



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Kamieninių ląstelių egzosomų poveikio osteoblastams tyrimas medikamentinės osteonekrozės *in vitro* modelyje

Baigiamasis magistro projektas

Eglė Šeperauskaitė

Projekto autorė

Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Kamieninių ląstelių egzosomų poveikio osteoblastams tyrimas medikamentinės osteonekrozės *in vitro* modelyje

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Eglė Šeperauskaitė

Projekto autorė

Vyresn. m. d. dr. Aistė Jekabsone

Vadovė

M. d. dr. Silvija Jankevičiūtė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Eglė Šeperauskaitė

Kamieninių ląstelių egzosomų poveikio osteoblastams tyrimas medikamentinės osteonekrozės *in vitro* modelyje

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.

Eglė Šeperauskaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Šeperauskaitė, Eglė. Kamieninių ląstelių egzosomų poveikio osteoblastams tyrimas medikamentinės osteonekrozės *in vitro* modelyje. 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: osteoblastai, su bisfosfonatais susijusi žandikaulio osteonekrozė, kamieninių ląstelių egzosomos, regeneracija.

Kaunas, 2021. 55 p.

Santrauka

Žandikaulio osteonekrozė yra bisfosfonatų, kurie skiriami gydyti per didelę kaulinio audinio rezorbciją, hiperkalcemiją, ilgalaikio vartojimo komplikacija. Taip pat yra ir kitų rizikos veiksnių, skatinančių šios ligos vystymąsi, tokių kaip dantų ar periodonto ligos, gliukokortikoidų terapija, chemoterapija, rūkymas. Vis dėlto ligos patogenezė nėra visiškai aiški, o vieno veiksmingo gydymo nėra. Dėl to svarbu atlikti mokslinius tyrimus, siekiant geriau suprasti su bisfosfonatais susijusius žandikaulio osteonekrozės vystymosi mechanizmus. Todėl projekte nagrinėjamas žymiai mažiau ištirtas, lyginant su osteoklastais, osteoblastų vaidmuo ligos modelyje, nes yra žinoma, kad su bisfosfonatais susijusi žandikaulio osteonekrozė yra susijusi su apoptozės indukcija osteoblastuose. Tai gali būti svarbus ankstyvo osteonekrozinių procesų nustatymo žymuo. Toliau projekte nagrinėta neląstelinė regeneracijos terapija – veikimas egzosomomis, kurios išskirtos iš riebalinio tipo kamieninių ląstelių. Taikant spektrofotometrinius, dvigubo branduolių dažymo metodus, buvo ištirtas osteoblastų gyvybingumas veikiant juos skirtingų koncentracijų bisfosfonatų ir išskirtų egzosomų preparatais. Taip pat buvo nustatytas bisfosfonatų ir egzosomų paveiktų osteoblastų energetinis profilis. Atlikus eksperimentus, apibendrinus gautus rezultatus, nustatyta, kad osteoblastams statistiškai reikšmingą gyvybingumo pokytį sukelia 5, 50 ir 100 μM bisfosfonatai lyginant su neveiktomis ląstelėmis. Taip pat bisfosfonatų inkubacijos laikai po 48, 72 val. irgi buvo statistiškai reikšmingi osteoblastų gyvybingumui. Tuo tarpu ląstelių gyvybingumas paveikus kartu ir bisfosfonatų, ir egzosomų mėginiais statistiškai reikšmingai padidėjo lyginant su tik bisfosfonatų paveiktais osteoblastais, o geriausią apsauginį poveikį parodė – 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ koncentracijos egzosomų preparatas. Be to tiriant osteoblastų energetinį profilį nustatyta, kad bisfosfonatai ženkliai sumažino mitochondrinį ir glikolitinį aktyvumą. Tuo tarpu kamieninių ląstelių egzosomos iš dalies sumažino mitochondrijų pažaidas, o glikolizei įtakos neturėjo. Gauti rezultatai įrodo, kad riebalinės kilmės kamieninių ląstelių egzosomos turi teigiamos įtakos kaulų regeneracijos procese.

Šeperauskaitė, Eglė. Investigation of the Effect of Stem Cell Exosomes on Osteoblasts in Medication-Related Osteonecrosis *In Vitro* Model. Master's Final Degree Project / supervisor Snr Researcher Dr. 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: osteoblasts, bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws, stem cells exosomes and regeneration.

Kaunas, 2021. 55 pages.

Summary

Osteonecrosis of the jaw is a complication of long-term use of bisphosphonates which are used for the treatment of excessive bone resorption, hypercalcaemia. Also, there are other risk factors which stimulates the development of this disease, such as dental or periodontal diseases, glucocorticoid therapy, chemotherapy, smoking. However, pathogenesis of the disease is still not completely clear and there is no single effective treatment. Therefore, it is important to perform scientific research in order to better understand bisphosphonate-related mechanisms for osteonecrosis of the jaw development. That is what this project through addresses the role of osteoblasts in the disease model, which has been significantly less studied compared to osteoclasts, as bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is known to be associated with induction of apoptosis in osteoblasts. This may be an important marker of early detection of the processes of osteonecrosis. The project further examined non-cellular regeneration therapy – the operation of exosomes that are isolated from adipose-type stem cells. The viability of osteoblasts treatment with different concentrations of bisphosphonates and isolated exosomes was investigated using spectrophotometric double-core staining methods. After executing experiments and summarizing the results, it was found that 5, 50 and 100 μM bisphosphonates cause statistically significant change for osteoblasts in terms of viability when compared to inactive cells. Also, incubation times of bisphosphonates after 48 and 72 hours were also statistically significant for osteoblast viability. Meanwhile, co-treatment of cells with both bisphosphonates and exosome samples showed a statistically significant increase compared to osteoblasts treated with bisphosphonates alone, with exosomes at a concentration of 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ showing the best protective effect. In addition, studies of the energy profile of osteoblasts found that bisphosphonates markedly reduced mitochondrial and glycolytic activity. Meanwhile, stem cell exosomes partially reduced mitochondrial damage and did not affect glycolysis. The obtained results prove that fat-derived stem cell exosomes have a positive effect on the process of bone regeneration.

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų sąrašas	10
Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. Kaulinis audinys	12
1.2. Osteoporozė.....	13
1.2. Bisfosfonatai.....	13
1.2.1. Bisfosfonatų atradimas	13
1.2.2. Vaistinės molekulės struktūriniai aktyvumo ryšiai	14
1.2.3. Vaisto-taikinio sąveikos	15
1.3. Osteonekrozė	17
1.4. Pažangiosios terapijos vaistiniai produktai	19
1.4.1. Kamieninės ląstelės	20
1.5. Egzosomos.....	21
1.5.1. Egzosomos regeneracijoje	22
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	24
2.1. Tirpalai ir reagentai	24
2.2. Prietaisai ir įrankiai.....	25
2.3. Žmogaus osteoblastų hFOB 1.19 ląstelių kultivavimas ir paruošimas tyrimui.....	25
2.3.1. Persėjimo procedūra	26
2.3.2. Ląstelių suspensijos ruošimas.....	26
2.3.3. Gyvų ląstelių skaičiaus nustatymas	26
2.4. Mezenchiminių kamieninių ląstelių ASC/TERT1 auginimas <i>in vitro</i>	27
2.4.1. Egzosomų išskyrimas iš ASC/TERT1.....	27

2.4.2. Egzosomų koncentracijos nustatymas	28
2.4.3. Egzosomų dydžio nustatymas	28
2.5. Osteoblastų veikimas bisfosfonatais ir egzozomų preparatais	28
2.6. Osteoblastų suminio metabolinio aktyvumo vertinimas	29
2.7. Osteoblastų gyvybingumo vertinimas	29
2.8. Mitochondrinio ir glikolinio energetinio metabolizmo vertinimas	30
2.9. Eksperimentų rezultatų apdorojimas ir vaizdavimas.....	31
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	32
3.1. Suminio metabolinio aktyvumo vertinimas.....	32
3.2. Egzosomų išskyrimas ir identifikavimas.....	34
3.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių egzozomų poveikio osteoblastų metaboliniam aktyvumui medikamentinės osteonekrozės <i>in vitro</i> modelyje tyrimas.....	35
3.4. Osteoblastų, paveiktų mezenchiminių kamieninių ląstelių egzozomomis, gyvybingumo tyrimas.....	38
3.5. hFOB 1.19 ląstelių, paveiktų bisfosfonatų ir egzozomų preparatais, energetinio profilio nustatymas	40
Išvados	43
Literatūros sąrašas	44

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Bisfosfonatų cheminės struktūros [32]	15
2 lentelė. Naudotų medžiagų sąrašas	24
3 lentelė. Naudotos įrangos sąrašas	25

Paveikslų sąrašas

1 pav. Kaulo sandara. Pritaikyta pagal [10].....	12
2 pav. Osteoklastų sukelta kaulinio audinio resorbcija. Pritaikyta pagal [11]	12
3 pav. Pirofosfatų struktūra. Pritaikyta pagal [23]	14
4 pav. Bisfosfonatų struktūra. Pritaikyta pagal [24].....	14
5 pav. Bisfosfonato molekulės branduolys. Pritaikyta pagal [30].....	14
6 pav. FPP, GGPP biosintezė ir baltymų prenilinimas. Pritaikyta pagal [44].....	16
7 pav. Mevalonato kelias. Pritaikyta pagal [45]	17
8 pav. ATMP klasifikacija. Pritaikyta pagal [79].....	20
9 pav. Egzosomų generavimas, sekrecija ir krovinių pernešimas iš donoro ląstelių į recipientų ląsteles. Pritaikyta pagal [98]	22
10 pav. hFOB 1.19 ląstelių linijos vaizdas per šviesinį mikroskopą.....	25
11 pav. ASC/TERT1 ląstelių linijos vaizdas per šviesinį mikroskopą.....	27
12 pav. Bradfordo kalibracinė kreivė	28
13 pav. Ląstelių gyvybingumo nustatymas spektrofotometriniu metodu.....	29
14 pav. Resazurino virtimas rezorufinu.....	29
15 pav. Ląstelių gyvybingumo nustatymas su fluorescenciniu mikroskopu.....	30
16 pav. Ląstelių fenotipo nustatymas su <i>Seahorse</i> analizatoriumi.....	31
17 pav. Alendronato ir zoledronato poveikio osteoblastų gyvybingumui tyrimas.....	33
18 pav. ASC/TERT1 ląstelių egzosomų dydžio procentinis pasiskirstymas	34
19 pav. Kamieninių ląstelių egzosomų reikšmė alendronatu veikiamų osteoblastų metaboliniam aktyvumui	35
20 pav. Kamieninių ląstelių egzosomų reikšmė zoledronatu veikiamų osteoblastų metaboliniam aktyvumui	37
21 pav. Dvigubo branduolių dažymo metodu vertintas osteoblastų, paveiktų bisfosfonatais ir egzosomomis, gyvybingumas.....	38
22 pav. Dvigubo branduolių dažymo metodu vertinti gyvybingumo rodikliai	39
23 pav. Mitochondrijų aktyvumo nustatymas	41
24 pav. Glikolizės aktyvumo nustatymas.....	42

Santrumpų sąrašas

ATP – adenozino trifosfatas;

BRONJ – su bisfosfonatais susijusi žandikaulio osteonekrozė;

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

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

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

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

RNR – ribonukleino rūgštis.

Įvadas

Osteoporozė yra lėtinė, su senėjimu susijusi kaulų retėjimo liga, kuri dažniausiai aptinkama, kai jau įvyksta kaulinis lūžis. Vieni iš dažniausiai skiriamų šiai ligai gydyti vaistinių preparatų yra bisfosfonatai. Šie vaistai stipriai slopina osteoklastų aktyvumą ir padidina kaulų mineralinį tankį, taip sumažindami kaulų lūžių riziką. Taip pat bisfosfonatai skirti hiperkalcemijai, atsirandančiai dėl piktybinio naviko, daugybinės mielomos, Pedžeto ligos, osteosklerozės, pluoštinės displazijos ir kitų kaulų ligų, kurioms būdinga kaulų rezorbcija, gydyti [1]. Tačiau šių vaistinių preparatų ilgalaikis vartojimas susijęs su nepageidaujama šalutiniais poveikiais, iš kurių dažniausiai pasitaiko žandikaulių osteonekrozė. Ši liga nustatoma, jei veido, kaklo srityse nebuvo taikoma spindulinė terapija, o pacientui atsiranda burnos kaulo atsivėrimas, negyjantis ilgiau nei aštuonias savaites [2]. Žandikaulio osteonekrozė iki šiol neturi veiksmingo gydymo, todėl labai svarbu ieškoti gydymo strategijų šiai problemai išspręsti [3].

Moksliniai tyrimai rodo, kad žandikaulių osteonekrozės priežastis gali būti bisfosfonatų slopinantis poveikis kaulų kamieninėms ląstelėms osteoblastams [4]. Iki klinikiniuose tyrimuose efektyviai žandikaulių osteonekrozės simptomus sumažino kamieninių ląstelių terapija [5]. Tačiau kamieninių ląstelių taikymas praktikoje susijęs su įvairiais iššūkiais, tokiais, kaip dozavimo, įvedimo ir ilgalaikio lokalizavimo sunkumais, imuninio atmetimo reakcijomis ir navikų augimo skatinimu [6]. Kamieninių ląstelių poveikis didele dalimi priklauso nuo jų išskiriamų egzosomų. Tai nuo keliasdešimt iki maždaug dviejų šimtų nanometrų dydžio membraninės pūsleles, kuriose yra baltymų, nukleorūgščių, lipidų bei kitų biomolekulių, svarbių tarpląsteliniame bendravime [7]. Jas išskiria įvairios organizmo ląstelės, taip pat ir mezenchiminės kamieninės ląstelės. Kamieninių ląstelių egzosomos stimuliuoja įvairių audinių regeneraciją, o tai leidžia manyti, kad jos gali sumažinti bisfosfonatų sukeltą žandikaulio osteonekrozės mastą ir paskatinti kaulinio audinio atsinaujinimą [8]. Kadangi egzosomos nėra imunogeniškos ir pasižymi gera skvarba į audinius, jų pateikimas, dozavimas būtų gerokai paprastesnis, nepageidaujamų poveikių rizika mažesnė nei kamieninių ląstelių. Mano žiniomis, kamieninių ląstelių egzosomų preparatai BRONJ gydymui iki šiol nėra išbandomi nei klinikiniuose, nei ikiklinikiniuose tyrimuose.

Projekto tikslas – ištirti riebalinės kilmės mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomų apsauginį ir regeneracinį poveikį *in vitro* su bisfosfonatais susijusios osteonekrozės modelyje.

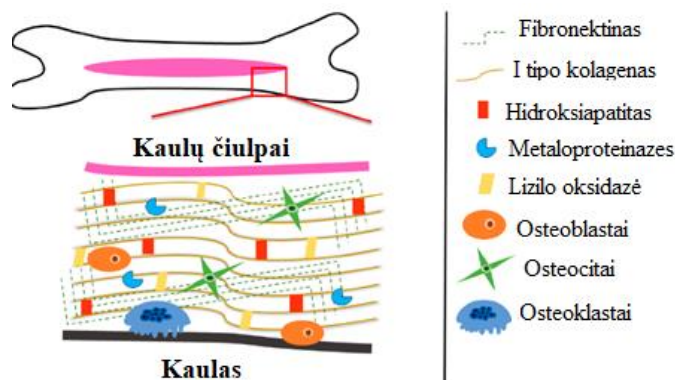
Projekto uždaviniai:

1. sukurti osteonekrozės modelį *in vitro*.
2. išskirti riebalinės kilmės kamieninių ląstelių egzosomas ir jas identifikuoti.
3. įvertinti kamieninių ląstelių egzosomų poveikį osteoblastų metaboliniam aktyvumui ir gyvybingumui.
4. nustatyti kamieninių ląstelių egzosomų poveikį osteoblastų mitochondrijų kvėpavimui ir glikolitiniam metaboliniam aktyvumui.

1. Literatūros apžvalga

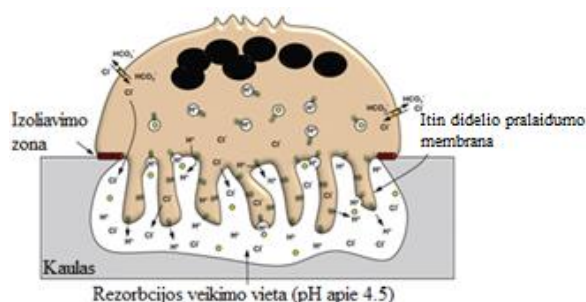
1.1. Kaulinis audinys

Kaulas yra standus organas, kuris sudaro stuburinių gyvūnų griaučius. Kaulai saugo įvairius kūno organus, gamina raudonuosius ir baltuosius kraujo kūnelius, kaupia mineralus, suteikia kūniui struktūrą ir atramą, suteikia judrumo. Kaulinį audinį sudaro įvairių tipų kaulinės ląstelės: osteoblastai ir osteocitai, kurie dalyvauja formuojant ir mineralizuojant kaulą, o osteoklastai dalyvauja kaulinio audinio rezorbcijoje (žr. 1 pav.). Taip pat kaulą sudaro ir tarpląstelinė terpė, kurioje yra organinė dalis, sudaryta daugiausia iš I tipo kolageno, bei neorganinė – daugiausia iš hidroksiapatito [9].



1 pav. Kaulo sandara susideda iš kaulinių ląstelių ir tarpląstelinio užpildo, kuriame yra I tipo kolagenas, ne kolageno tipo baltymai, tokie kaip fibronektiną, lizilo oksidazę (LOX), metaloproteinazes (MMP), bei hidroksiapatito kristalai. Pritaikyta pagal [10]

Kad kaulai būtų tvirti, kūnas suskaido seną kaulą ir pakeičia jį nauju kauliniu audiniu. Maždaug nuo 30 metų amžiaus kaulų masė nustoja augti, o maždaug nuo 40–50 metų, gali būti suskaidyta daugiau kaulinio audinio nei pakeičiama. Kaulo suskaidymą lemia osteoklastų aktyvumas, kuris apima bent tris etapus. Iš pradžių osteoklastai migruoja ir tvirtai prisitvirtina prie kaulo paviršiaus, pažymėto degradacijai ir pašalinimui. Kaulo paviršius pažymimas suformavus sandarią „izoliavimo zoną“, kurioje gausu siūlinio aktino (F-aktino). Aktinas atskiria rezorbcinę erdvę nuo aplinkinio kaulo (žr. 2 pav.).



2 pav. Osteoklastų sukelta kaulinio audinio rezorbcija. Pritaikyta pagal [11]

Po to vyksta plazminės membranos poliarizacija, kuri suformuoja rezorbcinę organelę – padidinto pralaidumo membraną, kuri yra arti kaulinio paviršiaus [11]. Per šią labai pralaidžią membraną į rezorbcijos veikimo vietą išleidžiamas matricą ardančių fermentų, vandenilio (H^+), chlorido (Cl^-) jonų „kokteilis“. Resorbcijos veikimo vietas parūgštinamos iki pH 4,5, veikiant

V-ATPazės protonų siurbliui ir chlorido jonų bei protonų antiporterui ClC-7 [12]. Šis nenutrūkstamas H⁺ ir Cl⁻ išmetimas padeda ištirpinti kaulų mineralinį komponentą ir kartu sustiprinti fermentų, kurie virškina organinę matricą, aktyvumą. Galiausiai suskaidyta kaulų matrica endocituojiama, transportuojama į sekretinį domeną ir išsiskiria į tarpląstelinę aplinką [13].

1.2. Osteoporozė

Kai vyksta per didelė kaulų demineralizacija ir rezorbcija, galima susirgti su senėjimu susijusia liga – osteoporozė. Tai yra liga, kurios požymiai maža kaulų masė ir kaulinio audinio trapumą sąlygojantys pokyčiai, ženkliai padidinantys kaulų lūžių riziką [14]. Osteoporozė yra dar vadinama „tyliąja liga“, nes dažniausia, kol nelūžta kaulas, žmogus net nežino, kad serga, nes kitų pastebimų simptomų nėra. Šios ligos riziką didinantys veiksniai yra alkoholizmas, anoreksija, endokrininiai, virškinimo trakto ar tulžies takų sutrikimai, inkstų ligos, organų transplantacijos [15]. Taip pat, kai kurie vaistai padidina kaulų nykimo greitį, pavyzdžiui, chemoterapija, protonų siurblio slopikliai, selektyvių serotonino receptorių slopikliai, gliukokortikoidai [16]. Rūkymas, per mažas fizinis aktyvumas taip pat yra rizikos veiksniai [17].

Nustatyta, kad moterys kelis kartus dažniau serga osteoporozė nei vyrai. Kaulų retėjimą didina po menopauzės susidarantis vis mažesnis estrogeno lygis [15]. Apskaičiuota, kad osteoporozė serga viena iš keturių moterų, vyresnių kaip 50 metų. Rizika per gyvenimą patirti bent vieną osteoporozinį kaulų lūžį kiekvienai moteriai yra 17,4 procento, o susirgti krūties vėžiu – 10,6 procento, tai yra kone perpus mažesnė [18]. Tad tai gan paplitusi kaulų liga, o senstant visuomenei sergamumas auga. Pavyzdžiui, Lietuvoje, pagal gyventojų sergamumo rodiklius per dvylika metų (nuo 2006 iki 2018 metų) osteoporozės susirgimo atvejų užfiksuota daugiau (nuo 13386 iki 17121 atvejų per metus) [19].

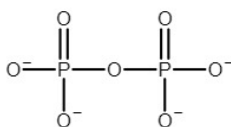
1.2. Bisfosfonatai

Svarbiausias osteoporozės gydymo tikslas – apsaugoti pacientą, padėti išvengti osteoporozinio kaulo lūžio. Klinikiniais tyrimais įrodyta, kad geriamieji ar intraveniniai bisfosfonatai yra labai veiksmingi vaistai nuo osteoporozės. Šie vaistai ne tik sulėtina kaulų rezorbciją, juos vartojant kaulo tankis ilgainiui padidėja, sumažėja stuburo slankstelių ir šlaunikaulio lūžių rizika [20].

1.2.1. Bisfosfonatų atradimas

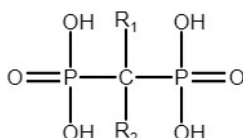
Nuo 1930-ųjų buvo žinoma, kad nedideli kiekiai polifosfatų gali veikti kaip vandens minkštikliai, slopindami kalcio druskų, tokių kaip kalcio karbonatas, kristalizaciją. Septintojo dešimtmečio pradžioje Fleičas ir kiti mokslininkai tyrė kolageno sukeltos kalcifikacijos mechanizmus ir parodė, kad kūno skysčiuose, pavyzdžiui, plazmoje ir šlapime, yra kalcifikacijos slopiklių. Tad mokslininkai pasiūlė, kad tokio tipo junginiai gali būti natūralūs kalcifikacijos reguliatoriai fiziologinėmis sąlygomis [21].

Fleičas ir jo kolegos parodė, kad neorganinis pirofosfatas (natūraliai atsirandantis polifosfatas, žinomas daugelio organizmo biosintetinių reakcijų šalutinis produktas) yra serume, šlapime ir gali užkirsti kelią kalcifikacijai, prisijungdamas prie naujai susidarantių hidroksiapatito kristalų (žr. 3 pav.). Todėl buvo postuluojiama, kad pirofosfatas (PPi) gali būti medžiaga, kuri paprastai užkerta kelią minkštųjų audinių kalcifikacijai ir reguliuoja kaulų mineralizaciją [22].



3 pav. Pirofosfatų struktūra. Pritaikyta pagal [23]

Bandymai su laboratoriniais gyvūnais, naudojant pirofosfatą ir polifosfatus, siekiant užkirsti kelią kalcifikavimui kraujagyslėse, odoje ir inkstuose, buvo sėkmingi tik tada, kai preparatai buvo sušvirkšti. Geriamieji preparatai buvo neaktyvūs dėl pirofosfato hidrolizės virškinimo trakte. Ieškant stabilesnių pirofosfato analogų, buvo ištirtos kelios skirtingos cheminės klasės. Tarp tirtų buvo ir bisfosfonatų (tuo metu vadinamų difosfonatų) (žr. 4 pav.).

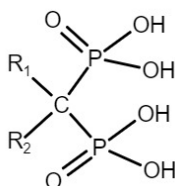


4 pav. Bisfosfonatų struktūra. Pritaikyta pagal [24]

Kaip ir pirofosfatas, bisfosfonatai turėjo didelį giminingumą kaulų mineralams ir buvo nustatyta, kad jie apsaugo nuo kalcifikacijos tiek *in vitro*, tiek *in vivo* [25]. Tačiau, skirtingai nei pirofosfatas, šis preparatas nėra hidrolizuojamas virškinimo trakte. Tyrimas įrodė, kad bisfosfonatai slopina hidroksiapatito kristalų tirpimą, galutinai nulėmė bisfosfonatų panaudojimą medicinoje, tad tolimesni tyrimai jau buvo skirti nustatyti šių preparatų efektyvumą stabdant kaulo rezorbciją [26].

1.2.2. Vaistinės molekulės struktūriniai aktyvumo ryšiai

Bisfosfonatai yra struktūriniai pirofosfato analogai, kuriuose fosforo-deguonies-fosforo (P-O-P) dalyje deguonies atomas yra pakeistas anglies atomu, gaunant fosforo-anglies-fosforo (P-C-P) sandarą molekulėje [27]. Visi biologiškai aktyvūs bisfosfonatai turi būdingą P-C-P struktūrą (žr. 5 pav.) būtiną biologiniam aktyvumui užtikrinti – kaulų rezorbcijai slopinti [28]. Giminingumą kaulų mineralui lemia R1 padėtyje esanti cheminė grupė, o priešrezorbcinio poveikio stiprumą suteikia R2 padėtyje esanti grupė [29].



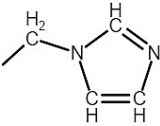
5 pav. Bisfosfonato molekulės branduolys. Pritaikyta pagal [30]

Vieni pirmųjų bisfosfanatų – etidronatas, šoninėje grandinėje turintis chloro (-Cl) grupę ir klodronatas, šoninėje grandinėje turintis metilo (-CH₃) grupę [27]. Bet šie junginiai turėjo riboto efektyvumo antirezorbcinį poveikį, todėl po jų sekė naujų, veiksmingesnių kaulų rezorbcijos slopiklių sintezė. Pavyzdžiui, zoledronatas yra tūkstantį kartų aktyvesnis už klodronatą ir dešimt tūkstančių kartų – už etidronatą [31].

R1 ir R2 šoninių grandinių modifikacija lemia fizikochemines, biologines, terapines ir toksikologines vaisto savybes. Vaistinėje molekulėje R1 padėtyje esanti hidroksilo (-OH) grupė suteikia didžiausią giminingumą molekulei su kaulu, tad visi naujesni bisfosfonatai R1 padėtyje turi OH grupę. Tokia struktūra leidžia bisfosfonatams tvirtai jungtis prie kaulų mineralinių paviršių osteoklastų veiklos vietose [29].

Reikia paminėti, kad R2 padėties grupė ir toliau modifikuojama, siekiant gerinti antirezorbcinį poveikį (žr. 1 lentelę). Keitimas apima alkilo grandinės prailginimą, pirminio (alendronato, pamidronato) ar tretinio (ibandronato) azoto įjungimą arba heterociklinio žiedo (risedronatas, zoledronatas) pridėjimą [29]. R2 grupės modifikacija padidino vaisto efektyvumą bei vaisto toleranciją. Nustatyta, kad bisfosfonatai, R2 padėtyje turintys azoto atomą, pasižymi didele antirezorbcine galia [30] ir tai susiję su atstumu nuo P–C–P grupės [32].

1 lentelė. Bisfosfonatų cheminės struktūros. Pritaikyta pagal [33]

Vaistas	R1 šoninės grandinės	R2 šoninės grandinės
Etidronatas	—OH	—CH ₃
Klodronatas	—Cl	—Cl
Pamidronatas	—OH	$\text{—C}_{\text{H}_2}\text{—C}_{\text{H}_2}\text{—NH}_2$
Alendronatas	—OH	$\text{—}\left[\text{C}_{\text{H}_2}\right]_3\text{—NH}_2$
Ibandronatas	—OH	$\text{—C}_{\text{H}_2}\text{—C}_{\text{H}_2}\text{—N}\left(\text{CH}_3\right)\left[\text{C}_{\text{H}_2}\right]_4\text{—CH}_3$
Zoledronatas	—OH	

1.2.3. Vaisto-taikinio sąveikos

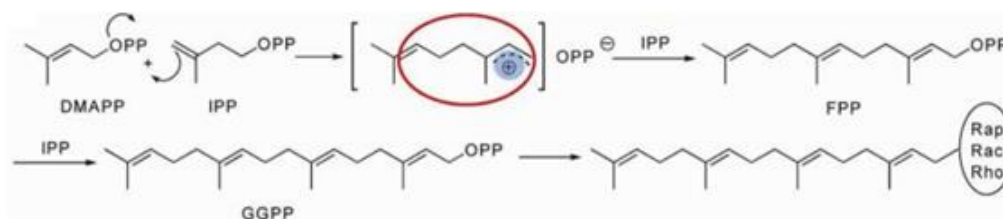
Vienas iš ankstyviausių klinikinių bisfosfonatų panaudojimų – kaulų vaizdinimas, nustatant metastazes ir kitus kaulų pažeidimus. Tai priklausė nuo vaistinių molekulių stipraus giminingumo kaulų mineralams ir nuo jų gebėjimo prijungti gama spinduliuotę skleidžiantį technecio izotopą [34]. Dabartinėje klinikinėje medicinoje bisfosfonatai yra naudojami įvairioms ligoms, susijusioms su per didele kaulų rezorbcija, gydyti, pavyzdžiui, Pedžeto, osteoporozės ligoms [35]. Šioms ligoms gydyti dažniausiai bisfosfonatai vartojami peroraliai. Taip pat bisfosfonatais gydomi piktybiniai navikai, kurie susiję su hiperkalcemija (padidėjusiu kalcio kiekiu kraujyje) ir / arba kaulinio audinio nykimu [31], nes kai kurie vėžinių ląstelių išskiriami veiksniai didina kaulų rezorbciją [36]. Šioms ligoms gydyti bisfosfonatų preparatai leidžiami intraveniniu būdu, nes veikia daug stipriau nei per burną vartojami vaistai.

Žvelgiant molekulinio lygiu, pirmiausiai bisfosfonatai tiesiogiai jungiasi su kaulų matricoje esančiais hidroksiapatito kristalais, suriša juos ir taip stabdo rezorbciją [37]. Vaistinės molekulės struktūroje esančios fosfatų grupės suteikia stiprų giminingumą kaulų hidroksiapatito kristalams, o hidroksilo

grupės buvimas dar labiau padidina bisfosfonatų gebėjimą surišti kalcį. Fosfato ir hidroksilo grupės kartu sukuria trigubą bisfosfonatų ir kaulų matricos sąveiką, suteikdamos bisfosfonatams jų nepaprastą specifiškumą kaului [38].

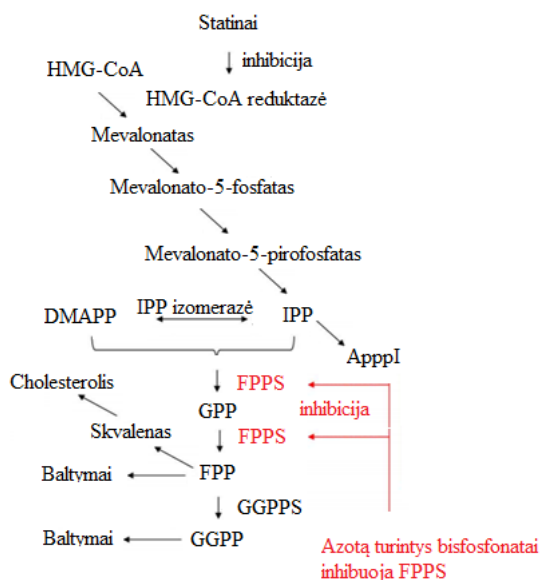
Slopinti resorbcijos procesą galima ne tik surišant hidroksiapatito kristalus, bet ir sukelti osteoklastų apoptozę. Visi bisfosfonatai labiausiai veikia osteoklastus slopindami jų gyvybingumą ir endocitinį aktyvumą, tačiau jų veikimo mechanizmai skiriasi priklausomai nuo molekulės struktūros. Azoto atomo neturinčios vaistinės molekulės slopina nuo adenozino trifosfato (ATP) priklausomus fermentus [39]. Trumpas R1 ir R2 šonines grandines turintys bisfosfonatai gali pakeisti neorganinį P_i ir yra toliau verčiami į ATP analogus. Dėl besikaupiančių nehidrolizuojamų ATP analogų citoplazmoje yra slopinami tarpląsteliniai fermentai, o tai daro neigiamą poveikį ląstelių metabolizmui, funkcijai ir išgyvenimui. Tad ši grupė veikia kaip provaistai, nes virsta į aktyvius metabolitus po to, kai osteoklastai juos įsisavina [38].

Azotą turintys bisfosfonatai slopina farnezilo pirofosfato sintazę (FPPS) – fermentą, dalyvaujantį mevalonato kelyje, kuris atsakingas už cholesterolio ir kitų sterolių gamybą [40]. FPPS yra homodimerinis fermentas, katalizuojantis alilo substrato, dimetilalilpirofosfato (DMAPP), kondensacijos seką su dviem 5-karbonizopentenilpirofosfato (IPP) molekulėmis, kad būtų gautas pirmiausiai C10 geranilpirofosfatas (GPP), o paskui ir izoprenoidas (FPP) C15 [41]. Norint gauti geranilgeranilpirofosfatą (GGPP), veikiant GGPP sintazei, reikia FPP. Abu izoprenoidai (FPP ir GGPP) yra nepakeičiami metabolitai, skirti potransliaciniam GTP-azių (Ras, Rab, Rho ir Rac) modifikavimui (prenilacijai) (žr. 6 pav.). Mažos GTP-azės yra svarbūs signaliniai baltymai, kurie reguliuoja įvairius ląstelių procesus, svarbius osteoklastų funkcijai, įskaitant ląstelių morfologiją, citoskeleto išdėstymą, membranos suglebimą, pūslelių judėjimą ir apoptozę [42]. Kad baltymai Ras, Rab, Rho ir Rac teisingai funkcionuotų, reikalingas prenilinimas, nes lipidų prenilo grupė naudojama baltymams įtvirtinti ląstelių membranose ir taip pat gali dalyvauti baltymų-baltymų sąveikoje [43].



6 pav. FPP, GGPP biosintezė ir baltymų prenilinimas, parodantis karbocitacijos pereinamąją būseną / reaktyvius tarpinius produktus ir bisfosfonatų karbocitacijos grandinės analogą (apibrauktas raudona elipse). Pritaikyta pagal [44]

Vaistinė molekulė gali jungtis prie FPPS aktyviosios vietos, konkuruodamas su DMAPP ir GPP (žr. 7 pav.), sudarant fermento inhibitoriaus kompleksą aktyviojoje vietoje. Tad fermento veikimas slopinamas.



7 pav. Mevalonato kelias, kuriame azoto atomą turintys bisfosfonatai stabdo sterolių gamybą. Pritaikyta pagal [45]

FPPS yra pagrindinis azoto turinčių bisfosfonatų molekulinis taikinytis, o jų sąveika pasireiškia dviem skirtingais slopinimo būdais: greitai, grįžtamoju konkurenciniu substrato DMAPP / GPP slopinimu ir nekonkurencingu tipo slopinimu, susijusiu su IPP. Pastarasis yra nuo laiko priklausomas slopinimas, atsirandantis dėl fermentų izomerizacijos [46].

1.3. Osteonekrozė

Nors bisfosfonatai iki šiol yra geriausi antiresorbciniai agentai, tačiau vartojant juos gali atsirasti stemplės uždegimai, opos, viduriavimas, pilvo skausmas [47], taip pat ir padidėja osteonekrozės rizika. Osteonekrozė – tai burnos ertmės kaulo atsivėrimas, kuris negyja aštuonias savaites ir daugiau [48]. 2003 metais Marx ir kiti pranešė apie 36 žandikaulio osteonekrozės atvejus, susijusius su bisfosfonatų, pavyzdžiui, zoledronato, vartojimu. Šie pacientai patyrė skausmingą žandikaulio kaulų pažeidimą, kurio nepaveikė medicininis ar chirurginis gydymas [49]. Nuo to laiko literatūroje buvo pranešta apie daugybę panašių su bisfosfonatais susijusių žandikaulio osteonekrozės atvejų. Amerikos burnos ir žandikaulių chirurgų asociacija 2014 metais pasiūlė terminą: „su vaistais susijusi žandikaulio osteonekrozė“, toliau – MRONJ (angl. *Medication Related Osteonecrosis of the Jaw*), kad apibūdintų žandikaulio osteonekrozę, susijusią su medikamentų vartojimu [50]. Šiuo metu yra trys vaistų, susijusių su MRONJ, grupės: bisfosfonatai, denosumabai ir antiangiogeniniai vaistai [51].

Pacientams su bisfosfonatais susijusi žandikaulio osteonekrozė, toliau – BRONJ (angl. *Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaws*) nustatoma, jei jie vartoja medikamentus, nebuvo gydomi spinduline terapija bei nebuvo patyrę anksčiau žandikaulio metastazių. Yra penkios pagrindinės su bisfosfonatais susijusios žandikaulio osteonekrozės patogenezės hipotezės: kaulų pertvarkymo slopinimas, infekcija / uždegimas, pakitusi angiogenezė, vaistų toksiškumas minkštiesiems audiniams [52]. Manoma, kad sumažėjusi kaulų rezorbcija ir po to sumažėjęs kaulų formavimo aktyvumas gali lemti didesnę preparatų kaupimąsi [53]. Ši teorija buvo paremta tyrimu su gyvūnais, kuris parodė išsivysčiusią šunų žandikauliuose nekrozę, gydant didelėmis bisfosfonatų dozėmis [54], ir tyrimu, įrodančiu žandikaulio osteonekrozės išgydymą kaulus formuojančiu agentu – teriparatidu [55].

Leidžiami į veną bisfosfonatai, kaip zoledronatas, 15 kartų dažniau sukelia osteonekrozę nei geriami, pavyzdžiui, alendronatas [56]. Epidemiologinių tyrimų duomenys atskleidė, kad stipresni bisfosfonatai, dažnesnis jų dozavimas, didesnė kaupiamoji dozė ir ilgesnė gydymo trukmė yra pagrindiniai su bisfosfonatais susijusios žandikaulio osteonekrozės rizikos veiksniai. Tyrime, kuriame dalyvavo 13 000 tiriamųjų, vartojusių geriamąjį bisfosfonatą (alendronatą), bendras žandikaulio osteonekrozės dažnis padidėjo nuo 0,1 procento iki 0,21 procento tiems, kurie vartojo alendronatą daugiau nei ketverius metus [57]. Panaši tendencija pastebėta ir vėžiu sergantiems pacientams, vartojantiems zoledronatą: ligos dažnis buvo 0,6 procento gydant vienus metus, 0,9 procento gydant dvejus metus ir 1,3 procento – trejus metus [58]. Nepaisant šių stebėjimų, yra tyrimų, rodančių pagreitintą, o ne slopinamą kaulų apykaitą žandikaulio osteonekrozės pažeidimų metu. Pažeidimų metu nustatytas reikšmingas padidėjęs osteoklastų skaičius ir kaulų lizė [59]. Tad užslopinta kaulų apykaita negali būti pagrindinė osteonekrozės patofiziologija.

Kai kurie tyrėjai pasiūlė, kad su bisfosfonatais susijusią žandikaulio osteonekrozę gali sukelti tiesioginis toksinis bisfosfonatų poveikis epitelio ląstelėms ir makrofagams, kuris sutrikdo burnos gleivinės vientisumą ir sukelia infekciją bei kaulų nekrozę. Yra žinoma, kad azoto turintys bisfosfonatai daro įtaką osteoklastų funkcijai ir išgyvenimui, slopindami mevalonato kelyje fermento farnesilpirofosfato sintazės sintezę. Zoledronatas yra stipriausias šio fermento slopiklis tarp visų bisfosfonatų. Įrodyta, kad farnesilpirofosfato sintazės slopinimas gali sukelti toksiškumą virškinimo trakto epiteliui [60], o pelių burnos gleivinės ląstelių apdorėjimas bisfosfonatais slopino proliferaciją ir žaizdų gijimą [61]. Taip pat buvo nustatyta, kad įvairių ląstelių, auginamų ant kaulų paviršių, anksčiau apdorotų bisfosfonatais, augimas buvo slopinamas *in vitro* [53]. Toks toksinis poveikis gali pakenkti minkštųjų audinių gijimui po traumos ar danties ištraukimo. Kaip minėta, bisfosfonatai taip pat turi toksinį poveikį makrofagams. Įrodyta, kad bisfosfonatai patekę į kultivuojamas makrofagus primenančias ląsteles J774 slopina cholesterolio sintezę [62] ir sukelia apoptozę [63] [64]. Manoma, kad veikiant didelėmis dozėmis, naudojamomis vėžiu sergantiems pacientams, bisfosfonatai gali aktyvinti šį mechanizmą nuslopindami vietinį imuninį atsaką ir padidindami infekcijos riziką, sukeldami gleivinės pakitimus bei kaulų nekrozę.

Nors infekcija yra plačiai pripažįstama kaip prisidedantis prie žandikaulio osteonekrozės veiksnys, tikslus jos, kaip proceso, vaidmuo vis dar nėra aiškus. Manoma, kad infekcija gali prisidėti prie ligos, sukeldama per didelę kaulų rezorbciją. Pacientams, kuriems yra buvę uždegiminių dantų ligų, tokių kaip periodonto ar dantų abscesas, yra septynis kartus didesnė rizika susirgti šia liga [65]. Kai kurios bakterijos, ypač gramneigiamos rūšies, gamina lipopolisaharidus, kurie stimuliuoja vietinę citokinų gamybą ir sukelia pagreitintą kaulų rezorbciją [66]. Taip pat nustatyta, kad kitos bakterijos tiesiogiai reguliuoja branduolinių veiksnių-kB ligando (RANKL) receptoriaus aktyvatoriaus gamybą žmogaus periodonto raiščių ląstelėse, dantenu fibroblastuose [67] ir B ląstelėse, kurios gali pagreitinti kaulų rezorbciją [68].

Taip pat mokslininkai teigia, kad BRONJ yra susijusi su apoptozės mechanizmu osteoblastuose aktyvinimu. Yra žinoma, kad osteonekrozė pažeidžia osteoblastų / osteoklastų ir osteocitų pusiausvyrą dėl energetinio metabolizmo pokyčių, susijusių su apoptozės reguliavimo osteoblastų populiacijoje mechanizmais [69]. Taip pat įrodyta, kad su BRONJ susijusi apoptozės indukcija osteoblastuose inicijuojama mitochondrinu keliu ir apima reaktyviųjų deguonies rūšių (ROS) gamybą, citochromo c išsiskyrimą, apoptosomos susidarymą ir vėliau efektorinių kaspazių kaskadą [70]. Be to, ROS kaupimasis sukelia oksidacinį stresą ir skatina osteoblastų apoptozę. Tad energetinis

osteoblastų profilis yra vienas iš pagrindinių osteogenezės moduliatorių, todėl gali būti svarbus ankstyvo osteonekrozinių procesų nustatymo žymuo [71].

Deja, ligos patogenezė nėra iki galo atskleista, tad labai svarbus vaidmuo tenka prevencijai, o chirurginė intervencija tebėra vieni iš pagrindinių gydymo būdų. Pacientams ir sveikatos priežiūros paslaugų teikėjams svarbiausias veiksnys, siekiant sumažinti BRONJ atsiradimo riziką, yra pacientų burnos sveikatos priežiūros optimizavimas prieš pradedant gydymą. Dantų patikra ir tinkama burnos priežiūra prieš pradedant antirezorbcinį gydymą gali sumažinti osteonekrozės riziką net 50 procentų [72]. Tačiau net ir atliekant nuolatinę dantų patikrą, BRONJ rizika yra gan didelė. Tad ši ženkliai gyvenimo kokybę sutrikdanti liga išlieka negydoma, dėl to būtina ieškoti efektyvių terapinių sprendimų. Daug vilčių teikia neseniai pradėti taikyti pažangiosios biologinės terapijos, ypač ląstelių terapijos metodai.

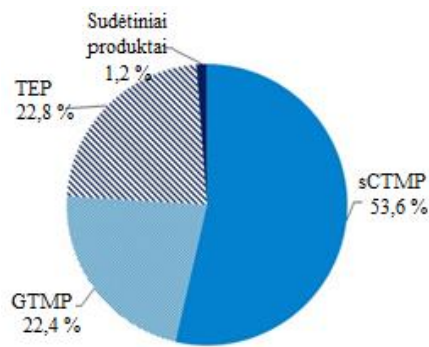
1.4. Pažangiosios terapijos vaistiniai produktai

1961 metais kanadiečiai Till ir McCulloch, tirdami radiacijos poveikį pelių kaulų čiulpams, įrodė apie daugiagalių kamieninių ląstelių egzistavimą [73]. Šie mokslininkai laikomi kamieninių ląstelių mokslo „tėvais“, nes tai buvo pirmasis mokslinis straipsnis apie kamienines (*hemopoetines*) ląsteles. Vėliau prie mokslininkų prisijungė Beckeris, tad jie sustiprino savo kamieninių ląstelių teoriją ir paskelbė rezultatus 1963 metais žurnale „Nature“ [74]. Jis atliko pelių kaulų čiulpų eksperimentus ir nustatė, kad skirtingos kraujo ląstelės yra kilusios iš specialios klasės ląstelių. Po novatoriškų atradimų mokslininkai ir toliau plėtojo šią naują sritį, tęsdami savo tyrimus bei konsultuodami kitus jaunus mokslininkus. Nuo to laiko prasidėjo kamieninių ląstelių tyrimų „bumas“.

Šių mokslininkų atradimas buvo panaudotas leukemija (kraujo vėžiu) sergančių žmonių gydymui, pasitelkiant kaulų čiulpų transplantaciją – kraujo ląstelių perpylimas ligoniui, siekiant atstatyti pažeistą kraujodaros sistemą [75]. Tada sekė tolimesnis žmogaus ląstelių tyrinėjimas ir jų pritaikymas, gydant tam tikras ligas. Biotechnologinės gamybos būdu iš gyvų organizmų išgautos veikliosios medžiagos, turinčios terapinį poveikį, tokios kaip antikūniai, citokinai, augimo faktoriai, medicinoje yra plačiai pritaikomos [76].

Europos Sąjungoje (ES) yra nustatyta teisinė sistema, nurodanti visų žmonėms skirtų vaistų, įskaitant biologinius vaistinius produktus, reglamentavimą. 2007 metais Europos Parlamentas ir Taryba priėmė reglamentą (EC) numeriu 1394 / 2007 dėl pažangiosios terapijos vaistinių preparatų (angl. *Advanced Therapy Medicinal Products*), kuriuos sudaro genų, somatinių ląstelių terapijos bei audinių inžinerija, taikymo [77]. Šios direktyvos tikslas – palengvinti naujų pažangios terapijos vaistinių preparatų patekimą į Europos rinką. Dokumente nurodomos pažangiosios terapijos vaistinių produktų gamybos pagrindas, kokybės, ikiklinikinių, klinikinių testų reikalavimai, kurie įrodytų vaistinio preparato efektyvumą, kokybę, saugumą. Taip pat direktyva nustato leidimus prekiauti šiais preparatais bei tolesnius veiksmus išdavus leidimą. Pirmasis pažangiosios terapijos vaistinis produktas, patvirtintas Europos Sąjungoje, atsirado 2009 metais, gavus leidimą naudoti ChondroCelect – audinių inžinerijos produktą, skirtą kremzlės defektams gydyti [78].

Kaip matome pagal 2016 metų duomenis (žr. 8 pav.), daugiau nei pusę visų pažangiosios terapijos produktų sudaro iš somatinių ląstelių išgauti vaistiniai preparatai [79].



8 pav. ATMP klasifikacija: genų terapijos vaistinių preparatų (GTMP), somatinių ląstelių terapijos vaistinių preparatų (sCTMP), audinių inžinerijos būdu pagamintų produktų (TEP) ir sudėtinių produktų procentinė dalis pagal 2016 metų duomenis. Pritaikyta pagal [79]

Taip yra tikriausiai dėl to, kad somatinių ląstelių klasė yra labai plati. Joms priklauso specializuotos ir kamieninės ląstelės. Pastarosios skirstomos į embrionines, vaisiaus ir suaugusio organizmo kamienines ląsteles. Suaugusias ląsteles galima skirti į mezenchimines ar hematopoetines. Mezenchiminės gali diferencijuotis į nervinio, kremzlinio, kaulinio, raumeninio, sausgyslinio, raiščių, riebalinio audinio ląsteles, o hematopoetinės – į įvairias kraujo ląsteles. Taip pat somatinėms ląstelėms priskiriamos ląstelės, su kuriomis atliktos manipuliacijos, keičiančios ląstelės funkciją.

1.4.1. Kamieninės ląstelės

Regeneracinėje medicinoje labai svarbus vaidmuo tenka kamieninėms ląstelėms, tai rodo nuolat augantis klinikinių bandymų su šiomis ląstelėmis skaičius. Šiuo metu yra atliekama virš penkių tūkstančių klinikinių bandymų su kamieninės ląstelėmis, siekiant jas pritaikyti organizmo ląstelių / audinių atsinaujinime [80]. Kamieninės ląstelės - tai nespecializuotos ląstelės, kurios geba diferencijuotis ir įgyti tam tikras specifines funkcijas. Kamieninės ląstelės gali būti skirstomos dvejopai: pagal diferenciacijos potencialą ir pagal jų išskyrimo vietą. Pagal diferenciacijos potencialą jos gali būti: totipotentinės, pluripotentinės, multipotentinės ir unipotentinės [81]. Iš totipotentinių kamieninių ląstelių gali išsivystyti visas organizmas, iš pluripotentinių – gali susidaryti visi organizmo audiniai (endoderma, mezoderma, ektoderma), tačiau jau ne visas organizmas. Multipotentinės kamieninės ląstelės – gali diferencijuotis tik į kelis ląstelių tipus, o unipotentinės – gali virsti tik į vieną ląstelių tipą.

Pagal išskyrimą kamieninės ląstelės gali būti: embrioninės, vaisiaus, suaugusio organizmo. Embioninės, vaisiaus kamieninės ląstelės yra daug žadančios, nes pasižymi gebėjimu neribotai daugintis ir virsti į bet kurią ląstelę [82]. Tai pluriopotentinių ląstelių pavyzdys. Šio tipo kamieninės ląstelės turi būti surinktos iš maždaug 7 dienų amžiaus embriono [83]. Tačiau imant ląsteles iš tokios ankstyvos vystymosi stadijos embriono, šis žūva. Tad kyla daug etinių diskusijų, ar tai moralu, nes dažnai embrionas sulyginamas su žmogumi.

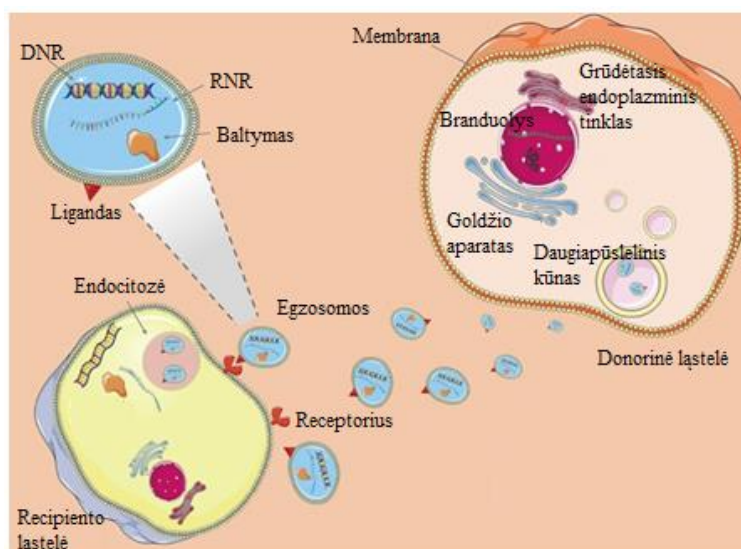
Kita alternatyva – suaugusio žmogaus kamieninės ląstelės. Šios skirstomos į hematopoetines – galinčias virsti į kraujo ląsteles, ir mezenchimines – galinčias virsti į kaulinio, kremzlinio, raumeninio, riebalinio audinio ir sausgyslių ląsteles [84]. Nors šių kamieninių ląstelių diferenciacija yra ribota, tačiau jų naudojimas kelia mažiau etinių klausimų lyginant su embrioninėmis. Mezenchiminės kamieninės ląstelės yra vienos iš dažniausiai naudojamų ląstelių rūšių kaip ląstelių terapija žmogaus ligoms gydyti.

Taikant kamienines ląsteles kaip pažangiąją terapiją, susiduriama su sunkumais, tokiais kaip ląstelių įvedimas ir lokalizavimas pažaidos vietoje, jų išgyvenamumo ir išlikimo pažaidos vietoje užtikrinimas, dozės parinkimas. Taip pat kamieninių ląstelių terapijos taikymas susijęs su naviko formavimosi ar jo augimo skatinimo, toksiškumo, imunogeniškumo rizika [6]. Tai apsunkina gydymą, nes turi būti gerai įvertinamas naudos ir rizikos santykis. Mokslininkai ieško būdų kaip tai sukontroliuoti. Viena iš perspektyviausių alternatyvų kamieninių ląstelių terapijai yra šių ląstelių egzosomų terapija. Šios nanometrų dydžio membrana apgaubtos pūslelės turi įvairių kamieninėms ląstelėms būdingų makromolekulių, skatinančių regeneraciją ir reguliuojančių imuninį atsaką. Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskirtos egzosomos padeda palaikyti audinių imunines savybes. Egzosomos pasižymi gerokai mažesne imuninio atmetimo sukėlimo bei onkologinių susirgimų rizika, negu kamieninės ląstelės. Be to, egzosomos yra labai stabilios ir gali būti laikomos maždaug 6 mėnesius *in vitro* 20 ° C temperatūroje neprarandant potencijos [85]. Pacientams, sergantiems IV laipsnio žarnyno transplantato prieš šeimininką liga, pritaikius gydymą mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomomis, simptomai žymiai pagerėjo [86]. Apibendrinant – egzosomos yra daug vilčių teikiantis pažangiosios medicinos įrankis.

1.5. Egzosomos

1983 metais [87] išsiskyrusios pūslelės pirmą kartą buvo aprašytos pašalinant transferino receptorių per avių retikulocitų (nesubrendusių eritrocitų) brendimą ir vėliau buvo pavadintos egzosomomis [88]. Daugelį metų egzosomos buvo laikomos organelėmis, kurios šalina iš ląstelės nereikalingas medžiagas. Tačiau 1996 metais buvo įrodyta, kad egzosomos dalyvauja antigeno pristatymo procese, taip atskleidžiant jų esminį vaidmenį imunologiniuose procesuose [89].

Egzosomos – tai mažos (nuo 30 iki 200 nm [90]) endocitinės kilmės pūslelės, kurias išskiria įvairios ląstelės ar organai. Jos susidaro iš daugiapūslelinių kūnų (angl. *multivesicular bodies*, sutrumpintai – MVB) ir išsiskiria į tarpląstelinę aplinką, susiliejus su plazmos membrana [91]. Pūslelės perduoda informaciją perkeldamos savo turinį: DNR [92], koduojančią [93] ir nekoduojančią RNR [94], baltymus [95] iš donorų ląstelių į recipientų ląsteles (žr. 9 pav.), taip sukeldamos ląstelėse-taikiniuose funkcinius pokyčius ir / arba diferenciaciją [96]. Tad egzosomos yra svarbios tarpininkės, palengvinančios tarpląstelinę ryšį be tiesioginio kontakto tarp ląstelių. Yra žinoma, kad egzosomų išskiriamas kiekis yra gan mažas, tačiau ląstelės išskiria jų daugiau, kai yra patiriamas stresas, pavyzdžiui, taikant radiaciją ar chemoterapinius vaistus [97].



9 pav. Egzosomų generavimas, sekrecija ir krovinių pernešimas iš donoro ląstelių į recipiento ląsteles. Pritaikyta pagal [98]

Nors egzozomomis gabenamos molekulės yra įvairios, manoma, kad egzozominiai baltymai ir RNR vaidina svarbiausią vaidmenį reguliuojant recipientinių ląstelių funkciją [99]. Egzosomų masių spektrometrijos duomenys nustatė daugiau kaip 4000 skirtingų egzozomų baltymų [100]. Nors egzozominiai baltymai iš esmės skiriasi priklausomai nuo egzozomų kilmės ir atlieka skirtingas funkcijas, kai kurie baltymai yra visų rūšių egzozomose [101], pavyzdžiui, šilumos šoko baltymai (HSP 70 ir HSP 90) [102]. Mažos RNR, arba mikroRNR, yra kita svarbi egzozomų pernešama ląstelių funkcijas įtakančių veiksnių grupė [103]. Koppers-Lalic ir kiti mokslininkai nustatė, kad funkcinės egzozominės RNR yra lemiamos reguliuojant ląstelių prikibimą, diferenciaciją ir aktyvumą [99].

1.5.1. Egzosomos regeneracijoje

Egzozomos gali veiksmingai skatinti audinių ir organų regeneraciją. Yamaguchi ir kiti mokslininkai nustatė, kad pelių po miokardo infarkto kairiojo skilvelio išstūmimo funkcija žymiai pagerėjo gydant egzozomomis [104]. Zhou ir kiti įrodė, kad gydymas egzozomomis pagerina pelių, sergančių ūminiu inkstų pažeidimu, inkstų funkciją [105]. O Basu ir Ludlow apžvelgė dabartinę egzozominę gydymą neuroregeneracijos ir odos regeneracijos srityse [106]. Šie tyrimai sudarė pagrindą tolimesniems egzozomų regeneracijoje tyrimams.

Žinoma, kad 4 – 6 procentai visų kaulų ląstelių yra osteoblastai, kurių pagrindinė funkcija yra kaulo formavimasis [107]. Kaulo formavimo metu osteoblastai gamina kalcio ir fosfato mineralus, sudarydami mineralizuotą kaulą. Osteoblastų dauginimąsi ir aktyvumą gali tiesiogiai reguliuoti egzozomos. Pavyzdžiui, žiurkėms, turinčioms kaukolės defektų, iš kaulų čiulpų ląstelių gautos egzozomos reikšmingai pagreitino išgijimą [108]. Nustatyta, kad šiuose tyrimuose pagrindinis osteoblastų dauginimąsi ir aktyvumą skatinantis veiksnys buvo iš kaulų čiulpų išskirtose egzozomose pernešama miRNR-196a. Nors *in vitro* tyrimai pabrėžia egzozomų svarbą osteoblastams, siekiant parengti gydymo strategijas, reikia daugiau informacijos apie egzozomų gydymo veiksmingumą kaulų sistemose.

Kaulų metastazės yra glaudžiai susijusios su nenormaliu pernelyg intensyviu osteoklastų aktyvavimu. Tyrimai parodė, kad naviko ląstelės, norėdamos padidinti subrendusių osteoklastų skaičių ir

aktyvumą, skatina osteolizę (kaulinio audinio nykimas dėl suintensyvéjusio kaulo ardymo proceso organizme), išskirdamos pūseles. Pavyzdžiui, iš prostatos vėžio ląstelių gautos egzosomos padidina osteoklastogenezę, stimuliuojant branduolinio faktoriaus κ B (RANK) receptoriaus aktyvatorių [109]. Tačiau ir subrendę osteoklastai gali reguliuoti to paties tipo ir kitas ląsteles per egzosomų sekreciją. Iš osteoklastų gautų egzosomų profiliai rodo, kad juose gausu RANK. Egzosomų su RANK ekspresija išsikvojimas slopina osteoklastų susidarymą [110]. Dėl gero patekimo į kaulų audinius, didelio kaulus regeneruojančio potencialo, atskleisto *in vitro* ir *in vivo* tyrimuose, ir biosuderinamumo egzosomos yra patraukli strategija kaulų augimui skatinti ir klinikinėms kaulų ligoms gydyti [111].

Yra tyrimų, rodančių, kad egzosomos stimuliuoja angiogenezę audiniuose ir organuose, o pagerėjusi kraujotaka, savo ruožtu, gali skatinti kaulų augimą ir atsinaujinimą. Įrodyta, kad placentos mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomos stimuliuoja endotelio ląstelių dauginimąsi, migraciją ir vamzdelių susidarymą *in vitro* [112]. Šios egzosomos skatina endotelio ląstelių dauginimąsi ir kraujagyslių formavimąsi per egzosominės miR-129, miR-136 [113] ir miR-17-92 [112]. Egzosomos gali skatinti angiogeninius veiksnius tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Tyrimai parodė, kad iš mezenchiminių kamieninių ląstelių išvestos egzosomos sėkmingai pagerino angiogenezę skirtinguose gyvūnų modeliuose. Pavyzdžiui, iš mezenchiminių kamieninių ląstelių gautų egzosomų injekcija sumažino miokardo išeminį / reperfuzinį (dėl staiga „paduodamo“ deguonimi įšotinto kraujo, širdies ląstelių patiriamo streso) sužalojimą ir pagerina išeminės širdies angiogenezę [114], o iš žmogaus virkštelės išskirtos mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomos skatina kraujo perfuziją (kraujo tekėjimas organizmu), susilpnėjusią dėl užpakalinių galūnių išemijos (sumažėjęs arterinio kraujo pritekėjimas į užpakalines galūnes) [115]. Apibendrinant apžvelgtus tyrimus, akivaizdu, kad egzosomos turi didelį regeneracinį ir gydantį potencialą, kuris dar laukia savo pritaikymo įvairių ligų, įskaitant ir medikamentinę osteonekrozę, atvejais.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tirpalai ir reagentai

2 lentelė. Naudotų medžiagų sąrašas

Medžiagos	Gamintojas	Šalis
Embrioninis veršelio serumas (angl. <i>fetal bovine serum</i> , toliau – FBS)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific	Jungtinė Karalystė
Ląstelių auginimo terpė DMEM + GlutaMAX (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific	Jungtinė Karalystė
Ląstelių auginimo terpė Ham's F-12K (Kaighn's)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific	Jungtinė Karalystė
Penicilino ir streptomicino antibiotikų tirpalas (Pen-Strep) (10000 IU/ml – 10000 µg/ml)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific	Jungtinė Karalystė
Fosfatinis druskos buferis (angl. <i>phosphate buffered saline</i> , toliau – PBS) pH 7,4	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Tripsino / EDTA 10x tirpalas (0,5 % tripsinas ir 0,2 % EDTA)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Tripano mėlio dažų tirpalas (0,4 %)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Ląstelių auginimo terpė aDMEM (angl. <i>Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , toliau – aDMEM)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific	Jungtinė Karalystė
GlutaMAX priedas	Gibco™, Thermo Fisher Scientific	Jungtinė Karalystė
Rekombinantinis žmogaus fibroblastų augimo faktorius α (angl. <i>recombinant human fibroblast growth factor α</i> , toliau – rh FGFA)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Rekombinantinis žmogaus fibroblastų augimo faktorius β (angl. <i>recombinant human fibroblast growth factor β</i> , toliau – rh FGFb)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Rekombinantinis žmogaus epidermio augimo faktorius (angl. <i>recombinant human epidermal growth factor</i> , toliau – rh EGF)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
BIOAMF-2 terpė	Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd.	Izraelis
Egzosomų išskyrimo rinkinys (angl. <i>Total Exosome Isolation Reagent</i>)	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	JAV
Jaučio serumo albuminas	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Bradfordo reagentas	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Alendronato rūgštis (grynumas ≥ 98 %)	Santa Cruz Biotechnology	JAV
Zoledronato rūgštis (grynumas ≥ 98 %)	Santa Cruz Biotechnology	JAV
Presto Blue reagentas	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	JAV
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Bisbenzimidio H 33342 trihidrochloridas (Hoechst 33342) (grynumas ≥ 98 %)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Propidžio jodidas (grynumas ≥ 94 %)	Sigma-Aldrich	Jungtinė Karalystė
Analizatoriaus seahorse ląstelių energijos profilio (angl. <i>Cell energy phenotype test</i>) reagentų rinkinys	Agilent Technologies Inc.	JAV
Analizatoriaus seahorse XF kalibrantas	Agilent Technologies Inc.	JAV
Analizatoriaus seahorse XF DMEM terpė	Agilent Technologies Inc.	JAV
Gliukozė	Merck KGaA	Vokietija
Natrio piruvatas	Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd.	Izraelis

L-glutaminas	Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd.	Izraelis
--------------	---	----------

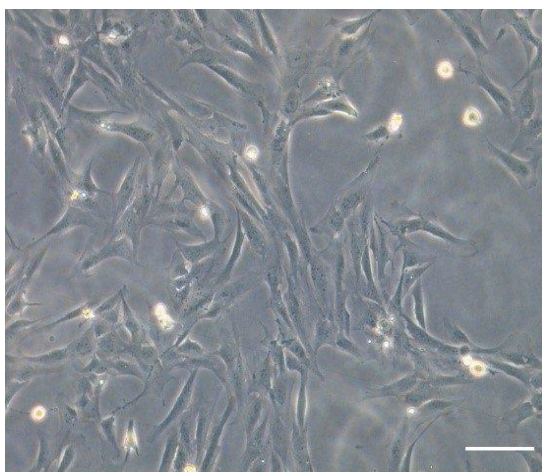
2.2. Prietaisai ir įrankiai

3 lentelė. Naudotos įrangos sąrašas

Įranga	Gamintojas	Šalis
II biologinio saugumo laminarinė oro srauto spinta ESCO Class II BSC, 24	ESCO	Singapūras
Heracell VIOS 160i CO ₂ inkubatorius	Thermo Fisher Scientific	JAV
Šviesaus lauko mikroskopas Leica DMi1	Leica Microsystems GmbH	Vokietija
Centrifuga BioSan Centrifuge LMC-4200R	BioSan	Latvija
Fuchs-Rosenthal hemocitometras	Brand	Vokietija
Daugiafunkcinis plokštelių skaitytuvas Infinite 200 Pro M Nano Plex	Tecan Group Ltd.	Šveicarija
96 šulinėlių skaidrios plokštelės	Thermo Fisher Scientific	JAV
Dinaminės šviesos sklaidos analizatorius Zetasizer Nano-ZS	Malvern Instruments Ltd.	Jungtinė karalystė
Seahorse XFp analizatorius	Agilent Technologies Inc.	JAV
Fluorescencinis mikroskopas OLYMPUS IX2-ILL100	Olympus Corporation	Japonija
Heraeus CO ₂ -AUTO-ZERO inkubatorius	Heareus-Christ GmbH	Vokietija

2.3. Žmogaus osteoblastų hFOB 1.19 ląstelių kultivavimas ir paruošimas tyrimui

Žmogaus vaisiaus osteoblastų hFOB 1.19 ląstelių linija (žr. 10 pav.) buvo įsigyta iš Amerikos ląstelių kultūrų kolekcijos (angl. *American Type Culture Collection*, toliau – ATCC) ir buvo auginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Ląstelių kultūrų auginimo laboratorijoje *in vitro* sąlygomis. Visi tyrimai su ląstelėmis atlikti laminarinėje traukos spintoje, siekiant sumažinti auginamos kultūros užsikrėtimo riziką. Laminare oras praeina pro filtrus, susidaro laminarinis srautas, dėl to yra nusodinami mikroorganizmai, įvairios dalelės. O šie šalinami per stalviršyje esančias ertmes. Siekiant sterilizuoti laminarinę oro srauto spintą, prieš eksperimentus ir po jų įjungiami ultravioletinių spindulių lempa.



10 pav. hFOB 1.19 ląstelių linijos vaizdas per šviesinį mikroskopą

Ši ląstelių linija auga prisitvirtinus prie substrato paviršiaus monosluoksniu 75 cm² paviršiaus ploto flakonėliuose. Ląstelės kultivuojamos Ham's F12 ir DMEM-GlutaMAX terpių mišinyje santykiu 1:1, taip pat pridedama 10 procentų FBS ir 1 procento Pen-Strep tirpalo. Terpė buvo atnaujinama kas dvi – tris dienas, o pasiekus apie 80–90 procentų prikibusių ląstelių pasidengimo flakonėlyje (konfluentškumo), ląstelės buvo persėjamos.

2.3.1. Persėjimo procedūra

Ląstelių persėjimas prasideda nuo senos mitybinės terpės nupylimo. Flakonėlis, kuriame buvo augintos ląstelės, praplaunamas dukart su PBS. Augdamos ląstelės tvirtinasi prie flakono sudarydamos monosluoksnį, todėl persėjimo metu jos turi būti atkabinamos nuo auginimo indo. Į flakoną įpilama 2 ml 0,25 procento tripsino tirpalo, inkubuojama apie penkias minutes 34 °C temperatūroje. Tripsinas yra žalingas ląstelėms, tad ilgiau inkubuoti nei penkias minutes nepatariama. Ląstelių atkibimas buvo vertinamas šviesiniu mikroskopu. Toliau sekė tripsino neutralizavimas įpilant į auginimo indą dvigubai didesnio tūrio šiltos mitybinės terpės. Susidariusi ląstelių suspensija buvo surinkta ir perkelta į naują auginimo indą, kuriame jau buvo iš anksto paruošta reikiamo tūrio šiltos mitybinės terpės. Ląstelių kultūros linija toliau buvo auginama inkubatoriuje, kuriame palaikoma 34 °C temperatūra, 5 procentų CO₂ prisotinta aplinka bei optimali drėgmė. Prieš talpinant į inkubatorių reikia nepamiršti tinkamai užsukti flakonėlio dangtelį. Jis turi būti ne iki galo užsuktas, kad į auginimo indą patektų reikalingas CO₂ kiekis, kuris užtikrina pH pusiausvyrą.

2.3.2. Ląstelių suspensijos ruošimas

Ląstelių suspensija ruošiama iš gyvybingų ir sveikų žmogaus osteoblastų (hFOB 1.19) ląstelių. Tad prieš eksperimentus, reikia įvertinti ląstelių monosluoksnį, terpės spalvą bei drumstumą. Terpės spalvos pokytis praneša apie pasikeitusią pH aplinką, pavyzdžiui, jei terpės spalva pasikeičia iš raudonos į geltoną, tai praneša apie terpės parūgštėjimą. O terpės drumstumas parodo, kad prie substrato yra neprisitvirtinusios ląstelės arba yra įsimetusi infekcija.

Įvertinus ląsteles, galima pradėti ruošti ląstelių suspensiją. Pirmiausia nupilama augimo terpė, dukart flakonėlis praplaunamas su PBS, o tada ant ląstelių įpilama 2 ml 0,25 procentų tripsino tirpalo ir paliekama inkubatoriuje, kol ląstelių monosluoksnis atkimba nuo auginimo indo dugno. Po penkių minučių į flakonėlį įpilama apie 4 ml šiltos mitybinės terpės, kad sustabdytų tripsino poveikį ląstelėms. Viskas perpilama į 15 ml talpos centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 minutes 120 x g greičiu. Susidaręs supernatantas pašalinamas, o nusėdusios ląstelės suspenduojamos 1 ml mitybinės terpės tūryje.

2.3.3. Gyvų ląstelių skaičiaus nustatymas

Gyvybingų ląstelių skaičiaus įvertinimui ląstelių suspensija sumaišoma su 0,4 procento tripano mėlio dažo tirpalu santykiu 1:1 ir gerai suspenduojama pipete. Ląstelių tankis apskaičiuojamas hemocitometru, ant jo kameros prilipinus dengiamąjį stiklelį. Hemocitometro padalintas į dvi specialiai graviruotas kameras. Vienoje kameroje yra 1 mm × 1 mm dydžio kvadratai, kurie yra atskirti triguba linija. Vienas 1 mm × 1 mm dydžio kvadratas yra padalintas į 16 mažesnių kvadratėlių. Kamera užpildoma ląstelių ir tripano mėlio tirpalu. Žiūrint per mikroskopą, skaičiuojamos ląstelės viename iš didelių keturių kvadratų.

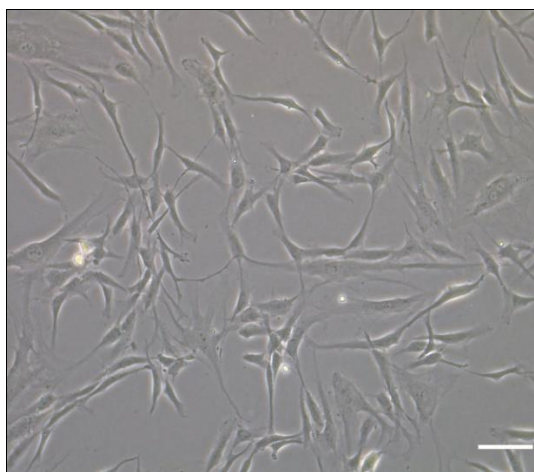
Gyvų ląstelių skaičius skaičiuojamas pagal formulę:

$$n = A \times B \times 10^4, \quad (2.3.3.)$$

kai n – gyvų ląstelių skaičius esantis pradinės suspensijos mililitre; A – suskaičiuotas ląstelių skaičius viename dideliame kvadrato; B – suspensijos praskiedimo tripano mėliu laipsnis; 10^4 – vieno didelio kvadrato tūrio dalis mililitre.

2.4. Mezenchiminių kamieninių ląstelių ASC/TERT1 auginimas *in vitro*

Žmogaus riebalinio audinio tipo mezenchiminių kamieninių ląstelių ASC/TERT1 linija (žr. 11 pav.) buvo įsigyta iš Evercyte ląstelių kolekcijos ir buvo auginama ląstelių kultūrų auginimo laboratorijoje, esančioje Lietuvos sveikatos mokslų universitete, *in vitro* sąlygomis. ASC/TERT1 linija auginta 75 cm² paviršiaus ploto flakonuose, mitybinėje terpėje: 2 procentai FBS, 1,2 procentai GlutaMAX, 0,4 procentai Pen-Strep tirpalo, 5 ng / ml rh FGFa, 5 ng / ml rh FGFb, 5 ng / ml rh EGF ir aDMEM. Terpė keičiama kas tris dienas, o pasiekus apie 80 – 90 procentų konfluentiškumo – ląstelės persėjamos. Ląstelių eksperimentai buvo atlikti laminarinėje traukos spintoje.



11 pav. ASC/TERT1 ląstelių linijos vaizdas per šviesinį mikroskopą

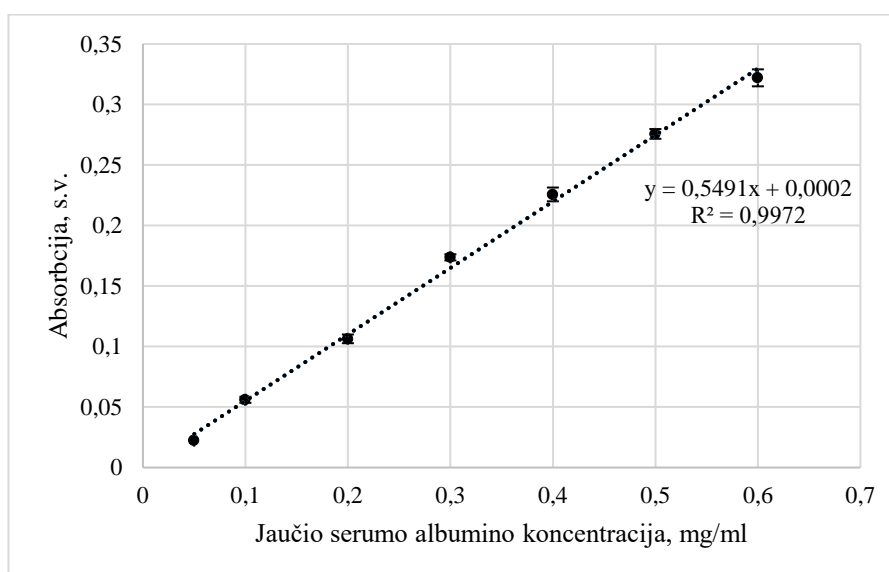
Persėjant ląsteles, reikia senąją terpę nupilti ir dukart flakono dugną praplauti su PBS, siekiant pašalinti terpės likučius. Vėliau užpilama 2 ml 0,05 procento tripsino tirpalo, inkubuojama ne ilgiau nei penkias minutes 37 °C temperatūroje. Jei ląstelės neatkimba nuo flakono dugno, galima švelniai padaužyti į flakono šoninę sienelę. Jei ląstelės atkibo, į flakoną buvo įpilama 4 ml terpės. Ląstelių suspensija buvo perkeliama į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 170 xg greičiu penkias minutes. Susidaręs supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos mitybinėje terpėje ir perkeltos į naują auginimo indą. ASC/TERT1 ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūros, optimalios drėgmės, 5 % CO₂ aplinkos inkubatoriuje.

2.4.1. Egzosomų išskyrimas iš ASC/TERT1

Kadangi serume yra daug egzosomų, siekiant, kad serumo egzosomos nelemtų tyrimo rezultatų, ASC/TERT1 buvo auginamos flakonuose beseruminėje terpėje BIOAMF-2. Po kelių parų terpė buvo surinkta, centrifuguojama 30 minučių 2000 xg greičiu. Po to supernatantas perpiltas į kitą mėgintuvėlį, į kurį vėliau įpilta pusė supernatanto tūrio egzosomų išskyrimo reagento, mėgintuvėlis pavartomas ir dedamas į šaldytuvą nakčiai. Kitą dieną centrifuguojama 10 000 x g greičiu 1 valandą 2–8 °C temperatūroje. Po centrifugavimo gautas supernatantas buvo pašalintas, o egzosomos suspenduojamos PBS ir saugomos -20 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

2.4.2. Egzosomų koncentracijos nustatymas

Egzosomų baltymo koncentracija buvo įvertinta naudojant Bradfordo reagentą. Norint aptikti ir egzosomų vidinius baltymus, tūrio santykiu 1:9 egzosomų mėginys buvo maišomas su 0,1 procento tritono tirpalu, laikoma 30 minučių šaldytuve. Praėjus pusvalandžiui, 10 µl mėginio ir 190 µl Bradfordo reagento buvo sumaišoma, vengiant šviesos bei burbuliukų susidarymo. Gautas mišinys įpiltas į 96-šulinėlių lėkštelę. Kontrolė buvo ruošiama taip pat, tik vietoj egzosomų buvo naudotas PBS. Po 5 minučių inkubacijos 595 nm bangos ilgio šviesos absorbcija buvo matuojama daugiafunkciniu plokštelių skaitytuvu. Baltymo kiekiui apskaičiuoti naudota Bradfordo kalibracinė kreivė (žr. 12 pav.), kuri gauta paruošiant standartinius skirtingų koncentracijų jaučio serumo albumino tirpalus (0,05–0,6 mg/ml). Mėginiai buvo sumaišyti su Bradfordo reagentu, inkubuoti penkias minutes, matuota 595 nm bangos ilgio šviesos sugertis.



12 pav. Bradfordo kalibracinė kreivė

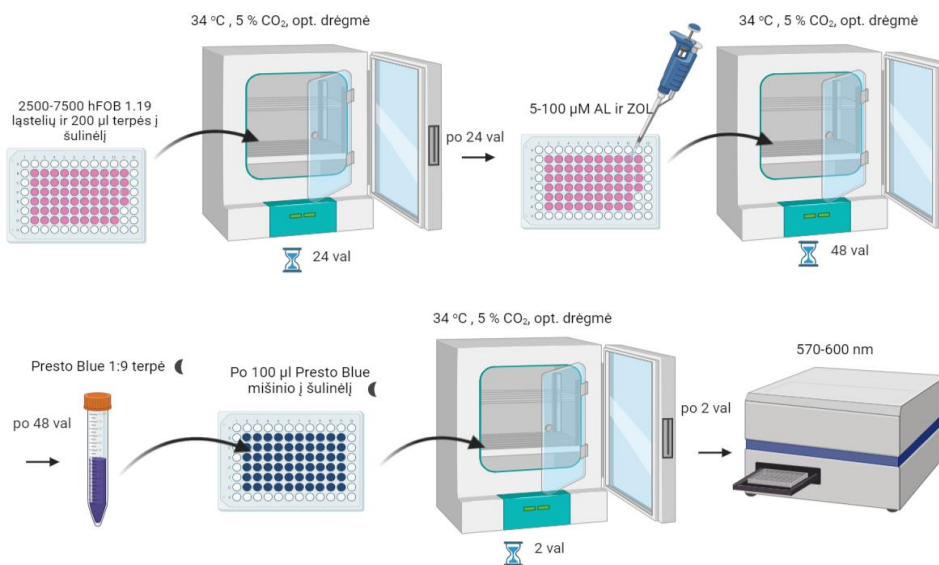
2.4.3. Egzosomų dydžio nustatymas

Norint įvertinti dalelių dydį naudotas Zetasizer analizatorius. Į kiuvetę buvo įpilta 500 µl egzosomų mėginio suspenduoto PBS ir matuota dinaminė šviesos sklaida su Zetasizer prietaisu, kuriuo buvo atlikti penki matavimai. Dalelių dydžio analizė atliekama dinamiškai išskleidant šviesą. Kai dalelės išsisklaido skystyje, jos juda atsitiktinai į visas puses. Brauno judėjimo principas yra tas, kad dalelės nuolat susiduria su tirpiklio molekulėmis. Šie susidūrimai sukelia tam tikrą energijos kiekį, kuris sukelia dalelių judėjimą. Energijos perdavimas yra daugiau ar mažiau pastovus, bet mažesnės dalelės juda didesniu greičiu nei didesnės. Jei žinomi visi kiti parametrai, turintys įtakos dalelių judėjimui, pavyzdžiui, tirpalo klampumas, dalelių, tirpalo refrakcijos koeficientai, temperatūra, galime nustatyti hidrodinaminį skersmenį matuodami dalelių greitį. Santykį tarp dalelių greičio ir dalelių dydžio nurodo Stokeso-Einšteino lygtis [116].

2.5. Osteoblastų veikimas bisfosfonatais ir egzosomų preparatais

hFOB 1.19 ląstelės buvo suskaičiuotos (žr. 2.3.2. ir 2.3.3.) ir pasėtos į 96 šulinėlių skaidrią lėkštelę, naudojant 2500–7500 ląstelių ir 200 µl mitybinės terpės vienam šulinėliui. Lėkštelė vienai parai buvo talpinama į inkubatorių, kuriame buvo 34 °C temperatūra, 5 % CO₂ aplinka bei optimali drėgmė. Po

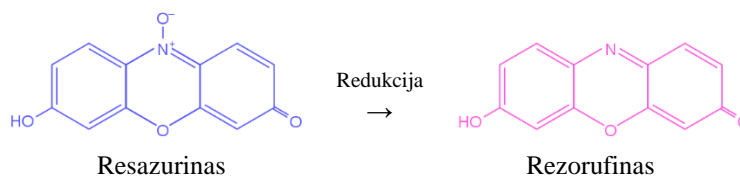
24 val. iš šulinėlių sena terpė buvo nusiurbta, užpilta naujos, kuri jau buvo papildyta skirtingomis alendronato (5–100 μM) ir zoledronato (5–100 μM) bei egzosomų (1–10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) koncentracijomis (žr. 13 pav.). Po dviejų parų terpė buvo nusiurbta ir užpilta po 100 μl kiekvienam šulinėliui paruošto PrestoBlue tirpalo. Dėl reagento jautrumo šviesai darbai buvo atliekami tamsoje. Tirpalas buvo ruošiamas santykiu 1:9, kai viena dalis PrestoBlue reagento ir devynios dalys – mitybinės terpės. Ląstelių šviesos sugertis po dviejų valandų inkubacijos su PrestoBlue tirpalu matuotos prie 570 nm ir 600 nm bangos ilgių. Bandyje buvo atliekami du techniniai pakartojimai, o kiekvienas eksperimentas pakartotas tris kartus. Santykinis ląstelių gyvybingumas ir proliferacija buvo išreikšta procentais, palyginti su neapdorotomis kontrolinėmis ląstelėmis (100 %).



13 pav. Ląstelių gyvybingumo nustatymas spektrofotometriiniu metodu

2.6. Osteoblastų suminio metabolinio aktyvumo vertinimas

Procedūra išlieka tokia pati kaip ir ankstesniame aprašyme (žr. 2.5.), tačiau pasirinktas ląstelių skaičius – 2500, alendronato ir zoledronato koncentracija buvo 5 μM , o egzosomų – 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Pirmiausia buvo tikrinamas osteoblastų gyvybingumas spektrofotometriškai, veikiant skirtingomis bisfosfonatų koncentracijomis. Šis metodas pagrįstas PrestoBlue reagentu – resazurinu, kuris veikia kaip ląstelių gyvybingumo rodiklis. Resazurinas (mėlynos spalvos) ląstelių kvėpavimo procese redukuojamas iki rezorufino (rožinės spalvos) (žr. 14 pav.). Konversija yra proporcinga metaboliškai aktyvių ląstelių skaičiui ir gali būti kiekybiškai įvertinta matuojant absorbciją [117].



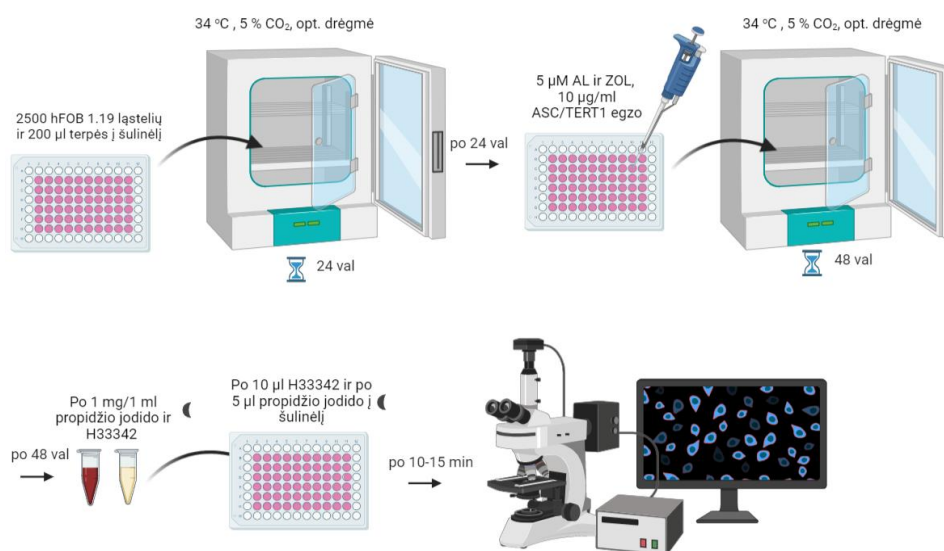
14 pav. Resazurino virtimas rezorufinu

2.7. Osteoblastų gyvybingumo vertinimas

Osteoblastų ląstelės buvo suskaičiuotos ir pasėtos į 96 šulinėlių skaidrią lėkštelę, vienam šulinėliui naudojant 2500 ląstelių, 200 μl terpės. 24 val. lėkštelė buvo inkubuojama inkubatoriuje. Po paros terpė buvo pakeista į naują terpę, kurioje buvo – 5 μM alendronato ir zoledronato bei

10 µg / ml egzosomų preparatai. Dvi paras inkubuota, o po jų buvo naudoti du fluorescenciniai dažai: propidžio jodidas ir Hoechst 33342. Bisbenzimidio H 33342 dažas yra neselektyvus, tad patenka į visų ląstelių branduolius ir juos nudažo mėlyna spalva. Tuo tarpu propidžio jodidas yra selektyvus ir patenka tik į tų ląstelių branduolius, kurių membrana yra pralaidi, vadinasi tokia ląstelė nebėra gyvybinga ir ją dažas nudažo raudona spalva.

Dažai buvo sveriami ir skiedžiami su distiliuotu vandeniu, kai galutinė abiejų dažų koncentracija 1 mg / 1 ml. Dėl dažų jautrumo šviesai, dirbta tamsoje. Į kiekvieną šulinėlį įpilta Hoechst 33342 10 µl dažų tirpalo, o propidžio jodido dažo – 5 µl. Ląstelės inkubuojamos apie 10–15 min. kambario temperatūroje (žr. 15 pav.). Fluorescenciniu mikroskopu buvo fiksuojami atsitiktiniai kiekvieno šulinėlio trys laukeliai. Jei vaizdas matomas neryškus, kažkiek ląstelių terpės buvo nusiurbta. Sveikos ir gyvybingos ląstelės vertintos tos, kurios UV šviesoje švytėjo mėlyna spalva, o žuvusios ląstelės – švytėjo raudona spalva. Gyvybingų ląstelių skaičius buvo išreikštas procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus šulinėlio laukelyje. *ImageJ* programa naudota užfiksuotų vaizdų kokybei gerinti.



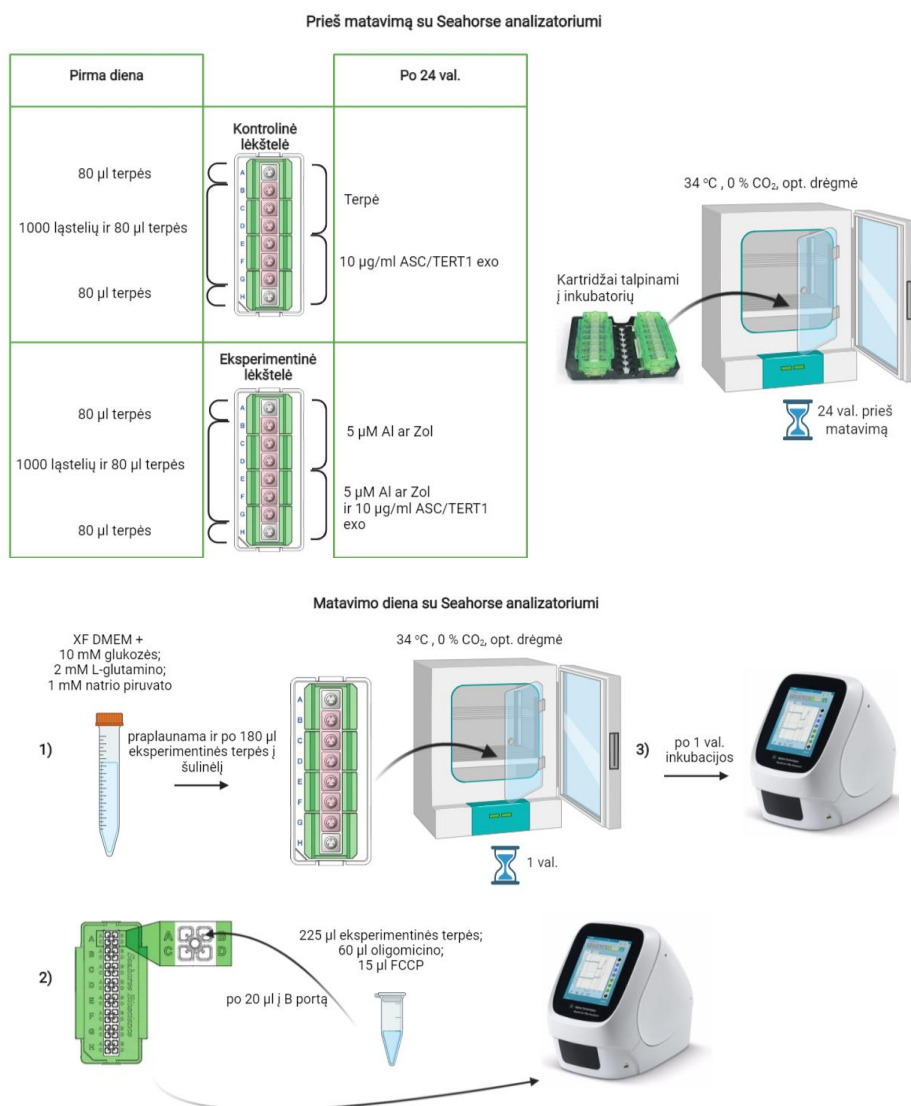
15 pav. Ląstelių gyvybingumo nustatymas su fluorescenciniu mikroskopu

2.8. Mitochondrinio ir glikolinio energetinio metabolizmo vertinimas

Gyvų ląstelių deguonies suvartojimo greitis, atspindintis mitochondrijų funkcijas, ir tarpląstelinio rūgštėjimo greitis, nusakantis glikolizės aktyvumą, buvo išmatuoti naudojant *Seahorse XFp* metabolizmo analizatorių. Ląstelių deguonies suvartojimas (kvėpavimas) ir protonų išsiskyrimas (glikolizė) sukelia greitus, lengvai išmatuojamus ištirpusio deguonies ir laisvųjų protonų koncentracijos pokyčius, kurie kas kelias sekundes matuojami jutiklių zondais. Prietaisas matuoja koncentracijas 2–5 minutes, tada apskaičiuoja kvėpavimo greičio ir rūgštėjimo greičio vertes.

hFOB 1.19 ląstelės buvo pasėtos į specialiai pritaikytą Agilent XFp analizatoriui 8 šulinėlių plokštelę, kai viename šulinėlyje – 1000 ląstelių ir 80 µl terpės. Parą inkubuojama, o po jos terpė buvo keičiama nauja, kurioje buvo 10 µM bisfosfonatų bei 10 µg / ml egzosomų. Vėl parą inkubuojama. Analizės atlikimo dieną buvo pasigaminta tyrimo terpė pagal gamintojo nurodytą protokolą, kai XF DMEM terpė buvo papildyta 10 mM gliukozės, 2 mM L-glutamino ir 1 mM natrio piruvato, pH sureguliuotas iki $7,4 \pm 0,1$. Su šia terpe lėkštelės buvo praplaunamos, pripildomos į šulinėlį po 180 µl. Valandą

inkubuojama be CO₂ inkubatoriuje 34 °C temperatūroje. Po valandos plokštelė su ląstelėmis buvo talpinama į analizatorių (žr. 16 pav.). Duomenys toliau analizuojami kompiuterine programa *Wave*.



16 pav. Ląstelių fenotipo nustatymas su *Seahorse* analizatoriumi

2.9. Eksperimentų rezultatų apdorojimas ir vaizdavimas

Eksperimentų metu gauti rezultatai buvo apdorojami suvedant juos į Microsoft Office EXCEL programą ir paskaičiuojant: aritmetinio matavimo rezultatų vidurkį (2.9 a) bei standartinį nuokrypį (2.9 b) su EXCEL programos funkcija „STDEV“. Braižant grafikus ir atliekant duomenų analizę buvo naudota SigmaPlot 13.5 programa. Statistikai reikšmingi ir nereikšmingi skirtumai vertinti Stjudento t-testu, kai lyginami dviejų grupių rezultatai, o kai lyginami daugiau nei dviejų grupių duomenys – vienkrypte dispersine ANOVA analize, taikant Bonferonio kriterijų. Statistiškai reikšmingais duomenimis buvo laikomi tie, kurių $p < 0.05$.

$$x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (2.9 a)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{(n-1)}} \quad (2.9 b)$$

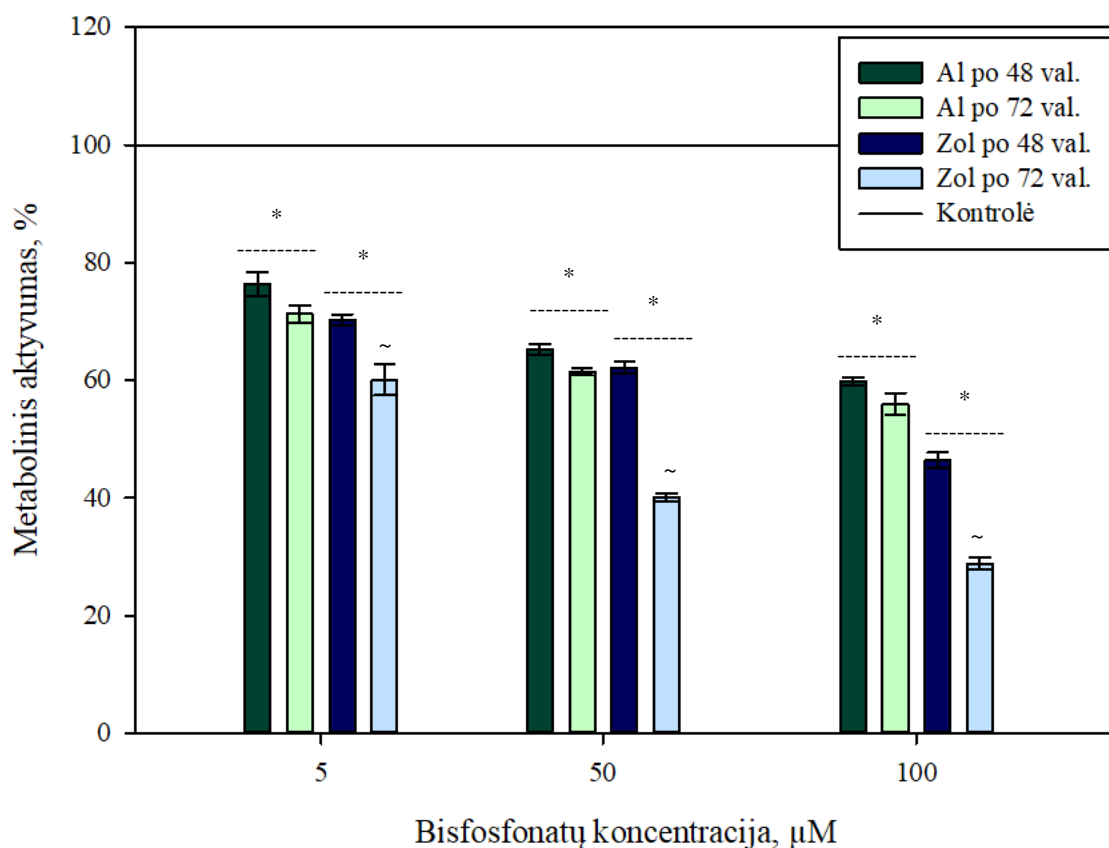
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Nors bisfosfonatų vaistiniai preparatai yra plačiai vartojami kaulų rezorbcijai gydyti, tačiau vartojant ilgą laiką ir didelėmis dozėmis, didėja žandikaulio osteonekrozės rizika [118]. Negyjantis žandikaulio kaulo atsivėrimas sukelia daug problemų, nes veiksmingo gydymo nėra. Daugėja įrodymų, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės turi didžiulį kaulų ir dantų audinių regeneravimo potencialą [119]. Tačiau ląstelių terapija kelia naviko formavimosi riziką, gali sukelti genetinį nestabilumą ar chromosomų aberacijas [120]. Šių ląstelių išskiriamos egzozomos pasižymi panašiomis regeneracinėmis savybėmis, jas naudoti patogiau ir nepageidaujamų šalutinių poveikių rizika mažesnė, lyginant su ląstelių terapija [121]. Todėl šio darbo tikslas buvo ištirti riebalinės kilmės mezenchiminių kamieninių ląstelių egzozomų apsauginį ir regeneracinį poveikį *in vitro* su bisfosfonatais susijusios osteonekrozės modelyje.

3.1. Suminio metabolinio aktyvumo vertinimas

Pirmasis darbo uždavinys buvo sukurti osteonekrozės modelį *in vitro*. Šiam uždaviniui įgyvendinti buvo pasirinkti du bisfosfonatai: alendronatas, kaip atstovas neciklinių senesnės kartos bisfosfonatų, ir zoledronatas – naujos kartos ciklinis, turintis savo struktūroje azotą. Nors intraveninis zoledronatas dažniausiai sukelia žandikaulio osteonekrozę dėl taikomos didelės intraveninės koncentracijos ir yra nuo dešimt iki šimto kartų stipresnis už geriamąjį alendronato vaistinį preparatą [122], tačiau ilgai vartojamas alendronatas, pavyzdžiui, gydant osteoporozę, irgi didina žandikaulio osteonekrozės atsiradimo ir vystymosi riziką [123].

Pirmiausia, norint sukurti kuo realesnį osteonekrozės modelį, buvo surinkta informacija apie bisfosfonatų koncentraciją yra kraujyje ir kauliniame audinyje. Paaiškėjo, kad preparato koncentracija kraujyje iškart po injekcijos būna apie 5 μM , o kauluose gali būti net iki šimto kartų didesnė [124]. Todėl eksperimentų metu buvo tirta, kaip 5–100 μM alendronato ir zoledronato tirpalai veikė suminį hFOB 1.19 osteoblastų metabolinį aktyvumą skirtingu laiko momentu. Gauti duomenys pateikiami 17 pav.



17 pav. Alendronato ir zoledronato poveikio osteoblastų gyvybingumui tyrimas. Grafike matomi absorbciniai matavimo duomenys, išreikšti procentais, esant 5–100 µM bisfosfonatų koncentracijoms (kontrolė – 0 µM bisfosfonatų, 100 %). Pateikiami 3 nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė nuokrypis, * žymi statistinį patikimumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$; ~ žymi statistinį lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$. Rezultatai analizuoti programiniu paketu *SigmaPlot 13.5*.

Iš grafiko matyti, kad didinant vaisto koncentraciją, mažėja ir ląstelių metabolinis aktyvumas. Pavyzdžiui, 5 µM koncentracijos alendronatas po 48 val. mažino metabolinį aktyvumą iki $76,35 \pm 2,07$ %, tuo tarpu dešimt kartų stipresnės koncentracijos alendronatas (50 µM) hFOB 1.19 ląstelių metabolinį aktyvumą sumažino iki $65,26 \pm 0,9$ % lyginant su kontrole. Taip pat pastebėta bisfosfonatų poveikio metaboliniam aktyvumui tiesioginė priklausomybė nuo poveikio trukmės: 50 µM koncentracijos zoledronatas po 48 val. sukėlė metabolinio aktyvumo sumažėjimą iki $62,16 \pm 1,07$ %, o po 72 val. – iki $46,4 \pm 1,35$ %. Toks zoledronato slopinamasis poveikis hFOB 1.19 ląstelėms nustatytas ir J. H. Kim ir kitų mokslininkų straipsnyje: „Flavanoidų sukeltos autofagijos apsauginis poveikis bisfosfonatų paveiktiems osteoblastams“. Ląstelės buvo paveiktos zoledronatu ir inkubuotos 24–72 val. Po 24 valandų zoledronatu (0–100 µM) apdorotų ląstelių gyvybingumas nepasikeitė, po 48 val. gyvybingumas reikšmingai sumažėjo – iki 67,7 % (50 µM) ir 48,5 % (100 µM), o po 72 val. – atitinkamai 47,4 % (50 µM) ir 29,3 % (100 µM). Šie rezultatai rodo, kad zoledronatas yra citotoksiškas osteoblastams [125].

Be to, matomas didesnis zoledronato poveikis metaboliniam aktyvumui lyginant su alendronatu, pavyzdžiui, 100 µM koncentracijos zoledronatas po 72 val. inkubacijos slopino osteoblastų metabolinį aktyvumą net iki $28,86 \pm 1,01$ %, kai tuo tarpu alendronatas po tokio pat laiko – iki $56,02 \pm 1,83$ %. Tai tik įrodo didesnę zoledronato citotoksiškumą lyginant su alendronatu [122].

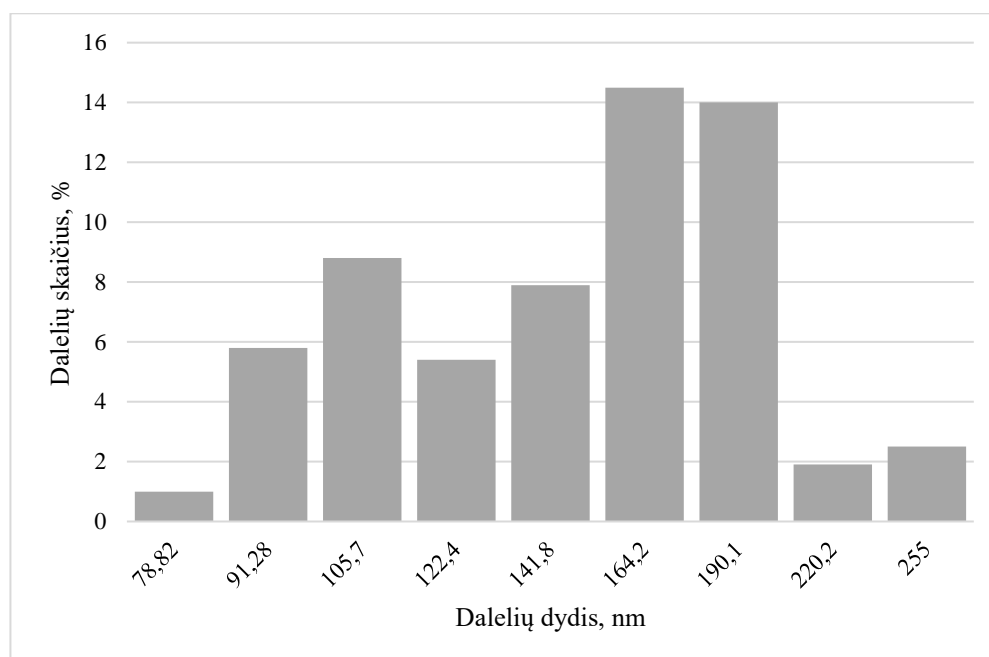
Statistinės analizės rezultatai atskleidė, kad hFOB 1.19 ląstelių, paveiktų alendronato preparatais (5–100 μM) tiek po 48 val., tiek po 72 val., gyvybingumas statistiškai reikšmingai sumažėjo lyginant su bisfosfonatų neveiktomis ląstelėmis (kontrole). Tuo tarpu osteoblastų, paveiktų zoledronato preparatais (5–100 μM), gyvybingumas statistiškai sumažėjo po 72 val. inkubacijos lyginant su kontrole. Tarp skirtingų bisfosfonatų grupių, pastebėtas statistiškai reikšmingas osteoblastų gyvybingumo nuslopinimas po 72 val. poveikio su zoledronatu, lyginant su kontrole.

Nustatius, kaip kinta hFOB 1.19 ląstelių gyvybingumas laike, priklausomai nuo bisfosfonatų koncentracijos terpėje, buvo iširta, kaip metabolinis aktyvumas priklauso nuo ląstelių tankio išbandant šulinėliui tenkančių ląstelių skaičius 2500–7500 ribose. Eksperimentai atlikti naudojant skirtingų koncentracijų alendronato ir zoledronato preparatus, taikant tuos pačius laiko intervalus. Nustatyta, kad ląstelių tankis didelės reikšmės neturėjo tyrimo rezultatams (rezultatai nepateikiami), tad tolimesniuose tyrimuose likta prie pradinio tirto ląstelių skaičiaus – 2500 viename šulinėlyje.

Atlikus rezultatų analizę, nuspręsta osteonekrozės modelyje *in vitro* toliau taikyti 5 μM bisfosfonatų koncentraciją ir veikti ląsteles 48 val. Ši bisfosfonatų koncentracija, inkubacijos laikas pasirinkti, nes osteoblastų gyvybingumo procentas buvo apie 70 %. Pagal ISO 10993-5, ląstelių gyvybingumo slopinimas 80–60 % rodo silpną citotoksiškumą [126]. Tad tai tinkamas modelis tyrinėti regeneracijos potencialą *in vitro*.

3.2. Egzosomų išskyrimas ir identifikavimas

Antrasis šio projekto uždavinys buvo išskirti riebalinės kilmės kamieninių ląstelių egzosomas ir jas identifikuoti. Buvo išskirti trys ASC/TERT1 ląstelių egzosomų mėginiai; kiekviename iš jų dinaminės sklaidos metodu buvo nustatytas dalelių dydis ir daugiavoliniu plokštelių skaitytuvu spektrofotometriniu režimu – baltymo kiekis. Gauti dalelių dydžio ir pasiskirstymo rezultatų duomenys pateikiami 18 pav.



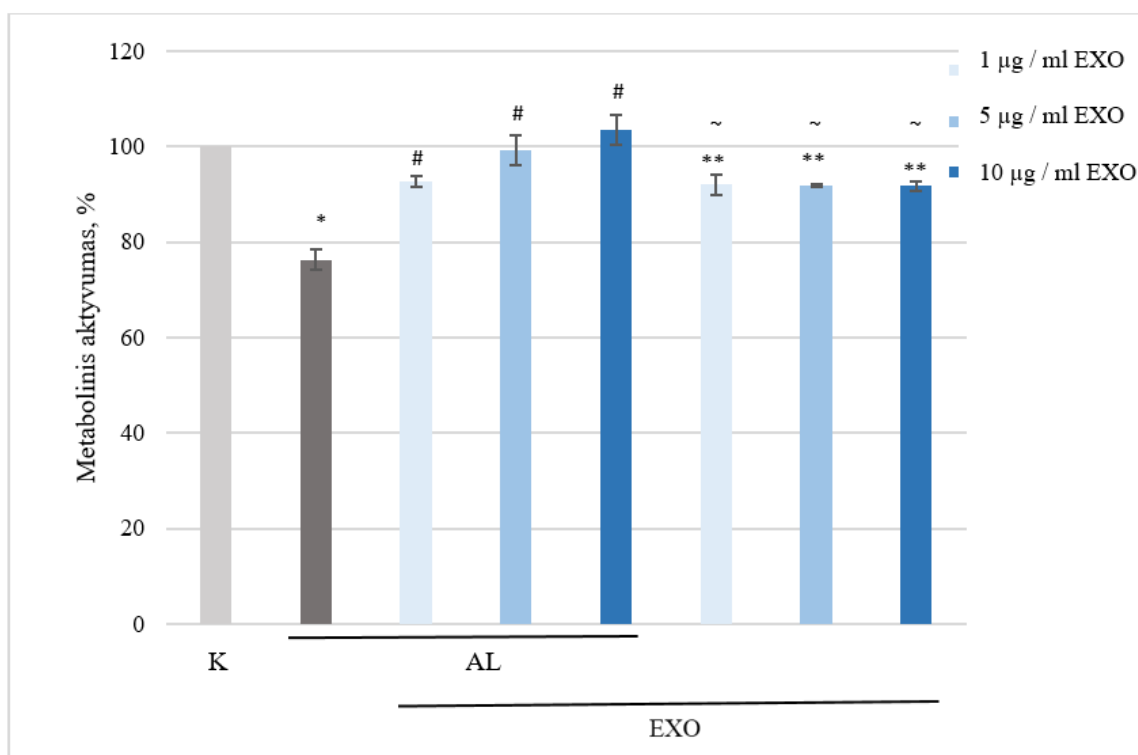
18 pav. ASC/TERT1 ląstelių egzosomų dydžio procentinis pasiskirstymas. Grafike matomi dalelių dydžių matavimo duomenys išreikšti procentais. Į kiuvetę įpilta išskirto egzosomų mėginio ir matuota su dinaminės šviesos sklaidos Zetasizer analizatoriumi. Rezultatai perteikti per *SigmaPlot 13.5 programą*.

Iš diagramos matyti, kad dalelių dydis svyruoja nuo 78,82 iki 255 nm. Literatūros duomenimis egzosomų dalelių dydis yra 30–200 nm ribose [90]. Tačiau dinaminės šviesos sklaidos Zetasizer analizatorius rodo ir didesnes daleles (220,2–255 nm), kurios nepriskiriamos egzosomoms. Todėl galime numanyti, kad šias pašalines daleles nevysiškai pašalino 0,22 μm dydžio filtrą. Vis dėlto didžioji dalelių procentinė dalis patenka į egzosomų priskiriamas ribas, todėl galima spręsti, kad būtent šios dalelės ir yra ASC/TERT1 išskirtos egzosomos.

Toliau buvo vertintas bendras egzosomų baltymo kiekis, nustatytas Bradfordo metodu spektrofotometriškai. Gautos trijų egzosomų mėginių koncentracijos: 0,442 mg/ml; 0,511 mg/ml ir 0,464 mg/ml. Tolimesniuose tyrimuose dirbta su šiais egzosomų preparatais.

3.3. Mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomų poveikio osteoblastų metaboliniam aktyvumui medikamentinės osteonekrozės *in vitro* modelyje tyrimas

Kitas šio darbo uždavinys buvo įvertinti kamieninių ląstelių egzosomų efektyvumą apsaugant osteoblastus nuo bisfosfonatų alendronato ir zoledronato sukeltų pažaidų. Šiam uždaviniui įgyvendinti buvo atlikti bisfosfonatais su ir be egzosomų paveiktų hFOB 1.19 ląstelių metabolinio aktyvumo tyrimai. Rezultatai pateikti 19 – 20 pav.



19 pav. Kamieninių ląstelių egzosomų reikšmė alendronatu veikiamų osteoblastų metaboliniam aktyvumui.

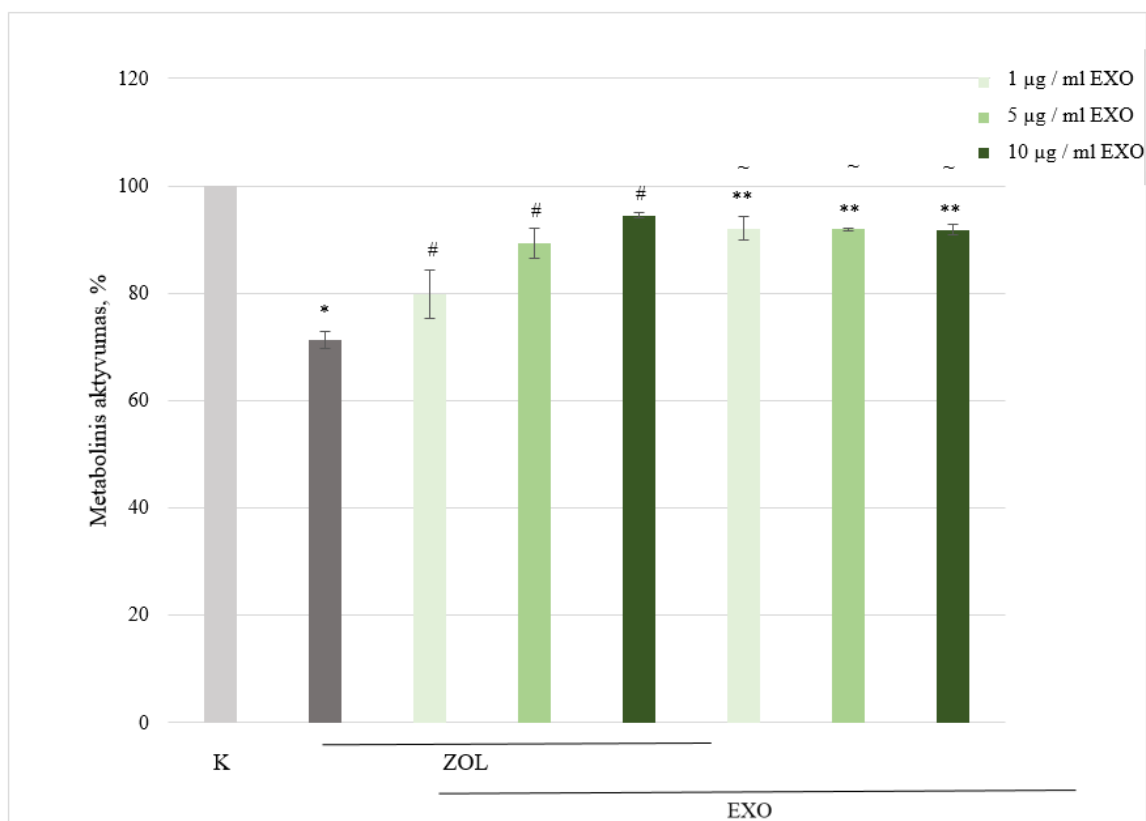
Absorbcijos intensyvumo duomenys, esantys grafike, išreikšti procentais, esant 1–10 μg / ml egzosomų koncentracijai (kontrolė – 0 μM alendronato ir 0 μg / ml egzosomų, 100 %). Pateikiami 3 nepriklausomų eksperimentų vidurkiai \pm standartinė nuokrypis, * žymi statistinį patikimumą, lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$; ** – kai $p < 0,001$; ~ žymi statistinį patikimumą, lyginant su alendronatu veiktomis ląstelėmis, kai $p < 0,001$, # žymi statistinį patikimumą, lyginant su alendronatu veiktomis ląstelėmis, kai $p < 0,001$.

Rezultatai analizuoti programiniu paketu *SigmaPlot 13.5*.

Iš grafiko (žr. 19 pav.) matyti, kad paveikus osteoblastų ląsteles 48 valandas su 5 μ M koncentracijos alendronatu, gyvybingų ląstelių procentas buvo gerokai sumažėjęs ($76,35 \pm 2,073$ %) ir statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolės. Paveikus osteoblastus alendronatu kartu su egzosomomis, didinant egzosomų koncentraciją nuo 1 iki 10 μ g / ml, ląstelių metabolinis aktyvumas tolydžio didėjo; atitinkamai, 1 μ g / ml gyvybingumą atstatė iki $92,64 \pm 1,09$ %, 5 μ g / ml – $99,3 \pm 3,14$ %, 10 μ g / ml – $103,42 \pm 3$ %. Tiek 5 μ g / ml, tiek 10 μ g / ml koncentracijos egzosomos pilnai atstatė osteoblastų metabolinį aktyvumą iki kontrolės lygio. Panašus regeneraciją skatinantis poveikis buvo aprašytas Lu bei kitų mokslininkų, kurie nustatė, kad iš riebalinių kamieninių ląstelių gautos egzosomos skatina žmogaus pirminių osteoblastinių ląstelių dauginimąsi ir diferenciaciją [127]. Kamieninių ląstelių egzosomos gali stimuliuoti kaulo regeneraciją ne tik tiesiogiai, bet ir skatindamos kitų ląstelių veiklą. Pavyzdžiui, nustatyta, kad išskirtos iš riebalinių kamieninių ląstelių egzosomos skatina tiek *in vitro*, tiek *in vivo* angiogenezę [128]. Taigi, egzosomų terapija gali padėti aprūpinti kaulinį audinį krauju, taip pagerinant medžiagų apykaitą ir pagreitinant gijimo procesą osteonekrozės atveju.

Įdomu, kad veikiant ląsteles egzosomomis be bisfosfonatų, jų suminis metabolinis aktyvumas buvo nedaug, tačiau reikšmingai mažesnis, negu kontrolinių pavyzdžių ir siekė nuo $92,07 \pm 2,19$ % iki $91,83 \pm 1,04$ % kontrolinės vertės. Tai leidžia manyti, kad egzosomos gali lemti ląstelių persitvarkymus, susijusius su metabolizmo pokyčiais. Gali būti, kad egzosomos inicijuoja osteoblastų diferenciaciją ar dediferenciaciją, bet šiai hipotezei įrodyti reikalingi detalesni energetinio metabolizmo tyrimai.

Laboratorinėse žiurkėse sukurtuose *in vivo* osteonekrozės modeliuose riebalinio tipo kamieninių ląstelių egzosomos stimuliavo trabekulinio kaulo tankio didėjimą, osteocitų bei proliferacinių ląstelių skaičiaus didėjimą, bei slopino apoptozinę [129]. Tuo tarpu *in vitro* tyrimuose egzosomos, išskirtos iš žmogaus riebalinio tipo kamieninių ląstelių, sustiprino žmogaus kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių migraciją, proliferaciją ir osteogeninę diferenciaciją [130].



20 pav. Kamieninių ląstelių egzosomų reikšmė zoledronatu veikiamų osteoblastų metaboliniam aktyvumui.

Absorbciniai matavimo duomenys, esantys grafike, išreikšti procentais, esant 1–10 µg / ml egzosomų koncentracijai (kontrolė – 0 µM zoledronato ir 0 µg / ml egzosomų, 100 %). Pateikiami 3 nepriklausomų eksperimentų vidurkiai ± standartinė nuokrypis, * žymi statistinį patikimumą, lyginant su kontrole, kai $p < 0,05$; **, kai $p < 0,001$; ~ žymi statistinį patikimumą, lyginant su zoledronatu veiktomis ląstelėmis, kai $p < 0,001$, # žymi statistinį patikimumą, lyginant su zoledronatu veiktomis ląstelėmis, kai $p < 0,05$.

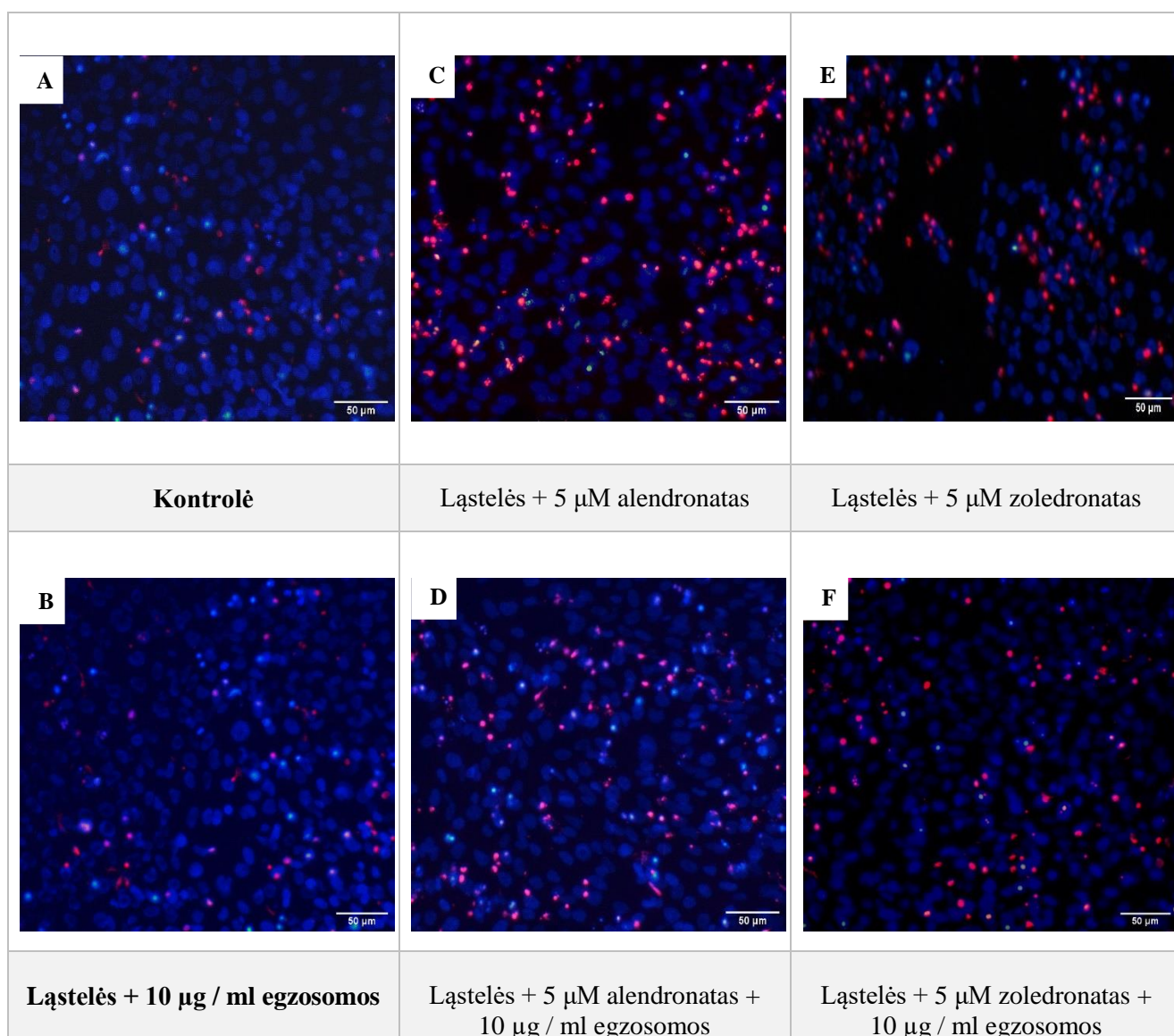
Rezultatai analizuoti programiniu paketu *SigmaPlot 13.5*.

Pateiktame grafike (žr. 20 pav.) matoma, kad po dviejų parų inkubacijos su 5 µM koncentracijos zoledronatu osteoblastų gyvybingumas ($69,29 \pm 1,53$ %) statistiškai reikšmingai skyrėsi lyginant su kontrole. Osteoblastų paveiktų skirtingų egzosomų preparatais gyvybingumas statistiškai reikšmingai skyrėsi lyginant su osteoblastų, paveiktų zoledronatu, gyvybingumu. Taip pat pastebėta, kad hFOB 1.19 ląstelių gyvybingumas, veikiant ir zoledronato, ir egzosomų mėginiais, statistiškai reikšmingai padidėjo lyginant su zoledronato veiktomis osteoblastų ląstelėmis ir siekė iki 95 % nepaveiktos kontrolės lygio.

Lyginant alendronato ir zoledronato poveikį osteoblastams, pastebėta, kad zoledronatas intensyviau slopina osteoblastų gyvybingumą ir jo sukeliamas pažeidas egzosomos sumažina silpniau, lyginant su alendronatu. Zoledronato preparatas (5 µM) slopina osteoblastų gyvybingumą iki $69,29 \pm 1,53$ %, tuo tarpu alendronatas – tik iki $76,35 \pm 2,073$ %. Dešimties µg / ml egzosomos alendronato paveiktų osteoblastų metabolinį aktyvumą atstato pilnai, o zoledronato paveiktų osteoblastų metabolinį aktyvumą tik iš dalies – jis išlieka 10 % mažesnis lyginant su kontrole.

3.4. Osteoblastų, paveiktų mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomomis, gyvybingumo tyrimas

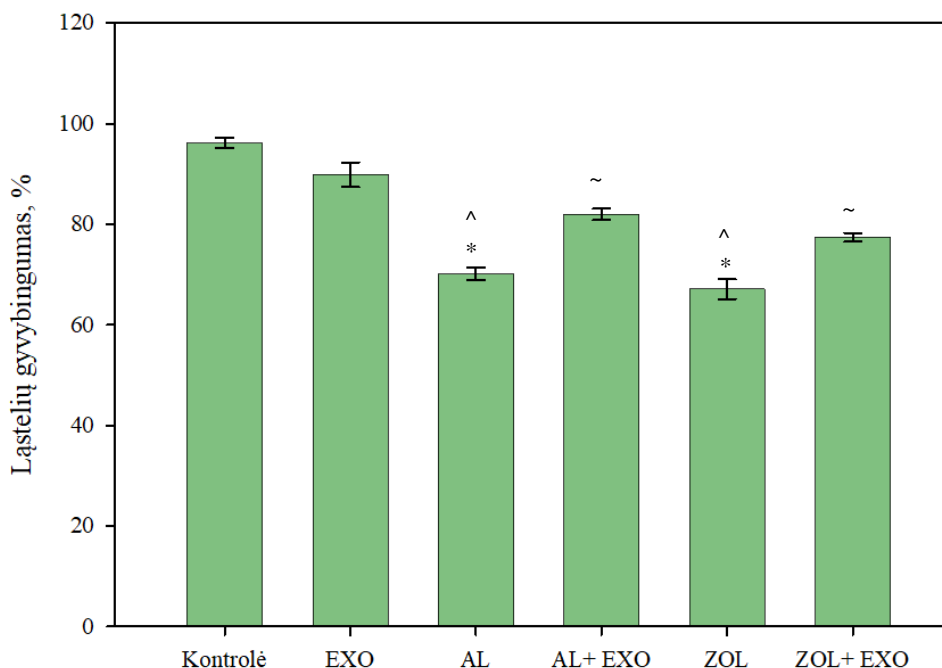
Dar papildomai osteoblastų gyvybingumas, veikiant didžiausia egzosomų koncentracija, buvo vertintas dvigubu branduolių dažymu fluorescenciniais dažais (Hoechst 33342 ir propidžio jodidu). Šie du gyvybingumo analizės metodai vienas kitą papildo, nes spektrofotometriškai nustatomas metabolinis aktyvumas visame šulinėlyje, tačiau nežinome, ar metabolinis aktyvumas sumažėjo dėl ląstelių žūtis, sulėtėjusios proliferacijos ar sulėtėjusio metabolizmo. Siekiant nustatyti, ar alendronatas ir zoledronatas sukelia osteoblastų žūtį, jų gyvybingumas buvo vertinamas branduolių dažymo metodu su fluorescenciniu mikroskopu. Gauti rezultatų duomenys pateikiami 21 ir 22 pav.



21 pav. Dvigubo branduolių dažymo metodu vertintas osteoblastų, paveiktų bisfosfonatais ir egzosomomis, gyvybingumas. Veikta 48 val. Vertintas gyvybingumas su fluorescenciniu mikroskopu. Nuotraukose matoma mėlyna spalva – gyvybingi ląstelių branduoliai, raudona – žuvusių. Rezultatai analizuoti *ImageJ* programiniu paketu.

Iš fluorescencinių nuotraukų galime pastebėti, kad nekrozės būdu žuvusių ląstelių (raudoni branduoliai) matyti visose nuotraukose, net kontrolės (21 pav. A). Panašiai nedaug žuvusių ląstelių pastebima egzosomų paveiktose ląstelėse (žr. 21 pav. B dalį). Taip pat matoma, kad žymiai padaugėjo žuvusių ląstelių alendronato ir zoledronato poveikyje (žr. 21 pav. atitinkamai C ir E dalis) lyginant su kontrole (žr. 21 pav. A dalį). Tuo tarpu bisfosfonatų ir egzosomų preparatais paveiktų osteoblastų gyvybingumas buvo didesnis lyginant su vien bisfosfonatais paveiktų ląstelių preparatais. Be to, bisfosfonatais (ypač zoledronatu) paveiktuose pavyzdžiuose matyti, kad ląstelių yra mažiau, padaugėję neužpildytų plotų. Dvigubas branduolių žymėjimas padeda aptikti nekrozės būdu žuvusias ląsteles, tačiau apoptozės būdu žuvusios ląstelės gali likti nepastebėtos, nes jos suskyla iki apoptotinių kūnų, kuriuos gretimos ląstelės fagocituoja, arba jie pereina plūduriuoti į ląstelių terpę, kur mikroskopuojant prie dugno prikibusias ląsteles yra nebeaptinkami. Dar viena apoptozės indikacija yra tai, kad nuotraukose matomi susitraukę šviesiai mėlyni branduoliai su kondensuotu chromatinu, kurie būdingi apoptozės būdu žūstančioms ląstelėms. Be to, raudoni nekroziniai branduoliai taip pat yra maži, susitraukę – gali būti, kad jų pradinis žūties kelias buvo apoptozė, tačiau dėl energetinių resursų trūkumo ląstelės nesugebėjo šio proceso užbaigti ir žuvo nekrozės būdu. Literatūros duomenimis, alendronatas ir zoledronatas iš tiesų gali sukelti osteoblastų apoptozę [131]. Vis dėlto, tam, kad apoptozė būtų patvirtinta mūsų modelyje, reikalingi tolimesni tyrimai įvertinant kaspazių aktyvumą ir fosfatidilserino pateikimą pagal žymėto Aneksino V fluorescenciją.

Toliau šiam darbe bisfosfonatais ir egzosomomis paveiktų ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas kiekybiškai, suskaičiuojant gyvybingų (mėlyni branduoliai) ir žuvusių ląstelių (raudoni branduoliai) procentines dalis. Rezultatai pateikiami 22 pav.



22 pav. Dvigubo branduolių dažymo metodu vertinti gyvybingumo rodikliai, išreikšti procentais, esant 5 μ M bisfosfonatų ir 10 μ g / ml egzosomų koncentracijoms (kontrolė – 0 μ M bisfosfonatų, 0 μ g / ml egzosomų).

Veikta 48 val. Vertintas gyvybingumas su fluorescenciniu mikroskopu. Pateikiami 3 nepriklausomų eksperimentų vidurkiai \pm standartinis nuokrypis, * žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$; ~ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su vien tik atitinkamu bisfosfonatu paveiktu preparatu, kai $p < 0,05$; ^ žymi statistinį skirtumą tarp bisfosfonatais ir egzosomomis paveiktas ląsteles, kai $p < 0,05$. Rezultatai analizuoti programiniu paketu *SigmaPlot 13.5*.

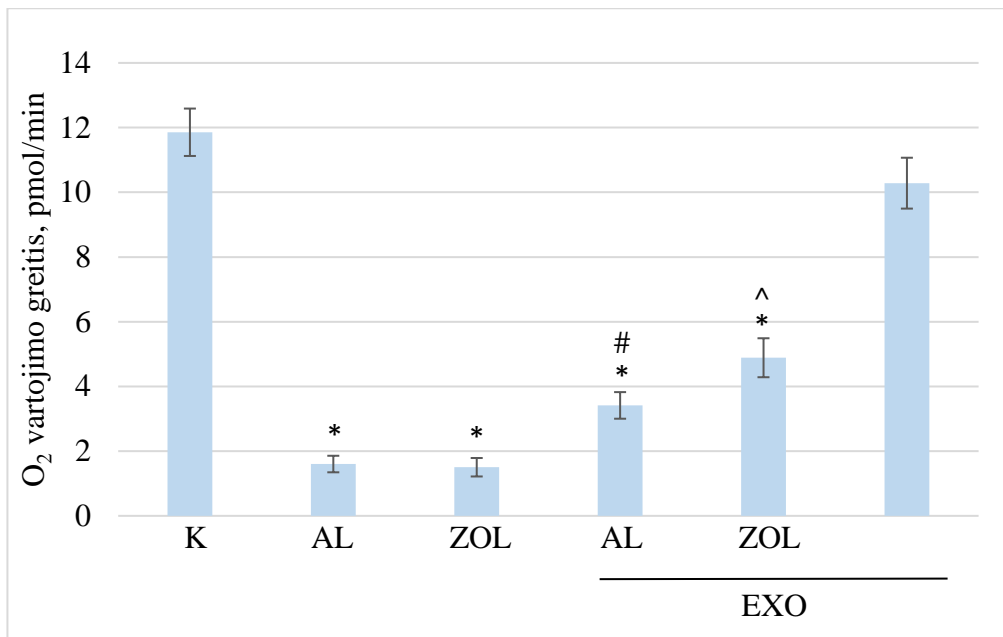
Grafike, pavaizduotame 22 pav., matyti, kad nepaveiktų osteoblastų (kontrolės) gyvybingumas buvo $96,14 \pm 1,01$ %. Tuo tarpu alendronato ir zoledronato paveiktų preparatų gyvybingumai statistiškai reikšmingai skyrėsi atitinkamai $70,1 \pm 1,24$ % ir $67,14 \pm 1,99$ %, lyginant su neveiktų ląstelių gyvybingumu. Egzosomų priedas statistiškai reikšmingai padidino gyvybingumą lyginant su bisfosfonatų veiktais osteoblastais nuo 10 (zoledronato atveju) iki 12 % (alendronato atveju). O paveikus ASC/TERT1 egzozomomis, pastebimas nedidelis statistiškai nereikšmingas gyvybingumo sumažėjimas iki $89,9 \pm 2,45$ %.

Lyginant metabolinio aktyvumo ir gyvybingumo rezultatus tarpusavyje nustatyta, kad osteoblastų, veiktų bisfosfonatais, metabolinis aktyvumas ir gyvybingumas statistiškai reikšmingai sumažėjo panašiai lyginant su kontrole, vadinasi, metabolinio aktyvumo sumažėjimas buvo sąlygojamas ląstelių žūties. PrestoBlue metabolizmo aktyvumo vertinimo metodu buvo nustatyta, kad egzozomų preparatai statistikai reikšmingai sumažino ląstelių gyvybingumą iki 10 %, tuo tarpu, gyvybingumo vertinimo fluorescencinės mikroskopijos metodu gauti rezultatai statistiškai reikšmingo pokyčio neparodė. Tai leidžia manyti, kad kamieninių ląstelių egzozomų preparatai osteoblastų gyvybingumo neveikia, tačiau sukelia jų metabolizmo pasikeitimus.

Palyginus egzozomų poveikį bisfosfonatų sukeltamų pažeidimų dydžiui metabolizmo vertinant aktyvumą ir gyvybingumą, nustatyta, kad paveikus ląsteles egzozomomis, tiek metabolinis aktyvumas, tiek gyvybingumas statistiškai reikšmingai padidėjo. Tokių kamieninių ląstelių egzozomų regeneracijos rezultatų ir buvo tikėtasi. Žinoma, kad bisfosfonatų poveikyje padidėjęs reaktyvių deguonies rūšių (ROS) generavimas gali sukelti oksidacinį stresą ir taip skatinti osteoblastų apoptozę [132]. O iš riebalinio tipo kamieninių ląstelių išskirtos egzozomos sumažina IL-1 β sukeltą oksidacinį stresą. Taip pat pastebėtas egzozomų priešuždegiminis poveikis osteoblastams, mažinant IL-6 ir TNF α reguliavimą [133].

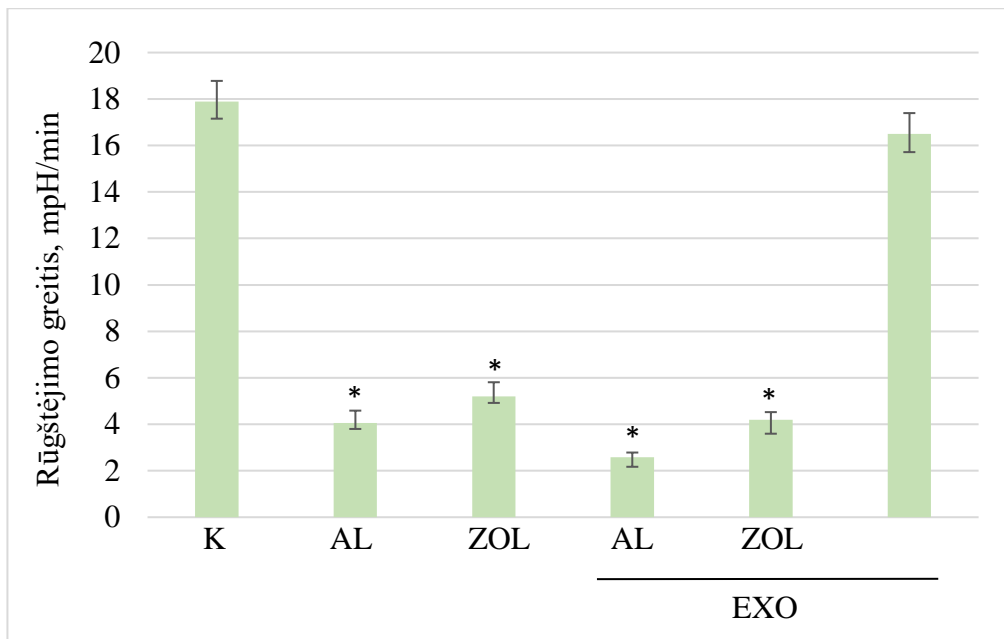
3.5. hFOB 1.19 ląstelių, paveiktų bisfosfonatų ir egzozomų preparatais, energetinio profilio nustatymas

Yra duomenų, kad bisfosfonatai gali daryti įtaką ląstelių energetiniam metabolizmui ir sukelti apoptozę nuo mitochondrijų funkcionalumo priklausančiu keliu [134]. Todėl vienas iš šio darbo uždavinių buvo ištirti, ar bisfosfonatai pažeidžia osteoblastų mitochondrijų funkcijas ir jei taip, ar nuo šių pažeidimų gali apsaugoti kamieninių ląstelių egzozomos. Gauti rezultatų duomenys pateikiami 23 ir 24 pav.



23 pav. Mitochondrijų aktyvumo nustatymas, esant 5 μ M bisfosfonatų ir 10 μ g / ml egzomosų koncentracijoms (kontrolė – 0 μ M bisfosfonatų, 0 μ g / ml egzomosų). Veikta 48 val. Vertintas gyvybingumas su *Seahorse* analizatoriumi. Pateikiami 3 nepriklausomų eksperimentų vidurkiai \pm standartinis nuokrypis, * žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$; ^ žymi statistinį skirtumą lyginant su egzomosų paveiktomis ląstelėmis, kai $p < 0,01$, # žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su egzomosų paveiktomis ląstelėmis, kai $p < 0,001$. Rezultatai analizuoti programiniu paketu *Wave*.

Kaip matome 23 pav., abu tiriami bisfosfonatai ženkliai sumažino mitochondrijų kvėpavimo (deguonies sunaudojimo) greitį – tiek alendronatu, tiek zoledronatu paveiktuose pavyzdžiuose jis tesiekė vos 13 procentų kontrolės aktyvumo. Kai terpėje kartu su alendronatu kartu buvo ir egzosomos, deguonies suvartojimo greitis reikšmingai padidėjo iki 29 procentų kontrolės aktyvumo. Nuo zoledronato sukeliama mitochondrijų pažaidų kamieninių ląstelių egzosomos apsaugojo dar efektyviau – kvėpavimo greitis šiuose pavyzdžiuose pakilo iki 41 procento kontrolės lygio. Vis dėlto, kamieninių ląstelių egzosomos apsaugojo osteoblastų mitochondrijas tik iš dalies, nes kvėpavimo greitis bisfosfonatais ir egzosomomis kartu paveiktuose pavyzdžiuose išliko gerokai mažesnis negu nepaveiktose kontrolinėse ląstelėse. Kamieninių ląstelių egzomosų preparatai reikšmingo poveikio osteoblastų mitochondrijų funkcijoms neturėjo.



24 pav. Glikolizės aktyvumo nustatymas, esant 5 μ M bisfosfonatų ir 10 μ g / ml egzosomų koncentracijoms (kontrolė – 0 μ M bisfosfonatų, 0 μ g / ml egzosomų). Veikta 48 val. Vertintas gyvybingumas su *Seahorse* analizatoriumi. Pateikiami 3 nepriklausomų eksperimentų vidurkiai \pm standartinis nuokrypis, * žymi statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant su kontrole, kai $p < 0,001$. Rezultatai analizuoti programiniu paketu *Wave*.

Iš grafiko (žr. 24 pav.) matyti, kad tiek tiriamas alendronatas, tiek zoledronatas ženkliai sumažino glikolizės aktyvumą atitinkamai iki 22 ir 27 procentų lyginant su neveiktomis ląstelėmis. Tačiau kamieninių ląstelių egzosomų apsauginis poveikis nepastebimas, jos netgi parodė mažesnę glikolizės aktyvumo vertę lyginant su bisfosfonatų veiktomis ląstelėmis. Pastebėta, kad tiek veiktų bisfosfonatais, tiek papildomai stimuliuotų egzosomomis rūgštėjimo vertės ne itin skyrėsi, tad galime sakyti, kad preparatų poveikis glikolizei nenustatytas.

Išvados

1. Veikiant osteoblastus skirtingų koncentracijų bisfosfonatų (alendronato ir zoledronato) preparatais, buvo sukurtas osteonekrozės modelis *in vitro*. Nustatytas statistiškai reikšmingai citotoksiškai osteoblastų gyvybingumą veikiantis indikacijos laikas – 48 valandos ir bisfosfonatų dozė – 5 μM .
2. Iš riebalinio tipo kamieninių ląstelių išskirtų egzosomų mėginyje 95 proc. dalelių buvo nuo 79 iki 190 nm dydžio, o tai atitinka literatūroje aprašytą egzosomų dydį.
3. Kamieninių ląstelių egzosomos per 48 valandas reikšmingai padidina osteoblastų, paveiktų bisfosfonatų preparatais, metabolinį aktyvumą ir gyvybingumą. Egzosomos pilnai atstato alendronato paveiktų osteoblastų metabolinį aktyvumą, ir iš dalies atstato osteoblastų, veiktų zoledronato preparatais, metabolinį aktyvumą.
4. Bisfosfonatai ženkliai sumažina osteoblastų mitochondrinį ir glikolitinį aktyvumą. Kamieninių ląstelių egzosomos iš dalies sumažina mitochondrijų pažaidas, tačiau reikšmingo poveikio glikolizės pažaidų dydžiui neturi.

Literatūros sąrašas

1. GUPTA, Mohit ir Neha GUPTA. Bisphosphonate Related Jaw Osteonecrosis. [interaktyvus]. 2020, 1–14 [žiūrėta. 2021-05-11]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534771/>
2. VILLA, Alessandro, Stefano CASTIGLIONI, Alessandro PERETTI, Marco OMODEI, B. GIOVANNI FERRIERI ir Silvio ABATI. Osteoporosis and Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw Bone. *ISRN Rheumatology* [interaktyvus]. 2011, 2011, 1–4 [žiūrėta. 2021-05-11]. ISSN 2090-5467. Available at: doi:10.5402/2011/654027
3. FLIEFEL, Riham, M. TRÖLTZSCH, J. KÜHNISCH, M. EHRENFELD ir S. OTTO. *Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: A systematic review* [interaktyvus]. B.m.: Churchill Livingstone. 1. gegužės 2015. ISSN 13990020. Available at: doi:10.1016/j.ijom.2015.01.026
4. BASSO, Fernanda G., Ana Paula SILVEIRA TURRIONI, Josimeri HEBLING ir Carlos A. DE SOUZA COSTA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology* [interaktyvus]. 2013, 59(6), 534–541 [žiūrėta. 2021-05-31]. ISSN 0304324X. Available at: doi:10.1159/000351194
5. ZANG, Xiaolong, Linhai HE, Lu ZHAO, Yang HE, E. XIAO ir Yi ZHANG. Adipose-derived stem cells prevent the onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw through transforming growth factor β -1-mediated gingival wound healing. *Stem Cell Research and Therapy* [interaktyvus]. 2019, 10(1), 1–13 [žiūrėta. 2021-05-31]. ISSN 17576512. Available at: doi:10.1186/s13287-019-1277-y
6. FLEURY, Audrey, Maria Carmen MARTINEZ ir Soazig LE LAY. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Frontiers in Immunology* [interaktyvus]. 2014, 5(AUG). ISSN 16643224. Available at: doi:10.3389/fimmu.2014.00370
7. KALLURI, Raghu ir Valerie S. LEBLEU. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* [interaktyvus]. 2020, 367(6478). ISSN 10959203. Available at: doi:10.1126/science.aau6977
8. TAN, S. H.S., J. R.Y. WONG, S. J.Y. SIM, C. K.E. TJIO, K. L. WONG, J. R.J. CHEW, J. H.P. HUI ir W. S. TOH. Mesenchymal stem cell exosomes in bone regenerative strategies—a systematic review of preclinical studies. *Materials Today Bio* [interaktyvus]. 2020, 7, 100067 [žiūrėta. 2021-05-11]. ISSN 25900064. Available at: doi:10.1016/j.mtbio.2020.100067
9. INDAP, Madhavi M ir Shubhada V CHIPLUNKAR. Marine Natural Products : New Avenue in Treatment of Osteoporosis Marine Natural Products : New Avenue in Treatment of Osteoporosis [interaktyvus]. 2017, (November). Available at: doi:10.3389/fmars.2017.00384
10. BUSSARD, Karen M ir Alexis D KOLB. The Bone Extracellular Matrix as an Ideal Milieu for Cancer Cell Metastases. *Cancers*. 2019, 11(1020), 1–27.
11. QIN, A, T S CHENG, N J PAVLOS, Z LIN, K R DAI ir M H ZHENG. V-ATPases in osteoclasts : Structure , function and potential inhibitors of bone resorption. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* [interaktyvus]. 2012, 44(9), 1422–1435. ISSN 1357-2725. Available at: doi:10.1016/j.biocel.2012.05.014
12. HENRIKSEN, Kim, Jeppe GRAM, Sophie SCHALLER, Bjarne H DAHL, Morten H DZIEGIEL, Jens BOLLERSLEV ir Morten A KARSDAL. Characterization of Osteoclasts from Patients Harboring a G215R Mutation in CIC-7 Causing Autosomal Dominant Osteopetrosis Type II. *The*

- American Journal of Pathology* [interaktyvus]. 2004, 164(5), 1537–1545. ISSN 0002-9440. Available at: doi:10.1016/S0002-9440(10)63712-1
13. VÄÄNÄNEN, H Kalervo, Haibo ZHAO, Mika MULARI ir Jussi M HALLEEN. The cell biology of osteoclast function. 2000, 381, 377–381.
 14. ALEKNA, V, M TAMULAITIENĖ ir A KRASAUSKIENĖ. Osteoporozės diagnostikos ir gydymo metodika. *Gerontologija*. 2011, 12(2), 110–130.
 15. FITZPATRICK, Lorraine A. Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clinic Proceedings* [interaktyvus]. 2002, 77(5), 453–468. ISSN 00256196. Available at: doi:10.4065/77.5.453
 16. PANDAY, Keshav, Amitha GONA ir Mary Beth HUMPHREY. Medication-induced osteoporosis: Screening and treatment strategies. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* [interaktyvus]. 2014, 6(5), 185–202. ISSN 17597218. Available at: doi:10.1177/1759720X14546350
 17. ABRAHAMSEN, Bo, Dorte BRASK-LINDEMANN, Katrine Hass RUBIN ir Peter SCHWARZ. A review of lifestyle, smoking and other modifiable risk factors for osteoporotic fractures. *BoneKEy Reports* [interaktyvus]. 2014, 3(July), 1–7. ISSN 2047-6396. Available at: doi:10.1038/bonekey.2014.69
 18. Lietuvos gydytojų žurnalas. *emedicina* [interaktyvus]. 2010. Available at: http://www.emedicina.lt/lt/zurnalai/lietuvos_gydytoju_zurnalas_2010/8/netinkamo_osteoporozes_gydymo_kaina_didele_kartotiniu_luziu_rizika.html
 19. Lietuvos gyventojų sergamumo ataskaitos (leidiniai). *Higienos institutas* [interaktyvus]. Available at: <http://www.hi.lt/lt/lietuvos-gyventoju-sveikata-ir-sveikatos-prieziuros-istaigu-veikla-2013-m.html>
 20. KENNEL, Kurt A. ir Matthew T. DRAKE. Adverse effects of bisphosphonates: Implications for osteoporosis management. *Mayo Clinic Proceedings* [interaktyvus]. 2009, 84(7), 632–638. ISSN 00256196. Available at: doi:10.4065/84.7.632
 21. FRANCIS, Marion D, R Graham G RUSSELL, Herbert FLEISCH ir Marion D FRANCIS. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *American Association for the Advancement of Science*. 1969, 165(3899), 1264–1266.
 22. FLEISCH, H., G. G. RUSSELL ir F. STRAUMANN. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature Publishing Group*. 1966.
 23. CHAMBERS, James P, D PH, San ANTONIO, Jennifer SEKOWSKI ir D PH. A Pyrophosphate Based Energy Generating Module A PYROPHOSPHATE BASED ENERGY GENERATING MODULE The University of Texas at San Antonio Aberdeen Proving Ground , MD 21010. 2014, (July).
 24. RASMUSSEN, Lars ir Jahan ABTAHI. Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw : An Update on Pathophysiology , Risk Factors , and Treatment. *International Journal of Dentistry* [interaktyvus]. 2014, 2014, 1–9. Available at: doi:10.1155/2014/471035
 25. FLEISCH, H, G. G RUSSEL ir M. D FRANCIS. Diphosphonates Inhibit Hydroxyapatite Dissolution in vitro and Bone Resorption in Tissue Culture and in vivo. *Science*. 1969, 165(3899), 1262–1264.
 26. RUSSELL, R. Graham G. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* [interaktyvus]. 2011, 49(1), 2–19. ISSN 87563282. Available at: doi:10.1016/j.bone.2011.04.022

27. RUSSELL, R G G ir M J ROGERS. Bisphosphonates : From the Laboratory to the Clinic and Back Again. 1999, 25(1), 97–106.
28. ROGERS, Michael J, D PH, S GORDON, D PH, H L BENFORD, B SC, S P LUCKMAN ir D PH. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. sine anno.
29. RUSSELL, R Graham G, Michael J ROGERS, Julie C FRITH, Steven P LUCKMAN, Fraser P COXON, Helena L BENFORD, Peter I CROUCHER, Claire SHIPMAN, Herbert A FLEISCH ir Russell E T AL. The Pharmacology of Bisphosphonates and New Insights Into Their Mechanisms of Action. *Bone and mineral research*. 1999, 14, 53–65.
30. EPSTEIN, S ir M ZAIDI. Biological properties and mechanism of action of ibandronate : Application to the treatment of osteoporosis [interaktyvus]. 2005, 37, 433–440. Available at: doi:10.1016/j.bone.2005.05.007
31. DRAKE, Matthew T., Bart L. CLARKE ir Sundeep KHOSLA. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical. *Mayo Clinic Proceedings* [interaktyvus]. 2008, 83(9), 1032–1045. ISSN 00256196. Available at: doi:10.4065/83.9.1032
32. EBETINO, F. H., A. V. BAYLESS, J. AMBURGEY, K. J. IBBOTSON, S. DANSEREAU ir A. EBRAHIMPOUR. Elucidation of a Pharmacophore for the Bisphosphonate Mechanism of Bone Antiresorptive Activity. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* [interaktyvus]. 1996, 109(1–4), 217–220. Available at: doi:10.1080/10426509608545129
33. MIGLIACCIO, Silvia, Marina BRAMA ir Giovanni SPERA. The differential effects of bisphosphonates, SERMS (selective estrogen receptor modulators), and parathyroid hormone on bone remodeling in osteoporosis. *Clinical interventions in aging* [interaktyvus]. 2007, 2(1), 55–64. ISSN 11769092. Available at: doi:10.2147/ciia.2007.2.1.55
34. FOGELMAN, Ignac, Rodney G BESSENT, TURNER JOHN G, Dennis L CITRIN, Iain T BOYLE ir William R GREIG. The use of whole-body retention of Tc-99m diphosphonate in the diagnosis of metabolic bone disease. *Nuclear Medicine*. 1978, 19(3), 270–276.
35. ROELOFS, Anke J, Frank H EBETINO, Alfred A RESZKA, R Graham G RUSSELL, Michael J ROGERS ir Gideon Rodan HERBIE. Bisphosphonates Mechanisms of Action HISTORY OF BIPHOSPHONATE DEVELOPMENT FOR USE IN BONE. *Bone*. 2008, 1737–1767.
36. MAURIZI, Antonio ir Nadia RUCCI. The osteoclast in bone metastasis: Player and target. *Cancers* [interaktyvus]. 2018, 10(7). ISSN 20726694. Available at: doi:10.3390/cancers10070218
37. ROSSINI, Maurizio, Giovanni ORSOLINI, Silvano ADAMI, Vidya KUNNATHULLY ir Davide GATTI. Osteoporosis treatment : why ibandronic acid ? 2013, 1371–1381.
38. RUSSELL, R Graham G. From Bench to Bedside. *Annals of New York Academy of Sciences* [interaktyvus]. 2006, 401(0), 367–401. Available at: doi:10.1196/annals.1346.041
39. CHAUGULE, Sachin R, Madhavi M INDAP ir Shubhada V CHIPLUNKAR. Marine Natural Products : New Avenue in Treatment of Osteoporosis. *Frontiers in Marine Science* [interaktyvus]. 2017, 4(384), 1–15. Available at: doi:10.3389/fmars.2017.00384
40. FERNANDEZ, David, Joaquin CASTRO-ORTEGA ir Juan FRAU. Human farnesyl pyrophosphate synthase inhibition by nitrogen bisphosphonates : A 3D-QSAR study Human farnesyl pyrophosphate synthase inhibition by nitrogen bisphosphonates : a 3D-QSAR study. *Computei-Aided Molecular Design* [interaktyvus]. 2013, 27, 739–754. Available at: doi:10.1007/s10822-013-9674-2

41. DUNFORD, James E, Aaron A KWAASI, Michael J ROGERS, Bobby L BARNETT, Frank H EBETINO, R Graham G RUSSELL, Udo OPPERMANN ir Kathryn L KAVANAGH. Structure – Activity Relationships Among the Nitrogen Containing Bisphosphonates in Clinical Use and Other Analogues : Time-Dependent Inhibition of Human Farnesyl Pyrophosphate Synthase. *Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2008, 51(7), 2187–2195. Available at: doi:10.1021/jm7015733
42. RIDLEY, A I, H F PATERSON, C L JOHNSTON, D DIEKMANN ir A HALL. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling Cdc25 is a nuclear protein expressed cons. *Cell*. 1992, 70(November), 401–410.
43. SINENSKY, Michael. Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2000, 1484, 93–106.
44. ZHANG, Yonghui, Rong CAO, Fenglin YIN, Michael P HUDOCK, Rey-ting GUO, Sujoy MUKHERJEE, Yi-gui GAO, Howard ROBINSON, Yongcheng SONG, Joo HWAN, Kyle BERGAN, Annette LEON, Lauren CASS, Amanda GODDARD, Ting-kai CHANG, Yang LIN, Ermond Van BEEK, Socrates PAPAPOULOS, Andrew H WANG, Mitsuo OCHI, Dushyant MUKKAMALA ir Eric OLDFIELD. Lipophilic Bisphosphonates as Dual Farnesyl/Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Inhibitors: An X-ray and NMR Investigation. *AM Chem Soc* [interaktyvus]. 2010, 131(14), 5153–5162. Available at: doi:10.1021/ja808285e.Lipophilic
45. OHNO, K, K MORI, M ORITA ir M TAKEUCHI. Computational Insights into Binding of Bisphosphates to Farnesyl Pyrophosphate Synthase. *Current Medivinal Chemistry*. 2011, 18(2), 220–233.
46. TSOUNPRA, Maria K., Joao R. MUNIZ, Bobby L. BARNETT, Aaron A. KWAASI, Ewa S. PILKA, Kathryn L. KAVANAGH, Artem EVDOKIMOV, Richard L. WALTER, Frank VON DELFT, Frank H. EBETINO, Udo OPPERMANN, R. Graham G. RUSSELL ir James E. DUNFORD. The inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase by nitrogen-containing bisphosphonates. Elucidating the role of active site threonine 201 and tyrosine 204 residues using enzyme mutants. *Bone* [interaktyvus]. 2015, 81, 478–486 [žiūrėta. 2021-06-01]. ISSN 87563282. Available at: doi:10.1016/j.bone.2015.08.020
47. MODI, Ankita, Shiva SAJJAN, E. MICHAEL LEWIECKI, Steven T. HARRIS ir Jessica PAPAPOULOS WEAVER. Relationship between Gastrointestinal Events and Compliance with Osteoporosis Therapy: An Administrative Claims Analysis of the US Managed Care Population. *Clinical Therapeutics* [interaktyvus]. 2016, 38(5), 1074–1080. ISSN 1879114X. Available at: doi:10.1016/j.clinthera.2016.03.027
48. GEORGE, Estee L., Yi Ling LIN ir Marnie M. SAUNDERS. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a mechanobiology perspective. *Bone Reports* [interaktyvus]. 2018, 8(October 2016), 104–109. ISSN 23521872. Available at: doi:10.1016/j.bonr.2018.03.003
49. MARX, Paul. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* [interaktyvus]. 2003, 61, 1115–118. ISSN 0099183X. Available at: doi:10.1080/15426432.1979.10383302
50. OHTA, Keiichi ir Hitoshi YOSHIMURA. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *American Journal of the Medical Sciences* [interaktyvus]. 2014, 72, 1938–1956. ISSN 15382990. Available at: doi:10.1016/j.amjms.2020.04.009

51. WAT, Winnie. Current Controversies on the Pathogenesis of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Dentistry Journal* [interaktyvus]. 2016, 4(4), 38. ISSN 2304-6767. Available at: doi:10.3390/dj4040038
52. CHANG, J., A. E. HAKAM ir L. K. MCCAULEY. Current Understanding of the Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaw. *Current Osteoporosis Reports* [interaktyvus]. 2018, 16(5), 584–595. ISSN 15442241. Available at: doi:10.1007/s11914-018-0474-4
53. CORNISH, Jillian, Usha BAVA, Karen E. CALLON, Jizhong BAI, Dorit NAOT ir Ian R. REID. Bone-bound bisphosphonate inhibits growth of adjacent non-bone cells. *Bone* [interaktyvus]. 2011, 49(4), 710–716. ISSN 87563282. Available at: doi:10.1016/j.bone.2011.07.020
54. ALLEN, Matthew R. ir David B. BURR. Mandible Matrix Necrosis in Beagle Dogs After 3 Years of Daily Oral Bisphosphonate Treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [interaktyvus]. 2008, 66(5), 987–994. ISSN 02782391. Available at: doi:10.1016/j.joms.2008.01.038
55. CHTIOUI, Haithem, Faiza LAMINE ir Riadh DAGHFOUS. Teriparatide therapy for osteonecrosis of the jaw. *New England Journal of Medicine* [interaktyvus]. 2011, 364(11), 1081–1082. ISSN 15334406. Available at: doi:10.1056/NEJMc1100730
56. ALARANJI, Ghassan, Amandeep GOYAL ir Pankaj BANSAL. *Bisphosphonate Toxicity* [interaktyvus]. B.m.: StatPearls Publishing, 2020 [žiūrėta. 2021-05-24]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562331/>
57. MALDEN, Nick ir Victor LOPES. An epidemiological study of alendronate-related osteonecrosis of the jaws. A case series from the south-east of Scotland with attention given to case definition and prevalence. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* [interaktyvus]. 2012, 30(2), 171–182. ISSN 09148779. Available at: doi:10.1007/s00774-011-0299-z
58. SAAD, F., J. E. BROWN, C. VAN POZNAK, T. IBRAHIM, S. M. STEMMER, A. T. STOPECK, I. J. DIEL, S. TAKAHASHI, N. SHORE, D. H. HENRY, C. H. BARRIOS, T. FACON, F. SENEAL, K. FIZAZI, L. ZHOU, A. DANIELS, P. CARRIÈRE ir R. DANSEY. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: Integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Annals of Oncology* [interaktyvus]. 2012, 23(5), 1341–1347. ISSN 09237534. Available at: doi:10.1093/annonc/mdr435
59. KRISHNAN, Anant, Atilla ARSLANOGLU, Nadir YILDIRM, Richard SILBERGLEIT ir Nafi AYGUN. Imaging findings of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with emphasis on early magnetic resonance imaging findings. *Journal of Computer Assisted Tomography* [interaktyvus]. 2009, 33(2), 298–304. ISSN 03638715. Available at: doi:10.1097/RCT.0b013e31817e4986
60. RESZKA, Alfred A., Judit HALASY-NAGY ir Gideon A. RODAN. Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation. *Molecular Pharmacology* [interaktyvus]. 2001, 59(2), 193–202. ISSN 0026895X. Available at: doi:10.1124/mol.59.2.193
61. LANDESBURG, Regina, Matthew COZIN, Serge CREMERS, Victoria WOO, Stavroula KOUSTENI, Satrajit SINHA, Lee Ann GARRETT-SINHA ir Srikala RAGHAVAN. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [interaktyvus]. 2008, 66(5), 839–847. ISSN 02782391. Available at: doi:10.1016/j.joms.2008.01.026

62. AMIN, D., S. A. CORNELL, S. K. GUSTAFSON, S. J. NEEDLE, J. W. ULLRICH, G. E. BILDER ir M. H. PERRONE. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*. 1992, 33(11), 1657–1663. ISSN 00222275.
63. ROGERS, Michael J., Kattya M. CHILTON, Fraser P. COXON, John LAWRY, M. Olivia SMITH, Sunita SURI ir R. Graham G. RUSSEL. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *Journal of Bone and Mineral Research* [interaktyvus]. 1996, 11(10), 1482–1491. ISSN 0884-0431. Available at: doi:10.1002/jbmr.5650111015
64. THOMPSON, Keith, Michael J. ROGERS, Fraser P. COXON ir Julie C. CROCKETT. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Molecular Pharmacology* [interaktyvus]. 2006, 69(5), 1624–1632. ISSN 0026895X. Available at: doi:10.1124/mol.105.020776
65. GEBARA, Shereen Nabhani ir Hiba MOUBAYED. Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients taking bisphosphonates. *American Journal of Health-System Pharmacy* [interaktyvus]. 2009, 66(17), 1541–1547. ISSN 10792082. Available at: doi:10.2146/ajhp080251
66. NAIR, Sean P., Sajeda MEGHJI, Michael WILSON, Krisanavane REDDI, Peter WHITE ir Brian HENDERSON. Bacterially induced bone destruction: Mechanisms and misconceptions. *Infection and Immunity* [interaktyvus]. 1996, 64(7), 2371–2380. ISSN 00199567. Available at: doi:10.1128/iai.64.7.2371-2380.1996
67. BELIBASAKIS, Georgios N., Nagihan BOSTANCI, Ahmed HASHIM, Anders JOHANSSON, Joseph ADUSE-OPOKU, Michael A. CURTIS ir Francis J. HUGHES. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: A putative role of the Arg-gingipains. *Microbial Pathogenesis* [interaktyvus]. 2007, 43(1), 46–53. ISSN 08824010. Available at: doi:10.1016/j.micpath.2007.03.001
68. HAN, X., X. LIN, A. R. SELIGER, J. EASTCOTT, T. KAWAI ir M. A. TAUBMAN. Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* [interaktyvus]. 2009, 24(3), 190–196. ISSN 09020055. Available at: doi:10.1111/j.1399-302X.2008.00494.x
69. MUTIJIMA, Eugène, Viviane DE MAERTELAER, Manu DEPREZ, Michel MALAISE ir Jean Philippe HAUZEUR. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: Its specificity and its distribution. *Clinical Rheumatology* [interaktyvus]. 2014, 33(12), 1791–1795 [žiūrėta. 2021-05-28]. ISSN 14349949. Available at: doi:10.1007/s10067-014-2607-1
70. DENG, Shuang, Jian Lin ZHOU, Hong Song FANG, Zhi Gang NIE, Sen CHEN ir Hao PENG. Sesamin Protects the Femoral Head From Osteonecrosis by Inhibiting ROS-Induced Osteoblast Apoptosis in Rat Model. *Frontiers in Physiology* [interaktyvus]. 2018, 9, 1787 [žiūrėta. 2021-05-28]. ISSN 1664042X. Available at: doi:10.3389/fphys.2018.01787
71. SHARES, Brianna H., Melanie BUSCH, Noelle WHITE, Laura SHUM ir Roman A. ELISEEV. Active mitochondria support osteogenic differentiation by stimulating-Catenin acetylation. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 293(41), 16019–16027. ISSN 1083351X. Available at: doi:10.1074/jbc.RA118.004102
72. WAN, Jason T., Douglas M. SHEELEY, Martha J. SOMERMAN ir Janice S. LEE. Mitigating osteonecrosis of the jaw (ONJ) through preventive dental care and understanding of risk factors.

- Bone Research* [interaktyvus]. 2020, 8(1). ISSN 20956231. Available at: doi:10.1038/s41413-020-0088-1
73. TILL, J E ir E A MCCULLOCH. A Direct Measurement of the Radiation Sensivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* [interaktyvus]. 1961, 14, 213–222. Available at: papers2://publication/uuid/1C2BF1A2-5C3B-4B1D-BD9C-A78A479292E4
74. BECKER, A. J., E. A. MCCULLOCH ir J. E. TILL. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* [interaktyvus]. 1963, 197, 452–454. Available at: <http://www.nature.com.ezp-prod1.hul.harvard.edu/nature/journal/v197/n4866/pdf/197452a0.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/E18DCA61-909A-4727-BBBE-677F400CB5A3>
75. MCCULLOCH, Ernest A ir James E TILL. Perspectives on the properties of stem cells. *Nature medicine*. 2005, 11(10), 1026–1028.
76. GIEZEN, Thijs J., Aukje K. MANTEL-TEEUWISSE, Sabine M.J.M. STRAUS, Huub SCHELLEKENS, Hubert G.M. LEUFKENS ir Antoine C.G. EGBERTS. Safety-related regulatory actions for biologicals approved in the United States and the European Union. *JAMA - Journal of the American Medical Association* [interaktyvus]. 2008, 300(16), 1887–1896. ISSN 00987484. Available at: doi:10.1001/jama.300.16.1887
77. EUROPOS PARLAMENTO IR TARYBOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1394/2007 dėl pažangiosios terapijos vaistinių preparatų, iš dalies keičiantis Direktyvą 2001/83/EB ir Reglamentą (EB) Nr. 726/2004. *EUROPOS PARLAMENTAS IR EUROPOS SAJUNGOS TARYBA*. 2007, 1–17. ISSN 0031-9015.
78. GERLIER, Laetitia, Mark LAMOTTE, Micheline WILLE, Peter C. KREUZ, Johan VANLAUWE, Dominique DUBOIS ir Francois M. MEURGEY. The cost utility of autologous chondrocytes implantation using ChondroCelect® in symptomatic knee cartilage lesions in Belgium. *PharmacoEconomics* [interaktyvus]. 2010, 28(12), 1129–1146. ISSN 11707690. Available at: doi:10.2165/11584920-000000000-00000
79. HANNA, Eve, Cécile RÉMUZAT, Pascal AUQUIER ir Mondher TOUMI. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *Journal of Market Access & Health Policy* [interaktyvus]. 2016, 4, 1–10. ISSN 2001-6689. Available at: doi:10.3402/jmahp.v4.31036
80. NIH; FDA. Klinikiniai bandymai. *clinicaltrials.gov* [interaktyvus]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Stem+Cell&term=&cntry=&state=&city=&dist=>
81. ZHANG, Lijie, Jerry HU ir Kyriacos A. ATHANASIOU. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* [interaktyvus]. 2009, 37(1–2), 1–57. ISSN 0278940X. Available at: doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v37.i1-2.10
82. BOYER, Laurie A., Ihn Lee TONG, Megan F. COLE, Sarah E. JOHNSTONE, Stuart S. LEVINE, Jacob P. ZUCKER, Matthew G. GUENTHER, Roshan M. KUMAR, Heather L. MURRAY, Richard G. JENNER, David K. GIFFORD, Douglas A. MELTON, Rudolf JAENISCH ir Richard A. YOUNG. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* [interaktyvus]. 2005, 122(6), 947–956. ISSN 00928674. Available at: doi:10.1016/j.cell.2005.08.020
83. LI, Ming, Dong ZHANG, Yi HOU, Lihong JIAO, Xing ZHENG ir Wei Hua WANG. Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Molecular Reproduction and*

- Development* [interaktyvus]. 2003, 65(4), 429–434. ISSN 1040452X. Available at: doi:10.1002/mrd.10301
84. BONGSO, Ariff ir Eng Hin LEE. *Stem Cells: from Bench to Bedside* [interaktyvus]. 2005. ISBN 981-256-126-9. Available at: www.stemcell8.cn
85. YU, Bo, Xiaomin ZHANG ir Xiaorong LI. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2014, 15(3), 4142–4157. ISSN 14220067. Available at: doi:10.3390/ijms15034142
86. KORDELAS, L., V. REBMANN, A. K. LUDWIG, S. RADTKE, J. RUESING, T. R. DOEPFNER, M. EPPLE, P. A. HORN, D. W. BEELEN ir B. GIEBEL. MSC-derived exosomes: A novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* [interaktyvus]. 2014, 28(4), 970–973. ISSN 14765551. Available at: doi:10.1038/leu.2014.41
87. PAN, Bin Tao ir Rose M. JOHNSTONE. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* [interaktyvus]. 1983, 33(3), 967–978. ISSN 00928674. Available at: doi:10.1016/0092-8674(83)90040-5
88. JOHNSTONE, R. M., M. ADAM, J. R. HAMMOND, L. ORR ir C. TURBIDE. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 1987, 262(19), 9412–9420. ISSN 00219258.
89. RAPOSO, G, HW NIJMAN, W STOORVOGEL, R LIEJENDEKKER, CV HARDING, CJ MELIEF ir HJ GEUZE. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. *Journal of Experimental Medicine*. 1996, 183, 1161–1172.
90. YU, Li Li, Jing ZHU, Jin Xia LIU, Feng JIANG, Wen Kai NI, Li Shuai QU, Run Zhou NI, Cui Hua LU ir Ming Bing XIAO. *A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples* [interaktyvus]. B.m.: Hindawi Limited. 2018. ISSN 23146141. Available at: doi:10.1155/2018/3634563
91. TURTURICI, Giuseppina, Rosaria TINNIRELLO, Gabriella SCONZO ir Fabiana GERACI. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: Advantages and disadvantages. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* [interaktyvus]. 2014, 306(7). ISSN 15221563. Available at: doi:10.1152/ajpcell.00228.2013
92. BALAJ, Leonora, Ryan LESSARD, Lixin DAI, Yoon Jae CHO, Scott L. POMEROY, Xandra O. BREAKEFIELD ir Johan SKOG. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications* [interaktyvus]. 2011, 2(1), 180–189. ISSN 20411723. Available at: doi:10.1038/ncomms1180
93. VALADI, Hadi, Karin EKSTRÖM, Apostolos BOSSIOS, Margareta SJÖSTRAND, James J. LEE ir Jan O. LÖTVALL. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* [interaktyvus]. 2007, 9(6), 654–659. ISSN 14657392. Available at: doi:10.1038/ncb1596
94. TAYLOR, Douglas D. ir Cicek GERCEL-TAYLOR. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* [interaktyvus]. 2008, 110(1), 13–21. ISSN 10956859. Available at: doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.033
95. AL-NEDAWI, Khalid, Brian MEEHAN, Johann MICALLEF, Vladimir LHOTAK, Linda MAY, Abhijit GUHA ir Janusz RAK. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology* [interaktyvus]. 2008, 10(5), 619–624. ISSN 14657392. Available at: doi:10.1038/ncb1725

96. DESROCHERS, Laura M., Marc A. ANTONYAK ir Richard A. CERIONE. Extracellular Vesicles: Satellites of Information Transfer in Cancer and Stem Cell Biology. *Developmental Cell* [interaktyvus]. 2016, 37(4), 301–309. ISSN 18781551. Available at: doi:10.1016/j.devcel.2016.04.019
97. HESSVIK, Nina Pettersen ir Alicia LLORENTE. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* [interaktyvus]. 2018, 75(2), 193–208. ISSN 14209071. Available at: doi:10.1007/s00018-017-2595-9
98. LUAN, Xin, Kanokwan SANSANAPHONGPRICHA, Ila MYERS, Hongwei CHEN, Hebao YUAN ir Duxin SUN. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery. *Acta Pharmacologica Sinica* [interaktyvus]. 2017, 38(6), 754–763. ISSN 17457254. Available at: doi:10.1038/aps.2017.12
99. KOPPERS-LALIC, Danijela, Marye M. HOGENBOOM, Jaap M. MIDDELDORP ir D. Michiel PEGTEL. Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery; A new approach in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [interaktyvus]. 2013, 65(3), 348–356. ISSN 0169409X. Available at: doi:10.1016/j.addr.2012.07.006
100. MATHIVANAN, Suresh, Hong JI ir Richard J. SIMPSON. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* [interaktyvus]. 2010, 73(10), 1907–1920. ISSN 18743919. Available at: doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006
101. SIMPSON, Richard J., Søren S. JENSEN ir Justin W.E. LIM. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* [interaktyvus]. 2008, 8(19), 4083–4099. ISSN 16159853. Available at: doi:10.1002/pmic.200800109
102. VAN DOMMELEN, Susan M., Pieter VADER, Samira LAKHAL, S. A.A. KOOIJMANS, Wouter W. VAN SOLINGE, Matthew J.A. WOOD ir Raymond M. SCHIFFELERS. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* [interaktyvus]. 2012, 161(2), 635–644. ISSN 01683659. Available at: doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.021
103. GIBBINGS, Derrick ir Olivier VOINNET. Control of RNA silencing and localization by endolysosomes. *Trends in Cell Biology* [interaktyvus]. 2010, 20(8), 491–501. ISSN 09628924. Available at: doi:10.1016/j.tcb.2010.06.001
104. YAMAGUCHI, Takehiro, Yasukatsu IZUMI, Yasuhiro NAKAMURA, Takanori YAMAZAKI, Masayuki SHIOTA, Soichi SANO, Masako TANAKA, Mayuko OSADA-OKA, Kenei SHIMADA, Katuyuki MIURA, Minoru YOSHIYAMA ir Hiroshi IWAO. Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* [interaktyvus]. 2015, 178, 239–246. ISSN 18741754. Available at: doi:10.1016/j.ijcard.2014.10.144
105. ZHOU, Ying, Huitao XU, Wenrong XU, Bingying WANG, Huiyi WU, Yang TAO, Bin ZHANG, Mei WANG, Fei MAO, Yongmin YAN, Shuo GAO, Hongbing GU, Wei ZHU ir Hui QIAN. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Research and Therapy* [interaktyvus]. 2013, 4(2). ISSN 17576512. Available at: doi:10.1186/scrt194
106. BASU, Joydeep ir John W. LUDLOW. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opinion on Biological Therapy* [interaktyvus]. 2016, 16(4), 489–506. ISSN 17447682. Available at: doi:10.1517/14712598.2016.1131976

107. GOLUB, Ellis E. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Seminars in immunopathology* [interaktyvus]. 2011, 33(5), 409–417. ISSN 18632300. Available at: doi:10.1007/s00281-010-0230-z
108. QIN, Yunhao, Lian WANG, Zhengliang GAO, Genyin CHEN ir Changqing ZHANG. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2016, 6, 1–11. ISSN 20452322. Available at: doi:10.1038/srep21961
109. INDER, Kerry L., Jayde E. RUELCKE, Lara PETELIN, Hyeongsun MOON, Eunju CHOI, James RAE, Antje BLUMENTHAL, Dietmar HUTMACHER, Nicholas A. SAUNDERS, Jennifer L. STOW, Robert G. PARTON ir Michelle M. HILL. Cavin-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation. *Journal of Extracellular Vesicles* [interaktyvus]. 2014, 3(1). ISSN 20013078. Available at: doi:10.3402/jev.v3.23784
110. HUYNH, N., L. VONMOSS, D. SMITH, I. RAHMAN, M. F. FELEMBAN, J. ZUO, W. J. RODY, K. P. MCHUGH ir L. S. HOLLIDAY. Characterization of regulatory extracellular vesicles from osteoclasts. *Journal of Dental Research* [interaktyvus]. 2016, 95(6), 673–679. ISSN 15440591. Available at: doi:10.1177/0022034516633189
111. QIN, Yunhao, Ruixin SUN, Chuanlong WU, Lian WANG ir Changqing ZHANG. Exosome: A novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2016, 17(5). ISSN 14220067. Available at: doi:10.3390/ijms17050712
112. SALOMON, Carlos, Jennifer RYAN, Luis SOBREVIA, Miharuru KOBAYASHI, Keith ASHMAN, Murray MITCHELL ir Gregory E. RICE. Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis. *PLoS ONE* [interaktyvus]. 2013, 8(7), 1–24. ISSN 19326203. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0068451
113. SAHOO, Susmita, Ekaterina KLYCHKO, Tina THORNE, Sol MISENER, Kathryn M. SCHULTZ, Meredith MILLAY, Aiko ITO, Ting LIU, Christine KAMIDE, Hemant AGRAWAL, Harris PERLMAN, Gangjian QIN, Raj KISHORE ir Douglas W. LOSORDO. Exosomes from human CD34+ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circulation Research* [interaktyvus]. 2011, 109(7), 724–728. ISSN 00097330. Available at: doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253286
114. BIAN, Suyan, Liping ZHANG, Liufa DUAN, Xi WANG, Ying MIN ir Hepeng YU. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *Journal of Molecular Medicine* [interaktyvus]. 2014, 92(4), 387–397. ISSN 14321440. Available at: doi:10.1007/s00109-013-1110-5
115. ZHANG, Hong Chao, Xin Bin LIU, Shu HUANG, Xiao Yun BI, Heng Xiang WANG, Li Xian XIE, Yong Qi WANG, Xiao Fang CAO, Jun LV, Feng Jun XIAO, Yang YANG ir Zi Kuan GUO. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. *Stem Cells and Development* [interaktyvus]. 2012, 21(18), 3289–3297. ISSN 15473287. Available at: doi:10.1089/scd.2012.0095
116. MAHMOOD ALJAMALI, Nagham. Zetasizer Technique in Biochemistry. *Biochem Anal Biochem* [interaktyvus]. 2015, 4(2), 5. Available at: doi:10.4172/2161-1009.1000168

117. XU, Manlong, David J. MCCANNA ir Jacob G. SIVAK. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [interaktyvus]. 2015, 71, 1–7. ISSN 1873488X. Available at: doi:10.1016/j.vascn.2014.11.003
118. SINGH, Madhumati ir Giriraj Sandeep GONEGANDLA. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws (BIONJ). *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery* [interaktyvus]. 2020, 19(2), 162–167. ISSN 0974942X. Available at: doi:10.1007/s12663-019-01211-2
119. ZHENG, Chenxi, Ji CHEN, Shiyu LIU ir Yan JIN. *Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation* [interaktyvus]. B.m.: Sichuan University Press. 1. rugsėjo 2019 [žiūrėta. 2021-05-23]. ISSN 20493169. Available at: doi:10.1038/s41368-019-0060-3
120. MUSIAŁ-WYSOCKA, Aleksandra, Marta KOT ir Marcin MAJKA. *The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies* [interaktyvus]. B.m.: SAGE Publications Ltd. 1. liepos 2019 [žiūrėta. 2021-05-23]. ISSN 15553892. Available at: doi:10.1177/0963689719837897
121. TANG, Yaya, Yan ZHOU ir Hong Jun LI. *Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review* [interaktyvus]. B.m.: BioMed Central Ltd. 1. gruodžio 2021 [žiūrėta. 2021-05-23]. ISSN 17576512. Available at: doi:10.1186/s13287-021-02138-7
122. AAPRO, M., P. A. ABRAHAMSSON, J. J. BODY, R. E. COLEMAN, R. COLOMER, L. COSTA, L. CRINÒ, L. DIRIX, M. GNANT, J. GRALOW, P. HADJI, G. N. HORTOBAGYI, W. JONAT, A. LIPTON, A. MONNIER, A. H.G. PATERSON, R. RIZZOLI, F. SAAD ir B. THÜRLIMANN. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: Recommendations of an international expert panel. *Annals of Oncology* [interaktyvus]. 2008, 19(3), 420–432. ISSN 15698041. Available at: doi:10.1093/annonc/mdm442
123. PAIVA-FONSECA, Felipe, Alan Roger SANTOS-SILVA, Ricardo DELLA-COLETTA, Pablo Agustin VARGAS ir Márcio Ajudarte LOPES. *Alendronate-associated osteonecrosis of the jaws: A review of the main topics* [interaktyvus]. B.m.: Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal. 2014 [žiūrėta. 2021-05-19]. ISSN 16986946. Available at: doi:10.4317/medoral.19094
124. CHEN, Tianling, James BERENSON, Robert VESCIO, Regina SWIFT, Alicia GILCHICK, Susan GOODIN, Patricia LORUSSO, Peiming MA, Christina RAVERA, Fabienne DECKERT, Horst SCHRAN, John SEAMAN ir Andrej SKERJANEC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *Journal of Clinical Pharmacology* [interaktyvus]. 2002, 42(11), 1228–1236. ISSN 00912700. Available at: doi:10.1177/009127002762491316
125. KIM, Jung Han, Hae Mi KANG, Su Bin YU, Jae Min SONG, Chul Hoon KIM, Bok Joo KIM, Bong Soo PARK, Sang Hun SHIN ir In Ryoung KIM. Cytoprotective effect of flavonoid-induced autophagy on bisphosphonate mediated cell death in osteoblast. *Journal of Cellular Biochemistry* [interaktyvus]. 2018, 119(7), 5571–5580 [žiūrėta. 2021-05-24]. ISSN 10974644. Available at: doi:10.1002/jcb.26728
126. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* [interaktyvus]. 2009 [žiūrėta. 2021-05-26]. Available at: <https://www.iso.org/standard/36406.html>

127. LU, Jian, Qi Yang WANG ir Jia Gen SHENG. *Exosomes in the Repair of Bone Defects: Next-Generation Therapeutic Tools for the Treatment of Nonunion* [interaktyvus]. B.m.: Hindawi Limited. 2019. ISSN 23146141. Available at: doi:10.1155/2019/1983131
128. LOPATINA, Tatiana, Stefania BRUNO, Ciro TETTA, Natalia KALININA, Massimo PORTA ir Giovanni CAMUSSI. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell Communication and Signaling* [interaktyvus]. 2014, 12(1), 26 [žiūrėta. 2021-05-27]. ISSN 1478811X. Available at: doi:10.1186/1478-811X-12-26
129. CHEN, Si, Yiman TANG, Yunsong LIU, Ping ZHANG, Longwei LV, Xiao ZHANG, Lingfei JIA ir Yongsheng ZHOU. Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration. *Cell Proliferation* [interaktyvus]. 2019, 52(5) [žiūrėta. 2021-05-24]. ISSN 13652184. Available at: doi:10.1111/cpr.12669
130. LI, Wenyue, Yunsong LIU, Ping ZHANG, Yiman TANG, Miao ZHOU, Weiran JIANG, Xiao ZHANG, Gang WU ir Yongsheng ZHOU. Tissue-Engineered Bone Immobilized with Human Adipose Stem Cells-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. *ACS Applied Materials and Interfaces* [interaktyvus]. 2018, 10(6), 5240–5254 [žiūrėta. 2021-05-24]. ISSN 19448252. Available at: doi:10.1021/acsami.7b17620
131. IDRIS, Aymen I., Javier ROJAS, Iain R. GREIG, Rob J. VAN'T HOF ir Stuart H. RALSTON. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcified Tissue International* [interaktyvus]. 2008, 82(3), 191–201 [žiūrėta. 2021-06-01]. ISSN 0171967X. Available at: doi:10.1007/s00223-008-9104-y
132. VIRGINIA GANGOITI, María, Ana MARÍA CORTIZO, Verónica ARNOL, Juan IGNACIO FELICE ir Antonio DESMOND MCCARTHY. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells [interaktyvus]. 2008. Available at: doi:10.1016/j.ejphar.2008.10.031
133. TOFIÑO-VIAN, Miguel, Maria Isabel GUILLÉN, María Dolores PÉREZ DEL CAZ, Miguel Angel CASTEJÓN ir Maria José ALCARAZ. Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells downregulate senescence features in osteoarthritic osteoblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [interaktyvus]. 2017, 2017. ISSN 19420994. Available at: doi:10.1155/2017/7197598
134. MOLLAZADEH, Samaneh, Sedigeh S. FAZLY BAZZAZ ir Amin A. KERACHIAN. Role of apoptosis in pathogenesis and treatment of bone-related diseases. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* [interaktyvus]. 2015, 10(1). ISSN 1749799X. Available at: doi:10.1186/s13018-015-0152-5