



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Glioblastomos 3D modelio su hipoksiniu gradientu kūrimas ir pritaikymas imuninių ląstelių egzosomose įterptų priešvėžinių medikamentų efektyvumo tyrimui

Baigiamasis magistro projektas

Deimantė Kulakauskienė

Projekto autorė

Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Glioblastomos 3D modelio su hipoksiniu gradientu kūrimas ir pritaikymas imuninių ląstelių egzosomose įterptų priešvėžinių medikamentų efektyvumo tyrimui

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Deimantė Kulakauskienė

Projekto autorė

Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

Vyresn. m. d. dr. Arūnas Kazlauskas

Recenzentas

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Deimantė Kulakauskienė

Glioblastomos 3D modelio su hipoksiniu gradientu kūrimas ir pritaikymas imuninių ląstelių egzosomose įterptų priešvėžinių medikamentų efektyvumo tyrimui

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto ir Lietuvos sveikatos mokslų universiteto teisės aktų, reglamentuojančių akademinę etiką, intelektinės nuosavybės teises, jų valdymą ir perdavimą;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Kauno technologijos universitete ir(ar) Lietuvos sveikatos mokslų universitete galiojančią tvarką ir mano studijų sutartis bus nutraukta, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai dėl galimo akademinės etikos pažeidimo.

Deimantė Kulakauskienė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Kulakauskienė, Deimantė. Glioblastomos 3D modelio su hipoksiniu gradientu kūrimas ir pritaikymas imuninių ląstelių egzosomose įterptų priešvėžinių medikamentų efektyvumo tyrimui. Baigiamasis magistro projektas / vadovė vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: glioblastoma; imuninės ląstelės; egzosomos; doksorubicinas; temozolomidas.

Kauas, 2021. 67 p.

Santrauka

Šio magistro baigiamojo darbo tikslas buvo panaudojant žmogaus glioblastomos ląstelių liniją parinkti tinkamas sąlygas glioblastomos 3D *in vitro* modelio su hipoksiniu gradientu kultivavimui ir pritaikyti imuninių ląstelių egzosomose įterptų priešvėžinių vaistų efektyvumo tyrimui. Tikslui pasiekti buvo iškelti šie uždaviniai: 1) suformuoti žmogaus glioblastomos *in vitro* 3D modelį ir įvertinti hipoksinio gradiento susidarymą; 2) išgryninti žmogaus mikroglijos ir monocitų produkuojamas egzosomas ir identifikuoti jas pagal dydį bei specifinius žymenis; 3) įterpti į žmogaus mikroglijos ir monocitų egzosomų sudėtį temozolomidą ir doksorubicino hidrochloridą bei įvertinti įterpimo efektyvumą; 4) įvertinti žmogaus mikroglijos ir monocitų egzosomose įterpto temozolomido ir doksorubicino hidrochlorido poveikį ląstelių metaboliniam aktyvumui bei migracijai suformuotame 3D glioblastomos *in vitro* modelyje.

Glioblastomos 3D modelis buvo formuojamas iš HROG-36 imortalizuotos ląstelių linijos, auginamos apvaliadugniame šulinėlyje ant plono agarozės sluoksnio. Susidaręs glioblastomos sferoidas buvo perkeltas ir kultivuojamas tarpląstelinio užpildo hidrogelyje *Geltrex*. Hipoksinių sričių susidarymas 3D modelyje buvo nustatomas konfokaliu mikroskopu pažymėjus hipoksinėse ląstelėse esančias tiolio grupes su pimonidazolo hidrochloridu, o tada nudažant jas su fluorescuojančiu antikūniu RED 549 Mab1. Egzosomos iš HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų ląstelių terpės buvo išskiriamos polimerinės precipitacijos/centrifugavimo būdu, įvertinamos pagal baltymo kiekį spektrofotometriniu Bradfordo metodu, identifikuojamos pagal dydį dinaminės šviesos sklaidos metodu ir pagal CD9 bei CD81 žymenis imunofermentiniu ELISA metodu. Temozolomidas ir doksorubicinas į egzosomas buvo įterpiami taikant elektroporaciją. Į egzosomas patekusio vaisto kiekis buvo įvertinamas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu bei pagal fluorescencijos intensyvumą (doksorubicinas). Glioblastomos ląstelių metabolinis aktyvumas buvo nustatytas fluorescenciniu *PrestoBlue* metodu. Glioblastomos ląstelių migracija tarpląsteliniam užpilde buvo vertinama šviesiniu mikroskopu, nuotraukos apdorojamos programiniu paketu *ImageJ*. Statistinė duomenų analizė buvo atlikta programa *SigmaPlot 13.0*.

Panaudojant žmogaus HROG-36 ląstelių liniją buvo suformuotas hidrogelyje įkapsuluotas glioblastomos 3D modelis su hipoksiniu 4radient. Monocitų egzosomų daugiausia buvo apie 120 nm, o mikroglijos – apie 90 ir 140 nm dydžio; abiejų ląstelių tipų egzosomose aptikta CD9 ir CD81. Vaisto įterpimas į HMC-3 mikroglijos egzosomas buvo efektyvesnis nei į U937 monocitų egzosomas. Didesnis įterpimo efektyvumas nustatytas naudojant temozolomidą nei doksorubicino hidrochloridą. Monocitų ir mikroglijos egzosomos su įterptais priešvėžiniais medikamentais po 72h reikšmingai sumažino hidrogelyje įkapsuluotuose sferoiduose kultivuojamų glioblastomos ląstelių gyvybingumą bei invazyvumą.

Kulakauskienė, Deimantė. Glioblastoma 3D Model with Hypoxic Gradient Design and Application for Exosome-Encapsulated Anticancer Medicine Efficiency Testing. Master's Final Degree Project / supervisor Senior Researcher PhD Aistė Jekabsone; 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: glioblastoma; immune cells; exosomes; doxorubicin hydrochloride; temozolomide.

Kaunas, 2021. 67 pages.

Summary

The aim of this master thesis project was by using a human glioblastoma cell line to select optimal conditions for the cultivation of a 3D *in vitro* model of glioblastoma with a hypoxic gradient and to apply it for exosome-encapsulated anticancer medicine efficiency testing. To achieve this goal, the following objectives have been set: 1) to create *in vitro* 3D model of human glioblastoma and to evaluate the formation of a hypoxic gradient; 2) to isolate exosomes from human microglia and monocytes and identify them by size and specific markers; 3) to load temozolomide and doxorubicin hydrochloride into human microglial and monocyte exosomes and evaluate drug loading efficiency; 4) to determine the effect of temozolomide and doxorubicin hydrochloride loaded microglial and monocytic exosomes on the metabolic activity and migration of cells in the designed 3D glioblastoma *in vitro* model.

Glioblastoma 3D model was created from HROG-36 immortalized cell line grown in a round-bottom well on a thin layer of agarose. The formed glioblastoma spheroids were encapsulated and cultured in the extracellular matrix hydrogel Geltrex. The formation of hypoxic regions in the glioblastoma 3D model was determined by confocal microscopy, by labelling thiol groups in hypoxic cells with pimonidazole hydrochloride and then staining with fluorescent RED 549 MAb1. Exosomes from HMC-3 microglial and U937 monocyte culture medium were isolated by polymer precipitation/centrifugation technique, evaluated for protein amount by spectrophotometric Bradford assay, characterized for particle size using the dynamic light scattering method, and for CD9 and CD81 markers by ELISA method. Temozolomide and doxorubicin were loaded into the exosomes by electroporation. The amount of the encapsulated medicines was assessed by high-performance liquid chromatography and fluorescence intensity (doxorubicin). The metabolic activity of glioblastoma cells was measured by fluorescent *PrestoBlue* assay. The migration of glioblastoma cells in the extracellular matrix was assessed by light microscopy, and the images were analysed by *ImageJ* software. Statistical data analysis was performed using *SigmaPlot 13.0* software.

Hydrogel encapsulated glioblastoma 3D model with hypoxic gradient was created using human HROG-36 cell line. The typical size of isolated monocyte exosomes was about 120 nm, and of microglial exosomes – about 90 and 140 nm; the exosomes from both cell types had CD9 and CD81. The loading efficiency of the drug into HMC-3 microglial exosomes was higher compared to U937 monocyte exosomes. Better loading efficiency was determined for temozolomide compared to doxorubicin hydrochloride. Exosomes from monocytes and microglia loaded with anticancer drugs significantly reduced metabolic activity and invasiveness of glioblastoma cells cultured in hydrogel-encapsulated spheroids.

Turinys

Paveikslų sąrašas	8
Santrumpų sąrašas	10
Įvadas.....	12
1. Literatūros apžvalga	14
1.1. Galvos smegenų navikų epidemiologija.....	14
1.2. Daugiaformės glioblastomos morfologiniai ypatumai	15
1.3. Imuninės sistemos ląstelių įtaka glioblastomos funkcionavime.....	16
1.4. Daugiaformės glioblastomos diagnostika ir gydymo strategija	17
1.5. Temozolomido priešvėžinis veikimo mechanizmas.....	18
1.6. Doksorubicino hidroklorido priešvėžinis veikimo mechanizmas.....	20
1.7. Ekstraląstelinės pūslelės – ląstelių komunikacijos kelias.....	20
1.8. Egzosomų biogenezė ir struktūrinis sąstatas	21
1.9. Egzosomų taikymas tikslinėje vėžio terapijoje	23
1.10. Farmacinių medikamentų įterpimo į egzomas metodai	24
1.11. Eksperimentiniai glioblastomos tyrimo modeliai.....	25
1.12. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas	27
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	28
2.1. Tyrimams naudotos medžiagos	28
2.2. Tyrimams naudota įranga	29
2.3. Ląstelių kultūrų kultivavimas	29
2.4. Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus įvertinimas Tripano mėliu	30
2.5. Glioblastomos 3D modelio kūrimas	30
2.6. Glioblastomos 3D modelio hipoksinio gradiento analizė imunohistocheminiu metodu.....	31
2.7. Egzosomų gryninimas iš ląstelių mitybinės terpės.....	32
2.8. Egzosomų baltymo koncentracijos įvertinimas spektrofotometriniu Bradfordo metodu.....	32
2.9. Egzosomų charakterizavimas dinaminės šviesos sklaidos metodu	33
2.10. Egzosomų CD9 ir CD81 žymenų raiškos nustatymas ELISA metodu	34
2.11. Vaistinių medžiagų įterpimas į egzomas elektroporacijos metodu.....	36
2.12. Vaistinių medžiagų įterpimo į egzomas nustatymas.....	37
2.13. Glioblastomos ląstelių migracijos tarpląsteliniam užpilde vertinimas	40
2.14. Glioblastomos gyvybingumo ir proliferacijos vertinimas fluorescuojančiu PrestoBlue dažu .	40
2.15. Statistinė duomenų analizė	41
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	42
3.1. Glioblastomos 3D modelio su hipoksiniu gradientu suformavimas.....	42
3.2. Egzosomų pritaikymas vaistų pateikimui.....	43
3.2.1. Imuninių ląstelių egzomosų charakterizavimas pagal dydį.....	43
3.2.2. Imuninių ląstelių egzomosų charakterizavimas pagal CD9 ir CD81 specifinių žymenų raišką.....	44
3.2.3. Į imuninių ląstelių egzomas įterpto temozolomido ir doksorubicino hidroklorido kiekio įvertinimas	45
3.3. Egzosomose įkapsuliuotų vaistų efektyvumo tyrimas panaudojant 3D glioblastomos modelį	48
3.3.1. Imuninių ląstelių egzomosose įterpto temozolomido poveikis glioblastomos ląstelių metaboliniam aktyvumui kultivuojant 3D aplinkoje	48

3.3.2. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto doksorubicino hidrochlorido poveikis glioblastomos ląstelių metaboliniam aktyvumui kultivuojant 3D aplinkoje.....	50
3.3.3. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto temozolomido poveikis glioblastomos ląstelių migracijai kultivuojant 3D aplinkoje.....	51
3.3.4. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto doksorubicino hidrochlorido poveikis glioblastomos ląstelių migracijai kultivuojant 3D aplinkoje.....	54
3.4. Rezultatų apibendrinimas	56
3.5. Rekomendacijos	57
Išvados	58
Literatūros sąrašas	59
Publikacijų sąrašas	67
Priedai.....	68
1 priedas. Baigiamojo projekto rezultatų skelbimas mokslinėje publikacijoje.....	68
2 priedas. Baigiamojo projekto rezultatų skelbimas tarptautinėje gyvybės mokslų konferencijoje Coins 2021.....	69

Paveikslų sąrašas

1 pav. Daugiaformės glioblastomos skiriamieji morfologiniai ypatumai	16
2 pav. Mikroglijos morfologinės formos	17
3 pav. Temozolomido struktūriniai virsmai organizme.....	19
4 pav. Doksorubicino hidrochlorido struktūrinė formulė.....	20
5 pav. Ekstraląstelių pūslelių tipai.....	21
6 pav. Egzosomų biogenezė ir patekimo į ląstelę-taikinį galimi būdai	22
7 pav. Vaisto įterpimas į egzosomų sudėtį inkubacijos metodu.....	24
8 pav. Vaisto įterpimas į egzosomų sudėtį fizikiniais metodais.....	25
9 pav. Ląstelių kultūrų modelinės sistemos.....	26
10 pav. Glioblastomos 3D modelio formavimo pagrindiniai etapai	31
11 pav. Bradfordo metodo kalibracinė kreivė, reikalinga egzosomų koncentracijos pagal bendro baltymo kiekį nustatymui	33
12 pav. ELISA CD9 žymens kalibracinė kreivė, skirta kiekybiškai įvertinti CD9 koncentraciją tiriamuosiuose mėginiuose	35
13 pav. ELISA CD81 žymens kalibracinė kreivė, skirta kiekybiškai įvertinti CD81 koncentraciją tiriamuosiuose mėginiuose	35
14 pav. Elektroporacijos metodo principas	36
15 pav. Temozolomido kalibracinė kreivė, skirta chromatografiškai įvertinti į egzosomas įterpto vaisto kiekį.....	38
16 pav. Doksorubicino hidrochlorido kalibracinė kreivė, skirta chromatografiškai įvertinti į egzosomas įterpto vaisto kiekį.....	38
17 pav. Doksorubicino hidrochlorido kalibracinė kreivė, skirta pagal fluorescencijos intensyvumą įvertinti į egzosomas įterpto vaisto kiekį	39
18 pav. Glioblastomos ląstelių migracijos vertinimo pavyzdys.....	40
19 pav. HROG-36 glioblastomos 3D modelio kūrimo etapai	42
20 pav. Suformuoto HROG-36 glioblastomos 3D modelio hipoksinio gradiento imunocitocheminis įvertinimas	43
21 pav. U937 monocitų egzosomų identifikavimas pagal dydį analizatoriumi Zetasizer Nano	43
22 pav. HMC-3 mikroglijos egzosomų identifikavimas pagal dydį analizatoriumi Zetasizer Nano	44
23 pav. U937 monocitų ir HMC-3 mikroglijos egzosomų specifinių žymenų kiekiai, nustatyti imunofermentiniu ELISA metodu	45
24 pav. HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomų su įterptu temozolomidu tipinė chromatograma vaisto kiekiui nustatyti.....	46
25 pav. HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomų su įterptu doksorubicino hidrochloridu tipinė chromatograma vaisto kiekiui nustatyti	46
26 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, proliferacijos ir metabolinio aktyvumo pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu temozolomidu	49
27 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, proliferacijos ir metabolinio aktyvumo pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu doksorubicino hidrochloridu.....	51
28 pav. Rerezentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su U937 monocitų egzosomose įterptu temozolomidu, vaizdai	52
29 pav. Rerezentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su HMC-3 mikroglijos egzosomose įterptu temozolomidu, vaizdai	52

30 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, migracijos pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu temozolomidu	53
31 pav. Režentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su U937 monocitų egzosomose įterptu doksorubicino hidrochloridu, vaizdai	54
32 pav. Režentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su HMC-3 mikroglijos egzosomose įterptu doksorubicino hidrochloridu, vaizdai	55
33 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, migracijos pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu doksorubicino hidrochloridu	56

Santrumpų sąrašas

CD – diferenciacijos klasteris (angl. *cluster of differentiation*);

CNS – centrinė nervų sistema;

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

DMEM/F12 – ląstelių auginimo terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*);

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

DOX – doksorubicino hidrochloridas;

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

ELISA – imunofermentinis tyrimo metodas (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*);

EP – ekstraląstelinės pūslelės;

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija;

ESCRT – endosominis pasiskirstymo kompleksas, reikalingas transportavimui (angl. *endosomal sorting complex required for transport*);

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

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

HROG-36 – imortalizuota žmogaus glioblastomos ląstelių linija;

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

MGMT – metilguanino-DNR metiltransferazė;

miRNR – mikro ribonukleorūgštis;

mRNR – informacinė ribonukleorūgštis (angl. *messenger ribonucleic acid*);

MVB – daugiapūslelinis kūnelis (angl. *multivesicular body*);

PBS – fosfatinis druskų buferis (angl. *phosphate buffered saline*);

pO₂ – deguonies slėgis;

RNR – ribonukleorūgštis;

RPMI1640 – ląstelių auginimo terpė (angl. *Roswell Park Memorial Institute*);

TAM – su naviku susiję makrofagai (angl. *tumor-associated macrophages*);

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas;

TMZ – temozolomidas;

U937 – imortalizuota žmogaus monocitų linija;

2D modelis – dvidimensinis modelis;

3D modelis – tridimensinis modelis.

Įvadas

Daugiaformė glioblastoma – tai piktybinis, agresyvus ir itin invazyvus galvos smegenų navikas, kurio gydymas klinikinėje praktikoje vis dar laikomas iššūkiu. Pacientų gyvenimo trukmė po diagnozės siekia vos 15 mėnesių, o tai rodo, jog standartinis daugiaformės glioblastomos gydymas yra neefektyvus [1]. Paprastai vartojamas chemoterapinis vaistas temozolomidas (TMZ) skatina vėžinės ląstelės atsparumo išsivystymą. Dėl didelio šalutinio poveikio gyvybiškai svarbiam smegenų audiniui, neįmanoma taikyti pakankamai efektyvių TMZ dozių, kurios pašalintų visas glioblastomos ląsteles. Dėl šios priežasties yra sunaikinamos vaistui jautresnės ląstelės, o atspariosios lieka ir toliau dauginasi, sąlygodamos jau gydymui atsparesnio auglio atsinaujinimą [2]. Priešvėžinių medikamentų taikymas glioblastomos gydymui yra ribojamas naviko lokalizacijos, nes dėl atrankiai laidaus kraujo-smegenų barjero ne visos molekulės gali pasiekti tikslinę vietą. Pavyzdžiui, taip periferijoje yra sulaikomas efektyviai veikiantis doksorubicino hidrochloridas (DOX) [3]. Trumpas sergančiųjų išgyvenamumas dėl gydymo nepakankamumo skatina ieškoti naujų metodų arba tobulinti jau esamas technologijas.

Onkologinių susirgimų gydymui vystomi nauji alternatyvūs metodai, tokie kaip nanotechnologija, imunoterapija bei kamieninių ląstelių terapija [4], tačiau jų efektyvumas vis dėlto yra nepakankamas [5, 6]. Veiksmingos naviko gydymo strategijos paieškose didelį potencialą gali turėti natūraliai organizme susidarančios egzosomos. Tai ląstelių gaminamos ir jų tarpusavio komunikacijoje dalyvaujančios pūslelės, pasižyminčios dideliu stabilumu, gebėjimu nesunkiai pereiti biologinius barjerus bei nesukeliančios imuninių reakcijų. Dėl šių savybių egzosomos tyrinėjamos kaip potencialūs vaistinių molekulių nešikliai organizme [7]. Įrodytas išskirtinai imuninių ląstelių egzosomoms būdingas gebėjimas selektyviai atpažinti vėžines ląsteles ir su jomis susiliesti [8] kelia susidomėjimą jų pritaikymui efektyviam vaisto pernešimui į daugiaformės glioblastomos sritį.

Iki šiol vis dar plačiai ikiklinikiniuose tyrimuose taikomos plokščios vieno sluoksnio ląstelių kultūros neatkartoja natūralių *in vivo* sąlygų. Viena iš pagrindinių priežasčių yra tai, kad plokščiose kultūrose ląstelių aplinkos fizikinės bei cheminės savybės labai skiriasi nuo natūralių – jos sąveikauja su plastikumu arba stiklu, kurių mechaninis tvirtumas žymiai didesnis už natūralių audinių, be to, metabolitų apykaita vyksta tiesiai į terpę arba iš jos, nesusidarant natūraliems barjerams bei gradientams [9]. Šie skirtumai lemia, jog daugelis sukurtų gydymo technologijų, pasiekusios klinikinių tyrimų etapą yra atmetamos dėl nepakankamo efektyvumo. Siekiant dar ikiklinikiniuose tyrimuose užtikrinti kuriamų daugiaformės glioblastomos gydymo galimybių potencialą, būtina sukurti natūralioms sąlygoms artimą glioblastomos ląstelių kultivavimo modelį. Sferinėje būsenoje kultivuojamos glioblastomos ląstelės pasižymi natūraliai audinyje joms būdinga morfologine išvaizda, funkcija, genų ir baltymų raiška, taip pat sąveika tarpusavyje bei su užląsteliniais užpildais [10]. Taigi, toks *in vivo* artimų sąlygų atkartojimas *in vitro* modeliuose gali pagerinti naujai kuriamų daugiaformės glioblastomos gydymo technologijų testavimo efektyvumą.

Darbo tikslas: pritaikant žmogaus glioblastomos ląstelių liniją, parinkti tinkamas sąlygas realistinio glioblastomos 3D *in vitro* modelio su hipoksiniu gradientu kultivavimui ir pritaikyti imuninių ląstelių egzosomose įterptų priešvėžinių vaistų efektyvumo tyrimui.

Darbo uždaviniai:

1. suformuoti žmogaus glioblastomos *in vitro* 3D modelį ir įvertinti hipoksinio gradiento susidarymą;

2. išgryninti žmogaus mikroglijos ir monocitų produkuojamas egzosomas ir identifikuoti jas pagal dydį bei specifinius žymenis;
3. įterpti į žmogaus mikroglijos ir monocitų egzosomų sudėtį temozolomidą ir doksorubicino hidrochloridą bei įvertinti įterpimo efektyvumą;
4. įvertinti žmogaus mikroglijos ir monocitų egzosomose įterpto temozolomido ir doksorubicino hidrochlorido poveikį glioblastomos ląstelių metaboliniam aktyvumui bei migracijai kultivuojant *in vivo* artimose 3D aplinkose.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Galvos smegenų navikų epidemiologija

Navikai galvos smegenų srityje sudaro vos 3 % visų neoplastinių būklių, tačiau dėl specifinės lokalizacijos, jie yra vieni sudėtingiausiai diagnozuojamų ir gydomų onkologinių susirgimų, dažnai tampančių mirties priežastimi [11]. Galvos smegenų neoplazmos nustatomos tiek tarp vaikų, tiek tarp suaugusiųjų, tačiau atitinkamai pagal amžių, jaunesniems pacientams dažniau diagnozuojama policistinė astrocitoma ir meduloblastoma, o suaugusiems – meningioma, glioblastoma bei hipofizės navikai [12]. Taip pat, remiantis statistiniais duomenimis, galvos smegenų navikai dažniau diagnozuojami Vakaruose gyvenantiems žmonėms nei Rytuose. Didžiausias moterų sergamumas yra stebimas Švedijoje, Albanijoje, Serbijoje, Latvijoje, Norvegijoje, o vyrų – Armėnijoje, Albanijoje, Makedonijoje ir Serbijoje. Nustatyta, kad šių navikų formavimasis taip pat priklauso nuo lyties bei rasės – dažniau jie yra diagnozuojami vyrams nei moterims bei baltaodžiams nei afroamerikiečiams [13].

Žinoma, kad galvos smegenų navikų išsivystymui yra reikšmingi įvairūs aplinkos, biologiniai bei genetiniai veiksniai [13]. Pastarieji apima šeimos linijoje paveldimus genetinius sindromus, galinčius padidinti galvos smegenų auglių riziką, tačiau nustatyta, kad tokių rizikos veiksnių procentinė dalis yra nedidelė [12]. Didesnę reikšmę galvos smegenų audinio piktybėjimo procese turi biologiniai veiksniai. Pavyzdžiui, yra nustatyta, jog vėžinėms ląstelėms būdinga imunosupresnių citokinų sekrecija lemia organizmo imuninio atsako nuslopinimą ir dėl to netrukdomą naviko augimą. Taip pat smegenų navikų formavimasis gali suintensyvėti dėl hormonų pusiausvyros sutrikimų [13]. Pagrindinei rizikos veiksnių grupei yra priskiriamas aplinkos poveikis organizmui. Atlikti tyrimai rodo, kad galvos smegenų audinio navikų susidarymas tiesiogiai susijęs su aplinkoje esančios jonizuojančios spinduliuotės intensyvumu. Taip pat reikšmingą įtaką gali turėti ir elektromagnetinis laukas bei mobiliųjų telefonų skleidžiamas radio dažnis [14]. Be to, naviko vystymąsi galvos srityje gali skatinti netinkama ar nesubalansuota mityba, alkoholio vartojimas bei rūkymas [13].

Nuo 1970 metų stebimas reikšmingai augintis galvos smegenų diagnozavimo rodiklis vaikų ir suaugusiųjų populiacijose. Tai siejama su sparčiai besivystančia medicinos pažanga ir naujų bei inovatyvių diagnostikos priemonių, leidžiančių greičiau ir paprasčiau nustatyti supiktybėjusį audinį, atsiradimu [15]. Remiantis 2020 m. publikuota Amna Almutrafi su bendraautorais [16] atlikta 2005-2014 m. sergamumo centrinės nervų sistemos (CNS) navikais studija, kasmet diagnozuojama vis daugiau galvos smegenų navikų, ir šie susirgimai išlieka opia visuomenės problema. Apibendrinti statistiniai vaikų CNS diagnostikos duomenys rodo, kad dažniausiai nustatomos meduloblastomos (iki 27 % visų atvejų) ir policistinės astrocitomos (iki 27 % visų atvejų) bei, retesniais atvejais, endolimomos (iki 12 % visų atvejų) ir didelio laipsnio gliomos (iki 10 % visų atvejų). Šiems navikams jautriausios smegenų anatomicinės dalys yra smegenėlės (iki 46 % visų atvejų) bei smegenų kamienas (iki 26 % visų atvejų). Suaugusiųjų diagnostikos rodiklių analizė rodo panašiai dažnai pasitaikančius meningiomų (iki 29 % visų atvejų) bei glioblastomų atvejus (iki 25 % visų atvejų). Įprastai tokių navikų susiformavimas stebimas supratentorinėje galvos smegenų dalyje, dažniausiai smegenų dangaluose (iki 21 % visų atvejų), kaktinėje (iki 17 % visų atvejų), smilkinio (iki 12 % visų atvejų) bei parietalinėje (iki 10 % visų atvejų) skiltyse [16].

Pagal epidemiologinius duomenis, senstančioje visuomenėje fiksuojamas vis dažnėjantis sergamumas gliomomis. Gliomos – tai piktybiniai galvos smegenų navikai, susiformuojantys

atsiradus glijos audinio pokyčiams. Pagal gliomų histologinį pobūdį, skiriamos mažo piktybiškumo laipsnio gliomos (astrocitoma, oligodendroglioma) bei didelio piktybiškumo laipsnio glioma – glioblastoma [17]. Glioblastomos diagnozavimas, lyginant su kitomis gliomos formomis, yra dažniausias ir siekia net iki 55 % visų atvejų [16].

1.2. Daugiaformės glioblastomos morfologiniai ypatumai

Daugiaformė glioblastoma – tai pirminė CNS neoplazma, susidedanti iš genetiškai ir morfologiškai skirtingų navikinių ląstelių grupių. Įprastai (iki 90 % atvejų) daugiaformė glioblastoma išsivysto *de novo* vykstant sveikų glijos ląstelių kancerogenezei. Tai pirminė glioblastoma, kuriai iki galo susiformuoti šiuo mechanizmu užtrunka iki 3 mėnesių. Rečiau (iki 10 % atvejų) daugiaformė glioblastoma susidaro progresuojant mažo piktybiškumo laipsnio gliomoms – tai ilgas naviko piktybėjimo procesas, trunkantis 4-5 metus. Šis daugiaformės glioblastomos susiformavimo būdas priskiriamas antriniam jos tipui ir paprastai diagnozuojamas vyresniems nei 39 metų pacientams. Antrinė glioblastoma pasižymi lėtesniu vystymosi mechanizmu ir dažniau teigiamu atsaku į gydymą. Nors daugiaformė glioblastoma gali išsivystyti skirtingais molekuliniais mechanizmais, tačiau pilnai susiformovę abu tipai tarpusavyje nesiskiria morfologine sandara [18, 19].

Daugiaformę glioblastomą sudaro mažos, daugiakampės arba verpstės formos ląstelės, kurioms būdingas polimorfizmas, anaplazija (diferenciacijos stoka) bei anizokariozė (branduolio dydžio ir formos variacija). Histologiniuose preparatuose daugiaformės glioblastomos ląstelių citoplazma yra acidofilinė, apribota silpnai išreikštu plazminės membranos kontūru. Ląstelių branduoliai yra ovalūs arba pailgi, turintys sutankėjusias heterochromatino sritis. Branduolių vidinėje struktūroje galima pastebėti daugybę branduolėlių, išsidėstančių centrinėje ir nuo centro nutolusiose branduolio dalyse. Nustatyta, kad kai kurios glioblastomos ląstelės gali turėti daugiau nei vieną branduolį bei tarpbranduolinius intarpus, be to, jų struktūroje gali būti randamos ir vakuolės [20].

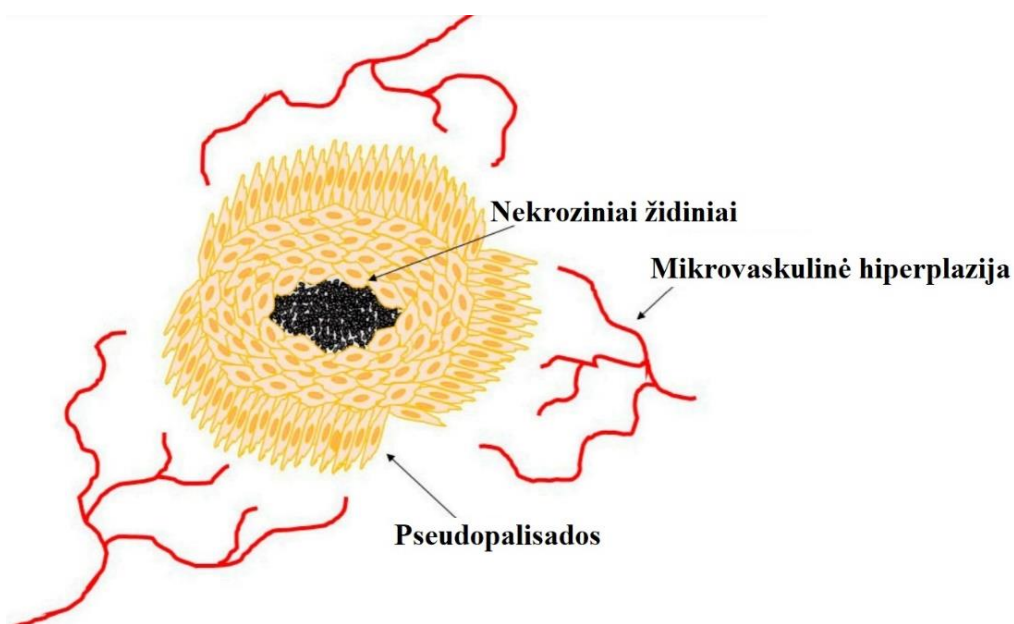
Piktybinių glioblastomos ląstelių sankaupa smegenų audinyje geba aplink save suformuoti tankų kraujagyslių tinklą iš morfologiškai pakitusių, hiperplazinių ir heterogeniškų endotelio ląstelių. Šiose ląstelėse yra aptinkamos sveikoms smegenų endotelio ląstelėms nebūdingos struktūros, tokios kaip *Weibel-Palade* kūneliai [20]. Naviką supančios kraujagyslės yra padengtos plonu, pertraukiamu pericitų monosluoksniu, lemiančiu endotelio anomalijas. Glioblastomą supančių kraujagyslių spindis yra didesnis, o pamatinė membrana storesnė lyginant su sveikame smegenų audinyje esančiomis kraujagyslėmis [21]. Taip pat glioblastomos kraujagyslėse dažnai nustatomi trombai, žalojantys jas sudarančių endotelio ląstelių struktūrą. [20, 21].

Dėl daugiaformės glioblastomos audinį supančio nepastovaus ir morfologiškai netaisyklingo kraujagyslių tinklo prastėja naviko aprūpinimas deguonimi. Dėl šios priežasties deguonies kiekis navikinėse ląstelėse sumažėja iki kritinio lygio ir pasiekia hipoksinę būklę. Hipoksija – tai deguonies slėgio (pO₂) kraujyje sumažėjimas iki mažiau nei 10 mmHg. Nustatyta, kad daugiaformės glioblastomos viduje yra labai daug hipoksinių regionų, iš kurių, dėl deguonies stygiaus pojūčio, naviko ląstelės invazyviai plinta į sveiką smegenų audinį, taip norėdamos išvengti jų funkcionavimui nepalankios mikroaplinkos [21]. Taip pat yra žinoma, kad hipoksijos paveiktos naviko sritys vėliau nekrozuoja sudarydamos vieną iš būdingiausių daugiaformės glioblastomos morfologinių ypatumų – nekrozinis židinius [22].

Nekroziniai židiniai pagal nekrozavusio ploto dydį ir lokalizaciją yra skirstomi į du tipus. Pirminėje glioblastomoje nustatomi dideli nekroziniai židiniai centrinėje naviko dalyje, susidarę dėl

nepakankamos kraujotakos, kuri užtikrintų būtinųjų maisto medžiagų bei deguonies tiekimą. Taip pat pirminės bei antrinės glioblastomos struktūroje dar gali susidaryti ir kelios pavienės, mažesnio ploto nekrozinės vietos. Šie mažesni nekroziniai židiniai paprastai yra apribojami aplink išsidėsčiusių glijos ląstelių – pseudopalisadų [20].

Pseudopalisados – tai tankiai išsidėsčiusios glijos ląstelės, orientuotos aplink nekrozuojančias glioblastomos sritis. Nustatyta, kad pseudopalisados gali būti 30-1500 μm pločio ir 50-3500 μm ilgio. Mažesnėms nei 100 μm pločio pseudopalisadoms yra būdingas labai didelis ląstelių tankumas ir nekrozės centrinėje naviko srityje nebuvimas. Vidutinio dydžio pseudopalisadose (200-400 μm) jau yra stebima centrinė nekrozė bei vakuolizacija, taip pat aptinkamos pavienės mirštančios ląstelės. Didesnėse nei 500 μm pločio pseudopalisadose yra nustatomi dideli nekroziniai židiniai ir susiformavusi kraujagyslė centrinėje dalyje [20]. Daugiaformės glioblastomos morfologinė išvaizda pavaizduota 1 paveikslėlyje.

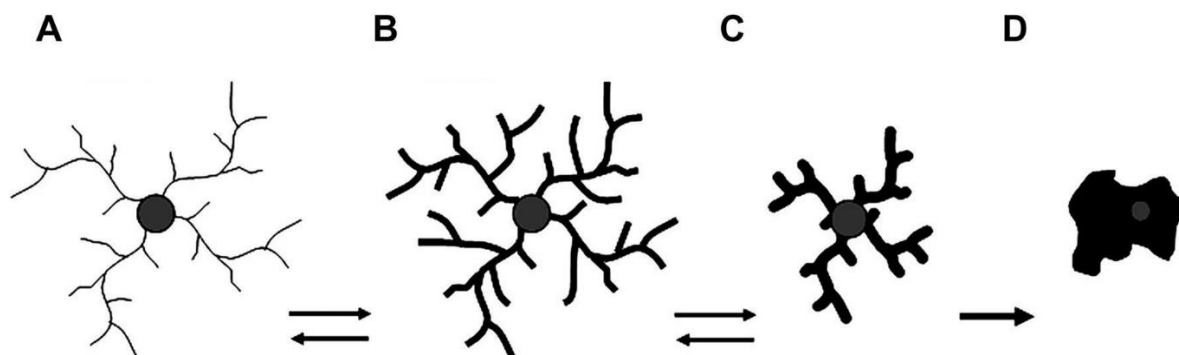


1 pav. Daugiaformės glioblastomos skiriamieji morfologiniai ypatumai. Paveiksle matomi nekroziniai židiniai, naviką supančios glijos ląstelės – pseudopalisados bei mikrovaskulinė hiperplazija. Adaptuota pagal A. R. Monteiro et al., 2017 [21]

1.3. Imuninės sistemos ląstelių įtaka glioblastomos funkcionavime

Dėl atrankiai laidaus kraujo-smegenų barjero CNS yra atskirta nuo periferijoje esančių imuninių ląstelių. Smegenų audinyje kovai su organizmui svetimais patogenais yra susiformavusios unikalios imuninės ląstelės – mikroglia. Mikroglia sudaro 10-15 % glijai priklausančių ląstelių [23], tačiau priešingai nei kitos CNS ląstelės, ji išsivysto iš embriono trynio maišo mezodermos ir kraujotakos sistema paplinta smegenų audinyje dar prieš pilnai susiformuojant kraujo-smegenų barjerui. Ankstyvuojau smegenų vystymosi laikotarpiu mikroglia yra būdinga ameboidinė forma, kuri, pilnai susiformavus CNS, pasikeičia ir įgauna didelį šakotumą aplink mažą ovalų kūną turinčią morfologinę išraišką (2 pav. A) [24]. Tai ramybės būsenoje esanti mikroglia, kuri yra atsakinga už CNS homeostazės palaikymą. Šakota mikroglijos morfologinė forma leidžia ląstelei nejudinant kūno keisti ataugų išsidėstymą erdvėje ir taip vertinti tarpląstelinės aplinkos būklę. Nuolat judančios mikroglijos ataugos greitai sureaguoja smegenų audinyje atsiradus patologiniam veiksniai ir skatina ląstelės morfologinę transformaciją [23]. CNS aplinkoje atsiradus neuronų pažeidimams ar mirštančioms

ląstelėms, mikroglija aktyvuojasi pereinama į hiperšakotą formą (2 pav. B). Vėliau, mažėjant ataugų šakotumo laipsniui, ji tampa reaktyvios formos (2 pav. C), o užsitęsus stimului ataugos pilnai yra įtraukiamos į didėjantį ląstelės kūną, taip įgaunant ameboidinę fagocituojančią morfologinę išraišką (2 pav. D) [25, 26]. Tačiau jeigu mikrogliją aktyvuojantis stimulus nėra labai stiprus, ląstelės struktūrinė transformacija baigiasi ties hiperšakotos formos atsiradimu [26].



2 pav. Mikroglijos morfologinės formos. (A) šakota forma ramybės būsenoje, (B) tarpinė hiperšakota forma, (C) reaktyvi forma, (D) ameboidinė fagocituojanti forma. Adaptuota pagal M. Hinwood et al., 2012 [26]

Kaip ir visiems makrofagams, mikrogliai taip pat yra būdingi skirtingi aktyvacijos fenotipai. Reaguojant į trumpalaikius pavojaus signalus mikroglijos fagocitinis aktyvumas yra nukreiptas į uždegiminių procesų slopinimą ir smegenų audinio regeneraciją (M2 fenotipas), tačiau užsitęsus CNS dirginančiam signalui, mikroglija pereina į smegenų audinio pažaidas sukeliančią būseną (M1 fenotipas). Pastaruoju atveju mikroglija nekontroliuojamai sekretuoja reaktyvius deguonies junginius bei uždegiminius citokinus, kurie kelia pavojų neuronų gyvybingumui. Uždegimo metu krauj-smegenų barjeras tampa pralaidesnis, todėl pažaidos vietoje skatinama periferinių monocitų infiltracija [27, 28]. Monocitai – tai vienbranduolės ląstelės, susidarančios kaulų čiulpuose iš mieloidinės kilmės pirmtako ir cirkuliuojančios kraujotakoje [28]. Reaguodami į aplinkoje atsiradusius patogeninius veiksnius, monocitai per kraujotakos sistemą geba pasiekti pavojaus signalą skleidžiančią vietą ir migruoti iš kraujotakos į tikslinį audinį. Audinyje monocitai diferencijuojasi į didesnes ir fagocituojančias ląsteles – makrofagus. Smegenų audinyje iš periferijos monocitų susidarę makrofagai atlieka mikroglijos funkciją ir kovoja su pavojų CNS keliančiais veiksniais [29].

Glioblastomos mikroaplinkoje yra aptinkamos funkciškai pakitusios imuninės ląstelės, vadinamos su naviku susijusiais makrofagais (angl. *tumor-associated macrophages*, TAM). TAM išsivysto iš smegenų audinyje normaliai funkcionuojančios mikroglijos bei infiltruotų periferinių monocitų ir, kaip ir įprasti makrofagai, geba egzistuoti tiek M1 (naviko augimą slopinančioje), tiek M2 (naviko augimą skatinančioje) formoje. Nustatyta, kad naviko aplinkoje vyraujant M2 fenotipo imuninėms ląstelėms, prognozuojamas sunkesnis glioblastomos atvejis. TAM nuolat palaiko aktyvią komunikaciją su navikinėmis ląstelėmis per citokinų (interleukinų IL-6 ir IL-10 bei transformuojantį augimo veiksnį TGF-β1) sąlygojamus signalinius kelius ir taip skatina šių ląstelių proliferaciją, invaziją bei vaskuliarizaciją [30].

1.4. Daugiaformės glioblastomos diagnostika ir gydymo strategija

Diagnozuoti daugiaformę glioblastomą ankstyvoje stadijoje dažnai yra sudėtinga dėl specifinių simptomų nebuvimo, tačiau ryškiausiai glioblastomos vystymosi pradžią gali apibūdinti stiprus

galvos skausmas ir jaučiamas intrakranijinio slėgio padidėjimas dėl galvos smegenų patinimo, galimos obstrukcijos ir sutrikusio smegenų skysčio nutekėjimo. Taip pat 25 % sergančiųjų ankstyvojoje ir 50 % vėlesnėse stadijose gali būti kankinami traukulių [31]. Pradinei glioblastomos diagnozei yra skiriamas kompiuterinės tomografijos arba magnetinio rezonanso tyrimas. Pastarojo tyrimo metu pacientui suleidžiamas medikamentas, sudėtyje turintis gadolinio joną. Dėl uždegiminių procesų per integralumą praradusį kraujo-smegenų barjerą gadolinis gali patekti į smegenų audinį ir susikaupti ligos paveiktose smegenų zonose taip padidindamas kontrastą vaizdinimo metu. Esant piktybinio naviko formavimosi pėdsakams, magnetinio rezonanso vaizduose matyti netaisyklingos formos, sutankėjęs darinys su nekrozine šerdimi. Nekrozinio židinio identifikavimas – tai svarbiausias histologinis smegenų audinio pokytis, leidžiantis naviką priskirti daugiaformei glioblastomai [32].

Glioblastomos gydymas – tai vienas sudėtingiausių ir rizikingiausių onkologinių gydymų klinikinėje praktikoje. Gydymo sėkmė iki šių dienų dar yra palyginti menka, o pacientų gyvenimo trukmė po diagnozės siekia tik iki 14 mėnesių. Pacientams, kuriems diagnozuojama glioblastoma, pirmiausiai, chirurginių metodų pagalba pašalinama kuo daugiau supiktybėjusio smegenų audinio ir taip panaikinamos pacientams pasireiškiančių traukulių priežastys. Kadangi glioblastoma linkusi invazyviai plisti į aplinkines smegenų sritis, vien chirurginiu būdu panaikinti naviko neįmanoma, o net 80 % pacientų yra stebimas recidyvas 2-3 cm atstumu nuo pašalinto pradinio židinio vietos. Vėliau pacientams skiriama radioterapija naikinti pavienėms glioblastomos ląstelėms. Gydymo radiacija laikas yra stipriai apribotas sudėtingų šalutinių veiksnių, tokių kaip negrįžtami neuronų pažeidimai, prasidėjusi nekrozė sveikuose smegenų regionuose ar ilgainiui išsivystantis tam tikrų navikų atsparumas radiacijai. Daugiaformės glioblastomos gydymo efektyvumas toliau palaikomas taikant chemoterapiją [33].

Daugiaformei glioblastomai naikinti skirti alkilinantys chemoterapiniai medikamentai, tokie kaip lomustinas, karmustinas bei TMZ pasižymi itin dideliu citotoksiškumu, sukeldami organizmui daug nepageidaujamų šalutinių reakcijų. Be to, nustatyta, kad ilgainiui išsivystantis glioblastomos atsparumas šiems preparatams lemia ir pačių vaistų veikimo efektyvumo mažėjimą. Nepaisant to, TMZ dėl didelio priešvėžinio efektyvumo ir toliau aktyviai naudojamas klinikinėje praktikoje ir iki šių dienų laikomas standartiniu chemoterapiniu medikamentu gydyti daugiaformę glioblastomą sergančius pacientus [33].

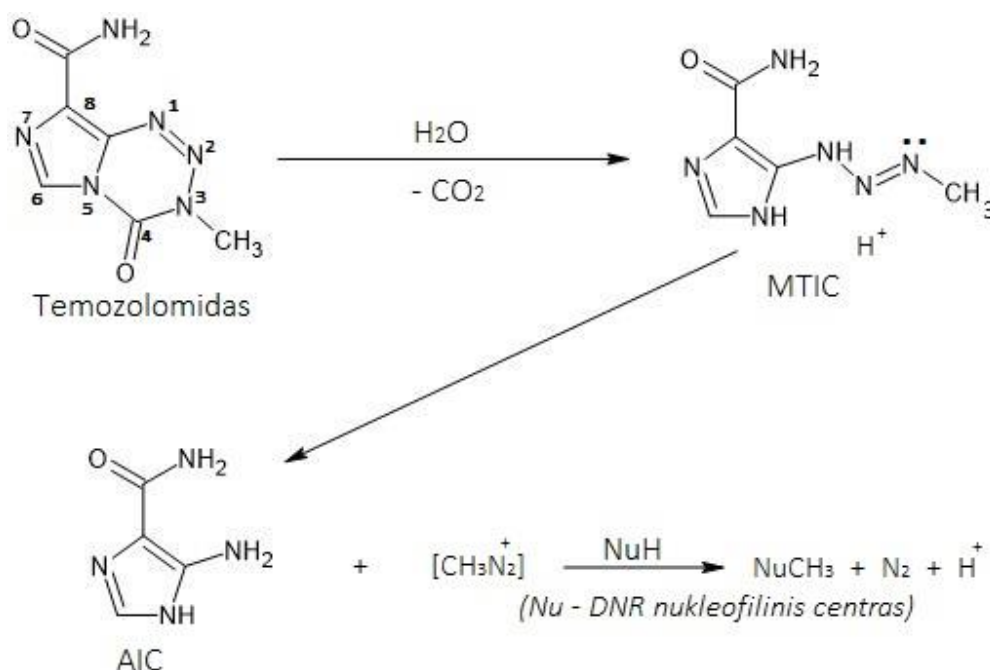
Gera žinoma natūralus, antraciklinų klasei priklausantis antibiotikas DOX pasižymi efektyviu priešvėžiniu poveikiu. Klinikinėje praktikoje DOX taikomas gydant tokius onkologinius susirgimus, kaip šlapimo pūslės, krūties, skrandžio, plaučių, kiaušidžių, skydliaukės ir kitus navikus [34]. Taip pat atlikti *in vitro* tyrimai parodė DOX potencialą naikinant daugiaformę glioblastomą, tačiau dėl fizikinių vaisto savybių, lemiančių ribotą jo praeinamumą per kraujo-smegenų barjerą, jis negali būti taikomas glioblastomos gydymui be specifinio nešiklio [35].

1.5. Temozolomido priešvėžinis veikimo mechanizmas

TMZ – tai imidazolo grupei priklausantis alkiliantis chemoterapinis medikamentas, skirtas gydyti piktybinius galvos smegenų navikus [36]. TMZ priskiriamas provaistų grupei, nes rūgštinėje aplinkoje (kai $\text{pH} < 5$) jis neturi farmakologinio aktyvumo, tačiau patekęs į neutralią ar šarminę terpę (kai $\text{pH} > 7$) patiria struktūrines modifikacijas, kurios lemia priešvėžinių savybių pasireiškimą. Dėl

TMZ molekulės didelio lipofiliškumo per burną ar intraveniniu keliu pavartotas vaistas gerai pereina smegenų-kraujo barjerą ir efektyviai veikia prieš CNS navikus [37].

TMZ struktūriniai virsmi fiziologiniame pH prasideda susidarius monometil triazeno 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-karboksamidui (MTIC), kuris sureagavęs su vandeniu skyla į 5-aminoimidazol-4-karboksiamidą (AIC) ir farmakologiškai aktyvų metildiazonio katijoną (3 pav.) [38]. Metildiazonio katijonas veikia įterpdamas metilo grupes tarp neigiamai įkrautos deoksiribonukleorūgšties (DNR) azotinių bazių. Dažniausiai yra metilinamas adeninas ties N³ atomu arba guaninas ties N⁷ atomu (90 % atvejų), rečiau – guaninas ties O⁶ atomu (10 % atvejų). Susidaręs metiladeninas ar metilguaninas vėliau jungiasi su kita azotine baze, o tokia komplementarumo principų neatitinkanti bazių porų sąveika lemia ląstelės ciklo stabdymą ir pažaidų taisymą. Reparacijos metu vienoje arba abejose DNR grandinėse atsiranda trūkiai, inicijuojantys ląstelės žūtį. Tačiau barjerą TMZ veikimui sudaro natūraliai egzistuojantys kiti savireparacijos mechanizmai, ištaisantys metilintas DNR sritys dar prieš prasidedant apoptozės procesui [39].

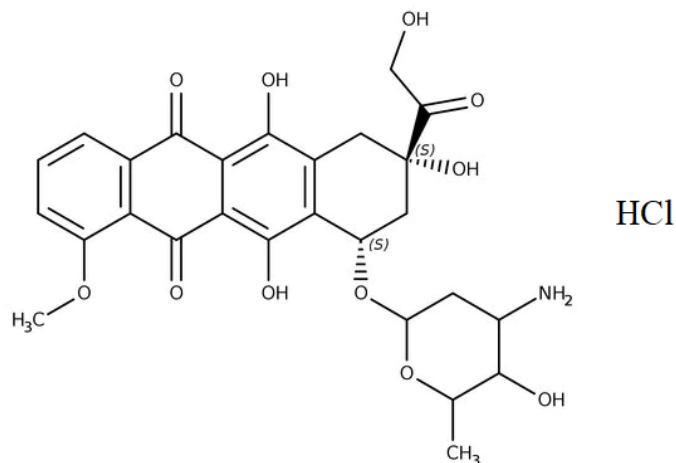


3 pav. Temozolomido struktūriniai virsmi organizme. Fiziologinio pH aplinkoje temozolomidas suskyla į 5-aminoimidazol-4-karboksiamidą (AIC) ir farmakologiškai aktyvų metildiazonio katijoną. Adaptuota pagal J. Zhang et al., 2012 [38]

Vienas svarbiausių TMZ efektyvumą slopinančių veiksnių yra metilguanino-DNR metiltransferazės (MGMT) geno raiška. Esant nemetilintam MGMT geno promotoriui intensyviai sintetinamas MGMT baltymas, kuris geba pašalinti metilo grupę nuo O⁶-metilguanino ir neutralizuoti TMZ sukeltą poveikį. TMZ metilintas N⁷-guaninas ir N³-adeninas gali būti atpažintas ir pataisytas bazių iškirpimo reparacijos (angl. *base excision repair*) keliu veikiant glikozilazėms, endonukleazėms, polimerazėms ir DNR ligazėms. Taip pat DNR sintezės metu veikia nesuporuotų nukleotidų reparacijos mechanizmas (angl. *mismatch repair*), kuris neteisingai susijungusių azotinių bazių vietose formuoja negrįžtamus DNR grandinės trūkius. Šie TMZ veikimą ribojantys mechanizmai yra pagrindinė problema, apsunkinanti daugiaformės glioblastomos gydymą [40].

1.6. Doksorubicino hidrochlorido priešvėžinis veikimo mechanizmas

Siekiant aplenkti TMZ poveikį mažinančius reparacijos mechanizmus ir išlaikyti nemažesnę priešvėžinį efektyvumą yra atliekamos studijos su potencialiu DOX taikymu smegenų navikų gydymui. DOX – tai gamtinės kilmės plačiu chemoterapiniu poveikiu pasižymintis medikamentas, kuris natūraliai susintetinamas vykstant *S. peucetius* bakterijų genties antrinio metabolizmo reakcijoms [41]. DOX molekulės struktūrinis sąstatas sudarytas iš aglikono ir prie jo prisijungusio aminocukraus (daunosamino) (4 pav.) [42].



4 pav. Doksorubicino hidrochlorido struktūrinė formulė

DOX priešvėžinis veikimo aktyvumas pasireiškia gebėjimu įsiterpti tarp DNR azotinių bazių porų, t.y. interkaliuoti DNR. DOX molekulėje esantis antrachinono fragmentas įsiterpia tarp DNR grandinių, o aminocukrus – daunosaminas – prisijungia mažajame DNR griovelyje. Susidaręs DOX ir DNR kompleksas stabilizuojamas naujai besiformuojančiomis vandenilinėmis jungtimis tarp DNR azotinių bazių. Šis procesas lemia polinukleotidinės grandinės iškraipymą, topoizomerazės II aktyvumo pokyčius ir dėl to slopinamą DNR replikaciją bei transkripciją [43]. Be to, DOX citotoksinis aktyvumas gali pasireikšti per sąveiką su ląsteliniu deguonimi, dėl kurios jis oksiduojamas į nestabilų junginį – semichinoną. Šio metabolinio virsmo metu ląstelėje intensyviai generuojami aktyvūs deguonies junginiai, kurie lemia DNR trūkių atsiradimą, baltymų fragmentaciją bei lipidų peroksidaciją [44].

Nepaisant DOX priešvėžinio veikimo efektyvumo, yra identifikuoti ir vaisto sukelti organizmui toksiniai padariniai. Dėl DOX nespecifinės sąveikos, molekulė veikia ne tik vėžinėse, bet ir sveikose ląstelėse. Pastebėta, kad DOX sąveika su kardiomiocitais sukelia itin stiprų nepageidaujamą kardiologinį poveikį [45]. Taip pat, DOX nuslopina kaulų čiulpų funkciją, todėl pacientams dažniau pasireiškia infekciniai susirgimai bei kraujavimas [46]. Be to, DOX taikymas onkologinių susirgimų gydyme galvos smegenų srityje yra apribotas jo menko praeinamumo per kraujo-smegenų barjerą [47].

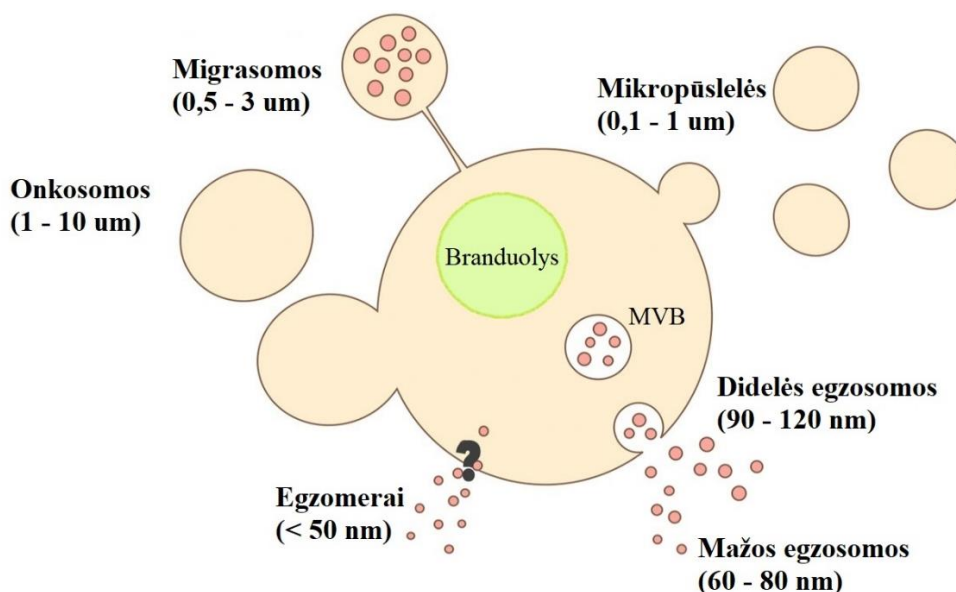
1.7. Ekstraląstelinės pūslelės – ląstelių komunikacijos kelias

Ekstraląstelinės pūslelės (EP) – tai lipidiniu dvisluoksniu apgaubtos pūslelės, generuojamos į tarpląstelinę aplinką bei bioskysčius tiek prokariotinių, tiek eukariotinių ląstelių. Anksčiau tokie dariniai buvo suprantami kaip ląstelinės kilmės „atliekos“, tačiau išsamesnė jų analizė parodė, kad pūslelių struktūroje sukaupti unikalūs baltymų, lipidų bei angliavandenių deriniai veikia kaip

signalinė priemonė perduodant informaciją iš vienos ląstelės kitai. Kiekvienos organizmo ląstelės fiziologinėmis ar pataloginėmis sąlygomis sekretuojamos EP atlieka svarbų vaidmenį ląstelių tarpusavio komunikacijoje, imuninio atsako perdavime, angiogenezėje bei kitų signalinių procesų sužadiniame [48, 49].

Ilgiausiai žinomi bei daugiausiai ištyrinėti yra trys EP tipai: apoptotiniai kūneliai, mikropūslelės bei egzosomos. Apoptotiniai kūneliai – tai 0,5-2 μm dydžio kūneliai, susidarantys iš apoptozės kelių mirštančios ląstelės fragmentų. Šiek tiek mažesnės yra mikropūslelės (100-1000 nm), kurios į tarpląstelinę aplinką atsiskiria pumpuruojant plazminei membranai dalijimosi metu. Egzosomos yra 40-120 nm dydžio pūslelės, vienintelės susiformuojančios ląstelės viduje ir į užląstelinę aplinką išlaisvinamos susiliejus daugiapūsleliniam kūneliui (ang. *multivesicular body*, MVB) su plazmine membrana [48, 50].

Augantis susidomėjimas EP lemia sparčiai intensyvėjančius mokslinius tyrimus šioje srityje. Remiantis naujausiais duomenimis, klasikinė šių pūslelių klasifikacija yra papildyta dar trimis unikalius morfologinius ypatumus turinčiais pūslelių tipais. Egzomerai – tai pačios mažiausios iki šiol identifikuotos EP (<50 nm). Struktūriškai egzomerai nuo kitų pūslelių skiriasi tuo, kad nėra apriboti lipidiniu dvisluoksniu bei yra gausiai praturtinti ląstelių metabolizme dalyvaujančiais baltymais. Taip pat dar yra žinomos migrasomos – tai 0,5-3 μm dydžio ir ovalios formos EP, kurios sudarytos iš daug mažų pūslelių, atsirandančių ląstelės migracijos eigoje. Didžiausias EP – onkosomas – geba sekretuoti vėžinės ląstelės. Jos formuojasi kaip ir mikropūslelės pumpuruojant ląstelės plazminei membranai, o jų dydis gali būti net iki 10 μm [49]. Pagrindiniai EP tipai pavaizduoti 5 paveikslėlyje.

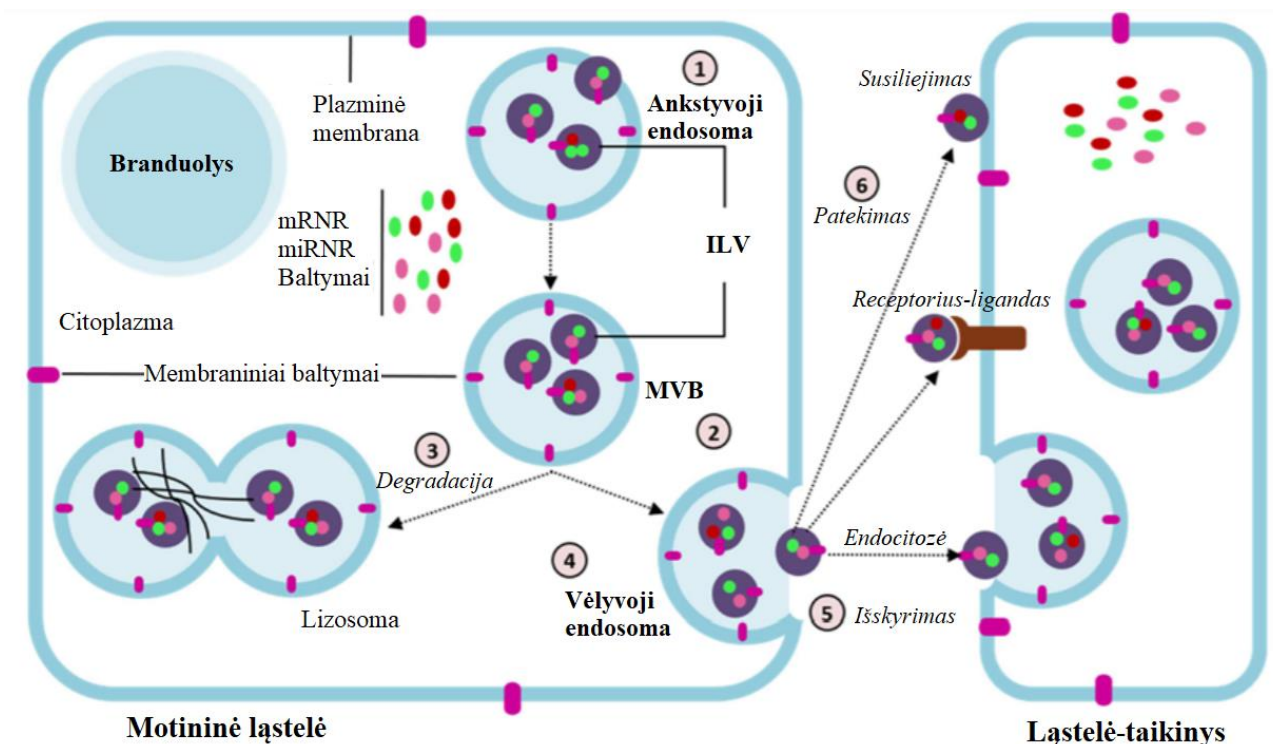


5 pav. Ekstraląstelių pūslelių tipai. Adaptuota pagal S. T. Y. Chuo et al., 2018 [49]

1.8. Egzosomų biogenezė ir struktūrinis sąstatas

Egzosomoms, priešingai nei kitoms EVs, yra būdinga endosominė kilmė, kuri lemia, jog šiose pūslelėse yra sukaupiama daug motininei ląstelei būdingų biomolekulių. Egzosomų formavimasis prasideda iš užląstelinių ir ląstelinių kompartmentų susidarius ankstyvajai endosomai. Brendimo metu endosomos plazminė membrana pumpuruoja į vidinę pusę sudarydama daug mažesnių pūslelių, kurios vadinamos intraluminalinėmis pūslelėmis (angl. *intraluminal vesicles*, ILV). Kiekvienos ILV

viduje surenkami ir apribojami skirtingi ląstelės citozolinių baltymų, lipidų bei nukleorūgščių deriniai. Susidarius daug tokių ILV, ankstyvoji endosoma virsta MVB, kuris gali būti arba nukreipiamas suardymui į lizosomas, arba transformuotis į vėlyvąją endosomą, kuri toliau susilieja su plazmine membrana ir išskiria į užląstelinę aplinką ILV kaip egzosomas [51, 52]. Egzosomos, išskirtos į tarpląstelinę aplinką, gali nukeliauti didelius atstumus iki ląstelės-taikinio ir perduoti jai signalą trimis skirtingais mechanizmais: 1) egzosomos membranai susiliejant su tikslinės ląstelės membrana ir tiesiogiai išlaisvinant egzosomos komponentus ląstelės citoplazmoje; 2) egzosomai veikiant kaip ląstelės membraniniams receptoriams specifiskam ligandui ir inicijuojant nuo receptorių priklausomas signalinės kaskados pradžia; 3) vykstant endocitozei egzosomos į ląstelių vidų patenka ankstyvosios endosomos struktūroje (6 pav.) [52].



6 pav. Egzosomų biogeneze ir patekimo į ląstelę-taikinį galimi būdai. Adaptuota pagal A. A. Patil ir W. J. Rhee, 2019 [52]

MVB susidarymui reikalingos ILV gali formuotis dviem skirtingais molekuliniais būdais. Pirmuoju atveju, ILV susidaryti yra būtinas endosominis pasiskirstymo kompleksas, reikalingas transportavimui (angl. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT). Tai iš maždaug 20 baltymų, pasiskirsčiusių į 4 mažesnius subvienetus (ESCRT-0, -I, -II, -III), sudarytas kompleksas, atsakingas už atitinkamų molekulių supakavimą į ILV. ESCRT-0 geba atpažinti ubiquitinu pažymėtus baltymus ir surūšiuoti juos endosomos membranos paviršiuje. Tuo tarpu, ESCRT-I ir ESCRT-II sukelia endosomos membranos deformaciją skatindami susidaryti jos įlinkiams į endosomos vidų. Galiausiai, ESCRT-III susijungęs su pagalbiniu baltymu Vps4, inicijuoja susidariusių membranos įlinkių atsiskyrimą ir užsivėrimą taip sudarant ILV [53]. Taip pat ILV gali susiformuoti ir nepriklausomai nuo ESCRT veikimo. Šiam mechanizmui yra svarbūs lipidai, tokie kaip keramidas, cholesterolis bei fosfolipazė D2, tetraspaninai diferenciacijos klasteris (angl. *cluster of differentiation*, CD) 63, CD81, TSPAN8 bei šiluminio šoko baltymas HSP70. Lipidai yra atsakingi už edosomos membranos įlinkių susidarymą, o baltymai – už atitinkamų molekulių derinių supakavimą į pūslelių vidų [54].

Nustatyta, kad egzosomų struktūriniame karkase gali būti identifikuojama maždaug 194 skirtingi lipidai, 1639 informacinės ribonukleorūgštys (mRNR) ir 764 mikro ribonukleorūgštys (miRNR) bei 4563 baltymai [55]. Cholesterolis, sfingomielinas, glikosfingolipidai ir fosfatidilserinas yra gausiausiai egzosomų struktūroje aptinkami lipidai. Jie atsakingi ne tik už pūslelės struktūrinės formos palaikymą ir apribojimą nuo išorinės aplinkos poveikio, tačiau jie taip pat dalyvauja egzosomos biogenezės procesuose [56]. Egzosomų struktūroje nustatomos ir nukleorūgštys – mRNR, miRNR bei ilgos nekoduojančios RNR. mRNR gali perduoti informaciją apie aminorūgščių seką naujai sintetinamo baltymo struktūroje, vadinasi, į ląstelę-taikinį patekusi egzosoma su motininei ląstelei būdinga mRNR gali sužadinti ląstelei-taikiniui nebūdingo baltymo sintezę. miRNR geba reguliuoti genų raišką potranskripciniu periodu slopindama arba aktyvindama komplementarias arba pusiau komplementarias sekas turinčios mRNR koduojamo baltymo transliaciją. miRNR taip pat gali sukelti histonų modifikacijas ir DNR promotoriaus regionų metilinimą transkripcijos eigoje [57].

Didžiąją egzosomos struktūros dalį sudaro baltymai, išsidėstę tiek viduje, tiek membranoje. Tetraspaninai (CD9, CD81, CD63, CD82, CD54, CD11b) yra svarbiausi egzosomų membranos baltymai, leidžiantys specifiškai jas identifikuoti. Taip pat egzosomos yra gausiai praturtintos šiluminio šoko baltymais (HSP60, HSP70, HSP90), kurie atlieka šaperonų funkciją ir reguliuoja ląstelės atsaką į aplinkoje esančius dirgilius. Be tetraspaninų ir šiluminio šoko baltymų, egzosomų struktūroje yra sutinkami ir tokie citoplazminiai baltymai, kaip klatrinas, Alix, ubikvitinas, TSG101, Rab ir aneksinai, kurie dalyvauja MVB, o vėliau egzosomos susidarymo procesuose. Egzosomos karkase yra nustatomos ir pagrindinio audinių suderinamumo komplekso I ir II klasės molekulės, dalyvaujančios imunoreguliacijoje reaguojant į antigenines struktūras. Taip pat egzosomoje gausu fermentų (pvz.: baltymų kinazė G, ATPazė, enolazė ir kt.), signalus perduodančių ir net viruso baltymų [55].

1.9. Egzosomų taikymas tikslinėje vėžio terapijoje

Iki šių dienų taikomas tradicinis vėžio gydymas apima naviko židinio šalinimą chirurginės procedūros metu bei palaikomąjį gydymą radio- bei chemoterapijomis [58]. Tokia gydymo strategija pagrįsta greitai besidauginančių vėžinių ląstelių dalijimosi slopinimu. Tačiau organizme natūraliai funkcionuojančios kitos, greitai atsinaujinančios ląstelės, tokios kaip kaulų čiulpų ar plaukų ląstelės, taip pat yra paveikiamos gydymo metu. Tai lemia, kad tradicinė ir nespecifiškai į navikinį audinį nukreipta vėžio terapija sukelia organizmui eilę nepageidaujamų reakcijų bei skatina greitą atsparumo gydymui išsivystymą [59].

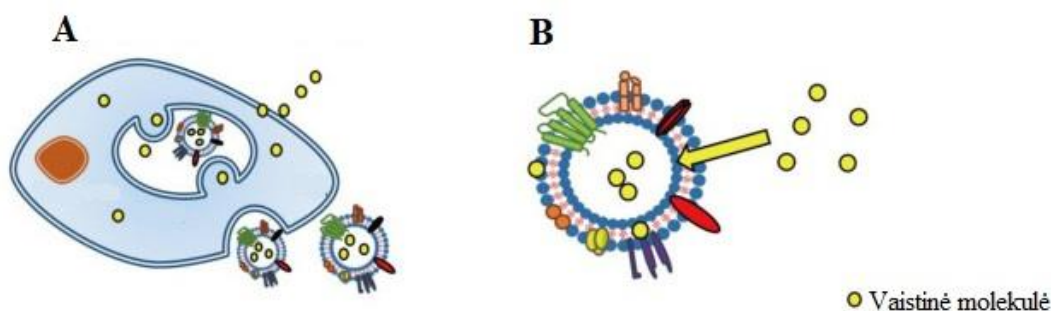
Kadangi onkologiniai susirgimai vis dar yra viena svarbiausių mirties priežasčių žmonių populiacijoje, tai skatina ieškoti alternatyvių ir labiau specifiškų vėžio gydymo metodų. Inovatyvių strategijų vystymui yra svarbu suprasti, kad naviko audinys sudarytas iš mišrios ląstelių populiacijos, kuriai būdingos skirtingos molekulinės savybės, lemiančios nevienodą atsaką į terapiją ir dėl to atsparaus gydymui fenotipo išsivystymą. Dėl šių priežasčių vis plačiau kalbama apie tikslinę vėžio terapiją, kuri priešingai nei tradiciniai gydymo metodai, specifiškai veikia naviką nedarant jokio poveikio aplinkiniams audiniams. Pavyzdžiui, nanomedicinoje itin mažo dydžio dalelės yra panaudojamos kaip chemoterapinių medikamentų nešikliai į naviko sritį, taip užtikrinant vaisto geresnį biologinį praeinamumą ir didesnę koncentraciją pageidaujamoje vietoje [60]. Nepaisant to, sintetinės nanodalelės yra neefektyvios dėl mažos skvarbos į naviko audinį ir prasto užsilaikymo jame [61].

Natūraliai organizme susidarančios nano dydžio egzomosos gali būti pritaikomos efektyviam ir itin specifiskam vaistinių preparatų pernešimui organizme. Lyginant su kitomis nano dalelėmis, tokiomis kaip liposomos, metalų jonai ar polimerai, egzomosos turi daugiau taikymo pranašumų [62]. Pavyzdžiui, natūrali egzosomų kilmė lemia, jog organizme nesužadamos imuninio atsako reakcijos. Be to, paprastai chemoterapiniai medikamentai patys savaime negeba efektyviai kirsti ląstelių plazminių membranų ir taip sukelti norimą poveikį. Egzosomose įterpti vaistai yra apsupti dvigubu lipidų sluoksniu, kuris ne tik pagerina vaisto praeinamumą į ląstelės-taikinio vidų, bet ir apsaugo jį nuo priešlaikio skilimo tarpląstelinėje aplinkoje. Taip pat vaisto, esančio egzomosos viduje, koncentracijos pastovumą iki patekimo į tikslinę vietą užtikrina ir tai, jog egzomosos, cirkuliuodamos kraujotakos sistemoje, pasižymi itin dideliu stabilumu tiek fiziologinėmis, tiek patologinėmis sąlygomis. Visos šios savybės lemia, kad egzomosos yra efektyvi ir veiksminga tikslinės vėžio terapijos priemonė [63, 64].

1.10. Farmacinių medikamentų įterpimo į egzomasas metodai

Egzosomų kaip vaistinių molekulių pernešimo sistemų kūrimas laboratorijoje gali būti atliekamas nuo egzomasos produkuojančių ląstelių priklausomais ir nepriklausomais metodais. Pirmuoju atveju, tikslinė molekulė pirmiausiai patenka į ląstelę, kurios funkcionavimo eigoje viduląsteliniai kompartmentai kartu su vaistu surenkami į egzomosos sąstatą ir sekretuojami į tarpląstelinę aplinką. Nuo egzosomų donorinių ląstelių nepriklausomi metodai apima tiesioginį biologiškai aktyvių junginių įterpimą į jau išgrynintų egzosomų sudėtį [65].

Pats paprasčiausias vaistų įterpimo į egzomasas būdas yra inkubacija, kurios metu dėl koncentracijų skirtumo molekulės iš aplinkos sverbiasi per lipidinį dvisluoksnį. Vaisto molekulės gali būti inkubuojamos mišinyje arba su donorinėmis ląstelėmis, arba tiesiogiai su išgrynintomis egzosomomis (7 pav.). Šis metodas mažiausiai pažeidžia egzosomų membranų integralumą, tačiau lipidinį sluoksnį pereinančio vaisto koncentracija nėra didelė [66].

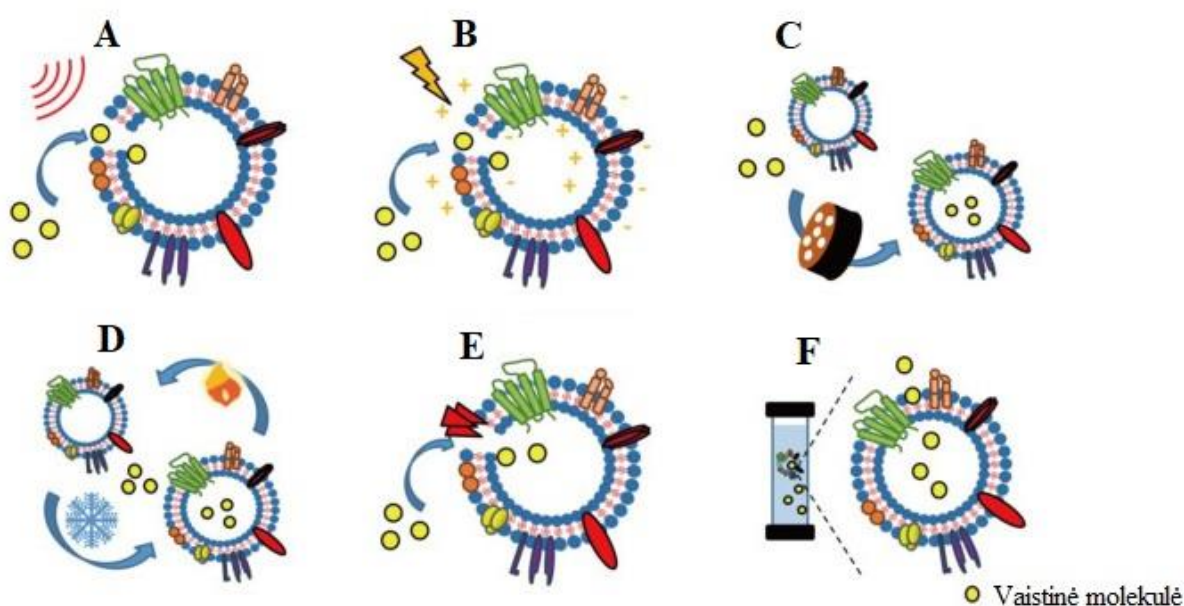


7 pav. Vaisto įterpimas į egzosomų sudėtį inkubacijos metodu. (A) Vaisto inkubacija su egzomasos produkuojančia ląstele, (B) vaisto tiesioginė inkubacija su egzosomomis. Adaptuota pagal S. Fu et al., 2020 [66]

Siekiant padidinti įterpiamo į egzosomų sudėtį vaisto kiekį dažniau taikomi fizikiniai metodai, kurie gali užtikrinti molekulės patekimo efektyvumą formuodami laikinas poras pūslelių membranose. Sonoporavimas – tai vienas iš tokių metodų, kurio veikimo principas remiasi garso bangų energijos gebėjimu susilpninti membranų vientisą struktūrą (8 pav. A). Taip pat mikroporų egzosomų membranose sudarymui gali būti taikoma elektroporacija, kurios metu pūslelės veikiamos trumpais elektros impulsais (8 pav. B). Paprastesnis metodas priversti formuotis įtrūkius membranos

struktūroje yra staigus egzosomų ir vaisto mišinio šildymas-šaldymas (8 pav. D), tačiau šio metodo taikymas yra ribojamas dėl baltymų biologinio aktyvumo mažėjimo ir egzosomų agregacijos padidėjimo [66].

Vaistas į egzosomų sąstatą taip pat gali būti įterpiamas taikant fizikinius metodus, kurie suaktyvina molekulių mainus abipus lipidinio dvisluoksnio. Tokiu veikimo mechanizmu pasižymi ekstruzija, kuriai vykstant medikamentas yra presuojamas su egzosomomis, kol jų membrana subliūkšta ir susimaišo su molekulėmis iš aplinkos (8 pav. C). Taip pat vaisto įterpimui gali būti naudojamos ir paviršiaus aktyvios medžiagos, tokios kaip saponinas ar tritonas, kurios geba sąveikauti su membranų struktūroje esančiomis molekulėmis ir jas suardyti taip sudarydamos ertmes vaistinės molekulės perėjimui (8 pav. E). Dar vienas vaisto molekulės įterpimo į egzosomas sudėtį metodas yra dializė. Egzosomų ir vaisto mišinys yra patalpinamas dializės membranoje ar mėgintuvėlyje ir nuolatos maišomas, kad vaistas patektų į pūslelės vidų (8 pav. F) [66].



8 pav. Vaisto įterpimas į egzosomų sudėtį fizikiniais metodais. (A) Sonoporavimas, (B) elektroporacija, (C) ekstruzija, (D) šildymas-šaldymas, (E) veikimas paviršiaus aktyviomis medžiagomis, (F) dializė. Adaptuota pagal S. Fu et al., 2020 [66]

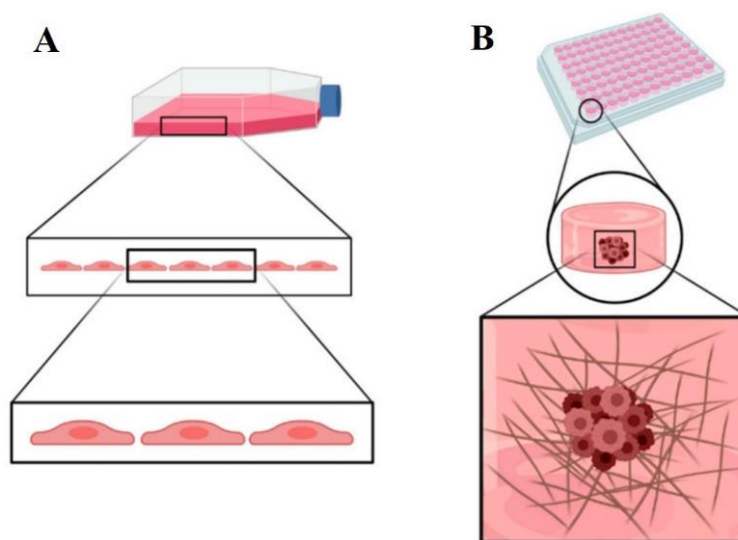
Palyginus visus galimus vaistų įterpimo į egzosomas būdus, elektroporacija pasižymi didžiausiu efektyvumu ir mažiausiai žalos egzosomoms keliamu poveikiu. Šiuo būdu efektyviai padidinamas savaime pro egzosomų membranas nedifunduojančių didesnių vaisto molekulių patekimas į pūslelės vidų. Be to, elektroporacijos procedūra yra nesudėtinga ir nereikalaujanti daug kaštų [67].

1.11. Eksperimentiniai glioblastomos tyrimo modeliai

Žinios bei supratimas apie organizme vykstančius biologinius procesus glaudžiai susijęs su pažanga *in vitro* tyrimuose. Gebėjimas auginti ląsteles ne organizmo aplinkoje suteikia mokslininkams galimybę analizuoti ląstelių biologiją, audinių morfologiją, leidžia nustatyti ligų patogenezės mechanizmus ir potencialius vaistų veikimo kelius. Nuo 1907 metų, kai pirmą kartą laboratorijoje buvo užauginta ląstelių kultūra, yra naudojamos dvidimensinės (2D) modelinės sistemos, kurios sudaromos ląstelėms prikimbant prie indo plastikinio paviršiaus ir suformuojant monosluoksnį. 2D modeliai yra gana paprasti, lengvai analizuojami ir kontroliuojami, o jų suformavimas nereikalauja

itin didelių kaštų, tačiau jie neatspindi tikros ląstelių morfologinės išraiškos, poliškumo ar dalijimosi būdo. Be to, 2D modeliuose neįmanoma atkartoti svarbios ir natūraliai organizme esančios ląstelių sąveikos tarpusavyje ir su užląsteline aplinka. Toks ląstelių kontaktavimas aplinkoje yra itin reikšmingas ląstelių diferenciacijai, proliferacijai, gyvybingumui, genų ir baltymų raiškai, atsakui į dirgiklius bei vaistų poveikiui [68].

Dėl 2D modelio trūkumų buvo ieškomi alternatyvūs metodai, kurie galėtų tiksliau atkartoti natūralias biologines struktūras eksperimentinėje skalėje. 1970 metais pirmą kartą buvo suformuotas tridimensinis (3D) modelis, kurio mikroaplinkos savybės leido išsaugoti natūralią ląstelių formą bei išlaikyti ląstelės-ląstelės bei ląstelės-užląstelinio užpildo sąveikas [68]. Trimačiuose ląstelių kultūrų modeliuose susidaro difuzinis maisto medžiagų bei deguonies gradientas. Šios modelinės sistemos savybės užtikrina, kad *in vitro* sferinėje būsenoje auginamos ląstelės yra artimos natūraliai naviko mikropalinkai [69]. Schematinis 2D ir 3D modelių sistemų palyginimas pavaizduotas 9 paveikslėlyje.



9 pav. Ląstelių kultūrų modelinės sistemos. (A) 2D modelis, (B) 3D modelis. Adaptuota pagal T. Saydé et al., 2021 [69]

Trimatis ląstelių modelis gali būti formuojamas panaudojant matricas ar be jų. Pastaruoju atveju, modelio susidarymas priklauso nuo ląstelių polinkio agreguotis esant tam tinkamoms sąlygoms. Pavyzdžiui, ląstelės geba savaime suformuoti sferinį darinį, kai yra auginamos „kabančiame laše“, taip pat induose, kurių paviršius netinkamas ląstelėms prikibti. Paprastai tokių indų paviršius yra apdorojamas ląstelėms nelipniais sintetiniais (pvz.: poli-2-hidroksietilmetakrilatas) arba natūraliais (pvz.: agarozė) polimerais. Savaiminė ląstelių agregacija dar gali būti paskatinama naudojant magnetinę levitaciją. Šio metodo pritaikymui ląstelių suspensija turi būti sumaišoma su magnetinėmis nanodalelėmis tam, kad vėliau veikiant magnetiniam laukui, ląstelės judėtų nuo indo paviršiaus link mitybinės terpės ir aplinkos sąlyčio ribos ir ten sudarytų sferoidą [70].

3D modelio formavimui naudojamos matricos gali būti natūralios (kolagenas, matrigelis, želatina) arba sintetinės (polietilenglikolis, polilakto rūgštis, poliglikolio rūgštis). Matrica modelio sudarymui pasirenkama atsižvelgus į jos poringumą, laidumą, paviršiaus pobūdį, mechaninį stabilumą ir kitas savybes siekiant atkartoti natūralią organizmo užląstelinę aplinką. Matricų panaudojimas trimačio

modelio sukūrimui užtikrina ląstelių agregato imobilizaciją, pagerina biochemines bei biofizines ląstelių savybes ir suteikia biologiškai aktyvią terpę joms daugintis bei diferencijuotis [70].

1.12. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Daugiaformė glioblastoma – tai agresyvi ir nekontroliuojamai plintanti galvos smegenų navikų forma, kurios gydymas klinikinėje praktikoje yra apribotas dėl sudėtingos lokalizacijos. Remiantis statistine sergančiųjų duomenų analize, vidutinė gyvenimo trukmė po diagnozės paprastai siekia vos iki dviejų metų. Tai rodo, kad šiuo metu taikoma kombinuota daugiaformės glioblastomos gydymo strategija, apimanti chirurginį, chemo- bei radioterapinį gydymą, yra nepakankamai efektyvi [71]. Glioblastomos gydymui naudojamas standartinis chemoterapinis vaistas TMZ, dėl nespecifiško veikimo, sukelia organizmui eilę nepageidaujamų reakcijų [33] ir skatina atsparaus vėžinės ląstelės fenotipo vystymąsi [40]. Kito, efektyviai veikiančio priešvėžinio medikamento DOX vartojimas glioblastomos gydymui yra ribojamas jo fizikinių savybių, trukdančių pareiti kraujo-smegenų barjerą [47].

Efektyvaus daugiaformės glioblastomos gydymo metodo nebuvimas skatina ieškoti inovatyvių technologijų. Šiuo metu intensyviai vystomai tikslinei vėžio terapijai, nukreiptai specifiskai naikinti auglio ląsteles, itin reikšmingas nanodalelių pritaikymas. Deja, sintetiniu būdu sukurtos nanodalelės yra neefektyvios dėl mažos skvarbos į vėžinius audinius ir prasto užsilaikymo juose [61]. Egzosomos – tai natūralios nano dydžio pūslelės, susidaranti palaikyti ląstelių tarpusavio komunikacijai [48]. Lipidiniu dvisluoksniu apgaubtos egzosomos pasižymi itin dideliu stabilumu organizme esant tiek fiziologinėms, tiek patologinėms sąlygoms. Šios pūslelės geba pereiti visus biologinius barjerus ir prasiskverbti į tolimiausius audinius, o dėl natūralios jų kilmės nėra sužadunami imuniniai savisaugos mechanizmai [63]. Taip pat yra nustatyta, kad išskirtinai imuninių ląstelių egzosomos pasižymi gebėjimu atpažinti navikines ląsteles bei efektyviai su jomis susiliesti [8]. Vis dėlto, iki šiol nėra sukurtos egzosomų technologija paremtos terapijos glioblastomos gydymui.

Norint padidinti *in vitro* ikiklinikinių tyrimų efektyvumą, būtina tobulinti glioblastomos eksperimentinius modelius. *In vivo* sąlygoms artimose 3D modelinėse sistemose, priešingai nei iki šiol vis dar plačiai naudojamose plokščiose vieno sluoksnio ląstelių kultūrose, ląstelės pasižymi natūraliai joms būdingu fenotipu, funkcija, genų ir batymų raiška. Taip pat dėl modelyje palaikomos sferinės glioblastomos struktūros, ląstelės gali sąveikauti tarpusavyje bei su užląsteliniu užpildu, be to, vykstant metabolitų apykaitai susidaro natūraliai navikiniame audinyje veikiančys barjerai bei gradientai [69, 72].

Taigi, šio baigiamojo darbo metu suformuotas glioblastomos 3D modelis su hipoksiniu gradientu leis *in vitro* tyrimuose imituoti natūralias glioblastomos fizikines ir chemines savybes. Kuriamos naujos glioblastomos gydymo technologijos bus testuojamos artimomis *in vivo* sąlygomis, todėl jų pritaikymas klinikiniuose tyrimuose turėtų ženkliai padidėti.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimams naudotos medžiagos

1 lentelė. Tyrimams naudotų medžiagų ir jų gamintojų sąrašas

Medžiagos pavadinimas	Gamintojas
DMEM + GlutaMAX ląstelių auginimo terpė	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Veršelio serumas	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Penicilinas-Streptomicinas	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Tripsinas-EDTA	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Fosfatinis druskų buferis	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 ląstelių auginimo terpė	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
DMEM/F12 ląstelių auginimo terpė	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
Tripiano mėlio dažas	Sigma-Aldrich
Total Exosome Isolation reagentas	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Bradfordo reagentas	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Jaučio serumo albuminas	Sigma-Aldrich
Žmogaus CD9 ELISA rinkinys	MyBioSource, JAV
Žmogaus CD81 ELISA rinkinys	MyBioSource, JAV
Temozolomidas	EMD Millipore Corp., JAV
Doksorubicino hidrochloridas	British Pharmacopoeia Commission Laboratory, UK
Agarozė	Sigma-Aldrich
Hypoxypore-Red549 rinkinys	Hypoxypore, Inc
Bisbenzimidio H 33342 trihidrochloridas (Hoechst 33342)	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 98\%$
Geltrex™ tarpląstelinis užpildas	Gibco™, Thermo Fisher Scientific
PrestoBlue™ tirpalas	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Dimetilsulfoksidas	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 99.9\%$
D (+)- Sacharozė	Carl Roth, grynumas $\geq 99.5\%$
Glicerolis	Sigma-Aldrich, grynumas $\geq 99\%$
Trifluoracto rūgštis	Merck (Darmstadt, Germany)
Acetonitrilas	Sigma-Aldrich

Metanolis	Sigma-Aldrich
-----------	---------------

827.2. Tyrimams naudota įranga

2 lentelė. Tyrimams naudotos įrangos bei jos gamintojų sąrašas

Įrangos pavadinimas	Gamintojas
Laminarinio oro srauto spinta	ESCO Class II BSC, Singapūras
Centrifuga	BioSan Centrifuge LMC-4200R, Latvija
Centrifuga	Heraeus Megafuge 16R, Vokietija
Centrifuga	Heraeus Biofuge Pico, Vokietija
Inkubatorius	New Brunswick Galaxy 170S
Hemocitometras	Fuchs-Rosenthal, Vokietija
Šviesinis mikroskopas	Leica Dmi1, Vokietija
Konfokalinis mikroskopas	Olympus Fluoview FV 1000, Japonija
Plokštelių skaitytuvas	Tecan Infinite 200 PRO, Šveicarija
Nanodalelių analizatorius	Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK
Kaitinimo spinta	VWR DRY-Line, Vokietija
Gene Pulser® elektroporatorius	Bio-Rad, JAV
Gene Pulser® elektroporacijos kiuvetės	Bio-Rad, JAV
Exosome Spin Columns (MW 3000)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Magnetinė maišyklė	2mag MIXcontrol 20, Vokietija
Chromatografas su diodų matricos detektoriumi	Waters e2695 Alliance system, Waters, Milford, MA, USA)
Chromatografinė kolonėlė	ACE Super, ACT, UK
Ultragarso vonelė	Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH, Vokietija

2.3. Ląstelių kultūrų kultivavimas

Tyrimams atlikti buvo naudojamos imortalizuotos žmogaus ląstelių linijos: mikrogijos HMC-3 (ATCC® CRL-3304), monocitų U-937 (ATCC® CRL-1593.2) bei glioblastomos ląstelių HROG36 (CLS®) kultūros. Darbai su ląstelėmis buvo atliekami sterilioje laminarinio oro srauto aplinkoje.

HMC-3 ląstelių linija buvo auginama DMEM + GlutaMAX ląstelių auginimo terpėje (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), papildytoje 11,2 % veršelio serumu (angl. *fetal bovine serum*, FBS) bei 1 % penicilino-streptomicino tirpalu (10000 IU/ml-10000 µg/ml). Ląstelių persėjimas buvo vykdomas pagal gamintojo rekomendaciją, 2-3 kartus per savaitę. Ląstelių tankumui pasiekus 90-95 % indo paviršiaus ploto, jos buvo veikiamos 0,25 % (w/v) Tripsino-0,53 mM etileno diamino tetraacto rūgšties (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) tirpalu, kuriame esantis fermentas užtikrina peptidinių jungčių tarp ląstelių monosluoksniui bei indo paviršiaus suskaidymą ties arginino ir lizino C-galais. Tirpalo sudėtyje įeinantis EDTA padidina tripsino fermentinį aktyvumą, neutralizuodamas Ca²⁺ bei Mg²⁺ jonus. Tripsino veikimo efektyvumui įtakos gali turėti mitybinėje terpėje buvusio serumo likučiai, kurie veikia kaip šio fermento inhibitoriai, todėl prieš ląstelių

paveikimą tripsino tirpalu, rekomenduojama ląstelių monosluoksniį bent kartą nuplauti su fosfatiniu druskų buferiu (angl. *phosphate buffered saline*, PBS). Ląstelėms atkibus nuo indo paviršiaus, tripsinas buvo inaktyvuojamas mitybine terpe ir kartu jos sudėtyje esančiu veršelio serumu. Ląstelių atskyrimui nuo tripsino likučių buvo vykdomas centrifugavimas 130 x g 5 min. Po centrifugavimo pašalinus supernatantą, ląstelės buvo suspenduojamos naujoje mitybinėje terpėje, užsėjamos į audinių kultūrų indus ir auginamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂.

U-937 monocitų ląstelių kultūra buvo kultivuojama RPMI 1640 ląstelių auginimo terpėje (angl. *Roswell Park Memorial Institute*), papildytoje 10 % FBS bei 1 % penicilino-streptomicino tirpalu (10000 IU/ml-10000 µg/ml). Mitybinės terpės pakeitimas buvo vykdomas 3-4 kartus per savaitę atsižvelgus į ląstelių tankumą. Ląstelių skaičius ir gyvybingumas buvo vertinamas dalį jų nudažius Tripano mėliu ir užpildžius šiuo ląstelių ir dažo mišiniu hemocitometro kamera, kurią vėliau buvo galima analizuoti šviesiniu mikroskopu (žr. 2.4.). Ląstelių tankumas mitybinėje terpėje buvo palaikomas pagal gamintojo rekomendaciją – 1×10^5 - 2×10^6 gyvybingų ląstelių mililitre. U-937 ląstelių linijos sukonzentravimui arba visiškam terpės pakeitimui buvo taikomas centrifugavimas 130 x g 5 min. Monocitų linija buvo auginama 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂.

HROG-36 glioblastomos linija buvo auginama DMEM/F12 auginimo terpėje (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*), papildytoje 10 % FBS bei 1% penicilino-streptomicino tirpalu (10000 IU/ml-10000 µg/ml). Ląstelėms mitybinė terpė buvo keičiama 1-2 kartus per savaitę. Persėjimo procedūros metu, kaip ir mikroglijos HMC-3 ląstelių atveju, suardyti tarp audinių kultūrų indo ir ląstelių susidariusias jungtis buvo naudojamas 0,05 % (w/v) Tripsino-0,53 mM EDTA tirpalas. Ląstelėms atkibus nuo indo paviršiaus, fermentas buvo inhibuojamas mitybine terpe, o jo likučiai pašalinami centrifuguojant 200 x g 5 min. HROG-36 ląstelių linija buvo kultivuojama audinių kultūrų induose ir auginama 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂.

2.4. Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus įvertinimas Tripano mėliu

Bendram ląstelių skaičiui nustatyti ir žuvusių bei sveikų ląstelių santykiui įvertinti buvo naudojamas 0,4 % Tripano mėlio dažas. Toks ląstelių skaičiavimo principas yra paremtas sveikų ir pažeistų ląstelių membranų vientisumo skirtumu. Sveikų ląstelių plazminė membrana yra vientisa, todėl dažas negali pereiti per membraną ir patekti į ląstelės vidų. Priešingai, pažeistų ląstelių membranos yra praradusios vientisumą, todėl Tripano mėlio molekulės iš tarpląstelinės aplinkos, kurioje jų koncentracija didesnė, pradeda skverbtis pro pažeistas ląstelių membranas ir susikaupia jų viduje.

Tripano mėlis su ląstelių suspensija buvo sumaišomi santykiu 1:1, o tada šiuo mišiniu buvo užpildoma hemocitometro kamera. Hemocitometro kameros vaizdas buvo vertinamas šviesiniu mikroskopu. Norint nustatyti mirusių (nusidažusių, mėlynų) ir gyvų (nenusidažusių, baltų) ląstelių skaičių, jos turėjo būti suskaičiuojamos visuose 16-oje hemocitometro kameros kvadratu. Gauta ląstelių suma buvo dauginama 2 kartus, taip atsižvelgta į ląstelių suspensijos skiedimų skaičių ir 5000 kartų, taip įvertinta vieno kvadrato tūrio dalis mililitre. Gautas rezultatas rodė skaičiuojamų ląstelių kiekį viename mililitre.

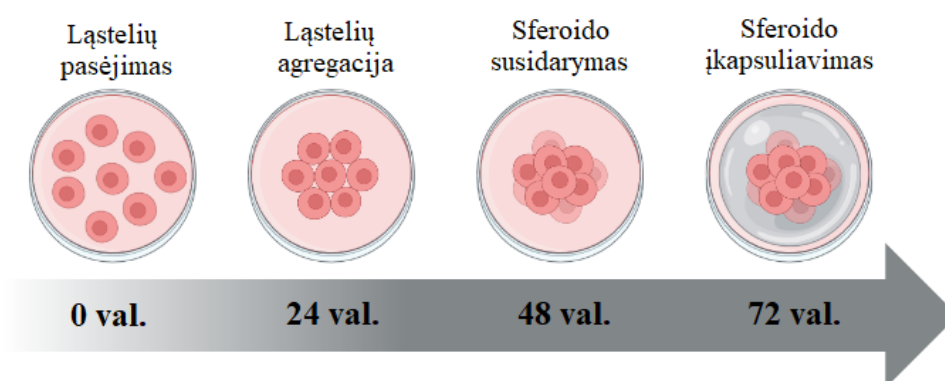
2.5. Glioblastomos 3D modelio kūrimas

Glioblastomos 3D modelis buvo kuriamas naudojant HROG-36 ląstelių liniją. Sferoidų suformavimui buvo panaudojamos apvaliadugnių 96 šulinėlių lėkštelės, kurios prieš ląstelių užsėjimą buvo padengiamos plonu 2% agarozės sluoksniu. Agarozė panaudojama sferoidų kūrimui dėl gebėjimo

sumažinti ląstelių auginimo indo paviršiaus adhezinės savybes. Dėl šios priežasties, inde patalpintos ląstelės negali sąveikauti su paviršiumi, todėl formuoja organoidinę 3D struktūrą. Sterilumui užtikrinti bei ištirpinti agarozei, paruoštas 2% tirpalas buvo kaitinamas 30 min. 120 °C temperatūroje. Karštas agarozės tirpalas laminarinio oro traukos spintoje buvo išpilstomas po 100 µl į kiekvieną šulinėlį. Praėjus mažiau nei 30 sekundžių, nespėjusios sustingti agarozės likučiai buvo nedelsiant atsargiai pašalinami iš šulinėlių su automatine pipete.

Prieš sėjimą į agarozę padengtus apvaliadugnius šulinėlius, glioblastoma buvo surenkama iš ląstelių auginimo indo, o gauta suspensija nucentrifuguojama (žr. 2.3.). Toliau buvo įvertinamas ląstelių skaičius su Tripano mėliu bei hemocitometru (žr. 2.4.). Į vieną šulinėlį (paviršiaus plotas 0,32 cm²) buvo sėjama po 10 000 ląstelių. Ląstelių sukonzentravimui šulinėlio centrinėje dalyje, lėkštelė buvo centrifuguojama 280 x g 7 min. Glioblastomos pavienių ląstelių agregacijai ir sferinės struktūros sudarymui, ląstelės buvo inkubuojamos 37 °C temperatūroje esant 5 % CO₂, 48 val.

Praėjus 48 val. inkubaciniam periodui, sferoidas buvo perkeliamas į tarpląstelinį užpildą Geltrex™. Tai tirpi pamatinės membranos forma, sudaryta iš IV tipo kolageno, laminino ir heparansulfato turinčių proteoglikanų. Šių komponentų mišinys užtikrina sferoido struktūrinio pagrindo sudarymą ir leidžia *in vitro* sąlygomis palaikyti natūraliam audiniui artimą ląstelių fenotipą ir funkcijas. Prieš naudojimą Geltrex™ tarpląstelinis užpildas turėjo būti lėtai atšildomas 2-8 °C temperatūroje. Siekiant palaikyti Geltrex™ skystoje formoje, išpilstymo į plokščiadugnių šulinėlių lėkšteles (arba konfokazines lėkštelės vaizdinimo atveju) metu jis buvo laikomas ant ledu. Kiekvienas šulinėlis, padengtas Geltrex™ užpildu (100 µl/cm²) buvo inkubuojamas 30 min. 37 °C temperatūroje tam, kad gelis sustingtų. Po inkubacijos, šulinėliuose, kuriuose formuojami sferoidai, esanti mitybinė terpė buvo atsargiai sumaišoma su automatine pipete. Maišymo metu judinama terpė lemė sferoido perėjimą iš dugno į šulinėlio paviršių, todėl su 50 µl pipetės antgaliu buvo galima jį perkelti ant tarpląstelinio užpildo. Perkeltas sferoidas su šiek tiek mitybinės terpės buvo inkubuojamas 37 °C temperatūroje, 15-30 min., o jam įsitvirtinus tarpląsteliniam užpilde, šulinėliai buvo papildomi mitybine terpe iki 200 µl/0,32 cm² ir toliau inkubuojami 37 °C temperatūroje esant 5% CO₂, 24 val. Sferoido skersmens dydis buvo monitoruojamas šviesiniu mikroskopu kiekvieną auginimo dieną. Pagrindiniai modelio formavimo etapai vaizduojami 10 paveikslėlyje.



10 pav. Glioblastomos 3D modelio formavimo pagrindiniai etapai

2.6. Glioblastomos 3D modelio hipoksinio gradiento analizė imunohistocheminiu metodu

In vivo sąlygomis naviko progresavimo eigoje yra identifikuojami hipoksiniai regionai, todėl *in vitro* suformuotame aukšto piktybiškumo laipsnio glioblastomos 3D modelyje ši savybė taip pat turėjo atsispindėti. Hipoksinių sričių nustatymui buvo panaudojamas Hypoxyprobe™ RED 549 rinkinys,

kurio sudėtyje buvo hipoksijos žymuo pimonidazolo hidrochloridas bei fluorogeninis RED 549 dažas, konjuguotas su pelės IgG1 monokloniniu antikūniu MAb1. Pimonidazolo hidrochloridas geba susiristi su baltymų, aminorūgščių ar peptidų tiolio grupėmis ir sudaryti stabilius junginius, kai ląstelėje jaučiamas deguonies stygius, o pO₂ yra mažiau nei 10 mmHg. Šiuos pimonidazolo hidrochlorido kompleksus su tiolio grupėmis atpažįsta ir pažymi RED 549 MAb1, todėl jo fluorescencinis atsakas gali būti detektuojamas esant bangai, kurios sužadinimas yra iki 562 nm, o emisija – iki 576 nm.

Hipoksinio gradiento analizei HROG-36 ląstelių linijos 3D modelinė sistema buvo formuojama vaizdinimui skirtose konfokalinėse lėkštelėse. Pirmiausiai, sferoidai buvo paveikiami 200 μM pimonidazolo hidrochloridu 2 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, nesusirėšusio hipoksijos žymens likučiai buvo pašalinami plaunant su PBS. Vėliau, 2 val. 37 °C temperatūroje, saugant nuo tiesioginės šviesos poveikio sferoidai buvo inkubuojami su RED 549 MAb1 (20 μg/ml) ir taip pažymimi hipoksinėse ląstelėse susidarę pimonidazolo hidrochlorido kompleksai su tiolio grupėmis. Dažo perteklius po inkubacijos buvo pašalinamas lėkštelę plaunant su PBS 3 kartus.

Glioblastomos ląstelių branduoliams pažymėti buvo atliekama 15 min. inkubacija tamsoje, kambario temperatūroje su 10 mM Hoechst 33342 fluorescuojančiu dažu. Jo perteklius vėliau pašalintas plaunant su PBS. Imunocitochemiškai pažymėti sferoidai buvo vaizdinami konfokaliniu mikroskopu. Gautos nuotraukos buvo apdorojamos programiniu paketu *ImageJ*.

2.7. Egzosomų gryninimas iš ląstelių mitybinės terpės

Remiantis literatūroje pateiktais duomenimis žinoma, kad FBS sudėtyje yra gausu egzosomų [73], todėl norint išgryninti tik ląstelių išskirtas nano dydžio pūsleles, būtina iš mitybinės terpės sudėties pašalinti serumą. Monocitai (400 000 ląstelių/ml tankumu) įprastomis augimo sąlygomis buvo kultivuojami beseruminėje terpėje 72 val. Mikroglijos ląstelės (300 000 ląstelių/ml tankumu) buvo auginamos rotuojant beseruminėje terpėje 48 val. Po atitinkamai kiekvienai ląstelių linijai taikomo periodo beseruminėje terpėje, ląstelių mitybinė terpė buvo surinkta ir nucentrifuguota 3000 x g 15 min. Centrifugavimo metu buvo pašalintos ląstelinės kilmės nuolaužos ir didesni neląsteliniai komponentai. Atskirtas supernatantas buvo filtruojamas per 0,22 μm poros dydžio filtrą, taip užtikrinant, kad mitybinėje terpėje neliko didesnių nei egzosomų specifiniam dydžiui būdingų dalelių.

Paruošta ląstelių mitybinė terpė buvo sumaišoma su *Total Exosome Isolation* reagentu santykiu 1:2 ir inkubuojama ne mažiau nei 12 valandų 2-8 °C temperatūroje. Po inkubacijos, mišinys buvo centrifuguojamas 10 000 x g 60 min. esant 2-8 °C temperatūrai. Inkubacijos metu reagentas veikia susirišdamas su vandens molekulėmis, todėl centrifuguojant net ir nedideliais greičiais nusodinami mažiau tirpūs komponentai, tokie kaip egzosomos. Po centrifugavimo supernatantas buvo pašalintas, o mėgintuvėlio dugne nusėdusios egzosomos suspenduotos PBS. Taip paruoštos egzosomos buvo saugomos –20 °C temperatūroje ne ilgiau nei 3 mėn.

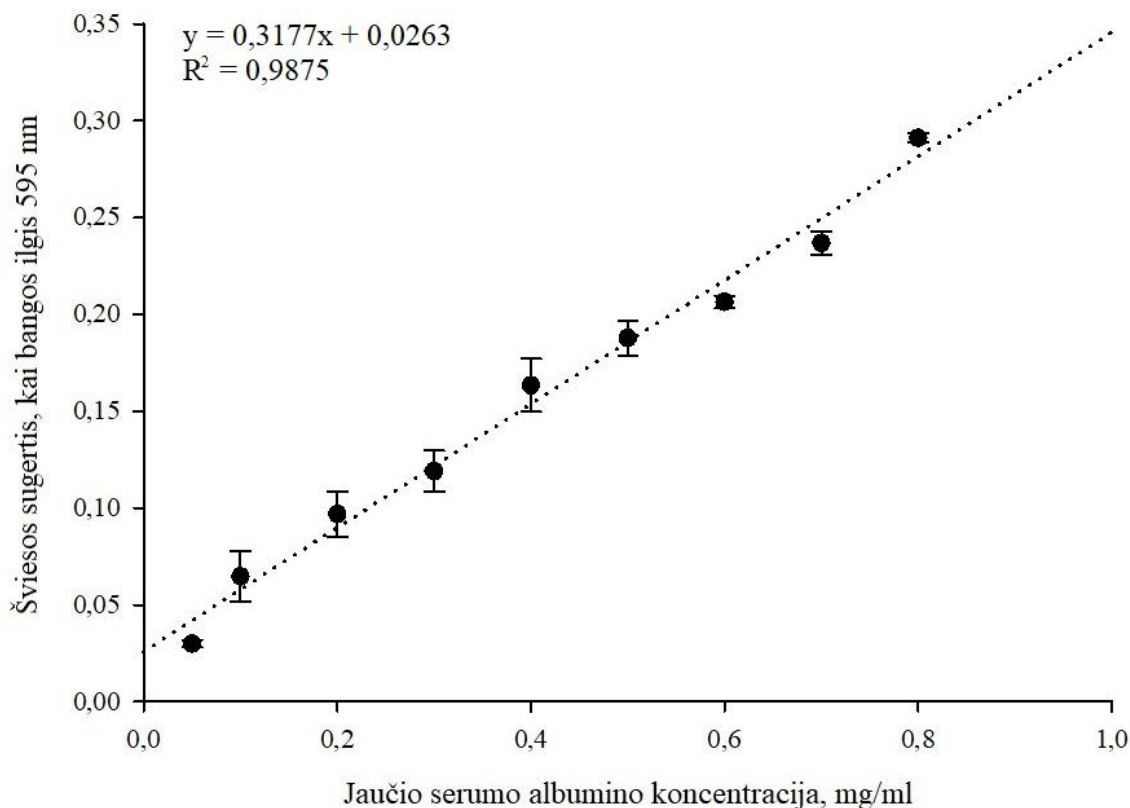
2.8. Egzosomų baltymo koncentracijos įvertinimas spektrofotometrinio Bradfordo metodu

Eksperimentiniuose tyrimuose egzosomų koncentracija buvo vertinama pagal bendrą egzosomų baltymo kiekį, nustatytą kiekybiniu Bradfordo metodu. Raudonai rudos spalvos Bradfordo reagento pagrindinis sudedamasis komponentas yra Kumasi brilliantinis mėlis G-250, ištirpintas fosforo rūgštyje. Šis junginys sąveikauja su mėginyje esančiomis bazinėmis ar aromatinėmis aminorūgštimis

ir lemia atitinkamo intensyvumo dažo spalvos pokytį iš raudonai rudos į mėlyną spalvą. Baltymo koncentracija nustatoma spektrofotometriškai išmatuojant 595 nm bangos ilgio šviesos sugertį.

Prieš spektrofotometrinę analizę, egzosomų mėginiai buvo maišomi su 0,1% detergento Triton X-100 (santykiu 9:1). Detergentas veikia ardydamas egzosomų lipidinį dvisluoksnį ir taip užtikrina, kad matavimo metu yra aptinkami ne tik transmembraniniai, bet ir viduląsteliniai egzosomų baltymai. Ardymo efektyvumui padidinti, mėginiai su detergentu buvo inkubuojami 15 min. 2-8 °C temperatūroje. Vėliau 10 µL mėginio buvo sumaišoma su 190 µL Bradfordo reagento 96-šulinėlių lėkštelėje, kuri prieš šviesos sugerties matavimą daugiafunkciniu plokštelių skaitytuvu buvo inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje saugant nuo tiesioginės šviesos poveikio.

Bendram baltymo kiekiui mėginyje nustatyti buvo sudaroma kalibracinė kreivė matuojant žinomos koncentracijos (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 ir 0,8 mg/ml) jaučio serumo albumino tirpalų šviesos sugertis (11 pav.). Remiantis šia kreive, buvo išvesta linijinės regresijos lygtis, kuri leido tiriamuose mėginiuose kiekybiškai įvertinti bendrą baltymo kiekį pagal formulę $x = \frac{y - 0,0263}{0,3177}$, kurioje x – baltymo koncentracija tiriamajame mėginyje (mg/ml), y – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.



11 pav. Bradfordo metodo kalibracinė kreivė, reikalinga egzosomų koncentracijos pagal bendro baltymo kiekį nustatymui

2.9. Egzosomų charakterizavimas dinaminės šviesos sklaidos metodu

Iš ląstelių mitybinės terpės išgrynintos egzosomos buvo charakterizuojamos pagal dydį dinaminės šviesos sklaidos metodu nanodalelių analizatoriumi. Taikant šį metodą dalelių dydis nėra tiesiogiai išmatuojamas, jis yra sumodeliuojamas pagal dalelių gebėjimą išsklaidytą šviesą. PBS praskiestas egzosomų mėginys buvo perkeliamas į vienkartinę kiuvetę, tirpalu užpildant bent 1 cm kiuvetės

aukščio. Į nanodalelių analizatoriuje patalpintą kiuvetę su egzosomų mėginiu buvo nukreipiama lazerio šviesa, kuri dėl dalelių Brauno judėjimo buvo išsklaidoma. Dalelių judėjimo sukeltų skirtingo intensyvumo signalo amplitudžių analizė leido nustatyti transliacinį difuzijos koeficientą. Šis koeficientas yra susijęs su dalelių hidrodinaminiu skersmeniu, todėl taikant Stokso-Einšteino lygtį galima apskaičiuoti mėginyje esančių dalelių dydį [74]. Kiekvienas egzosomų mėginys buvo įvertinamas atlikus 5 atskirus matavimus, kurie analizatoriaus programoje buvo apdorojami ir suvidurkinami bei pateikiami su standartiniu nuokrypiu.

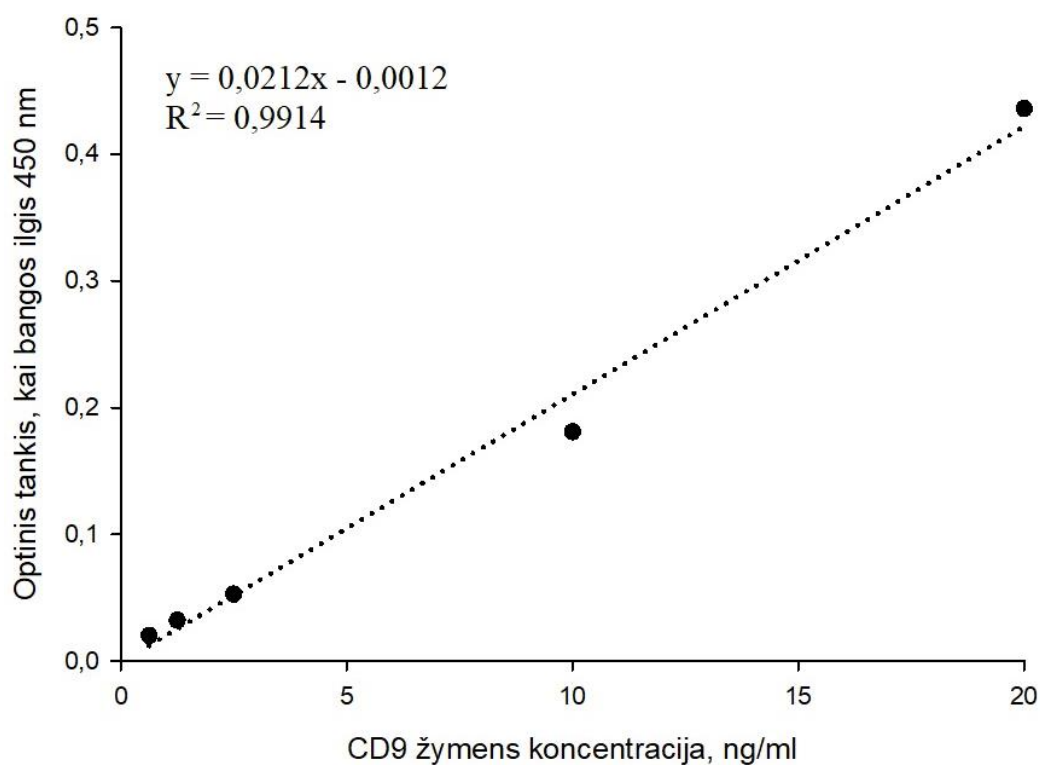
2.10. Egzosomų CD9 ir CD81 žymenų raiškos nustatymas ELISA metodu

ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – tai imunofermentinis tyrimo metodas, leidžiantis identifikuoti specifinio antigeno buvimą tiriamajame mėginyje. Žmogaus muninių ląstelių egzosomos buvo charakterizuojamos pagal būdingiausias gyvūninės kilmės egzosomoms žymenis, CD9 ir CD81. Šiuo tikslu buvo naudojami žmogaus CD9 ir CD81 validuoti ELISA rinkiniai. ELISA metodas pagrįstas susidarančia antikūno-antigeno sąveika pagal „sumuštinio“ principą, t.y. antikūnas, nukreiptas prieš specifinį žymenį, iš anksto yra imobilizuotas 96-šulinėlių lėkštelėje, todėl pridėjus tiriamojo egzosomų mėginio jame esantis žymuo turi sąveikauti su antikūnu šulinėlio dugne. Vėliau, egzosomų žymuo kaip antigenas atpažįstamas pridėjus su biotinu konjuguotą antrinį antikūną. Biotino molekulė reikalinga tolimesnei sąveikai su streptavidinu (CD9 nustatymo atveju) arba avidinu (CD81 nustatymo atveju), konjuguotu su krienų peroksidazės fermentu. Šio fermento detekcijai naudojamas substratas 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas (TMB), kuris prisijungęs katalizuoja krienų peroksidazę ir lemia tiriamojo mėginio spalvos pasikeitimą iš bespalvės į mėlyną. Reakcija sustabdoma paveikus specialiu rūgštiniu tirpalu, kuris mėlyną mėginio spalvą pakeičia į geltoną, o 450 nm bangos ilgio šviesos intensyvumas (optinis tankis) įvertinamas spektrofotometriniu režimu veikiančiu plokštelių skaitytuvu.

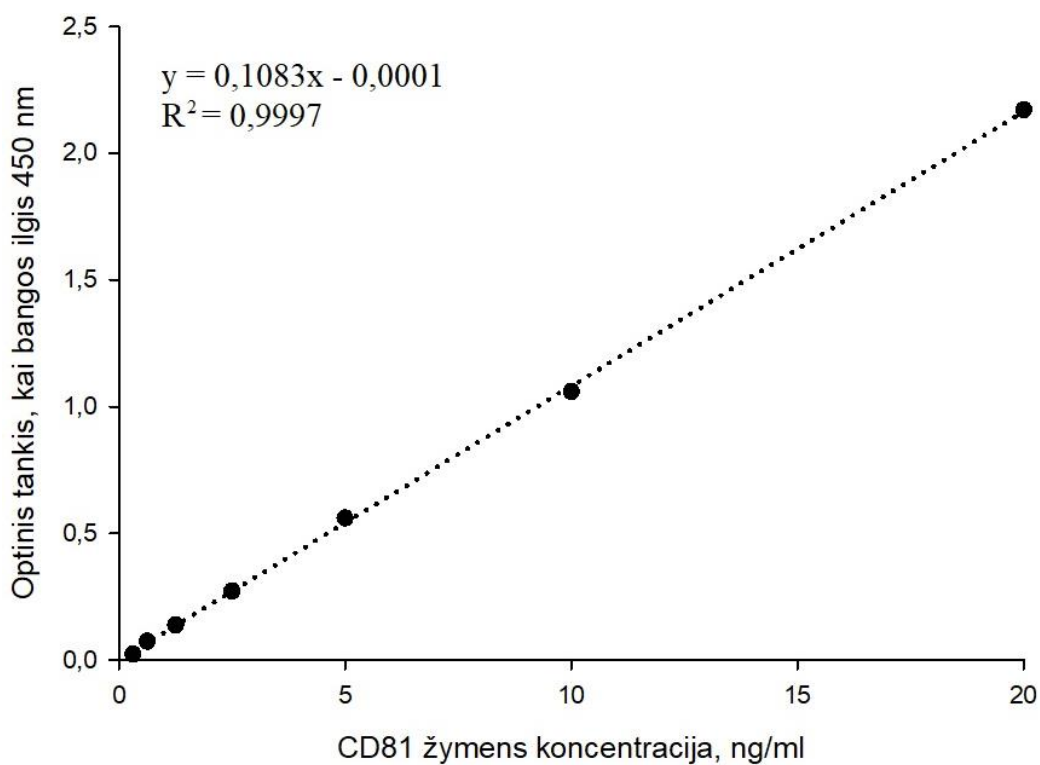
Prieš imunofermentinės analizės tyrimą, egzosomų mėginių koncentracijos buvo įvertinamos pagal bendrą baltymo kiekį Bradfordo metodu. Atlikti CD9 ir CD81 ELISA analizei buvo naudojami egzosomų preparatai, kurių koncentracija pagal bendrą baltymo kiekį buvo 0,13 mg/ml. Imuninių ląstelių egzosomų mėginys (100 µl) buvo perkeliamas į šulinėlį, padengtą prieš atitinkamą žymenį nukreiptu antikūnu ir inkubuojamas 90 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, su pirminiu antikūnu nesusirišusio antigeno likučiai buvo pašalinami 2 kartus praplaunant šulinėlius su plovimo buferiu. Toliau šulinėliai buvo papildomi biotinu pažymėtu antriniu antikūnu (100 µl) ir inkubuojami 60 min. 37 °C temperatūroje. Inkubacijai pasibaigus vėl buvo atliekamas šulinėlių praplovimas nuo antikūno likučių (3 kartus). Vėliau buvo vykdoma 30 min. inkubacija 37 °C temperatūroje su streptavidino/avidino ir krienų peroksidazės konjugatu. Kaip ir po ankstesnių inkubacijų, šulinėliai buvo praplauti plovimo buferiu (5 kartus). Galiausiai, šulinėliai buvo papildomi krienų peroksidazės substratu TMB (90 µl) ir inkubuojami tamsoje 15 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, spalvinė reakcija buvo stabdoma pridėnant stop tirpalą (50 µl), o optinis tankis šulinėliuose išmatuojamas daugiafunkciniu plokštelių skaitytuvu. Kiekvieno matavimo metu buvo atliekama kontrolė vietoje egzosomų mėginio užpildant šulinėlius skiedimo buferiu (100 µl). Tolesnės manipuliacijos kontroliniuose šulinėliuose buvo vykdomos pagal anksčiau aprašytą metodiką.

Siekiant kiekybiškai įvertinti žymenų kiekį egzosomų mėginiuose buvo sudaromos kalibracinės kreivės. Buvo pamatuojami žinomų koncentracijų žymenų tirpalų optiniai tankiai ir sudaromi priklausomybės grafikai. Pagal grafikui specifiską linijinės regresijos lygtį buvo sudarytos formulės žymens koncentracijos nustatymui: $x = \frac{y + 0,0012}{0,0212}$ (CD9) ir $x = \frac{y + 0,0001}{0,1083}$ (CD81), kuriose x –

mėginyje esančio atitinkamo žymens koncentracija (ng/ml), y – mėginio optinis tankis, kai bangos ilgis 450 nm. CD9 žymens kalibracinė kreivė pateikiama 12 paveikslėlyje, CD81 – 13 paveikslėlyje.



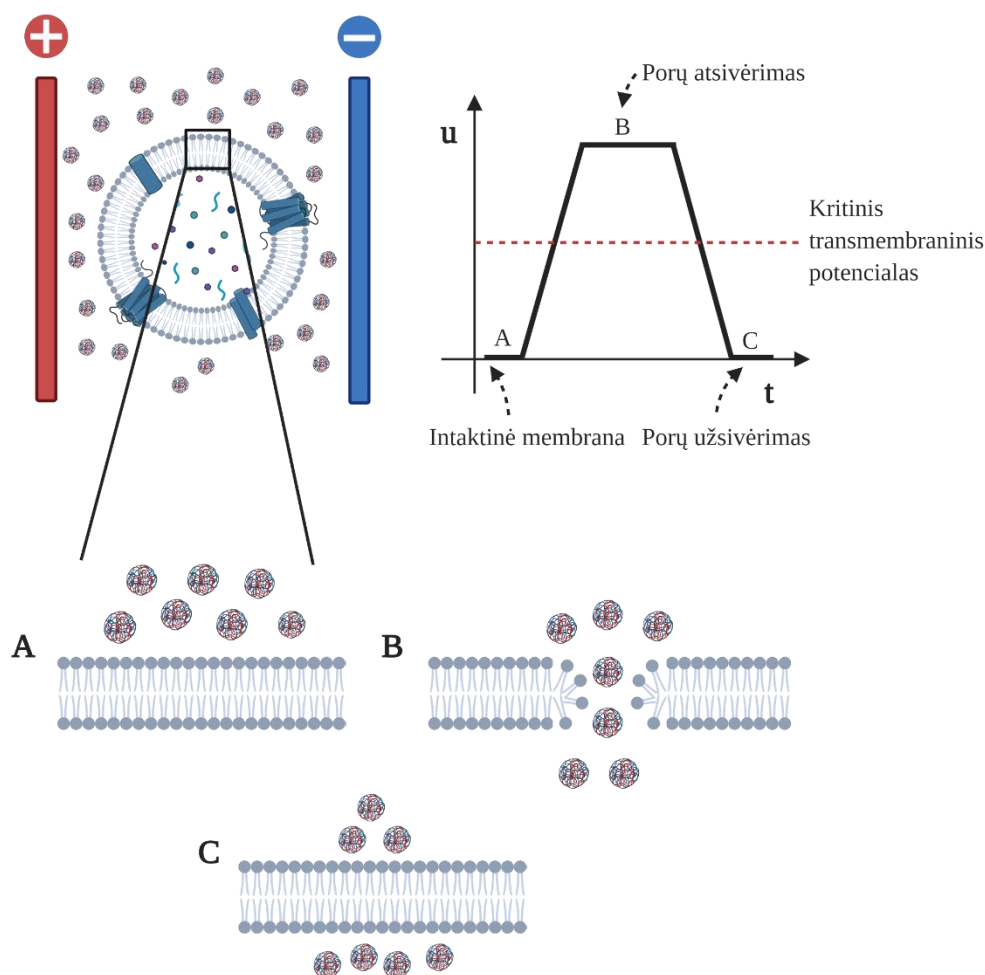
12 pav. ELISA CD9 žymens kalibracinė kreivė, skirta kiekybiškai įvertinti CD9 koncentraciją tiriamuosiuose mėginiuose



13 pav. ELISA CD81 žymens kalibracinė kreivė, skirta kiekybiškai įvertinti CD81 koncentraciją tiriamuosiuose mėginiuose

2.11. Vaistinių medžiagų įterpimas į egzomas elektroporacijos metodu

Vaisto molekulės įterpimui į egzosomų struktūrinį sąstatą buvo naudojama elektroporacija. Tai fizikinis metodas, kuris remiasi biologinių membranų ir aplinkos terpės poliarizacijos bei laidumo skirtumais. Veikiant elektriniam laukui, egzosomų membrana poliarizuojasi ir vidinėje egzosomos pusėje sukuriamas stipresnis elektrinis laukas nei aplinkos terpėje. Tai lemia, kad pūslelės lipidiniame dvisluoksnyje susiformuoja laikinosios poros, pro kurias vaisto molekulės iš aplinkos gali difunduoti į egzosomos vidų [75]. Metodo principas vaizduojamas 14 paveikslėlyje.



14 pav. Elektroporacijos metodo principas. (A) Egzosoma veikiama išoriniu elektrinio lauko impulsu, (B) kai elektrinio lauko stipris yra didesnis už slenkstinę ribą, egzomos membranoje susidaro laikinosios poros, pro kurias gali difunduoti molekulės iš aplinkos, (C) elektrinio lauko stipriui sumažėjus iki slenkstinio potencialo, poros membranoje išnyksta

Išgrynintos imuninių ląstelių egzomos su DOX ir TMZ (1 μg egzosomų mėginio pagal bendrą baltymo kiekį buvo dedama 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DOX arba TMZ) buvo sumaišomi elektrai laidžiamame buferyje, sudarytame iš 500 mM sacharozės, ištirpintos 10% glicerolio tirpale [76]. 80 μl šio mišinio buvo perkeliama į iš anksto atšaldytą 0,1 cm elektroporacijos kiuvetę. Egzosomų ir vaisto mišiniu užpildyta kiuvetė buvo įstatoma į elektroporatorių tarp dviejų elektrodų ir veikiama 400 V įtampos impulsu du kartus (vieno impulso trukmė 0,60 ms). Po poveikio, mišinys nedelsiant buvo perkeliamas iš elektroporacijos kiuvetės į 1,5 ml talpos Eppendorf tipo mėgintuvėlį ir inkubuojamas 30 min. 37 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ši inkubacija buvo vykdoma norint pagreitinti membranos integralumo atsistatymą.

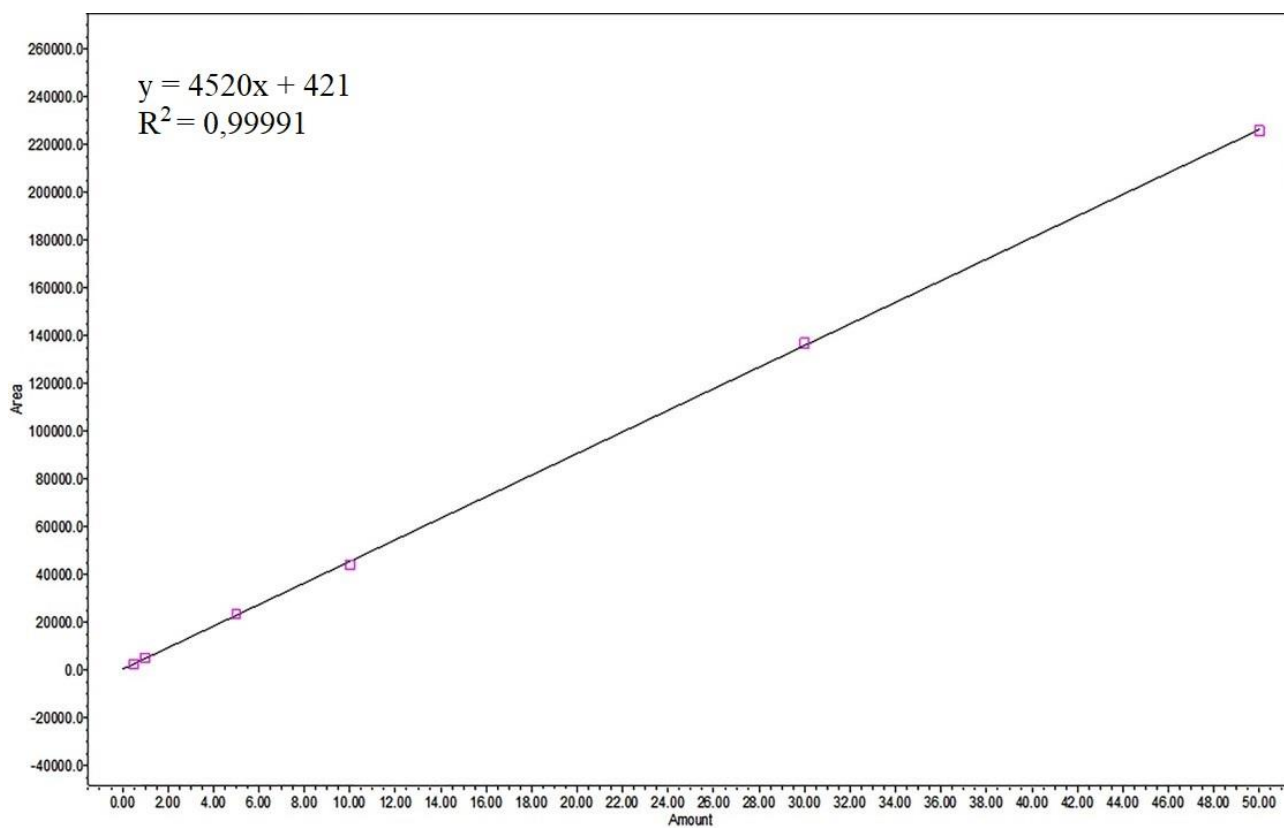
Į egzosomų vidų nepatekusio vaisto likučiai buvo surenkami panaudojant *Exosome Spin Columns* kolonėles, skirtas iš mėginio šalinti nedidelius junginius, kurių molekulinė masė ≤ 3000 . Remiantis gamintojo protokole nurodyta informacija, kolonėlėje esantis gelio sluoksnis prieš naudojimą turėjo būti sudrėkinamas su PBS (650 μ l), sumaišomas ir paliekamas 15 min. kambario temperatūroje. Susidarius gelinei membranai, skysčio perteklius buvo pašalinamas į surinkimo mėgintuvėlį įstatytą kolonėlę centrifuguojant 750 x g kambario temperatūroje 2 min. Po centrifugavimo kolonėlė buvo paruošta naudojimui. Iš pradžių, kolonėlė buvo perkeliama į 1,5 ml talpos Eppendorf tipo mėgintuvėlį, o egzosomų ir vaisto mišinys atsargiai supilamas ant gelio. Kartojant centrifugavimą ankstesniais parametrais, egzosomos buvo apvalomos nuo neįterpto vaisto likučių, kurie buvo sulaikomi gelio sluoksnyje, tuo tarpu, likęs mėginys ištekėjo į Eppendorf tipo mėgintuvėlį.

2.12. Vaistinių medžiagų įterpimo į egzomas nustatymas

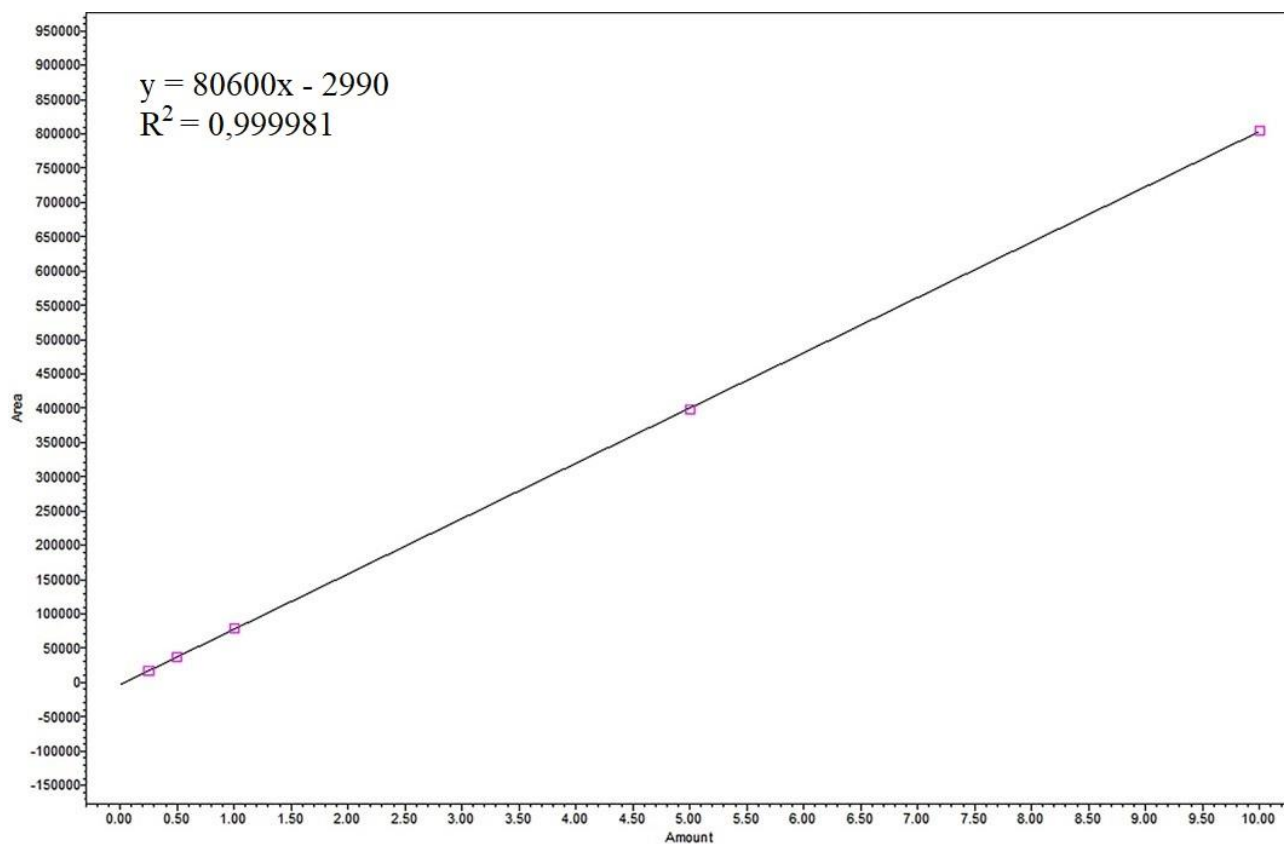
Į imuninių ląstelių egzomas įterpti medikamentai buvo identifikuojami efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu. Tai analitinis metodas, leidžiantis nustatyti tiriamąjį mėginį sudarančių komponentų tapatybę bei kiekybiškai juos įvertinti. Metodas pagrįstas tiriamąjį mėginį sudarančių komponentų skirtingomis sorbcijos ir desorbcijos savybėmis. Mėginys kartu su judria faze leidžiamas per kolonėlėje imobilizuotą stacionarią fazę. Dėl skirtingos junginių sorbcijos gebos, mėginys yra išskirstomas į sudedamąsias dalis, kurias galima identifikuoti [77]. Egzosomų mėginių chromatografinė analizė buvo atlikta bendradarbiaujant su LSMU Farmakognozijos katedros prof. dr. Lina Raudone bei dokt. Gabriele Vilkickyte.

Egzosomų mėginys prieš chromatografinę analizę buvo sumaišomas su organiniu tirpikliu acetonitrilu (santykiu 1:1) ir 10 min. veikiamas ultragarsu (esant 80 kHz dažniui, 100 W galiai, kambario temperatūroje) tam, kad suirtų pūslelių membrana ir įterptas vaistas pasklistų tirpiklyje. Prieš atliekant chromatografinę analizę, suardyti mėginiai buvo prafiltruoti per 0,2 μ m poros dydžio filtrus. Paruoštas egzosomų mėginys buvo analizuojamas ESC chromatografu su diodų matricos detektoriumi. Naudota kolonėlė buvo ACE Super C18 (250 mm \times 4.6 mm, dalelių dydis 3 μ m). Analizė atlikta taikant gradientinį eliuavimą. Egzosomų mėginių su TMZ analizei judrioji fazė buvo sudaryta iš A – 0,1% trifluoroacto rūgšties ir B – 100% metanolio (0 min., 10% B; 0–3 min., 20% B; 3–6 min., 40% B; 6–10 min., 10% B; 10–15 min., 10% B; metodika pritaikyta remiantis [78]). Egzosomų, kuriose buvo įterptas DOX, analizei naudota judri fazė, kuri buvo sudaryta iš A – 0,1% trifluoroacto rūgšties ir B – 100% acetonitrilo (0 min., 15% B; 0–8 min., 25% B; 8–16 min., 40% B; 16–25 min., 70% B; 25–33 min., 100% B; 33–35 min., 15% B; 35–40 min., 15% B; metodika pritaikyta remiantis [79]). Judrios fazės tėkmės greitis – 0,5 ml/min. Bandinių injekavimo tūris – 10 μ l. Kolonėlės temperatūra – 35 °C. Analizės rezultatai apdoroti su Empower (Waters) programa.

TMZ ir DOX buvo identifikuojami pagal jų standartinių junginių sulaikymo laiką bei UV spinduliuotės spektrą, kai yra žinoma, jog TMZ absorbcijos maksimumas ties 330 nm, o DOX – 233 nm. Kiekybiniam DOX ir TMZ įvertinimui buvo sudaromos kalibracinės kreivės matuojant žinomų koncentracijų tirpalus (TMZ atveju, buvo naudojami 0,5, 1, 5, 10, 30 ir 50 μ g/ml koncentracijų tirpalai, o DOX – 0,25, 0,5, 1, 5 ir 10 μ g/ml). TMZ kalibracinė kreivė vaizduojama 15 paveikslėlyje, o DOX – 16 paveikslėlyje.



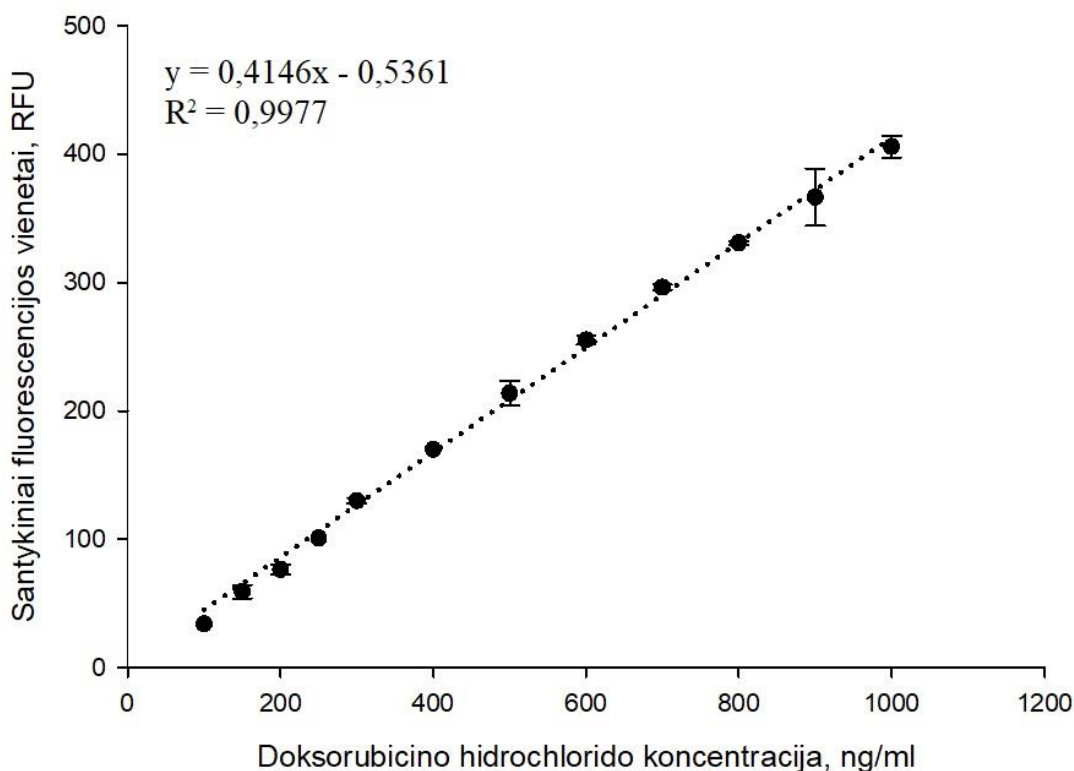
15 pav. Temozolomido kalibracinė kreivė, skirta chromatografiškai įvertinti į egzosomas įterpto vaisto kiekį



16 pav. Doksorubicino hydrochlorido kalibracinė kreivė, skirta chromatografiškai įvertinti į egzosomas įterpto vaisto kiekį

Dėl DOX natūralaus fluorescencinio potencialo į imuninių ląstelių egzomas įterpto vaisto koncentracija buvo nustatoma ir fluorescenciniu metodu. Visų pirma, egzosomų membrana turėjo būti suardoma panaudojant detergentą Triton X-100, kurio 0,1% tirpalo 2 μl buvo sumaišomi su 18 μl egzosomose įterpto DOX mėginiu. Pagerinti detergento veikimo efektyvumą, mišinys buvo inkubuojamas 15-30 min. 2-8 °C temperatūroje. Po inkubacijos dėl suardyto egzosomų membranos lipidinio dvisluoksnio, DOX buvo išlaisvintas iš pūslelės į aplinkinį skystį. Paruoštas mėginys buvo skiedžiamas su PBS iki 100 μl, sumaišomas ir perkeliamas į juodą 96 šulinėlių lėkštelę. DOX fluorescencijos intensyvumas buvo matuojamas daugiafunkciniu plokštelių skaitytuvu, kai bangos sužadinimo ilgis 485 nm, o emisija – 595 nm. Įterpimo vertinimo metodika buvo vykdoma tamsoje, saugant DOX nuo tiesioginės šviesos poveikio.

Kiekybiniam įterpto į imuninių ląstelių egzomas DOX įvertinimui buvo sudaroma kalibracinė kreivė, kuri vaizduojama 17 paveikslėlyje. Buvo paruošiami žinomos koncentracijos DOX tirpalai (100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ir 1000 ng/ml) ir išmatuojamas jų fluorescencijos intensyvumas. Pagal gautus rezultatus buvo sudarytas priklausomybės grafikas bei išvesta linijinė regresija, kuri leido sudaryti formulę, reikalingą į egzomas įterpto DOX kiekio įvertinimui: $x = \frac{y + 0,5361}{0,4146}$, kurioje x – DOX koncentracija tiriamajame mėginyje (ng/ml), y – tiriamojo mėginio fluorescencijos intensyvumas, kai sužadinimo bangos ilgis 485 nm, o emisija 595 nm.

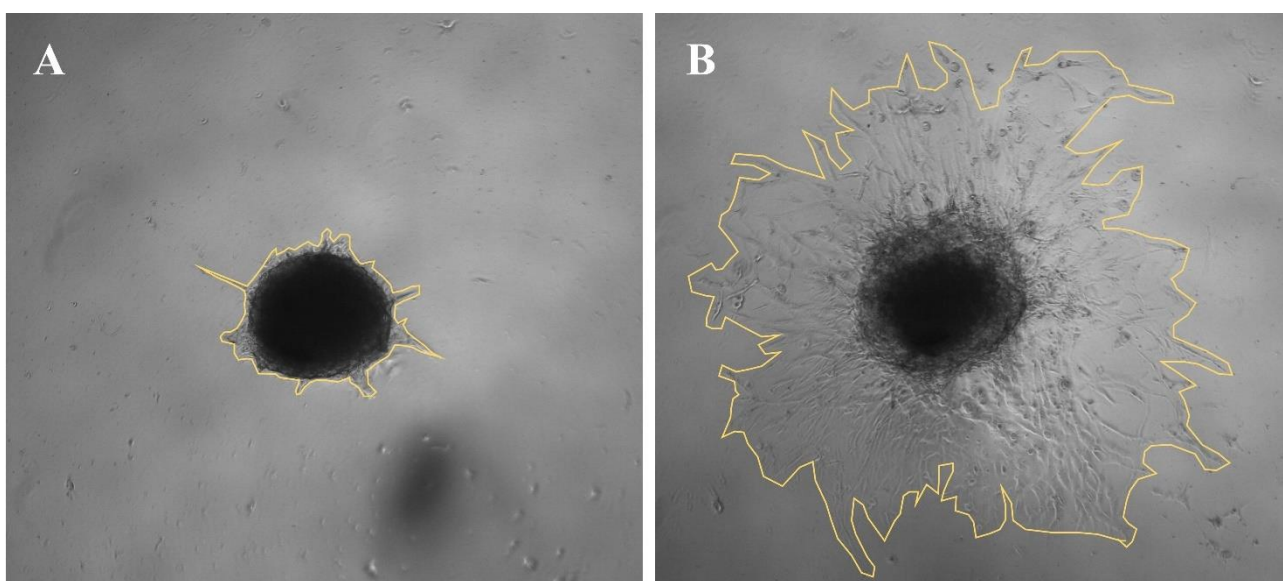


17 pav. Doksorubicino hidroklorido kalibracinė kreivė, skirta pagal fluorescencijos intensyvumą įvertinti į egzomas įterpto vaisto kiekį

Apskaičiuotas į egzomas įterpto DOX kiekis buvo panaudojamas procentiniam įterpimo efektyvumo įvertinimui pagal formulę $x = \frac{C(DOX)}{C(ideta)} \times 100\%$, kurioje x – procentinis DOX įterpimo į egzomas efektyvumas; C (DOX) – į egzomas įterpta DOX koncentracija, C (įdėta) – DOX koncentracija, panaudota vykdant elektroporaciją.

2.13. Glioblastomos ląstelių migracijos tarpląsteliniame užpilde vertinimas

Glioblastomos HROG-36 invazyvumas po poveikio imuninių ląstelių egzosomose įterptu DOX ir TMZ buvo vertinamas pagal pavienių ląstelių migraciją. Geltrex™ tarpląsteliniame užpilde suformuotas glioblastomos 3D modelis buvo veikiamas mikroglijos HMC-3 bei monocitų U937 egzosomomis, kurių struktūroje buvo įterptas DOX arba TMZ. Ląstelių migracija buvo vertinama prieš paveikiant tiriamaisiais egzosomų mėginiais bei praėjus 72 val. po poveikio. Kiekviename numatytime laiko taške buvo atliekamas sferoidų vaizdinimas šviesiniu mikroskopu, o gautos nuotraukos panaudotos nustatyti ląstelių migracijos aktyvumui. Panaudojant programinį paketą *ImageJ* buvo vertinamas išmigravusių iš sferoido ląstelių užimamas plotas, atmetus pradiniam laiko taške buvusį sferoido plotą (18 pav.).



18 pav. Glioblastomos ląstelių migracijos vertinimo pavyzdys. Ląstelių migracijos pokyčiai buvo nustatyti išmatavus sferoido plotą pradiniam laiko taške (A) ir po 72 val. iš sferoido išmigravusių ląstelių užimamą plotą (B). Šių plotų skirtumas identifikavo ląstelių migracijos potencialą

2.14. Glioblastomos metabolinio aktyvumo vertinimas fluorescuojančiu PrestoBlue dažu

Glioblastomos ląstelių gyvybingumas buvo vertinamas panaudojant *PrestoBlue* dažą. Tai ląstelių metabolinio aktyvumo indikatorius, kurio veikimas pagrįstas rezazurino metaboliniais virsmis gyvybingose ląstelėse. Mėlynos spalvos ne fluorescuojantis rezazurinas, patekęs į funkcionuojančią ląstelę, vykstant elektronų pernašai kvėpavimo grandine yra redukuojamas iki raudonos spalvos rezorufino. Susidariusio rezorufino spalvos intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo metaboliškai aktyvių ląstelių skaičiaus ir gali būti kiekybiškai įvertintas matuojant fluorescenciją ar šviesos sugertį.

Glioblastomos 3D modelis buvo veikiamas imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu DOX ir TMZ 72 val. 37 °C temperatūroje. Po 72 val. inkubacijos buvo vertinamas sferoido gyvybingumas *PrestoBlue* fluorescuojančiu dažu. *PrestoBlue* reagentas buvo sumaišomas su ląstelių mitybine terpe santykiu 1:10 ir perkeliamas ant glioblastomos sferoido (100 μ l/0,32 cm²) prieš tai pašalinus terpę su egzosomomis. Sferoidas su dažu buvo inkubuojamas 3 val. 37 °C temperatūroje, saugant nuo tiesioginės šviesos poveikio. Po inkubacijos, mitybinė terpė su metabolizuotu rezazurinu buvo surenkama ir perkeliama į juodą 96 šulinėlių lėkštelę. Spalvos intensyvumas buvo matuojamas

daugiafunkciniu plokštelių skaitytuvu, kai fluorescencijos sužadavimo bangos ilgis 560 nm, o emisija – 590 nm.

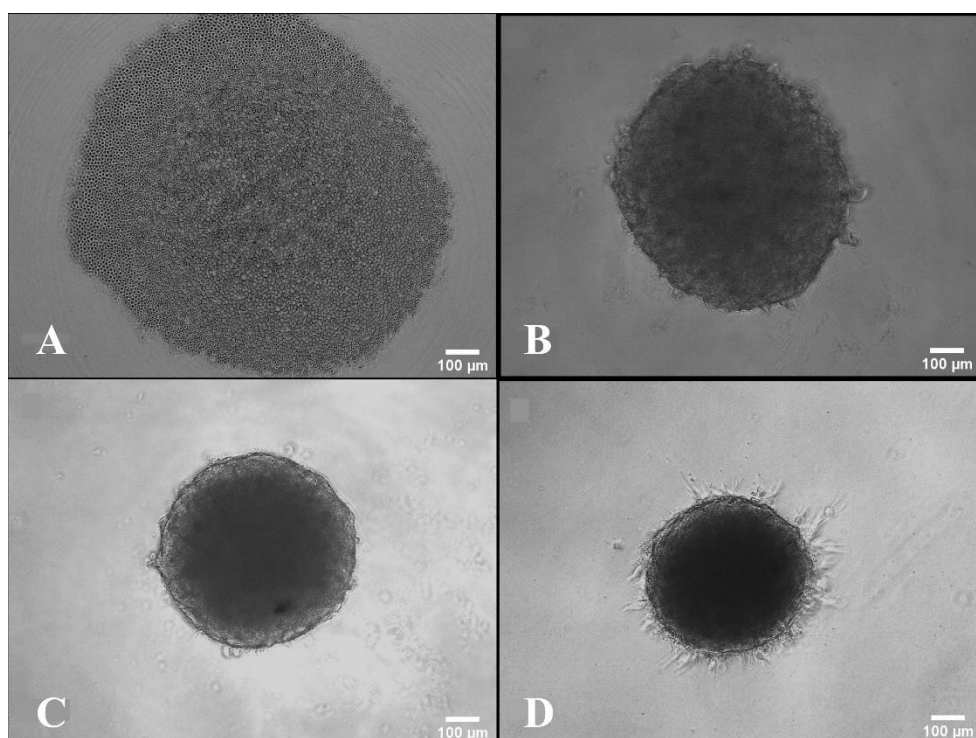
2.15. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atliekama *SigmaPlot 13.0.* programiniu paketu. Grafikuose pateikta vidutinė duomenų reikšmė gauta iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų rezultatų. Duomenų vidurkiai nurodyti su standartiniu nuokrypiu. Rezultatų lyginimas tarp dviejų grupių buvo atliktas taikant Stjudento t-testą, o palyginti daugiau nei dviems grupėms buvo naudojama vienkryptė dispersinė ANOVA analizė (angl. *one-way analysis of variance*), pasirinkus Bonferonio statistinį kriterijų.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Glioblastomos 3D modelio su hipoksiniu gradientu suformavimas

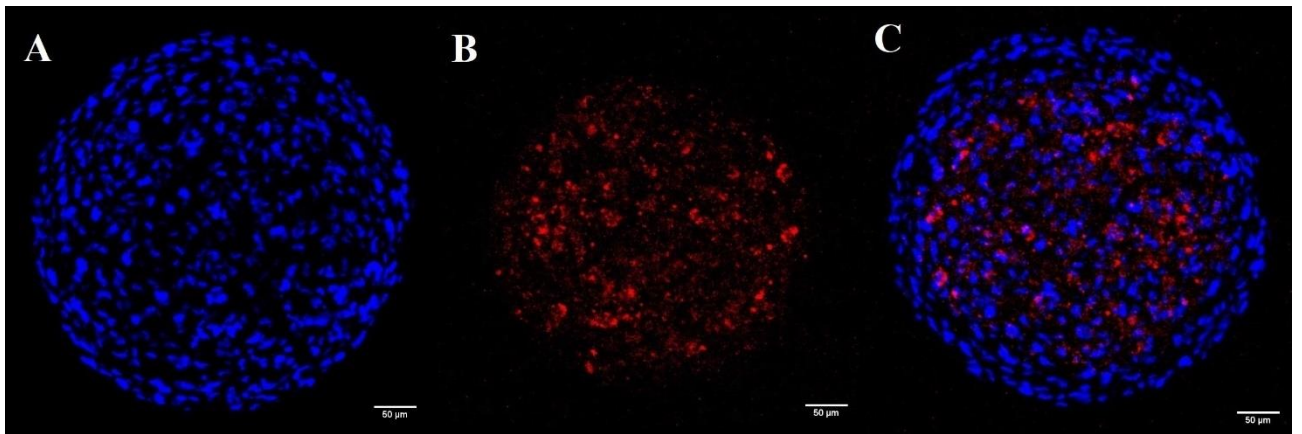
Kiekvienas glioblastomos 3D modelis buvo formuojamas iš 10 000 ląstelių, kurios buvo sukonzentruojamos iš anksto plonu agarozės sluoksniu padengtame apvaliadugniame šulinėlyje (19 pav. A). Praėjus 24 val. po ląstelių užsėjimo, ląstelės pradeda agreguotis ir sudaryti sferinės formos užuomazgas (19 pav. B). Nustatyta, kad šio tarpinio glioblastomos darinio dydis yra $538 \pm 17 \mu\text{m}$. Po 48 val. susidaro taisyklingos formos glioblastomos sferoidas, kurio skermens dydis yra $448 \pm 15 \mu\text{m}$ (19 pav. C). Toks sferoidas jau perkeliamas į tarpląstelinį užpildą Geltrex™ ir paliekamas įsitvirtinti inkubuojant dar 24 val. Praėjus 24 val. po sferoido įkapsuliavimo, jo dydis yra $376 \pm 20 \mu\text{m}$ (19 pav. D).



19 pav. HROG-36 glioblastomos 3D modelio kūrimo etapai. (A) Glioblastomos ląstelių sukonzentravimas šulinėlyje, padengto plonu agarozės sluoksniu, dugne, (B) sferoido vaizdas po 24 val., (C) sferoido vaizdas po 48 val., (D) sferoidas tarpląsteliniam užpildui Geltrex™ po 24 val.

Remiantis literatūroje pateiktais duomenimis, hipoksinių sričių susidarymas vėžiniuose 3D modeliuose yra aptinkamas, kai sferoidų skersmuo būna didesnis nei $200 \mu\text{m}$, o sferoido dydžiui esant virš $500 \mu\text{m}$ pradeda formuotis nekroziniai židiniai [80]. Glioblastomos ląstelių skaičius, naudotas 3D modelio sukūrimui, buvo parenkamas eksperimentiniu būdu formuojant sferoidus ir matuojant jų dydį, kol susidaręs sferinis modelis buvo didesnis nei $200 \mu\text{m}$, bet mažesnis nei $500 \mu\text{m}$.

Suformuoto 3D modelio hipoksinių sričių įvertinimui buvo panaudotas Hypoxyprobe™ RED 549 rinkinys. Iš pradžių, sferoidą sudarančių hipoksinių ląstelių baltymų tiolio grupės buvo pažymimos pimonidazolo hidrokloridu, o tada nudažomos fluorescuojančiu RED 549 dažu. Ląstelių branduolių vizualizacijai buvo taikoma trumpa inkubacija su Hoechst 33342 dažu. Imunocitochemiškai pažymėtas sferoidas buvo vaizdinamas konfokaliu mikroskopu – hipoksinės sritys buvo nustatytos naudojant TXRED filtrų rinkinį, o ląstelių branduoliai – DAPI (20 pav.).



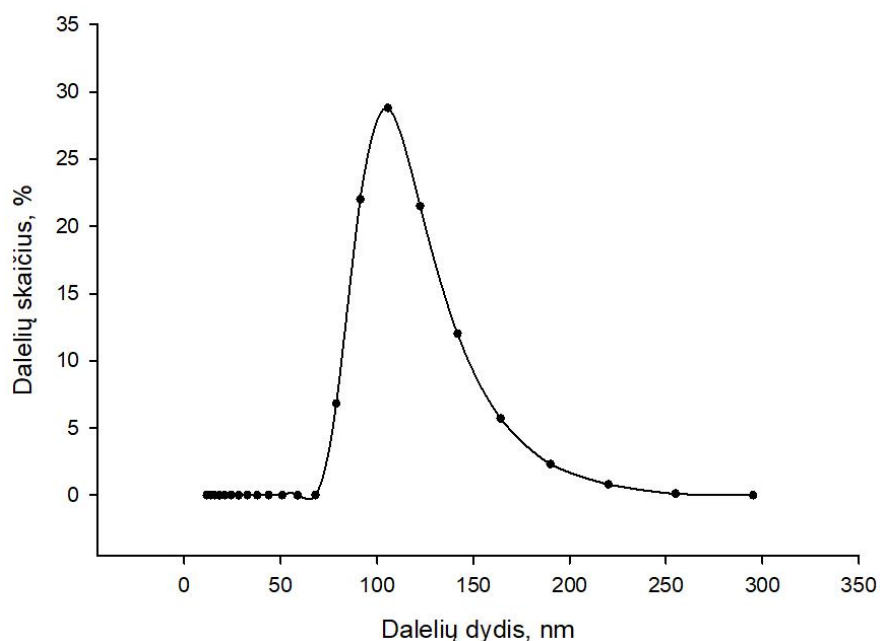
20 pav. Suformuoto glioblastomos 3D modelio hipoksinio gradiento imunocitocheminis įvertinimas. (A) Mėlynai pažymėti sferoidą sudarančių ląstelių branduoliai (Hoechst 33342), (B) to paties mikroskopinio lauko hipoksinėse ląstelėse raudonai šviečiantys tiolio grupę turintys baltymai (Hypoxyprobe™ RED 549), (C) bendras vaizdas, reprezentuojantis hipoksinius židinius, lokalizuotus sferoido centrinėje dalyje.

Hipoksijos žymuo pimonidazolo hidrochloridas yra plačiai naudojamas *in vitro* vėžinių 3D modelių hipoksijos tyrimuose. Pavyzdžiui, jo pritaikymas yra aprašytas iš HCT116 adenokarcinomos [81], T-47D krūties vėžio [82], LLC Lewis plaučių karcinomos bei A673 Ewingo sarkomos ląstelių linijų suformuotų sferoidų hipoksinų sričių vaizdinimui [83].

3.2. Egzosomų pritaikymas vaistų pateikimui

3.2.1. Imuninių ląstelių egzosomų charakterizavimas pagal dydį

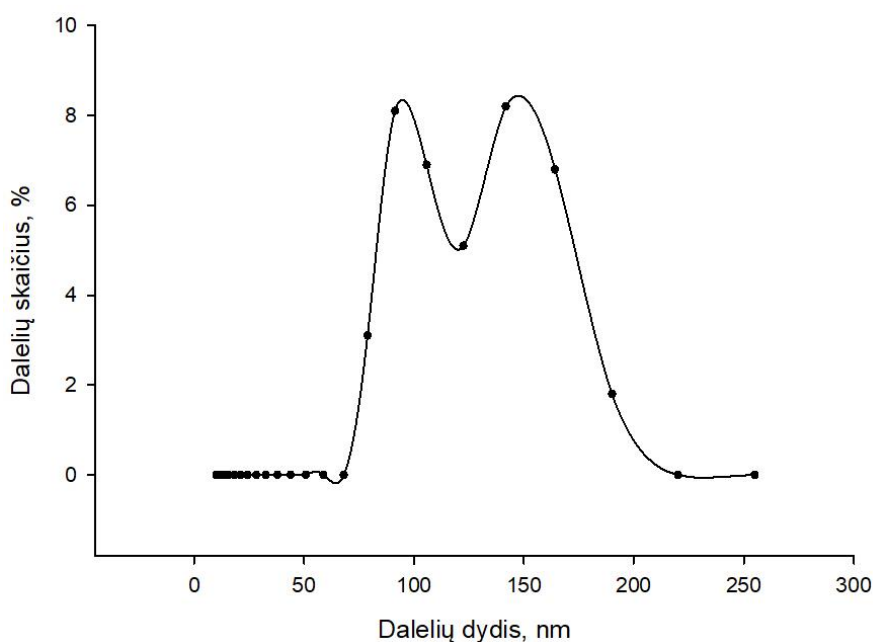
Pirmame imuninių ląstelių egzosomų pritaikymo priešvėžinių vaistų pateikimui etape, egzosomų preparatai buvo charakterizuojami įvertinant juose dalelių dydį analizatoriumi Zetasizer Nano. Analizės metu nustatyta, kad monocitų linijos U937 egzosomų dydis yra nuo 78 nm iki 190 nm (didžiausia dalelių frakcija stebima ties 120 nm, 21 pav.).



21 pav. U937 monocitų egzosomų identifikavimas pagal dydį analizatoriumi Zetasizer Nano

Remiantis moksliniais straipsniais apie gyvūninės kilmės egzosomas, pažymima, kad jų dydis varijuoja tarp 30-200 nm [84]. Taigi, gauti rezultatai sutampa su literatūroje pateiktais duomenimis. Didesnių nei 120 nm dalelių dydis gali būti fiksuojamas dėl savaiminio egzosomų polinkio agreguotis, tai lemia, jog analizatoriaus aptinkamos didesnės dalelės gali būti kelių egzosomų sudarytas agregatas. Taip pat Sanjana Haque su bendraautorais [85] atliko U937 monocitų egzosomų dydžio analizę Zetasizer Nano analizatoriumi. Šie mokslininkai nustatė, kad U937 sekretuojamos egzosomos yra mažesnės, t.y. $66 \pm 1,4$ nm.

Taip pat buvo atlikta ir mikroglijos HMC-3 linijos produkuojamų egzosomų dydžio analizė. Tyrimo metu nustatyta, kad mikroglijos egzosomos pagal dydį buvo pasiskirsčiusios 78-190 nm intervale (buvo stebimos dvi ryškios dydžio frakcijos – ties 91 nm bei 141 nm, 22 pav.).



22 pav. HMC-3 mikroglijos egzosomų identifikavimas pagal dydį analizatoriumi Zetasizer Nano

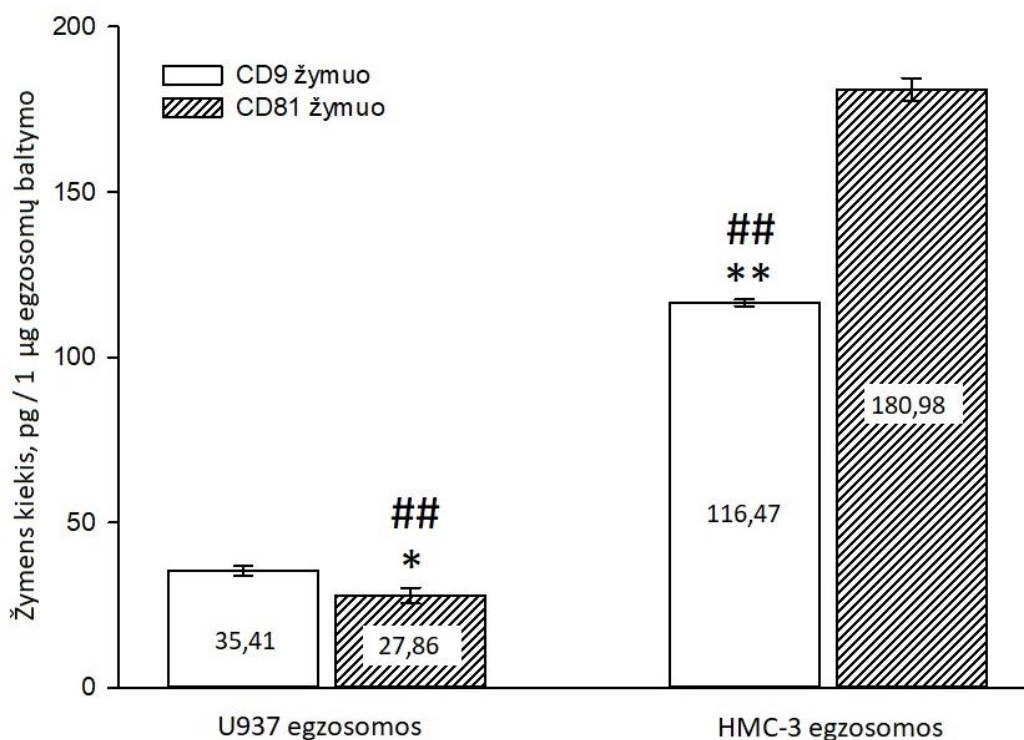
Kaip ir U937 egzosomų atveju, didesnių dalelių identifikavimas gali būti susijęs su egzosomų agregacija, tačiau gautas egzosomų dydžio pasiskirstymas iki 200 nm sutampa su literatūros duomenimis [84]. Sanjay Kumar su kolegomis [86] taip pat įvertino HMC-3 linijos egzosomų dydį NanoSight-LM10 analizatoriumi ir gavo panašius rezultatus – identifikuojamas šių ląstelių egzosomų dydis buvo iki 150 nm.

3.2.2. Imuninių ląstelių egzosomų charakterizavimas pagal CD9 ir CD81 specifinių žymenų raišką

Kitame tyrimų etape išgrynintų imuninių ląstelių egzosomų mėginyje buvo nustatomi mokslinėje literatūroje aprašyti pagrindiniai gyvūninės kilmės egzosomoms būdingi žymenys CD9 ir CD81. Šie baltymai yra egzosomų membranoje lokalizuoti specifiniai panašaus dydžio teraspaninai (CD9 molekulinė masė yra 24 kDa, o CD81 – 26 kDa). Šiame darbe CD9 ir CD81 baltymai tiriamuosiuose egzosomų mėginiuose buvo identifikuojami taikant kiekybinį imunofermentinį ELISA metodą.

Tiek U937 monocitų, tiek HMC-3 mikroglijos egzosomų mėginiuose buvo aptikta CD9 ir CD81 žymenų raiška. Gauti rezultatai rodo, jog HMC-3 mikroglijos egzosomose CD9 žymens kiekis yra tris kartus, o CD81 šešis kartus didesnis lyginant su U937 monocitų egzosomomis. Kiekybiškai

įvertinta, kad U937 sekretuojamose egzosomose CD9 žymens kiekis 1 μg egzosomų baltymo yra $35,41 \pm 1,53$ pg, kai tuo tarpu, HMC-3 egzosomų mėginyje CD9 kiekis yra net $116,47 \pm 1,03$ pg. Vertinant CD81 žymens kiekį nustatyta, kad U937 monocitų egzosomose šio baltymo raiška yra $27,86 \pm 2,36$ pg, o HMC-3 mikroglijos egzosomose – $180,98 \pm 2,02$ pg (23 pav.).



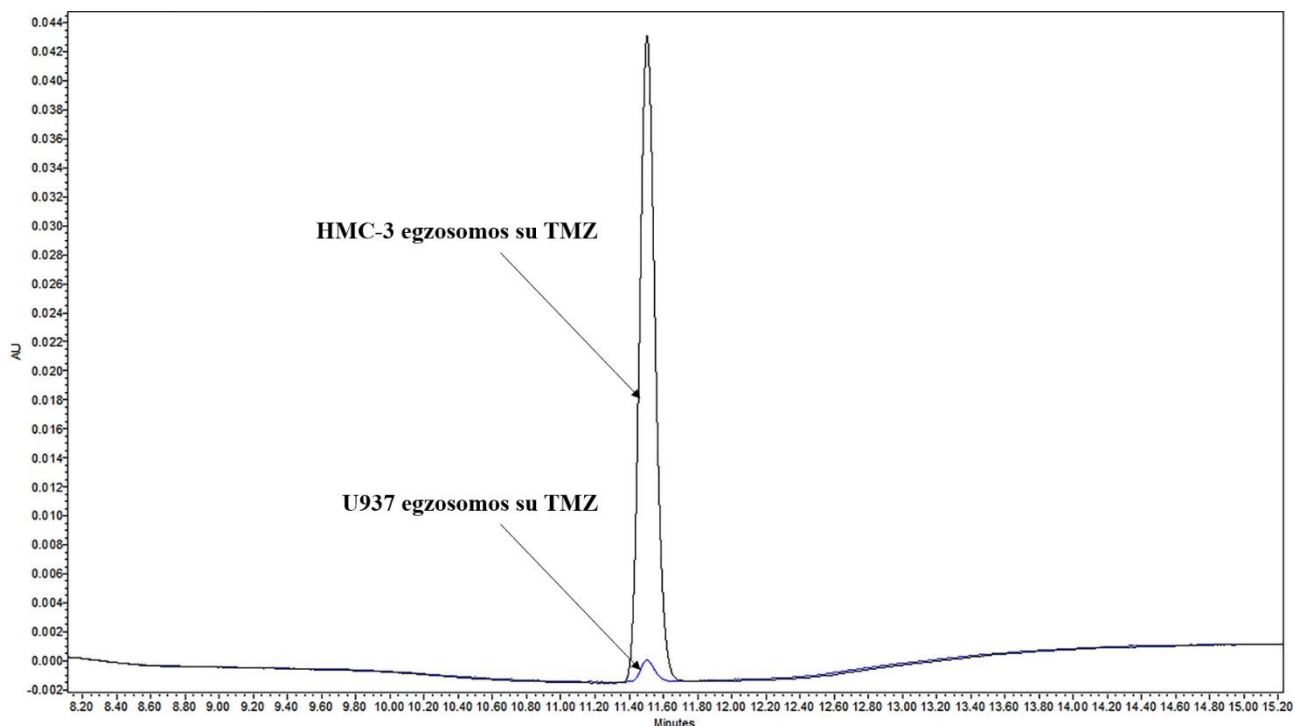
23 pav. U937 monocitų ir HMC-3 mikroglijos egzosomų specifinių žymenų kiekiai, nustatyti imunofermentiniu ELISA metodu. ** žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su CD9 žymens kiekiu U937 egzosomose, kai $p < 0,001$; * žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su CD9 žymens kiekiu U937 egzosomose, kai $p < 0,01$; ## žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su CD81 žymens kiekiu HMC-3 egzosomose, kai $p < 0,001$. N = 3

HMC-3 mikroglijos egzosomų validacija pagal CD9 žymenį taip pat buvo aprašoma Sanjay Kumar ir jo bendraautorių mokslinėje publikacijoje [86]. Jie atliko HMC-3 išgrynintų egzosomų analizę Dot Blot metodu (tai paprastesnė *Western Blot* analizės versija) ir identifikavo CD9 žymens raišką. Taip pat analizuojant BV2 imortalizuotos pelės mikroglijos linijos produkuojamas egzosomas buvo nustatyti ir CD9 [87], ir CD81 žymenys [88]. CD81 žymens raiška U937 monocitų egzosomose buvo identifiukuota *Western Blot* metodu Sanjana Haque su kolegomis [85] atliktuose tyrimuose.

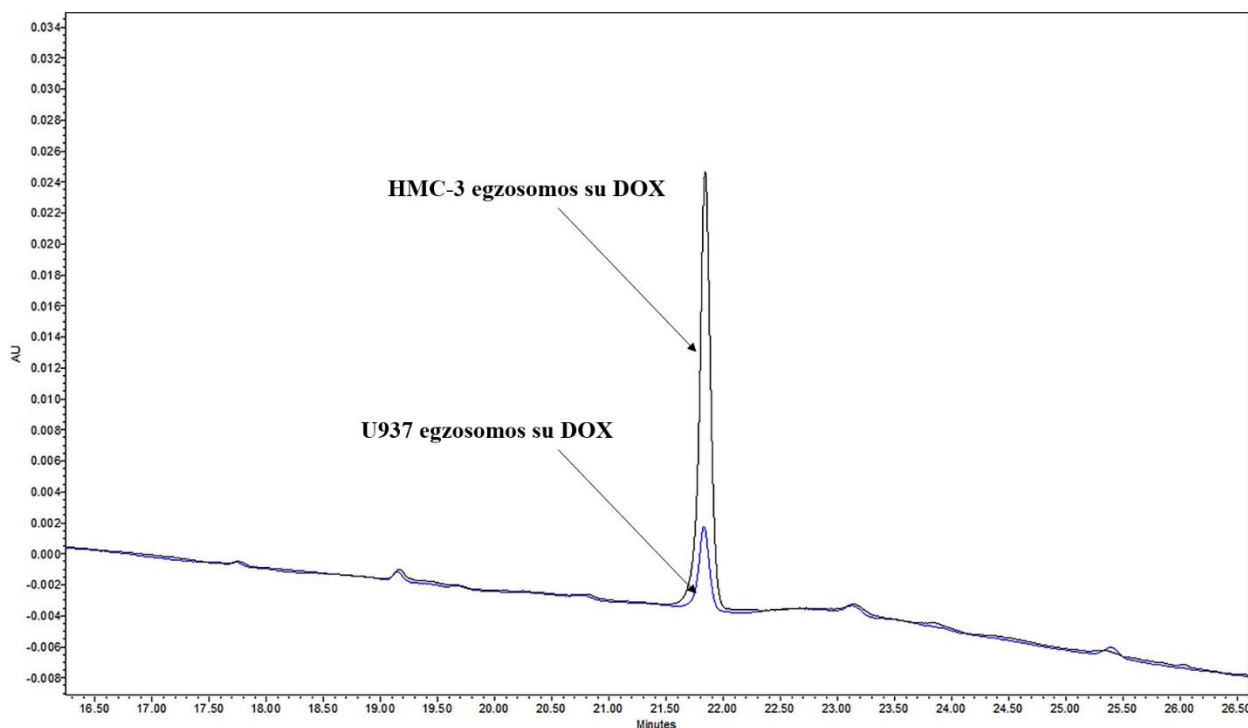
3.2.3. Į imuninių ląstelių egzosomas įterpto temozolomido ir doksorubicino hidroklorido kiekio įvertinimas

Priešvėžiniai medikamentai į imuninių ląstelių egzosomų sudėtį buvo įterpiami taikant elektroporacijos metodą. Elektroporacijos parametrų pasirinkimui buvo išanalizuota keletas literatūros šaltinių. Remiantis žiniomis, jog didesnių objektų membranose poroms susiformuoti reikia mažesnio elektrinio lauko stiprio nei mažesnių dalelių membranų permeabilizavimui [89] bei N. Lamichhane su kolegomis [90] atliktais egzosomų elektroporacijos eksperimentų parametrais, mūsų tyrimuose buvo pasirenkamas dvigubas 400V pulsas.

Imuninių ląstelių egzosomose įterptas vaistas buvo nustatomas ESC metodu, jo kiekį vertinant pagal gautos chromatografinės smailės plotą, arba fluorescenciniu metodu, išmatuojant egzosomų preparato fluorescencijos intensyvumą. Tipinė HMC-3 ir U937 egzosomų mėginių su TMZ chromatograma pateikiama 24 paveikslėlyje, o su DOX – 25 paveikslėlyje.



24 pav. HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomų su įterptu temozolomidu tipinė chromatograma vaisto kiekiui nustatyti. $\lambda = 330$ nm; $R_t = 11,500$ min.



25 pav. HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomų su įterptu doksorubicino hidrochloridu tipinė chromatograma vaisto kiekiui nustatyti. $\lambda = 233$ nm; $R_t = 21,840$ min.

Gauti rezultatai, pateikti 3 lentelėje, rodo, kad HMC-3 mikroglijos egzosomų preparate po elektroporacijos TMZ koncentracija yra $40,393 \pm 0,47$ $\mu\text{g/ml}$, o U937 egzosomų mėginyje – $1,422 \pm 0,054$ $\mu\text{g/ml}$. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto DOX koncentracija buvo įvertinama ir chromatografiniu metodu, ir pagal skleidžiamą fluorescencijos intensyvumą. Chromatografiškai nustatyta, kad HMC-3 mikroglijos egzosomų preparate po elektroporacijos įterpto DOX koncentracija yra $2,415 \pm 0,010$ $\mu\text{g/ml}$, o U937 monocitų egzosomų mėginyje – $0,480 \pm 0,008$ $\mu\text{g/ml}$. Pagal fluorescenciją įvertinta DOX koncentracija egzosomose skyrėsi nežymiai nuo koncentracijos, nustatytos chromatografiniu būdu. Įvertinta, kad HMC-3 mikroglijos mėginiuose po elektroporacijos DOX koncentracija yra $1,97 \pm 0,31$ $\mu\text{g/ml}$, o U937 monocitų egzosomose – $0,43 \pm 0,063$ $\mu\text{g/ml}$.

Apskaičiuojant vaisto įterpimo į egzosomas efektyvumą, pradinė vaisto koncentracija, panaudota elektroporacijoje, buvo prilyginama 100 % , o įvertinus vaisto koncentraciją egzosomose po elektroporacijos buvo nustatoma, kokia procentinė dalis laisvo vaisto pateko į egzosomas (žr. 2.12.). Į HMC-3 mikroglijos egzosomas įterpto TMZ efektyvumas yra 26,9 %, o DOX – 1,61 %, vertinant chromatografiškai nustatytą vaisto koncentraciją arba 1,31 %, vertinant pagal fluorescencijos intensyvumą gautą koncentraciją. Vaisto įterpimo efektyvumas į U937 monocitų egzosomas yra mažiau efektyvus, lyginant su HMC-3 mikroglijos egzosomomis. Apskaičiuota, kad į monocitų egzosomas įterpto TMZ efektyvumas yra 0,28 %, o DOX – 0,1 % (DOX įterpimo efektyvumo vertinime naudojant pagal fluorescencijos intensyvumą gautą koncentraciją procentinė dalis keičiasi nežymiai – 0,09 %, 3 lentelė).

Pagal egzosomose nustatytą vaisto koncentraciją, buvo apskaičiuojamas jo kiekis, tenkantis 1 μg egzosomų baltymo. Nustatyta, kad po elektroporacijos 1 μg HMC-3 egzosomų baltymo tenka 8976,22 ng TMZ ir 536,67 ng DOX (pagal fluorescencinį vertinimą – 437,78 ng DOX), o 1 μg U937 egzosomų baltymo – 94,8 ng TMZ ir 32 ng DOX (pagal fluorescencinį vertinimą – 28,67 ng DOX, 3 lentelė).

3 lentelė. Priešvėžinio vaisto įterpimo į imuninių ląstelių egzosomas efektyvumo rodiklių palyginimas. Lentelėje pateikiami trijų matavimų vidurkiai su standartiniu nuokrypiu (SN). $\text{DOX}_{\text{fluor}}$ – DOX kiekio vertinimas egzosomose fluorescenciniu metodu. * žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su TMZ kiekiu, tenkančiu 1 μg HMC-3 egzosomų baltymo, kai $p < 0,001$; ^ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su DOX kiekiu, tenkančiu 1 μg U937 egzosomų baltymo, kai $p < 0,001$; # žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su TMZ įterpimo efektyvumu į HMC-3 egzosomas, kai $p < 0,001$; ~ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su įterpimo efektyvumu į U937 egzosomas, kai $p < 0,001$

	Egzosomų baltymo kiekis, naudotas elektroporacijoje (μg)		Vaisto koncentracija, naudota elektroporacijoje ($\mu\text{g/ml}$)		Nustatyta įterpto vaisto koncentracija \pm SN ($\mu\text{g/ml}$)		Vaisto kiekis, tenkantis 1 μg egzosomų baltymo (ng)		Įterpimo efektyvumas (%)	
	HMC-3	U937	HMC-3	U937	HMC-3	U937	HMC-3	U937	HMC-3	U937
TMZ	4,5	15	150	500	$40,393 \pm 0,47$	$1,422 \pm 0,054$	8976,22	* ^ 94,8	26,9	# ~ 0,28
DOX					$2,415 \pm 0,010$	$0,480 \pm 0,008$	* ^ 536,67	32	# ~ 1,61	0,1
DOX_{fluor.}					$1,97 \pm 0,31$	$0,43 \pm 0,063$	* ^ 437,78	28,67	# ~ 1,31	0,09

Giuseppe Toffoli su kolegomis [91] taip pat pritaikė elektroporacijos metodą DOX įterpimui į žmogaus storosios žarnos bei krūties vėžio ląstelių linijų produkuojamas egzosomas. Šių mokslininkų įterpto DOX į egzosomų sudėtį efektyvumas siekė 1,5%. Tai sutampa su mūsų tyrimuose nustatytu DOX pakrovimo efektyvumu į mikroglijos egzosomas. Hosna Gomar su grupe [92] atliktas DOX įterpimas elektroporacijos būdu į mezenchimos kamieninių ląstelių egzosomas buvo efektyvesnis ir siekė 13%. Skirtingų ląstelių linijų produkuojamos egzosomos pasižymi skirtingomis savybėmis, tai lemia, jog DOX įterpimo į egzosomas efektyvumas varijuoja tarp skirtingų egzosomų tipų.

3.3. Egzosomose įkapsuliuotų vaistų efektyvumo tyrimas panaudojant 3D glioblastomos modelį

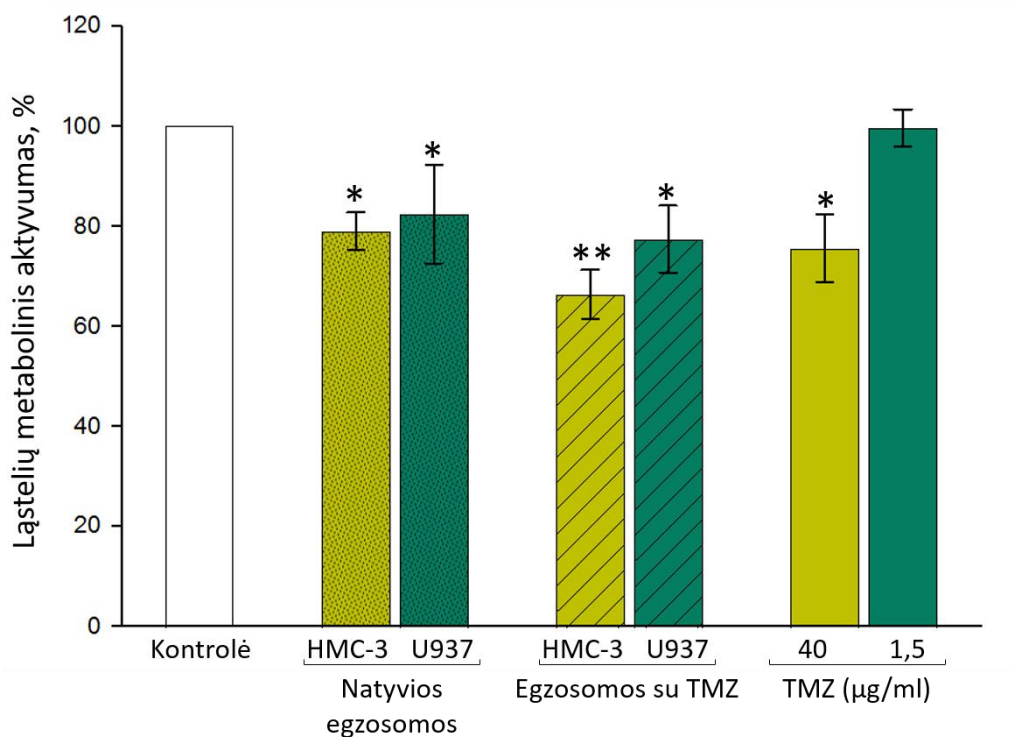
3.3.1. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto temozolomido poveikis glioblastomos ląstelių metaboliniam aktyvumui kultivuojant 3D aplinkoje

Imuninių ląstelių egzosomose įterpto TMZ poveikis glioblastomos metaboliniam aktyvumui buvo įvertinamas naudojant resazurino-rezorufino metaboliniams virsmams jautrų *PrestoBlue* dažą. Suformuotas ir tarpląsteliniam užpilde Geltrex™ kultivuojamas glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo veikiamas natyviomis HMC-3 mikroglijos bei U937 monocitų egzosomomis (5 µg/ml) ir HMC-3 mikroglijos bei U937 monocitų egzosomomis, kurių sudėtyje buvo įterptas TMZ (5 µg/ml). Taip pat buvo stebimas laisvo TMZ poveikis glioblastomos sferoidams. Laisvo TMZ koncentracijos buvo parenkamos atsižvelgus į egzosomų sudėtyje po elektroporacijos įterpto vaisto kiekį: HMC-3 mikroglijos egzosomų atveju tai 40 µg/ml, o U937 monocitų egzosomų – 1,5 µg/ml. Kontrolinių, nepaveiktų ląstelių metabolinis aktyvumas buvo prilygintas 100 %, o kituose mėginiuose išmatuotas ląstelių suminis metabolinis aktyvumas buvo išreikštas kontrolės procentais.

Gauti rezultatai rodo (26 pav.), kad po 72 val. poveikio natyvios HMC-3 mikroglijos egzosomos reikšmingai sumažina glioblastomos ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, metabolinį aktyvumą iki 79 % ± 4 %. Veikiant tokiomis pačiomis egzosomomis su jose įterptu TMZ, ląstelių gyvybiniai rodikliai statistiškai reikšmingai sumažėja iki 66 % ± 5 %. Poveikis laisvu TMZ (40 µg/ml) ląstelių metabolinį aktyvumą sumažina iki 76 % ± 7 %. HMC-3 egzosomose įterptas TMZ lyginant su laisvu TMZ poveikiu glioblastomos metabolinio aktyvumo statistiškai reikšmingai neveikia, tačiau matoma, jog didesnė laisvo vaisto koncentracija veikia panašiai kaip ir įterpta egzosomose.

Be to, glioblastomos ląstelių, kultivuojamų sferinėje būsenoje, metabolinis aktyvumas reikšmingai sumažėja iki 82 % ± 10 % paveikus natyviomis U937 monocitų egzosomomis. Panašų poveikį sukelia ir U937 monocitų egzosomos, kuriose įterptas TMZ (77 % ± 7 %). Vertinant laisvo TMZ (1,5 µg/ml) poveikį glioblastomos ląstelėms, reikšmingų pokyčių lyginant su kontrole nenustatyta (100 % ± 4 %). Gauti rezultatai rodo, jog monocitų egzosomose įterpto TMZ poveikis glioblastomos ląstelių gyvybiniam rodikliams reikšmingai nesiskiria lyginant su laisvu TMZ, tačiau matyti, kad egzosomos padidina mažesnių TMZ koncentracijų poveikį (26 pav.).

Taip pat palygintas HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomų su TMZ poveikis glioblastomos ląstelių gyvybingumui. HMC-3 mikroglijos egzosomos su TMZ glioblastomos metabolizmą mažina labiau (66 % ± 5 %) nei U937 monocitų egzosomos, kuriose įterptas TMZ (77 % ± 7 %), tačiau statistiškai patikimo skirtumo nėra (26 pav.). Tikėtina, kad mikroglijos egzosomos, kurių sudėtyje yra TMZ, labiau slopina glioblastomos metabolinį aktyvumą dėl didesnio TMZ kiekio, įterpto į pūsleles vykdant elektroporaciją.



26 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, metabolinio aktyvumo pokyčiai paveikus imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu temozolomidu. Poveikio vertinimas atliktas po 72 val. inkubacijos su natyviomis HMC-3 mikroglijos bei U937 monocitų egzosomomis (5 µg/ml); su HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis, kuriose buvo įterptas TMZ (5 µg/ml); su TMZ 40 µg/ml (pagal nustatytą pakrovimo kiekį HMC-3 egzosomose) bei 1,5 µg/ml (pagal nustatytą pakrovimo kiekį U937 egzosomose). Rezultatai pateikiami kaip procentiniai vidurkių pokyčiai nuo kontrolės su standartiniais nuokrypiais. * žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$; ** žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$. N = 3

Wolfgang Wick su grupe [93] taip pat nustatė laisvo TMZ poveikį U87 glioblastomos ląstelių, auginamų 3D modelyje, gyvybingumui. Mokslininkų rezultatai parodė, kad glioblastomos sferoido gyvybingumas po 24 val. sumažėjo iki 80 % paveikus 125 µM TMZ (t.y. 24,25 µg/ml) ir iki 50 % paveikus 250 µM TMZ (t.y. 48,5 µg/ml). Ryškesnis laisvo TMZ poveikis aprašytoje publikacijoje gali būti susijęs su trumpesne inkubacija. Samira Borhani su kolegomis [94] nustatė, kad inkubuojant su TMZ ilgiau nei 24 val. vaisto citotoksinis poveikis U87 glioblastomos ląstelėms mažėja dėl ląstelėje pradedančių veikti savireparacijos mechanizmų. Šių mokslininkų gauti rezultatai parodė, jog po 24 val. glioblastomos inkubacijos su 1000 µM (t.y. 164 µg/ml) TMZ, ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki 60 %, o tęsiant inkubaciją iki 72 val. tokia pati TMZ koncentracija ląstelių gyvybingumą sumažino tik iki 90 %.

Antonietta Arcella su grupe [95] sukonstravo liposomas, kurių sudėtyje įterpė TMZ ir palygino šių pūslelių daromą poveikį U87 glioblastomos ląstelių gyvybingumui su tiesioginiu TMZ poveikiu. Jų rezultatai parodė, kad po 72 val. inkubacijos liposomose įterptas TMZ turėjo stipresnį poveikį glioblastomos gyvybingumui nei laisvas TMZ.

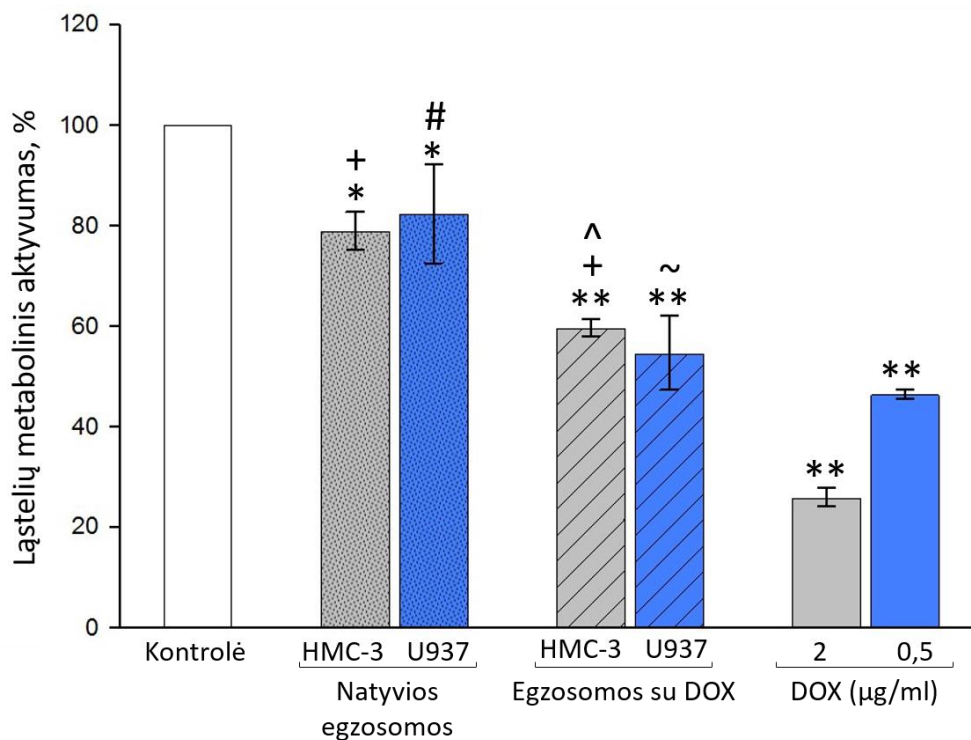
3.3.2. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto doksorubicino hidrochlorido poveikis glioblastomos ląstelių metaboliniam aktyvumui kultivuojant 3D aplinkoje

Panaudojant fluorescuojantį *PrestoBlue* dažą buvo įvertintas imuninių ląstelių egzosomose įterpto DOX poveikis HROG-36 glioblastomos ląstelių, auginamų sferinėje būsenoje, metaboliniam aktyvumui. Suformuotas glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo inkubuojamas su HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų natyviomis egzosomomis (5 µg/ml) bei su HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis, kurių sudėtyje buvo įterptas DOX (5 µg/ml). Siekiant palyginti egzosomose įterpto DOX poveikio efektyvumą, glioblastomos ląstelės taip pat buvo veikiamos laisvu DOX, taikant koncentracijas, kurios buvo nustatytos egzosomose po elektroporacijos (HMC-3 egzosomose 2 µg/ml, o U937 egzosomose 0,5 µg/ml). Kontrolinių, nepaveiktų vaistais ar egzosomomis glioblastomos sferoidų metabolinis aktyvumas prilygintas 100%, o laisvu ir egzosomose įkapsuliuotu DOX paveiktų ląstelių metabolinis aktyvumas išreikštas kontrolės procentais.

Po 72 val. inkubacijos su natyviomis HMC-3 egzosomomis, glioblastomos ląstelių gyvybingumas reikšmingai sumažėja iki 79 % ± 4 %, o HMC-3 egzosomos su įterptu DOX glioblastomos gyvybingumą sumažina dar iki 60 % ± 2 %. Laisvo DOX (2 µg/ml) poveikis sumažina ląstelių metabolinį aktyvumą iki 26 % ± 2 %. Tai rodo, jog laisvo DOX sukiamas poveikis yra reikšmingai didesnis nei DOX, įterpto egzosomose (27 pav.). Mokslinėje literatūroje galima pamatyti tyrimus, kai egzosomos, kurių struktūroje buvo įterptas DOX, sukėlė priešingą poveikį ir sumažino glioblastomos ląstelių gyvybinius rodiklius labiau nei veikiant laisvu DOX [96].

Pateiktame grafike (27 pav.) taip pat matoma, kad natyvios U937 egzosomos sumažina glioblastomos ląstelių gyvybingumą iki 82 % ± 10 %. Tuo tarpu, veikiant U937 monocitų egzosomomis, kuriose įterptas DOX, glioblastomos gyvybiniai rodikliai sumažėja dar iki 55 % ± 7 % ir reikšmingai skyriasi lyginant tiek su kontrole, tiek su natyviomis monocitų egzosomomis. Po inkubacijos su laisvu DOX (0,5 µg/ml), glioblastomos metabolinis aktyvumas mažėja iki 47 % ± 1 %, tačiau statistiškai pokytis tarp laisvo ir egzosomose įterpto DOX poveikio yra nereikšmingas.

Palyginus HMC-3 mikroglijos (60 % ± 2 %) ir U937 monocitų (55 % ± 7 %) egzosomų su įterptu DOX daromą poveikį glioblastomos sferoidams, matoma, kad ląstelių gyvybingumo slopinimas reikšmingai nesiskiria ir yra panašus abiem atvejais (27 pav.).



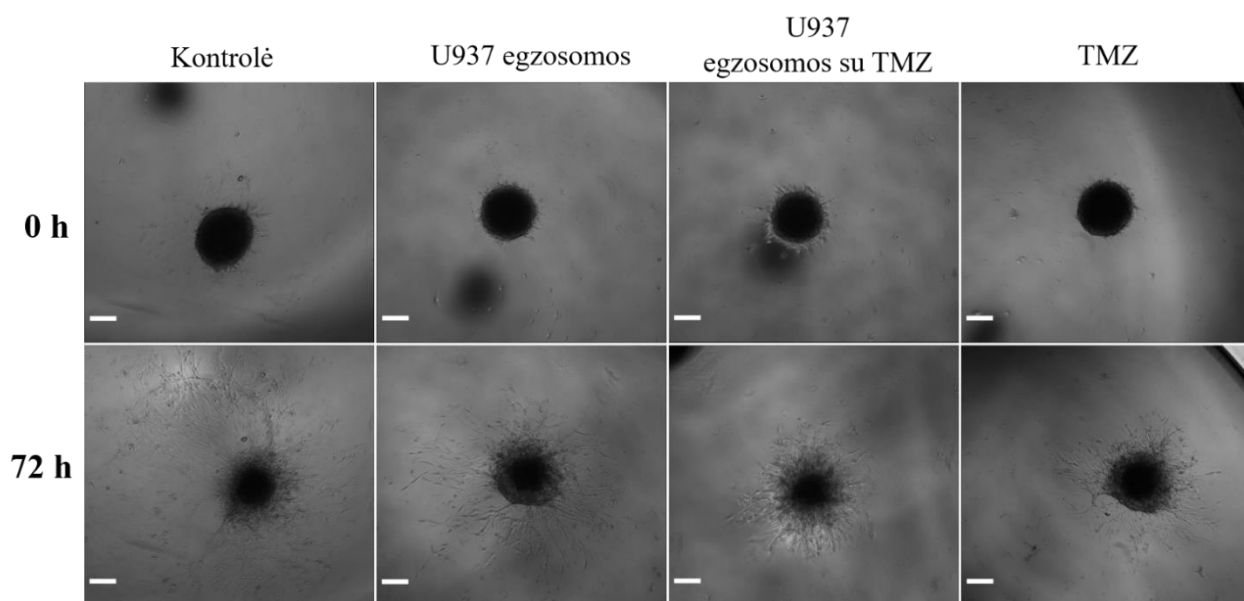
27 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, metabolinio aktyvumo pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu doksorubicino hidrochloridu. Poveikio vertinimas atliktas po 72 val. inkubacijos su natyviomis HMC-3 mikroglijos bei U937 monocitų egzosomomis (5 µg/ml); su HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis, kuriose buvo įterptas DOX (5 µg/ml); su DOX 2 µg/ml (pagal nustatytą pakrovimo kiekį HMC-3 egzosomose) bei 0,5 µg/ml (pagal nustatytą pakrovimo kiekį U937 egzosomose). Rezultatai pateikiami kaip procentiniai vidurkių pokyčiai nuo kontrolės su standartiniais nuokrypiais. * žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$; ** žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$; # žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su DOX 0,5 µg/ml, kai $p < 0,01$; + žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su DOX 2 µg/ml, kai $p < 0,001$; ^ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su natyviomis HMC-3 egzosomomis, kai $p < 0,05$; ~ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su natyviomis U937 egzosomomis, kai $p < 0,05$. N = 3

Elizabeth Graham-Gurysh su kolegomis [97] nustatė panašų laisvo DOX poveikį glioblastomos ląstelėms. Mokslininkai parodė, kad po 48 val. inkubacijos su 0,8 µM (t.y. 0,47 µg/ml) laisvo DOX LN-18 glioblastomos linijos gyvybingumas sumažėjo iki 50 %. Simone Pisano su grupe [98] taip pat panaudojo monocitų egzosomas kaip DOX pernešimo sistemas į navikinį audinį ir palygino vėžinių ląstelių gyvybingumą veikiant laisvu ir egzosomose įterptu DOX. Šių eksperimentų metu buvo nustatyta, kad monocitų egzosomose įterptas DOX sukėlė didesnę vėžinių ląstelių gyvybingumo rodiklių slopinimą nei laisvas DOX.

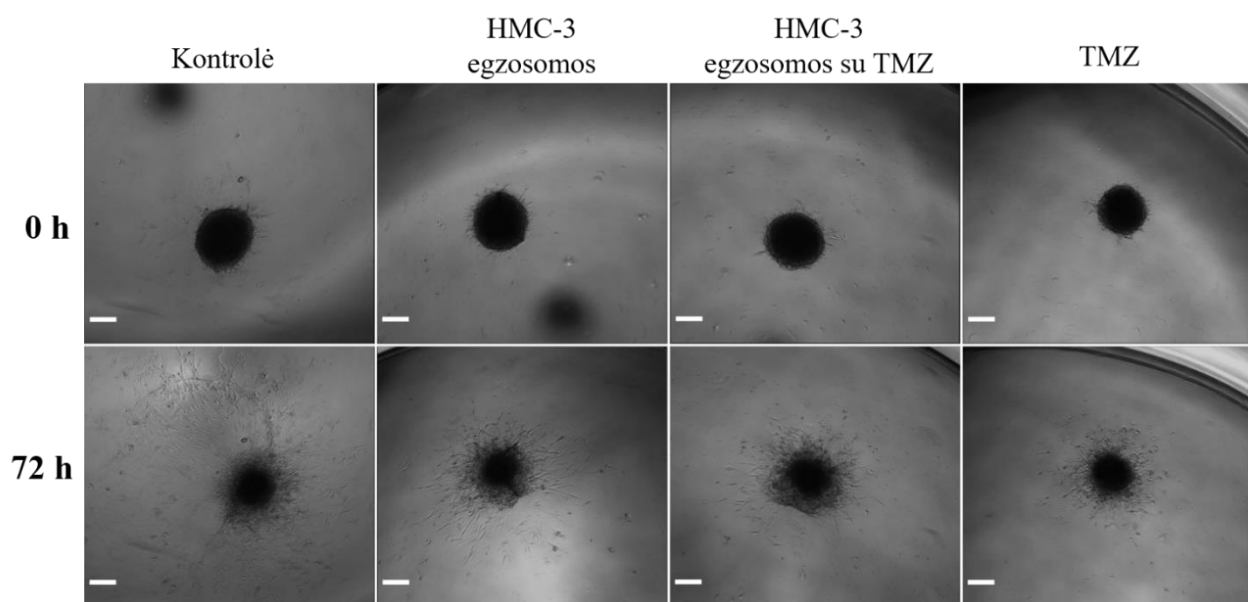
3.3.3. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto temozolomido poveikis glioblastomos ląstelių migracijai kultivuojant 3D aplinkoje

Glioblastomai natūraliai būdinga invazija į aplinkinius audinius – tai pagrindinis šio naviko bruožas, sunkinantis gydymo procesą. Suformuotas glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo veikiamas HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis su TMZ (5 µg/ml). Palyginimui sferoidai buvo veikiami HMC-3 ir U937 natyviomis egzosomomis (5 µg/ml) bei laisvu tos pačios koncentracijos TMZ.

Siekiant įvertinti HROG-36 glioblastomos migracijos potencialą, šviesinio mikroskopo vaizdo nuotraukose buvo matuojamas ląstelių pasklidimo plotas aplink sferoidą. Rerezentaciniai glioblastomos migracijos pokyčiai paveikus U937 egzosomose įterptu TMZ vaizduojami 28 paveikslėlyje, o paveikus HMC-3 egzosomose įterptu TMZ – 29 paveikslėlyje.



28 pav. Rerezentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su U937 monocitų egzosomose įterptu temozolomidu, vaizdai. Glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo veikiamas natyviomis U937 egzosomomis (5 µg/ml), U937 egzosomomis su įterptu TMZ (5 µg/ml) bei TMZ (1,5 µg/ml – pagal nustatytą pakrovimo kiekį U937 egzosomose). Mastelis nuotraukose – 100 µm

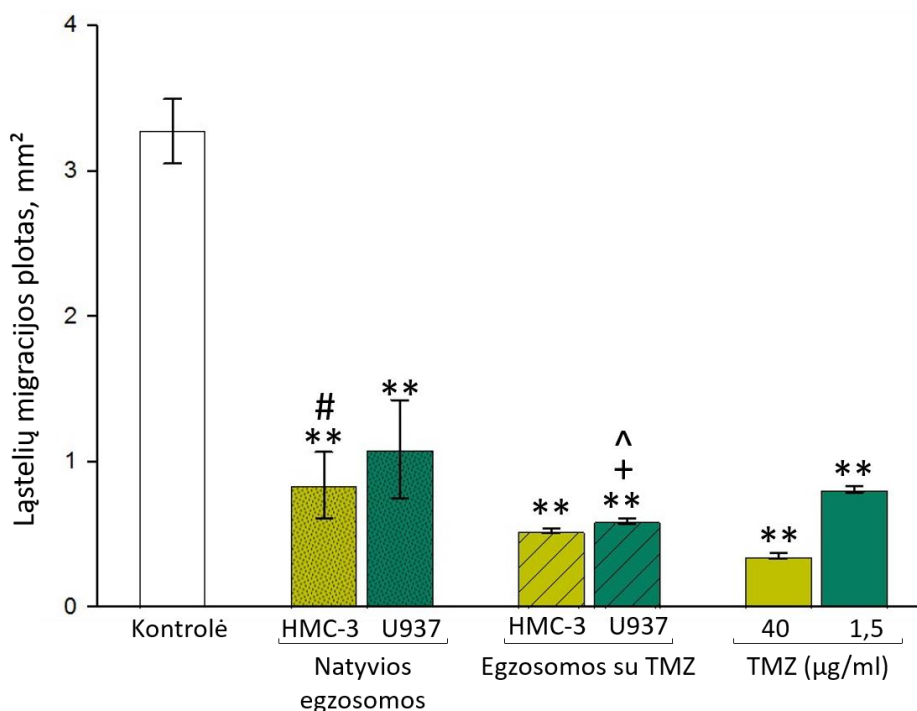


29 pav. Rerezentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su HMC-3 mikroglijos egzosomose įterptu temozolomidu, vaizdai. Glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo veikiamas natyviomis HMC-3 egzosomomis (5 µg/ml), HMC-3 egzosomomis su įterptu TMZ (5 µg/ml) bei TMZ (40 µg/ml – pagal nustatytą pakrovimo kiekį HMC-3 egzosomose). Mastelis nuotraukose – 100 µm

Gauti duomenys rodo, kad glioblastomos ląstelių migracijos plotas po 72 val. poveikio natyviomis HMC-3 mikroglijos egzosomomis reikšmingai sumažėja nuo $3,27 \pm 0,22 \text{ mm}^2$ iki $0,84 \pm 0,23 \text{ mm}^2$, o tokios pačios egzosomos su TMZ migracijos plotą sumažina dar iki $0,52 \pm 0,02 \text{ mm}^2$. Laisvas $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ TMZ ląstelių migracijos nuo sferoido plotą sumažina panašiai kaip ir egzosomose įterptas TMZ ($0,36 \pm 0,32 \text{ mm}^2$), bet reikšmingai mažiau nei natyvios mikroglijos egzosomos (30 pav.).

Natyvios U937 monocitų egzosomos taip pat reikšmingai mažina glioblastomos ląstelių migracijos plotą iki $1,08 \pm 0,34 \text{ mm}^2$. Pateiktame rezultatu grafike matoma, jog monocitų egzosomos su TMZ migracijos plotą mažina dar per pusę ($0,59 \pm 0,02 \text{ mm}^2$). Laisvas TMZ ($1,5 \text{ }\mu\text{g/ml}$) taip pat slopina glioblastomos invazyvumą ir veikia panašiai kaip natyvios egzosomos ($0,81 \pm 0,22 \text{ mm}^2$). Taigi, monocitų egzosomose įterptas TMZ reikšmingai daugiau slopino glioblastomos invazyvumą nei laisvas TMZ (30 pav.).

Lyginant HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomų su įterptu TMZ poveikį glioblastomos ląstelių migracijai, galima matyti, jog mikroglijos egzosomose įterptas vaistas glioblastomos invazyvumą slopina reikšmingai daugiau nei monocitų egzosomose esantis TMZ (30 pav.). Tikėtina, kad ryškesnis HMC-3 mikroglijos egzosomų poveikis yra susijęs su didesniu į egzosomas įterptu TMZ kiekiu.

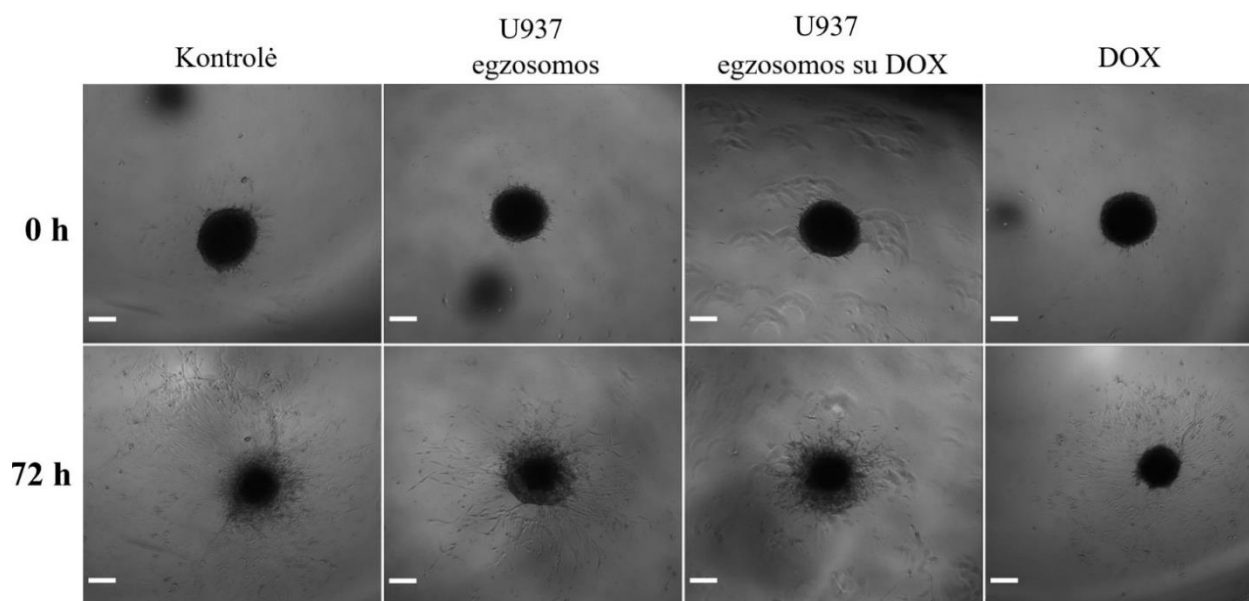


30 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, migracijos pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu temozolomidu. Poveikio vertinimas atliktas po 72 val. inkubacijos su natyviomis HMC-3 mikroglijos bei U937 monocitų egzosomomis ($5 \text{ }\mu\text{g/ml}$); su HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis, kuriose buvo įterptas TMZ ($5 \text{ }\mu\text{g/ml}$); su TMZ $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (pagal nustatytą pakrovimo kiekį HMC-3 egzosomose) bei $1,5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (pagal nustatytą pakrovimo kiekį U937 egzosomose). ** žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$; # žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su TMZ $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$, kai $p < 0,05$; + žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su TMZ $1,5 \text{ }\mu\text{g/ml}$, kai $p < 0,01$; ^ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su HMC-3 egzosomomis su TMZ, kai $p < 0,05$. N = 3

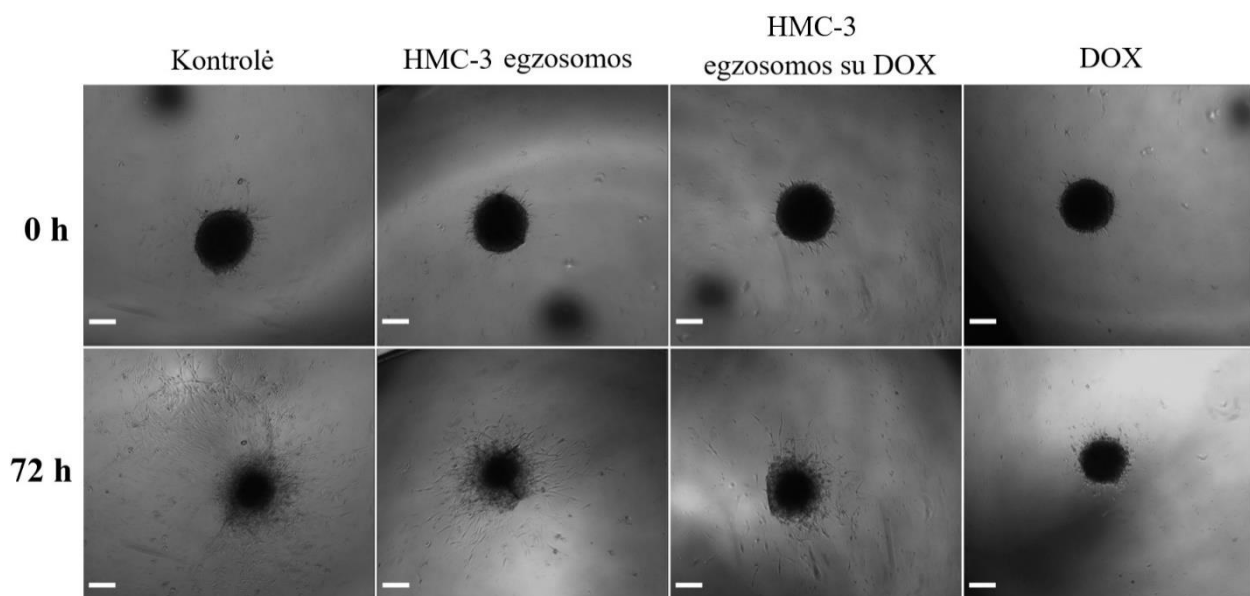
Diana Matias [99] atliktuose glioblastomos migracijos pokyčių po poveikio laisvu TMZ tyrimuose taip pat galima matyti ląstelių invazyvumo slopinimą. Mokslininkė su kolegomis poveikiui stebėti panaudojo panašios koncentracijos TMZ (200 μM , t.y. 38,8 $\mu\text{g/ml}$) ir praėjus 24 val. nustatė migracijos sumažėjimą iki 70%. Mūsų gautuose rezultatuose matomas ryškesnis laisvo TMZ poveikis, galimai dėl pasirinktos ilgesnės poveikio trukmės.

3.3.4. Imuninių ląstelių egzosomose įterpto doksorubicino hidrochlorido poveikis glioblastomos ląstelių migracijai kultivuojant 3D aplinkoje

Glioblastomos ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, invazyvumas buvo vertinamas pagal ląstelių migracijos plotą. Suformuotas ir Geltrex™ tarpląsteliniam užpilde auginamas glioblastomos sferoidas 72 val. buvo inkubuojamas su natūraliomis HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis (5 $\mu\text{g/ml}$) bei HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis, kuriose vykdant elektroporaciją buvo įterptas DOX (5 $\mu\text{g/ml}$). Glioblastomos 3D modelis taip pat buvo tiesiogiai veikiamas tos pačios koncentracijos laisvu DOX. Palyginimui su HMC-3 mikroglijos egzosomomis, sferoidai buvo inkubuojami su 2 $\mu\text{g/ml}$ DOX, o palyginimui su U937 monocitų egzosomomis su 0,5 $\mu\text{g/ml}$ DOX. Natūralus HROG-36 glioblastomos ląstelių migracinis aktyvumas buvo vertinamas pagal tiriamaisiais mėginiais nepaveikto sferoido migracijos plotą (kontrolė). U937 monocitų egzosomose įterpto DOX reprezentatyvus poveikis pateikiamas 31 paveikslėlyje, o HMC-3 mikroglijos egzosomose įterpto DOX – 32 paveikslėlyje.



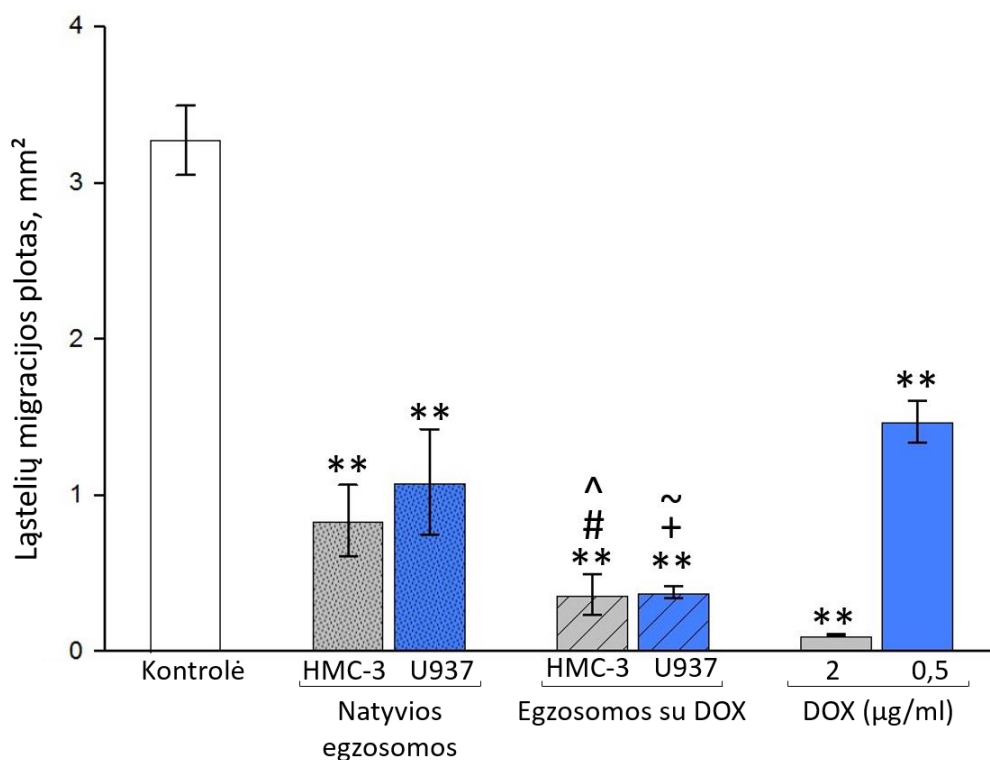
31 pav. Reprezentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su U937 monocitų egzosomose įterptu doksorubicino hidrochloridu, vaizdai. Glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo veikiamas natūraliomis U937 egzosomomis (5 $\mu\text{g/ml}$), U937 egzosomomis su įterptu DOX (5 $\mu\text{g/ml}$) bei DOX (0,5 $\mu\text{g/ml}$ – pagal nustatytą pakrovimo kiekį U937 egzosomose). Mastelis nuotraukose – 100 μm



32 pav. Reprerentaciniai HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje su HMC-3 mikroglijos egzozomose įterptu doksorubicino hidrochloridu, vaizdai. Glioblastomos 3D modelis 72 val. buvo veikiamas natyviomis HMC-3 egzozomomis (5 µg/ml), HMC-3 egzozomomis su įterptu DOX (5 µg/ml) bei DOX (2 µg/ml – pagal nustatytą pakrovimo kiekį HMC-3 egzozomose). Mastelis nuotraukose – 100 µm

33 paveikslėlyje pateiktame grafike matoma, jog natūraliai HMC-3 mikroglijos sekretuojamos egzozomos mažina glioblastomos ląstelių migracijos plotą nuo $3,27 \pm 0,22 \text{ mm}^2$ iki $0,84 \pm 0,23 \text{ mm}^2$. Nustatytas natyvių mikroglijos egzozomų slopinantis poveikis glioblastomos ląstelių migraciją atkartoja Alfonso Grimaldi su grupe [100] gautus rezultatus. Inkubacija su HMC-3 egzozomomis, kuriose įterptas DOX, taip pat reikšmingai mažina nuo sferoido numigravusių ląstelių plotą iki $0,36 \pm 0,13 \text{ mm}^2$. Tačiau tiesioginis poveikis 2 µg/ml DOX sukelia migracijos ploto sumažėjimą net iki $0,1 \pm 0,01 \text{ mm}^2$, todėl toks ląstelių invazyvumo nuslopinimas yra reikšmingai didesnis nei natyvių ar DOX sudėtyje turinčių mikroglijos egzozomų.

Po 72 val. inkubacijos tiek natyvios U937 monocitų egzozomos, tiek U937 monocitų egzozomos, kuriose įterptas DOX, reikšmingai sumažina glioblastomos ląstelių migracijos plotą. Analizuojant gautus rezultatus matoma, kad monocitų egzozomos glioblastomos migracijos plotą mažina iki $1,08 \pm 0,34 \text{ mm}^2$, o egzozomos su DOX tris kartus labiau. Lyginant U937 monocitų egzozomų poveikį su laisvo DOX (0,5 µg/ml) poveikiu matoma, jog laisvas DOX glioblastomos migracijos plotą sumažina tik iki $1,47 \pm 0,13 \text{ mm}^2$. Tai rodo, kad monocitų egzozomose įterptas vaistas efektyviau mažina glioblastomos ląstelių invazyvumą nei veikdamas laisvas (33 pav.).



33 pav. HROG-36 ląstelių, kultivuojamų 3D aplinkoje, migracijos pokyčiai po poveikio imuninių ląstelių egzosomomis su įterptu doksorubicino hidrochloridu. Poveikio vertinimas atliktas po 72 val. inkubacijos su natyviomis HMC-3 mikroglijos bei U937 monocitų egzosomomis (5 µg/ml); su HMC-3 mikroglijos ir U937 monocitų egzosomomis, kuriose buvo įterptas DOX (5 µg/ml); su DOX 2 µg/ml (pagal nustatytą pakrovimo kiekį HMC-3 egzosomose) bei 0,5 µg/ml (pagal nustatytą pakrovimo kiekį U937 egzosomose). ** žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$; # žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su DOX 2 µg/ml, kai $p < 0,05$; ## žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su DOX 2 µg/ml, kai $p < 0,01$; + žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su DOX 0,5 µg/ml, kai $p < 0,01$; ^ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su natyviomis HMC-3 egzosomomis, kai $p < 0,05$; ~ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su natyviomis U937 egzosomomis, kai $p < 0,05$. N = 3

3.4. Rezultatų apibendrinimas

Šio darbo metu panaudojant žmogaus glioblastomos HROG-36 ląstelių liniją buvo suformuotas ir tarpląsteliniam užpildui kultivuojamas 3D modelis. Sudarytuose 376 ± 20 µm dydžio glioblastomos sferoiduose taikant imunohistocheminį dažymą identifikuoti hipoksiniai regionai.

Egzosomos, reikalingos vaisto pateikimui, buvo išskirtos polimerinės precipitacijos metodu iš U937 monocitų ir HMC-3 mikroglijos žmogaus ląstelių linijų. Išgrynintų egzosomų mėginiai buvo charakterizuojami pagal dydį ir specifinius žymenis. U937 monocitų egzosomų mėginyje daugiausiai dalelių buvo 120 nm dydžio, o HMC-3 mikroglijos egzosomų mėginyje – 91 nm bei 141 nm. Tiek U937 monocitų, tiek HMC-3 mikroglijos egzosomų mėginiuose buvo aptikti egzosomoms specifiški CD9 ir CD81 žymenis. Nustatyta, kad HMC-3 mikroglijos egzosomose CD9 žymens raiška yra tris kartus, o CD81 šešis kartus didesnė lyginant su U937 monocitų egzosomomis.

Priešvėžiniai medikamentai TMZ ir DOX į imuninių ląstelių egzosomas buvo įterpti elektroporacijos metodu. Egzosomose įterpto TMZ ir DOX koncentracija buvo įvertinta chromatografiniu metodu

(DOX koncentracija papildomai apskaičiuota ir pagal fluorescencijos intensyvumą). Nustatyta, kad po elektroporacijos 1 µg HMC-3 egzosomų baltymo tenka 8976,22 ng TMZ ir daugiau nei dešimt kartų mažesnis kiekis DOX, o 1 µg U937 egzosomų baltymo – 94,8 ng TMZ ir tris kartus mažiau DOX. Vaisto įterpimas į mikroglijos egzosomas yra efektyvesnis lyginant su monocitų egzosomomis. Didesnis efektyvumas stebimas įterpiant TMZ, o mažesnis – DOX.

Egzosomose įkapsuliuotų vaistų efektyvumo tyrimai buvo atlikti panaudojant 3D glioblastomos modelį. U937 monocitų ir HMC-3 mikroglijos egzosomos su įterptu vaistu po 72 val. reikšmingai sumažino glioblastomos ląstelių metabolinį aktyvumą. U937 monocitų ir HMC-3 mikroglijos egzosomų su TMZ poveikio efektyvumas buvo panašus lyginant su natyviomis egzosomomis ir laisvu TMZ. U937 monocitų ir HMC-3 mikroglijos egzosomos su DOX veikė efektyviau už natyvias egzosomas, bet mažiau efektyviai nei laisvas DOX.

Taip pat buvo įvertinti glioblastomos ląstelių invazyvumo tarpląsteliniam užpilde pokyčiai. HMC-3 mikroglijos egzosomos su TMZ glioblastomos ląstelių migraciją mažino panašiai kaip ir natyvios egzosomos bei laisvas TMZ. U937 monocitų egzosomos su TMZ glioblastomos ląstelių migraciją slopino panašiai kaip ir natyvios egzosomos, bet efektyviau nei laisvas TMZ. HMC-3 mikroglijos egzosomos su TMZ glioblastomos ląstelių migraciją slopino efektyviau nei U937 monocitų egzosomos su TMZ. HMC-3 mikroglijos egzosomos su DOX glioblastomos ląstelių migraciją slopino efektyviau nei natyvios egzosomos, tačiau mažiau efektyviai nei laisvas DOX. U937 monocitų egzosomos su DOX glioblastomos ląstelių migraciją slopino efektyviau nei natyvios egzosomos ar laisvas DOX.

3.5. Rekomendacijos tolesniems tyrimams

1. Atliktuose tyrimuose buvo pasirinkta lyginti tos pačios pakrautų skirtingų ląstelių egzosomų koncentracijos poveikį nepriklausomai nuo vaisto įterpimo efektyvumo. Vykdam tolesnius tyrimus rekomenduojama palyginti ir tos pačios koncentracijos vaisto skirtingų ląstelių egzosomose poveikį.
2. Egzosomų skvarbai į tarpląstelinį užpildą ir įkapsuliuotuose sferoiduose esančias ląsteles nustatyti reikalingi papildomi tyrimai su žymėtomis egzosomomis.
3. Sukurtą 3D glioblastomos modelį rekomenduojama toliau vystyti, įvedant daugiau *in vivo* sąlygas atkartojančių veiksnių, pavyzdžiui, terpės judėjimą.
4. Rekomenduojama egzosomų efektyvumą taip pat ištirti ant chorionoalantojinės membranos suformuotame vaskuliarizuotame glioblastomos modelyje.

Išvados

1. Panaudojant žmogaus HROG-36 ląstelių liniją ir užląstelinio užpildo hidrogelį Geltrex buvo suformuotas glioblastomos 3D modelis su hipoksiniu gradientu.
2. Monocitų egzosomoms būdingas dydis buvo apie 120 nm, o mikroglijos egzosomoms – apie 90 bei 140 nm. Ir monocitų, ir mikroglijos egzosomose aptikta CD9 ir CD81 žymenų raiška.
3. Elektroporacijos būdu į imuninių ląstelių egzosomas buvo įterpti priešvėžiniai medikamentai temozolomidas ir doksorubicino hidrochloridas. Vaistų įterpimas į mikroglijos egzosomas buvo efektyvesnis nei į monocitų egzosomas. Didesnis įterpimo efektyvumas nustatytas naudojant temozolomidą nei doksorubicino hidrochloridą.
4. Monocitų ir mikroglijos egzosomos su įterptais priešvėžiniais medikamentais po 72 val. reikšmingai sumažino hidrogelyje įkapsuliuotuose sferoiduose kultivuojamų glioblastomos ląstelių metabolinį aktyvumą bei invazyvumą. Imuninių ląstelių egzosomos su temozolomidu veikė panašiai kaip natyvios egzosomos ir laisvas vaistas. Doksorubicino hidrochloridas mikroglijos egzosomose metabolinį aktyvumą ir migraciją slopino labiau už natyvias egzosomas, bet mažiau negu laisvas vaistas, o monocitų egzosomose – labiau ir už natyvias egzosomas, ir už laisvą vaistą.

Literatūros sąrašas

1. MICHAEL, Justin S., Bong-Seop LEE, Miqin ZHANG and John S. YU. Nanotechnology for treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Translational Internal Medicine*. 2018. Vol. 6, no. 3, p. 128–133. DOI 10.2478/jtim-2018-0025.
2. CHIEN, Chia Hung, Wei Ting HSUEH, Jian Ying CHUANG and Kwang Yu CHANG. Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2021. Vol. 28, no. 18, p. 1–10. DOI 10.1186/s12929-021-00717-7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00717-7>
3. BREDLAU, Amy Lee, et al. Localized delivery of therapeutic doxorubicin dose across the canine blood-brain barrier with hyperthermia and temperature sensitive liposomes. *Drug Delivery* [online]. 2018. Vol. 25, no. 1, p. 973–984. DOI 10.1080/10717544.2018.1461280. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1461280>
4. CHARMSAZ, Sara, et al. Innovative technologies changing cancer treatment. *Cancers*. 2018. Vol. 10, no. 6, p. 1–9. DOI 10.3390/cancers10060208.
5. TAN, Shuzhen, Dongpei LI and Xiao ZHU. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2020. Vol. 124, p. 1–11. DOI 10.1016/j.biopha.2020.109821.
6. KIM, Hee Jung and Jeong-Soo PARK. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Development & Reproduction*. 2017. Vol. 21, no. 1, p. 1–10. DOI 10.12717/dr.2017.21.1.001.
7. SHAO, Juntang, Jennica ZARO and Yuxian SHEN. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: From tissue distribution to intracellular fate. *International Journal of Nanomedicine*. 2020. Vol. 15, p. 9355–9371. DOI 10.2147/IJN.S281890.
8. KIM, Myung Soo, et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*. 2016. Vol. 12, no. 3, p. 655–664. DOI doi: 10.1016/j.nano.2015.10.012.
9. DUVAL, Kayla, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017. Vol. 32, no. 4, p. 266–277. DOI 10.1152/physiol.00036.2016.
10. FONTOURA, Julia C., et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2020. Vol. 107, no. 110264, p. 1–10. DOI 10.1016/j.msec.2019.110264. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110264>
11. MIRANDA-FILHO, Adalberto, et al. Cancers of the brain and CNS: Global patterns and trends in incidence. *Neuro-Oncology*. 2017. Vol. 19, no. 2, p. 270–280. DOI 10.1093/neuonc/now166.
12. MCNEILL, Katharine A. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics* [online]. 2016. Vol. 34, no. 4, p. 981–998. DOI 10.1016/j.ncl.2016.06.014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>
13. SALEHINIYA, Hamid, et al. Brain Cancer in the World: an Epidemiological Review. *World Cancer Research Journal* [online]. 2019. Vol. 6, no. e1356, p. 1–5. Available from: <https://www.wcrj.net/wp-content/uploads/sites/5/2018/12/e1180-Testicular-cancer-in-the-world-an-epidemiological-review.pdf>

14. BONDY ML, et al. Brain Tumor Epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* [online]. 2008. Vol. 113, no. 7, p. 1953–1968. DOI 10.1002/cncr.23741.Brain. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
15. RIANO, Ivy, et al. Incidence, Mortality, and Survival Trends of Primary CNS Tumors in Cali, Colombia, From 1962 to 2019. *JCO Global Oncology*. 2020. No. 6, p. 1712–1720. DOI 10.1200/go.20.00368.
16. ALMUTRAFI, Amna, et al. The Epidemiology of Primary Central Nervous System Tumors at the National Neurologic Institute in Saudi Arabia: A Ten-Year Single-Institution Study. *Journal of Cancer Epidemiology*. 2020. Vol. 2020, no. 1429615. DOI 10.1155/2020/1429615.
17. PATEL, Anoop P., et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019. Vol. 18, no. 4, p. 376–393. DOI 10.1016/S1474-4422(18)30468-X.
18. OHGAKI, Hiroko and Paul KLEIHUES. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2013. Vol. 19, no. 4, p. 764–772. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
19. KARSY, Michael, et al. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: Review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathologica*. 2012. Vol. 50, no. 4, p. 301–321. DOI 10.5114/fn.2012.32361.
20. URBANSKA, Kaja, Justyna SOKOLOWSKA, Maciej SZMIDT and Pawel SYSA. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*. 2014. Vol. 18, no. 5, p. 307–312. DOI 10.5114/wo.2014.40559.
21. MONTEIRO, Ana, Richard HILL, Geoffrey PILKINGTON and Patrícia MADUREIRA. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells*. 2017. Vol. 6, no. 4, p. 45. DOI 10.3390/cells6040045.
22. SPENCE, Alexander M, et al. Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clinical Cancer Research*. 2008. Vol. 14, no. 9, p. 2623–2630. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-07-4995.Regional.
23. NAYAK, Debasis, Theodore L. ROTH and Dorian B. MCGAVERN. Microglia development and function. *Annual Review of Immunology*. 2014. Vol. 32, p. 367–402. DOI 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.
24. XAVIER, Anna L., João R.L. MENEZES, Steven A. GOLDMAN and Maiken NEDERGAARD. Fine-tuning the central nervous system: Microglial modelling of cells and synapses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014. Vol. 369, no. 1654, p. 1–10. DOI 10.1098/rstb.2013.0593.
25. TAYLOR, Samuel E., Cristina MORGANTI-KOSSMANN, Jonathan LIFSHITZ and Jenna M. ZIEBELL. Rod microglia: A morphological definition. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 5, p. 1–9. DOI 10.1371/journal.pone.0097096.
26. HINWOOD, M., J. MORANDINI, T. A. DAY and F. R. WALKER. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. 2012. Vol. 22, no. 6, p. 1442–1454. DOI 10.1093/cercor/bhr229.
27. ATRI, Chiraz, Fatma Z. GUERFALI and Dhafer LAOUINI. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular*

- Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 6, p. 1–15. DOI 10.3390/ijms19061801.
28. KATSUMOTO, Atsuko, Haiyan LU, Aline S. MIRANDA and Richard M. RANSOHOFF. Ontogeny and functions of CNS macrophages. *Journal of Immunology*. 2014. Vol. 193, no. 6, p. 2615–2621. DOI 10.4049/jimmunol.1400716.Ontogeny.
 29. KARLMARK, Karlin, F. TACKE and I. DUNAY. Monocytes in health and disease — Minireview. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2012. Vol. 2, no. 2, p. 97–102. DOI 10.1556/eujmi.2.2012.2.1.
 30. GRÉGOIRE, Hélène, et al. Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. Vol. 11, no. 368, p. 1–17. DOI 10.3389/fphar.2020.00368.
 31. RASMUSSEN, Birthe Krogh, et al. Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. 2017. Vol. 135, no. 3, p. 571–579. DOI 10.1007/s11060-017-2607-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-017-2607-5>
 32. DAVIS, Mary Elizabeth. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016. Vol. 20, no. 5, p. S2–S8. DOI 10.1007/978-3-319-08467-1_5.
 33. HANIF, Farina, et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017. Vol. 18, no. 1, p. 3–9. DOI 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
 34. RIVANKAR, Sangeeta. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014. Vol. 10, no. 4, p. 853–858. DOI 10.4103/0973-1482.139267.
 35. MATCOVSCHII, Valerii, Dan LISII, Valentin GUDUMAC and Stanislav DOROSENCO. Selective interstitial doxorubicin for recurrent glioblastoma. *Clinical Case Reports*. 2019. Vol. 7, no. 12, p. 2520–2525. DOI 10.1002/ccr3.2546.
 36. KOMAL ANJUM, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomedicine et Pharmacotherapy* [online]. 2017. Vol. 92, p. 681–689. DOI 10.1016/j.biopha.2017.05.125. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.125>
 37. BARCISZEWSKA, Anna-maria and Dorota GURDA. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 8, p. 1–12. DOI 10.1371/journal.pone.0136669.
 38. ZHANG, Jihong, Malcolm F.G. STEVENS and Tracey D. BRADSHAW. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*. 2012. Vol. 5, no. 1, p. 102–114. DOI 10.2174/1874-470211205010102.
 39. LEE, Sang Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases* [online]. 2016. Vol. 3, no. 3, p. 198–210. DOI 10.1016/j.gendis.2016.04.007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
 40. SINGH, Neha, Alexandra MINER, Lauren HENNIS, and Sandeep MITTAL. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist*. 2020. Vol. 3, p. 1–27. DOI 10.20517/cdr.2020.79.
 41. CASSINELLI, Giuseppe. The roots of modern oncology: from discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use. *Tumori*. 2016. Vol. 102, no. 3, p. 226–235.

- DOI 10.5301/tj.5000507.
42. ARORA, Divya, Chetan SHARMA, Sundeep JAGLAN and Eric LICHTFOUSE. *Pharmaceuticals from Microbes*. 2019. ISBN 978-3-030-01880-1.
 43. JAWAD, Bahaa, et al. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2019. Vol. 21, no. 7, p. 1–17. DOI 10.1039/C8CP06776G.
 44. THORN, Caroline F., et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011. Vol. 21, no. 7, p. 440–446. DOI 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.Doxorubicin.
 45. DENEL-BOBROWSKA, Marta and Agnieszka MARCZAK. Structural modifications in the sugar moiety as a key to improving the anticancer effectiveness of doxorubicin. *Life Sciences* [online]. 2017. Vol. 178, p. 1–8. DOI 10.1016/j.lfs.2017.04.009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.04.009>
 46. CHANG, Vivian Y., and Jessica J. WANG. Pharmacogenetics of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. . 2018. Vol. 20, no. 7, p. 1–14.
 47. ROS, Martina Da, et al. Aldoxorubicin and Temozolomide combination in a xenograft mice model of human glioblastoma. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, no. 79, p. 34935–34944. DOI 10.18632/oncotarget.26183.
 48. YÁÑEZ-MÓ, María, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015. Vol. 4, no. 1, p. 1–60. DOI 10.3402/jev.v4.27066.
 49. CHUO, Steven Ting Yu, Jasper Che Yung CHIEN and Charles Pin Kuang LAI. Imaging extracellular vesicles: Current and emerging methods. *Journal of Biomedical Science*. 2018. Vol. 25, no. 91, p. 1–10. DOI 10.1186/s12929-018-0494-5.
 50. BATTISTELLI, Michela and Elisabetta FALCIERI. Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology*. 2020. Vol. 9, no. 21, p. 1–10. DOI 10.3390/biology9010021.
 51. ZHANG, Yuan, Yunfeng LIU, Haiying LIU and Wai Ho TANG. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience* [online]. 2019. Vol. 9, no. 19, p. 1–18. DOI 10.1186/s13578-019-0282-2. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
 52. PATIL, Anandrao Ashok and Won Jong RHEE. Exosomes: Biogenesis, Composition, Functions, and Their Role in Pre-metastatic Niche Formation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019. Vol. 24, no. 5, p. 689–701. DOI 10.1007/s12257-019-0170-y.
 53. YUE, Binglin, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Proliferation*. 2020. Vol. 53, no. 7, p. 1–10. DOI 10.1111/cpr.12857.
 54. KOWAL, Joanna, et al. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014. Vol. 29, p. 116–125.
 55. J. CRENSHAW, Brennetta, Brian SIMS and Qiana L. MATTHEWS. *Biological Function of Exosomes as Diagnostic Markers and Therapeutic Delivery Vehicles in Carcinogenesis and Infectious Diseases*. 2019.
 56. SKOTLAND, Tore, Nina P. HESSVIK, Kirsten SANDVIG and Alicia LLORENTE. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome

- biology. *Journal of Lipid Research*. 2019. Vol. 60, no. 1, p. 9–18. DOI 10.1194/jlr.R084343.
57. GUSACHENKO, O. N., M. A. ZENKOVA and V. V. VLASSOV. Nucleic acids in exosomes: Disease markers and intercellular communication molecules. *Biochemistry (Moscow)*. 2013. Vol. 78, no. 1, p. 1–7. DOI 10.1134/S000629791301001X.
 58. XU, Zhijie, Shuangshuang ZENG, Zhicheng GONG and Yuanliang YAN. Exosome-based immunotherapy: a promising approach for cancer treatment. *Molecular Cancer*. 2020. Vol. 19, no. 160, p. 1–16. DOI 10.1186/s12943-020-01278-3.
 59. SEEBACHER, N. A., A. E. STACY, G. M. PORTER and A. M. MERLOT. *Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019. ISBN 1304601910942.
 60. PUCCI, Carlotta, Chiara MARTINELLI and Gianni CIOFANI. Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*. 2019. Vol. 13, no. 961, p. 1–26. DOI 10.3332/ecancer.2019.961.
 61. ZHANG, Ya Ru, et al. Strategies to improve tumor penetration of nanomedicines through nanoparticle design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2019. Vol. 11, no. 1, p. 1–12. DOI 10.1002/wnan.1519.
 62. DAI, Jie, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2020. Vol. 5, no. 145, p. 1–10. DOI 10.1038/s41392-020-00261-0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>
 63. DUTTA, Abhishek. Exosomes-based cell-free cancer therapy: a novel strategy for targeted therapy. *Immunological Medicine* [online]. 2020. Vol. 14, p. 1–8. DOI 10.1080/25785826.2020.1818482. Available from: <https://doi.org/10.1080/25785826.2020.1818482>
 64. ZHAO, Xiaoyin, et al. Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [online]. 2020. Vol. 128, no. 110237, p. 1–9. DOI 10.1016/j.biopha.2020.110237. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110237>
 65. HAN, Yohan, et al. Overview and update on methods for cargo loading into extracellular vesicles. *Processes*. 2021. Vol. 9, no. 356, p. 1–19. DOI 10.3390/pr9020356.
 66. FU, Shengyang, Yi WANG, Xiaohuan XIA and Jialin C. ZHENG. Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. *NanoImpact* [online]. 2020. Vol. 20, no. 100261, p. 1–20. DOI 10.1016/j.impact.2020.100261. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100261>
 67. ANTIMISIARIS, Sophia G., Spyridon MOURTAS and Antonia MARAZIOTI. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics*. 2018. Vol. 10, no. 4, p. 1–40. DOI 10.3390/pharmaceutics10040218.
 68. KAPAŁCZYŃSKA, Marta, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2018. Vol. 14, no. 4, p. 910–919.
 69. SAYDÉ, Tarek, et al. Biomaterials for three-dimensional cell culture: From applications in oncology to nanotechnology. *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, no. 481, p. 1–29. DOI 10.3390/nano11020481.
 70. LANGHANS, Sigrid A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 9, no. 6, p. 1–14.

DOI 10.3389/fphar.2018.00006.

71. WEN, Jieqiong, Wanbin CHEN, Yayun ZHU and Pengbo ZHANG. Clinical features associated with the efficacy of chemotherapy in patients with glioblastoma (GBM): a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis. *BMC Cancer*. 2021. Vol. 21, no. 81, p. 1–10. DOI 10.1186/s12885-021-07800-0.
72. COLWELL, Nicole, et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: Shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro-Oncology*. 2017. Vol. 19, no. 7, p. 887–896. DOI 10.1093/neuonc/now258.
73. LEHRICH, Brandon M., et al. Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 11. DOI 10.3390/ijms19113538.
74. AUSTIN, Jake, et al. Nanoparticle number concentration measurements by multi-angle dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*. 2020. Vol. 22, no. 5, p. 1–15. DOI 10.1007/s11051-020-04840-8.
75. LUFT, Christin and Robin KETTELER. Electroporation Knows No Boundaries: The Use of Electrostimulation for siRNA Delivery in Cells and Tissues. *Journal of Biomolecular Screening*. 2015. Vol. 20, no. 8, p. 932–942. DOI 10.1177/1087057115579638.
76. 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* [online]. 2019. Vol. 1, no. 12, p. 1–9. DOI 10.1007/s42452-019-1646-2. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1646-2>
77. R, Malviya, V. Banasal, O.P., Pal and P.K., Sharma. High Performance Liquid Chromatography: a Short Review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2010. Vol. 2, no. 5, p. 22–26.
78. MICHELS, Luana R., et al. HPLC–UV method for temozolomide determination in complex biological matrices: Application for in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Biomedical Chromatography*. 2019. Vol. 33, no. 10, p. 1–10. DOI 10.1002/bmc.4615.
79. DHARMALINGAM, Senthil Rajan, Srinivasan RAMAMURTHY, Kumarappan CHIDAMBARAM and Shamala NADARAJU. A simple HPLC bioanalytical method for the determination of doxorubicin hydrochloride in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 13, no. 3, p. 409–415. DOI 10.4314/tjpr.v13i3.15.
80. BARISAM, Maryam, Mohammad Said SAIDI, Navid KASHANINEJAD and Nam Trung NGUYEN. Prediction of necrotic core and hypoxic zone of multicellular spheroids in a microbio-reactor with a U-shaped barrier. *Micromachines*. 2018. Vol. 9, no. 94, p. 1–19. DOI 10.3390/mi9030094.
81. GOMES, Aurélie, et al. Oxygen partial pressure is a rate-limiting parameter for cell proliferation in 3D spheroids grown in physioxic culture condition. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, no. 8, p. 1–11. DOI 10.1371/journal.pone.0161239.
82. TALARI, Abdullah Chandra Sekhar, Ahtasham RAZA, Shazza REHMAN and Ihtesham U. REHMAN. Analyzing normal proliferating, hypoxic and necrotic regions of T-47D human breast cancer spheroids using Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2017. Vol. 52, no. 10, p. 909–924. DOI 10.1080/05704928.2017.1363053. Available from:

<https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1363053>

83. RIFFLE, Stephen, Ram Naresh PANDEY, Morgan ALBERT and Rashmi S. HEGDE. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*. 2017. Vol. 17, no. 338, p. 1–12. DOI 10.1186/s12885-017-3319-0.
84. GURUNG, Sonam, Dany PEROCHEAU, Loukia TOURAMANIDOU and Julien BARUTEAU. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2021. Vol. 19, no. 47, p. 1–19. DOI 10.1186/s12964-021-00730-1. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
85. HAQUE, Sanjana, et al. Monocyte-derived exosomes upon exposure to cigarette smoke condensate alter their characteristics and show protective effect against cytotoxicity and HIV-1 replication. *Scientific Reports* [online]. 2017. Vol. 7, no. 16120, p. 1–14. DOI 10.1038/s41598-017-16301-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16301-9>
86. KUMAR, Sanjay, Qiana L. MATTHEWS and Brian SIMS. Effects of Cocaine on Human Glial-Derived Extracellular Vesicles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 8, no. 563441, p. 1–8. DOI 10.3389/fcell.2020.563441.
87. XU, Wenqin, et al. Exosomes from Microglia Attenuate Photoreceptor Injury and Neovascularization in an Animal Model of Retinopathy of Prematurity. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* [online]. 2019. Vol. 16, no. 15, p. 778–790. DOI 10.1016/j.omtn.2019.04.029. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.04.029>
88. VAN DEN BROEK, Bram, et al. Microglial derived extracellular vesicles activate autophagy and mediate multi-target signaling to maintain cellular homeostasis. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020. Vol. 10, no. 1, p. 1–25. DOI 10.1002/jev2.12022.
89. ROLS, Marie-Pierre. Parameters Affecting Cell Viability Following Electroporation In Vitro. In : *Handbook of Electroporation*. 2017. p. 1449–1465. ISBN 9783319328867.
90. LAMICHHANE, Tek N., Rahul S. RAIKER and Steven M. JAY. Exogenous DNA Loading into Extracellular Vesicles via Electroporation is Size-Dependent and Enables Limited Gene Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 2015. Vol. 12, no. 10, p. 3650–3657. DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00364.
91. TOFFOLI, Giuseppe, et al. Exosomal doxorubicin reduces the cardiac toxicity of doxorubicin. *Nanomedicine*. 2015. Vol. 10, no. 19, p. 2963–2971. DOI 10.2217/nmm.15.118.
92. GOMARI, Hosna, et al. Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14, p. 5679–5690. DOI 10.2147/IJN.S210731.
93. WICK, Wolfgang, et al. Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Research*. 2002. Vol. 62, no. 6, p. 1915–1919.
94. BORHANI, Samira, et al. In vitro radiosensitizing effects of temozolomide on U87MG cell lines of human glioblastoma multiforme. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2017. Vol. 42, no. 3, p. 258–265.
95. ARCELLA, Antonietta, et al. Brain Targeting by Liposome-Biomolecular Corona Boosts Anticancer Efficacy of Temozolomide in Glioblastoma Cells. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018. Vol. 9, no. 12, p. 3166–3174. DOI 10.1021/acschemneuro.8b00339.

96. THAKUR, Abhimanyu, et al. Inhibition of Glioma Cells' proliferation by doxorubicin-loaded Exosomes via microfluidics. *International Journal of Nanomedicine*. 2020. Vol. 15, p. 8331–8343. DOI 10.2147/IJN.S263956.
97. GRAHAM-GURYSH, Elizabeth, et al. Sustained Delivery of Doxorubicin via Acetalated Dextran Scaffold Prevents Glioblastoma Recurrence after Surgical Resection. *Mol. Pharm.* 2018. Vol. 15, no. 3, p. 1309–1318. DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01114.Sustained.
98. PISANO, Simone, et al. Immune (Cell) Derived Exosome Mimetics (IDEM) as a Treatment for Ovarian Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. Vol. 8, no. 553576, p. 1–14. DOI 10.3389/fcell.2020.553576.
99. MATIAS, Diana, et al. Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition. *Cellular Oncology*. 2017. Vol. 40, no. 3, p. 247–261. DOI 10.1007/s13402-017-0320-1.
100. GRIMALDI, Alfonso, et al. Microglia-derived microvesicles affect microglia phenotype in glioma. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019. Vol. 13, no. 41, p. 1–14. DOI 10.3389/fncel.2019.00041.

Publikacijų sąrašas

Straipsniai recenzuojamuose periodiniuose leidiniuose

„Investigation of phenolic composition and anticancer properties of ethanolic extracts of Japanese quince leaves“ žurnale *Foods 2021* (Volume 10, Issue 1, 18).

Mokslinių tyrimų rezultatų skelbimas konferencijose

„Hypoxia reduces sensitivity to temozolomide and activates catalase expression“ tarptautinėje gyvybės mokslų konferencijoje Coins vykusioje 2021-03-30, Vilniuje.

1 priedas. Baigiamojo projekto rezultatų skelbimas mokslinėje publikacijoje



The image shows a certificate of publication for the journal 'foods'. At the top left, there are three circular icons: a green one with a fork and knife, a blue one with 'Indexed in: PubMed', and a yellow one with 'CITESCORE 1.3 SCOPUS'. To the right of these is a yellow circle with 'IMPACT FACTOR 4.092'. The journal title 'foods' is in a green serif font, with 'an Open Access Journal by MDPI' below it. The main title 'CERTIFICATE OF PUBLICATION' is in large, bold, black capital letters, centered and surrounded by a laurel wreath. Below this, the article title is given: 'Investigation of Phenolic Composition and Anticancer Properties of Ethanolic Extracts of Japanese Quince Leaves'. The authors are listed as 'Vaidotas Zvikas; Ieva Urbanaviciute; Rasa Bernotiene; Deimante Kulakauskiene; Urte Morkunaite; Zbigniew Balion; Daiva Majiene; Mindaugas Liaudanskas; Pranas Viskelis; Aiste Jekabsone; Valdas Jakstas'. The journal information is 'Published in: Foods 2021, Volume 10, Issue 1, 18'. At the bottom right, the MDPI logo is shown with 'Academic Open Access Publishing Since 1996' and 'BaseL, December 2020'.

 **foods**
an Open Access Journal by MDPI

CERTIFICATE OF PUBLICATION

Certificate of publication for the article titled:
Investigation of Phenolic Composition and Anticancer Properties of Ethanolic Extracts of Japanese Quince Leaves

Authored by:
Vaidotas Zvikas; Ieva Urbanaviciute; Rasa Bernotiene; Deimante Kulakauskiene; Urte Morkunaite; Zbigniew Balion;
Daiva Majiene; Mindaugas Liaudanskas; Pranas Viskelis; Aiste Jekabsone; Valdas Jakstas

Published in:
Foods 2021, Volume 10, Issue 1, 18

 **MDPI** Academic Open Access Publishing
Since 1996
BaseL, December 2020



Certificate of PARTICIPATION

This certificate is presented to

**DEIMANTĖ
KULAKAUSKIENĖ**

For participating in the International Conference of Life Sciences
The (Extra)ordinary COINS 2021 and presenting a poster during the
poster session on 30th of March

Coordinator of the
conference

Daniel Šematovič



2021-03-30
Vilnius

