

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**ŠTÚDIUM EXOZÓMOV AKO SYSTÉMU
TRANSPORTU LIEČIV PRI LIEČBE
GLIOBLASTÓMU**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Konzultanti diplomovej práce: PharmDr. Hana Jansová, Ph.D.

Aistē Jekabsone, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Lucia Tomášková

Čestné vyhlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne (pod vedením konzultanta). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

Dátum: 15.02.2020

Lucia Tomášková

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa rada pod'akovala mojej konzultantke PharmDr. Hanke Jansovej, Ph.D. za rady a cenné pripomienky pri vypracovávaní diplomovej práce. Veľké vďaka tiež patrí Aisté Jekabsone, Ph.D. a celému tímu z Litovskej Univerzity zdravotných vied za ich pomoc pri výskume, odborné rady a vedenie. V neposlednom rade ďakujem celej mojej rodine a blízkym priateľom za podporu počas celej doby štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lucia Tomášková

Školitel: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Štúdium exozómov ako systému transportu liečiv pri liečbe glioblastómu

Ochorenia centrálného nervového systému patria medzi najzávažnejšie choroby postihujúce človeka. Otvplyvňujú život nie len samotného pacienta, ale aj jeho okolia. Preto ich terapia, či už na úrovni úplného vyliečenia alebo zmiernenia sprevádzajúcich symptómov, je výzvou vedeckého bádania. V našom výskume sme sa zamerali na multiformný glioblastóm, rakovinu mozgu zatiaľ nevyliečiteľnú. Hlavným úskalím pri terapii je prekonanie hematoencefalickej bariéry. Exozómy ako telu prirodzené nanovezikuly sa ukázali ako vhodným systémom na doručenie liečiv do mozgového tkaniva. Naš výskum ukázal, že vhodnou metódou dokážeme získať dostatok kvalitných exozómov z makrofágov a veľmi efektívne ich naplniť protinádorovými látkami paklitaxelom, doxorubicínom a temolozidom, pričom takto doručené látky vykazujú vyššiu účinnosť a menej vedľajších účinkov ako voľná forma.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lucia Tomášková

Supervisor: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of exosomes as a drug delivery system in the treatment of glioblastoma

Central nervous system disorders are among the most serious diseases affecting humans. They affect not only the patient's life, but also his/her surroundings. Therefore, their therapy, whether at the level of complete cure or alleviation of accompanying symptoms, is a challenge for scientific research. In our research, we focused on glioblastoma multiforme, a brain cancer not yet treatable. The main drawback in therapy is overcoming the blood-brain barrier. Exosomes, such as the body's natural nano-vesicles, have been shown to be a suitable system for delivering drugs to brain tissue. Our research has shown that by a suitable method we are able to obtain sufficient quality exosomes from macrophage and fill them very efficiently with antitumor agents paclitaxel, doxorubicin and temozolomide, while the delivered substances show higher efficacy and fewer side effects than the free form.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Teoretická časť	9
2.1. Multiformný glioblastóm	9
2.2. Hematoencefalická bariéra	14
2.3. Nanotechnológie	20
2.4. Exozómy	22
2.5. Štúdium exozómov	29
3. Ciele práce	39
4. Metódy a materiál	40
5. Výsledky	50
5.1. Výber metódy izolácie (čistenia) exozómov	50
5.2. Plnenie exozómov liečivami	54
5.3. Štúdium stability exozómov s protirakovinovými látkami a uvoľňovanie účinných látok	59
5.4. Štúdium účinkov DOX, PTX a TMZ a ich exozomálnych foriem na životaschopnosť buniek C6 glioblastómbu.	61
5.5. Štúdium zavedenia exozómu a prechodu cez hematoencefalickú bariéru	62
6. Diskusia	64
7. Záver	69
8. Zoznam skratiek	70
9. Zoznam obrázkov	72
10. Zoznam tabuliek	73
11. Literatúra	74

1. Úvod

Multiformný glioblastóm je nevyliciteľná rakovina mozgu, ktorá predstavuje asi polovicu všetkých nádorov mozgu. Priemerná dĺžka života po stanovení diagnózy je zvyčajne iba 12-18 mesiacov. (Gousias a kol. 2009, Tamimi a kol. 2015). Agresivita glioblastómu je spôsobená subpopuláciou kmeňových buniek rezistentných na chemoterapiu a radiačnú terapiu charakteristických pre tento typ nádoru. Schopnosť nádorových buniek rýchlo migrovať do tkanív znižuje účinnosť chirurgickej a lokalizovanej chemoterapie či ožarovania (Bruce 2019). Taktiež sa mnoho subpopulácii nádorových buniek stáva rezistentných voči chemoterapii a rádioterapii (Paw a kol. 2015). Výzvou terapie nádoru mozgu, ako aj obecné všetkých ochorení mozgu, je dodanie správneho liečiva v dostatočnom množstve za optimálnych podmienok do potrebného miesta účinku, teda do mozgu. Komplikácia tohto problému spočíva vo veľmi dobrej ochrane mozgového tkaniva hematoencefalickou bariérou. Táto bariéra je svojou morfológiou a funkciou len veľmi ťažko prekonateľná, preto je dôležité vyvinúť metódu cieleného dodávania liečiv do mozgu a cielené prekonanie hematoencefalickej bariéry.

Cieľom projektu, ktorého súčasťou je aj táto práca, je vyvinúť novú stratégiu identifikácie a selektívnej deštrukcie regeneračných kmeňových buniek rakoviny a buniek glioblastómu oddelených od materského nádoru. Na vyriešenie tohto problému sa používa schopnosť makrofágových exozómov rozpoznávať a fúzovať rakovinové bunky (Kim a kol. 2016), ako aj schopnosť exozómov prechádzať biologickými bariérami, vrátane hematoencefalickej bariéry (Yuan a kol. 2017).

2. Teoretická časť

2.1. Multiformný glioblastóm

Multiformný glioblastóm (GMB) je najbežnejším malígnym nádorom mozgu. Zvyčajne sa nachádza v mozgových hemisférach a vychádza z astrocytových buniek. Ovplyvňuje hlavne dospelých a vyskytuje sa *de novo* alebo menej často malígnymi zmenami astrocytómov nižšieho stupňa (stupeň II - astrocytóm WHO s nižšou malignitou, stupeň III - anaplastický astrocytóm WHO). Terapia GBM je paliatívna pomocou chirurgických, rádioterapeutických a chemoterapeutických roztokov (Bruce 2019, Kleihues a kol. 2002).

2.1.1. Epidemiológia

Miera incidencie GMB je najvyššia, tvoriaca 75 % prípadov, medzi malígnymi nádormi mozgu a v priemere sa hýbe medzi 0,59 - 3,69 na 100 000 obyvateľov za rok (Thakkar a kol. 2014, Khurana a kol. 2011, Gousias a kol. 2009, Tamimi a kol. 2015, Lee a kol. 2010). Typicky postihuje najmä dospelých medzi 45 - 75 rokov. Najčastejší výskyt je medzi 75 až 84 a po 85. roku znova klesá (Ostrom a kol. 2013). Priemerný vek pri diagnostike vyššie uvedeného GMB je 55 rokov (Chakrabarti a kol. 2005) a u sekundárnych GMB je 40 rokov (Taylor a kol. 2014). Výskyt u detí je netypický a výskyt u mužov je celkovo vyšší než u žien (Ostrom a kol. 2013). U belochov je výskyt vyšší ako u černochoch (IR je 2,5 - krát väčšie u európskych Američanov ako afrických) (Song a kol. 2009).

GBM sa najčastejšie nachádza v supratentoriálnom regióne, najmä vo frontálnom laloku. Lokalizácia v mozočku je veľmi vzácna a v mieche ešte viac zriedkavejšia (Tamimi a Juweid 2017).

2.1.2. Etiológia

Etiológia GMB nie je úplne známa. Svoju úlohu pravdepodobne hrá aj rodinná genetická predispozícia. Ďalej môže vzniknúť následkom iného známeho genetického syndrómu, napríklad: neurofibromatózy, Turcotova syndrómu (Hamilton a kol. 1995) alebo Li-Fraumeniho syndrómu (Kleihues a Ohgaki 1999).

2.1.3. Patofyziológia

GBM môžeme rozdeliť na primárne a sekundárne. Primárne GBM - my vznikajú *de novo*, majú častejší výskyt (asi 60 %) a sú typickejšie pre staršiu populáciu (nad 50 rokov).

Sekundárne GBM vychádzajú z malignizácie astrocytómov, ich výskyt je nižší (asi 40 %) a objavujú sa u mladších pacientov (pod 45 rokov) (Sathornsumetee a kol. 2007).

Obe varianty sú spôsobené akumuláciou veľkého počtu genetických mutácií:

- strata heterozygotnosti na ramene chromozómu 10q sa vyskytuje až v 60 – 90 % prípadov GBM a je celkovo špecifická pre GBM (Waugh 2014),
- mutácia v nádorovom supresorovom géne *p53* dochádza v 25 - 40 % prípadov, najmä v sekundárnom GBM (Ohgaki a Kleihues 2007),
- klinicky významné mutácie v géne receptoru endoteliálneho rastového faktoru (EGFR) sa prejavujú zvýšenou aktivitou. Vyskytuje sa až v 40 –50 % prípadov primárneho GBM (menej často v sekundárnom GBM) (Wong a kol. 1992),
- nekontrolovaná bunková proliferácia môže byť tiež spôsobená mutáciou v géne *MDM* (Mouse Double Minute homolog), ktorého produkt sa viaže na nádorový supresor *p53*, čím sa bunka zbavuje významného regulačného mechanizmu. Podľa niektorých štúdií je mutácia v tomto géne spojená s horšou prognózou (Shapiro a kol. 1989),
- PDGFR je receptor pre PDGF-alfa (rastový faktor alfa pochádzajúci z doštičiek), rastový faktor, ktorý pôsobí ako hlavný mitogen pre gliové bunky. Amplifikácia alebo nadmerná expresia PDGFR sa vyskytuje až v 60 % prípadov sekundárneho GBM (Duerr a kol. 1998),
- *PTEN* (Fosfatáza – tenzín homolog) kóduje tyrozín fosfatázu na chromozómovom ramene 10q. Fosfatáza inhibuje signálne kaskády. Ak mutácia vedie k strate funkcie, bunka sa začne nekontrolovateľne množiť. Vyskytuje sa v 30 % GBM, prevažne primárneho pôvodu (Duerr a kol. 1998),
- medzi ďalšie mutácie patria poruchy génu *p16 a Rb* (Scott a kol. 1998).

2.1.4. Prognóza

Za posledných 25 rokov liečba GBM pokročila iba mierne. Súčasná terapia je iba paliatívna a dokázateľne zlepšuje kvalitu života. Bez terapie pacienti umierajú do troch mesiacov. Liečení pacienti prežívajú priemerne 12 mesiacov, pričom menej ako 25 % prežije do dvoch rokov a menej ako 10 % do päť rokov. GBM je jedno z najzávažnejších nádorových ochorení mozgu a jeho liečba či skvalitnenie života pacientov je náročným cieľom (Scott a kol. 1998).

2.1.5. Diagnostika

Pre diagnostiku sú najvýznamnejšie zobrazovacie metódy. Na CT vidíme hypodenzné ložisko s periférnou prstencovou zónou zosilneného kontrastu a zónou penumbry edému mozgu. MRI je metódou voľby. Typicky je na T1-obraze prstencová hyperintenzita, tvorená nádorovou masou s bohatou neovaskularizáciou, a na T2-obraze edém obklopujúci lézii (Mukundan a kol. 2008). PET ukáže na zvýšený metabolizmus glukózy v danej oblasti. Prognostický význam má meranie veľkosti tumoru po operácii pomocou O-2-[(18)F]fluoroethyl-l-tyrosin (Piroth a kol. 2011). MR- spektroskopia zobrazí zmeny peakov, napríklad medzi cholínom a kreatinínom, laktátom, N-acetylaspartát. Zmeny na elektroencefalografii sú nešpecifické (Bruce 2019).

2.1.6. Klinický obraz

Príznaky a symptómy odrážajú umiestnenie nádoru. Všeobecnými príznakmi sú bolesť hlavy, nauzea a vracanie, zmeny v osobnosti a spomalenie kognitívnych funkcií. Bolesť môžu mať rôznu intenzitu, kvalitu a početnosť. Závažnejšie bývajú ráno po zobudení. Zmeny nálad, mentálnej kapacity a koncentrácie sú často jedinými viditeľnými abnormalitami. Typický je záchvatovitý priebeh, ktorý sa môže prejavovať ako hemiparézy, poruchy senzoriky, strata zraku a afázia (Bruce 2019, Roth a Elvidge 1960).

2.1.7. Terapia

Liečba GBM je veľmi náročná a bohužiaľ dodnes nemáme liečbu, ktorá by toto ochorenie vyliečila, teda GBM nie je liečiteľné (Preusser a kol. 2011). U malígnych gliómov zostáva paliatívna liečba a zahŕňa chirurgický zákrok, rádioterapiu a chemoterapiu (Sathornsumetee a kol. 2007). Chirurgická resekcia je základom liečby a jej úlohou je maximálne zmenšiť nádorovú masu a znížiť tak tlak na okolité štruktúry, umožniť histopatologickú diagnózu a posilniť účinok adjuvantnej terapie, ktorá nasleduje po resekcii. (Ryken a kol. 2008, Lacroix a kol. 2001).

Adjuvantná terapia pozostáva z adjuvantnej rádioterapie (štandardná frakcionácia konformnej rádioterapie, 60 Gy), konkomitantná chemorádioterapia (rádioterapia nasledovaná chemoterapiou) a adjuvantná chemoterapia (temozolomid, nitrosomočoviny) (Ellor a kol. 2014).

Rádioterapia kombinovaná s resekciou tumoru predlžuje život pacienta s GBM z 3 - 4 na 7 - 12 mesiacov (Stupp a kol. 2005). Rádiosenzibilizátory (chemoterapeutiká, cielené molekulárne látky a antiangiogénne látky) môžu zvýšiť terapeutický účinok rádioterapie (Ellor a kol. 2014).

Chemoterapeutická liečba chlóretylačnými činidlami, ako je karmustín alebo lomustín, bola kontroverzná. Došlo síce k miernemu zvýšeniu priemerného prežívania, ale nezhodujú sa v použití (Lakomý a kol. 2010). Temozolomid je aktívne alkylačné činidlo užívané perorálne, určené osobám s novo diagnostikovaným GBM (Stewart 2002, Friedman a kol. 1998).

Biologické preparáty sa v súčasnej dobe uplatňujú s mechanizmami ovplyvňujúcimi angiogézu a epidermálne rastové faktory. Oba procesy sú dôležité pre rast a vývoj nádoru a ich ovplyvnením môžeme život nádoru ohroziť (Lakomý a kol. 2011). Najväčšia pozornosť je v súčasnej dobe venovaná bevacizumabu. Bevacizumab je humanizovaná monoklonálna protilátka proti vaskulárnemu epiteliálnemu rastovému faktoru (VEGF). Súčasne sa objavili práce s ďalším inhibítorom angiogenézy, enzastaurinom, nie však v takej miere (Lakomý a kol. 2011, Fernandes a kol. 2017). Cilengitid patrí do novej triedy onkologických terapeutík, tzv. inhibítorov integrínov. Tie sa viažu na povrchové bunkové receptory, integríny, a inhibujú tak rast nádoru a jeho angiogézu (Šlampa a kol. 2010). Everolimus je perorálne účinný inhibítor cicavčieho rapamycínového cieľového receptora (mTOR), jednej z komponent intracelulárnych signálnych ciest ovplyvňujúce bunkový rast, metabolizmus, proliferáciu a angiogézu. Ide o derivát rapamycínu, ktorý v komplexe s intracelulárnym proteínom FKBP-12 pôsobí ako inhibítor mTOR serín-treonínové kinázy a tým inhibuje rozvoj nádoru. Rovnako pôsobí aj temsirolimus (Lakomý a kol. 2011, Fernandes a kol. 2017). Gefitinib, erlotinib, imatinib sú inhibítory tyrozinkinázovej aktivity, štúdie však nepreukázali ich význam (Lakomý a kol. 2011, Fernandes a kol. 2017). Cetuximab je inhibítor EGFR. Receptor EGFR (erbB-1) je vo zvýšenej miere exprimovaný na povrchu buniek nádoru (u 40-50 % pacientov s GBM). Štúdie preukázali len mierny efekt v liečbe recidivujúcich či progredujúcich gliómov (Lakomý a kol. 2011, Fernandes a kol. 2017, Glantz a kol. 2000).

V prípade recidívy choroby sa postup vyberá podľa veku, celkového stavu, primárnej histológie, predchádzajúcej odpovede na liečbu, času od pôvodnej diagnózy a rozsahu recidívy (pokiaľ možno v tímovej multidisciplinárnej biologickej súvahe). V prípade

lokálnych nádorov je na prvom mieste chirurgický zákrok, ďalej sa uvažuje o systémovej terapii alebo o prípadnom opakovanom ožiarení. Podporná liečba tiež zohráva veľmi dôležitú úlohu (Fadul a kol. 2009).

Symptomatická liečba dopĺňa liečbu paliatívnu. Záchvaty sa kompenzujú levetiracetamem, fenytoinom alebo karbamazepinom. Levetiracetam, na rozdiel od ostatných dvoch, nemá účinok na systém cytochrómu P450 a neinterferuje preto s chemoterapií. Vazogénny edém mozgu sa kompenzuje kortikoidy (dexametazón) často v kombinácii a antiulceróznymi liekmi (famotidín, ranitidín) (Lopez a kol. 2006).

Hlavnou prekážkou použitia chemoterapeutických činidiel pre nádory mozgu je skutočnosť, že hematoencefalická bariéra (HEB) účinne vylučuje veľa látok z CNS. Z tohto dôvodu sa vyvíjajú nové spôsoby intrakraniálneho dodávania liečiv na dodávanie vyšších koncentrácií chemoterapeutických činidiel do nádorových buniek bez toho, aby sa predišlo nepriaznivým systémovým účinkom týchto liekov (Gallego 2015).

2.2. Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (HEB) oddeľuje krvný prúd od mozgového tkaniva a tvorí tak jednu z najdôležitejších bariér chrániacich citlivé tkanivá pred toxickými látkami. Je definovaná ako systém plochých endotelových buniek s pevnými spojmi usporiadanými tak, aby tvorili jednu súvislú vrstvu, ktorá je rozprestretá po vnútornom obvode kapilár (Šťastný a kol. 2002).

Iba v niektorých miestach mozgu nie je táto bariéra vytvorená. Patrí sem subfornikálny a subkomisurálny orgán, epifýza, area postrema, eminentia mediana, neurohypofýza, vaskulárny orgán lamina terminalis a choroidálne plexy. Zdalo by sa, že tieto miesta sú viac prístupné pre prestup látok, avšak nie je tomu tak. Vnútrotný povrch kapilár v týchto miestach je asi 5000 - krát menší než v prípade HEB, preto by mal mať prestup látok v tejto oblasti len obmedzený význam (Daneman a Prat 2015).

HEB však nie je jediná bariérová vrstva medzi krvou a mozgovým tkanivom. Spolu s epitelom choroidálneho plexu a arachnoidálneho epitelu tvorí hematoliquórovú bariéru, teda bariéru medzi krvou a likvórom (Šlampa a kol. 2010).

2.2.1. Morfológia HEB

Základnou anatomickou štruktúrou sú endotelové bunky v cerebrálnych krvných kapilárach. Sú distribuované po celej dĺžke kapiláry a tvoria jej výstelku. Povrch endotelu spevňuje tenká bazálna membrána, do ktorej sú zanorené tzv. pericyty. K tejto membráne z opačnej strany ako endotelové bunky priliehajú astrocyty svojím rozšíreným koncom (Daneman a Prat 2015).

Endotelové bunky sú spojené tesnými spojmi (tight junctions - TJ) na apikálnej strane plazmatickej membrány (tá, ktorá je spojená s krvou), ktoré ich pevne stmelujú do súvislej vrstvy výstelky kapilár a zamedzujú tak voľnej difúzii látok. Na basolaterálnej strane sú to adherentné spoje (adherens junctions - AJ), ktoré zabezpečujú medzibunkovú priľnavosť. V cerebrálnom endoteli sa nachádza aj špecifická enzymatická bariéra, ktorá je schopná metabolizovať rôzne látky (napríklad neuroaktívne látky, liečivá a živiny). Vo zvýšenej koncentrácii sa tu nachádzajú enzýmy γ -glutamyl transpeptidáza (γ -GTP), alkalická fosfatáza a dekarboxyláza aromatických kyselín (Daneman a Prat 2015).

Medzi povrchom luminálnej (apikálnej) a abluminálnej (basolaterálnej) membrány endotelových buniek existuje polarita. Ukázalo sa je γ -glutamyl transpeptidáza a alkalická fosfatáza sú prítomné na luminálnej strane, zatiaľ čo špecifická pumpa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPáza

a na sodíku dependentný transportér neutrálnych aminokyselín sú skôr na abluminálnej časti membrány. Glukózový transportér GLUT-1 môžeme nájsť na oboch stranách v pomere 3:1 s prevahou na abluminálnej strane. O P-glycoproteíne (P-gp) vedci tvrdia, že sa pravdepodobne nachádza na luminálnej strane, existujú však dôkazy, že je spojený s astrocyty, teda z abluminálnej strany (Daneman a Prat 2015).

Bazálna membrána ako celok poskytuje mechanickú oporu pripojeným bunkám (astrocyty, pericyty a kapilára) a funguje ako „hrubý filter“ pre látky s veľkou molekulou. Jej permeabilita je ovplyvnená obsahom proteáz (Šťastný a kol. 2002).

Pericyty sú schopné zastat' kontraktlnú funkciu hladko - svalových vlákien a nachádzajú sa teda na miestach, kde je svaloviny nedostatok alebo úplne chýba (48). Majú tiež schopnosť fagocytózy, produkcie cytokínov (interleukínov 1 a 6) a zúčastňujú sa bariérovej funkcie zmenou aktivity enzýmu γ -glutamyl transpeptidázi (Šťastný a kol. 2002).

Mozgové tkanivo tvoria dva typy buniek : *neuróny* prenášajúce informácie v CNS a *gliové bunky*, ktoré držia neuróny spolu a majú mnoho iných funkcií (Matters, 2002).

Jedným z hlavných typov gliových buniek sú *astrocyty*. Delíme ich na vláknité, ktorá sa vyskytujú hlavne v bielej hmote, a protoplazmatické hlavne v šedej hmote. Z tela astrocytov vystupuje veľké množstvo výbežkov a sú spojené skulinovým spojením (gap junctions - GJ) (Němeček a kol. 1997). Sú schopné indukovať a ďalej udržiavať bariérovú funkciu endotelu produkciou rôznych rastových faktorov (Šťastný a kol. 2002).

Ďalším typom gliových buniek sú *mikroglie*, ktoré vďaka svojej pohyblivosti a schopnosti fagocytovať sa považujú za „upratovacie“ bunky. *Ependymové bunky* tvoria ependym tvoriaci výstelku mozgových komôr aj miechového kanálu (Pazdera 2003).

Oligodendrocyty tvoria myelinovú pošvu na axónoch neurónov CNS, na periférii túto funkciu zastávajú *Schwannové bunky*. Význam tejto pošvy spočíva v elektrickom izolovaní axoplazmy od mimobunkovej tekutiny, rýchlejšie vedenie impulzov (Pazdera 2003).

Ďalšími bunkami tvoriacimi HEB sú *žirne bunky*, ktoré ovplyvňujú permeabilitu HEB. Obsahujú proteázy, ktoré môžu poškodzovať myelinovú pošvu alebo svojou degranuláciou uvoľniť cytokíny a uľahčiť tak prestup leukocytom do interstícia mozgu. Ďalej sú to *perivaskulárne mikroglie* a *makrofágy*, ktoré zohrávajú významnú úlohu v tvorbe amyloidných plakov (Šťastný a kol. 2002).

2.2.2. Fyziológia HEB

Význam HEB spočíva v obmedzení prestupu látok z krvi do intersticiálnej tekutiny mozgu. Hlavnú úlohu zohrávajú dva základné bariérové mechanizmy: fyzikálny (TJ, bazálna membrána, astrocyty) a metabolické (príslušná enzymatická výbava). Základnou funkciou HEB je ochrana mozgového tkaniva pred cudzorodými látkami, teda aj liečivami, pre ktoré predstavuje nežiadúcu prekážku v dosiahnutí ich liečebného efektu (Lincová a kol. 2002).

V nasledujúcom prehľade sú uvedené látky, pre ktoré je táto bariéra priepustná (tieto látky využívajú najbežnejší transportný mechanizmus jednoduchou pasívnou difúziou). Ide o látky:

- vysoko lipofilné (rozpustný v tukoch)
- v neionizovanej forme (tu rozhoduje hodnota pH a pKa)
- v neviazanej forme (teda neviazané na plazmatické proteíny)
- s malou molekulou (molekulová hmotnosť pod 400 Da) (Šťastný a kol. 2002)

Liečiva, ktoré nespĺňajú niektorú z týchto podmienok, neprechádzajú cez HEB a nemôžu teda pôsobiť v mozgu. Musia byť teda špecificky modifikované. Nie vždy však dokážeme nájsť vhodnú modifikáciu.

Je však jasné, že z krvi sa do mozgu musia dostávať aj živiny, kyslík a iné látky dôležité pre život, ako aj odvádzať odpadové látky. Kyslík, oxid uhličitý, oxid dusnatý či voda bariérou voľne difundujú. Ostatné látky využívajú transportné mechanizmy v membránach endotelových buniek. HEB selektívne vyberá látky, ktoré sa dostanú do mozgu a udržuje tak optimálne prostredie pre nervové bunky mozgu. Prísna je kontrola iónových gradientov (Hartl a Palát 2011).

Aby látka prešla do CNS musí prekonať HEB, na ktorú sa môžeme pozerat' ako na sústavu rôznorodých vrstiev. Zoradených smerom od miesta kontaktu s krvou ich môžeme rozdeliť nasledovne:

- luminální (apikálnej) cytoplazmatickej membráne endotelové bunky
- vlastné cytoplazmy endotelové bunky - vnútorný cytoplazmatickej doména
- abluminálnej (bazolaterálnou) cytoplazmatickej membráne endotelové bunky
- pericyty (iba na určitých miestach)
- bazálnej membrána
- príľahlé astrocyty (Daneman a Prat 2015).

2.2.3. Morfológická štruktúra biomembrán

Základom biomembrány je fosfolipidová dvojvrstva, do ktorej sú buď priamo zabudované alebo sú na povrchu umiestnené molekuly bielkovín.

Molekulárna štruktúra biomembrán je zložená z:

- membránových lipidov, hlavne fosfolipidy a steroly, ktoré si môžeme predstaviť ako krátke tyčinky s hydrofóbnou skupinou mastných kyselín na jedno konci a hydrofilnou časti s polárnymi skupinami na druhej,
- membránových bielkovín, najmä globulárne bielkoviny s molekulárnou hmotnosťou 15 – 150 kDa, slúžiace ako transportné systémy, receptory, enzýmy či udržiavajúce tvar dvojvrstvy,
- membránových sacharidov vo forme glykoproteínov a glykolipidov (Nečas a kol. 2000).

2.2.4. Membránový prenos

Rozlišujeme tieto základné mechanizmy membránového prenosu:

- *Difúzia*

Jedná sa o samovoľné prenikanie molekúl z oblasti vyššej koncentrácie do oblasti nižšej koncentrácie vplyvom tepelného pohybu častíc. Ide o typ pasívneho transportu. Ak sa jej nezúčastní žiaden membránový proteín hovoríme o voľnej difúzii, ak prenášacové proteíny- uľahčená difúzia, ak kanálové proteíny- prostá difúzia.

Inou formou difúzie je paracelulárna (medzibunková) limitovaná TJ medzi bunkami a transcelulárna limitovaná prítomnosťou transportných vezikúl).

Takto prechádzajú látky s malou molekulou, malé nenabité hydrofóbne molekuly (voda, alkoholy atď.) (Nečas a kol. 2000).

- *Prenos pomocou proteínov*

Proteíny môžu byť vo forme kanálov alebo prenášačov. Pohyb látok je možný oboma smermi a je obmedzený typom, saturabilita, rýchlosťou či špecifikácia. Delíme ich:

- a) Transport pomocou prenášačov

Môže byť pasívny (facilitovaná difúzia) dokázaný pre príjem cukrov, aminokyselín či niektorých iónov a je limitovaný koncentračným gradientom, stereošpecifikáciou, saturabilitou väzbových miest (Nečas a kol. 2000). Ďalej môže byť aktívny, ktorý prebieha proti koncentračnému gradientu a vyžaduje prívod energie (najčastejšie vo forme ATP). Prenos je však jednosmerný a saturabilný (Abbott a kol. 2006). Príkladom je sodno-draselná pumpa či P-gp.

- b) Transport pomocou kanálov

Kanály sú tvorené oligomernými-kanálovými proteínmi s mnohými podjednotkami. Vytvárajú pór, ktorými môžu rozpustené látky difundovať. Jedná sa hlavne o anorganické ióny (napr. H^+ , Ca^{2+} ...). Tento transport je limitovaný hustotou kanálov, koncentračným gradientom či stavom kanálu (otvorený/zatvorený) (Abbott a kol. 2006).

- *Exocytóza a endocytóza*

Endocytózou sa látky dostávajú do vnútorného prostredia bunky. Existujú dva podtypy, pitocytóza a fagocytóza. V oboch prípadoch dochádza k vchĺpeniu membrány, jej oddeleniu, čím vzniká mechúrik, ktorý sa pomocou lyzozomálnych enzýmov následne natrávi a uvoľní tak svoj obsah. Pri exocytóze sa bunčné vezikuly uvoľňujú do extracelulárneho priestoru (Abbott a kol. 2006).

Faktormi, ktoré teda ovplyvňujú schopnosť látok prechádzať HEB sú: koncentračný gradient, veľkosť molekuly (teda molekulová hmotnosť), flexibilita a konformácie danej molekuly, liposolubilita, bunková a enzymatická stabilita, afinita k prietokovými transportérom a ku špecifickým proteínovým prenášačom a v neposlednom

rade náboj a efekty prítomných fyziologických aj patologických podmienok organizmu (Abbott a kol. 2006, Thomas 1999).

2.3. Nanotechnológie

V súčasnosti nadobúdajú nanotechnológie vo farmakoterapii čoraz väčší význam a to hlavne oblasti farmaceutickej technológie.

Dôvody zmenšovania rozmerov systémov pre dopravu liekov je:

- čo najmenší zásah do tela
- cieľená terapia špecifických druhov tkanív
- zvýšenie účinnosti liekov
- zníženie dávky a vedľajších účinkov

2.3.1. Lipozómy

Lipozómy sú malé fosfolipidové dvojvrstvové vaky. Sú schopné ochrániť liečivo pred degradáciou, priniesť ho k miestu aktivity a znížiť vplyv jeho vedľajších účinkov. Limitované sú však možnosťami enkapsulácie liečiva, rozpustnosti (vo vode rozpustné prenikajú rýchlejšie) a stabilitou (Bogunia a Sugisaka 2002).

2.3.2. Dendrimery

Dendrimery sú polymérne makromolekuly sférického tvaru pozostávajúce z jadra, rozvetvených jednotiek a terminálnych funkčných skupín a určujú vlastnosti rozpúšťania. Cieľenie je zabezpečené pripojením špecifických linkerov na povrchu dendrimeru (Prnka a Šperlink 2006).

2.3.3. Micely

Micely sú asociačné koloidné útvary tvorené v roztoku surfaktantov po prekročení kritickej micelárnej koncentrácie. Ich veľkosť je 5-10 nm. Liečiva sú zachytené v jadre micely a okolo nej je hydrofilný plášť. Je možné meniť ich veľkosť a tvar (Prnka a Šperlink 2006).

2.3.4. Tekuté kryštály

Kombinujú vlastnosti kvapalného a pevného skupenstva a vyrábajú sa tak, aby vytvorili rôzne konfigurácie a striedali tak polárne a nepolárne vrstvy (Prnka a Šperlink 2006).

2.3.5. Nanočastice

Ďalšou možnosťou sú nanočastice. Zabudovaním liečiv do nanočastíc sa zvyšuje ich stabilita, zlepšuje sa penetrácia do buniek a zabraňuje sa nešpecifickým účinkom,

napríklad ich nešpecifickej väzbe. Túto formu dnes používajú napríklad antibiotiká, cytostatiká či hormóny (Birrenbach a Speiser, 1976). Liečivo je rozpustené, enkapsulované alebo pripevnené do matrix nanočastice. Nanokapsuly sú vezikuly s polymerickou membránou a liečivom v dutine (olejové alebo vodové jadro). Nanosféra predstavuje matrix, v ktorej je liečivo rozptýlené vnútri častice.

Zaujímavou možnosťou je využitie nanočastíc na cieleň transport liečiv. Takého využitie nanočastíc vedie k zníženiu nežiadúcich účinkov a zníženiu dávky. Na svojom povrchu nesú rozpoznávacie elementy, ktoré sú priťahované receptormi cieľových buniek. Nanočastica musí byť stabilná, biokompatibilná dostatočne veľká a musí mať možnosť kontroly uvoľňovania liečiva v terapeutickom rozmedzí. Uvoľňovanie závisí od vlastností nanočastice a spôsobu enkapsulácie. Ideálny nanoliek je netoxický, stabilný, neaktivuje imunitný systém a schopný preniesť liečivo priamo do cieľovej bunky. Dosiahnuť však ideálne vlastnosti je veľmi náročné (Langer 2000).

Príkladom využitia nanotechnológie v terapii je nab-paklitaxel (paklitaxel viazaný na nanočastice albumínu) s veľkosťou 130 nm. Klinické štúdie ukázali, že nab-paklitaxel má rýchlejšiu a lepšiu distribúciu v postihnutom tkanive ako obyčajný paklitaxel čím zvyšuje a zrýchľuje terapeutický účinok, v dôsledku čoho sa zvyšuje prežitie pacientov (Harries a kol. 2005).

Nanotechnológiu využíva aj génová terapia. Úspešne bol liečený pacient s hemofiliou B (defektný gén kódujúci hemokoagulačný faktor IX) a pacient s hemofiliou A (defektný gén kódujúci hemokoagulačný faktor VIII). V týchto prípadoch na fibroblasty pacientov pôsobil plasmid obsahujúci sekvencie génu faktora VIII (liečba hemofílie A) a vírusový vektor, ktorý exprimoval humánnu faktor IX (liečba hemofílie B) (Kay a kol. 2000).

Veľmi sľubnou skupinou génovej terapie je genetická imunizácia pomocou DNA vakcín, ktorej výhodami je vysoká stabilita plazmidu DNA, nízka cena, znížené riziko infekcie spájajúcej sa so zoslabenými vírusovými vakcínami, možnosť umiestniť početné antigény do jedného plazmidu a schopnosť navodiť humorálnu aj bunkovú imunitnú odpoveď (Cui a Mumper 2001).

Nanočastice sa môžu využiť aj ako nosič pre vitamín A a E, čo sa dá využiť v dermatológii. V kozmetológii sa dajú využiť v opaľovacích krémoch (nanočastice TiO₂ alebo ZnO), pričom vykazujú vyššiu fotoprotekciu a lepšiu rozštiepatelnosť (Singh a Nanda 2014).

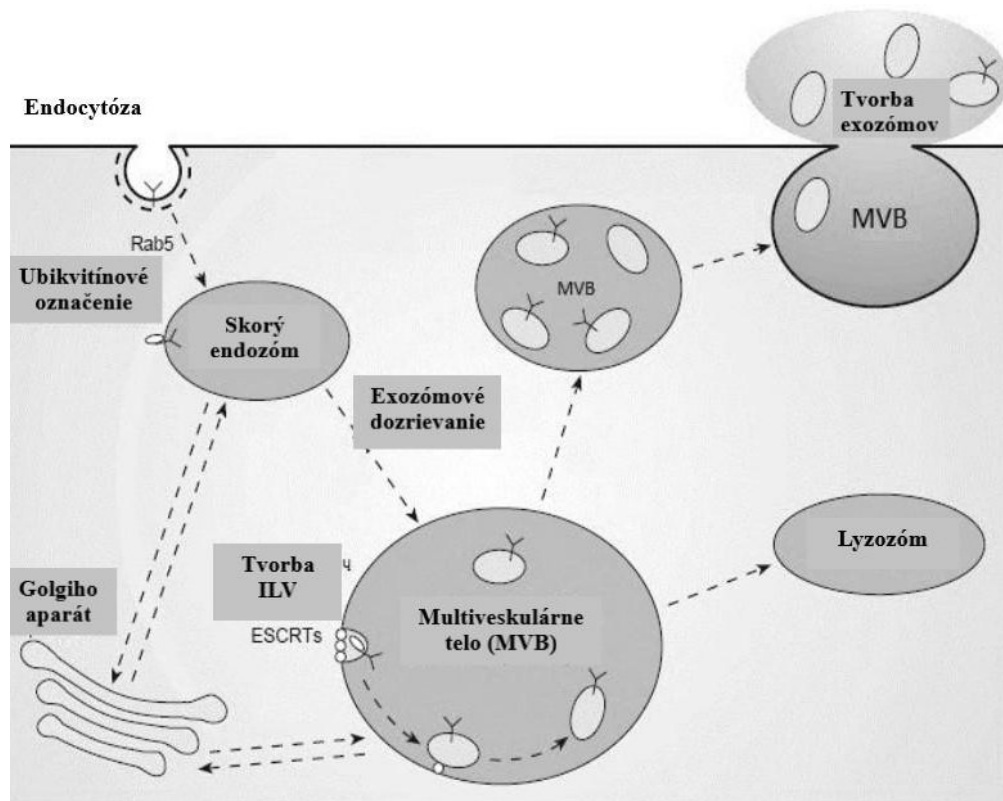
2.4. Exozómy

2.4.1. Definícia

Exozómy predstavujú malé membránové vezikuly endocytového pôvodu. Sú produkované takmer všetkými bunkami a ich veľkosť kolíše v rozmedzí 30 – 100 nm (Batrakova a Kim 2015, Théry a kol. 2009). Nachádzajú sa v rôznych telesných tekutinách, napríklad v slinách, krvi, moči, amniotickej tekutine, bronchoalveolárnej lavážnej tekutine, synoviálnej tekutine alebo materskom mlieku (Batrakova a Kim 2015, Shimoda a Khokha 2013). Exozómy majú zväčša guľovitú/pohárovitú morfológiu (Hong a kol. 2014) a sú nositeľmi rôznych molekúl, ako sú miRNA, mRNA, ncRNA (non-coding RNA), DNA, extra-chromozomálne DNA, proteíny, lipidy. Exozómy sú schopné preniesť tieto bioaktívne molekuly z donorovej do recipientnej bunky, a tak ju priamo ovplyvniť (Shimoda a Khokha 2013, Subra a kol. 2010). Vďaka štruktúre a schopnosti cirkulovať v telesných tekutinách exozómy umožňujú dopravu niektorých signálnych/efektorových molekúl do distálnych častí ľudského tela.

2.4.2. Vznik

Biogenéza exozómov sa začína tvorbou skorého endozómu (early endosome – EE) z bunkovej membrány. Ubikvitínom modifikované proteíny z cytoplazmy, ktoré putujú do skorých endozómov, priťahujú rôzne cytoplazmatické proteínové komplexy (Rab GTPázy, ESCRT a iné faktory) indukujúce následné prehlbovanie membrány EE do vnútra. Týmto spôsobom vznikajú v skorom endozóme intraluminálne vezikuly (ILVs) obsahujúce „náklad“ z cytoplazmy alebo povrchu bunky. Postupne, počas maturácie EE v spolupráci s rôznymi bunkovými faktormi, dochádza k jeho zmene na neskorý endozóm (late endosome – LE). Tento sa od EE líši v hodnote pH (EE: pH 6,8 – 5,9; LE: pH 6,0 – 4,9) (Huotari a Helenius 2011). V mnohých publikáciách sa LE označuje aj ako MVB (multivesicular body), respektíve multivezikulárny endozóm. Sú dve možnosti osudu MVB (Obr. 1.); buď splynie s lyzozómom a materiál vnútri endolyzozómu sa degraduje, alebo sa pohybuje pozdĺž cytoskeletu bunky k jej membráne. V blízkosti bunkovej membrány dochádza k zapojeniu ďalších exkrečných mechanizmov a proteínov, ako sú SNARE proteíny (syntaxín, SNAP-25, synaptotagmín, synaptobrevín), v prítomnosti ktorých dôjde k splynutiu bunkovej a vezikulárnej membrány a vylúčeniu vezikulárnych teliesok do extracelulárneho prostredia, kde sa už označujú názvom exozómy (Huotari a Helenius 2011, Tamkovich a kol. 2016).

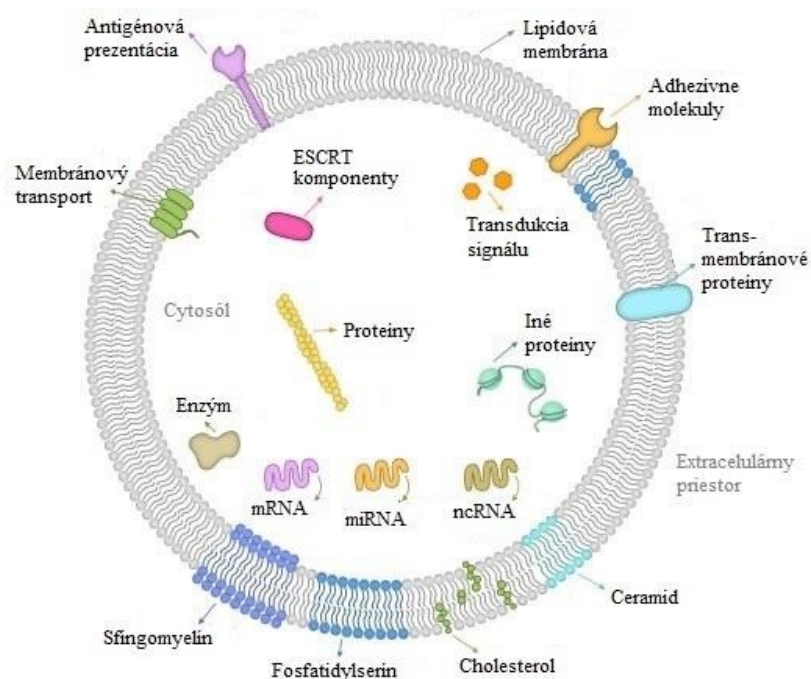


Obr. 1. Mechanizmus zrenia a vylučovania exozómov. (Prispôsobené Tamkovich SN a kol. 2008) Rab5 (GTPázy) pomáha vytvárať skoré endozómy a ESCRT (transportné proteíny endozomálnej distribúcie) sa naň viažu. ESCRT určuje tvorbu (ILV) v MVB. MVB uvoľňuje exozómy pri kontakte s plazmatickou membránou.

2.4.3. Štruktúra

Proteínový (ale aj lipidový) profil extracelulárnych vezikúl – exozómov zväčša reflektuje obsah parentálnych buniek, pričom vezikuly sú obohatené aj o niektoré špeciálne molekuly, ako sú adhézne molekuly, molekuly zabezpečujúce recykláciu materiálu, cytoskeletálne molekuly, heat shock proteíny, cytoplazmatické enzýmy, proteíny sprostredkujúce signálnu transdukciiu, cytokíny, chemokíny, proteinázy a bunkovo-špecifické antigény (Balaj a kol. 2011). Ako už bolo spomenuté, exozómy disponujú proteínmi a molekulami, ktoré sa počas ich biogenézy nedegradujú, ale ostávajú vo vezikulách. Najčastejšie sú to membránové transportéry a fúzne proteíny (GTPázy, anexíny, flotilín), heat-shock proteíny, tetraspaníny (napríklad CD9, CD63, CD81), proteíny zúčastňujúce sa biogenézy MVB (Alix, TSG101). Niektoré z nich sa považujú za markery exozómov, napríklad antigény CD63 a CD81 (Subra a kol. 2010, Segura a kol.

2005). Tieto markery sa používajú najčastejšie v publikáciách na dôkaz prítomnosti exozómov v skúmanej vzorke spolu s udaním veľkosti exozómov. Znaky MHC II a CD86 sú prítomné iba v exozómoch pochádzajúcich z antigén prezentujúcich buniek a znak MFG-E8/laktadherín sa zase nachádza iba na exozómoch z nezrelých dendritických buniek (Véron a kol. 2005, Frydrychowicz a kol. 2014). Exozómy zväčša, aj napriek ich endozómovému pôvodu, neobsahujú proteíny z endoplazmatického retikula, mitochondrií alebo jadra (Tili a kol. 2013). Ďalšou zložkou exozómov sú miRNA, ncRNA, ktoré sú abnormálne exprimované pri niektorých typoch nádorov a zapojené do patogenézy nádorových ochorení (Rabinowits a kol. 2009). Profily expície exozómových miRNA pochádzajúcich z nádorových buniek sú študované ako pravdepodobné biomarkery prítomnosti a/alebo progresie neoplastického procesu (Bhayani a kol. 2012). MiRNA sa špecificky sekvenčne viažu na 3' UTR (neprekľadaný región) cieľových m3RNA, čo vyúsťuje buď do inhibície translácie alebo mRNA degradácie (McDonald a kol. 2013). Niektoré miRNA cirkulujú v telesných tekutinách vo forme napríklad AGO (Argonaute 2) komplexov, iné sú uložené v exozómoch. Prenos týchto malých miRNA molekúl do cieľových buniek predstavuje jeden zo spôsobov regulácie expície génov (Bunggulawa a kol. 2018). Na úplnosť, aby sme nezabudli na žiadnu súčasť zloženia exozómov, lipidová zložka je takisto dôležitým komponentom. Exozómy obsahujú prevažne lipidy ako cholesterol (zabezpečuje vysokú pevnosť a stabilitu lipidovej dvojvrstvy), diglyceridy, sfingolipidy (vrátane sfingomyelínu a ceramidu, dôležitých pri biogenéze), fosfolipidy, glycerofosfolipidy vrátane fosfatidylcholínu, fosfatidylserínu, fosfatidyletanolamínu, fosfatidilinozitolu a polyglycerofosfolipidov (napríklad bisfosfát). Množstvá konkrétnych lipidov, v porovnaní s lipidovým zložením parenterálnej bunky, bývajú niekedy až štvornásobne zvýšené, čo sa prejavuje zvýšením rigidity membrány (Segura a kol. 2005).



Obr. 2. Schematické znázornenie štruktúry exozómu. (Upravené od Lou a kol. 2017)

2.4.4. Bunkové rozpoznávanie exozómov

Bunky rozpoznávajú exozómy tromi cestami: voľný pohyb, adhézia a antigénové rozpoznávanie. Rozpoznanie *voľným pohybom* alebo plávaním je pravdepodobne sprostredkované opsonizáciou exozómov počas cirkulácie v krvi. *Adhézia* na bunky vyžaduje konformačnú zmenu integrínov za účelom zvýšenia afinity, integríny sú následne oligomerizované a spoja sa s cytoskeletom bunky. Pri *antigénovom rozpoznávaní*, je špecifikácia cieľovej bunky pravdepodobne daná kombináciou antigénov a molekúl MHC I a II. triedy. MHC molekuly sú exprimované na povrchu exozómov v závislosti na rodičovských bunkách (Wang a kol. 2017). Môžeme teda tvrdiť, že exozómy produkované rôznymi tkanivami majú rôzne cieľové bunky.

2.4.5. Vychytávanie exozómov

Niektoré štúdie ukazujú, že vychytávanie exozómov je proces, ktorým sú exozómové signály prenesené do recipientnej bunky pomocou trojkrovového mechanizmu: receptorová interakcia, membránová fúzia a endocytóza/fagocytóza. Mnohé štúdie poukazujú na možnosť špecifického rozpoznávania proteínov na povrchu exozómov a buniek (Wang a kol. 2017, Kim a kol. 2016).

2.4.6. *Odvodené exozómy*

Štúdie ukázali, že exozómy získané z rôznych štruktúr majú rôzne úlohy.

Exozómy pochádzajúce z makrofágov. Makrofágy svojou schopnosťou fagocytovať hrajú dôležitú úlohu v imunitnej odpovedi organizmu. Výskum ukázal, že exozómy získané z makrofágov prechádzajú cez HEB do mozgového parenchymu živých myši. Pravdepodobne receptor lektínu c-typu sprostredkoval proces absorpcie v ľudských mozgových mikrovaskulárnych endoteliálnych bunkách, používané ako modelové bunky pri výskume funkcií HEB. Tieto exozómy by teda mohli byť vhodné ako nosič terapeutík pri liečbe ochorení mozgu (Yuan a kol. 2017). Iným príkladom štúdie je výskum paklitaxelu (PTX) a doxorubicínu (DOX) začlenených do exozómov a ich zhodnej lokalizácie s pľúcnyimi metastázami (Kim a kol. 2016).

Exozómy získané z osteoklastov. Osteoklasty sú veľké viacjadrové bunky špecializované na kostnú resorpciu. Počas procesu osteoklastogenézy sú vylučované exozómy, ktoré majú úlohu inhibovať aktivitu osteoblastov (Neesse a kol. 2010).

Exozómy získané z bronchiálnych fibroblastov. Fibroblasty hrajú kľúčovú úlohu pri zápaloch dýchacích ciest tým, že exprimujú rad cytokínov a adhézných molekúl a tiež pri infiltrácii a aktivácii eozinofilov a iných leukocytov. Haj-Saleem a kol. skúmali úlohy exozómov z bronchiálnych fibroblastov. Je možné konštatovať, že exozómy získané z týchto buniek zohrávajú úlohu posla pri zvýšenej proliferácii epitelu dýchacích ciest v prípade ťažkej astmy a môžu prispievať k prestavbe dýchacích ciest, aspoň čiastočne, moduláciou epitelových buniek (Haj-Saleem a kol. 2017).

Exozómy derivované z mezenchymálnych kmeňových buniek (MSC). Exozómy odvodené od MSC sú vysoko obohatené o biologicky aktívne molekuly, ako sú proteíny a RNA, a preto sú dobre vybavené na udržiavanie homeostázy v tkanive a reagujú na vonkajšie podnety, majú potenciálne terapeutické vlastnosti pri ochorení pečene a vykazujú ochranný účinok proti poškodeniu myokardu (Szabo-scandic 2019).

Exozómy spôsobené Rhabdomyosarkómom (RMS). RMS je klasifikovaný ako najbežnejší sarkóm mäkkých tkanív u detí a dospievajúcich a je formou nádoru s charakteristickými črtami línia kostrových svalov. Bunky RMS produkujú exozómy, ktoré nesú informáciu vo forme RNA a môžu ovplyvňovať angiogenézu a proliferáciu ľudských fibroblastov (Sung a Weaver 2017).

Exozómy získané z metastatických rakovinových buniek podporujú tvorbu buniek a adhéziu. Tieto exozómy majú agresívny charakter a môžu nie len podporovať metastázy, ale aj ovplyvňovať ešte zdravé bunky (Nabavi a kol. 2017).

Exozómy získané z malígneho mezoteliómu. Zhubný mezotelióm, ktorý pochádza z neregulovanej bunkovej proliferácie výstelky mezodermálneho tkaniva - hrudná dutina, srdce, pľúca, brušná dutina a intraabdominálne orgány, je zriedkavým typom rakoviny. Ukázalo sa, že exozóm pochádzajúci z ľudských malígných mezoteliómových buniek má imunoregulačnú funkciu počas progresie rakoviny, regulujú recipientné bunky nádorového mikroprostredia a obsahujú faktory spojené s metastázami (Abdelmagid a kol. 2015).

Exozómy vyvolané rakovinou pankreasu. Rakovinové bunky pankreasu produkujú exozómy, ktoré preprogramujú bunky v okolí nádoru a zvyšujú proliferáciu a migráciu rakovinových buniek (Haj-Salem a kol. 2017)

2.4.7. Význam

Význam exozómov sa stále skúma. Štúdie ukazujú, že exozómy môžu zohrávať viaceré funkcie ako aj za fyziologických, tak aj patologických podmienok.

Exozómy uvoľnené z extracelulárneho prostredia sa viažu na receptory na povrchu buniek a/alebo môžu byť internalizované do cieľovej bunky – dôjde k ich fúzii. Obsah exozómov vrátane špecifických proteínov, lipidov a nukleových kyselín pochádzajúcich z pôvodných buniek (zdravé, nádorové, infikované) potom dokáže podnecovať rôzne typy vnútrobunkovej signalizácie. Exozómy sa preto považujú za sprostredkovateľov medzibunkovej komunikácie (Zitvogel a kol. 1998).

Exozómy vylučované antigén prezentujúcimi bunkami aktivujú T-lymfocyty (T-ly), a teda aktivujú imunitnú odpoveď (Lou a kol. 2017).

Kvôli svojej schopnosti prenášať svoje „dávky“ do iných buniek sa exozómy považujú za prispievajúce faktory rôznych chorôb. Napríklad môžu transportovať Ap amyloidy, proteín tau, prióny a mnoho ďalších látky spojené s neurodegeneratívnymi chorobami (Raposo a kol. 1996, Bobrie a Théry 2013). V štúdiu Taieb a kol. ukázali, že exozómy z dendritických buniek (DEX) nesú MHC/ peptidové komplexy schopné posilniť primárnu T-ly odpoveď a odvrhnutie nádoru v prítomnosti adjuvantných látok. Kombinačné štúdie cyklofosfamidu s DEX v absencii adjuvantných látok na myšiach s vyvolanými nádormi potvrdili silný antigén-závislý protinádorový efekt (Taieb a kol. 2006) .

Ďalšou dôležitou vlastnosťou exozómov je ich schopnosť prechádzať cez hematoencefalickú bariéru *in vivo* aj *in vitro*. Štúdie *in vivo* naznačujú, že exozómy podávané injekčne, intravenózne alebo nazálne prechádzajú do mozgových buniek (Yuyama a Igarashi 2017, Taieb a kol. 2006, Yuan a kol. 2017).

Exozómy sú autológne tvorené v tele pacienta, môžu byť navrhnuté tak, aby niesli liečivo alebo cieľové proteíny bez vyvolania imunitnej odpovede (Zeringer a kol. 2015).

2.5. Štúdium exozómov

2.5.1. Metódy izolácie exozómov

Centrifugačné, filtračné a imunoafinitné metódy sa na izoláciu exozómov používajú najčastejšie. Hlavná pozornosť sa venuje získaniu čistých a kvalitných exozómov (Li a kol. 2017).

2.5.1.1. Diferenciálna centrifugácia

Preparatívna ultracentrifugácia je obecnou najpoužívanejšou metódou izolácie exozómov a iných bunkových komponentov. Princípom je rozdeľovanie zložiek zmesi pomocou odstredivej sily a postupné usádzanie jednotlivých zložiek na základe ich hustoty, veľkosti a tvaru. Príkladom je diferenciálna centrifugácia, ktorá je zostavená zo série centrifugačných cyklov líšiacich sa rýchlosťou a dĺžkou trvania centrifugácie a zabezpečujúce dôkladné oddelenie exozómov od ostatných zložiek zmesi. Nevýhodou tejto metódy sú nízke výťažky s nízkou čistotou v dôsledku kontaminácie rôznych agregátov a lipoproteínov. Preto býva často spojená s druhým typom centrifugácie - centrifugáciou v hustotnom gradiente sacharózy, ktorá zabezpečí vyššiu čistotu oddelením exozómov a peptidových agregátov. Hoci je táto metóda najpoužívanejšia, má mnoho nevýhod, vyžaduje veľké objemy vzoriek, je časovo náročná, má nízke výťažky a navyše môže dochádzať k poničeniu vezikúl v dôsledku vysokých rýchlostí centrifugácie (Campoy a kol. 2016, Contreras-Naranjo a kol. 2017).

2.5.1.2. Izolácia podľa veľkosti častíc - ultrafiltrácia

Komerčné membránové filtre alebo polykarbonátové plechovky sa používajú na izoláciu buniek a veľkých extracelulárnych vezikúl (EV) v biologických vzorkách. Metódy filtrácie sa často kombinujú s ultracentrifugáciou. Samotná izolácia sa uskutočňuje na filtri s definovanou veľkosťou pórov. Ultrafiltrácia oproti ultracentrifugácii má výhodu v kratšom čase potrebnom k uskutočneniu tejto metódy, vo vyššej čistote získaných exozómov a nevyžaduje žiadne špeciálne prístroje. Nevýhodou je používanie sily na pretlačenie vzorky cez filter, čo môže viesť k poškodeniu a roztrhnutiu väčších vezikúl, ktoré následne kontaminujú výsledný roztok a blokujú póry filtra proteínmi, ktoré adherujú na povrch membrány a bránia elúcii exozómov (He a kol. 2018, Diaz a kol. 2018).

2.5.1.3. *Zachytávacie metódy izolácie na základe afinity*

Tieto metódy využívajú to, že na povrchu exozómov sa nachádza veľké množstvo proteínov a receptorov, ktoré vystupujú ako antigény a môžu sa na ne teda naviazať ich špecifické protilátky. Uplatňuje sa to napríklad pri analytickej metóde ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), pomocou ktorej sa zachytávajú exozómy a zároveň sa spektrofotometricky alebo fluorescenčne kvantifikujú. Boli vyvinuté aj špeciálne, protilátkami pokryté magnetické guľičky, ktoré predstavujú jednoduchý a rýchly spôsob získavania exozómov (Campoy a kol. 2016)

2.5.1.4. *Exozomálna precipitácia*

Táto metóda sa používa už viac ako 50 rokov na izoláciu vírusov, či iných makromolekúl. Typicky sa používa precipitačný roztok s obsahom polyetylén glykolom (PEG) s molekulárnou hmotnosťou 8 000 Da. Tento roztok sa inkubuje s biologickým materiálom cez noc pri +4°C. Zmes sa potom centrifuguje na nízkej rýchlosti za vzniku peliet s exozómami. Výhodou tejto metódy je, že nevyžaduje špecializované zariadenia, je relatívne jednoduchá a časovo nenáročná. Nevýhodou je kontaminácia lipoproteínmi ako aj agregátmi. Tieto nedostatky môžeme minimalizovať pre- a post- izolačnými krokmi. Pre- izolačný krok zahŕňa typicky odstránenie subcellulárnych častí, napríklad lipoproteínov, centrifugáciou. Post-izolačný krok odstraňuje polymér použitím Sephadex G-25 column (Contreras-Naranjo a kol. 2017).

2.5.1.5. *Mikrofluidná izolácia exozómov*

Tieto metódy dokážu rýchlo a efektívne separovať exozómy a využívať fyzikálne a biochemické vlastnosti exozómov. Okrem bežných prístupov, ako je veľkosť, hustota a imunoafinita, je možné implementovať inovatívne mechanizmy triedenia, ako sú akustické, elektroforetické a elektromagnetické manipulácie. Pri použití týchto zariadení sa očakáva významné zníženie objemu vzorky, spotreby činidla a čas izolácie (Creative-biolabs 2020)

2.5.2. *Metódy purifikácie exozómov*

Použitím purifikačnej metódy sa zvyšuje kvalita získanej vzorky exozómov a tiež koncentrácia. Týmito metódami sú ultracentrifugácia a mikrofiltrácia, rozmerovo- vylučovacia chromatografie (SEC) a imunoafinitné zachytávanie (Ko a kol. 2016).

2.5.2.1. *Ultracentrifugácia a mikrofiltrácia*

Ultracentrifugácia sa všeobecne považuje za štandardnú metódu izolácie extracelulárnych vezikúl. Táto technika oddeľuje vezikuly od ostatných zložiek vzorky v závislosti od ich rýchlosti sedimentácie, ktorá je väčšinou určená veľkosťou a hustotou. Vo všeobecnosti existujú tri hlavné kroky na oddelenie exozómov ultracentrifugačnou metódou. Najskôr sa pelety s bunecnými zvyškami odstreďujú pomalou odstredivou rýchlosťou (300 x g). Potom pelety s väčšími vezikulami (apoptické telieska a niektoré väčšie mikročastice) pri rýchlejšej centrifugačnej rýchlosti (1 000 - 20 000 x g) a nakoniec sa môžu malé vezikuly (exozómy a menšie mikročastice) peletovať pri veľmi vysokej rýchlosti odstredovania (100 000 x g) (Ko a kol. 2016).

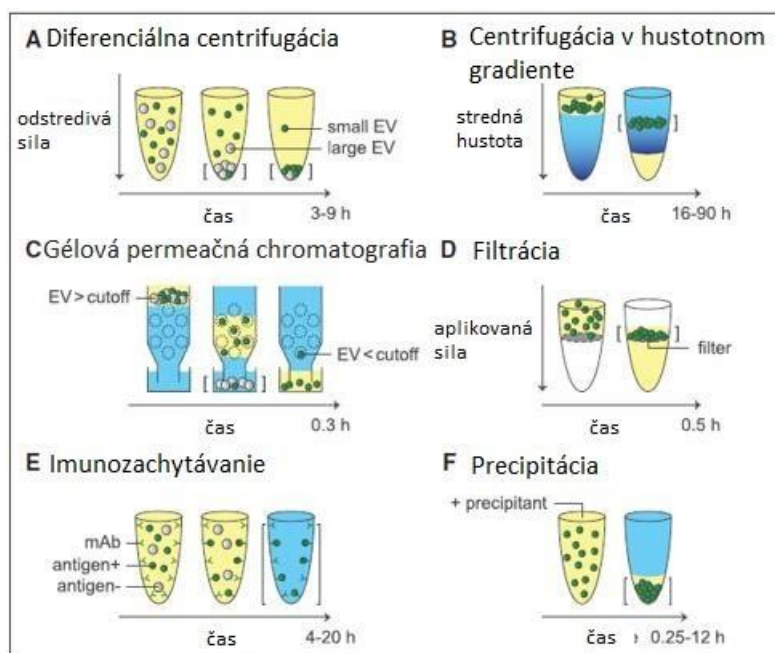
Mikrofiltrácia je metóda izolácie/čistenia, ktorá využíva hydrofilizovanú polyvinylidéndifluoridovú membránu na ľahké čistenie exozómov zo vzoriek so zníženou spoločnou purifikáciou hojných neexosomálnych proteínov. Často sa používa v spojení s ultracentrifugáciou namiesto prvého a druhého zatočenia, aby sa získal produkt, ktorý je bez nežiadúcich kontaminantov. Táto metóda môže zvýšiť purifikáciu a integritu exozómov (Ko a kol. 2016, Creative-biolabs 2020).

2.5.2.2. *Rozmerovo-vylučovacia chromatografia (SEC)*

SEC umožňuje separovať komponenty vzorky na základe diferenciálnej rýchlosti pohybu cez gélovú maticu komponentov rôznych veľkostí. Čím je zložka menšia, tým viac je schopná preniknúť do gélovej matrice, čím dlhšie zostáva v kolóne a potom je eluovaná. V súvislosti s izoláciou exozómov môžu byť vezikuly oddelené od menších kontaminantov proteínov a nukleových kyselín. Typicky, keď sa na prepravu vzorky cez kolónu použije vodný roztok, je táto technika známa ako gélová filtračná chromatografia alebo gélová permeačná chromatografia. Chromatografická kolóna je naplnená jemnými poréznymi guľôčkami, ktoré sú zložené z dextránových polymérov (Sephadex), agarózy (Sephacryl) alebo polyakrylamidu (Sephacryl alebo BioGel P). Veľkosť pórov týchto guľôčok sa používa na odhad rozmerov makromolekúl. V procese čistenia exozómov SEC funguje ako dobrý nástroj, ktorý môže extrahovať exozómy s vysokým výťažkom a vysokým čistením. Okrem toho kombinácia SEC a ultrafiltrácie alebo ultracentrifugácie môže významne obohatiť exozómy z rôznych vzoriek (Ko a kol. 2016, Sharma a kol. 2018).

2.5.2.3. *Imunoafinitné zachytávanie*

Imunoafinitné zachytávacie metódy používajú guľôčky potiahnuté protilátkami na selektívnu izoláciu vezikúl vykazujúcich požadovaný povrchový marker. Predkoncentrované vzorky extracelulárnych vezikúl sa inkubujú s magnetickými guľôčkami potiahnutými protilátkou proti cieľovému markeru, čo umožňuje špecifický rozpad extracelulárnych vezikúl exprimujúcich cieľ na svojom povrchu. Exozómy sú vezikuly, ktorá na svojom povrchu majú rôzne membránové proteíny a receptory a je teda možné vyvinúť metódu, ktorá bude využívať interakcie medzi receptormi a ligandmi a medzi proteínmi (antigénmi) a ich protilátkami. V súčasnosti boli na povrchu exozómov identifikované množstvo špecifických molekúl ako je CD63, CD81, CD82, CD9, Alix, anexín, EpCAM a Rab5. Protilátky proti týmto povrchovým markerom by mohli byť imobilizované na rôznych médiách, vrátane magnetických guľôčok, chromatografických matric, platní a mikrofluidných zariadení na exozómové zachytenie. Napríklad CD34 je jedinečný biomarker blastov akútnej myeloidnej leukémie (AML). Protilátky proti CD34 môžu byť potiahnuté na magnetických mikrogulôčkach na čistenie exozómov z plazmy pacientov s AML pomocou imunoafinitnej interakcie medzi CD34 a ich protilátkami. Táto technológia sa tiež používa na izoláciu a čistenie exozómov odvodených od konkrétneho typu bunky, ako sú napríklad nádorové bunky. Predkoncentrované vzorky extracelulárnych vezikúl sa inkubujú s magnetickými guľôčkami potiahnutými protilátkou proti cieľovému markeru, čo umožňuje špecifický rozpad extracelulárnych vezikúl exprimujúcich cieľ na svojom povrchu. Výhodou tejto technológie je, že produkuje čisté a homogénne výtázky exozómov. Tento konštrukčný prístup však vylučuje zachytenie potenciálne biologicky relevantných subpopulácií, ktoré neexprimujú konkrétny požadovaný povrchový marker (Yang a kol. 2017).



Obr. 3. Princíp metód izolácie a purifikácie EV. (Prebraté od Creative-biolabs 2020)

2.5.3. Metódy analýzy obsahu exozómov

Po izolovaní exozómov je nutné dokázať ich prítomnosť. Najčastejšie sa používa transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) využívajúca usmernený tok elektrónov cez vzorku. Časť elektrónov je pohltenej vzorkou a zvyšok, ktorý prejde vytvára obraz pomocou určitej zobrazovacej metódy. V prípade, že sa vo vzorke nachádzajú 30 – 150 nm veľké vezikuly, odpovedajúce veľkosti exozómov, je možné prejsť analýze ich obsahu (Sharma a kol. 2018).

Najdôležitejšie zložky exozómov sú exozomálne proteíny a RNA. Na stanovenie proteínov sa používa hmotnostná spektrometria, ktorá stanovuje zloženie a chemickú štruktúru a imunoanalytické metódy Western blotting a ELISA, ktorými sa detekuje prítomnosť určitých proteínov a stanovuje sa ich koncentrácia. Celkový obsah proteínu sa tiež dá stavať použitím Bradfordovho činidla a stanovením absorbančie medzi 465 nm a 595 nm. Bradfordovo činidlo obsahuje modré farbivo, ktoré sa dokáže viazať na bielkoviny a vytvoríť s nimi stabilný komplex, ktorý môže byť detekovateľný (Coby a kol. 2005). Pri RNA sa spektrofotometrom NanoDrop určí jej koncentrácia, potom môže byť RNA reverznou transkriptázou prepísaná do cDNA a tá môže byť amplifikovaná prostredníctvom kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie a môže byť stanovená jej sekvencia (Bu a kol. 2018, Fang a kol. 2017).

2.5.4. Metódy kvantifikácie exozómov

Analýza pohybu nanočastíc. Táto metóda analyzuje Brownov pohyb prostredníctvom rozptylu svetla na zistenie veľkosti nanočastíc v kvapalnej suspenzii. Častice v suspenzii prechádzajú prietokovou komorou a sú osvetlené laserovým zdrojom. Rozptyl svetla vyrobený z tohto záznamu sa zaznamenáva pomocou videokamery.

Laditeľné odporové pulzné snímanie (TRPS). Metóda detekuje priechod jednotlivých častíc cez póry v membráne a funguje podobne ako Coulterov počítač. Detekcia TRPS poskytuje informácie o koncentrácii aj veľkosti.

ELISA. Exozómy sa zachytávajú na dne mikrojамky a množstvo biomarkera sa detekuje protilátkami, ktoré generujú fluorescenčný alebo kolorimetrický signál.

Prietoková cytometria. Prietoková cytometria deteguje častice suspendované v tekutine ich interakciou s laserovým lúčom pri ich tečení cez detekčnú bunku. Ak využijeme fluorescenčné farbenie markerov špecifických pre dané vezikuly, môžeme túto metódu využiť na stanovenie počtu vezikúl prítomných vo vzorke.

Rezonancia povrchovej plazmy. Senzory založené na povrchu sa používajú na stanovenie koncentrácie vezikúl v roztoku meraním rýchlosti príchodu vezikúl na povrch senzora v podmienkach obmedzeného hromadného transportu. Za týchto podmienok je počiatočná rýchlosť väzby priamo úmerná koncentrácii a difúznemu koeficientu vezikúl (Johnsen a kol. 2014).

2.5.5. Naplnenie exozómov liečivom

Naplnenie exozómov využíva niekoľko rôznych prístupov.

2.5.5.1. Naloženie naivných exozómov izolovaných rodičovských buniek *ex vitro*.

Väčšinou je princípom spoločná inkubácia malých lipofilných molekúl a exozómov alebo im podobných vezikúl. Príkladmi môže byť vloženie kurkumínu, doxorubicínu alebo paklitaxelu pri izbovej teplote. Náplň liečiva sa pohybovala od 7,2 % pre PTX, do 11,7 % pre DOX. Relatívne nízku nosnosť týchto nosičov môžeme vysvetľovať tak, že exozómy nie sú prázdne, ale nesú už vlastne proteíny a nukleové kyseliny (Li a kol. 2017, Campoy a kol. 2016).

Elektroporácia. Aplikáciou elektrického poľa na suspenziu exozómov (alebo buniek) a zvoleného terapeutického nákladu sa tvoria póry do lipidovej dvojvrstvy membrány, čo uľahčuje pohyb nákladu do vnútra exozómov. Následná jednoduchá inkubácia exozómov s nákladom umožní vstup terapeutického nákladu do exozómu. Napríklad kurkumín bol efektívne vložený do exozómov iba po piatich minútach inkubácie pri teplote 22 °C a bolo preukázané, že sprostredkujú významné protizápalové účinky na niekoľkých modeloch chorôb, ako je mozgový zápal, autoimunitné ochorenie a nádory mozgu (Zhuang a kol. 2011, Jiang a kol. 2017).

Sonifikácia. Ďalším spôsobom naloženia nákladu do exozómov je pomocou ultrazvuku. Sonifikuje sa zmes liekov s exozómami šiestimi cyklami po dobu 30 s, celkovo tri minúty, nasledované dvojminútovým ochladením, ktoré malo za následok účinné plnenie liečiva do exozómov. Vzhľadom na veľkosť zeta potenciálu a množstvo liečiva, nedochádza k žiadnym významným zmenám v štruktúre a obsahu exozómálnej membrány po sonikácii. Rozsiahla reformácia a zmena tvaru exozómov po sonikácii umožnili difúziu katalázy napriek relatívne pevnej a vysoko štruktúrovanej lipidovej dvojvrstvy a viedlo k vysokej účinnosti zaťaženia exozomálnych nosičov (nosnosť 20–26 %) (Wei a kol. 2017).

Chladienie/zahrievanie. Inou možnosťou plnenia exozómov liečivom je rôzne použitie cyklov striedania chladenia a ohrievania vzorky.

2.5.5.2. *Naplnenie rodičovských buniek liekom, ktorý sa potom uvoľňuje v exozómoch.*

Na naplnenie sa použije jednoduchá inkubácia buniek a liečiv. Bola skúmaná inkubácia HepG2 buniek (ľudského hepatocelulárneho karcinómu) s rôznymi latkami (etoposid, irinotecan, karboplatina) a boli zaznamenané významné produkcie exozómov s inkorporovanými látkami (Fang a kol. 2017)

2.5.6. *Modifikácie exozómov*

V súčasnosti majú nanosystémy na úrovni dodávania liečiv značný význam. Na zlepšenie terapeutického účinku sa dnes používajú rôzne liekové formulácie na nanobáze. Exozómy ako komunikačné prostriedky bunky, schopné prenášať svoj obsah naprieč organizmom, získali pozornosť vedcov. Preukázali výhodu v biologickej kompatibilite, nakoľko prenášajú endogénny biologický materiál (RNA, proteíny) (Thian a kol. 2018).

2.5.6.1. *Povrchová modifikácia*

Tian a kol. navrhol jednoduchý, rýchly a účinný spôsob konjugácie funkčných ligandov na exozomálne povrchy pomocou bioorthogonálneho azidalkynylového cykloadície. Cyklický (Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys) peptid [c (RGDyK)], ktorý vykazuje vysokú afinitu na integrín $\alpha v P3$ v reaktívneho mozgového vaskulárneho endotelu bunky po ischémii, bol konjugovaný na povrchu exozómu. Výsledok ukazuje, že modifikované exozómové molekuly vykazovali väčšiu akumuláciu v ischemickom mozgu v porovnaní s nemodifikovanými exozómovými molekulami (Tian a kol. 2018).

2.5.6.2. *Exozómy kombinované s fuzogénnym peptidom citlivým na pH a kationový lipid na cytosolové podávanie*

GALA je peptid zložený z opakujúcich sa sekvencií Glu Ala-Leu-Ala, s amfifílnou štruktúrou, a teda citlivosťou na pH. Často sa používa na zlepšenie účinnosti transfekcie. Na rozdiel od GALA, kationové lipidy ovplyvňujú rôzne vlastnosti DNA-kationového lipozómu komplexov a zohrávajú veľmi dôležitú úlohu v efektívnom prenose génov. Pre terapeutickú liečbu sa však takáto možnosť ukázala ako nedostatočná (Kim a kol. 2018).

2.5.6.3. *Exozómové inžinierstvo s PEG a AA pre pľúcne metastázy*

Posledný výskum sa sústredil na pokus prekonať nemalobunkový karcinóm pľúc pomocou technológie nanonosičov. V tomto výskume bol modifikovaný exozóm s paklitaxelom PEG a AA (ligand) pre zlepšenie cirkulácie v krvi a umožnil zacielenie na pľúcne metastázy. Použitím tohto modifikovaného exozómu môže liečivo selektívne doručiť na cieľové rakovinové bunky a tiež môže zvýšiť mieru prežitia pacientov s rakovinou pľúc (Sato a kol. 2016).

2.5.6.4. *Exozómy fuzované s lipozómami*

Na zvýšenie dodacej funkcie exozómov, Sato a kol. sa pokúsil posilniť membrány exozómov s lipozómami metódou zmrazovania a rozmrazovania. Výsledok štúdie naznačuje, že takto fuzované exozómy sa môžu použiť na transport exogénnych hydrofóbných lipidov a tiež hydrofilných látok (Sato a kol. 2016).

2.5.6.5. *Nanočastice s kovovo-organickou kostrou pokrytou exozómami*

Kovovo-organické štruktúry (MOFs) sú hybridné zlúčeniny s jedno, dvoma alebo trojrozmernou štruktúrou, ktoré pozostávajú z anorganických iónov/zhlukov kovov a organických ligandov. V roku 2017 Illes a spolupracovníci kombinovali MOF

s exozómom. Výsledky ukázali, že exozóm potiahnutý MOF je inteligentný a efektívny systém dodávania liekov (Schindler a kol. 2019).

2.5.7. Terapeutické účinky exozómov naplnených liečivom

Dodávací systém založený na exozómovoch má osobitné výhody, ako napríklad špecifickosť, bezpečnosť a stabilita. V súčasnosti záujem o exozómy rastie pre ich schopnosť prechádzať z jednej bunky do druhej bunky a to aj cez najt'ažšie membrány, akou je hematoencefalická bariéra. Skutočnosť, že exozómy sú prírodné produkty tela má za následok nízku imunitnú odpoveď. Exozóm môže tiež vykazovať zvýšenú stabilitu v krvi, ktorá im umožňuje cestovať na veľké vzdialenosti v rámci tela za fyziologických aj patologických podmienok. Ďalej exozómy majú hydrofilné jadro, vďaka čomu sú vhodné pre použitie u liečiv rozpustných vo vode (Wei a kol. 2017). Teda sa môžu využívať ako donory liečiva do cieľových buniek. V jednom z prvých výskumov sa ukázalo, že exozómy naplnené kurkumínom chránia myši pred zápalom mozgu. Takýto spôsob podania zlepšilo vlastnosti kurkumínu: zlepšenie rozpustnosti, predĺženie času cirkulácie, zachovanie terapeutickkej aktivity (He a kol. 2018). Iné štúdie, s paklitaxelom (PTX) alebo doxorubicínom (DOX), ukázali podobné zlepšenie v prieniku do nádorových tkanív (Diaz a kol. 2018).

Exozómy môžeme použiť na zacielenie exozómov do miesta ochorenia. Napríklad exozómy, produkované bunkami geneticky pozmenenými bunkami tak, aby exprimovali membránový proteín (Lamp2b) fúzovaný s neurónovo špecifickým peptidom odvodeným z glykopeptidu vírusu besnoty, dodávali si RNA GAPDH do neurónov a viedli k knockdownu špecifického génu. Takto sa môžu knockdownnúť gény, ktoré sú terapeutickými cieľmi Parkinsonovej alebo Alzheimerovej choroby (Momen-Heravi 2013).

2.5.8. Klinické využitie exozómov

Existuje niekoľko prístupov na zavedenie exozómov s liečivom. Napríklad leukocyty zozbierané z krvi sa môžu kultivovať, rozmnožiť, prípadne diferencovať, potom sa exozómy naplnia liečivom a znovu sa podajú pacientovi. Je dôležité, aby produkcia exozómov bola škálovateľná alebo reprodukovateľná, nakoľko konečný výťažok môže ovplyvniť výrobné náklady aj klinické aplikácie, teda je dôležitý výber rodičovských buniek. Napríklad MSC produkujú veľa exozómov, teda môžu byť použiteľné na ich produkciu (Contreras-Naranjo a kol. 2017). Alebo môžeme zmeniť podmienky kultivácie (pH, dobu) alebo použiť bioreaktory (Creative-biolabs, 2020). Ďalej môžu byť exozómy

izolované z kostnej drene alebo z iných zdrojov (bovine milk). Obecne platí, že terapie s využitím exozómov sú bezpečné, účinné, a uskutočniteľné. Príkladom je štúdia , kde pacientom s karcinómom pľúc aplikovali autologné exozómy naplnené antigénom a pozorovali sa imunitné reakcie (Ko a kol. 2016).

3. Ciele práce

- Izolácia exozómov makrofágov (stanovenie podmienok, porovnanie metód izolácie, vyhodnotenie kvalitatívnych a kvantitatívnych charakteristík).
- Charakterizácia exozómov (vzhľad, veľkosť, prítomnosť exozómovo špecifických markerov).
- Testovanie a výber metódy plnenia exozómov liečivami, tak aby nedošlo k narušeniu štruktúry exozómov.
- Štúdium stability exozómov s protirakovinovými látkami a uvoľňovanie účinných látok.
- Porovnanie účinnosti voľnej formy protirakovinového liečiva a liečiva naplneného v exozóme.
- Štúdium zavedenia exozómu a prechodu cez hematoencefalickú bariéru.

4. Metódy a materiál

4.1. Kultúra makrofágov

Leukemická monocytová línia (THP-1) sa použila na prípravu kultúry ľudských makrofágov. RPMI médium 1640 - GlutaMAX™ -I médium (Thermo Fisher Scientific) doplnené 1 mM Na pyruvátom a 10 % teľacie sérum bez exozómov (Thermo Fisher Scientific) a 1 000 IU/ml penicilín-streptomycínu (Gibco®, Thermo Fisher Scientific). THP-1 sa pestuje v 75 cm² (15 – 20 ml média) liekovkách na tkanivové kultúry pri 37 °C (inkubátor New Brunswick Galaxy 170S, Eppendorf), až kým usadené bunky nepokryjú 65 až 75 % dna liekovky. Na vyvolanie bunkovej diferenciácie sa bunkové médium zmenilo na médium Macrophage-SFM (Thermo Fisher Scientific) s 200 nM forbolmyristátu acetátu (PMA, Sigma-Aldrich) a nechalo sa 24 hodín. Počas tejto doby sa monocyty THP-1 diferencujú na makrofágy. Nediferencované bunky (neadherujúce, okrúhle) sa premyjú zmenou média na Macrophage-SFM bez PMA a udržiavajú sa v inkubátore počas 48 h. Po uplynutí tejto doby sa bunkové médium zhromaždí na izoláciu exozómom.

Primárne peritoneálne hlodavce makrofágy sa zbierali z 2 - 4 mesačných myší BALB/c a samcov potkanov Wistar (vivárium LSMU), ako opísali Lu a Varley, s malými modifikáciami podľa protokolu (Lu a kol. 2013). Stručne, 5 ml roztoku PBS sa injektovalo intraperitoneálne do peritoneálnej dutiny po anestézii plynným CO₂ a preťatím miechy. Brucho sa jemne masíruje 15 až 30 s a peritoneálna tekutina sa zbiera striekačkou do 15 ml centrifugačnej skúmavky a rotuje pri 300 x g počas 5 min pri 4 °C (odstredivka Biosan BS-010212-AAA). Guľôčky boli resuspendované v RPMI médiu doplnenom 10 % teľacieho séra, 20 ng/ml faktora stimulujúceho kolónie makrofágov a 100 IU/ml penicilín-streptomycínu a naočkované do liekoviek s tkanivovými kultúrami s plochou 75 cm². Počet liekoviek závisí od výťažku bunky. Výsledná suspenzia sa zriedila na 10⁵ buniek/ml a výsledný objem sa rozdelil do 15 až 20 ml/liekovka. Bunky boli uložené v inkubátore (New Brunswick Galaxy 170S, Eppendorf) pri 37 °C a 5 % CO₂. Po 16 h sa bunky trikrát premyli v médiu, aby sa odstránili bunky bez makrofágov. Makrofágy boli pestované na konfluenciu 75 až 85 %, potom boli premyté v médiu Macrophage - SFM (Thermo Fisher Scientific) a ďalej kultivované v tomto médiu na exozómové zhromažďovanie počas 48 h.

4.2. Metódy izolácie exozómov

Izolácia exozómov ultracentrifugáciou

Bunkové kultivačné médium bolo odstredené pri 2000 x g (LMC - 4200R Biosan odstredivka), výsledný supernatant bol ďalej centrifugovaný pri 10 000 x g (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific) a výsledný supernatant bol odstredený v 100 000x g ultracentrifúge (Sorvall WX 80, T1270, Thermo Fisher Scientific), 90 min pri 4 °C. Supernatant sa odstráni a peleta (exozóm) sa suspenduje v 500 µl fosfátového tlmivého roztoku (PBS, Thermo Fisher Scientific). Výsledný roztok bol filtrovaný (veľkosť pórov 0,22 µm, PVDF, Merck) a znovu odstredovaný 90 min pri 100 000 x g, 4 °C. Výsledné exozómy boli resuspendované v 100 µl PBS.

Separácia exozómov chromatografiou

Médium bunkovej kultúry sa nechalo prejsť vylučovacími chromatografickými stĺpcami qEV10/35 nm (IZON) podľa protokolu výrobcu. Po zahriatí kolóny na teplotu miestnosti bola táto kolóna namontovaná na stojan v komore s laminárnym prúdením a premytá pufrom pozostávajúcim z PBS s 0,05 % NaN₃ a prefiltrovaná cez filter s veľkosťou pórov 0,22 µm. Vzorka exozómu bola prvýkrát odstredená pri 1500 x g počas 10 min (LMC-4200R Biosan) a výsledný supernatant bol znovu centrifugovaný pri 10 000 x g počas 10 min (Heraeus Megafuge 16R). Supernatant sa naniesie na kolónu a zhromaždia sa frakcie s objemom 0,5 ml. Zhromaždilo sa 50 takýchto frakcií. Každá získaná druhá frakcia sa stanovila Bradfordovou metódou pre celkový obsah proteínov. Porovnanie výsledkov získaných s exozómovo špecifickou výstupnou zónou poskytnutou výrobcom ukazuje, že elúcia exozómu je najpravdepodobnejšia pri frakciách 15 – 18 ml. Frakcie zhromaždené vo frakciách od 13 ml do 20 ml boli skontrolované pomocou Zetasizer. Frakcie obsahujúce častice medzi 35 a 180 nm sa zhromaždili a skoncentrovali vo filtračných skúmavkách Amicon Ultra-4 s prahom 10 kDa (Merck) filtráciou pri 4000 x g počas 10 min a 4000 x g počas 30 min (odstredivka, Thermo Fisher Scientific).

Izolácia exozómov ultrafiltráciou

Zozbierané kultivované bunkové médium sa prefiltrovalo cez 0,22 µm filter (PVDF, Merck) a odstredilo sa pri 4000 x g (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific) vo filtračných skúmavkách Amicon Ultra-15 s prahom 10 kDa (Merck) a koncentrovalo sa 30 min pri 4000 x g.

Izolácia exozómov zrážaním polyméru

Roztok na zrážanie polymérnych exozómov bol pripravený z 20 % Mr 6000 polyetylén glykolu (PEG, Sigma-Aldrich) jeho rozpustením v deionizovanej vode (MilliQ, Merck) v 1 M NaCl. Bunkové kultivačné médium sa odstredilo pri 2000 x g (LMC - 4200R Biosan odstredivka), potom sa dobre premiešalo s roztokom PEG v pomere 1:1 a inkubovalo sa pri + 4 °C počas 16 h. Výsledný roztok sa centrifugoval pri 2500 x g (LMC - 4200R Biosan) 1 h. Výsledný supernatant sa odstráni a skúmavky sa udržiavajú prevrátené cez filtračný papier, aby sa supernatant mohol dobre oddeliť. Peleta sa riedi v 100 – 500 µl PBS a pretrepáva sa s inzulínovou injekčnou striekačkou počas 5 min, aby sa adherentné exozómy rozdelili čo najhomogénnejšie.

4.3. Farbenie a príprava exozómov na výskum

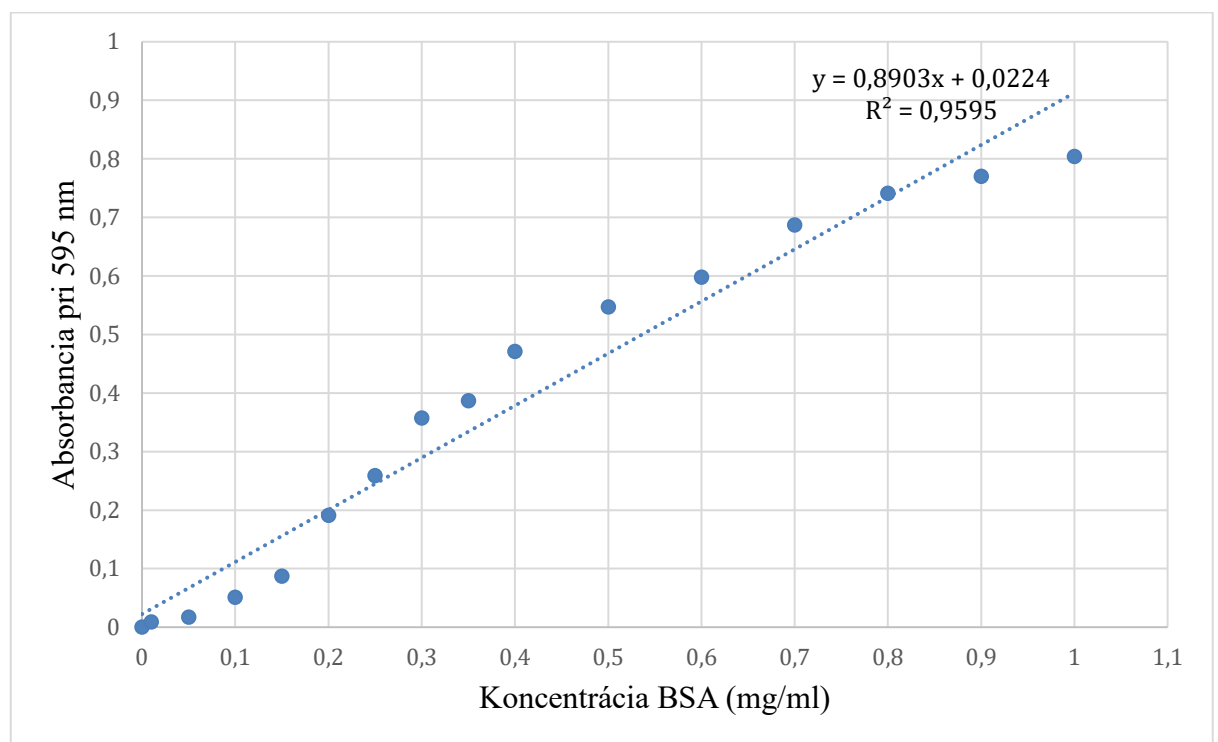
Farbenie exozómov vyžaduje Opti-MEM™ (Gibco™), lipofektamínové RNAiMAX transfekované činidlo (Invitrogen™) a RNA (Invitrogen™ BLOCK-iT™ Alexa Fluor™ Red Fluorescent Control, 20 µM), ktorý je označený fluórchrómom Alexa Fluor 555 a žiari po vstupe do exozómu vďaka väzbe s exozomálnou RNA. Jedna skúmavka (Eppendorf) s izolovanými exozómami zmiešame s 100 µl roztoku Opti-MEM, ktorý obsahuje 0,2 µM fluorescenčného farbiva a 3 µl lipofektamínu. Zmes sa inkubuje pri teplote miestnosti 5 min, potom sa naleje na exozómy a inkubuje sa cez noc pri 37 °C. Nasledujúci deň sa exozómová skúmavka odstreduje pri 10 000 x g počas 1 h (Heraeus™ Megafuge™ 16R). Supernatant sa odsaje, zlikviduje a exozómy sa suspendujú v 200 µl PBS. Táto zmes sa premiešava pomocou inzulínovej striekačky (1 ml U-100 0,35*13 mm N1) počas 10 min. Koncentrácia exozomálneho proteínu v roztoku sa stanoví Bradfordovou metódou a vybrané množstvo sa umiestni na bunky pestované na Petriho miskách na sklenenom dne (Eppendorf) na mikroskopické zobrazenie. Bunky s exozómami sa zobrazujú pomocou mikroskopu Axio Observer.Z1 (Carl ZEISS microscopy GmbH) (Nemecko). Sieť mitochondriálnych buniek je označená 500 nM MitoTracker Green (inkubované počas 30 min) a jadrá zafarbené 10 µg/ml Hoechst 33342 (inkubované počas 5 min).

Rovnaký protokol sa používa na prípravu exozómov na pozorovanie pomocou TEM.

4.4. Stanovenie koncentrácie exozómového proteínu pomocou Bradfordovej metódy

Bradfordovo činidlo je roztok Coomassie brilantnej modrej G-250 v kyseline fosforečnej a metanole. Kalibračná krivka je skonštruovaná tak, aby merala neznáme

množstvo proteínu meraním absorbancie známych koncentrácií hovädzieho sérového albumínu (BSA) a vynesení závislosti na množstve proteínu (Obr č.4.). Exozómy sa najskôr štiepia pomocou 1 % detergentu Triton X (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich), aby sa stanovila koncentrácia exozómu. Z tohto roztoku sa pridá 15 µl na 96-jamkovú doštičku a pridá sa 185 µl Bradfordovho činidla. Triton v konečnom objeme s Bradfordovým činidlom je 0,03 %. Doska sa zabalí do fólie, nechá 10 min stáť. Absorpcia svetla v roztokoch sa meria spektrofotometrom (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™) pri 595 nm. Podľa skonštruovanej kalibračnej krivky sa určí obsah exozómov.



Obr.4. Kalibračná krivka je určená na stanovenie koncentrácie proteínu pomocou Bradfordovej metódy

4.5. Stanovenie exozómovo špecifických markerov

Exozómové prípravky sa identifikovali pomocou špecifických exozómovo špecifických markerov CD9, CD63 a CD81 pomocou súprav ELISA (Abbexa) podľa protokolu výrobcu a snímača doštičiek (Tecan Infinite Pro M NanoPlex).

4.6. Príprava a pozorovanie exozómov pomocou trasmisívneho elektrónového mikroskopu

Exozómová vzorka sa homogenizuje pomocou inzulínovej striekačky 5 min. Následne sa vzorka zmieša s 4 % PFA v pomere 1:1 a jedna kvapka (5-10 µl) naniesie na uhlíkom

potiahnuté kovové mriežky Formvar. Zakryje sa a nechá sa absorbovať do membrány 20 min. Premýva sa 5 min 100 µl PBS. Na fixáciu mriežok sa používa päťminútové pôsobenie 1,7 % roztoku glutaraldehydu, a celé sa dvakrát premyje deionizovanou vodou (MiliQ) aspoň dve minúty. Na mriežky sa potom naniesie 50 µl uranyl-acetátu a nechá sa 5 min pôsobiť v tme. Mriežky sa následne vystavia na 10 min roztoku čerstvo pripraveného 2,25 % methylcelulózy a 2 % uranyl-acetátu v pomere 4:1. Tato inkubácia sa uskutočňuje na chladiacom podklade (ľad). Mriežky sa na záver sušia na filtračnom papieri 10 – 15 min. Takto pripravené vzorky boli pozorované elektrónovým mikroskopom pri napätí 80 kV.

4.7. Meranie veľkosti exozómov

Pomocou dynamického rozptylu svetla môže Zetasizer merať veľkosť častíc a jej zetapotenciál. Princíp spočíva v meraní Brownovho pohybu, ktorého veľkosť súvisí s veľkosťou častíc, pričom malé častice sa pohybujú rýchlejšie a veľké častice pomalšie.

Nanosystém Zetasizer porovnáva pomer variácie intenzity škvŕn a vypočítava veľkosť častíc pomocou Stokesovej-Einsteinovej rovnice, ktorá vyjadruje vzťah medzi veľkosťou častíc a rýchlosťou Brownovho pohybu.

Stokes - Einsteinova rovnica:

$$r = kT / 6 \pi \eta D$$

r ... polomer častice

η ... dynamická viskozita

k... Boltzmanova konštanta

T ... absolútna teplota

D... difúzny koeficient

Veľkosť exozómu (hydrodynamický polomer) bola odhadnutá pomocou Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) podľa intenzity dynamického rozptylu svetla pomocou softvéru výrobcu na výpočty. Na meranie bol exozómový prípravok zriedený 15-krát v PBS a miešaný v trepačke Vortex počas 1 min.

4.8. Naplnenie exozómov DOX, PTX, a TMZ

Na naplnenie sa DOX, PTX a TMZ zmiešali s exozómovou suspenziou s celkovou koncentráciou proteínu 400 – 500 µg/ml. Pracovné roztoky na nanášanie exozómov sa mierne líšili v závislosti od spôsobu nanášania, ale všetky si zachovali rovnakú konečnú koncentráciu exozómového proteínu a liečiva (1 mM). Na konci každého postupu nanášania boli preparáty zbavené nepretržitého liečiva pomocou kolón Exosome Spin Columns (MW3000, Thermo Fisher Scientific) a odstredenú podľa protokolu výrobcu (750 x g, 2 min).

Plnenie exozómov inkubáciou

Exozómový prípravok s DOX alebo TMZ alebo PTX sa inkuboval v PBS a PBS so 17 µg/ml digitonínu v injekčných liekvočkách z tmavého skla na viacmiestnom magnetickom miešadle (2MAG MIXdrive 6 MTP, 200 rpm). Boli použité duálne inkubačné teploty a rôzne doby trvania. Inkubácia sa uskutočňovala pri 3 °C počas ½, 1, 1½ a 2 h a pri °C po dobu 6, 12 a 24 h. Uskutočnili sa 3 experimenty na 6 replikátoch v každom inkubačnom stave.

Plnenie exozómov opakovanými metódami chladenia - zahrievania

Exozómový prípravok s DOX alebo TMZ alebo PTX sa rozdelil pri 200 µl do skúmaviek s objemom 30 µl pri 200 µl a umiestnil sa do mrazničiek pri -20 °C, -40 °C alebo -80 °C na 1 h. Prípravky sa potom rýchlo zahrievajú vo vodnom kúpeli pri 37 °C a postup sa opakuje 2, 3, 4 a 5 - krát.

Exozómové plnenie elektroporáciou

Na elektroporáciu sa roztok exozóm-liečivo doplnil 200 mM sacharózy (Roth a Elvidge 1960). Prípravok sa umiestnil do chladenej 1 mm elektroporačnej bunky a vystavil sa napätiu 1 000 V (intenzita elektrického poľa 10 kV/cm) 0,7 ms trvajúcim impulzom s 1, 2 alebo 3 opakovaním alebo 2 500 V (intenzita elektrického poľa 25 kV/cm) 654 ms trvajúcim impulzom s rovnakým opakovaním pomocou eporátora (Eppendorf). Prípravok sa potom skladoval pri 37 °C 30 min, aby sa obnovila integrita exozomálnej membrány.

Exozómové plnenie ultrazvukovou sonoporáciou

Zmrazený exozómový prípravok bol sonikovaný na Branson Digital Sonifier 450 s použitím päť milimetrového hrotu pri 20, 30, 40 a 50 % amplitúde po 3, 4 alebo 5 30s cykloch záťaž/pauza, zatiaľ čo sa skúmavka udržiavala na ľade. Po sonikácii sa prípravok skladoval 30 min pri 37 °C, aby sa obnovila integrita exozomálnej membrány.

4.9. Hodnotenie efektívnosti a stability naplnených exozómov

Na vyhodnotenie účinnosti plnenia DOX boli membrány naložených exozómov prerušené po dobu 5 min na 5 %. Intenzita fluorescencie (excitačná vlnová dĺžka 470 nm, emisia – 575 nm) detergentu TX-100 a DOX sa merala pomocou čítača dosiek Tecan Infinite Pro M Nano Plex. Koncentrácia DOX sa vypočítala z kalibračnej krivky.

Účinnosť nanášania PTX a TMZ sa hodnotila vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou. 100 µl naplneného exozómového preparátu sa udržiavalo vo vyhrievacom bloku pri 75 °C, až kým sa voda úplne neodparila.

Na detekciu PTX sa pridá 100 µl acetonitrilu, dobre sa premieša na trepačke Vortex a 10 min sa odstredí pri 10 000 x g (Heraeus Megafuge 16R). Supernatant sa filtruje cez 0,22 µm PTFE filter a prenesie sa do vysokovýkonných skúmaviek na kvapalinovú chromatografiu. Vzorkovací objem bol nastavený na 20 µl. Použil sa chromatografický systém Waters Alliance e2695 s detektorom 2998 PDA a kolónou C18 (Supelco Nucleosil C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Sigma-Aldrich). Mobilná fáza - voda: acetonitril v objemovom pomere 45:55, prietok – 1 ml/min, teplota -40 °C. Eluovanie PTX sa monitoruje meraním absorpcie svetla pri 227 nm.

Na detekciu TMZ sa pridá 100 µl metanolu, dobre sa premieša na trepačke Vortex a 10 min sa odstredí pri 10 000 x g (Heraeus Megafuge 16R). Supernatant sa filtruje cez 0,22 µm PTFE filter a prenesie sa do vysokovýkonných skúmaviek na kvapalinovú chromatografiu. Vzorkovací objem bol nastavený na 20 µl. Používa sa chromatografický systém Waters Alliance e2695 s detektorom PDA 2998 a kolónou C18 (Supelco Nucleosil C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Sigma-Aldrich). Mobilná fáza - metanol a 0,5 % kyselina octová v objemovom pomere 30:70, prietok – 1 ml/min, teplota -40 °C. Eluovanie PTX sa monitoruje meraním absorpcie svetla pri 330 nm.

Stabilita exozómu sa hodnotila skladovaním prípravkov exozómu pri +4 °C, -20 °C, -40 °C a -80 °C počas 1, 7, 14 a 28 dní. Po tomto účinku rôzneho trvania a teploty sa preparáty analyzovali rovnakým spôsobom ako na stanovenie účinnosti nanášania.

Uvoľňovanie liečiva z exozómov sa hodnotilo umiestnením exozómového prípravku na dialýzu do 300 K MWCO Float-A-Lyzer G2 (Thermo Fisher Scientific) a jeho ponorením do PBS pri teplote kabaretu s magnetickým miešaním. Množstvo uvoľneného liečiva sa meralo odoberaním vzorky každú pol hodinu počas 10 h a analýzou, ako je opísané vyššie.

4.10. Sledovanie exozómov *in vitro* a *in vivo*

Internalizácia exozómu *in vitro* a *in vivo* sa monitorovala monitorovaním fluorescencie DOX v nabitých exozómoch. Vo vnútri bunky sa označil mitochondriálny sieťový marker MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific). Bunkové kultúry glioblastómu exponované exozómom s DOX sa zobrazili fluorescenčným mikroskopom Zeiss Axio Observer Z.1 (pre vstup do exozómu) a konfokálnym mikroskopom Olympus FluoView1000 (na vyhodnotenie životaschopnosti sféroidov).

Na vyhodnotenie priechodu exozómov cez hematoencefalickú bariéru boli použité 3-mesačné myši BALB/c vo veku 2 až 4 mesiacov (povolenie SFVS č. B1-954, povolenie na testovanie zvierat G2-96. Do každej nosovej dierky sa nakvapkalo 100 m.j. hyaluronidázy (typ III, Sigma-Aldrich) rozpustená v 5 μ l PBS a nechala sa stáť 30 min. Do každej nosovej dierky sa potom nakvapká 1 μ g/50 μ g exozómov s fluorescenčne značeným prípravkom RNA. Infúzia sa uskutočňuje 5 μ g každých 5 min. Mozgy sa vybrali po 1, 2, 4 a 24 h a 1h fixovali v 100 ml 4 % roztoku paraformaldehydu pri izbovej teplote. Mozog sa potom preniesol do PBS s 25 % sacharózy a skladoval sa pri 4 °C po dobu 24 h. Mozog je chladený tekutým dusíkom, respektíve s použitím chladiacej bázy (Triangle Biomedical Sciences). Zmrazené kusky sa nakrájajú na mraziaci mikrotóm (HM 560 mikrometrov), hrúbka kuskov je 18 – 30 μ m a teplota je -23 °C. Rezané kusky sa umiestnia na sklíčka (Plus, Menzel Glaser) a nechajú sa sušiť pri izbovej teplote 15 až 30 min. Jadrá buniek sa označia inkubáciou počas 10 min v 6 μ g/ml Hoechst33342 PBS. Sklíčka sa potom opäť premyli PBS (3 x 10 min) a potiahli sa Vectashield (Vector Laboratories), hrany sa natierali bezfarebným lakom na nechty. Vzorky sa zobrazili konfokálnym mikroskopom Zeiss Axio Observer LSM 700 (Carl Zeiss Microimaging Inc).

4.11. Hodnotenie životaschopnosti buniek glioblastómu

Životaschopnosť sféroidov glioblastómu sa hodnotila konfokálnou mikroskopiou (Olympus FluoView FV1000). Fluorescenčne farbivo propidiumjodidu (5 μ g/ml) sa použilo na vyhodnotenie nekrotických buniek, ktoré zafarbili jadrá týchto buniek červenou farbou, pretože integrita ich membrány bola narušená. Jadrá všetkých buniek boli označené

fluorescenčným farbivom Hoechst 33342, ktoré sa viaže na DNA všetkých jadier buniek a svieti modro. Získané obrázky boli spracované a analyzované pomocou softvéru ImageJ a kvantitatívne údaje pomocou SigmaPlot vs. 13 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

4.12. Metóda kultivácie a príprava buniek na experimentovanie

Na detekciu exozómov do buniek sme použili bunkovú líniu C6. Bunková línia C6 (ATCC®CCL-107™) je gliálna bunková línia izolovaná z mozgu potkana (*Rattus norvegicus*) vhodná na výskum gliómu ochorenia.

Bunková subkultivácia je cieľené udržiavanie alebo množenie buniek v podmienkach *in vitro* opakovaným prenosom buniek do čerstvého kultivačného média pod stálou kontrolou ich vlastností. Princípom je zadržiavanie buniek pred dosiahnutím konfluencie 80 – 90 %.

Postup: PBS, TE (trypsín/EDTA 1x roztok, Gibco™) s čírym kultivačným médiom [CM: 5 ml filtrovaného FBS + 500 µl PenStrep (penicilín, streptomycín, Gibco™) + DMEM (1x) + Glutamax™ (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™)] sa predhrialo na 37 °C. Skúmala sa kontaminácia kultivovaných buniek pod mikroskopom, bunky majú normálny vzhľad (tvar ihly). Bunky dvakrát prepláchli sterilným PBS, aby sa odstránili zvyšky séra obsahujúce zložky deaktivujúce trypsín. Pridalo sa 500 µl TE, rovnomerne rozložilo na dno a banku sa uzavrela. Nechalo sa pôsobiť 1 min a keď sa bunky začali uvoľňovať, niekoľkokrát poklepalo, aby sa uvoľnili. Potom sa TE rýchlo deaktivoval pridaním 3 ml média. Bunky sa odstredili v odstredivke Biosan LMC-4200R počas 5 min, 200 g, potom sa odsal supernatant a pridalo sa 1 ml čerstvého média, potom sa riedilo podľa plánovaného riedenia 1:3 - 1:10 = 1/3 - 1/10. Bunky sa niekoľkokrát resuspendovali odsatím a vypustením pipety oproti spodnej časti banky. Množstvo suspenzie sa prenieslo do pripravenej novej kultivačnej banky, do ktorej sme už pipetovali nové čerstvé médium, dôkladne sa premiešalo s pipetou a rovnomerne dispergovalo pohybom banky tam a späť a sprava doľava. Kultivácia prebiehala v inkubátore. Na stanovenie počtu buniek sa zvolený objem suspenzie zmiešal v pomere 1:1 s trypanovou modrou (produktová línia Gibco™, 0,4 %) a umiestnil sa do hemocytometrickej komory (Fuchs-Rosenthal). Bunková suspenzia s trypanovou modrou sa počítala s použitím mikroskopu s inverzným mikroskopom Leica DM1, t.j. živé bunky na štyroch komorných štvorcoch. Výsledné číslo sa vynásobilo 4 (pretože existuje spolu 16 štvorcov kamery), potom 2 (pretože bunky sa vyhodnotia dvakrát pomocou trypanovej modrej) a následne 5

000, čím sa získala jedna frakcia štvorcového objemu na mililiter. Výsledkom bol počet buniek na mililiter. Bunky potom boli nasadené do nových rastových nádob na rast, Petriho misky alebo jamky pre exozómové experimenty.

4.13. Štatistické a iné analýzy údajov

Štatistická analýza a grafická vizualizácia sa uskutočnili so softvérovým balíkom SigmaPlot 13 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Výsledky sú prezentované ako priemery 3 až 15 experimentov so štandardnými chybami. Štatistická analýza sa uskutočnila pomocou ANOVA a výberom navrhovaných optimálnych testov podľa distribúcie údajov - Dunn's, Kruskal-Wallis alebo Tukey. Výsledky sa považujú za významne odlišné, ak $p < 0,05$. Korelačné koeficienty boli vypočítané pomocou funkcie MS Excel Correl.

5. Výsledky

5.1. Výber metódy izolácie (čistenia) exozómov

Metódy ultracentrifugácie, gélovej permeačnej chromatografie, ultrafiltrácie a zrážania polyetylénglykolom sa testovali výberom rôznych podmienok a vyhodnotením výťažku exozómov, kvality prípravy (čistota, tvar a integrita membrány), času a nákladov na prácu.

Najskôr sa pomocou ELISA analyzovali obsahy exozómových markerov CD9, CD63 a CD81 exozómovými prípravkami izolovanými rôznymi metódami. Zistili sme, že obsah týchto markerov v 1 mg celkového proteínu v prípravku, ako sa stanovilo Bradfordovou metódou, bol podobný vo všetkých exozómových prípravkoch izolovaných všetkými metódami (Tab.1.).

Tab.1. Množstvo CD9, CD63 a CD81 v ng na miligram celkového proteínu na prípravu exozómov. Údaje sú uvedené ako priemer z 5 experimentov (každé 3 paralelné merania) so strednou štandardnou odchýlkou.

Eliminačná metóda Marker	Ultra- centrifugácia	Gélová filtrácia	Ultrafiltrácia	Precipitácia PEG
CD9	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,46 ± 0,07	0,36 ± 0,03
CD63	1,12 ± 0,05	1,02 ± 0,01	1,04 ± 0,01	1,10 ± 0,6
CD81	1,53 ± 0,14	1,68 ± 0,12	1,75 ± 0,09	1,62 ± 0,06

Hodnotili sme tiež koreláciu medzi celkovým obsahom proteínov v prípravku a každým z markerov CD9, CD63 a CD81 v každom z odlišne pripravených exozómových prípravkov. Korelačné koeficienty pre každý z týchto markerov sú uvedené v Tab. 2.

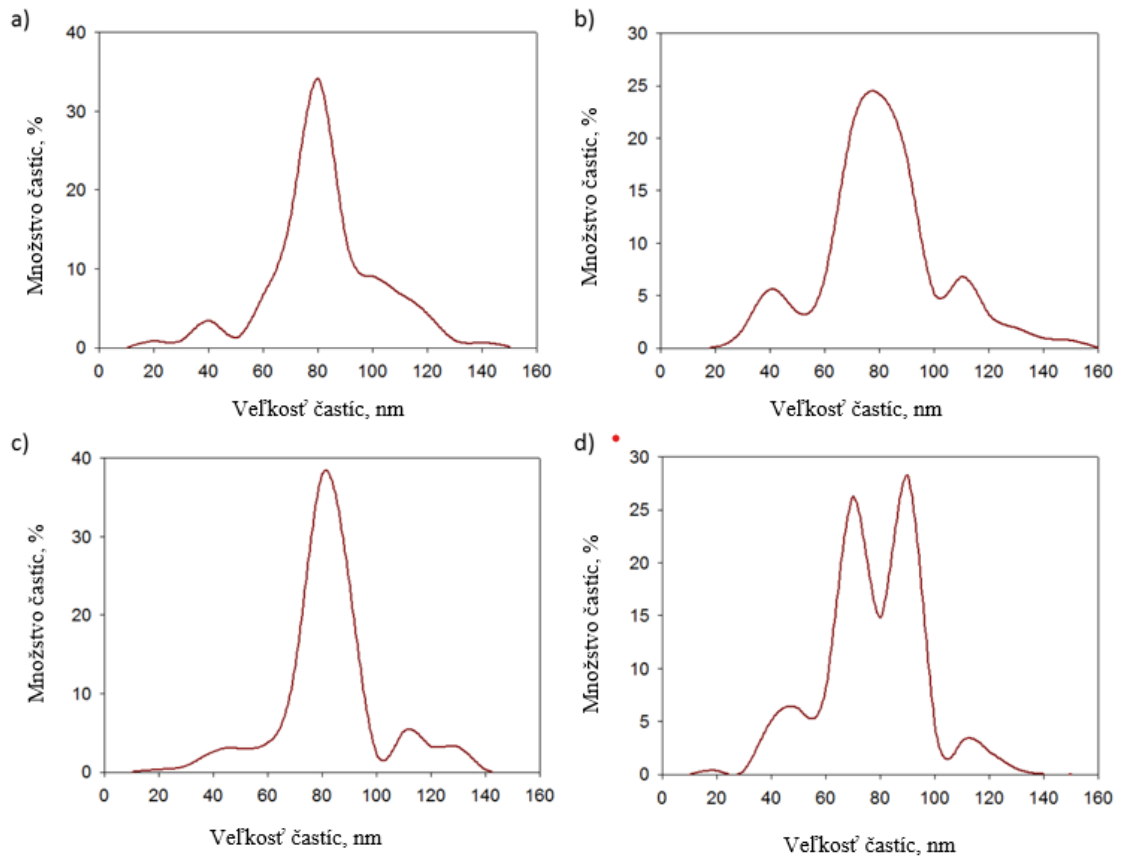
Tab.2. Korelácia medzi obsahom CD9, CD63, CD81 a celkovým obsahom bielkovín v prípravkoch obsahujúcich exozómy.

Eliminačná metóda Marker	Ultra- centrifugácia	Gélová filtrácia	Ultrafiltrácia	Precipitácia PEG
CD9	0.98	0.96	0.99	0.99
CD63	0.99	0,97	0.98	0,92
CD81	0.99	0,91	0.99	0.95

Množstvo povrchových markerov špecifických pre exozómy vo všetkých prípravkoch silne korelovalo s celkovým obsahom proteínov, čo znamená, že prípravky boli relatívne čisté a nemali žiadne hlavné proteínové nečistoty neexosomálneho pôvodu.

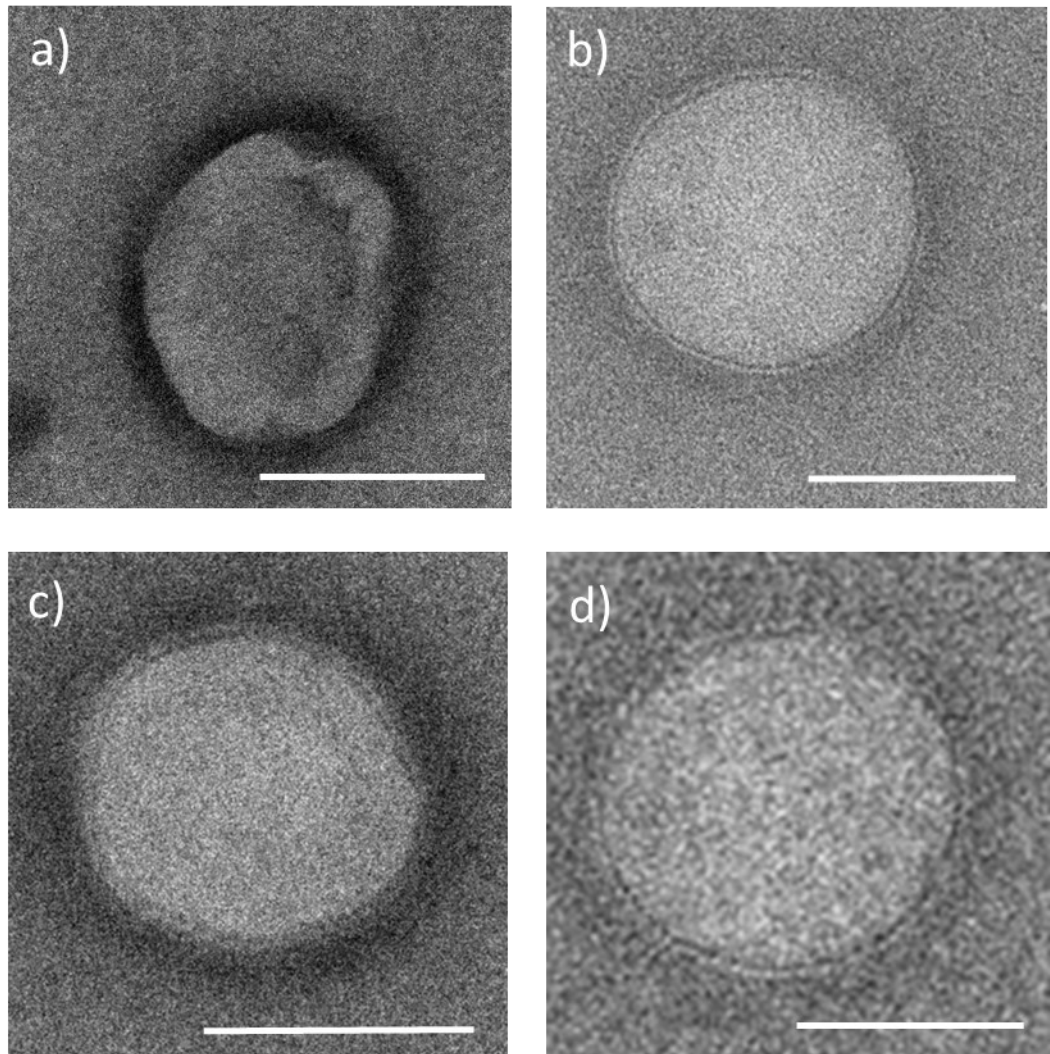
Ďalej sme vyhodnotili výtťažok rôznych spôsobov izolácie exozómov stanovením celkového množstva exozómového proteínu uvoľneného z 15 ml bunkového média. Tento obsah v prípravkoch získaných ultracentrifugáciou, gélovou filtráciou, ultrafiltráciou a zrážaním bol $134,8 \pm 11,5 \mu\text{g}$; $314,5 \pm 15,3 \mu\text{g}$; $328,1 \pm 18,2 \mu\text{g}$ a $394,6 \pm 17,1 \mu\text{g}$. Výtťažok exozómovej purifikácie ultracentrifugáciou je teda výrazne nižší ako pri iných metódach a najvyšší výtťažok sa získa purifikáciou zrážaním PEG.

Veľkosť častíc v rozlične pripravených exozómových prípravkoch bola stanovená pomocou Zetasizer. Na obrázku 5 (Obr.5.) vidno, že veľkosť častíc pripravených všetkými štyrmi spôsobmi bola podobná a väčšina častíc zodpovedala exozómovo špecifickej veľkosti 30 až 130 nm.



Obr.5. Analýza veľkosti častíc rôznych čistených exozomálnych prípravkov pomocou Zetaseizer.
a) ultracentrifugáciou čistený produkt, b) gelom čistený produkt, c) použitá post-filtračná metóda-ultrafiltrácia, d) PEG precipitácia.

V ďalšom kroku sme skúmali rôzne čistené exozómové preparáty pod transmisným elektrónovým mikroskopom. Na obrázku 6 (Obr.6.) vidíme, že exozómy pripravené ultracentrifugáciou (Obr.6a) sú deformované bez zachovania okrúhlej štruktúry a čírej membránovej dvojvrstvy. Medzitým mali exozómové prípravky purifikované gélovou filtráciou (Obr.6b), ultrafiltráciou (Obr.6c) a zrážaním (Obr.6d) symetricky sférické exozómy s jasne viditeľnou dvojvrstvou lipidov.



Obr.6. Prípravy rôznych čistených exozómov sa zobrazujú pomocou transmisného elektrónového mikroskopu. a) príprava pomocou ultracentrifugácie, b) exozómy purifikované gélovou filtráciou, c) ultrafiltrácia, d) zrážanie PEG. Mierka - 100 nm.

5.2. Plnenie exozómov liečivami

Exozómy boli naplnené tromi rôznymi protirakovinovými liečivami: DOX, TMZ a PTX inkubáciou s týmito liečivami a sonikáciou, prudkým miešaním, chladením-zahrievaním, inkubáciou s digitonínom a elektroporáciou. Hodnotila sa účinnosť inzercie liečiva a integrita exozomálnych membrán.

Najskôr sa testovalo plnenie liečiv inkubáciou za rôznych podmienok. Použila sa inkubácia pri 37 °C a pri 8 °C za i bez prítomnosti digitonínu. Výsledky účinnosti inzercie liečiva počas inkubácie sú uvedené v tabuľke 3 (Tab.3.).

Tab.3. Účinnosť inzercie DOX , TMZ a PTX do exozómov inkubáciou za rôznych podmienok . Temp - teplota, Dig- Digitonín, trvanie v hodinách, koncentrácie liečiv v exozómovom roztoku sú uvedené v nM.

Temp	37 °C								8 °C					
	-				+				-			+		
Dig														
Trvanie	0,5	1	1.5	2	0,5	1	1.5	2	6	12	24	6	12	24
DOX	54 ± 8	95 ± 6	82 ± 6	67 ± 5	114 ± 9	66 ± 6	56 ± 5	32 ± 5	27 ± 8	39 ± 3	61 ± 5	68 ± 6	111 ± 15	145 ± 14
TMZ	23 ± 2	43 ± 1	41 ± 7	22 ± 6	26 ± 4	36 ± 4	31 ± 6	16 ± 2	11 ± 1	17 ± 2	36 ± 7	12 ± 3	19 ± 4	34 ± 1
PTX	11 ± 4	22 ± 2	21 ± 1	14 ± 1	14 ± 4	15 ± 3	17 ± 2	19 ± 5	8 ± 1	21 ± 1	17 ± 4	24 ± 3	28 ± 3	17 ± 1

Vidíme, že DOX bol prítomný hlavne v exozómovej príprave po 24 h inkubácie s digitonínom pri 8 °C, o niečo menej účinná počas 0,5 h inkubácia s digitonínom pri 37 °C a 12 h inkubácia pri 8 °C. Účinnosť dodania TMZ do exozómu bola úplne nezávislá od digitonínu, ale so zvyšujúcou sa inkubačnou dobou sa zvyšovala na 1 h pri 37 °C a až na 24 h pri 8 °C. Zavádzanie PTX bolo najúčinnnejšie po 12 h s digitonínom pri 8 °C. U všetkých liekov klesla účinnosť po inkubácii dlhšej ako 1 h pri 37 °C.

V ďalšej fáze štúdie sme pozorovali, ako efektívne sú exozómy naplnené liečivom pomocou metódy opakovaného zmrazenia a rozmrazenia. Účinnosti plnenia dosiahnuté touto metódou sú uvedené v tabuľke 4 (Tab.4).

Tab.4. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómov metódou chladenia a zahrievania. Temp – teplota, Opak.- počet opakovaní, koncentrácie liečiva v exozómovom roztoku sú uvedené v nM.

Temp	-20 ° C				-40 ° C				-80 ° C			
Opak.	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
DOX	123 ± 15	168 ± 19	204 ± 21	221 ± 20	96 ± 10	139 ± 7	156 ± 12	169 ± 13	42 ± 4	59 ± 3	64 ± 3	52 ± 7
TMZ	26 ± 2	36 ± 2	44 ± 7	52 ± 3	28 ± 2	33 ± 4	48 ± 5	56 ± 4	12 ± 4	26 ± 7	22 ± 4	22 ± 5
PTX	16 ± 2	28 ± 6	35 ± 5	36 ± 7	18 ± 6	31 ± 7	39 ± 7	36 ± 8	11 ± 2	12 ± 2	16 ± 7	11 ± 3

Vstup DOX sa najúčinnšie podporil opätovným ochladením a zahriatím na -20 °C a účinnosť vstupu liečiva bola úmerná počtu cyklov ochladzovania a zahrievania. Najvyššia hodnota bola dosiahnutá po 5 cykloch. Množstvo DOX v týchto vzorkách významne prekročilo maximálne množstvo dosiahnuté inkubačnými metódami. Chladenie-zahrievanie na -40 °C zvýšilo obsah DOX menej ako -20 °C chladenie-zahrievanie na -80 °C nezvyšovalo obsah DOX v exozómoch. TMZ aj PTX vstup do exozómov bolo zvýšené chladením-zahrievaním na -40 °C. Množstvo liečiva sa zvyšovalo so zvyšovaním počtu cyklov na 4, ale aplikácia 5 cyklov nezvýšila účinnosť nakladania. Zmrazenie/zahriatie na -80 °C nemalo taký veľký vplyv na množstvo liečiva v exozómoch.

Plnenie liečivom bolo tiež uskutočňované elektroporáciou exozómamov v roztoku liečiva (údaje o účinnosti sú uvedené v tabuľke 5).

Tab.5. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómov elektroporačnou metódou. Koncentrácie liečiva v exozómovom roztoku sú uvedené v nM.

napätie	1 000 V			2500 V		
	1	2	3	1	2	3
DOX	186 ± 23	154 ± 8	166 ± 14	376 ± 18	206 ± 33	106 ± 26
TMZ	26 ± 7	36 ± 15	46 ± 12	67 ± 6	44 ± 5	36 ± 3
PTX	12 ± 4	16 ± 2	14 ± 3	48 ± 11	26 ± 6	33 ± 9

Najvyššie množstvá DOX, TMZ a PTX v exozómoch sa detegovali po jednom impulze elektrického poľa 25 kV/cm počas 654 ms. Zvyšovanie počtu impulzov neprineslo zvýšenie účinnosti.

Účinok ultrazvukovej sonoporácie na vstup liečiva do exozómov je uvedený v tabuľke 6.

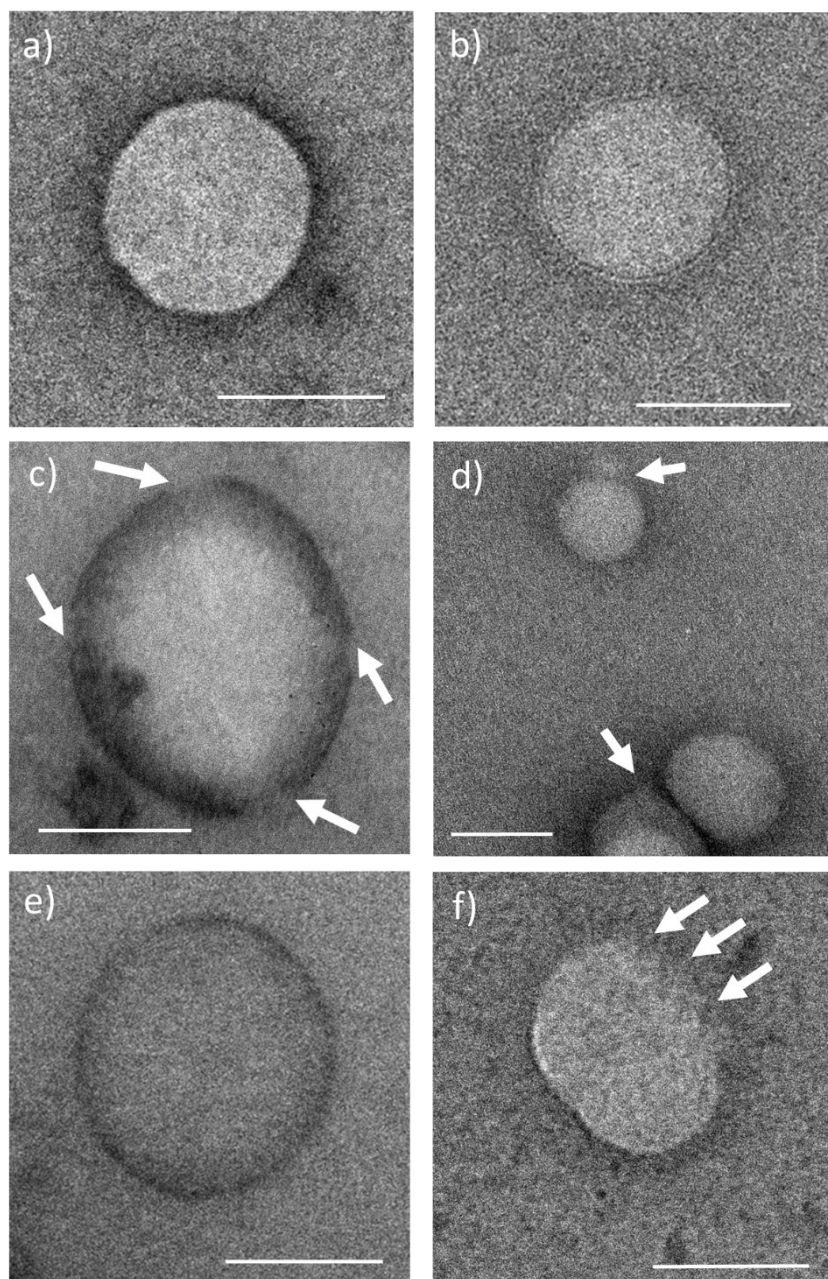
Tab.6. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómu ultrazvukovou sonoporáciou. Koncentrácie liečiva v exozómovom roztoku sú uvedené v nM.

Amplitúda	20 %			30%			40%			50%		
	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5
DOX	86 ± 11	98 ± 4	106 ± 13	126 ± 13	165 ± 8	178 ± 14	264 ± 6	302 ± 12	384 ± 14	206 ± 13	212 ± 17	164 ± 21
TMZ	24 ± 8	27 ± 8	39 ± 6	41 ± 5	38 ± 5	40 ± 2	46 ± 7	69 ± 7	93 ± 10	68 ± 11	44 ± 10	38 ± 6
PTX	16 ± 2	28 ± 4	29 ± 1	26 ± 3	24 ± 6	30 ± 11	30 ± 2	48 ± 7	56 ± 13	26 ± 7	22 ± 7	24 ± 5

Rozbor produktov získaných inkorporáciou liečiva do exozómu sonoporáciou ukázalo, že maximálne množstvo liečiva bolo ovplyvnené amplitúdou 40 % po 4 a 5

30 s cykloch záťaž/pauzy. Množstvo DOX, TMZ a PTX merané po 5 cykloch boli najvyššie v porovnaní so všetkými ostatnými metódami plnenia.

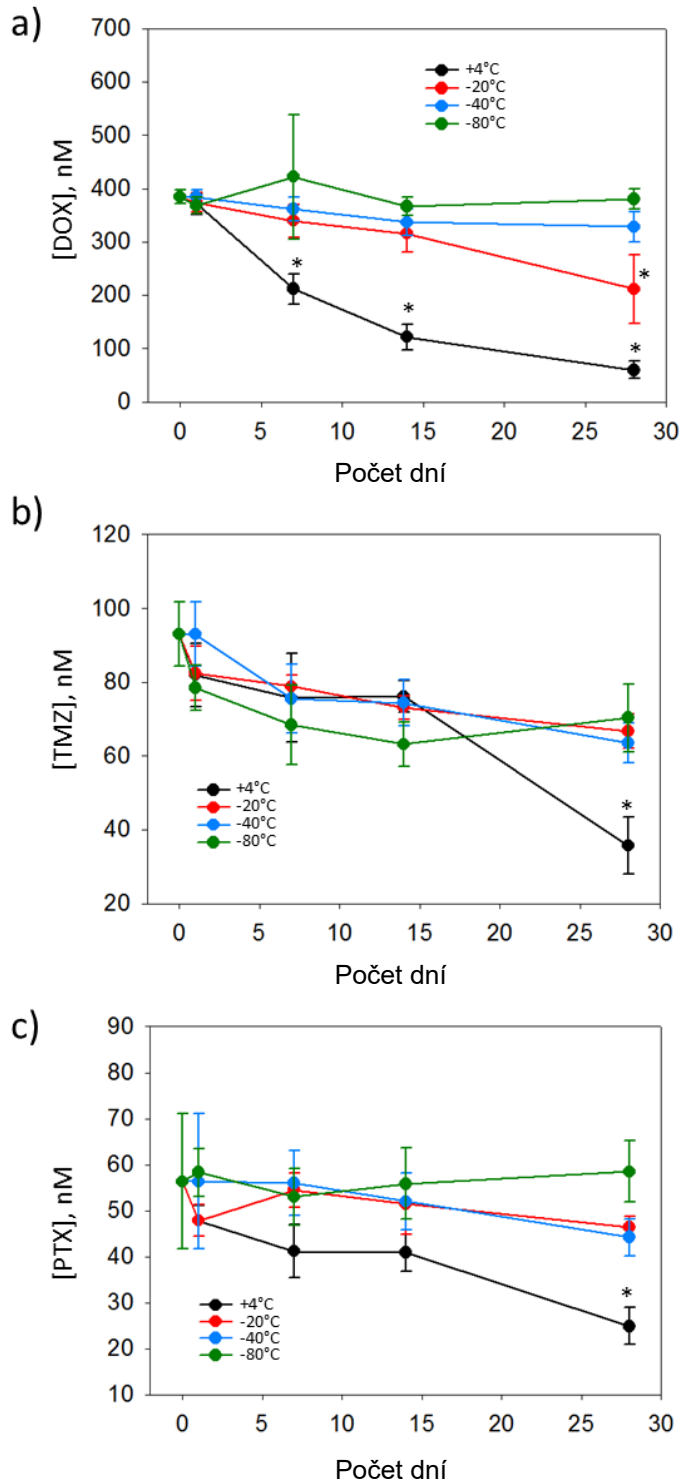
V ďalšom kroku sa metódy naplnenia exozómov liečivami hodnotili z hľadiska ich poškodenia. Rozsah poškodenia bol stanovený pozorovaním exozómových prípravkov naplnených rôznymi metódami pod transmisným elektrónovým mikroskopom. Na monitorovanie boli vybrané produkty s najvyššou účinnosťou: 0,5 h inkubácia s digitonínom pri 37 °C, 24 h inkubácia s digitonínom pri 8 °C, štyri mraziace/zahrievacie cykly s ochladzovaním na -20 °C, štyri mraziace/zahrievacie cykly s ochladzovaním na -40 °C, elektroporácia jedným impulzom elektrického poľa 25 kV/cm počas 645 ms a sonoporácia pomocou 40 % amplitúdy a piatimi cyklami 30 s aktivita/pauzy. Na obr.7. vidíme, že inkubácia s digitonínom nespôsobila pretrvávajúce a zistiteľné poškodenie exozomálnych membrán po 0,5 h ani pri 37 °C a po 24 h pri 8 °C (Obr.7a, 7b). Medzitým po 4 cykloch chladenia/zahrievania asi 30 – 40 % exozómov malo viditeľné poškodenú integritu membrány (Obr.7c, 7d).



Obr.7. Reprezentatívne obrázky exozómov ovplyvnených rôznymi metódami nanášania liečiva sú vidieť pod transmisným elektrónovým mikroskopom. a) 0,5 h inkubácia s digitonínom pri 37 °C, b) 24 h inkubácia s digitonínom pri 8 °C; c) štyri cykly zmrazenia/rozmrazenia pri -20 °C; d) štyri cykly zmrazenia/rozmrazenia pri -40 °C; e) ultrazvukom pri 40 % amplitúde a piatich 30 s cykloch záťaž/pauza; f) elektroporácia jediným impulzom elektrického poľa 25 kV/cm počas 645 ms. Šípky označujú porušenie integrity membrány. Mierka – 100 nm.

5.3. Štúdium stability exozómov s protirakovinovými látkami a uvoľňovanie účinných látok

Stabilita exozómu sa hodnotila skladovaním prípravkov exozómu pri +4 °C, -20 °C, -40 °C a -80 °C počas 1, 7, 14 a 28 dní. Obrázok 8 ukazuje, že keď sa exozómy skladovali pri +4 °C, obsah DOX sa štatisticky významne znížil iba po jednom dni a pokračoval v znižovaní počas celého obdobia štúdie. Pri skladovaní pri -20 °C sa pozoroval významný rozdiel od základnej línie až po 28 dňoch skladovania. Keď sa exozómy s DOX skladovali pri -40 °C a -80 °C po dobu až 28 dní, nepozorovali sa žiadne významné rozdiely v hladinách liečiva. V prípade TMZ a PTX sa iba prípravky uchovávané pri +4 °C počas 28 dní významne odlišovali od pôvodného množstva, vo všetkých ostatných prípadoch sme nenašli významné rozdiely. V súhrne sa odporúča uchovávať exozóm s DOX pri -20 °C maximálne 14 dní a pri teplotách -40 °C alebo -80 °C pre dlhšie skladovanie. Exozómy s TMZ a PTX sa môžu uchovávať pri +4 °C až 14 dní a na dlhodobejšie skladovanie by sa mali skladovať v mrazničke pri -20 °C.



Obr.8. Štúdiá stability exozómov s DOX (a), TMZ (b) a PTX (c). Exozómy liečiva boli skladované pri rôznych teplotách počas 1, 7, 14 a 28 dní a bol stanovený obsah liečiva. * - štatisticky významný rozdiel v porovnaní s množstvom liečiva bezprostredne po naložení, $p < 0,05$.

Na základe získaných výsledkov boli vybrané najúčinnšie spôsoby čistenia exozómov a nanášania liečiv na exozómy. Výber bol založený na nasledujúcich výberových kritériách: (1) maximálna dávka liečiva, (2) minimálne narušenie integrity exozómu. Na základe týchto kritérií boli vyvinuté a prezentované štandardné postupy extrakcie a plnenia exozómov.

5.4. Štúdium účinkov DOX, PTX a TMZ a ich exozomálnych foriem na životaschopnosť buniek C6 glioblastómu.

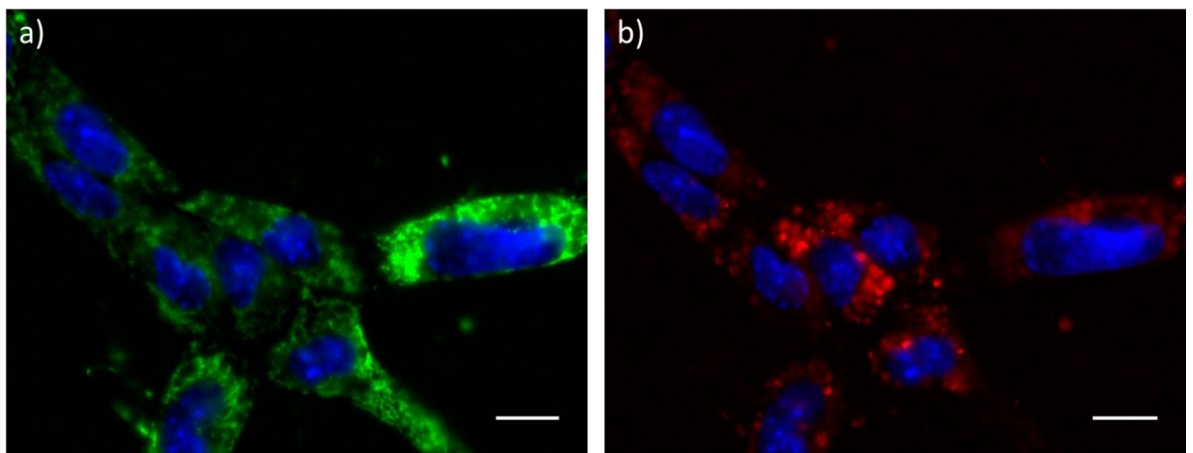
Exozómy boli izolované z primárneho peritoneálneho makrofágového kultivačného média pre potkany, pretože C6 bunky sú potkanieho pôvodu. Sféroidy glioblastómu a bunkové kultúry boli vystavené pôsobeniu voľnou formou a sonifikáciou naplnených exozómov uvedenými protirakovinovými látkami počas 24, 48 a 72 h. Konfokálna mikroskopia hodnotila percento životaschopných buniek a jej výsledky môžeme vidieť v tabuľke č. 7. Z výsledkov vidíme, že látky, ktoré boli naplnené v exozómoch, podstatne viac znižovali životaschopnosť C6 buniek.

Tab.7. Vplyv DOX, TMZ, PXT na životaschopnosť C6 buniek glioblastómu. Exo-control= ekvivaletné množstvo exozomálneho proteínu, vyjadrené v percentách

Látka \ Čas	24 hod	48 hod	72 hod
Exo-DOX	67,4 ± 8,3	41,2 ± 8,2	17,8 ± 5,9
DOX	92,0 ± 3,0	75,0 ± 4,6	57,3 ± 9,0
Exo-Control	102,0 ± 2,6	99,0 ± 4,33	98,8 ± 3,2
Látka \ Čas	24 hod	48 hod	72 hod
Exo-TMZ	54,6 ± 7,8	23,2 ± 4,4	10,4 ± 3,9
TMZ	102,7 ± 3,1	103,7 ± 6,0	104,3 ± 3,2
Exo-Control	94,0 ± 6,0	83,8 ± 9,9	97,4 ± 4,3
Látka \ Čas	24 hod	48 hod	72 hod
Exo-PXT	89,8 ± 5,1	73,6 ± 5,6	74,4 ± 11,4
PXT	92,0 ± 1,0	94,7 ± 11,0	85,6 ± 5,0
Exo-Control	82,4 ± 6,4	75,8 ± 3,9	63,8 ± 7,1

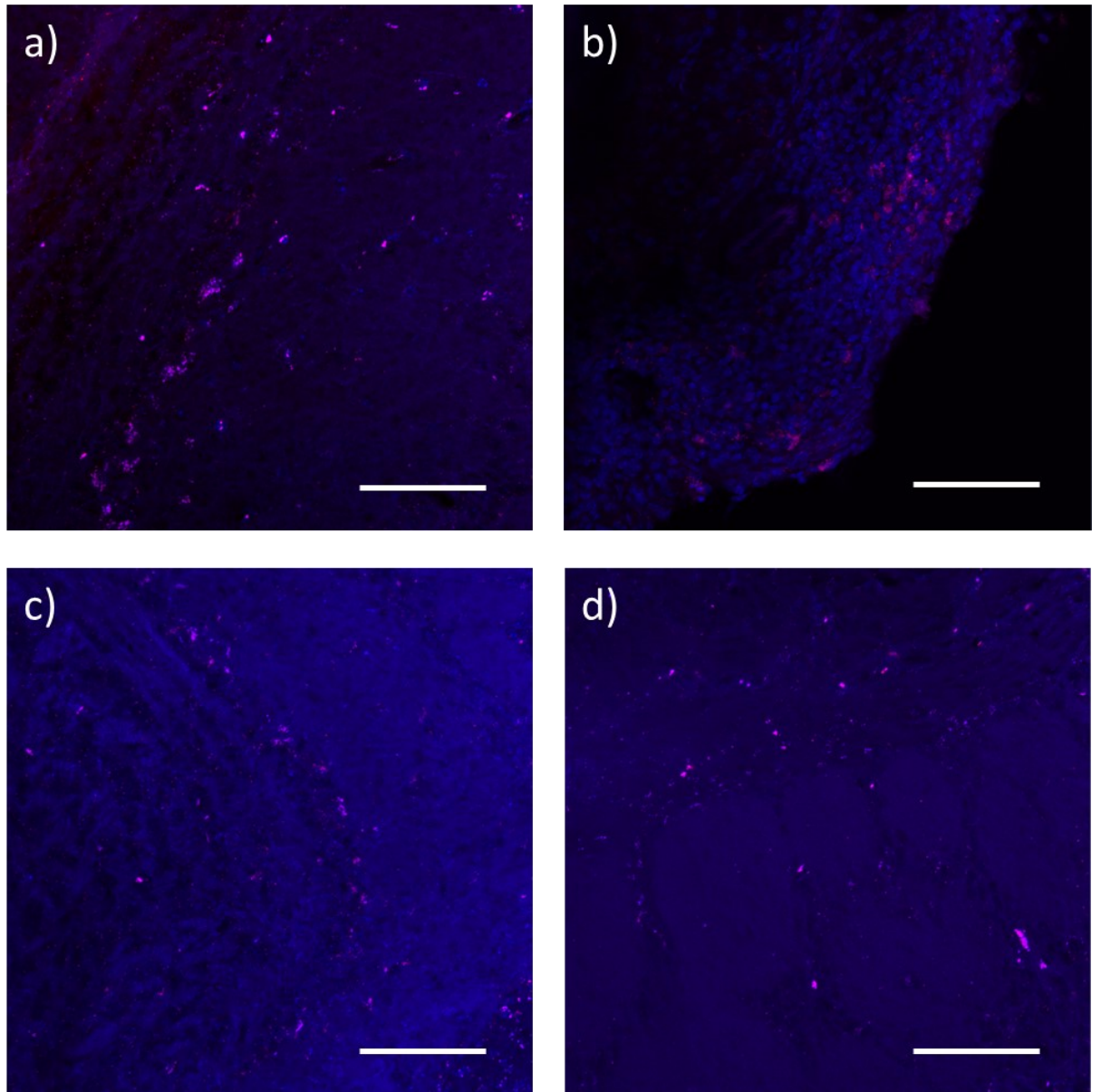
5.5. Štúdium zavedenia exozómu a prechodu cez hematoencefalickú bariéru

Na štúdium vstupu exozómov s liečivom do izolovaných buniek nádoru sme použili exozómy z pľúcnych buniek a ako liečivo DOX. Prvý vstup buniek bol pozorovateľný už po dvoch hodinách po nanesení vzorky na C6 - bunky. Z výsledkov vieme, že vnútrobunková lokalizácia exozómov je indikovaná zhodou s mitochondriálnou sieťou v okolí jadra bunky, pričom vyššia koncentrácia je v okolí menej aktívnych mitochondrií (Obr.9.)



Obr.9. Prístup exozómov s DOX k C6 glioblastómovým bunkám. Viditeľné po 2 h od začiatku expozície. Exozómy viditeľné (b) v dôsledku fluorescencie DOX (červená), ich vnútrobunková lokalizácia je indikovaná zhodou s mitochondriálnou sieťou označenou MitoTracker Green FM (zelená) (a), jadrá buniek zafarbené pomocou Hoechst 33342 (modrá). Mierka – 50 μ m.

Na vyhodnotenie schopnosti makrofágových exozómov prechádzať hematoencefalickou bariérou *in vivo* sa do myší typu BALB/c zaviedli fluorescenčne značené exozómy a ich distribúcia v mozgu sa pozorovala po 1, 2, 3 a 4 h. Na túto štúdiu sa použili exozómy izolované z primárneho myšacieho peritoneálneho makrofágového kultivačného média. Bolo pozorované, že po 1 h je mozog pomerne bohatý na exozómy a podobné množstvo sa detekuje po 2, 3 a 4 h. (Obr.10.). Intranazálne zavedené exozómy makrofágov už boli prítomné po 1 h. od expozície.



Obr.10. Exozómy v prípravkoch myšieho mozgu po 1 (a), 2 (b), 3 (c) a 4 (d) hodinách. Exozómy s internalizovanou AF555 značenou RNA fluoreskujú červene, jadrá zafarbené pomocou Hoechst 33342 (modrá). Mierka – 500 μm .

6. Diskusia

Glioblastóm je nevyliciteľná rakovina mozgu, ktorá predstavuje asi polovicu všetkých nádorov mozgu. Stáva sa čoraz agresívnejšou, nakoľko bunky nádoru sa stávajú rezistentnejšími na chemoterapiu a radiačnú terapiu. Exozómy ako nanočastice prirodzene sa vyskytujúce v organizme predstavujú nový spôsob cielej terapie. Aby sme dokázali ich správne použiť ako liekovú formu, musíme nájsť optimálne podmienky pre ich získanie, naplnenie liečivom a spôsob skladovania. Tiež treba zaistiť zisk kvalitných exozómov v dostatočnom množstve a ich účinnosť.

Prvým krokom bola optimalizácia izolácie exozómov z kultivovaného makrofágového média. Využili sme štyri základné metódy izolácie a zároveň čistenia exozomálnej vzorky. Porovnali sme získané výťažky, kvalitu exozómov a pracovnú náročnosť (Tab.1., Tab.2., Obr.5., Obr.6.). Kvalitu exozómov sme hodnotili stanovením veľkosti pomocou Zetasiezeru (Obr.5.). Všetky použité metódy izolácie získali častice podobných veľkostí a väčšina týchto častíc zodpovedala exozómovej veľkosti 30 – 130 nm, ako tvrdí aj Sharma a kol. vo svojich štúdiách (Sharma a kol. 2018). Na stanovenie tvaru a detekcie poškodenia integrity membrány sme použili TEM. Získali sme exozómy definovanej veľkosti s dobre analyzovateľnými vlastnosťami (Obr.6.). Rovnaké metódy použili v štúdiu Sharma a jej tím, a získali porovnateľné výsledky (Sharma a kol. 2018). Ultracentrifugáciou sme získali relatívne čisté exozómy, avšak s porušenou membránou lipidovej dvojvrstvy (Obr.6a.). Táto metóda tiež vyžadovala viac času na jednotlivé cykly centrifugácie a výťažok bol výrazne nižší ako pri ostatných metódach. Podobné výsledky získali aj Campoy a Contreras - Narajo so svojimi tímami. (Campoy a kol. 2016, Contreras-Naranjo a kol. 2017). Ďalšou metódou bola gélová permeačná chromatografia. Touto metódou sme opäť získali čisté exozómy guľovitého tvaru s viditeľnou lipidovou dvojvrstvou (Obr.6b.), výťažok bol vyšší ako u ultracentrifugácie, ale stále nižší ako u ostatných dvoch metódach, čím súhlasíme s výsledkami štúdiu Koa a Sharmy a ich kolektívov (Ko a kol. 2016, Sharma a kol. 2018). Treťou metódou bola ultrafiltrácia, pri ktorej si exozómy zachovali guľovitý tvar s možnou vizuálnou detekciou dvojvrstvy lipidov (Obr.6c.), druhý najvyšší výťažok, s rovnako čistými exozómami, podobne ako uvádza He a Diaz (He a kol. 2019, Diaz a kol. 2018). Potvrdilo sa tiež tvrdenie, že ultrafiltrácia je časovo menej náročná ako ultracentrifugácia a má vyšší výťažok ako tvrdia spomenuté štúdie. Poslednou metódou bolo využitie PEG precipitácie. Táto metóda dosiahla najlepšie výsledky. Získali sme symetrické sférické exozómy s jasne

viditeľnou dvojvrstvou lipidov (Obr.6d.), s najvyšším výťažkom a s nízkymi nárokmi na čas a náklady, ako tvrdí aj Contreras-Naranjo a jeho tím vo svojej štúdií (Contreras - Naranjo a kol. 2017).

Súhrnne možno povedať, že gélová filtrácia, ultrafiltrácia a precipitácia poskytujú podobne kvalitné exozómové preparáty a podobné výťažky exozómov. Metóda zrážania PEG je však podstatne efektívnejšia z hľadiska času a nákladov na prácu, takže metóda zrážania PEG bola zvolená pre ďalšiu prácu.

Exozómy sú charakteristické prítomnosťou markerov CD9, CD63, CD81, preto sme si ich vybrali ako dôkaz prítomnosti exozómov a stanovenia ich obsahu. Analýzou pomocou metódy ELISA sme dokázali všetkých uvedených markerov, teda môžeme dokázať prítomnosť exozómov (Tab.1.). Rovnaké markery použili aj Caby a kolektív vo svojej štúdií, kde dokázali prítomnosť týchto markerov v exozómoch získaných z ľudskej krvnej plazmy (Caby a kol. 2005). Pri tomto kroku sme tiež porovnali metódy stanovenia obsahu exozómov. Analýza pomocou ELISy a stanovenie obsahu celkového proteínu pomocou Bradfordovho činidla ukázali, že množstvo povrchových markerov špecifických pre exozómy vo všetkých prípravkoch silne koreluje s celkovým obsahom proteínov (Tab.2.), čo znamená, že prípravky boli relatívne čisté a nemali žiadne hlavné proteínové nečistoty neexosomálneho pôvodu. Celkový obsah Bradfordových proteínov je teda vhodným spôsobom odhadu obsahu exozómov.

Ďalším krokom bolo izolované exozómy naplniť liečivom. Exozómy sme naplnili tromi rôznymi liečivami používanými v terapii glioblastómu: PTX, TMZ a DOX. Hodnotili sme účinnosť plnenia liečivom a poškodenie membrán exozómov. Najskôr sme testovali metódu inkubácie liečiva a exozómov pri rôznych teplotách a tiež za prítomnosti digitonínu (Tab.3.). Použila sa inkubácia pri 37 °C, kde pohyblivosť membrány je blízko fyziologickej a Brownova pohyblivosť je aktívnejšia v porovnaní s podmienkami nižšej teploty, je však možná aj znížená stabilita exozómov a vyššie riziko poškodenia. Testovala sa aj inkubácia s pridaním steroidného saponínu digitonínu, ktorý spôsobuje pórovitosť membrány nahradením cholesterolu. Inkubácie s a bez digitonínu sa tiež uskutočňovali pri 8 °C, keď tekutosť membrán, a teda pravdepodobnosť spontánnej interferencie s liečivom, je nižšia, ale stabilita exozómov je lepšie udržiavaná. DOX vykazoval najlepšie výsledky po 24 h inkubácii s digitonínom pri 8 °C. TMZ po 1 h pri 37 °C a inkubácia bola úplne nezávislá od prítomnosti digitonínu. Pre PTX bolo najúčinnšie inkubovať 12 h pri 8 °C

s digitonínom. U všetkých liekov klesla účinnosť po inkubácii dlhšej ako 1 h pri 37 °C. Je pravdepodobné, že to mohlo byť spôsobené skutočnosťou, že exozómy sa začnú rozpadat' po určitom čase pri tejto teplote a už nemôžu liečivo udržať.

Druhou metódou bolo opakovanie chladenia a zahrievania (Tab.4.). Táto metóda bola opäť najvýhodnejšia pre DOX, ktorý najlepšie výsledky dosahoval po piatich cykloch chladenia a zahrievania na -20 °C. Pre TZM a PTX bolo najvýhodnejšie po štyroch cykloch mrazenia a zahrievania na -40 °C. Zmrazenie-zahriatie na -80 °C nemalo taký veľký vplyv na množstvo liečiva v exozómoch ako rovnaký postup pri vyšších teplotách. Je možné, že pri -80 °C prípravok zamrzne príliš rýchlo a molekuly liečiva sa pohybujú príliš pomaly, aby umožnili ich prechod z média do vnútra exozómov.

Ako ďalšiu metódu sme využili elektroporáciu (Tab.5.), kedy sme exozómy vystavili 1, 2 a 3 impulzom so silou poľa 1000 a 2500 V. Najlepší výsledok pre všetky tri látky vykazovalo použitie jedného impulzu 2500 V poľa počas 654 ms. Je pravdepodobné, že pole tejto sily vytvorilo dostatok párov v membránach exozómov na vyvolanie interferencie s liekom. Keď sa počet pulzov tejto sily zvýšil, účinnosť nakladania liečiv sa znižovala. Je možné, že pri opakovanej expozícii bolo poškodenie exozomálnych membrán už príliš veľké na to, aby sa obnovila integrita a udržalo liečivo. Podobné výsledky získal so svojimi exozómami Jiang a jeho tím. (Jiang a kol. 2017).

Poslednou metódou bolo vystavenie exozómov účinkom sonoporácie (Tab.6.). Najvyššie množstvo liečiva bolo ovplyvnené amplitúdou 40 % po 4 a 5 30 s cykloch záťaž/pauzy pre všetky tri látky. Sonoporáciu využil aj Kim a jeho tím pri svojich výskumoch plnenia PTX do exozómov z makrofágov (Kim a kol. 2016) a tiež vyhodnotili tento spôsob ako najefektívnejší.

V súhrne sú použité spôsoby plnenia exozómov liečivami v zostupnom poradí podľa účinnosti plnenia: ultrazvuková sonoporácia > elektroporácia > chladenie/zahrievanie > inkubácia. Týmito výsledkami môžeme podporiť tvrdenia štúdií, ktoré vykonali Li a Campoy a ich tými (Li a kol. 2017, Campoy a kol. 2016).

Inkubácia s digitonínom nespôsobila pretrvávajúce a zistiteľné poškodenie exozomálnych membrán po 0,5 h ani pri 37 °C a po 24 h pri 8 °C (Obr.7a, 7b). Medzitým po 4 cykloch chladenia/zahrievania asi 30 – 40 % exozómov malo viditeľné poškodenú integritu membrány (Obr.7c, 7d). Lézie boli výraznejšie v tých exozómoch, ktoré boli väčšie, ale v niektorých menších boli pozorované aj nepravidelnosti membrán. Exozómový

prípravok ošetrený sonoporáciou nemal podobné lézie, ale po elektroporácii asi 40 % pozorovaných exozómov malo viditeľné poškodené membrány a stratili svoj okrúhly tvar. Stručne povedané, exozóm bol najviac ovplyvnený elektroporáciou a v menšej miere mrazením/zahrievaním a najmenej inkubáciou a sonoporáciou.

Exozómy liečiva plnené sonoporáciou pri 40 % amplitúde po 4 a 5 30 s cykloch záťaž/pauzy boli vybrané pre štúdie stability. Stabilita exozómu sa hodnotila skladovaním prípravkov exozómu počas 1, 7, 14 a 28 dní pri +4 °C, -20 °C, -40 °C a -80 °C. Exozómy skladované pri +4 °C svoj obsah DOX významne znížili už po jednom dni a pokračovali v znižovaní aj ďalšie dni. Pri skladovaní pri -20 °C sa pozoroval významný rozdiel až po 28 dňoch skladovania a pri -40 °C a -80 °C po dobu až 28 dní sa nepozorovali žiadne významné rozdiely. V prípade TMZ a PTX sa iba prípravky uchovávané pri +4 °C počas 28 dní významne odlišovali, vo všetkých ostatných prípadoch sme nenašli významné rozdiely. Pre PTX podobne výsledky získala aj štúdia Agrawala (Agrawal a kol. 2017). V súhrne sa odporúča uchovávať exozóm s DOX pri -20 °C maximálne 14 dní a pri vyšších teplotách -40 °C alebo -80 °C. Exozómy s TMZ a PTX sa môžu uchovávať pri +4 °C až 14 dní a na dlhodobšie skladovanie by sa mali skladovať v mrazničke pri -20 °C.

Z našich výsledkov teda vyplýva, že nami odporúčaná metóda na izolovanie exozómov je metóda zrážania PEG a na plnenie liečiv exozómov sonifikácia ultrazvukom pri 40 % amplitúde a päť tridsaťsekundových cykloch záťaž/pauzy.

Ďalej sme sa zamerali na štúdium pôsobenia liečiv voľných a inkorporovaných do exozómov. Liečiva DOX, TMZ a PXT boli plnené do exozómov sonoporáciou pomocou 40 % amplitúdy a piatimi cyklami 30 s záťaž/pauzy. DOX v exozómoch (Exo-DOX) znižoval životaschopnosť buniek o viac ako 25 % v porovnaní s voľným DOX počas rovnakej doby pôsobenia. Podobné výsledky získali aj Schindler a kol. vo svojej štúdií, kde voľný DOX alebo Exo-Dox inkubovali s bunkami HEK293 počas 4 h pri 37 °C (Schindler a kol. 2019). U TMZ bola účinnosť exozomálnej formy dokonca ešte väčšia, nakoľko voľná forma takmer vôbec neovplyvnila nádor. Vieme teda povedať že TMZ naplnený exozómami vykazuje vysokú účinnosť napriek rezistencii nádoru voči tejto látke. Toto tvrdenie je dokázané štúdiou Yina a jeho tímu (Yin a kol. 2019). PXT vykazoval obdobné výsledky, avšak významnejší rozdiel v pôsobení nastal až po dlhšom pôsobení. Kim a jeho

tým (Kim a kol. 2018) vo svojej štúdií dosiahli porovnateľné účinky. Súhrnne môžeme teda povedať, že ak naplníme exozómy liečivom zvýšime ich účinnosť na bunky.

Pri štúdiu prechodu exozómov cez HEB, sme naplnili exozómy DOX sonoporáciou a využili sme jeho vlastnosť ako fluorescenčnej zlúčeniny. Je známe, že exozómy môžu prechádzať HEB. Aby sa zabezpečilo, že exozómy skutočne vstúpia do študovaných divokých a transgénnych astrocytov, boli ošetrené exozómami, ktorých RNA bola označená Alexa Fluor 555 (Obr.9a). Pridané exozómy boli viditeľné už po dvoch hodinách a ich signalizácia je zhodná so signalizáciou mitochondriálnej siete. Po inkubácii vstúpili exozómy do buniek astrocytov, pretože sú usporiadané v sekvencii konzistentnej s morfológiou buniek, čo je zrejmé z mitochondriálnej siete (Obr.9b). Pred pozorovaním bolo bunkové médium niekoľkokrát zmenené, takže boli pozorované iba exozómy, ktoré vstúpili do bunky. K podobnému zisteniu prišli aj Kim a jeho kolektív, ktorí skúmali účinok exozomálnej formy PTX na nádorových bunkách pľúcnych metastáz (Kim a kol. 2018).

Na štúdium schopnosti makrofágových exozómov prechádzať hematoencefalickou bariérou *in vivo*, sme intranazálne zaviedli vzorku exozómov do myši typu BALB/c. Tieto exozómy boli izolované z primárneho myšacieho peritoneálneho makrofágového kultivačného média a fluorescenčne označené. Ich distribúcia v mozgu sa pozorovala po 1, 2, 3 a 4 h. Pozorovali sme, že intranazálne zavedené exozómy makrofágov už do 1 h prechádzajú hematoencefalickou bariérou a sú distribuované v mozgu (Obr.10). Prechod exozómov HEB potvrdili aj Yuyama a Igarashi vo svojej štúdií Alzheimeru (Yuyama a Igarashi 2017).

Súhrnne môžeme teda povedať, že ak naplníme exozómy liečivom zvýšime ich účinnosť na bunky. Táto skutočnosť niekoľkokrát potvrdená štúdiami (Yin a kol. 2019, Sato a kol. 2016) má význam v dávkovaní a ovplyvňovaní možných nežiadúcich účinkov. Schindler vo svojej štúdií preukázali významné zníženie kardiotoxicity exozomálneho DOX ako aj ekvivalentnú účinnosť použitia nižšej dávky DOX v exozómoch v porovnaní s voľným DOX (Schindler a kol. 2019).

Exozómy sú teda schopné prekonať hematoencefalickú bariéru a predstavujú systém schopný cieleného dodania liečiva do mozgu. V terapii glioblastómi tak predstavujú nádej na zvýšenie účinnosti už známych liečiv a zníženie ich nežiadúcich účinkov.

7. Záver

Našou štúdiou sme teda vybrali najefektívnejšiu metódu izolácie exozómov a stanovili jej podmienky. Metóda zrážania PEG sa ukázala ako najefektívnejšia, a preto ju odporúčame pre rozsiahle skriningové štúdie.

Získali sme exozómy, ktoré charakterizujeme guľovitým tvarom s viditeľnou lipidovou dvojvrstvou a veľkosťou 30-130 nm. Bola tiež dokázaná prítomnosť exozómov špecifických markerov CD9, CD63, CD81. Porovnanie stanovenia obsahu proteínu Bradfordovou metódou a stanovenie prítomnosti špecifických markerov pomocou ELISy ukázalo, že Bradfordova metóda je vhodná na stanovenie obsahu exozómov, nakoľko výsledky týchto dvoch metód silne spolu korelovali.

Porovnali sme metódy plnenia liečiv do exozómov a stanovili sme podmienky efektívneho plnenia. Exozóm je najviac ovplyvňovaný elektroporáciou, menej chladením/zahrievaním a najmenej inkubáciou a sonikáciou ultrazvukom. Na plnenie liečiv do exozómov sa odporúča sonifikácia ultrazvukom pri 40 % amplitúde a päť tridsaťsekundových cykloch záťaž/pauzy, ktorá sa ukázala ako najúčinnější s najmenším deštrukčným účinkom na exozóm.

Exozómy s DOX udržiavajú stabilné koncentrácie liečiva pri skladovaní pri + 4 °C a -20 °C po dobu až 14 dní, teda odporúčame skladovať pri -20 °C maximálne 14 dní. Exozómy s TMZ a PTX udržiavajú naplnené množstvo liečiva pri + 4 °C až 14 dní. Exozómy s DOX, TMZ a PTX si uchovávajú naplnené množstvo liečiva uložené pri teplote -40 °C a -80 °C počas 28 dní.

Exozómy s DOX vstupujú do buniek glioblastómu po 2 h a DOX spôsobí ich smrť po 14 h. Exozómy makrofágov prechádzajú HEB a vstupujú do mozgu do 1 h po intranazálnom podaní. Pri plánovaní štúdií *in vivo* odporúčame, aby exozómy vstúpili do mozgu do 1 h po intranazálnom podaní, tak aby očakávaný nástup účinku je medzi 0,5 a 1 h po zavedení.

Exozómy izolované z makrofágov sú teda vhodným systémom na dodanie protirakovinových liečiv do mozgu v terapii multiformného glioblastómu.

8. Zoznam skratiek

AJ - adherentné spoje (adherence junctions)

AML - akútna myeloidná leukémiy

ATP - adenzín-5'-trifosfát

CD - označenie klastru

CNS – centrálny nervový systém

CT - počítačová tomografia (Computed Tomography)

DEX – dendrické bunky

DNA – kyselina deoxyribonuleová

DOX- doxorubicín

EE - (early endosome) skorý endozóm

EGFR - receptor pre epidermový rastový faktor

ESCRT - transport vyžadujúci endozomálny distribučný komplex (Endosomal sorting complex required for transport)

EV - extracelulárnych vezikúl

Exo-DOX (TMZ, PXT) - Exozomálne formy DOX, TMZ, PXT

GJ - medzerovité spoje (gap junctions)

GMB – glioblastoma multiforme

HEB - hematoencefalická bariera

ILVs - intraluminálne vezikuly

LE - neskorý endozóm (late endosome)

MDM - Mouse Double Minute homolog

MHC I. a II. - hlavný histokompatibilný komplex

miRNA – mikro-RNA

MM - malígný mezotelióm

MOF - kovovo-organické štruktúry

MR - spektroskopia – magnetická rezonančná spektroskopia

MRI - zobrazovanie magnetickou rezonanciou (magnetic resonance imaging)

mRNA – mediátorová RNA

MSC - mezenchymálne kmeňové bunky

mTOR - cicavčí rapamycínový receptor

MVB - multivesikulárne telo (multivesicular body)

ncRNA – non-coding RNA, nekódujúce RNA

PDGF-alfa - rastový faktor odvodený z doštičiek alfa

PDGF-R - receptory rastového faktora odvodené z doštičiek

PEG - polyetylénglykol

PMA – forbolmyristát - acetát

PTEN - rastový faktor odvodený z doštičiek

PXT - paklitaxel

RMS - rhabdomyosarkómom

RNA - kyselina ribonukleová

SEC - rozmerovo-vylučovacia chromatografia

TEM - transmisný elektrónový mikroskop

THP-1 – línia buniek ľudskej monocytárnej leukémie

TJ- tesné spoje (tight junctions)

T-ly – T-lyfocyty

TMZ - temozolomid

TRPS - laditeľné odporové pulzné snímanie

WHO - svetová zdravotnícka organizácia

9. Zoznam obrázkov

Obr.1. Mechanizmus zrenia a vylučovania exozómov.

Obr.2. Schematické znázornenie štruktúry exozómu.

Obr.3. Princíp metód izolácie a purifikácie extracelulárnych vezikúl (EV).

Obr.4. Kalibračná krivka je určená na stanovenie koncentrácie proteínu pomocou Bradfordovej metódy.

Obr.5. Analýza veľkosti častíc rôznych čistených exozomálnych prípravkov pomocou Zetaseizer.

Obr.6. Prípravy rôznych čistených exozómov sa zobrazujú pomocou transmisného elektrónového mikroskopu.

Obr.7. Reprezentatívne obrázky exozómov ovplyvnených rôznymi metódami nanášania liečiva sú vidieť pod transmisným elektrónovým mikroskopom.

Obr.8. Štúdia stability exozómov s DOX (a), TMZ (b) a PTX (c).

Obr.9. Prístup exozómov s DOX k C6 glioblastómovým bunkám.

Obr.10. Exozómy v prípravkoch myšieho mozgu po 1 (a), 2 (b), 3 (c) a 4 (d) hodinách.

10. Zoznam tabuliek

Tab.1. Množstvo CD9, CD63 a CD81 v ng/mg celkového proteínu na prípravu exozómov

Tab.2. Korelácia medzi obsahom CD9, CD63, CD81 a celkovým obsahom bielkovín v prípravkoch obsahujúcich exozómy.

Tab.3. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómov inkubáciou za rôznych podmienok .

Tab.4. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómov metódou chladenia a zahrievania.

Tab.5. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómov elektroporačnou metódou.

Tab.6. Účinnosť inzercie DOX, TMZ a PTX do exozómu ultrazvukovou sonoporáciou.

Tab.7. Vplyv DOX, TMZ, PXT na životaschopnosť C6 buniek glioblastómu.

11. Literatúra

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>

Abdelmagid, S. M., Sondag, G. R., Moussa, F. M., Belcher, J. Y., Yu, B., Stinnett, H., Novak, K., Mbimba, T., Khol, M., Hankenson, K. D., Malcuit, C., & Safadi, F. F. (2015). Mutation in Osteoactivin Promotes Receptor Activator of NFκB Ligand (RANKL)-mediated Osteoclast Differentiation and Survival but Inhibits Osteoclast Function. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20128–20146. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.624270>

Agrawal, A. K., Aqil, F., Jeyabalan, J., Spencer, W. A., Beck, J., Gachuki, B. W., Alhakeem, S. S., Oben, K., Munagala, R., Bondada, S., & Gupta, R. C. (2017). Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(5), 1627–1636. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.001>

Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1180>

Batrakova, E. V., & Kim, M. S. (2015). Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 219, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.030>

Bhayani, M. K., Calin, G. A., & Lai, S. Y. (2012). Functional relevance of miRNA* sequences in human disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 731(1–2), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.10.014>

Birrenbach, G., & Speiser, P. P. (1976). Polymerized Micelles and Their Use as Adjuvants in Immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(12), 1763–1766. <https://doi.org/10.1002/jps.2600651217>

Bobrie, A., & Théry, C. (2013). Unraveling the physiological functions of exosome secretion by tumors. *Oncotarget*, 2(1), e22565. <https://doi.org/10.4161/onci.22565>

Bogunia-Kubik, K., & Sugisaka, M. (2002). From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems*, 65(2–3), 123–138. [https://doi.org/10.1016/s0303-2647\(02\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s0303-2647(02)00010-2)

- Bruce, Jeffrey N. Glioblastoma Multiforme [online]. Posledná revízia 2019, [cit. 2020-02-13]. Dostupné z : < <https://emedicine.medscape.com/article/283252-overview> >
- Bu, H., He, D., He, X., & Wang, K. (2018). Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. *ChemBioChem*, 20(4), 451–461. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800470>
- Bunggulawa, E. J., Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y., & Wang, G. (2018). Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0403-9>
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, 17(7), 879–887. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
- Campoy, I., Lanau, L., Altadill, T., Sequeiros, T., Cabrera, S., Cubo-Abert, M., Pérez-Benavente, A., Garcia, A., Borrós, S., Santamaria, A., Ponce, J., Matias-Guiu, X., Reventós, J., Gil-Moreno, A., Rigau, M., & Colas, E. (2016). Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. *Journal of Translational Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0935-4>
- Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H.-J., & Ugaz, V. M. (2017). Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a Chip*, 17(21), 3558–3577. <https://doi.org/10.1039/c7lc00592j>
- Creative-biolabs. Exosome isolation and purification, [cit. 2020-02-19]. Dostupné z : < <https://www.creative-biolabs.com/exosome/exosome-purification-via-size-exclusion-chromatography-sec.htm>>
- Cui, Z., & Mumper, R. J. (2001). Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *Journal of Controlled Release*, 75(3), 409–419. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00407-2)
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Diaz, G., Bridges, C., Lucas, M., Cheng, Y., Schorey, J. S., Dobos, K. M., & Kruh-Garcia, N. A. (2018). Protein Digestion, Ultrafiltration, and Size Exclusion Chromatography to

Optimize the Isolation of Exosomes from Human Blood Plasma and Serum. *Journal of Visualized Experiments*, 134. <https://doi.org/10.3791/57467>

Duerr, E.-M., Rollbrocker, B., Hayashi, Y., Peters, N., Meyer-Puttlitz, B., Louis, D. N. (1998). PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene*, 16(17), 2259–2264. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201756>

Ellor, S. V., Pagano-Young, T. A., & Avgeropoulos, N. G. (2014). Glioblastoma: Background, Standard Treatment Paradigms, and Supportive Care Considerations. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, 42(2), 171–182. <https://doi.org/10.1111/jlme.12133>

Fadul, C. E., Wen, P. Y., Kim, L., & Olson, J. J. (2009). Cytotoxic chemotherapeutic management of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, 92(2), 239–239. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9776-1>

Fang, S., Tian, H., Li, X., Jin, D., Li, X., Kong, J., Yang, C., Yang, X., Lu, Y., Luo, Y., Lin, B., Niu, W., & Liu, T. (2017). Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification. *PLOS ONE*, 12(4), e0175050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175050>

Fernandes C, Costa A, Osório L., Lago, R. C., Linhares, P., Carvalho B., & Caeiro, C. (2017). Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In *Glioblastoma* (pp. 197–241). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11>

Friedman, H. S., McLendon, R. E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S. H., Henry, A. J., Ashley, D. M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A. J., Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O. M., Provenzale, J. M., Bigner, D. D., Haglund, M. M., Modrich, P. L. (1998). DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 16(12), 3851–3857. <https://doi.org/10.1200/jco.1998.16.12.3851>

Frydrychowicz, M., Kolecka-Bednarczyk, A., Madejczyk, M., Yasar, S., & Dworacki, G. (2014). Exosomes - Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 81(1), 2–10. <https://doi.org/10.1111/sji.12247>

Gallego, O. (2015). Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current Oncology*, 22(4), 273. <https://doi.org/10.3747/co.22.2436>

- Glantz, M. J., Cole, B. F., Forsyth, P. A., Recht, L. D., Wen, P. Y., Chamberlain, M. C., Grossman, S. A., & Cairncross, J. G. (2000). Practice parameter: Anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 54(10), 1886–1893. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.10.1886>
- Gousias, K., Markou, M., Voulgaris, S., Goussia, A., Voulgari, P., Bai, M., Polyzoidis, K., Kyritsis, A., & Alamanos, Y. (2009). Descriptive Epidemiology of Cerebral Gliomas in Northwest Greece and Study of Potential Predisposing Factors, 2005–2007. *Neuroepidemiology*, 33(2), 89–95. <https://doi.org/10.1159/000222090>
- Haj-Salem, I., Plante, S., Gounni, A. S., Rouabhia, M., & Chakir, J. (2017). Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma. *Allergy*, 73(1), 178–186. <https://doi.org/10.1111/all.13234>
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B., Burger, P. C., Wood, P. A., Taqi, F., Booker, S. V., Petersen, G. M., Offerhaus, G. J. A., Tersmette, A. C., Giardiello, F. M., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1995). The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 332(13), 839–847. <https://doi.org/10.1056/nejm199503303321302>
- Harries, M., Ellis, P., & Harper, P. (2005). Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel for Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7768–7771. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.08.002>
- Hartl, J., Palát, K. : Farmaceutická chemie I. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2011.s. 102.
- He, L., Zhu, D., Wang, J., & Wu, X. (2018). A highly efficient method for isolating urinary exosomes. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3944>
- Hong, C. S., Muller, L., Boyiadzis, M., & Whiteside, T. L. (2014). Isolation and Characterization of CD34+ Blast-Derived Exosomes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*, 9(8), e103310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103310>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>

- Chakrabarti, I., Cockburn, M., Cozen, W., Wang, Y.-P., & Preston-Martin, S. (2005). A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer*, 104(12), 2798–2806. <https://doi.org/10.1002/cncr.21539>
- Jiang, X.-C., & Gao, J.-Q. (2017). Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 521(1–2), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.038>
- Johnsen, K. B., Gudbergsson, J. M., Skov, M. N., Pilgaard, L., Moos, T., & Duroux, M. (2014). A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles — Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1846(1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.005>
- Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., J Tai, S., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., & High, K. A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genetics*, 24(3), 257–261. <https://doi.org/10.1038/73464>
- Khurana, V., Jain, S., Smee, R., Cook, R., Dobes, M., Shadbolt, B., Smith, S., & Dexter, M. (2011). Increasing incidence of glioblastoma multiforme and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000-2008): Findings of a multicenter Australian study. *Surgical Neurology International*, 2(1), 176. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.90696>
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Yuan, D., Deygen, I., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2018). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.011>

- Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology*, 1(1), 44–51. <https://doi.org/10.1093/neuonc/1.1.44>
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., & Cavenee, W. K. (2002). The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61(3), 215–225. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.3.215>
- Ko, J., Carpenter, E., & Issadore, D. (2016). Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *The Analyst*, 141(2), 450–460. <https://doi.org/10.1039/c5an01610j>
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., McCutcheon, I. E., Hassenbusch, S. J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., & Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*, 95(2), 190–198. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>
- Lakomý, R., Fadrus, P., Šlampa, P., Poprach, A., Svoboda, T., Vybíhal, V., Křen, L., Belanová, R., Šíková, I., Slabý, O. Glioblastoma multiforme - naše zkušenosti s léčbou v letech 2003-2008. In *Edukační sborník: XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky*, 2010, č. 48.
- Lakomý, R., Fadrus, P., Šlampa, P., Svoboda, T., Křen, L., Lžičarová, E., Belanová, R., Šíková, I., Poprach, A., Schneiderová, M., Procházková, M., Šána, J., Slabý, O., Smrčka, M., Vyzula, R., Svoboda, M. Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: Konsekutivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009. *Klinická onkologie*, 2011, roč. 24, č. 2, s. 112-120.
- Langer, R. (2000). Biomaterials in Drug Delivery and Tissue Engineering: One Laboratory's Experience. *Accounts of Chemical Research*, 33(2), 94–101. <https://doi.org/10.1021/ar9800993>
- Lee, C.-H., Jung, K.-W., Yoo, H., Park, S., & Lee, S. H. (2010). Epidemiology of Primary Brain and Central Nervous System Tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 48(2), 145. <https://doi.org/10.3340/jkns.2010.48.2.145>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>

Lincová, D., Farghali, H., et al. : *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1.vydání, Galén, Praha, 2002, s. 12

Lopez, K. A., Waziri, A. E., Canoll, P. D., & Bruce, J. N. (2006). Convection-enhanced delivery in the treatment of malignant glioma. *Neurological Research*, 28(5), 542–548. <https://doi.org/10.1179/016164106x116836>

Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., & Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(6), e346–e346. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.63>

Matters, M. (přeložila Soldánová, J.) : Could re-growing nerves be possible (Byl by možný opětý vývin nervov?), revízia: 10. 2002 . [cit. 2020-01-06]. Dostupné z : <<http://www.roskaczmsz.cz/casopis/html/02-03/nervy.html>>

McDonald, M. K., Capasso, K. E., & Ajit, S. K. (2013). Purification and microRNA Profiling of Exosomes Derived from Blood and Culture Media. *Journal of Visualized Experiments*, (76). <https://doi.org/10.3791/50294>

Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P.-Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., Saracoglu, E., Skog, J., & Kuo, W. P. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological Chemistry*, 394(10), 1253–1262. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141>

Mukundan, S., Holder, C., & Olson, J. J. (2008). Neuroradiological assessment of newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 89(3), 259–269. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9616-3>

Nabavi N, Bennewith KL, Churg A, Wang Y, Collins CC, Mutti L. Switching off malignant mesothelioma: exploiting the hypoxic microenvironment. (2017). *Genes & Cancer*. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.124>

Nečas, O. et al. – *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3.vydání, H& H Vyšehradská, Jinočany, 2000, s. 157 – 183

Nesse, A., Michl, P., Frese, K. K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M. A., Lolkema, M. P., Buchholz, M., Olive, K. P., Gress, T. M., & Tuveson, D. A. (2010). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 60(6), 861–868. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.226092>

Němeček, S., Levitan, I.B., Kaczmarek, L.K., : Glie, revízia: 03. 1997, [cit. 2020-01-10].
Dostupné z : < <http://www1.lfl.cuni.cz/~zfsisar/bp/1.4.htm> >

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1445–1453.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15(suppl 2), ii1-ii56. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not151>

Paw, I., Carpenter, R. C., Watabe, K., Debinski, W., & Lo, H.-W. (2015). Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Letters*, 362(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.015>

Pazdera, J. : Mikroglie. revízia: 11. 2003, [cit. 2020-01-10]. Dostupné z :
<<http://www.osel.cz/tisk.php?clanek=457>>

Piroth, M. D., Holy, R., Pinkawa, M., Stoffels, G., Kaiser, H. J., Galldiks, N., Herzog, H., Coenen, H. H., Eble, M. J., & Langen, K. J. (2011). Prognostic impact of postoperative, pre-irradiation 18F-fluoroethyl-L-tyrosine uptake in glioblastoma patients treated with radiochemotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 99(2), 218–224.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.03.006>

Preusser, M., de Ribaupierre, S., Wöhrer, A., Erridge, S. C., Hegi, M., Weller, M., & Stupp, R. (2011). Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of Neurology*, 70(1), 9–21. <https://doi.org/10.1002/ana.22425>

Prnka T., Šperlink K., Bionanotechnológia, nanotechnologie, nanomedicina, 2006, 71-96

Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D., & Kloecker, G. H. (2009). Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 10(1), 42–46. <https://doi.org/10.3816/clc.2009.n.006>

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>

- Roth, J. G., & Elvidge, A. R. (1960). Glioblastoma Multiforme: A Clinical Survey. *Journal of Neurosurgery*, 17(4), 736–750. <https://doi.org/10.3171/jns.1960.17.4.0736>
- Ryken, T. C., Frankel, B., Julien, T., & Olson, J. J. (2008). Surgical management of newly diagnosed glioblastoma in adults: role of cytoreductive surgery. *Journal of Neuro-Oncology*, 89(3), 271–286. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9614-5>
- Sathornsumetee, S., Reardon, D. A., Desjardins, A., Quinn, J. A., Vredenburgh, J. J., & Rich, J. N. (2007). Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*, 110(1), 13–24. <https://doi.org/10.1002/cncr.22741>
- Sato, Y. T., Umezaki, K., Sawada, S., Mukai, S., Sasaki, Y., Harada, N., Shiku, H., & Akiyoshi, K. (2016). Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep21933>
- Scott, J. N., Rewcastle, N. B., Brasher, P. M. A., Fulton, D., Hagen, N. A., MacKinnon, J. A., Sutherland, G., Cairncross, J. G., & Forsyth, P. (1998). Long-term Glioblastoma Multiforme Survivors: a Population-based Study. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 25(3), 197–201. <https://doi.org/10.1017/s0317167100034016>
- Segura, E., Amigorena, S., & Théry, C. (2005). Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.05.003>
- Shapiro, W. R., Green, S. B., Burger, P. C., Mahaley, M. S., Selker, R. G., VanGilder, J. C., Robertson, J. T., Ransohoff, J., Mealey, J., Strike, T. A., & Pistenmaa, D. A. (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. *Journal of Neurosurgery*, 71(1), 1–9. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.1.0001>
- Sharma, P., Ludwig, S., Muller, L., Hong, C. S., Kirkwood, J. M., Ferrone, S., & Whiteside, T. L. (2018). Immunoaffinity-based isolation of melanoma cell-derived exosomes from plasma of patients with melanoma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1435138. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1435138>
- Shimoda, M., & Khokha, R. (2013). Proteolytic factors in exosomes. *PROTEOMICS*, 13(10–11), 1624–1636. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200458>

Schindler, C., Collinson, A., Matthews, C., Pointon, A., Jenkinson, L., Minter, R. R., Vaughan, T. J., & Tigue, N. J. (2019). Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry and enhanced in vitro potency. *PLOS ONE*, 14(3), e0214545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214545>

Singh, P., & Nanda, A. (2014). Enhanced sun protection of nano-sized metal oxide particles over conventional metal oxide particles: An in vitro comparative study. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(3), 273–283. <https://doi.org/10.1111/ics.12124>

Song, W., Ruder, A. M., Hu, L., Li, Y., Ni, R., Shao, W., Tang, J. (2009). Genetic Epidemiology of Glioblastoma Multiforme: Confirmatory and New Findings from Analyses of Human Leukocyte Antigen Alleles and Motifs. *PLoS ONE*, 4(9), e7157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007157>

Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. (2002). *The Lancet*, 359(9311), 1011–1018. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)08091-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)08091-1)

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/nejmoa043330>

Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.m003657>

Sung, B. H., & Weaver, A. M. (2017). Exosome secretion promotes chemotaxis of cancer cells. *Cell Adhesion & Migration*, 11(2), 187–195. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1273307>

Szabo-scandic. Everything you wanted to know about exosomes. revízia: 03.2019, [cit. 2020-02-23]. Dostupné z : < <https://www.szabo-scandic.com/information/newsletter/maerz-2019/everything-you-wanted-to-know-about-exosomes-but-were-afraid-to-ask/>>

Šlampa P , Burkoň P a Komínek L. Glioblastom přehled léčby [online]. ©2010. Poslední revize 3.9.2010, [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <<https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/glioblastom-prehled-lecby-454084> >

Šťastný, F., Pliss, L., Hoeschl, C. Proteázy a hematoencefalická bariéra [online]. Posledná revízia: 11.2002, [cit. 2020-02-13]. Dostupné z : < <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/PSYCH 402/04.htm> >

Taieb, J., Chaput, N., Scharz, N., Roux, S., Novault, S., Ménard, C., Ghiringhelli, F., Terme, M., Carpentier, A. F., Darrasse-Jèse, G., Lemonnier, F., & Zitvogel, L. (2006). Chemoimmunotherapy of Tumors: Cyclophosphamide Synergizes with Exosome Based Vaccines. *The Journal of Immunology*, 176(5), 2722–2729. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2722>

Tamimi AF, Juweid M. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In *Glioblastoma* (pp. 143–153). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>

Tamimi, A. F., Tamimi, I., Abdelaziz, M., Saleh, Q., Obeidat, F., Al-Husseini, M., Haddadin, W., & Tamimi, F. (2015). Epidemiology of Malignant and Non-Malignant Primary Brain Tumors in Jordan. *Neuroepidemiology*, 45(2), 100–108. <https://doi.org/10.1159/000438926>

Tamkovich, S. N., Tutanov, O. S., & Laktionov, P. P. (2016). Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 10(3), 163–173. <https://doi.org/10.1134/s1990747816020112>

Taylor. A., Wilson, T., & Karajannis, M. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5(1), 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>

Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-14-0275>

- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Thomas, W. E. (1999). Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Research Reviews*, 31(1), 42–57. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(99\)00024-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(99)00024-7)
- Tian, T., Zhang, H.-X., He, C.-P., Fan, S., Zhu, Y.-L., Qi, C., Huang, N.-P., Xiao, Z.-D., Lu, Z.-H., Tannous, B. A., & Gao, J. (2018). Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*, 150, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.012>
- Tili, E., Michaille, J.-J., & Croce, C. M. (2013). MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunological Reviews*, 253(1), 167–184. <https://doi.org/10.1111/imr.12050>
- Véron, P., Segura, E., Sugano, G., Amigorena, S., & Théry, C. (2005). Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.05.001>
- Wang, C., Zhang, C., Liu, L., A, X., Chen, B., Li, Y., & Du, J. (2017). Macrophage-Derived mir-155-Containing Exosomes Suppress Fibroblast Proliferation and Promote Fibroblast Inflammation during Cardiac Injury. *Molecular Therapy*, 25(1), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.09.001>
- Waugh, M. G. (2014). Chromosomal Instability and Phosphoinositide Pathway Gene Signatures in Glioblastoma Multiforme. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 621–630. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9034-9>
- Wei, W. G., Zou, S., Ong, W. Y., Torta, F., Alexandra, A. F., Schiffelers, R. M., Storm, G., Wang, J.-W., Czarny, B., & Pastorin, G. (2017). Bioinspired Cell-Derived Nanovesicles versus Exosomes as Drug Delivery Systems: a Cost-Effective Alternative. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14725-x>
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., & Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2965–2969. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2965>

- Yang, C., Guo, W. -b., Zhang, W. -s., Bian, J., Yang, J. -k., Zhou, Q. -z., Chen, M. -k., Peng, W., Qi, T., Wang, C. -y., & Liu, C. -d. (2017). Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. *Andrology*, 5(5), 1007–1015. <https://doi.org/10.1111/andr.12412>
- Yin, J., Zeng, A., Zhang, Z., Shi, Z., Yan, W., & You, Y. (2019). Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine*, 42, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.016>
- Yuan, D., Zhao, Y., Banks, W. A., Bullock, K. M., Haney, M., Batrakova, E., & Kabanov, A. V. (2017). Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials*, 142, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.011>
- Yuyama, K., & Igarashi, Y. (2017). Exosomes as Carriers of Alzheimer's Amyloid- β . *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00229>
- Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. V. (2015). Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4), pdb.top074476. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074476>
- Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R. C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2011). Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Molecular Therapy*, 19(10), 1769–1779. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.164>
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>