laisvo DOX koncentracija nesiskyrė nuo įkapsuliuoto egzosomose ir abiem atvejais buvo 84 ng/ml.

Spektrofotometrinė analizė naudojant PrestoBlue reagentą parodė, kad DOX pradeda veikti po 48 valandų ir didžiausias poveikis ląstelių gyvybingumui matomas praėjus 72 valandoms (16 pav.). Tai atitinka mokslinėje literatūroje aprašytus tyrimus, kuriuose naudojant mažesnes DOX koncentracijas (<200 ng/ml) citotoksinis poveikis glioblastomos ląstelėms buvo pastebimas šiek tiek vėliau negu naudojant didesnes DOX koncentracijas (2000 ng/ml). Tačiau abiem atvejais ląstelių žūtis įvyko praėjus 3-4 paroms po ląstelių paveikimo su DOX [40].

Kaip matoma grafike (15 pav.), paveikus glioblastomos ląsteles 72 valandas su laisvu DOX, gyvybingų ląstelių sumažėjo iki $87\% \pm 7\%$. Po tokios pačios trukmės poveikio su egzosomose esančiu DOX, gyvybingų ląstelių buvo $73\% \pm 2\%$, o paveikus su natūraliomis mikroglijos egzosomomis gyvybingų ląstelių buvo $81\% \pm 4\%$. Palyginus su kontrole, statistiškai reikšmingą poveikį sukėlė laisvas doksorubicinas ir į egzosomas įkapsuliuotas doksorubicinas. Nors grafike matoma, jog natūralių egzosomų poveikis ląstelių gyvybingumui ganėtinais skiriasi nuo kontrolės, šis skirtumas nėra statistiškai patikimas. Matoma nemaža variacija tarp rezultatų, kuri gali kliudyti statistikos analizei. Larsson su grupe taip pat aprašo rezultatų nenuoseklumą atliekant vėžinių ląstelių gyvybingumo analizę su rezazurinu [60]. Pastebima rezultatų variacija gali atsirasti dėl skirtumų užsėjamų ląstelių kiekyje. Nors buvo siekiama visus šulinėlius užsėti vienodu ląstelių skaičiumi, atsitiktinai vienam šulinėliui gali tekti daugiau ląstelių. Taip pat, variacija gali atsirasti jeigu ląstelės yra prastai pasiskirsčiusios šulinėlio plote ir tai gali turėti įtaką jų augimo greičiui.

Glioblastomos ląstelių gyvybingumo sumažėjimas po poveikio su natūraliomis egzosomomis buvo statistiškai reikšmingas lyginant su laisvo DOX sukeltu poveikiu. Taip pat, egzosomos su įkapsuliuotu DOX statistiškai reikšmingai sumažino glioblastomos gyvybingumą lyginant su natūraliomis egzosomomis (15 pav.).

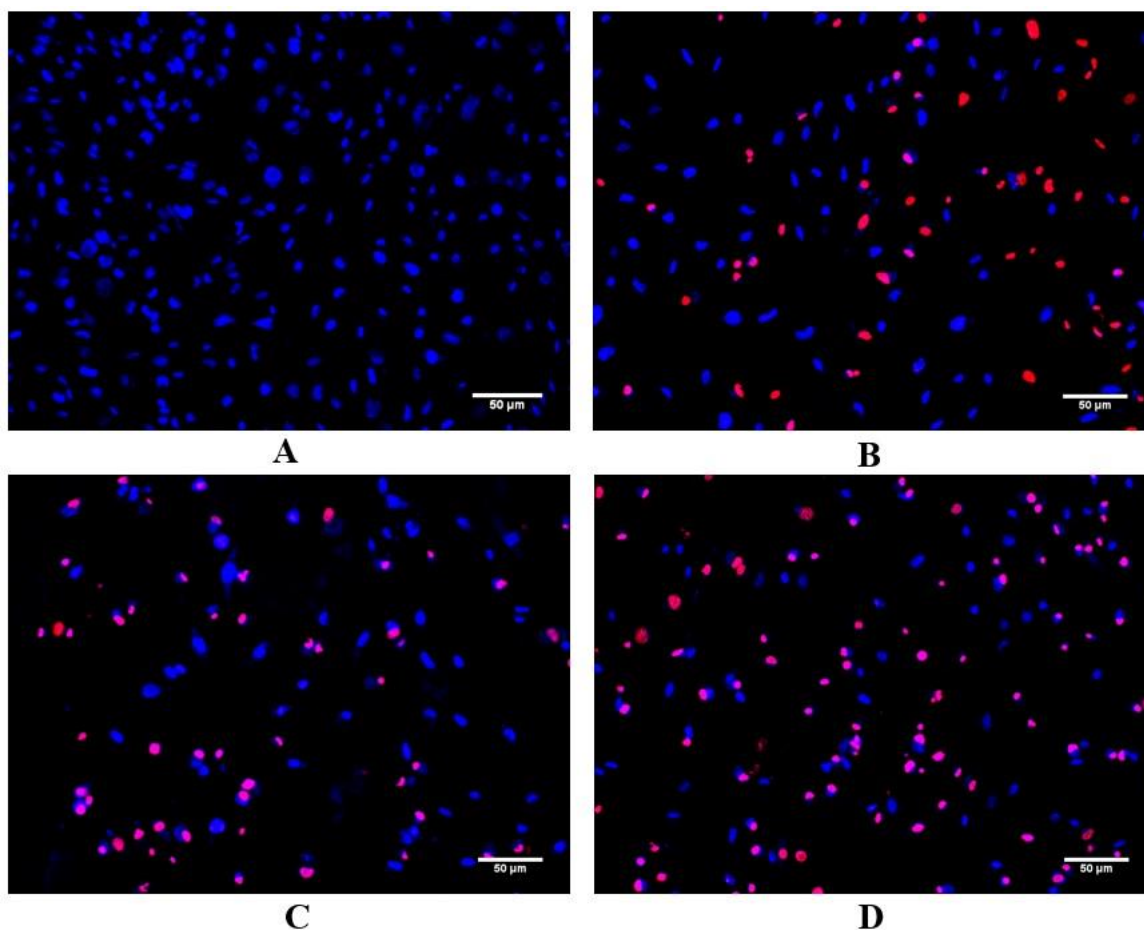
HROG-36 ląstelių gyvybingumas praėjus 72 valandoms po poveikio su egzosomų bei DOX preparatais buvo papildomai vertinamas fluorescencinės mikroskopijos būdu. Ląstelių gyvybingumo analizei buvo pasirinkta naudoti du skirtingus testus, kadangi kiekvieno iš jų veikimo principai skiriasi. PrestoBlue metodu gaunama informacija apie visą šulinėlyje esančią ląstelių populiaciją, tačiau šis metodas matuoja ląstelių metabolinį aktyvumą ląstelėms redukuojant rezazuriną į rezorufiną. Šiam procesui įtaką gali daryti tiek ląstelių gyvybingumas, tiek proliferacija, bei tiriamųjų preparatų poveikis ląstelių metabolizmui. Priešingai nei PrestoBlue metodas, dvigubas branduolių žymėjimas fluorescenciniais dažais (Hoechst 33342 ir propidžio jodidu) tiksliai nustato žuvusias ląsteles. Tačiau ir šitas analizės būdas turi minusų. Šiuo būdu įvertinamos ne visos ląstelės, esančios šulinėlyje, o tik atsitiktinai pasirinkto mikroskopo vaizdai, todėl vertinamų ląstelių imtis yra mažesnė nei vertinant PrestoBlue metodu. Todėl naudojant abu metodus gaunama papildoma informacija, padedanti tiksliau įvertinti mikroglijos egzosomų bei DOX preparatų poveikį glioblastomos ląstelių gyvybingumui.



15 pav. HROG-36 ląstelių gyvybingumas nustatytas spektrofotometriniu PrestoBlue metodu. Ląstelės buvo inkubuojamos 48 ir 72 valandas su natūraliomis mikroglijos egzozomomis (EXO), doksorubicinu (DOX) ir egzozomomis, užpildytomis DOX (EXO-DOX). Rezultatai vaizduojami kaip procentinio gyvybingumo nuo kontrolės vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. N = 3. * žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.05$; ** kai $p < 0.01$; ## žymi statistinį patikimumą lyginant EXO su EXO-DOX, kai $p < 0.01$; + žymi statistinį patikimumą lyginant EXO su DOX, kai $p < 0.05$ (taikant Bonferonio statistinį kriterijų).

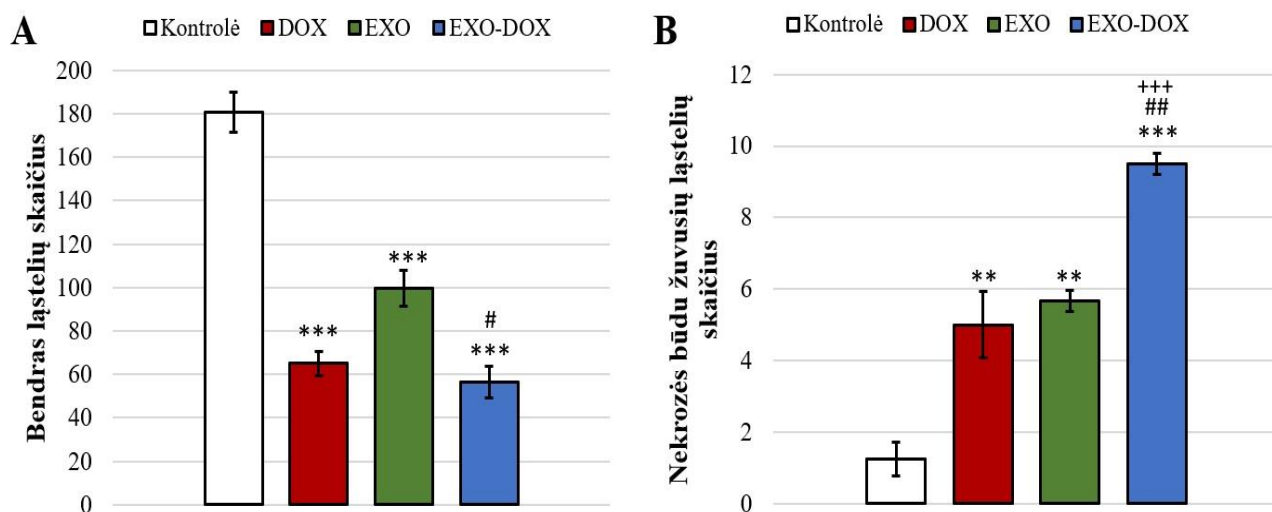
Po 72 valandų inkubacijos su egzozomų bei DOX preparatais, ląstelių branduoliai buvo nudažyti fluorescenciniais dažais Hoechst 33342 ir propidžio jodidu ir vaizdinami fluorescenciniu mikroskopu. Rezultatai yra pateikti 16, 17 ir 18 paveiksluose.

Pateiktose reprezentacinėse HROG-36 ląstelių branduolių fluorescencijos nuotraukose matoma, kad po 72 valandų bendras ląstelių skaičius sumažėjo po poveikio su natūraliomis egzozomomis (16 pav. B), laisvu DOX (16 pav. C) bei doksorubicinu pakrautomis egzozomomis (16 pav. D) lyginant su kontrole (16 pav. A), kurioje ląstelės nebuvo paveiktos. Taip pat, raudonai fluorescuojantys branduoliai, kurie žymi negyvas ląsteles, yra matomi visose nuotraukose, išskyrus kontrolę. Galima teigti, kad visi preparatai neigiamai veikia glioblastomos ląsteles ir geba sukelti ląstelių žūtį.



16 pav. Mikroglijos egzosomų bei DOX preparatų poveikis HROG-36 ląstelių gyvybingumui po 72 valandų inkubacijos. A – kontrolė; B – natūralios mikroglijos egzosomos; C – laisvas DOX; D – mikroglijos egzosomos su įterptu DOX. Nuotraukose mėlynai nudažyti visų ląstelių branduoliai, o raudonai tik žuvusių ląstelių branduoliai. N = 3.

Fluorescencinėse nuotraukose pastebėtas ląstelių sumažėjimas po poveikio su egzosomų bei DOX preparatais, buvo išanalizuotas detaliau. 17 paveiksle, A grafike, matomas statistiškai reikšmingas bendro ląstelių skaičiaus, matomo mikroskopiniame laukelyje, sumažėjimas po poveikio su egzosomų ir DOX preparatais, lyginant su kontrole. Palyginus bendrą ląstelių skaičių mikroskopo laukeliuose, kuriuose ląstelės buvo paveiktos su egzosomomis, viduje turinčiomis doksorubiciną, jis buvo reikšmingai mažesnis už natūraliomis mikroglijos egzosomomis paveiktų ląstelių bendrą skaičių.

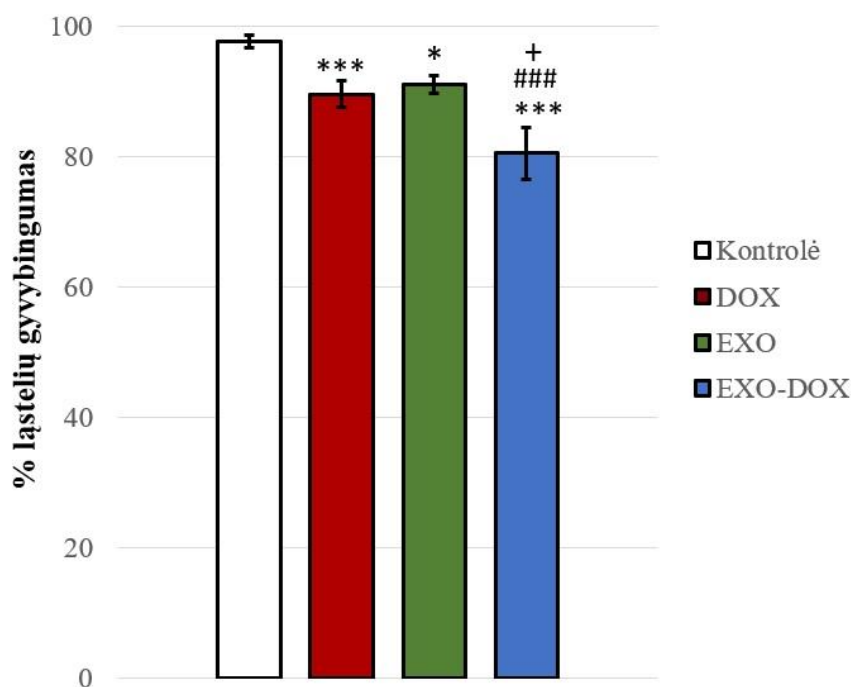


17 pav. HROG-36 ląstelių skaičiaus sumažėjimas matomas mikroskopo laukelyje atliekant gyvybingumo analizę fluorescenciniu mikroskopu. Pateikti rezultatai yra po 72 valandų trukusio poveikio su natūraliomis mikroglijos egzozomomis (EXO), doksorubicinu (DOX) ir egzozomomis, užpildytomis DOX (EXO-DOX). Kontroliniame mėginyje ląstelės buvo nepaveiktos. A – skirtumai tarp bendro ląstelių skaičiaus mikroskopo laukelyje; B – skirtumai tarp nekrozės būdu žuvusių ląstelių skaičius mikroskopo laukelyje. Grafikuose pateikti rezultatų vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. N = 3. ** žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.01$; *** kai $p < 0.001$; # žymi statistinį patikimumą lyginant EXO-DOX su EXO, kai $p < 0.05$; ## kai $p < 0.01$; +++ žymi statistinį patikimumą lyginant EXO-DOX su DOX, kai $p < 0.001$. Statistinė analizė buvo atlikta taikant Bonferonio statistinį kriterijų. N = 3.

Patekęs į ląsteles doksorubicinas jungiasi prie DNR, sukeldamas joje nepataisomas pažaidas. Taip pat, doksorubicino metabolizmo metu, ląstelėje susidaro reaktyvūs deguonies junginiai, kurie pažeidžia įvairias organėles, baltymus ir sukelia oksidacinį stresą [36]. Toks doksorubicino poveikis gali sukelti ląstelės žūtį tiek apoptozės, tiek nekrozės būdu. Ląstelių žūtį nekrozės būdu galima aptikti fluorescencijos būdu, kadangi priešingai negu apoptotinės ląstelės, nekrozinių ląstelių membrana būna pažeista ir pralaidi propidžio jodido dažui. Tuo tikslu buvo įvertintas nekrozinių ląstelių skaičius mikroskopo laukeliuose (17 pav. B). Nekrozės būdu žuvusių ląstelių skaičius yra reikšmingai didesnis, kai HROG-36 ląstelės buvo paveiktos su egzozomų ir DOX preparatais lyginant su neveiktomis ląstelėmis. Taip pat, nustatyta, kad egzozomos, užpildytos DOX, sukėlė nekrozę didesniai skaičiui glioblastomos ląstelių lyginant su laisvo DOX ir natūralių egzozomų poveikiais.

Bendras paveiktų ląstelių skaičiaus sumažėjimas (17 pav. A) ir reprezentacinėse fluorescencijos nuotraukose, kuriose glioblastoma buvo veikiama egzozomų ir DOX preparatais, dalies branduolių sumažėjimas yra pagrindas įtarti, kad chromatinas juose yra kondesuotas ir ląstelėse vyko apoptozės procesas. Šiam programuotam ląstelių mirties būdai būdinga chromatino kondensacija ir fragmentacija. Apoptozės metu ląstelės pradeda progresyviai nykti ir suskyla į membrana apgaubtus apoptotinius kūnelius, kuriuos tiksliai aptikti šiame darbe taikytu fluorescenciniu metodu yra sudėtinga, nes propidžio jodidas nepatenka pro apoptotinių kūnelių membraną.

Atlikus tolesnę fluorescencinių nuotraukų analizę buvo apskaičiuotas procentinis paveiktų glioblastomos ląstelių gyvybingumas (18 pav.). Nustatyta, kad kontroliniuose šulinėliuose, kuriuose glioblastomos ląstelės nebuvo paveiktos, gyvybingi branduoliai sudarė $98\% \pm 0.9\%$ visų branduolių; laisvu DOX paveiktų glioblastomos ląstelių gyvybingų branduolių buvo $90\% \pm 2.1\%$ visų branduolių; natūraliomis egzozomomis paveiktų glioblastomos ląstelių gyvybingi branduoliai sudarė $91\% \pm 1.4\%$ visų branduolių; egzozomomis su įterptu DOX paveiktų ląstelių gyvybingų branduolių buvo $81\% \pm 4\%$ visų branduolių.



18 pav. HROG-36 ląstelių gyvybingumas po 72 valandų inkubacijos su laisvu doksorubicinu (DOX), natūraliomis mikroglijos egzozomomis (EXO) ir egzozomomis, užpildytomis DOX (EXO-DOX), vertintas fluorescenciniu mikroskopu. Kontroliniame mėginyje ląstelės buvo nepaveiktos. Grafike rezultatai pateikti kaip procentinis gyvybingų ląstelių skaičius nuo bendro ląstelių skaičiaus laukelyje. Pateikti rezultatų vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. * žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0.05$; *** kai $p < 0.001$; ### žymi statistinį patikimumą lyginant EXO su EXO-DOX, kai $p < 0.001$; + žymi statistinį patikimumą lyginant DOX su EXO-DOX, kai $p < 0.05$. Statistinė analizė buvo atlikta taikant Bonferonio statistinį kriterijų. $N = 3$.

Statistinės analizės rezultatai atskleidė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp skirtingų preparatų grupių (18 pav.). HROG-36 ląstelių, paveiktų su DOX, natūraliomis egzozomomis ir egzozomomis su įterptu doksorubicinu, gyvybingumas statistiškai reikšmingai sumažėjo lyginant su kontrole. Šis rezultatas atitinka 18 paveiksle pateiktus rezultatus bei PrestoBlue metodu gautus rezultatus. Toliau, atlikus palyginimus tarp grupių, pastebėtas reikšmingas ląstelių gyvybingumo sumažėjimas po poveikio su egzozomomis, užpildytomis doksorubicinu, lyginant su DOX bei natūraliomis egzozomomis veiktomis ląstelėmis.

Lyginant glioblastomos gyvybingumo rezultatus, gautus PrestoBlue ir fluorescencinės mikroskopijos metodais, nustatytas statistiškai reikšmingas citotoksinis egzosomų, užpildytų doksorubicinu, poveikis lyginant tiek su kontrolėmis, tiek su natūraliomis egzosomomis bei laisvu DOX. Galima teigti, kad doksorubicino hidrochloridas įterptas į mikroglijos egzosomas yra efektyvesnis negu esantis laisvoje vaisto formoje. Atlikti tyrimai, kurių metu vėžinės ląstelės buvo veikiamos chemoterapiniais vaistais patalpintais į egzosomas, taip pat nurodė padidintą vaisto veiksmingumą bei sukliamą greitesnį citotoksinį poveikį negu veikiant ląsteles laisvu vaistu [61–63]. Laisvas DOX yra hidrofilinis, todėl šioje formoje vaistui gali būti sunkiau patekti į ląstelės vidų pro plazminę membraną. Taip pat, dėl hidrofiliškumo ir didelės molekulinės masės, laisvas DOX yra sulaikomas KSB, todėl negali patekti į smegenis ir tikslią veikimo vietą [38]. Priešingai, DOX esantis egzosomų viduje, yra apgaubtas pūslelės plazmine membrana. Egzosomos gali patekti į ląstelę susijungus su jos plazmine membrana arba specializuotos endocitozės būdu. Tokioje formoje, DOX galėtų pereiti KSB ir pasiekti ląstelės-taikinio branduolį, pagrindinę veikimo vietą, ir sukelti neigiamą poveikį glioblastomos ląstelių gyvybingumui. LSMU Farmacinių technologijų institute, dr. A. Jekabsone grupėje, atlikti tyrimai parodė, kad egzosomos pereina KSB ir patenka į smegenis. Egzosomos, pažymėtos fluorescenciniais dažais, buvo intranasaliai įvestos pelėms. Po 3 valandų buvo paimti smegenų audinio pavyzdžiai histologinei analizei, kurios metu smegenų audinyje buvo aptiktos egzosomos (nepublikuoti duomenys).

Gyvybingumo tyrimai atskleidė, kad natūralios mikroglijos egzosomos geba sumažinti glioblastomos gyvybingumą ir sukelti jų žūtį nekrozės būdu. Fluorescencinė mikroskopija atskleidė, kad natūraliomis egzosomomis veiktų HROG-36 ląstelių gyvybingumo sumažėjimas buvo statistiškai reikšmingas palyginus su kontrole, tačiau PrestoBlue metodas statistiškai patikimo skirtumo neparodė. Vis dėl to, literatūroje yra aprašomas natūralių imuninių ląstelių egzosomų gebėjimas sunaikinti vėžines ląsteles ir panaudoti natūralias egzosomas priešvėžinei terapijai, kaip alternatyvą modifikuotoms egzosomoms. Munich su grupe pademonstravo, kad natūralios dendritinių ląstelių išskiriamos egzosomos gali tiesiogiai nužudyti melanomas, plaučių bei kitų tipų vėžines ląsteles. Šių egzosomų citotoksinis poveikis stiprėjo didinant egzosomų koncentraciją bei poveikio laiką [64]. Kita mokslininkų grupė gavo panašius rezultatus su egzosomomis išgautomis iš natūraliųjų kilerių ląstelių. Jos sukėlė citotoksinį poveikį melanomos ląstelėms tiek *in vitro*, tiek *in vivo* tyrimuose [65]. Šios imuninės ląstelės, kaip ir mikroglija, gamina ir išskiria daug imunoreguliacinių molekulių, citotoksinių fermentų, bei turi transmembraninius receptorius, MHC klasės molekules. Šios biomolekulės buvo rastos ir imuninių ląstelių išskiriamose egzosomose, todėl šios pūslelės gali selektyviai sąveikauti su paviršinėmis molekulėmis, esančiomis ląstelių-taikinių membranoje, ir sukelti neigiamą poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui. Pagal atliktus proteomikos tyrimus su pelių mikroglijos ląstelių išskirtomis egzosomomis, nustatyta, kad jos turi nemažai bendrų baltymų, randamų dendritinių ir B ląstelių egzosomose [6]. Šiame darbe buvo pirmą kartą išskirtos egzosomos iš žmogaus mikroglijos ląstelių ir pademonstruotas citotoksinis poveikis žmogaus glioblastomos ląstelėms. Šis atradimas suteikia pagrindą atlikti tolimesnius tyrimus siekiant išsiaiškinti žmogaus mikroglijos egzosomų poveikį glioblastomos ląstelėms ir galimybę šias egzosomas panaudoti kaip alternatyvią terapiją glioblastomos gydymui.

3.7. Rezultatų apibendrinimas ir tolesni tyrimai

Šio darbo metu iš žmogaus mikroglijos ląstelių išskirtos egzosomos buvo identifikuotos pagal dydį, morfologiją, bendro baltymo kiekį ir specifinius žymenis. Šie tyrimai yra dažniausiai taikomi egzosomų charakterizavimui biologiniuose mėginiuose [66]. Mikroglijos egzosomų dydis buvo 60 – 90 nm ribose ir jos turėjo apvalią, plazminės membranos ribojamą, formą. Tai atitinka mokslinėje literatūroje aprašomas egzosomų fizines charakteristikas [3]. Taip pat, mikroglijos egzosomos turėjo paviršinių egzosomų žymenį, tetraspaniną CD9, kuris yra plačiai naudojamas egzosomų identifikavimui.

Pagrindinė limitacija atliekant mokslinius tyrimus su ląstelių egzosomomis, kuri yra minima literatūroje, yra mažas išskiriamų egzosomų kiekis. Su šia problema buvo susidurta ir šiame darbe. Literatūroje nurodoma, kad sutrikdant ląstelių homeostazę, jos gali išskirti daugiau egzosomų [56]. Buvo siekiama mikroglijos ląstelėms sukelti stresą pakeliant kultivavimo temperatūrą iki 39°C laipsnių. Didesnis egzosomų kiekis buvo išskirtas ląstelių, kurios buvo augintos 37°C temperatūroje negu 39°C, tačiau pastebėtas skirtumas nebuvo statistškai patikimas. Todėl dar reiktų atlikti papildomus tyrimus ir patvirtinti šį reikinį bei išbandyti kitokius mikroglijos ląstelių stimuliavimo būdus.

Toliau, buvo tiriamas mikroglijos egzosomų patekimas į glioblastomos ląsteles. Buvo nustatyta, kad egzosomos į ląsteles patenka greitai. Po 2 valandų jos galėjo būti aptinkamos ląstelės viduje, kurioje išsilaiko ne mažiau nei 24 valandas. Šis rezultatas patvirtina, kad mikroglijos egzosomos sąveikauja su glioblastomos ląstelėmis ir gali būti naudojamos gyvybingumo tyrimams. Būtų verta atlikti papildomus egzosomų patekimo į ląsteles tyrimus, padėsiančius nustatyti mikroglijos egzosomų sąveikos su glioblastomos ląstelėmis tipą, bei patekimo į jas būdą.

Siekiant paruošti mikroglijos egzosomas su įterptu doksorubicino hidrochloridu, buvo atlikta elektroporacija. Šis metodas yra vienas iš pagrindinių taikomų modifikuoti egzosomoms terapiniams tikslams [67]. Elektroporacijos sąlygos buvo pasirinktos pagal mokslinėje literatūroje aprašytus dažniausiai taikomus parametrus egzosomų elektroporacijai [15]. Elektroporacijos būdu į mikroglijos egzosomas buvo įterpta 342 ng/ml doksorubicino hidrochlorido, o vaisto įterpimo efektyvumas buvo 0.34%. Modifikuojant elektroporacijos parametrus tikriausiai galima pasiekti didesnę įterpto vaisto koncentraciją, tačiau tinkamų sąlygų atrinkimą riboja mažas išskiriamų egzosomų kiekis. Atliekant tolimesnius tyrimus būtų tikslinga atlikti egzosomų identifikavimą po jų elektroporacijos, patikrinti ar nepakito egzosomų dydis, morfologija.

Šio baigiamojo projekto tikslas buvo įvertinti mikroglijos egzosomų, kaip vaistų transporto sistemos, efektyvumą sunaikinant glioblastomos ląsteles. Todėl buvo atlikti glioblastomos gyvybingumo tyrimai, veikiant ląsteles natūraliomis mikroglijos egzosomomis, laisvu bei įterptu į egzosomas doksorubicino hidrochloridu. Tyrimų rezultatai atskleidė, kad į egzosomas įterptas DOX per 72 valandas sukėlė reikšmingą citotoksinį poveikį glioblastomos ląstelėms, lyginant tiek su kontrolėmis, tiek su natūraliomis egzosomomis bei laisvu DOX. Taigi, galima teigti, kad mikroglijos egzosomos gali būti naudojamos pristatyti DOX į vėžines ląsteles. Taip pat, buvo pastebėta, kad natūralios mikroglijos egzosomos irgi sumažino glioblastomos ląstelių gyvybingumą, lyginant su kontrole. Pagal gautus rezultatus, mikroglijos egzosomos galėtų būti naudojamos glioblastomos gydymui natūralioje formoje arba formuluojant jas su chemoterapiniais vaistais, tokiais kaip DOX. Būtų

tikslinga atlikti tolesnius tyrimus, kurie padėtų detaliau išsiaiškinti kokio tipo ląstelės žūtį (nekrozę ar apoptozę) sukelia natūralios mikroglijos egzozomos glioblastomos ląstelėse, bei koks yra detalus šio proceso iniciacijos mechanizmas.

Šio projekto metu gauti rezultatai sukuria pagrindą atlikti tolesnius tyrimus su žmogaus mikroglijos ląstelių egzozomomis, kurie padėtų geriau suprasti jų sukeltą poveikį glioblastomos ląstelėms ir padėtų atrasti naują gydymo būdą.

Išvados

1. Išskirtų mikroglijos egzsomų preparatas pasižymėjo egzosomoms būdingomis savybėmis. Jame esančių dalelių dydis buvo 60 - 90 nm intervale, jos turėjo joms būdingą morfologiją ir egzosomoms būdingą žymenį CD9.
2. Mikroglijos egzosomos į glioblastomos ląsteles patenka po 2 valandų ir išlieka ląstelės viduje ne mažiau 24 valandų.
3. Natūralios mikroglijos egzosomos per 72 valandas sukelia reikšmingą glioblastomos ląstelių gyvybingumo sumažėjimą palyginus su nepaveiktomis ląstelėmis.
4. Chemoterapinis vaistas doksorubicino hidrochloridas gali būti įterpiamas į mikroglijos egzosomas elektroporacijos būdu. Į egzosomas patekusio vaisto koncentracija buvo $0.342 \pm 0.08 \mu\text{g}$, o pakrovimo efektyvumas buvo 0.34 ± 0.08 .
5. Doksorubicino hidrochloridu užpildytos mikroglijos egzosomos per 72 valandas reikšmingai sumažina glioblastomos ląstelių gyvybingumą ir yra efektyvesnės už natūralias mikroglijos egzosomas bei laisvą doksorubicino hidrochloridą.

Literatūros sąrašas

1. QUEZADA, Claudia, Ángelo TORRES, Ignacio NIECHI, Daniel URIBE, Susana CONTRERAS-DUARTE, Fernando TOLEDO, Rody SAN MARTÍN, Jaime GUTIÉRREZ and Luis SOBREVIA. Role of extracellular vesicles in glioma progression. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018, 60, 38–51. ISSN 18729452. Prieiga per: doi:10.1016/j.mam.2017.12.003
2. GILLIGAN, Katie E. and Róisín M. DWYER. Engineering exosomes for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(6). ISSN 14220067. Prieiga per: doi:10.3390/ijms18061122
3. KALLURI, Raghu and Valerie S. LEBLEU. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020, 367(6478). ISSN 10959203. Prieiga per: doi:10.1126/science.aau6977
4. CHENG, Lin, Kun ZHANG, Shuying WU, Manhua CUI and Tianmin XU. Review Article Focus on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes : Opportunities and Challenges in Cell-Free Therapy. 2017, 2017. Prieiga per: doi:10.1155/2017/6305295
5. WU, Chun Hua, Jingbo LI, Li LI, Jianping SUN, Muller FABBRI, Alan S. WAYNE, Robert C. SEEGER and Ambrose Y. JONG. Extracellular vesicles derived from natural killer cells use multiple cytotoxic proteins and killing mechanisms to target cancer cells. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019, 8(1). ISSN 20013078. Prieiga per: doi:10.1080/20013078.2019.1588538
6. POTOLICCHIO, Ilaria, Gregory J. CARVEN, Xiaonan XU, Christopher STIPP, Richiard J. RIESE, Lawrence J. STERN and Laura SANTAMBROGIO. Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Aminopeptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism. *The Journal of Immunology*. 2005, 175(4), 2237–2243. ISSN 0022-1767. Prieiga per: doi:10.4049/jimmunol.175.4.2237
7. MURGOCI, Adriana-natalia, Dasa CIZKOVA, Petra MAJEROVA, Eva PETROVOVA, Lubomir MEDVECKY, Isabelle FOURNIER and Michel SALZET. Brain-Cortex Microglia-Derived Exosomes: Nanoparticles for Glioma Therapy. *ChemPhysChem*. 2018, 19(10), 1205–1214. ISSN 14394235. Prieiga per: doi:10.1002/cphc.201701198
8. JOHNSTONE, R. M., M. ADAM, J. R. HAMMOND, L. ORR and C. TURBIDE. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 1987, 262(19), 9412–9420. ISSN 00219258.
9. COLOMBO, Marina, Graça RAPOSO and Clotilde THÉRY. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2014, 30(1), 255–289. ISSN 1081-0706. Prieiga per: doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
10. MATHIEU, Mathilde, Lorena MARTIN-JAULAR, Grégory LAVIEU and Clotilde THÉRY. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*. 2019, 21(1), 9–17. ISSN 14764679. Prieiga per: doi:10.1038/s41556-018-0250-9
11. STUFFERS, Susanne, Catherine SEM WEGNER, Harald STENMARK and Andreas BRECH. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009, 10(7), 925–937. ISSN 13989219. Prieiga per: doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x
12. HA, Dinh, Ningning YANG and Venkatareddy NADITHE. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016, 6(4), 287–296. ISSN 22113843. Prieiga per: doi:10.1016/j.apsb.2016.02.001
13. RAPOSO, Graça and Willem STOORVOGEL. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013, 200(4), 373–383. ISSN 00219525. Prieiga per: doi:10.1083/jcb.201211138

14. HESSVIK, Nina Pettersen and Alicia LLORENTE. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018, 75(2), 193–208. ISSN 14209071. Prieiga per: doi:10.1007/s00018-017-2595-9
15. JOHNSEN, Kasper Bendix, Johann Mar GUDBERGSSON, Martin Najbjerg SKOV, Linda PILGAARD, Torben MOOS and Meg DUROUX. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2014, 1846(1), 75–87. ISSN 18792561. Prieiga per: doi:10.1016/j.bbcan.2014.04.005
16. MENTKOWSKI, Kyle I, Jonathan D SNITZER, Sarah RUSNAK and Jennifer K LANG. Therapeutic Potential of Engineered Extracellular Vesicles. *The AAPS Journal*. 2018, 20(3), 50. ISSN 1550-7416. Prieiga per: doi:10.1208/s12248-018-0211-z
17. VALADI, Hadi, Karin EKSTRÖM, Apostolos BOSSIOS, Margareta SJÖSTRAND, James J. LEE and Jan O. LÖTVALL. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. 2007, 9(6), 654–659. ISSN 14657392. Prieiga per: doi:10.1038/ncb1596
18. JADLI, Anshul S., Noura BALLASY, Pariya EDALAT and Vaibhav B. PATEL. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020, 467(1–2), 77–94. ISSN 15734919. Prieiga per: doi:10.1007/s11010-020-03703-z
19. CONIGLIARO, Alice and Carla CICCHINI. Exosome-Mediated Signaling in Epithelial to Mesenchymal Transition and Tumor Progression. *Journal of Clinical Medicine*. 2018, 8(1), 26. ISSN 2077-0383. Prieiga per: doi:10.3390/jcm8010026
20. SAINT-POL, Julien, Fabien GOSSELET, Sophie DUBAN-DEWEER, Gwënaël POTTIEZ and Yannis KARAMANOS. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020, 9(4), 851. Prieiga per: doi:10.3390/cells9040851
21. JURJ, Ancuta, Oana ZANOAGA, Cornelia BRAICU, Vladimir LAZAR, Ciprian TOMULEASA, Alexandru IRIMIE and Ioana BERINDAN-NEAGOE. A Comprehensive Picture of Extracellular Vesicles and Their Contents. Molecular Transfer to Cancer Cells. *Cancers*. 2020, 12(2), 298. ISSN 2072-6694. Prieiga per: doi:10.3390/cancers12020298
22. MULCAHY, Laura Ann, Ryan Charles PINK and David Raul Francisco CARTER. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014, 3(1). ISSN 20013078. Prieiga per: doi:10.3402/jev.v3.24641
23. COSTA VERDERA, Helena, Jerney J. GITZ-FRANCOIS, Raymond M. SCHIFFELERS and Pieter VADER. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. 2017, 266(July), 100–108. ISSN 18734995. Prieiga per: doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.019
24. WEN, Chuan, Robert C. SEEGER, Muller FABBRI, Larry WANG, Alan S. WAYNE and Ambrose Y. JONG. Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017, 6(1), 1–19. ISSN 20013078. Prieiga per: doi:10.1080/20013078.2017.1400370
25. SRIVASTAVA, Akhil, Narsireddy AMREDDY, Vipul PAREEK, Mahendran CHINNAPPAN, Rebaz AHMED, Meghna MEHTA, Mohammad RAZAQ, Anupama MUNSHI and Rajagopal RAMESH. Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020, (November 2019), 1–20. ISSN 1939-5116. Prieiga per: doi:10.1002/wnan.1621
26. KIM, Myung Soo, Matthew J. HANEY, Yuling ZHAO, Vivek MAHAJAN, Irina DEYGEN, Natalia L. KLYACHKO, Eli INSKOE, Aleksandr PIROYAN, Marina SOKOLSKY, Onyi OKOLIE, Shawn D. HINGTGEN, Alexander v. KABANOV and Elena v. BATRAKOVA. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2016, 12(3), 655–664. ISSN 15499642. Prieiga per: doi:10.1016/j.nano.2015.10.012

27. PRIONISTI, Ioanna, Léo H. BÜHLER, Paul R. WALKER and Renaud B. JOLIVET. Harnessing microglia and macrophages for the treatment of glioblastoma. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, 10(JUN), 1–9. ISSN 16639812. Prieiga per: doi:10.3389/fphar.2019.00506
28. LEVTOVA, Natalie, Luke M. HEALY, Catalina Marysol Carvajal GONCZI, Brandon STOPNICKI, Manon BLAIN, Timothy E. KENNEDY, Craig S. MOORE, Jack P. ANTEL and Peter J. DARLINGTON. Comparative morphology and phagocytic capacity of primary human adult microglia with time-lapse imaging. *Journal of Neuroimmunology*. 2017, 310, 143–149. ISSN 18728421. Prieiga per: doi:10.1016/j.jneuroim.2017.05.012
29. PAOLICELLI, Rosa C., Giorgio BERGAMINI and Lawrence RAJENDRAN. Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience*. 2019, 405, 148–157. ISSN 18737544. Prieiga per: doi:10.1016/j.neuroscience.2018.04.003
30. BRITES, Dora and Adelaide FERNANDES. Neuroinflammation and depression: Microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015, 9(DEC), 1–20. ISSN 16625102. Prieiga per: doi:10.3389/fncel.2015.00476
31. YANG, Yiyi, Antonio BOZA-SERRANO, Christopher J.R. DUNNING, Bettina Hjelm CLAUSEN, Kate Lykke LAMBERTSEN and Tomas DEIERBORG. Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2018, 15(1), 1–19. ISSN 17422094. Prieiga per: doi:10.1186/s12974-018-1204-7
32. HANAHAN, Douglas and Robert A. WEINBERG. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011, 144(5), 646–674. ISSN 00928674. Prieiga per: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
33. PULLAN, Jessica E., Matthew I. CONFELD, Jenna K. OSBORN, Jiha KIM, Kausik SARKAR and Sanku MALLIK. Exosomes as Drug Carriers for Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*. 2019, 16(5), 1789–1798. ISSN 15438392. Prieiga per: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00104
34. PALUMBO, Michael O., Petr KAVAN, Wilson H. MILLER, Lawrence PANASCI, Sarit ASSOULINE, Nathalie JOHNSON, Victor COHEN, Francois PATENAUDE, Michael POLLAK, R. Thomas JAGOE and Gerald BATIST. Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology*. 2013, 4, 1–9. ISSN 16639812. Prieiga per: doi:10.3389/fphar.2013.00057
35. LU, Mei, Haonan XING, Zhe XUN, Tianzhi YANG, Xiaoyun ZHAO, Cuifang CAI, Dongkai WANG and Pingtian DING. Functionalized extracellular vesicles as advanced therapeutic nanodelivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018, 121(103), 34–46. ISSN 18790720. Prieiga per: doi:10.1016/j.ejps.2018.05.001
36. THORN, Caroline F., Connie OSHIRO, Sharon MARSH, Tina HERNANDEZ-BOUSSARD, Howard MCLEOD, Teri E. KLEIN and Russ B. ALTMAN. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2011, 21(7), 440–446. ISSN 17446872. Prieiga per: doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
37. SIGMA-ALDRICH. *Doxorubicin hydrochloride*. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1515>
38. LESNIAK, Maciej S., Urvashi UPADHYAY, Rory GOODWIN, Betty TYLER and Henry BREM. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer research*. 2005, 25(6B), 3825–31. ISSN 0250-7005. Prieiga per: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16312042>
39. ANNOVAZZI, Laura, Valentina CALDERA, Marta MELLAI, Chiara RIGANTI, Luigi BATTAGLIA, Daniela CHIRIO, Antonio MELCARNE and Davide SCHIFFER. The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. *International Journal of Oncology*. 2015, 46(6), 2299–2308. ISSN 17912423. Prieiga per: doi:10.3892/ijo.2015.2963

40. MATCOVSCHII, Valerii, Dan LISII, Valentin GUDUMAC and Stanislav DOROSENCO. Selective interstitial doxorubicin for recurrent glioblastoma. *Clinical Case Reports*. 2019, 7(12), 2520–2525. ISSN 20500904. Prieiga per: doi:10.1002/ccr3.2546
41. WILLIAM, Doreen, Madlin WALTHER, Björn SCHNEIDER, Michael LINNEBACHER and Carl Friedrich CLASSEN. Temozolomide-induced increase of tumorigenicity can be diminished by targeting of mitochondria in in vitro models of patient individual glioblastoma. *PLOS ONE*. 2018, 13(1), e0191511. ISSN 1932-6203. Prieiga per: doi:10.1371/journal.pone.0191511
42. ZHANG, Yue-feng, Jin-bo SHI and Chao LI. Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: Current status and the way forward. *Cytotherapy* . 2019, (88). ISSN 14653249. Prieiga per: doi:10.1016/j.jcyt.2019.10.002
43. SUN, Dongmei, Xiaoying ZHUANG, Xiaoyu XIANG, Yuelong LIU, Shuangyin ZHANG, Cunren LIU, Stephen BARNES, William GRIZZLE, Donald MILLER and Huang Ge ZHANG. A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy* . 2010, 18(9), 1606–1614. ISSN 15250024. Prieiga per: doi:10.1038/mt.2010.105
44. LUDWIG, Nils, Theresa L WHITESIDE and Torsten E. REICHERT. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* . 2019, 20(19), 4684. ISSN 1422-0067. Prieiga per: doi:10.3390/ijms20194684
45. GOMARI, Hosna, Mehdi Forouzandeh MOGHADAM and Masoud SOLEIMANI. Targeted cancer therapy using engineered exosome as a natural drug delivery vehicle. *Oncotargets and Therapy* . 2018, 11, 5753–5762. ISSN 11786930. Prieiga per: doi:10.2147/OTT.S173110
46. LI, Pin, Melisa KASLAN, Sze Han LEE, Justin YAO and Zhiqiang GAO. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics* . 2017, 7(3), 789–804. ISSN 18387640. Prieiga per: doi:10.7150/thno.18133
47. DOYLE, Laura and Michael WANG. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019, 8(7), 727. ISSN 2073-4409. Prieiga per: doi:10.3390/cells8070727
48. LUAN, Xin, Kanokwan SANSANAPHONGPRICHA, Ila MYERS, Hongwei CHEN, Hebao YUAN and Duxin SUN. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforams for drug delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017, 38(6), 754–763. ISSN 1671-4083. Prieiga per: doi:10.1038/aps.2017.12
49. LI, Yanyan, Yongtai ZHANG, Zhe LI, Kuan ZHOU and Nianping FENG. Exosomes as Carriers for Antitumor Therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019, 5(10), 4870–4881. ISSN 2373-9878. Prieiga per: doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00417
50. FUHRMANN, Gregor, Andrea SERIO, Manuel MAZO, Rekha NAIR and Molly M. STEVENS. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*. 2015, 205, 35–44. ISSN 18734995. Prieiga per: doi:10.1016/j.jconrel.2014.11.029
51. YAO, Zhenlan, Xiaofang JIA, Dominik A MEGGER, Jieliang CHEN, Yuyi LIU, Jianhua LI, Barbara SITEK and Zhenghong YUAN. Label-Free Proteomic Analysis of Exosomes Secreted from THP-1-Derived Macrophages Treated with IFN- α Identifies Antiviral Proteins Enriched in Exosomes. *Journal of Proteome Research*. 2019, 18(3), 855–864. ISSN 1535-3893. Prieiga per: doi:10.1021/acs.jproteome.8b00514
52. GRIMALDI, Alfonso, Carmela SERPE, Giuseppina CHECE, Valentina NIGRO, Angelo SARRA, Barbara RUZICKA, Michela RELUCENTI, Giuseppe FAMILIARI, Giancarlo RUOCCO, Giuseppe Rubens PASCUCCI, Francesca GUERRIERI, Cristina LIMATOLA and Myriam CATALANO. Microglia-Derived Microvesicles Affect Microglia Phenotype in Glioma. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019, 13(February), 1–14. ISSN 1662-5102. Prieiga per: doi:10.3389/fncel.2019.00041

53. RIDER, Mark A., Stephanie N. HURWITZ and David G. MECKES. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Scientific Reports*. 2016, 6(March), 1–14. ISSN 20452322. Prieiga per: doi:10.1038/srep23978
54. LAWRIE, A. S., A. ALBANYAN, R. A. CARDIGAN, I. J. MACKIE and P. HARRISON. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sanguinis*. 2009, 96(3), 206–212. ISSN 00429007. Prieiga per: doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01151.x
55. AYED, Zeineb, Luana CUVILLIER, Garima DOBHAL and Renee v. GOREHAM. Electroporation of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* with gold nanoparticles. *SN Applied Sciences*. 2019, 1(12), 1–9. ISSN 2523-3963. Prieiga per: doi:10.1007/s42452-019-1646-2
56. GURUNATHAN, Sangiliyandi, Min-hee KANG, Muniyandi JEYARAJ, Muhammad QASIM and Jin-hoi KIM. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 2019, 8(4), 307. ISSN 2073-4409. Prieiga per: doi:10.3390/cells8040307
57. LIU, Chunying and Changqing SU. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics*. 2019, 9(4), 1015–1028. ISSN 18387640. Prieiga per: doi:10.7150/thno.30853
58. CLAYTON, Aled, Atilla TURKES, Hossein NAVABI, Malcolm D. MASON and Zsuzsanna TABI. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of Cell Science*. 2005, 118(16), 3631–3638. ISSN 00219533. Prieiga per: doi:10.1242/jcs.02494
59. HEDLUND, Malin, Olga NAGAEVA, Dominic KARGL, Vladimir BARANOV and Lucia MINCHEVA-NILSSON. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS ONE*. 2011, 6(2). ISSN 19326203. Prieiga per: doi:10.1371/journal.pone.0016899
60. LARSSON, Peter, Hanna ENGQVIST, Jana BIERMANN, Elisabeth WERNER RÖNNERMAN, Eva FORSSELL-ARONSSON, Anikó KOVÁCS, Per KARLSSON, Khalil HELOU and Toshima Z. PARRIS. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific Reports*. 2020, 10(1), 5798. ISSN 2045-2322. Prieiga per: doi:10.1038/s41598-020-62848-5
61. GOH, Wei Jiang, Choon Keong LEE, Shui ZOU, Esther C.Y. WOON, Bertrand CZARNY and Giorgia PASTORIN. Doxorubicin-loaded cell-derived nanovesicles: An alternative targeted approach for anti-tumor therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 2759–2767. ISSN 11782013. Prieiga per: doi:10.2147/IJN.S131786
62. SCHINDLER, Christina, Andie COLLINSON, Carl MATTHEWS, Amy POINTON, Lesley JENKINSON, Ralph R. MINTER, Tristan J. VAUGHAN and Natalie J. TIGUE. Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry and enhanced in vitro potency. *PLoS ONE*. 2019, 14(3), 1–19. ISSN 19326203. Prieiga per: doi:10.1371/journal.pone.0214545
63. KANCHANAPALLY, Rajashekhar, Sachin Kumar DESHMUKH, Suhash Reddy CHAVVA, Nikhil TYAGI, Sanjeev Kumar SRIVASTAVA, Girijesh Kumar PATEL, Ajay Pratap SINGH and Seema SINGH. Drug-loaded exosomal preparations from different cell types exhibit distinctive loading capability, yield, and antitumor efficacies: A comparative analysis. *International Journal of Nanomedicine*. 2019, 14, 531–541. ISSN 11782013. Prieiga per: doi:10.2147/IJN.S191313
64. MUNICH, Stephan, Andrea SOBO-VUJANOVIC, William J. BUCHSER, Donna BEER-STOLZ and Nikola L. VUJANOVIC. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *OncoImmunology*. 2012, 1(7), 1074–1083. ISSN 2162-402X. Prieiga per: doi:10.4161/onci.20897
65. ZHU, Liya, Senthilkumar KALIMUTHU, Prakash GANGADARAN, Ji Min OH, Ho Won LEE, Se Hwan BAEK, Shin Young JEONG, Sang Woo LEE, Jaetae LEE and Byeong Cheol AHN. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics*. 2017, 7(10), 2732–2745. ISSN 18387640. Prieiga per: doi:10.7150/thno.18752

66. YANG, Xiao Xia, Chao SUN, Lei WANG and Xiu Li GUO. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *Journal of Controlled Release*. 2019, 308(44), 119–129. ISSN 18734995. Prieiga per: doi:10.1016/j.jconrel.2019.07.021
67. ZHANG, Yuan, Yunfeng LIU, Haiying LIU and Wai Ho TANG. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*. 2019, 9(1), 1–18. ISSN 20453701. Prieiga per: doi:10.1186/s13578-019-0282-2