

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

JAUNA PIEEJA PROSTATAS VĒŽA CIRKULĒJOŠU  
EKSTRACELULĀRO VEZIKULU SELEKTĪVAI  
IZOLĒŠANAI UN TO IETVERTO RNS BIOMARKĶIERU  
ANALĪZE

Bakalaura darbs

Autors: Sindija Šmite

Stud. apl. Nr.: ss18081

Darba vadītājs: Msc. biol. Edgars Endzeliņš

RĪGA 2021

## KOPSAVILKUMS

Audzēju producētās ekstracelulārās vezikulas (EVs) ir ieguvušas ievērojamu uzmanību zinātnieku vidū pēdējo gadu laikā, kā daudzsološs biomarkieru avots ar potenciālu pielietojumu vēža diagnostikā, prognostikā un monitorēšanā. Pacientu biofluīdos cirkulējošo EV izmantošanu šiem mērķiem apgrūtinā tas, ka vēža izcelsmes EVs bieži sastāda zemu proporciju no kopējā parauga EV satura un šī proporcija mēdz atšķirties pacientu starpā. Tādēļ vajadzīgs meklēt jaunas pieejas, kas ļautu selektīvi izolēt un analizēt noteiktas EV subpopulācijas, kas bagātinātas ar vēža izcelsmes biomarkieriem.

Adresējot šo aktualitāti, bakalaura darbā tika attīstīta un testēta jauna EV subpopulāciju izolēšanas metode – ar antivielām noklātu magnētisko nanodaļiņu (MNP) izmantošana. Konjugēšanai ar MNP tika izmantotas antivielas pret PSMA (prostatas specifisks marķieris) un CD63 (universāls EV marķieris) un, testējot konstruktus ar bioreaktorā ģenerētām PSMA+ LNCaP līnijas EVs, apstiprināts, ka tie ar augstu efektivitāti spēj piesaistīt attiecīgās EV populācijas. Tālākie rezultāti liecināja, ka imunoafīni izolētas PV pacientu urīna EVs satur augstāku mērķa subpopulācijas līmeni, nekā ar SEC izdalītā EV populācijā. Sākotnējie ddPCR testi apstiprināja PV marķiera miR-375 klātbūtni imunoafīni izolētās PV pacientu urīna EV subpopulācijās.

Atslēgas vārdi: Prostatas vēzis; Ekstracelulārās vezikulas; Šķidrās biopsijas; Imunoizolēšana; Magnētiskās nanodaļiņas; Biomarkieri; miRNS.

## SUMMARY

Tumour-produced extracellular vesicles (EVs) have gained considerable attention among scientists in recent years as a promising source of biomarkers with potential applications in cancer diagnosis, prognosis and monitoring. The use of EVs circulating in patients' biofluids for these purposes is complicated by the fact that EVs of cancer origin often represent a low proportion of the total EV content of the sample and this proportion tends to vary between patients. Therefore, new approaches are needed to selectively isolate and analyse specific subpopulations of EVs enriched in biomarkers of cancer origin.

To address this need, a novel method for isolating EV subpopulations, the use of antibody-coated magnetic nanoparticles (MNPs), was developed and tested in a bachelor thesis. Antibodies against PSMA (prostate specific marker) and CD63 (universal EV marker) were used for conjugation to MNPs and the constructs were tested with bioreactor generated PSMA+ LNCaP line EVs and confirmed to be able to recruit target EV populations with high efficiency. Further results showed that immunoaffinity-isolated urinary EVs from PV patients contained higher levels of the target subpopulation than the SEC-isolated EV population. Preliminary ddPCR assays confirmed the presence of the PV marker miR-375 in immunoaffinity isolated PV patient urinary EV subpopulations.

Keywords: Prostate cancer; Extracellular vesicles; Liquid biopsies; Immunoisolation; Magnetic nanoparticles; Biomarkers; miRNA.

## SAĪSINĀJUMI

Ab-MNP – Antivielas un magnētisko nanodaļiņu konjugācijas konstrukts	MV – Mikrovezikula
AGR – Augstas glikozes raža	MVĶ – Multivezikulārais ķermenītis
ALIX – <i>ALG-2-interacting protein X</i>	NGS – Jaunās paaudzes sekvenčēšana
AUC – <i>Area under curve</i>	NTA – Nanodaļiņu izsekošanas analīze
BME – beta-merkaptotetanolis	PBS – Fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums
CDM-HD – <i>Chemically Defined Medium For High Density Cell Culture</i>	PCA3 – Prostatas vēža antigēns 3
cf-DNS – Cirkulējoša brīvā dezoksiribonukleīnskābe	PHI – Prostatas veselības indekss
CTC – Cirkulējošā audzēja šūna	PSA – Prostatas specifiskais antigēns
ct-DNS – Cirkulējoša audzēju dezoksiribonukleīnskābe	PSMA – Prostatas specifiskais membrānas antigēns
ddPCR – Digitālā pilienu polimerāzes ķēdes reakcija	PV – Prostatas vēzis
DEPC – Dietil-pirokarbonāts	PVO – Pasaules Veselības Organizācija
DMEM – <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	qPCR – Kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija
DRI – Digitāli rektālā izmeklēšana	qRT-PCR – Kvantitatīvā reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija
dsDNS – Divpavedienu dezoksiribonukleīnskābe	SEC – Izmēru izslēgšanas hromatogrāfija
EUA – Eiropas Urologu asociācija	ssDNS – Vienpavedienu dezoksiribonukleīnskābe
EV – Ekstracelulārā vezikula	Sulfo-NHS – N-hidroksisulfosukcinimīds
FBS – Liellopa augļa serums	TSG101 – Audzēja uzņēmības gēns 101
ILV – Intraluminālā vezikula	ZGR – Zemas glikozes raža
LPH – Labdabīga prostatas hiperplāzija	
MES – 4-morfolinoetānsulfoskābe	
MHC – Galvenais audu saderības komplekss	
miRNS – Mikro-ribonukleīnskābe	
MNP – Magnētiskā nanodaļiņa	
mRNS – Matricas ribonukleīnskābe	

## SATURA RĀDĪTĀJS

Ievads.....	7
1. Literatūras apskats .....	9
1.1. Prostatas vēža sastopamība un diagnostika .....	9
1.1.1. Prostatas vēža klasifikācija.....	10
1.1.2. PV simptomi un diagnostikas metodes .....	12
1.2. Ekstracelulārās vezikulas, to bioģenēze .....	18
1.2.1. EV tipi .....	18
1.2.2. EV bioģenēzes mehānismi .....	18
1.2.3. EV uzbūve un sastāvs.....	21
1.2.4. EV fizioloģiskā loma.....	23
1.3. EV iegūšana pētījumu vajadzībām .....	26
1.3.1. EV iegūšanas avoti .....	26
1.3.2. EV izolēšana.....	28
2. Materiāli un metodes .....	30
2.1. Materiāli.....	30
2.1.1. Šūnu līnijas .....	30
2.1.2. Barotnes un gēli.....	30
2.1.3. Reaģenti un izejvielas.....	31
2.1.4. Reaģentu komplekti.....	33
2.1.5. Aprīkojums un materiāli.....	34
2.1.6. Šķīdumu sagatavošana .....	37
2.1.7. Darba drošība .....	39
2.2. Metodes .....	41
2.2.1. Vēža šūnu līnijas kultivēšana .....	41
2.2.2. EV izdalīšana.....	42
2.2.3. Magnētisko nanodaļiņu un antivielu konjugācija.....	45
2.2.4. <i>DotBlot</i> analīze .....	46
2.2.5. Dzelzs satura noteikšana .....	47
2.2.6. EV imunoizolēšana.....	47
2.2.7. Šūnu lizāta sagatavošana .....	48

2.2.8. <i>Western blot</i> analīze .....	48
2.2.9. Urīna paraugu apstrāde.....	50
2.2.10. EV-noplicināta urīna iegūšana .....	50
2.2.11. Nanodaļiņu izsekošanas analīze .....	51
2.2.12. Proteīnu koncentrācijas noteikšana ar BCA metodi.....	51
2.2.13. RNS izdalīšana .....	52
2.2.14. kDNS sintēze.....	53
2.2.15. Digitālā pilienu polimerāzes ķēdes reakcija .....	53
3. Rezultāti.....	55
3.1. EV iegūšana no dobo šķiedru bioreaktora apstākļos kultivētām LNCaP šūnām .....	55
3.2. Dažāda antivielu blīvuma MNP konjugātu efektivitātes salīdzinājums un imunoizolēšanas apstākļu optimizācija.....	57
3.3. EV-noplicināta urīna iegūšana un raksturošana .....	59
3.4. Konjugēto MNP efektivitāte un specifiskums.....	60
3.5. Darbplūsmas optimizācija EV ietverto RNS kvantitēšanai: RNS izdalīšanas soļa nepieciešamības izvērtējums .....	61
3.6. Imunoizolēšanas un SEC efektivitātes salīdzinājums PV pacientu urīna paraugos .....	62
3.7. RNS marķieru kvantitēšana imunoizolētās PV pacientu urīna EVs.....	63
4. Diskusija .....	65
4.1. EV producēšana bioreaktorā.....	65
4.2. Ar antivielām konjugēto MNP konstruktū raksturošana .....	66
4.3. Ar antivielām konjugēto MNP konstruktū veiktspējas testēšana urīna bioparaugos .....	67
4.4. RNS biomarķieru analīze no PV pacientu urīna imunoizolētām EVs.....	69
5. Secinājumi .....	71
6. Pateicības .....	72
7. Literatūras saraksts .....	73

## IEVADS

Vēzis ir otra nāvējošākā slimība pasaulē, kas 2018. gadā prasījusi aptuveni 9,6 milj. dzīvību. Izplatītākie vēža veidi ir plaušu, krūts, kolorektālais un prostatas (WHO, 2021). Šobrīd izplatītākā metode prostatas vēža diagnosticēšanai un monitorēšanai ir audu biopsiju veikšana. Tā ir invazīva metode un var radīt īslaicīgu, pat ilglaicīgu diskomfortu. Aktuālāka kļūst šķidro biopsiju (asins, urīns, likvors u.c.) izmantošana vēža diagnostikā, kas ļauj izvairīties no klasiskās biopsijas mīnusiem. Šķidro biopsiju priekšrocības: iespēja minimāli invazīvā veidā iegūt lielāku parauga daudzumu; cirkulējošās biomarkķieru molekulas spēj reprezentēt audzēja attīstību reālajā laikā; ātra cirkulējošo biomarkķieru analīze, kas noder efektīvākai terapijas pielāgošanai. Par biomarkķieriem var izmantot cirkulējošas audzēja šūnas, brīvi cirkulējošas nukleīnskābas un ekstracelulārās vezikulas (EVs). Fosfolipīdu dubultslāņa EV daļiņas, kuras apkārtējā vidē izdala šūnas, satur attiecīgajai šūnai atbilstošu biomolekulu repertuāru. Bioloģiskajos šķidrumos pārstāvēto EV izolēšana un tālāka to satura analīze paver jaunas iespējas vēža diagnostikā (Kretschmer A., Tilki D., 2017).

Izplatītākās EV izolēšanas metodes ir ultracentrifugācija un izmēru izslēgšanas hromatogrāfija, taču pēdējā laikā zinātniekus ir ieinteresējušas alternatīvas metodes. Tās ir tādas pieejas, kas ļauj selektīvi izolēt un analizēt noteiktas EV subpopulācijas, kas ir bagātinātas ar vēža izcelsmes biomarkķieriem. Tā kā pacientu bioloģiskajos šķidrumos cirkulējošo vēža izcelsmes EVs bieži sastāda vien zemu proporciju no kopējā tajos pārstāvēto EV repertuāra un šī proporcija mēdz ļoti atšķirties pacientu starpā, tad iepriekšminētās metodes nav optimālas vēža biomerķieru izpētei.

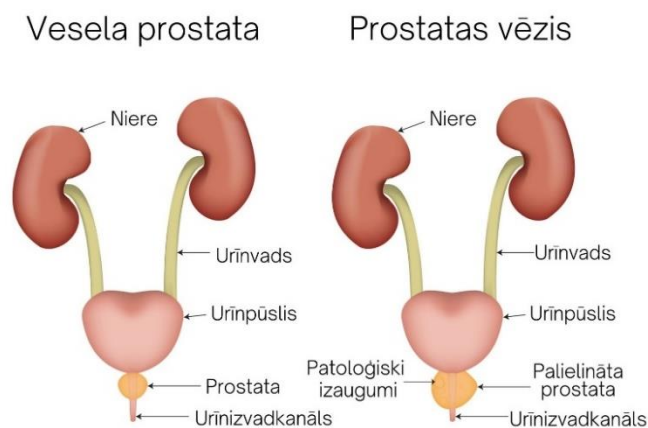
Viena no jaunākajām selektīvas EV izolēšanas metodēm ir uz imunoafinitāti balstīta metode, kurā izmanto ar antivielām klātas magnētiskās daļiņas, kas spējīgas piesaistīt mērķa antigēnu uz virsmas prezentējošas EVs (Doyle L., Wang M., 2019). Tā ir daudzsološa metode, kas ir noderīga klīnisko šķidro biopsiju izpētē, jo ļauj no šķidruma izolēt mērķētu EV subpopulāciju. EV ietvertās biomolekulas spēj sniegt detalizētu informāciju par slimības progresu un agresivitāti. Viena no tādām biomolekulu grupām, pēc kuras klīniskajos paraugos var, piemēram, atšķirt prostatas vēža un labdabīgas prostatas hiperplāzijas gadījumus, ir miRNS (Stuopelyte K. et al., 2016). Pašlaik nav neviena miRNS urīna testa agrīnai prostatas vēža atklāšanai un prognozei. Lai apstiprinātu tās miRNS, kuru izmainītā regulācija audos ir saistīta ar prostatas audzēju, ir nepieciešami papildu pētījumi ar urīnu (Foj L. et al., 2017).

Bakalaura darba mērķis bija attīstīt un testēt jaunu pieeju prostatas vēža EV subpopulācijas selektīvai izolēšanai no pacientu bioloģiskajiem šķidrumiem, kas būtu balstīta uz ar antivielām noklātu magnētisko nanodaļiņu (MNP) izmantošanu, kā arī tālāk apstiprināt, ka izolētajā subpopulācijā iespējams detektēt prostatas vēža miRNS biomarkierus. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

1. Iegūt prostatas vēža EVs no šūnu kultūras, izmantojot dobo šķiedru bioreaktoru;
2. Uzkonstruēt ar PSMA un CD63 antivielām konjugētas magnētiskās nanodaļiņas.
3. Optimizēt imūnizolēšanas apstākļus un raksturot Ab-MNP veiktspēju, tās testējot ar šūnu līniju EVs;
4. Raksturot Ab-MNP EV izolēšanas efektivitāti un specifiskumu urīna vidē;
5. Izmantot Ab-MNPs EVs subpopulāciju izolēšanai no prostatas vēža pacientu šķidrām biopsijām;
6. Analizēt prostatas vēža miRNS biomarkierus izdalītajās EV subpopulācijās, izmantojot ddPCR.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

Priekšdziedzeris jeb prostata ir vīriešiem specifisks dziedzeris; tas aptver urīnizvadkanālu, kur tas iziet no urīnpūšļa (1.attēls). Prostata ir svarīgs orgāns reproduktīvajai funkcijai, jo tajā testosterons tiek pārveidots bioloģiski aktīvā formā, kā arī tās sekretētais šķidrums sastāda daļu no spermas šķidrās komponentes, kas sajaucas ar spermatozoīdus saturošo sēklinieku sekrētu. Šis šķidrums palīdz spermatozoīdiem ceļot un izdzīvot. Anatomiski cilvēka prostatai ir trīs zonas: perifērā zona, kuru skar 60-75% prostatas vēža (PV) gadījumu, centrālā zona un pārejas zona (McNeal J., 1988). Prostatas dziedzeris satur trīs epitēlija šūnu tipus: bazālo, luminālo un neuroendokrīno (Henry G. et al., 2018). Gan luminālās šūnas, gan bazālās šūnas var kalpot par PV izcelsmes šūnām, tomēr nav zināms, vai neuroendokrīnās šūnas var transformēties (Wang G. et al., 2018). Cilvēka prostatu veido dziedzeru un stromas elementi, kas cieši saplūst pseidokapsulā (Lee C. et al., 2011).



1.attēls. Vīrieša urīnorgānu sistēmas shēma. Attēls pielāgots no currae.com.

Priekšdziedzeris atrodas zem urīnpūšļa. Prostatas centrā ir urīnizvadkanāls, caur kuru tiek izvadīts urīns. Vēža skarta prostata ir ar izaugumiem un palielināta, kas bloķē urīna plūsmu.

Figure 1. Scheme of male urinary tract. Adapted from currae.com.

The prostate is located below the bladder. In the centre of the prostate is the urethra, through which urine is passed. A prostate affected by cancer is covered with abnormal growths and is enlarged, which blocks the flow of urine.

## 1.1. Prostatas vēža sastopamība un diagnostika

Vēzis ir globāla veselības problēma, jo pēc Pasaules Veselības Organizācijas (PVO) datiem tas bija otrais sastopamākais nāves cēlonis 2020.gadā pasaulē aiz kardiovaskulārajām saslimšanām (WHO, 2021). Vēža statistikas datubāzes *Globocan* dati par 2020.gadu ziņo, ka Eiropā tika

diagnosticēti nedaudz vairāk kā 473 000 PV gadījumu, kas sastāda 20% no visiem vēžu gadījumiem vīriešiem, bet kā nāves iemesls tas ir bijis 108 000 gadījumos. Savukārt Latvijā 2020.gadā tika reģistrēts 1531 PV gadījums, kas ir 25% no visiem vēžu gadījumiem vīriešiem, kā arī 405 ar PV saistīti nāves gadījumi (Globocan, 2021).

Kā galvenais PV riska faktors tiek uzskatīts vecums – šī slimība lielākoties skar vīriešus vecumā virs 65 gadiem, taču arvien vairāk ir palielinājies PV gadījumu skaits nedaudz jaunākiem vīriešiem – vecumā no 55 gadiem (Salinas C. et al., 2014); tādēļ savlaicīga PV diagnosticēšana ir kļuvusi par aktuālu problēmu. Arī cilvēka rasei ir liela nozīme – afroamerikāņiem ir viens no augstākajiem PV saslimstības rādītājiem pasaulē (275 gadījumi uz 100 000 vīriešiem), kas ir gandrīz par 60% augstāks nekā baltajai rasei. Vēl mazāk PV skarto ir aziātu vidū (Crawford E., 2003; Platz E. et al., 2000). PV attīstību un agresivitāti vēl ietekmē smēķēšana (Weir J., Dunn J., 1970); šīs slimības iedzimtības faktori, lai gan ir pētījumi, kas gan apstiprina, gan noliedz šo (Ganesh B. et al., 2011; Simard J. et al., 2002); kā arī augums un ķermeņa masas indekss (Genkinger J. et al., 2020). No gēniem, kuru mutācijas ir saistītas ar PV, ir identificēti *HOXB13*, *BRCA1*, *BRCA2* (Wang G. et al., 2018).

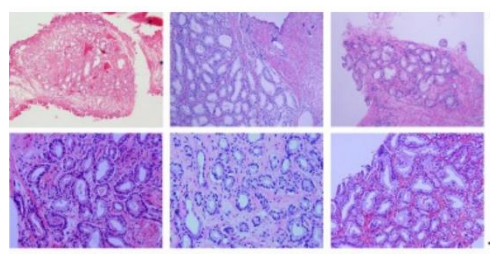
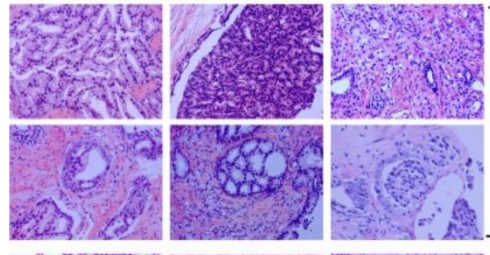
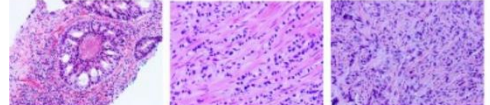
PV molekulārās izmaiņas un klīniskā gaita ir ļoti nevienmērīga. Jaunas zināšanas par audzēju morfoloģiju un saistību ar klīniskajām pazīmēm ir mudinājušas PVO pārskatīt PV klasifikāciju. Akurāta PV klasifikācija ir svarīga, lai izvēlētos atbilstošu ārstēšanas metodi. Balstoties uz jauniem pētījumiem, PV var tikt iedalīts vairākos apakštipos ar atšķirīgām molekulārajām izmaiņām un klīnisko pazīmju manifestāciju, kas pēdējos gados ļauj vēl vairāk personalizēt ārstēšanas metodes (Inamura, 2018).

### 1.1.1. Prostatas vēža klasifikācija

Prostatas šūnu patoloģijas var būt ne tikai ļaundabīgas, kā PV gadījumā, bet arī labdabīgas, kā labdabīgas prostatas hiperplāzijas (LPH) gadījumā. LPH lielākoties skar prostatas pārejas zonu, savukārt PV lielākoties sastopams perifērajā zonā (McNeal J., 1981). Amerikāņu patologs Donalds Glīsons (1992) postulēja, ka PV dažādās formas ir cieši saistītas ar tā plašo morfoloģisko izpausmi. Viņaprāt, pētniecībā ir ļoti vērtīga histoloģiskā klasifikācija, ko varētu un vajadzētu plašāk un sistemātiskāk izmantot pacientu aprūpē.

Šobrīd Glīsona klasifikācijas sistēma (2.attēls) ir viena no uzticamākajām metodēm PV agresivitātes novērtēšanai. Tā izstrādāta 20.gadsimta 60.–70.gados un 2004.gadā PVO to oficiāli apstiprināja PV klasificēšanai, un pēcāk papildināja 2016. gadā (Humphrey et al., 2016; Chen N.,

Zhou Q., 2016). Glīsona klasifikācija ir standarta pieeja prostatas adenokarcinomu histoloģiskās diferenciacijas pakāpes piešķiršanai, kas ir saistīta ar slimības smaguma pakāpi. Saskaņā ar šo sistēmu PV tiek iedalīts piecās Glīsona pakāpēs. Pakāpe tiek piešķirta pamatojoties uz dziedzeru diferenciacijas vērtējumiem, kas variē no 1 (labi diferencietas šūnas) līdz 5 (slikti diferencietas šūnas). Heterogēnās Glīsona klasifikācijas metodē, kas apstiprināta 2014.gadā, no biopsijas paraugiem tiek ņemti vērā divas sastopamākās audu diferenciacijas struktūras veidi un to vērtības saskaitītas. Saskaitot Glīsona pakāpes, iegūst Glīsona skaitli (summu), kas atbilst kādai no piecām grupām. Pirmās grupas audzējs ir mazāk agresīvs, bet piektās grupas – visvairāk agresīvs (Hasan A. et al., 2021).

	<b>Glīsona pakāpes 1-3</b> atsevišķi, individuāli dziedzeri	<b>Glīsona skaitlis ≤6</b>	<b>Grupa 1</b>	
		<b>Glīsona pakāpe 4</b> saplūduši vai slikti izveidojušies dziedzeri	<b>Glīsona skaitlis 3+4=7</b>	<b>Grupa 2</b>
			<b>Glīsona pakāpe 5</b> Pavedienveida veidojumi, zonas bez dziedzeriem, individuālas šūnas	<b>Glīsona skaitlis 4+3=7</b>
<b>Glīsona skaitlis 4+4=8</b> <b>3+5=8</b> <b>5+3=8</b>				<b>Grupa 4</b>
		<b>Glīsona skaitlis 4+5=9</b> <b>5+4=9</b> <b>5+5=10</b>	<b>Grupa 5</b>	

2.attēls. Glīsona klasifikācijas sistēma. Attēls adaptēts no Chen N., Zhou Q., 2016.

Imūnhistoloģiskie prostatas audzēju paraugi ar atbilstošu Glīsona vērtējumu pēc šūnu diferenciacijas (1-5). Saskaitot pakāpes, iegūst Glīsona skaitli (2-10). Glīsona skaitlis atbilst kādai no piecām audzēja agresivitātes grupām.

Figure 2. Gleason grading system. Adapted from Chen N., Zhou Q., 2016.

Immunohistological prostate tumour specimens with appropriate Gleason score based on cell differentiation (1-5). The Gleason grade (2-10) is obtained by summing the scores. The Gleason grade corresponds to one of five tumour aggressiveness groups.

Prostatas ļaundabīgās transformācijas procesam ir vairākas pakāpes. Tas sākas kā prostatas intraepiteliālā neoplāzija – notiek luminālo šūnu hiperplāzija, samazinās bazālo šūnu skaits un kodoli kļūst atipiski. Tam seko lokalizēts prostatas audzējs un pēc tam progresējoša prostatas adenokarcinoma ar lokālu invāziju, kas var tālāk progresēt par metastātisku PV (Shen M., Abate-Shen C., 2010; Wang G. et al., 2018). Lielākā daļa nāves gadījumu no vēža iestājas tieši metastāžu

dēļ. Limfmezgli, kas robežojas ar primāro audzēju, bieži ir pirmā metastāžu vieta, kam seko metastāzes aknās, plaušās un kaulos (Datta K. et al., 2010).

Gan normālas, gan audzēja skartas prostatas darbībai ir nepieciešami vīrišķie hormoni – androgēni. Pētījumu gaitā parādīts, ka sēklinieku androgēnu deprivācija ar ķirurģisku vai ķīmisku kastrāciju izraisa prostatas audzēju regresiju (Huggins C., Hodges C., 1941). Tomēr pēc šādas manipulācijas parasti ir novērojama PV atgriešanās. Tādā gadījumā šādu recidīvu slimību sauc par kastrācijas rezistentu prostatas vēzi (NCCN, 2020).

### 1.1.2. PV simptomi un diagnostikas metodes

Izplatītākie PV simptomi ir urīna nesaturēšana; seksuālā disfunkcija; zarnu darbības traucējumi (Talcott J. et al., 2003); sāpes gurnos, mugurā (mugurkaulā), krūtīs (ribās); kāju vai pēdu vājums vai nejutīgums (American Cancer Society, 2019). Slimības gaitai progresējot, mainās arī simptomu biežums un intensitāte.

Atkarībā no slimības stadijas PV ārstēšanai var izmantot aktīvu novērošanu, ķirurģisku ārstēšanu, ķīmijterapiju, hormonu terapiju, staru terapiju vai vairāku šo terapiju kombināciju (Miller et al., 2016). Ne mazāk svarīgi par piemērotākās terapijas izvēli, ir būtiski arī laicīgi diagnosticēt priekšdziedzera patoloģijas. Hugosson J. et al. (2010) veica populācijas skrīninga pētījumu ar mērķi novērtēt, cik efektīva ir skrīninga programma, kurā vīrieši tika izraudzīti pēc nejaušības principa un pēc tam aicināti piedalīties prostatas specifisko antigēna (PSA) testā. Pētījumā secināja, ka šāda programma samazinātu PV izraisītu mirstību pat uz pusi 14 gadu laikā, ja 76% no vīriešiem (vecumā no 50 gadiem) vismaz vienu reizi ir veiktu PSA testu. Šis ir viens no testiem ar kuru palīdzību var diagnosticēt PV, taču laika gaitā ir rastas citas metodes – ar dažādām priekšrocībām vai trūkumiem.

#### 1.1.2.1. Izplatītākās diagnostikas metodes

##### Digitāli rektālā izmeklēšana (DRI)

Sākotnēji vienīgā PV diagnostikas metode bija DRI – ar pirkstu caur taisno zarnu aptaustot prostatu. Lai gan tās rezultāti var tikt interpretēti subjektīvi (Smith D., Catalona W., 1995), tā ir noderīga metode un tiek izmantota praksē vēl mūsdienās, kaut arī klāt nākusi virkne jaunu diagnostikas pieeju. Okotie O. et al. (2007) norāda, ka DRI neiekļaušana skrīninga protokolos var pasliktināt PV ārstēšanas rezultātus, jo daudzi tikai ar DRI konstatētie vēža gadījumi ir potenciāli ārstējami. Ir svarīgi piebilst, ka ne visas ar DRI noteiktās izmaiņas norāda uz PV – tās var būt LPH dēļ, kādēļ ir nepieciešami testi, kas specifiski norāda, ka vīrietim ir PV.

### Transrektālā prostatas ultrasonogrāfija (TRUS)

TRUS parasti izmanto prostatas tilpuma noteikšanai, jo tā ir lētāka un ātrāka metode nekā magnētiskās rezonanses (MR) izmeklējums, kā arī prasa mazāk personāla un telpas. Arī TRUS gadījumā rezultāti var būt subjektīvi – priekšdziedzera tilpuma novērtējums tomēr ir atkarīgs no procedūras veicēja (Tewari A. et al., 1996). Taču TRUS ir liela nozīme citā PV diagnostikas metodē – biopsijās (Gosselaar et al., 2008; Nguyen-Nielsen M., Borre M., 2016).

### Biopsijas

Biopsijas materiāla imūnhistoloģiskā analīze ļauj precīzāk diskriminēt PV no LPH, kā arī sniedz iespēju raksturot PV Glīsona skaitli, kas ir nozīmīgi klīnisko lēmumu pieņemšanai. Lielākajā daļā gadījumu PV audu biopsijas tiek veiktas TRUS kontrolē. Ņemtais biopsiju skaits var atšķirties katrā valstī vai klīnikā, bet parasti tas variē no 6 līdz 10 (Gosselaar et al., 2008; Nguyen-Nielsen M., Borre M., 2016). Tieši ar biopsijas palīdzību histoloģiskajam paraugam var noteikt Glīsona pakāpi, kas sniedz vairāk informācijas par audzēja attīstības pakāpi un agresivitāti (Gleason D., 1992). Tomēr prostatas biopsijas laikā ņemtais paraugu skaits ir ierobežots un tajos ne vienmēr var atrast audzēja šūnas (Serefoglu E. et al., 2013). Arī šai metodei ir šķēršļi – patoloģiem ir diezgan sarežģīti ātri un viennozīmīgi objektīvi identificēt anomālijas biopsijas pārskatos, pie tam manuāla apstrāde aizņem daudz laika un kavē ārstēšanu. Šī iemesla dēļ notiek attīstība datorizētas noteikšanas (*Computer-Aided Detection*) jomā. Nesenie sasniegumi šajā jomā, izmantojot dziļo mācīšanos (*Deep learning*), ir pavēruši plašas iespējas automātiskai patoloģiju noteikšanai un atpazīšanai ar ļoti augstu precizitāti gan PV, gan citu medicīnisko diagnožu un prognožu noteikšanā. Automatizētās dziļās mācīšanās sistēmas ir devušas daudzsoļus rezultātus, izmantojot histopatoloģiskos attēlus, lai precīzi klasificētu prostatas vēzi (Hasan A. et al., 2021).

Pacientam šī invazīvā procedūra parasti nerada lielas komplikācijas, bet gan var sagādāt diskomfortu. Pacienti ziņo par sāpēm, drudzi, asiņošanu līdz 35 dienām pēc procedūras (Rosario D. et al., 2012) un pēcbiopsijas infekcijām, kā dēļ pacientam ir svarīgi lietot atbilstošas antibiotikas (Nguyen-Nielsen M., Borre M., 2016).

### PSA tests

PSA jeb KLK3 ir plašāk zināmais proteīns no kallikreīniem, kas pēc funkcijas ir serīna proteāzes. Kallikreīnu ģēnu saimē ir 15 locekļi (*KLK1-15*) un 10 no to produktiem ir atrodami urīnā (Sardana G., Diamandis E., 2009). PSA izdala tikai prostatas dziedzeris, tāpēc tā mērījumi var dot ieskatu par izmaiņām prostatas darbībā. PSA normālā funkcija ir šķīdināt spermu, bet PV gadījumā tas tiek sekretēts lielā daudzumā. Ja PSA koncentrācija asins serumā ir virs 4,0 ng/ml,

tad tas tiek uzskatīts par pozitīvu gadījumu – PV indikāciju. Tomēr arī novecošana, LPH un prostatīts (prostatas iekaisums), izraisa PSA līmeņa paaugstināšanos, tādēļ pēc šī marķiera ir liela viltus pozitīvu rezultātu iespējamība (Dejous C., Krishnan U., 2021). Šis augstais kļūdas īpatsvars noved pie nevajadzīgām biopsiju veikšanām un liekām terapijām (An Y. et al., 2020; Catalona W.J. et al., 1998). Lai uzlabotu prostatas vēža detektēšanu, ir ieteicams testēt dažādus PSA parametrus, piemēram, PSA blīvumu (PSA koncentrācijas attiecību pret prostatas tilpumu) un tā brīvo vai kopējo līmeni paraugā (Serefoglu E.C. et al., 2013).

#### Citas attēlveidošanas metodes

Ja saglabājas aizdomas par PV pat pie negatīva biopsijas rezultāta, diagnozes precizēšanai var tikt izmantota multiparametriskā magnētiskās rezonanses skenēšana (mpMR). Visbeidzot, kaulu scintigrāfija un pozitronu emisijas tomogrāfiju un datortomogrāfiju (PET-CT) skenēšana ir papildu diagnostikas attēlveidošanas instrumenti, kas ir īpaši noderīgi metastāžu novērtēšanai un slimības progresēšanas uzraudzībai (Nguyen-Nielsen M. & Borre M., 2016).

#### 1.1.2.2. Jaunās diagnostikas metodes

PV agrīnā slimības stadijā ir asimptomātisks, un tam ir raksturīga liela kūtra jeb indolenta vēža tipa apakšgrupa. Tāpēc ir ļoti svarīgi izstrādāt individualizētu pieeju prostatas vēža agrīnai atklāšanai, slimības klasifikācijai (indolenta vai agresīva) un atbildes uz ārstēšanu prognozēšanai. PV biomarķieru atklāšanā ir panākts ievērojams progress, galvenokārt, pateicoties genomikas tehnoloģiju attīstībai. Ir izveidots plašs un inovatīvs, uz dažādu biomateriālu (serums, urīns, audzēja audi) analīzi balstītu prognostikas un diagnostikas testu klāsts (Kohaar I. et al., 2019). Tā kā šīs metodes ir jaunas, tās vēl tiek testētas un vispārpieņemtajās PV diagnosticēšanas Eiropas Urologu asociācijas (EUA) vadlīnijās vēl nav iekļautas (EAU, 2021).

#### Prostatas veselības indeksa (PHI) tests

Šobrīd ir pieejami uzlaboti asins seruma testi – ar tiem joprojām testē PSA līmeni, taču ņemot vērā vairākus faktoros. Prostatas veselības indekss (PHI) ir asins analīzes tests, kas analizē brīvā PSA (fPSA), kopējā PSA (tPSA) un p2PSA (primārā prostatas audzēja audos sastopamā fPSA izoforma) līmeni, lai prognozētu, vai pacientam ir  $\geq 7$  Glīsona skaitļa slimības risks. Šo testu var izmantot, lai atšķirtu PV no citām labdabīgām slimībām vīriešiem vecumā no 50 gadiem, kuriem DRI rezultāti neuzrāda patoloģijas un seruma kopējais PSA līmenis ir no 2 līdz 10 ng/ml (Catalona W. et al., 2011).

#### Četru kallikreīnu tests

Vēl viena PSA testa uzlabotā versija ir seruma tests, kas balstīts uz četrus kallikreīnus (tPSA, fPSA, neskatoties uz PSA un hK2) analīzi. Salīdzinot ar ierastajiem datiem par kopējo PSA un vecumu, šis tests ir precīzāks agresīvas slimības prognozēšanā. Pētījums, kurā novērtēta četrus kallikreīna marķieru prognostiskā vērtība patoloģiski nenozīmīgam salīdzinājumā pret agresīvu PV, parādīja, ka par 8-10% statistiski nozīmīgi ( $p < 0,00001$ ) uzlabojas PV prognozēšanas precizitāte biopsijas laikā, pie tam šie rezultāti ļauj izvairīties no aptuveni 48-56% nevajadzīgu biopsiju (Carlsson S. et al., 2013). Stattin P. (2015) longitudinālā pētījumā konstatēja, ka PSA līmenis asinīs 50 un 60 gadu vecumā paredz ilgtermiņa metastātiska PV risku un ka kallikreīna marķieru panelis spēcīgi prognozē attālinātas metastāzes daudzus gadus vēlāk vīriešiem ar mēreni paaugstinātu PSA. Pašreizējās EUA vadlīnijās kā viens no potenciālajiem marķieru testiem, ko var piedāvāt pacientiem ar PSA no 2,0 līdz 10,0 ng/ml, lai papildus novērtētu risku, ir minēts *4Kscore* – četrus kallikreīna marķieru tests. Tomēr, tā kā joprojām trūkst vienprātības par testa lietošanu, tas nav ieteicams kā primārais diagnostikas tests (Kretschmer A., Tilki D., 2017).

#### Cirkulējošas audzēja šūnas (CTC)

Ir zināms, ka prostatas un citu vēžu pacientu asinīs un kaulu smadzenēs var noteikt audzēja šūnas (Morgan T. M. et al., 2007). Cirkulējošas audzēja šūnas (CTC) pēdējā laikā ir aktīvi pētītas kā biomarķieri pacientiem ar progresējošu PV. Thalgott et al. (2013) pētījumā secināja, ka CTC koncentrācija ir izmantojama kā prognostisks molekulārais marķieris, īpaši metastātiska kastrācijas rezistentā PV pacientiem, kuriem ir kaulu metastāzes. Viņa pētījumā tika izmantots *CellSearch™ System* (ASV) tests. Tā princips īsumā – centrifugētam asiņu sedimenta slānim tiek pievienotas ar antivielām (pret epiteliālu šūnu adhēzijas molekulām, kas nodrošina CTC atdalīšanu no vairuma citu šūnu) klātas magnētiskās daļiņas, kas imunoprecipitācijas veidā piesaista sev CTCs. Šūnas iekrāso ar citokeratīnu antivielām (CTC), CD45 antivielu (kontaminējošie leukocīti) un DAPI (šūnu kodoli). Tālāk iezīmētas šūnas tiek ienestas īpašā kārtridžā, kur tās magnētiskajā laukā izkārtojas vienā fokusa plaknē. Kārtridžs tiek skenēts ar *Celltracks Analyzer II* sistēmu, kas atpazīst citokeratīnu un DAPI dubultpozitīvās šūnas kā potenciālas CTC. Kā CTC alternatīvu pēta cirkulējošas audzēja (bezšūnu) DNS (ct-DNS) vai bezšūnu DNS (cf-DNS), kas ir īsi, ~150-180 bp (Keller L. et al., 2021), DNS fragmenti, kas cilvēka bioloģiskajos šķidrumsos nonāk šūnu degradācijas procesu vai regulētas izvadīšanas ceļos. No dažādām šūnām var tikt izvadītas cf-DNS, bet ct-DNS ir tikai audzēju šūnām specifiskas (Grabuschnig S. et al., 2020).

Līdz ar jaunās paaudzes sekvencēšanas (NGS) un jutīgu CTC noteikšanas plazmas testu ieviešanu, CTC, cf-DNS un ct-DNS kļūst par nozīmīgiem šķidro biopsiju mērķiem onkoloģijā. Šie

testi ir minimāli invazīvi un piemēroti audzēja monitorēšanai pirms un pēc operācijas. Lai gan šī metode jau ir pierādījusi sevi kā daudzsološu, tai vēl ir nepieciešami uzlabojumi. Kā viena no problēmām ir zemie ct-DNS vai CTC daudzumi šķidrās biopsijās, kā arī CTC/ct-DNS korelācija ar pacientu vecumu un dzimumu nav precīzi noteikta, kas ir problemātiski specifiska un precīza diagnostikas testa pilnveidei (Kohaar I. et al., 2019).

#### Prostatas vēža antigēna 3 (PCA3) tests

Biomarķierus testiem iegūst ne tikai no asinīm, bet arī no urīna. *ProgenSA* (ASV) Prostatas vēža antigēna 3 (PCA3) biomarķiera tests nosaka PCA3 mRNS pirmreizējā urīnā un pēc DRI veikšanas. Sākotnējā pētījumā par PCA3 izmantošanu PV noteikšanai Fradet Y. (2004) demonstrēja 74% jutību un 91% specifiskumu biopsijas rezultātu prognozēšanai pacientiem ar PSA līmeni, kas mazāks par 4 ng/ml. PCA3 tests ir novērtēts arī kā prognostisks rīks, kas palīdz pieņemt lēmumus par aktīvu uzraudzību zema riska PV pacientiem. Līdz šim gan nav izdevies noteikt vispārpieņemtu PCA3 skalas robežvērtību. Pašreizējās EUA PV vadlīnijās teikts, ka galvenā indikācija PCA3 testam ir papildus informācijas iegūšanai pēc negatīvas pirmās biopsijas pacientiem, kuriem ir risks iegūt prostatas audzēju; šo metodi nerekomendē aktīvam monitoringam (EAU, 2021).

#### mRNS biomarķieru tests

Šobrīd pieejams ir *SelectMDx* tests (prognozēšanas precizitāte AUC 0,85), kas nosaka DLX1 un HOXC6 mRNS līmeņus urīnā pēc DRI, izmantojot kvantitatīvo reversās transkripcijas PCR (qRT-PCR). Pēc Dijkstra S. (2017) pētījuma tika secināts, ka stratēģiska *SelectMDx* lietošana pacientiem ar PSA līmeni >3 ng/ml var palīdzēt samazināt pārmērīgas diagnostikas un pārmērīgas ārstēšanas gadījumu skaitu. EUA šim testam ir sniedzis tādas pašas indikācijas kā PCA3 testam (EAU, 2021).

#### Urīna eksosomu RNS tests

Savukārt *ExoDx prostate Intelliscore* ir urīna eksosomu analīze, kas mēra tādas eksosomās esošās RNS kā ERG un PCA3. Šai urīna analīzei nav nepieciešama ne DRI pirms parauga ievākšanas, ne īpaša apstrāde pēc tās, tāpēc to var viegli integrēt klīniskajā rutīnā (Kretschmer A., Tilki D., 2017). Tests ir ieteicams vīriešiem vecumā no 50 gadiem ar PSA 2-10 ng/ml, kuriem apsver iespēju veikt prostatas biopsiju (EAU, 2021).

#### Daudzparametru gēnu testi

Jaunami PV prognostikā ir audu paraugu testi, kuros pielieto genomikas datus. *ConfirmMDx* ir komerciāli pieejams biomarķieru tests, ar kuru pārbauda GSTP1, APC un RASSF1 metilācijas

līmeņus prostatas audu biopsijā. Šī epiģenētiskā biomarkķieru testa pamatā ir ideja, ka epiģenētiskās modifikācijas ietekmē gēnu ekspresiju, neietekmējot genomu. Gadījumā, ja pēc biopsijas PV netiek konstatēts, epiģenētisko izmaiņu pierādīšana labdabīgos audos liecinātu par karcinomas klātbūtni (Partin A. et al., 2014). *Oncotype DX Genomic Prostate Score* testā izmanto parafīnā ieslēgtu seroloģisko audu paraugu un qRT-PCR metodi. Ar testu mēra 17 gēnu, kas atbildīgi par audzēja šūnu augšanu un izdzīvošanu, mRNS ekspresiju; šis gēnu panelis paredz agresīvas slimības risku, atvieglojot klīnisko lēmumu pieņemšanu par labu aktīvai uzraudzībai vai tūlītējai ārstēšanai. (Knezevic D. et al., 2013).

## 1.2. Ekstracelulārās vezikulas, to biogēnēze

### 1.2.1. EV tipi

Ekstracelulārās vezikulas (EVs) ir lipīdu dubultslāņa aptvertas daļiņas, kas var saturēt dažādas šūnu savstarpējā komunikācijā iesaistītas biomolekulas un tās ekstracelulārajā vidē izdala gan prokariotu, gan eikariotu šūnās. Ir pieņemts sīkāk izdalīt trīs galvenās EV klases pēc to biogēnēzes: eksosomas, mikrovezikulas (MVs) un apoptotiskos ķermenīšus. Šīs klases pēc to daļiņu izmēra un molekulārā satura savā starpā var pārklāties, taču atšķiras bioloģiskie mehānismi, kas iesaistīti to veidošanā. Eksosomas, kuru tipiskais diametrs ir 30-150 nm, attīstās no multivezikulārā ķermenīša (MVĶ) intraluminālajām vezikulām (ILV), tam saplūstot ar šūnas plazmatisko membrānu un atbrīvojot saturu ekstracelulārajā telpā (Doyle L., Wang M., 2019). MVs rodas, šūnas plazmatiskajai membrānai izliecoties uz āru un atdaloties jeb pumpurojoties, un to diametrs ir aptuveni 100-1000 nm (Minciacchi V. et al., 2015). Apoptozes laikā, pieaugot iekššūnas hidrostatiskajam spiedienam, notiek plazmatiskās membrānas atdalīšanās no šūnas kortikālā citoskeleta. Tā rezultātā plazmatiskā membrāna uzpūšas un tiek izdalīti apoptotiskie ķermenīši, kuru diametrs var būt robežās no 50 līdz 5000 nm, tomēr pārsvarā dominē izmērā lielākie (Borges F.T. et al., 2013). Apoptotiskos ķermenīšus likvidē fagocīti, tādējādi, apoptozes ceļā mirušo šūnu atliekas brīvi neizplūst ekstracelulārajā telpā un nerada apkārtesošo šūnu bojājumus (Kakarla R. et al., 2020).

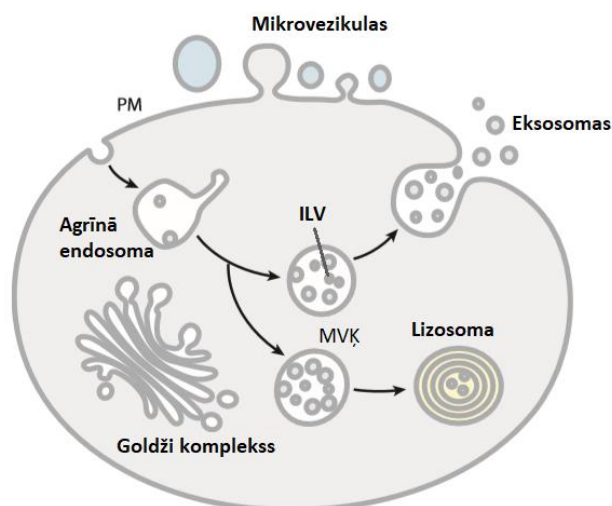
EVs ir īpaši ieinteresējušas zinātniekus, jo tās iesaistās šūnu savstarpējā komunikācijā, kas ir ļoti komplekss process. Pateicoties EV spējai pārnest proteīnus, lipīdus un nukleīnskābes, tās ir spējīgas ietekmēt mērķšūnu funkcijas. EVs iesaistās plaša spektra fizioloģiskajos procesos dažādās orgānu sistēmās. Īpašu uzmanību EVs ir ieņēmušas tādu slimību kā vēža un autoimūno saslimšanu izpētē (Escrevente C. et al., 2011; Skriner K. et al., 2006).

### 1.2.2. EV biogēnēzes mehānismi

Visām EV klasēm nav vienāds biogēnēzes mehānisms, arī katras klases ietvaros mehānismi var variēt, kā tas ir eksosomu gadījumā. EVs var formēties, piemēram, endocitozes ceļā (eksosomas) vai pumpurojoties no šūnas, kā to dara MVs. Savukārt apoptotisko ķermenīšu veidošanās, kā jau liecina nosaukums, ir atkarīga no šūnu programmētās nāves jeb apoptozes (Yáñez-Mó M. et al., 2015).

### 1.2.2.1. Eksosomu biogēnēze

Eksosomu kompleksais biogēnēzes process ir smalkāk izpētīts nekā MV vai apoptotiskajiem ķermenīšiem. Eksosomu veidošanas process notiek vairākos soļos (3.attēls). Vispirms, no plazmatiskās membrānas ieliekšanās veidojas agrīnā endosoma. Agrīnajai endosomai nobriestot, tās lumenā uzkrājas intraluminālās vezikulas (ILVs), kuras rodas, tās membrānai ieliecoties. Endosomu, kura satur ILVs, sauc par MVĶ. Pēc tam tas vai nu saplūst ar lizosomām un tiek degradēts, vai arī saplūst ar šūnas plazmatisko membrānu (Felder S. et al., 1990). Ja notiek saplūšana ar šūnas plazmatisko membrānu, tad ILVs izkļūst ekstracelulārajā telpā un tiek sauktas par eksosomām (Février B., Raposo G., 2004).



3.attēls. Shematiskais eksosomu un mikrovezikulu biogēnēzes mehānisma attēlojums. Agrīnā endosoma veidojas, ieliecoties PM, kas nobriestot kļūst par MVĶ. MVĶ var saplūst ar lizosomu un tikt degradēts, vai saplūst ar PM un izdalīt saturā esošās ILVs, tādējādi tās izvadot ekstracelulārajā telpā, kur tās tiek sauktas par eksosomām. Mikrovezikulas rodas PM izliekšanās un pumpurošanās gadījumā. PM – plazmatiskā membrāna, MVĶ – multivezikulārais ķermenītis, ILVs – intraluminālā vezikulas. Attēls adaptēts no Colombo M. et al., 2014.

Figure 3. Schematic representation of the mechanism of exosome and microvesicle biogenesis. The early endosome is formed by inward budding of PM, and then becomes an MVB when matures. The MVB can either fuse with a lysosome and be degraded or it can fuse with PM excreting its contents into the extracellular space, thus creating exosomes. Microvesicles arise through PM outward budding. PM – plasmatic membrane, MVB – multivesicular body, ILVs – intraluminal vesicles. Adapted from Colombo et al., 2014.

Eksosomu veidošanās var sekot transportēšanai nepieciešamā endosomu šķirošanas kompleksa (ESCRT) atkarīgam vai neatkarīgam ceļam. ESCRT komponenti ir nozīmīgi, jo tie spēj veicināt membrānu izliekšanos prom no citoplazmas (Juan T., Fürthauer M., 2018). Gan MVĶ, gan ILV veidošanos ietekmē ESCRT komplekss (van Niel G. et al., 2011). ESCRT sastāv no vairāk kā desmit proteīniem, kas sagrupējas četros kompleksos (ESCRT-0, -I, -II un -III) ar asociētajiem proteīniem (VPS4, VTA1, ALIX). ESCRT-0 atpazīst ubikvitinētos proteīnus un piesaista tos endosomālajai membrānai. Pēc tam ESCRT-I un ESCRT-II, kuriem ubikvitinētais proteīns tiek secīgi nodots, veicina membrānas pumpurošanos uz iekšu (endosomālā lumena virzienā), aptverot ubikvitinēto „kravu”. ESCRT-III noslēdz šo procesu, pilnībā nošķeļot pumpurojošās vezikulas, kā rezultātā izveidojās ILVs, kas satur ubikvitinēto „kravu” (Henne W. et al., 2011).

ESCRT neatkarīgā ceļā vezikulas var veidoties dažādu iemeslu rezultātā. Viens no iemesliem ir keramīda sekmēta membrānas ieliekšanās. Keramīds rodas pēc sfingomielīna pārveides ar sfingomielīnāzes enzīma palīdzību (Trajkovic K. et al., 2008). Kā nākamo iemeslu jāmin noteiktu tetraspanīnu ekspresiju. Piemēram, ar CD63 palīdzību var notikt ILV un eksosomu veidošana (van Niel G. et al., 2011). Membrānas tetraspanīnu CD9 un CD82 ekspresija HEK293 šūnās palielināja  $\beta$ -katenīnu saturošu eksosomu izdalīšanos (Chairoungdua A. et al., 2010).

#### 1.2.2.2. MV un apoptotisko ķermenīšu biogēnēze

MVs veidojas, plazmatiskajai membrānai izliecoties uz āru un membrānas izliekumam pilnībā nodaloties no šūnas, ko nodrošina aktīva citoskeleta kontrakcija (Wang T. et al., 2014). Liela loma MV biogēnēzē ir iekššūnu videi – kalcija jonu koncentrācijai citosolā. Kad tā palielinās, tad enzīmi flopāze un skramblāze inhibē flipāzi, kā rezultātā fosfatidilserīns pārvietojas no fosfolipīdu dubultslāņa iekšējā slāņa uz ārējo. Kalcija joni aktivē arī citosoliskās proteāzes, kuras, šķeļot aktīva citoskeletu, atļauj veidoties plazmatiskās membrānas izliekumiem. (Turturici G. et al., 2014).

Apoptotiskie ķermenīši veidojas apoptozes procesa laikā. Apoptozes procesu šūnā iniciē ārēji vai iekšēji šūnas signāli un procesa gaitā aktivizējas kaspāžu atkarīgā proteolīzes kaskāde. Kaspāze 8 un kaspāze 9 iniciē apoptozes signālceļus, bet kaspāzes 3, 6 un 7 piedalās šūnas noārdīšanā (Battistelli M., Falcieri E., 2020). Notiek šūnu deformācija, kas izpaužas kā membrānau pūslīšu veidošana (*blebbing*) (Charras G. et al., 2005). Atkārtota pūslīšu dalīšanās izveido apoptotiskos ķermenīšus, kas pildīti ar organellām, hromatīnu un citu šūnu saturu (Croft D. et al., 2005). Apoptotiskās šūnas vidē izdala fagocītu hemotaksi stimulējošus citokīnus (piemēram, CX3CL1) un uz virsmas prezentē molekulāros marķierus (piemēram, fosfatidilserīnu), kas iezīmē tās

fagocitozei (Truman L. et al., 2008). Šī iemesla dēļ apoptotiskie ķermenīši tiek ātri likvidēti. Daži autori apoptotiskās vezikulas iedala sīkāk apakšklasēs: apoptotiskajos ķermenīšos (1-5µm) un apoptotiskajās MVs (<1µm). Pastāv hipotēze, ka apoptotiskās MVs rodas kamēr šūnā vēl tikai attīstās apoptozes process, bet nav viennozīmīgi noskaidroti konkrēti molekulārie mehānismi (Caruso S., Poon I., 2018).

### 1.2.3. EV uzbūve un sastāvs

EV uzbūves pamatā ir fosfolipīdu dubultslānis, kurā var būt integrēti proteīni un lipīdi, savukārt to lumenā var tikt ietvertas jau minēto divu grupu biomolekulas, kā arī nukleīnskābes (4.attēls). EV sastāvs nav nokomplektēts nejauši – izpētīts, ka vismaz daļa tajās esošās biomolekulas tiek iekļautas mērķtiecīgi. Proteīnu iekļaušana vezikulās ir selektīva, jo tikai daļa no donora šūnas virsmas proteīniem tiek iekļauti vezikulu sastāvā (Turturici G. et al., 2014).

#### Proteīni

EV virsmas proteīni var tikt izmantoti kā marķieri, lai noteiktu EV klasi. Galvenie eksosomu proteīnu virsmas marķieri ir tetraspanīni (CD63, CD9, CD81, CD82), ESCRT kompleksā iekļautie Alix un TSG101, bet MV – integrīni, selektīni un CD40 ligands (Witwer K. et al., 2013). Histonu proteīni ir galvenie apoptotisko ķermenīšu marķieri. Savukārt EV lumenā var būt tādi citosola proteīni kā hemoglobīns, citoskeleta proteīni, ESCRT komponenti, enzīmi (acetilholīnesterāze, heparanāze, hialuronidāze u.c.) (Zhao Y. et al., 2021).

Aktuāli ir kļuvuši pētījumi, kur izmanto EV virsmas proteīnus, lai noteiktu EV izcelsmi vai identificētu kādu EV subpopulāciju kā slimības indikatoru. Piemēram, CPNE3 proteīns un karstuma šoka proteīns 60 (Hsp60) pacientu plazmas eksosomās ir daudzsološs kandidāts kolorektālā vēža diagnostikā. Kā vēl viens specifisks kolorektālā vēža diagnostikas indikators ir glipikāna-1 (GPC1) pozitīvas pacientu plazmas eksosomas (Xiao Y. et al., 2020).

#### Nukleīnskābes

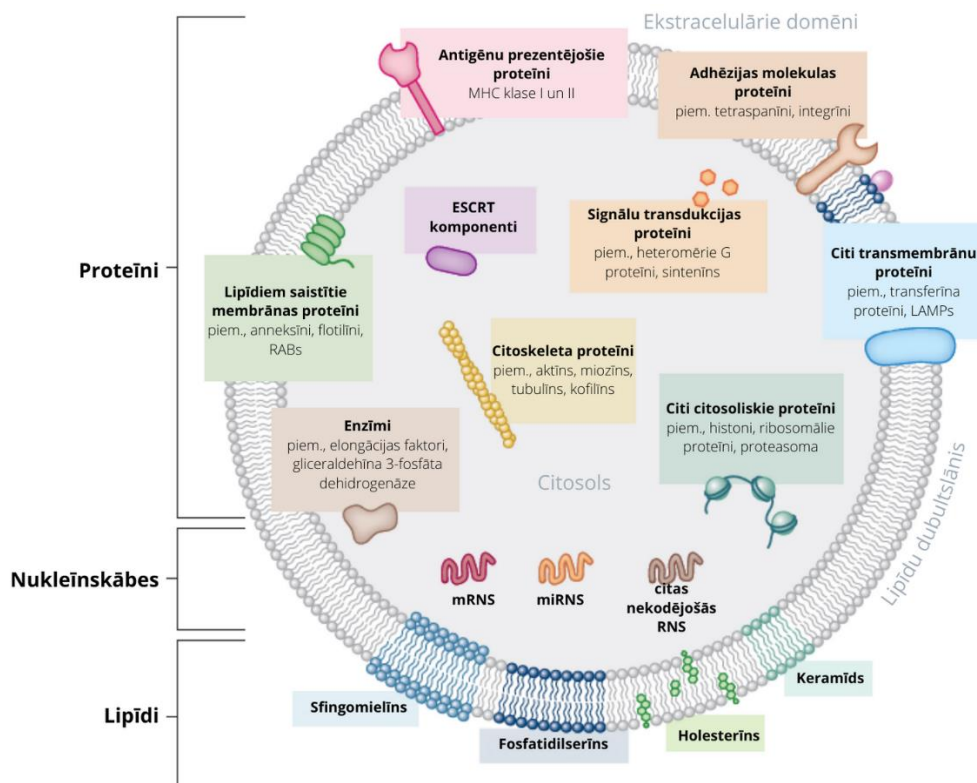
EVs sastāvā var būt dažādu veidu RNS, kā to parādīja Huang X. (2013) – cilvēka plazmas EV sastāvā visvairāk pārstāvētas bija miRNS (76% no visiem NGS nolasījumiem; ietverot 593 dažādas miRNS). MiRNS mērķa gēnu analīze liecināja, ka daudzām miRNS var būt svarīga loma tādās bioloģiskajās funkcijās kā olbaltumvielu fosforilēšanā, RNS locīšanā un angiogēnēzē. Vēl tika konstatētas ribosomālās RNS (rRNS) (9%), garās nekodējošās RNS (3%), *piwi-interacting*-RNS (piRNS) (1%), transporta RNS (tRNS) (1%) u.c.

Īpaši zinātnieku uzmanību ir piesaistījušas miRNS – īsas, proteīnus nekodējošas RNS molekulas (vidēji 22 nukleotīdi), kas iesaistītas post-transkripcionālā gēnu ekspresijas regulēšanā. Šīs nukleīnskābes cirkulē bioloģiskajos šķidrums (piemēram, asinīs, urīnā) gan brīvā veidā (Mitchell P. et al., 2008; Mall C. et al., 2013), gan var tikt ietvertas vezikulās (Endzelinš E. et al., 2017). Pēdējos gados tās arvien vairāk pēta kā potenciālus biomarķierus dažādu vēža veidu diagnostikā un slimības gaitas prognozēšanā (Price C., Chen J., 2014). Rodríguez M. (2017) ar NGS ir salīdzinājusi miRNS līmeņus urīna eksosomās PV pacientiem un veseliem cilvēkiem. Ar qPCR validējot diferenciāli ekspresētās miRNS neatkarīgā kohortā tika parādīts, ka divām miRNS, miR-196a-5p (AUC 0,73) un miR-501-3p (AUC 0,69), ir potenciāls tikt izmantotām par biomarķieriem PV diagnostiskai. Vēl jāpiemin, ka dažas cirkulējošās miRNS var būt dominanti sastopamas EVs, turpretim, citas plazmā sastopamas pārsvarā brīvā veidā (Arroyo J. et al., 2011). Endzelinš E. (2017), salīdzinot PV asociēto miRNS līmeņus plazmas EVs un kopējā plazmā starp PV un LPH, arī parādījis, ka dažām miRNS diagnostiskā veikspēja uzlabojas, ja tās tiek analizētas EV sastāvā, turpretim, citām augstāka diagnostiskā veikspēja ir, analizējot tās totālajā plazmā.

EVs saturā ir konstatētas arī vairāku veidu DNS molekulas, kā piemēram, mitohondriju DNS (mtDNS), vienpavediena DNS (ssDNS), divpavedienu DNS (dsDNS) (Guescini Met al., 2010; Thakur B. et al., 2014). Nav skaidra fizioloģiskā nozīme DNS esamībai EVs, taču jau šobrīd EV transportētajām DNS ir potenciāls būt par klīnikā nozīmīgu biomarķieri, kas palīdzētu identificēt audzēju somatiskās mutācijas, analizējot bioloģiskajos šķidrums sastopamo EV DNS saturu (Yáñez-Mó M. et al., 2015).

### Lipīdi

Tā kā vairākums pētījumu par EV saturu fokusējas uz proteīnu un nukleīnskābju sastopamību, pētījumi par lipīdiem ir mazākumā. Tomēr ir noskaidrots, ka EVs var atrast tādas lipīdus, kā sfingomielīnu, kas atrodams audzēja radītās EVs un veicina angiogēnēzi (Kim W. et al., 2002), gangliozīdus – īpaši GD<sub>3</sub> gangliozīda bagātinātas vezikulas veicina melanocītu migrāciju (Otake A. et al., 2019). Vēl vezikulās ir sastopami fosfolipīdi, holesterīns (Brouwers J. et al., 2013) un keramīdi vai tā atvasinājumi (Vittorelli M. et al., 2010).



4.attēls. Kopējais ekstracelulāro vezikulu (EV) sastāvs. EVs sastāva (proteīnu, lipīdu un nukleīnskābju grupas) un membrānas orientācijas shematisks attēlojums. ESCRT – transportēšanai nepieciešamais endosomu šķirošanas komplekss; LAMP – ar lizosomu saistītais membrānas proteīns; MHC – galvenais audu saderības komplekss; RAB – ar Ras saistītie proteīni smadzenēs. Attēls adaptēts no Colombo M. et al., 2014.

Figure 4. Overall composition of extracellular vesicles (EVs). Schematic representation of the composition (families of proteins, lipids, and nucleic acids) and membrane orientation of EVs. ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; LAMP, lysosome-associated membrane protein; MHC, major histocompatibility complex; RAB, Ras-related proteins in brain. Adapted from Colombo M. et al., 2014.

#### 1.2.4. EV fizioloģiskā loma

##### Loma pēc EV klasēm

Katra EV klase pilda noteiktas bioloģiskās lomas. Eksosomas iesaistās šūnu savstarpējā komunikācijā (Aliotta J. et al., 2007), imūnatbildes stimulēšanā kā antigēna prezentējošās vezikulas (Qazi K. et al., 2009), nervu sistēmā eksosomas veicina mielīna veidošanos (Pusic A., Kraig R., 2014), kā arī var spēlēt lomu patoloģiskos procesos, piemēram, audzēju attīstībā (Vu L. et al., 2019). Eksosomu un MV kopīgā loma ir mērķšūnas pārprogrammēšana. MVs piedalās koagulācijā, iekaisuma procesos un arī audzēja attīstīšanā (Turturici G. et al., 2014). Apoptotisko ķermenīšu

galvenais uzdevums ir nogādāt mirušo šūnu atliekas līdz to likvidētājiem, lai šo atlieku dēļ, kas var tikt uztvertas kā patogēns, nerastos autoimūnatbilde. Tas nav vienīgais apoptotisko ķermenīšu uzdevums - tie var piegādāt šūnām antigēnus no apoptotiskām šūnām, kuras tika inficētas ar mikroorganismu. Tas nozīmē, ka apoptotiskajiem ķermenīšiem ir perspektīva tikt izmantotiem vakcīnās (Winau F. et al., 2006).

#### EV loma starpšūnu komunikācijā

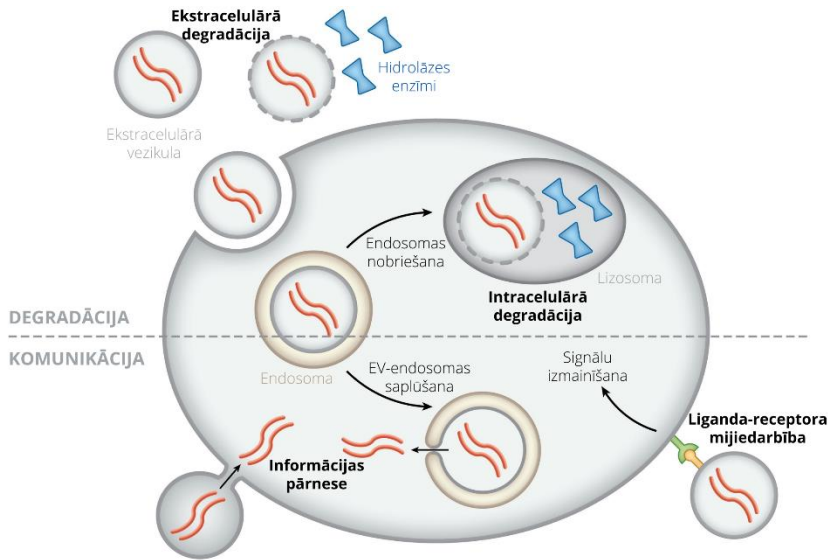
Informācijas pārnese no EVs uz mērķšūnām var notikt gan tieši mijiedarboties (saplūšana ar mērķšūnu vai uzņemšana endocitozes veidā), gan netieši (saistoties ar receptoru), rezultātā ietekmējot mērķšūnas bioloģiskās funkcijas (5.attēls). Vienkāršākais komunikācijas veids ir signalizēšana ar šūnu membrānas receptoru ligandiem, kur saziņa notiek caur liganda-receptora mijiedarbību (Shurtleff M. et al., 2018). Ar līdzīgiem mehānismiem to dara arī apoptotiskie ķermenīši, iesaistoties autoimūnajos procesos, imūnsistēmas atbildē pret patogēniem mikroorganismiem un transplantētu orgānu atgrūšanas gadījumos. Tādām vezikulām uz plazmatiskās membrānas virsmas ir ekspresētas MHC I un II molekulas ar antigēna peptīdu, lai tieši notiktu prezentācija naivajām T šūnām (Caruso S., Poon I., 2018).

Vēl EVs var kalpot kā šķīstošu mediatoru – citokīnu – pārnēsējas. Piemēram, interleikīnu 1β (IL-1β) šūnas ne tikai izdala brīvā veidā, sekretorajām lizosomām saplūstot ar plazmatisko membrānu, bet arī iekļaujot EV sastāvā. IL-1β tālāk tiek atbrīvots ekstracelulārajā vidē pēc EV virsmas P2X7R receptora aktivācijas ar ATP (Pizzirani C. et al., 2007).

Tā kā plaša spektra blīvo audzēju šūnas, kā arī normālas vēža mikrovides šūnas izdala EVs, kuras var saturēt šai slimībai specifisku molekulāro saturu, EV raksturošanu varētu būt iespējams izmantot specifiskai un agrīnai diagnostikai. Biomolekulu sekrēciju caur EVs var veicināt pārlietu liels konkrēto molekulu daudzums šūnā. Piemēram, kad miRNS šūnā ir vairāk kā to mērķa mRNS, tad miRNS var tikt novirzīta uz EVs, kas liek domāt, ka šūnas var izmantot EVs, arī lai atbrīvotos no liekā materiāla (Shurtleff M. et al., 2018).

Audzēju EV var būt nozīme gan lokāli – piemēram, pielāgojot savu mikrovidi ar izdalīto eksosomu starpniecību komunikācijā ar apkārtējiem audiem, tādējādi veicinot šūnu proliferāciju, angiogēnēzi, imūnsupresiju, gan sistemātiski, piemēram, pirmsmetastātiskās nišas veidošanā un imūnsupresijā (Dörsam B. et al., 2018). Ir veikti dažādi eksperimenti, lai izsekotu, kā vezikulas iesaistās vēža attīstībā. Reprezentatīvs pētījums, kas veikts 2011.gadā, izskaidro, kā tieši MVs var iesaistīties audzēja attīstībā. Daļa audzēju iniciējošo šūnu, kas cilvēka nieru šūnu karcinomā ekspresē mezenhimālo cilmes šūnu marķieri CD105, izdala MVs, kas ierosina angiogēnēzi un

veicina pirmsmetastātiskās nišas attīstību. No CD105 pozitīvām audzēju iniciējošām šūnām iegūtās MVs normālām cilvēka endotēlija šūnām piešķir aktīvā angiogēno fenotipu. Pēc šo modificēto endotēlija šūnu *in vivo* implantācijas pelēm ar smagu kombinēto imūndeficītu (SCID), modificētās šūnas aktīvi auga un veidoja jaunus asinsvadus (Grange C. et al., 2011).



Shurtleff MJ, et al. 2018. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2:395–411

5.attēls. Ekstracelulāro vezikulu (EV) un šūnu mijiedarbības. EVs var tikt noārdītas ar ekstracelulārajiem hidrolāzes enzīmiem vai lizosomā. Šūnas EV saturu var saņemt, saplūstot ar plazmas membrānu vai endosomālo membrānu, kā rezultātā notiek informācijas pārnese. Ligandi uz EV virsmas var uzsākt receptoru mediētu signalizāciju bez uzņemšanas. Attēls adaptēts no Shurtleff M. et al., 2018.

Figure 5. Extracellular vesicle (EV) and cell interactions. EVs can be degraded by extracellular hydrolase enzymes or in the lysosome. Cells can receive EV content by fusion with the plasma membrane or endosomal membrane, resulting in information transfer. Ligands on the EV surface can initiate receptor-mediated signalling without uptake. Adapted from Shurtleff M. et al., 2018.

### EVs šķidrās biopsijās

Dažādos bioloģiskajos šķidrums detektējamās EVs pilda specializētus uzdevumus, kas saistīti ar vidi, kurā tās atrodas. Urīnā esošās EVs satur antimikrobiālus proteīnus un ir atbildīgas par urīnceļu infekcijas imūnatbildi. EVs no augļūdeņa regulē imūnatbildi, lai nodrošinātu augļa izdzīvošanu. Asinīs var cirkulēt EV subpopulācija, kas radusies, piemēram, no audzējiem (Yáñez-Mó M. et al., 2015). Skog J. (2008) pētījumā bija ievērojama korelācija starp asins seruma MV daudzuma samazināšanos glioblastomas pacientiem pēc tās izoperēšanas. Šie apsvērumi liek domāt, ka asinīs un citos bioloģiskajos šķidrums (urīnā, likvorā vai siekalās) pārstāvēto EV molekulāra raksturošana varētu tikt izmantota kā šķidrā biopsija vēža diagnosticēšanai.

### 1.3. EV iegūšana pētījumu vajadzībām

Galvenie EV iegūšanas mērķi ir to izmantošanai klīniskajos pētījumos (mērķētas terapijas) (Murphy D. et al., 2019) vai molekulārajai diagnostikai (kā biomarkieri), un jaunu, ar EV saistītu metožu attīstīšanai (Rodríguez M. et al., 2017). EVs ir atrodamas teju visos organisma bioloģiskajos šķidrumos, kā arī *in vitro* apstākļos tās producē šūnu līnijas (Witwer K. et al., 2013).

#### 1.3.1. EV iegūšanas avoti

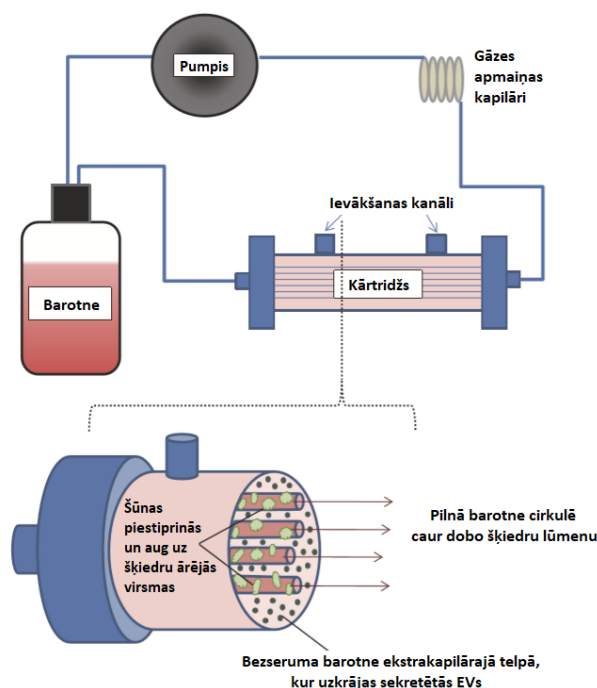
EVs var tikt iegūtas no šūnu kondicionētajām barotnēm, kā arī bioloģiskajiem šķidrumiem. Bioloģiskie šķidrumi, kurus izmanto klīniskajā praksē vai pētniecībā un satur dažāda veida slimības marķierus, tiek saukti par šķidrajām biopsijām. Par šķidrajām biopsijām var kalpot tādi donoru bioloģiskie paraugi kā asinis, siekalas, urīns, piens, likvors u.c. Klīniskiem pētījumiem un terapijām bieži vien ir nepieciešamas specifiskas EV subpopulācijas no šķidrajām biopsijām.

EV avota izvēle ir atkarīga no eksperimenta mērķa, tomēr, producējot tās *in vitro*, ir svarīgi darīt to apstākļos, kas ļautu izvairīties no kontaminēšanas ar serumā esošajām EVs – nepieciešami bezseruma apstākļi vai jāizmanto no EV brīvs serums (Witwer K. et al., 2013). Lai iegūtu EVs no šūnu kultūrām, šūnas lielākoties audzē flaskos vai platēs bezseruma apstākļos. Šūnu kondicionēta barotne, kas ir bagātināta ar to sekretētajām vezikulām, tiek savākta un izmantota kā avots EV izdalīšanai (Hamada T. et al., 2020).

Nereti nepieciešams iegūt lielākus EV daudzumus, kam šobrīd plaši izmantotā šūnu audzēšana flaskos nav parocīga – tiek patērēts pārmērīgs daudzums flasku un barotņu un šūnām regulāri nepieciešama pasažēšana, kas ir laikietilpīgs process. Lai izvairītos no šādiem šķēršļiem, aktuāla ir kļuvusi šūnu audzēšana bioreaktoros (Yan I. K. et al., 2018). Virkne autoru EV iegūšanai ir sekmīgi izmantojuši dobo šķiedru bioreaktorus – ar HEK293 šūnu līniju (Watson D. et al., 2018), žurku aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņu šūnām, primārajiem cilvēka hepatocītiem, zarnu vēža Caco-2 šūnām (Storm M. et al., 2016) un mezenhimālām cilmes šūnām (Gobin J. et al., 2021).

Dobo šķiedru bioreaktors parasti sastāv no dobo šķiedru kārtidža, pumpja, gāzu apmaiņas sistēmas un barotnes rezervuāra (6.attēls). Šādā bioreaktorā šūnas tiek sētas kārtidža ekstrakapilārajā telpā (EKT), kas ir papildīta ar daļēji caurlaidīgiem, dobiem hidrofilā polisulfona vai celulozes kapilāriem. Pumpis nodrošina, ka šūnu barotne nepārtraukti cirkulē kapilāru lumenā, savukārt pašas šūnas aug trīs dimensijās kontaktā ar šo kapilāru ārējo virsmu. Kārtidža dobo šķiedru poru izmērs ir tāds, kas neļauj pašu šūnu producētajām EVs aizplūst prom no EKT, kā arī

seruma EVs no kopējās cirkulācijas nonākt EKT (Watson D. et al., 2018). EVs uzkrājas iekš EKT, no kuras ievāc kondicionēto barotni EV tālākai attīrīšanai (Yan I. K. et.al., 2018).



6.attēls. Shematisks dobo šķiedru bioreaktora attēlojums. Barotne atrodas rezervuāra pudelē, kas pa silikona caurulītēm plūst uz kārtridžu ar pumpja palīdzību. Caur kārtridža šķiedrām plūst svaiga barotne, nodrošinot šūnu apgādi ar barības vielām; to producētās makromolekulas uzkrājas ekstrakapilārajā telpā. EVs – ekstracelulārās vezikulas. Attēls pielāgots balstoties uz Yan I. K. et.al., 2018.

Figure 6. Schematic representation of a hollow fibre bioreactor. The reservoir bottle contains a medium that flows through silicone tubing to the cartridge with the pump's assistance. Fresh medium flows through the fibres of the cartridge, providing nutrients to the cells; the macromolecules they produce accumulate in the extracapillary space. EV – extracellular vesicles. Image adapted from Yan I. K. et.al., 2018.

Dobo šķiedru bioreaktora tehnoloģija ir īpaši parocīga EV iegūšanai, jo bioreaktorā ir iespēja nepārtraukti un ilgstoši producēt EVs augstā koncentrācijā (Yan I. K. et.al., 2018). Bioreaktora EV paraugs satur gan augstāku daļiņu skaitu, gan zemāku daļiņu/proteīnu proporciju salīdzinājumā ar flasku kultūrām, kas norāda uz augstāku tīrību. Četrus mēnešus nepārtraukti dobo šķiedru bioreaktorā audzēta HEK293 šūnu līnija izdalīja 10 reizes augstāku EV daudzumu, salīdzinot ar flasku kultūrām (Cadwell J., 2017). Tā iemesla dēļ, ka plaši izmantotie serumi, ko iegūst no liellopu asinīm, var variēt ar saturu, ir radīti ķīmiski definēti seruma aizvietoņi. Tajos ir konkrēti zināma proteīnu, vitamīnu, augšanas faktoru, aminoskābju koncentrācija, kas nodrošina, ka tiek uzturēta kondicionētā barotne ar zināmu sastāvu, kas nodrošina atkārtotamību (van der Valk J. et al., 2010).



### Imunoizolēšana

Imunoizolēšana ir metode, kas ļauj izolēt noteiktu vezikulu subpopulāciju atkarībā no virsmas marķieru ekspresijas. Metodes princips ir vienkāršs – izmantot antivielu, kas specifiski saistās ar konkrētu EV proteīnu. Tādā veidā var iegūt augstas tīrības pakāpes, selektīvu paraugu (Tarasov V. et al., 2021). EV detektēšanai un kvantitatīvai noteikšanai no plazmas, seruma un urīna ir piemērota imūnfermentatīvā analīze (ELISA), izmantojot dažādas specifiskas antivielas. Cits veids kā veikt imunoizolēšanu ir ar magnētiskajām lodītēm, kuru virsma ir klāta ar izvēlēto antivielu. Šai izolēšanas metodei ir augstāka EV uztveršanas efektivitāte un lielāka jutība nekā citām, uz mikroplatēm balstītām, metodēm, ko nodrošina lielāks reakcijas virsmas laukums un homogēnā reakcijas vide (Gurunathan S. et al., 2019).

### Uz mikrofluīdiku balstīta izolēšana

Šī metode izmanto ne tikai parastos EV atdalīšanas principus, piemēram, pēc lieluma, blīvuma vai ar imunoafinitāti, bet arī inovatīvus šķirošanas mehānismus, piemēram, akustiskās, elektroforētiskās un elektromagnētiskās manipulācijas (Gurunathan S. et al., 2019). Wang Z. et al. (2013) eksperimentā izmantoja mikrofluīdikas ierīci, kas bija spējīga izolēt 40-100 nm diametra eksosomas, vienlaikus aizfiltrējot prom proteīnus, citas EVs un šūnu atliekas. Mikrofluīdikas sistēmās var tikt integrēts arī imūnafinitātes princips. Uz mikrofluīdiku balstītā imunoafinitātes izolēšanā izmanto "uztveršanas antivielas" vai ar antivielām klātas lodītes, kas mērķētas uz specifiskiem EV subpopulāciju virsmas marķieriem – līdzīgi kā imunoizolēšanas gadījumā (Gurunathan S. et al., 2019).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Šūnu līnijas

Darbā tika izmantota LNCaP šūnu līnija, kas ir epiteliāla metastātiska cilvēka prostatas vēža šūnu līnija, izdalīta no metastāzes kakla limfmezglā. Šī līnija ir iegādāta no ATCC (*American Type Culture Collection*; kataloga nr. CRL-1740) un uzturēta standarta zīdītāju šūnu kultūru apstākļos (+37°C, mitrinātā atmosfērā ar 5% CO<sub>2</sub>) kā adherenta kultūra no 53. pasāžas līdz 57. pasāžai.

#### 2.1.2. Barotnes un gēli

1.tabula  
Western blot SDS-PAGE gēli.

Table 1  
SDS-PAGE gels for Western Blot.

Reaģents	10% apakšējam gēlam, µl	6% augšējam gēlam, µl
ddH <sub>2</sub> O	4400	3225
30% Akrilamīds	3670	1000
Lower Tris pH 8.8	2750	-
Upper Tris pH 6.8	-	625
10% SDS	110	50
10% APS*	110	50
TEMED*	11	5

\*polimerizācijas katalizatori, kurus pievieno uzreiz pirms gēla liešanas kasetē

2.tabula  
Pilnā barotne LNCaP uzturēšanai adherentos apstākļos.

Table 2  
Complete medium for maintaining LNCaP line under adherent conditions.

Reaģenti	Sākuma konc.	Beigu konc.	50 mL
RPMI ar L-glutamīnu	-	-	līdz 50 mL
Inaktivēts FBS (iFBS)	100%	10%	5 mL
L-glutamīns	200 mM	2 mM	500 µL
Antibiotiku-Antimikotiku kokteilis	100x	1x	500 µL
Nātrija piruvāts	100 mM	1 mM	500 µL

3.tabula  
Pilnā barotne LNCaP uzturēšanai dobo šķiedru bioreaktorā.

Table 3

Complete medium for maintaining LNCaP line in hollow fibre bioreactor.

Reaģenti	Sākuma konc.	Beigu konc.	500 mL
DMEM (ar L-glutamīnu, 4.5g/L glikozi un 110mg/L nātrija piruvātu)	-	-	līdz 500 mL
iFBS vai CDM-HD	100%	10%	50 mL
L-glutamīns	200 mM	2 mM	5 mL
Antibiotiku-Antimikotiku kokteilis	100x	1x	5 mL
F12 (ar 1.8g/L glikozi)	-	-	līdz 50 mL
Inaktivēts FBS vai CDM-HD	100%	10%	5 mL
L-glutamīns	200 mM	2 mM	500 µL
Antibiotiku-Antimikotiku kokteilis	100x	1x	500 µL
Glikoze	200 g/L	2,5 g/L	625 µL
Gala pilnajā barotnē izmanto 1:1 DMEM un F12 pilno barotņu maisījumu			

### 2.1.3. Reaģenti un izejvielas

4-1.tabula  
Reaģenti un izejvielas, to ražotāji.

Table 4-1

Chemical reagents and their producers.

Reaģenti un izejvielas, apraksts	Ražotāji
Akutāze	Sigma-Aldrich, ASV
Akrilamīds	Roanal, Ungārija
Bis-akrilamīds	Bio-Rad, ASV
Antibiotiku-Antimikotiku kokteilis, 100x	Thermo Fisher Scientific, ASV (Kataloga nr. 15240-062)
Dietilpirokarbonāts (DEPC)	Alfa-Aesar, Lielbritānija
DMEM ar L-glutamīnu, 4.5g/L glikozi un 110mg/L nātrija piruvātu	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV
F12 barotnes piedeva	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV
CDM-HD seruma aizstājējs	FiberCell Systems, ASV
Fibronektīns, no cilvēka plazmas	Sigma-Aldrich, ASV
Etanols, 96%	SIA "Kalsnavas elevators"

4-2.tabula  
Reaģenti un izejvielas, to ražotāji.

Table 4-2  
Chemical reagents and their producers.

PBS šķīdināmas tabletes	Sigma-Aldrich, ASV
D-Glikoze	Sigma-Aldrich, ASV
L-glutamīns, 200 mM šķīdums	Thermo Fisher Scientific, ASV
Liellopa augļa serums (FBS)	Sigma-Aldrich, ASV
Nātrija dedocilsulfāts (SDS)	Merck, Vācija
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa</i>	Thermo Fisher Scientific, ASV
N,N,N',N',-tetra-metiletilenediamīns (TEMED)	Bio-Rad, ASV
Amonija persulfāts (APS)	Bio-Rad, ASV
Ponceau-S	Roanal, Ungārija
Tris - hidroksimetil aminometāns	VWR, ASV
Tween 20	Sigma-Aldrich, ASV
Sefaroze CL-2B	GE Healthcare, ASV
Metanols	Reahim, Krievija
Glicīns	Stanlab, Polija
Etiķskābe, 99,8%	Lach-Ner, Čehija
Glicerīns, >99%	Sigma-Aldrich, ASV
β-merkaptotetanols	Serva Electrophoresis GmbH, Vācija
Beztauku piena pulveris, ≤1,5% tauku	Sigma-Aldrich, ASV
Liellopa seruma albumīns (BSA)	Sigma-Aldrich, ASV
<i>N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)</i>	Sigma-Aldrich, ASV
N-hidroksisulfosukcinimīds, nātrija sāls (Sulfo-NHS), >99%	Sigma-Aldrich, ASV
<i>4,5-Dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt monohydrate („Tiron”)</i>	Merck, Vācija
<i>4-Morpholinoethanesulfonic acid (MES)</i>	Merck, Vācija
Magnētiskās nanodaļiņas, <i>FluidMAG-ARA: 200 nm</i>	Chemicell, Vācija
Nukleāžu brīvs ūdens	Thermo Fisher Scientific, ASV
RiboLock RNāžu inhibitors (20 U/μL)	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>UniSp6 miRCURY LNA miRNA PCR Assay primers</i>	Qiagen, ASV (Kataloga nr. 339306)
<i>hsa-miR-375-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	Qiagen, ASV (Kataloga nr. YCP1552280)
<i>QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen</i>	Bio-Rad, ASV (Kataloga nr. 1864005)
<i>QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix</i>	Bio-Rad, ASV (Kataloga nr. 1864034)

5.tabula  
Antivielas, to ražotāji.  
Table 5  
Antibodies, their producers.

<b>Antivielas, apraksts</b>	<b>Ražotāji</b>
Truša monoklonāla IgG pret cilvēka TSG101	ABCAM, Lielbritānija (Kataloga nr. ab125011)
Peles monoklonāla IgG pret cilvēka ALIX	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-166952)
Peles monoklonāla IgG pret cilvēka CD63	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-5275)
Truša poliklonāla IgG pret cilvēka Kalneksīnu	ABCAM, Lielbritānija (Kataloga nr. ab22595)
Peles monoklonāla IgG pret cilvēka CD9	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-13118)
Peles monoklonāla IgG pret cilvēka PSMA	Merck, Vācija (Kataloga nr. SAB4200257)
Peles monoklonāla IgG pret cilvēka PSMA	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-59674)
Truša poliklonāla IgG pret cilvēka CD63	Sino Biological, ASV (Kataloga nr. 11271-T16)
Peles monoklonāla IgG pret cilvēka CD63	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-5275)
Peļu IgG-kapa saistošais proteīns, HRP konjugāts	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-516102)
Peles anti-truša IgG, HRP konjugāts	Santa Cruz Biotechnology, ASV (Kataloga nr. sc-2357)

#### 2.1.4. Reaģentu komplekti

6.tabula.  
Reaģentu komplekti, to ražotāji.  
Table 6.  
Reagent kits, their producers.

<b>Reaģentu komplekti, apraksts</b>	<b>Ražotāji</b>
<i>Western Blotting Detection Reagent kit</i>	GE HealthCare Lifesciences, Vācija. (Kataloga nr. RPN2108)
<i>Pierce BCA Protein Assay kit</i>	Thermo Fisher Scientific, ASV. (Kataloga nr. #23227)
RNS izdalīšanas komplekts <i>miRNeasy Micro Kit</i>	Qiagen, ASV (Kataloga nr. 217084)
kDNS sintēzes komplekts <i>miRCURY LNA RT Kit</i>	Qiagen, ASV (Kataloga nr. 339340)

## 2.1.5. Aprīkojums un materiāli

7-1.tabula.  
Aprīkojums.  
Table 7-1  
Equipment.

<b>Apraksts</b>	<b>Iekārtas modelis</b>	<b>Ražotājs</b>
Autoklāvs	Labo MLS-3020U	Sanyo, Japāna
Dobo šķiedru bioreaktora sūknis	<i>FiberCell® Duet pump</i>	FiberCell, ASV
Glikometrs	<i>GlucCell Meter</i>	CESCO Bioengineering Co., Taivāna
Centrifūga	Sigma 1-15PK	DJB Labcare, Lielbritānija
Centrifūga	<i>Centrifuge 5415 D</i>	Eppendorf, Vācija
Centrifūga	<i>Centrifuge 5804 R</i>	Eppendorf, Vācija
Ultracentrifūga	Optima L-100 XP Rotors: SW 32 Ti 32 000 RPM	Beckman Coulter, ASV
CO <sub>2</sub> inkubators	<i>CO<sub>2</sub> incubator MCO-18AIC</i>	Sanyo, Japāna
Laminārās plūsmas kabinets	<i>Kojair BLOWWIZARD Class II BSC</i>	KOJAIR, Vācija
Invertais gaismas mikroskops	<i>AE31 Elite Inverted Phase Contrast Microscope</i>	Motic, Honkonga
Mikroskopa kamera	Moticam (CMOS) 3 MP	Motic, Honkonga
Magnētiskais maisītājs	<i>Labmixer Magneti stirrer</i>	Labotek, Dānija
Ūdens termostats	<i>Incubation Heating Water Bath 1013, 14 L</i>	GFL, Vācija
Automātiskā pipete	PIPETBOY acu	Integra Biosciences, ASV
Vortekss tipa maisītājs	Bio Vortex V1	Biosan, Latvija
Kelvinators	MDF-U53V	Sanyo, Japāna
Velkmes skapis	MSZ 6619	Ezermester ISZ, Ungārija
Mikroplašu spektrofotometrs	<i>BioTek MQX200 UQuant</i>	Biotek, ASV
Daļiņu izmēra, Zeta potenciāla un molekulmasas analizators	<i>Zetasizer Nano ZS</i>	Malvern, Lielbritānija
Nanodaļiņu izsekošanas iekārta	Nanosight instrument NS300	Malvern, Lielbritānija
pH mērītājs	<i>MP220 Basic pH/mV/°C Meter</i>	Mettler Toledo, ASV
Mikropipete	<i>Eppendorf 1000 µL micropipette</i>	Sigma-Aldrich, ASV
Mikropipete	<i>Eppendorf 200 µL micropipette</i>	Sigma-Aldrich, ASV

7-2.tabula.  
Aprīkojums.  
Table 7-2  
Equipment.

Mikropipete	<i>Eppendorf 10 µL micropipette</i>	Sigma-Aldrich, ASV
Ledus bloks	<i>PCR Cooler for 96 well plates</i>	Eppendorf, ASV
Komplekts gēla elektroforēzei	<i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>	Bio-Rad, ASV
Rezervuāra vāka konstrukcija	<i>38 mm Reservoir Cap Assembly, #A1006</i>	FiberCell Systems, ASV
dSLR kamera	<i>Nikon d610</i>	Nikon, Japāna
Kameras objektīvs	<i>Sigma 35mm f/1.4 DG HSM Art (Nikon F mount)</i>	Sigma, Japāna
PCR iekārta	<i>C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module</i>	Bio-Rad, ASV
Pilienu ģenerētājs	<i>QX200™ Droplet Generator</i>	Bio-Rad, ASV
Pilienu nolasītājs	<i>QX200 Droplet Reader</i>	Bio-Rad, ASV

8-1.tabula.  
Materiāli.  
Table 8-1  
Materials.

<b>Materiāli, apraksts</b>	<b>Ražotāji</b>
T-175 šūnu kultūru flaski ar standarta augšanas virsmu	Sarstedt, Vācija
Transferpipete, <i>Transferpipette</i> , 3,5mL	Sarstedt, Vācija
Falcon tipa stobri, <i>15 mL Tube</i>	Sarstedt, Vācija
Falcon tipa stobri, <i>50 mL Tube skirted</i>	Sarstedt, Vācija
Falcon tipa stobri, <i>50 mL Tube non-skirted</i>	Sarstedt, Vācija
Poliallomēra stobri, 38 mL (25x89mm)	Beckman Coulter, ASV
Mikrocentrifūgas stobriņi 1,5 mL	Eppendorf, ASV
Mikrocentrifūgas stobriņi 2,0 mL	Eppendorf, ASV
Mikrocentrifūgas stobriņi 1,5 mL <i>Protin Low-bind</i>	Eppendorf, ASV
Mikrocentrifūgas stobriņi 2,0 mL <i>Protin Low-bind</i>	Eppendorf, ASV
Gorjajeva kamera	Медремкомплект, Krievija
Whatman Anatop 0,02 µm	Merck, Vācija

8-2.tabula.  
Materiāli.  
Table 8-2  
Materials.

Mikropipetes uzgaļi ar filtru <i>Biosphere Filter Tips</i> 10 µl	Sarstedt, Vācija
Mikropipetes uzgaļi ar filtru <i>Biosphere Filter Tips</i> 1000 µl	Sarstedt, Vācija
Mikropipetes uzgaļi <i>Pipette tip</i> 10 µL	Sarstedt, Vācija
<i>Pipette tip</i> 200 µL	Eppendorf, Itālija
<i>Pipette tip</i> 1000 µL	Eppendorf, Itālija
SEC kolonna <i>TELOS SPE Columns</i>	Kinesis, Lielbritānija
SEC polietilēna frits <i>TELOS Polyethylene Frits</i> , 20µm, 15ml	Kinesis, Lielbritānija
MBS filtrs <i>Methacrylate-butadiene-styrene filtropur S</i> 0,2 µm	Sarstedt, Vācija
Parafilma <i>Parafilm M</i>	Bemis, ASV
Šļirce 10 mL syringes	Wellspring Medical Supplies CO. LTD, Ķīna
Šļirce perfuzoram, 3 komponentu, <i>Luer Lock</i> savienojums, 50/60 mL	Becton, ASV
Šļirce perfuzoram, 3 komponentu, <i>Luer Lock</i> savienojums, 20 mL	Becton, ASV
Šļirce 10 mL	Jiangsu Kanghua Medical Equipment Co., Ķīna
Sterican adata, 14G 2.1x80 mm,	B Braun, Vācija
Pudele <i>Nalgene™ Narrow-Mouth Polycarbonate Bottles with Closure</i> , 0,5 L	Thermo Fisher Scientific, ASV
Pudele <i>Nalgene™ Narrow-Mouth Polycarbonate Bottles with Closure</i> , 1 L	Thermo Fisher Scientific, ASV
Augstas plūsmas polisulfona šķiedru kārtidžs, 20 kDa, 20 mL <i>FiberCell Cartridge Module #C2011</i> ,	FiberCell Systems, ASV
Glikozes testa strēmeles <i>GlucCell Glucose Test Strips</i>	CESCO Bioengineering Co., Taivāna
Ultrafiltrācijas stobri <i>Amicon Ultra-0.5mL 3k Centrifugal Filters</i>	Merck Millipore Ltd., Vācija
Ultrafiltrācijas stobri <i>Amicon Ultra-15mL 100k Centrifugal Filters</i>	Merck Millipore Ltd., Vācija
96 bedrīšu plate <i>Nunc MaxiSorp™ flat-bottom</i>	Invitrogen, ASV
96 bedrīšu plate <i>Corning® 96 Well Black Polystyrene Microplate, clear flat bottom, black polystyrene</i>	Sigma-Aldrich, ASV

8-3.tabula.  
Materiāli.  
Table 8-3  
Materials.

Kārtridža gumija <i>DG8™ Gaskets for QX200™/QX100™ Droplet Generator</i>	Bio-Rad, ASV
Kārtridži <i>DG8™ Cartridges for QX200™/QX100™ Droplet Generator</i>	Bio-Rad, ASV
<i>ddPCR™ 96-Well Plates</i>	Bio-Rad, ASV
Seroloģiskā pipete 5 mL	Sarstedt, Vācija
Seroloģiskā pipete 10 mL	Sarstedt, Vācija
Seroloģiskā pipete 25 mL	Sarstedt, Vācija
Cepure <i>Round Cap 21''</i>	Shanghai Channelmed Import & Export CO., LTD, Ķīna
Cimdi <i>Nitrile examination gloves M</i>	Klinion, Nīderlande
Maska <i>Face mask disposable</i>	Wuhan Topmed trading Co., Ķīna

### 2.1.6. Šķīdumu sagatavošana

9-1.tabula  
Šķīdumu sagatavošana.  
Table 9-1  
Preparation of solutions.

<b>Bufersšķīdums</b>	<b>Pagatavošana</b>
<b>10x MES buferšķīdums (100mM, pH 4,5 / 5,0 / 6,0)</b>	Izšķīdina 1,952 g MES ~ 80 mL ultratīra ūdens un noregulē pH līdz 4,5, 5,0 vai 6,0. Uzpilda līdz 100 mL tilpumam, izfiltrē caur 0,2 µL filtru.
<b>MNP bloķēšanas buferšķīdums</b>	Izšķīdina 500 mg BSA iekš 25 mL 10mM MES pH 4,5 buferšķīduma.
<b>2x MNP R/W buferšķīdums</b>	Pie 49,6 mL PBS pievieno 200 mg BSA un 200 µL 10% Tween20; Izmanto atšķaidījumā 1:1 ar bioloģisko šķidrumu vai PBS.
<b>MNP uzglabāšanas buferšķīdums</b>	Izšķīdina 50 mg BSA un 250 µL 10% NaN <sub>3</sub> iekš 50 mL PBS.
<b>Karaļūdens</b>	Stikla traukā pie 4 tilpumiem (8 mL) ~ 35 % HCl lēnām pievieno 1 tilpumu (2 mL) ~65% HNO <sub>3</sub> . Gatavo un izmanto velkmes skapī.

9-2.tabula  
 Šķīdumu sagatavošana.  
 Table 9-2  
 Preperation of solutions.

<b>0,2M NaP pH 9,7 buferšķīdums</b>	Izšķīdina 2,84 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MW=141,96 g/mol) vai 3,56 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (MW=177,99 g/mol) iekš ~ 80 mL ultratīra ūdens; pielāgo pH līdz 9,7 un uzpilda līdz 100 mL.
<b>1x DEPC-PBS</b>	Vienu PBS tableti izšķīdina uz 200 mL ultratīra ūdens (Mili-Q). Pievieno 1 µL DEPC uz katru 1 mL PBS buferšķīduma un maisījumu sakrata. Nākamajā dienā autoklavē (15 min pie 121°C) un pirms lietošanas nofiltrē (0,2 µm filtri).
<b>20% glikoze</b>	Uzpilda 100 g D-glikozi līdz 500 mL ar ultratīru ūdeni, autoklavē 15 min pie 110°C (nedrīkst augstākā temperatūrā).
<b>CDM-HD</b>	33,36 g CDM-HD pulverim pievieno ultratīra ūdens līdz 1000 mL un izšķīdina uz magnētiskā maisītāja. Noregulē pH = 6,8 ar NaOH vai HCl. Nofiltrē caur 0,2 µm filtru.
<b>1M Tris-HCl pH 8,0</b>	6,05 g Trīs bāzes izšķīdina 40 mL ūdens, pielāgo pH līdz 8,0, ar koncentrētu HCl un uzpilda tilpumu līdz 50 ml. Nofiltrē caur 0,2 µm filtru.
<b>4x RIPA</b>	6 mL 5M NaCl + 2 mL Triton X100 + 2 mL 10% SDS + 10 mL 10% Nātrija deoksiholāts + 10 mL 1M pH 8,0 Tris-HCl + ultratīrs ūdens līdz 50 mL.
<b>20x TBS</b>	175,3 g NaCl + 48 g Tris bāze + ultratīrs ūdens līdz 1000 mL, pielāgo pH 7,5 ar HCl.
<b>10% piens</b>	20 g piena pulvera izšķīdina uzsildītā (+70°C) 1x TBST (0,05% Tween 20) līdz 200 mL gala tilpumam. Centrifugē 2 min pie 3000 x g un supernatantu nofiltrē caur 40 µm sietiņu.
<b>1x TBST (0,1% Tween 20)</b>	10 mL 20x TBS + 200 µL Tween-20 + destilēts ūdens līdz 200 mL.
<b>1x TBST (0,05% Tween 20)</b>	10 mL 20x TBS + 100 µL Tween-20 + destilēts ūdens līdz 200 mL.

9-3.tabula  
 Šķīdumu sagatavošana.  
 Table 9-3  
 Preparation of solutions.

<b>10x Running buferšķīdums</b>	10 g SDS + 30,3 g Tris bāze + 144 g glicīns + destilēts ūdens līdz 1000 mL.
<b>30% akrilamīds</b>	29,2 g akrilamīds + 0,8 g bis-akrilamīds + destilēts ūdens līdz 100 mL.
<b>10% SDS</b>	10 g SDS + destilēts ūdens līdz 100 mL.
<b>4x Laemmli buferšķīdums</b>	1 mL 1M Tris-HCl pH 6,8 + 400 mg SDS + 2 mL glicerīns + 10 mg bromfenolzilais + 1 mL β-merkaptotetanolis (tikai reducējošā Laemmli gadījumā) + ultratīrs ūdens līdz 5 mL.
<b>Lower Tris buferšķīdums</b>	36,3 g Tris bāze + 8 mL 10% SDS + destilēts ūdens līdz 180 mL, samazina šķīduma pH līdz 8,8 ar koncentrētu HCl + destilēts ūdens līdz 200 mL.
<b>Upper Tris buferšķīdums</b>	6,06 g Tris bāze + 4 mL 10% SDS + destilēts ūdens līdz 90 mL, samazina šķīduma pH līdz 6,8 ar koncentrētu HCl + destilēts ūdens līdz 100 mL.
<b>Pārneses buferšķīdums</b>	14,4 g glicīnu un 3 g Tris bāzi izšķīdina destilētā ūdenī līdz 900 mL gala tilpumam un pievieno 100 mL metanolu.
<b>Ponceau-S krāsošanas buferšķīdums</b>	2,5 mL konc. etiķskābe + 50 mg Ponceau-S + destilēts ūdens līdz 50 mL. Nofiltrē caur 0,2 μm filtru.

### 2.1.7. Darba drošība

Darbam šūnu laboratorijā ir jālieto individuālie aizsardzības līdzekļi, jānēsā piemērots aizsargapģērbs – tīrs laboratorijas halāts cepure, apavi, kas ir paredzēti darbam tikai konkrētajā telpā, vienreizlietojamie cimdi, kurus pirms darba sterilizē ar 70% etanolu, un ja nepieciešams – sejas aizsargmaska un brilles. Tas ir nepieciešams, lai izvairītos no šūnu kultūru un citu reaģentu kontaminācijas, kā arī lai pasargātu pats sevi no saskarsmes ar kaitīgām vielām. Pirms darba uzsākšanas tiek dezinficēta darba virsma ar 70% etanola šķīdumu. Darba virsma un aparatūra ir jādezinficē arī pēc darba ar katru šūnu kultūru, lai nenotiktu šūnu kultūru kontaminācija savā starpā. Pirms darbam nepieciešamo materiālu ienešanas laminārā, tie jādezinficē ar 70% etanola šķīdumu.

Laminārs katru dienu pēc darba ir jāiztīra ar 70% etanola šķīdumu un 60 min jāsterilizē ar laminārā uzstādīto UV lampu. Kamēr UV lampa laminārā vai telpā, kur atrodas darba virsmas, ir ieslēgta, tajā nedrīkst uzturēties.

Darbā ar atsevišķiem ķīmiskiem reaģentiem drošībai jāpievērš īpaša uzmanība. DEPC, metanola, etiķskābes, SDS atvēršana un lietošana jāveic velkmes skapī, jo to ieelpošana var kairināt elpceļus vai, nokļūstot uz ķermeņa virsmas, izraisīt karinājumu. Akrilamīds ir kancerogēna un toksiska viela, tā viegli tiek absorbēta ādā, tādēļ jābūt piesardzīgam to izmantojot. Karaļūdens jāgatavo un jāizmanto tikai velkmes skapī, jo izdala toksiskas gāzes. Ar to strādājot, jāpārliedz, ka tuvumā nav organisko vielu. Atlikušais šķīduma daudzums jāneitralizē ar NaOH šķīdumu vai nātrija bikarbonātu.

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Vēža šūnu līnijas kultivēšana

#### Flaskos

LNCaP šūnu līnija tika uzturēta adherento kultūru flaskos šūnu kultūru inkubatorā (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitrums), RPMI barotnē, papildinātā ar 10% inaktivētu FBS, 1x L-glutamīnu (2mM), 1x antibiotiku-antimikotiku kokteili un 1x nātrija piruvātu (1mM). Kultūras tika sētas blīvumā 7,5–15·10<sup>6</sup> uz T-175 flasku (175 cm<sup>2</sup> laukuma) un pasažēšana veikta ik pēc 4 vai 3 dienām, izmantojot akutāzi.

#### Dobo šķiedru bioreaktorā

Pirms bioreaktora kārtidža inokulācijas nepieciešams veikt vairākus secīgus kārtidža preinkubācijas soļus. Pirmajā solī bioreaktora rezervuāra pudelē tika iepildīti 450 mL PBS un EKT (ar šļirci palīdzību caur portu) uzpildīta pilnībā ar PBS. Kārtidžs tika ievietots elektriskajā pumpī un atstāts inkubatorā skaloties (+37°C, 5% CO<sub>2</sub> un 100% gaisa mitrums) vismaz 24 h (vēlams 72 h) ar plūsmas ātrumu 60-80 mL/min. Otrajā solī, kas ir specifisks tikai PV šūnu līnijām, EKT saturs tika aizvietots ar svaigu PBS, kurā izšķīdināti 0,5 mg cilvēka plazmas fibronektīna un kārtidžs atstāts pa nakti bez plūsmas istabas temperatūrā. Nākamajā dienā tika veikta pirmā barotnes maiņa – PBS rezervuāra pudele tika nomainīta ar 125 mL RPMI barotni saturošu pudeli un EKT saturs ar šļirci tika aizvietots ar 20 mL RPMI barotnes. Kārtidžs tika ievietots elektriskajā pumpī un atstāts inkubatorā uz 24 h ar plūsmas ātrumu 80-100 mL/min. Otrā barotnes maiņa un skalošana tika veikta pēc pirmās barotnes maiņas parauga, taču izmantojot pilno RPMI barotni (ar piedevām). Trešā barotnes maiņa tika veikta pēc otrās barotnes maiņas parauga un tai nekavējoties sekoja EKT inokulācija ar LNCaP šūnu līniju. Pēc barotnes maiņas tika nomērīta tās sākotnējā glikozes koncentrācija, izmantojot glikometru un testa strēmeles: testa strēmeles lodziņā tika ienesti 1,5 µL barotnes, paņemti no rezervuāra pudeles.

Izmantojot akutāzi, tika savāktas LNCaP šūnas no 13 adherentu kultūru T-175 flaskiem ar 70% konfluenci, kas pēc skaita atbilda 4,48·10<sup>8</sup> šūnām, un resuspendētas tās atpakaļ šo pašu šūnu kondicionētās barotnes 20 mL tilpumā. Šūnu suspensija tika ievadīta bioreaktora kārtidžā: šļircē tika iesūkta resuspendēto šūnu suspensija un lēnām to caur kreiso EKT portu ievadīta EKT, izspiežot esošo EKT barotni tukšā šļircē caur labo portu. Šūnas tika vienmērīgi izklidētas pa EKT, 3-4x lēni caur EKT pārnesot barotni no vienas šļirci otrā un atpakaļ līdz, visbeidzot, tika atstāts vienāds suspensijas tilpums (10 mL) katrā šļircē, kas pēc labā cirkulācijas porta atvēršanas caur

bioreaktora šķiedrām tika izspiests kopējā cirkulācijā. Kārtridžs tika rotēts pa 180 grādiem un atstāts bez plūsmas, laminārā un 20 minūtēm. Pēc šī laika kārtridžs tika rotēts atpakaļ normālā pozīcijā, ievietots elektriskajā pumpī un atstāts inkubatorā ar plūsmas ātrumu 80-100 mL/min.

Katru dienu tika veikts cirkulējošās barotnes glikozes mērījums. Ik reizi, kad glikozes koncentrācija barotnē nokritās uz pusi, tikai mainīta cirkulējošā barotne, tās tilpumu dubultojot, un pakāpeniski (četros soļos) pārejot no RPMI uz DMEM/F-12 balstītu barotni, līdz tika sasniegts maksimālais 1 L tilpums. Tomēr vēlāk barotnes maiņas protokols tika pielāgots LNCaP līnijas individuālajām prasībām – pārejot atpakaļ uz 500 mL tilpumu un barotnes nomaiņu veicot katru dienu. Kad ikdienas glikozes patēriņš sasniedza  $\geq 0,5$  g, pilnajā cirkulējošā barotnē inaktivētais FBS tika pakāpeniski (četros soļos) aizstāts ar ķīmiski definētu seruma aizvietotāju (CDM-HD), savukārt EKT barotne uzreiz tika mainīta uz serumu nesaturošu. Pēc pilnīgas pārejas no inaktivētā FBS uz CDM-HD un, kad glikozes patēriņš sasniedza  $\geq 1$  g dienā, tika veiktas zemas glikozes ražas (ZGR) ievākšana katras 2-3 dienas: tika aizvērti gala porti (savienoti ar cirkulējošās barotnes rezervuāru) un EKT porti (iziet no kārtridža) un šļirce ar 20 mL svaigas pilnās barotnes tika piestiprināta pie viena EKT porta. Tad tika atvērti abi EKT porti un lēnām izspiesta barotne no šļirces, tādā veidā uzpildot otram EKT portam pievienoto šļirci. Abi EKT porti tika aizvērti un ar bioreaktora kondicionēto barotni piepildītā šļirce nomainīta pret jaunu, tukšu šļirci. Tika atvērti sānu porti un turpināta šūnu kultivēšana. Vēlāk, pielāgojot kultivēšanas apstākļus LNCaP līnijai, ZGR tika ievākta katru dienu.

Pēc ražas ievākšanas protokola tālākas optimizācijas katru dienu tika ievākta gan ZGR, gan augstas glikozes raža (AGR). AGR protokols tika veikts uzreiz pēc katras ZGR. Tika aizvērts tikai kreisais gala ports un katram EKT portam tika piestiprināta 20 mL šļirce. Rezervuāra vāks tika atgriezts par  $\frac{1}{4}$  pagriezienu. Pēc labā EKT porta atvēršanas lēnām tika ievilkti 10 mL barotnes labajā šļircē, labais EKT ports aizvērts. Pēc kreisā EKT porta atvēršanas lēnām tika ievilkti 10 mL barotnes kreisajā šļircē. Tad tika atvērti abi EKT porti un aizvērti abi gala porti. Lēni caur EKT tika pārnesta barotne no vienas šļirces otrā un atpakaļ 2-3 reizes. Šļircu barotne tika izspiesta iekšā vienā šļircē, tad aizvērti abi EKT porti un lietotās šļirces nomainītas pret jaunām. Tika atvērti sānu porti un turpināta šūnu kultivēšana.

## 2.2.2. EV izdalīšana

### 2.2.2.1. Šūnu kondicionēto barotņu apstrāde un koncentrēšana

LNCaP kondicionētu barotni no bioreaktora EKT secīgi centrifugēja 10 min pie 300 x g un 10 min pie 3000 x g, lai atbrīvotos no šūnām un to atliekām; supernatantu uzglabāja maksimums,

līdz 4 dienām pie +4°C līdz tālākai apstrādei. Apvienotus 3-4 dienu supernatantus centrifugēja 30 min pie 3000 x g, +4°C. Izmantojot 0,2 µm MBS filtrus, izfiltrēja supernatantu. Amicon Ultra–15 100kDa 15 mL ultrafiltrācijas stobriņu uzpildīja ar filtrēto barotni un centrifugēja pie 3300 x g, +4°C, atkārtojot procesu, līdz pilnīgi viss paraugs tika sakoncentrēts līdz 0,5 mL. Koncentrēto barotni pārnesa 1,5 mL stobriņā, savorteksēja, centrifugēja 10 pie 10000 x g, +4°C; supernatantu pārnesa jaunā stobriņā un uzglabāja pie +4°C temperatūras līdz SEC veikšanai.

#### 2.2.2.2. SEC veikšana

Izmantojot izmēru izslēgšanas hromatogrāfiju, barotnes koncentrāta sastāvā esošās daļiņas tiek fracionētas pēc to izmēriem. Kolonnā esošās sefarozes daļiņas ir ar porām, kurās iekļūst mazākās daļiņas un molekulas, bet lielākās daļiņas iekļūst porās nespēj. Šī iemesla dēļ lielākās daļiņas ātrāk izfiltrējas caur hromatogrāfijas vidi, bet mazākās daļiņas mēro garāku ceļu caur sefarozes lodīšu porām, līdz ar ko tām ir nepieciešams ilgāks laiks, lai tās izfiltrētos. Pēc SEC veikšanas iegūto frakciju sērija secīgi saturēs izmēros arvien mazākas daļiņas (sākot ar EVs un beidzot ar mazākiem proteīnu kompleksiem).

Vārglāzē katrai kolonnai tika ielieti 15 mL CL-2B sefarozes suspensijas un atstāti 1 h istabas temperatūrā sedimentēties. Tad tika atsūkts augšējais etanola slānis un veikta skalošana – uz katriem 15 mL sefarozes pievienoti 6 mL DEPC-PBS, suspensija tika samaisīta ar mikropipeti un atstāta uz 15 min sedimentēties. Skalošana tika atkārtota vēl divas reizes. Tad uz katru 15 mL sākotnējo sefarozes suspensijas tilpumu tika pielieti 4 mL filtrēta DEPC-PBS. Nepieciešamais skaits TELOS filtrācijas kolonnu tika ievietots statīvā un nolīmeņots ar līmeņrādi. Katra kolonna tika papildīta ar 10 mL filtrēta DEPC-PBS un ar marķieri atzīmēts 10 mL līmenis. Pēc kolonnu atgaisošanas ar cimdu (ierosinot buferšķīduma plūsmu un ļaujot tam iztecēt caur filtru) kolonna tika uzreiz uzpildīta ar 11 mL sagatavotās sefarozes. Kad tā bija nosedimentējusies līdz 10 mL atzīmei (ja nepieciešams, tad kolonna tika papildināta ar papildus sefarozi), tad uzmanīgi kolonna līdz augšai tika uzpildīta ar DEPC-PBS. Kā augšējie filtri tika sagatavoti 10 mL šļirces cilindrā atgāzēti friti. Frits ar rupjo pusi uz augšu ar pincetes palīdzību tika iespiests kolonnā līdz sefarozes līmenim. Kolonna no apakšas tika noslēgta ar šļirces adatu, pa vidu ievietojot parafilmas gabaliņu, bet no augšas – ar pārvilkto parafilmu, un uzglabāta +4°C temperatūrā līdz izmantošanas brīdim (taču to nevajadzētu uzglabāt ilgāk kā ~24 h, ja buferim nav pievienots 0,05% nātrija azīds).

Uz kolonnas tika uznesti 0,5 mL LNCaP barotnes koncentrāta, vai arī 1 mL urīna koncentrāta. Tad tekošo filtrātu secīgi vāca 1,5 mL stobriņos ar 0,5 ml soli kopā 20-30 frakcijās. Fracionēšanas gaitā kolonna nepārtraukti tika papildināta ar DEPC-PBS, lai frits vienmēr būtu zem šķīduma

līmeņa. Savāktās frakcijas tika uzglabātas +4°C temperatūrā līdz tās tika raksturotas un koncentrētas; tās nevajadzētu uzglabāt bez apstrādes ilgāk kā ~24 h. Pēc darba kolonnas tika izskalotas ar 10 mL 0,5 M NaOH un 20 mL DEPC-PBS. Ilgākai uzglabāšanai kolonnas tika izskalotas ar vismaz 10 mL 0,05% NaN<sub>3</sub> saturošu DEPC-PBS un friti atstāti pārklāti ar šo buferi. Šādas kolonnas tika uzglabātas +4°C temperatūrā līdz pat 14 dienām un pirms darba izskalotas ar 20 mL DEPC-PBS.

### 2.2.2.3. SEC frakciju raksturošana

SEC frakcijas tika raksturotas, izmantojot Zetasizer Nano ZS (Malvern) iekārtu un *Zetasizer software* (Malvern) datorprogrammu. Iekārta daļiņu lieluma noteikšanai izmanto dinamisko gaismas izkliedi. Tiek mērītas daļiņu izkliedētās lāzera gaismas intensitātes fluktuācijas. Fluktuāciju frekvenci nosaka daļiņu Brauna kustība – mazākās daļiņas kustēsies ātrāk, līdz ar ko izkliedētās gaismas lokālā intensitāte mainīsies straujāk. Integrēti analizējot šos datus, iekārta ļauj gūt priekšstatu par daļiņu izmēru sadalījumu un relatīvo daļiņu koncentrāciju paraugā.

Ar DEPC-PBS izskalotā kivetē tika ienesti 20 µL savorteksētas frakcijas parauga. Vienam paraugam tika veikti 10 mērījumi pa 10 sekundēm, trīs atkārtojumos. Frakciju sērijas sākumā tika atrasta pirmā frakcijā, kuru mērot pie automātiski regulētas lāzera intensitātes (*Attenuator*), tā ir zem 11. Intensitāte zem 11 liecina, ka šī frakcija satur daļiņas. Frakciju sērijas otrā galā tika atrasta pēdējā frakcija, kurai izmēra histogrammā galvenā pīķa modālā vērtība nav zem 40 nm. Tomēr tika pievērsta uzmanība arī, lai būtisks daļiņu daudzums nebūtu zem 30 nm. Koncentrēšanai, kā EVs saturošas tika izvēlētas abas robežfrakcijas, kā arī visas frakcijas starp tām.

### 2.2.2.4. SEC frakciju koncentrēšana

Amicon 3kDa 0,5 mL ultrafiltrācijas stobros tika iepildīti savorteksēti EV saturošo frakciju paraugi, kas tika noskaidroti, tās raksturojot. Visas izvēlētas viena parauga frakcijas tika apvienotas un koncentrētas uz viena ultrafiltrācijas stobriņa. Ultrafiltrācijas stobriņi tika centrifugēti 12 min pie 14 000 x g, +4°C temperatūrā līdz LNCaP EV paraugs tika sakoncentrēts līdz 100-150 µL, bet urīns līdz 20–40 µL. Iegūtais EV koncentrāts tika alikvotēts *Protein Low-bind* 1,5 mL stobriņos pa 25 µL LNCaP EV gadījumā, bet urīna gadījumā paraugi tika sagatavoti *Western blot* analīzei un atlikušais paraugs iesaldēts. EV alikvoti tika uzglabāti kelvinatorā (-80°C). No katra LNCaP EV izdalīšanas eksperimenta, viens EV alikvots tika izmantots EV raksturošanai ar BCA metodi un nanodaļiņu izsekošanas analīzi. EV paraugus nav ieteicams pakļaut atkārtotiem sasaldēšanas-atkausēšanas cikliem.

### 2.2.3. Magnētisko nanodaļiņu un antivielu konjugācija

Antivielu kovalentai piesaistei pie glikuronskābes apvalkotām magnētiskām nanodaļiņām tika izmantota karbodiimīdu kondensācijas reakcija. Karbodiimīdi ir sintētiski savienojumi ar  $\text{RN}=\text{C}=\text{NR}$  funkcionālo grupu, kurus plaši izmanto organiskajā sintēzē karboksilskābes atlikumu ( $-\text{COOH}$ ) kovalentai sajūgšanai ar primārajiem amīniem ( $-\text{NH}_2$ ), galā veidojot peptīdsaiti. Viens no šādiem savienojumiem ir EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimīds), kas aktivē karboksilgrupu, veidojot nestabilu O-acilizourīnvielas starpproduktu, kuru pēc tam var viegli aizvietot  $-\text{NH}_2$  grupa, rezultātā savienojot šīs grupas savā starpā ar peptīdsaiti. Bieži papildus tiek pievienots Sulfo-NHS (N-hidroksisulfosukcinimīds), jo tas aizvieto nestabilo O-acilizourīnvielu pret stabilu Sulfo-NHS grupu, ko arī tālāk var aizvietot  $-\text{NH}_2$  grupa. Rezultātā konjugācijas efektivitāte tiek paaugstināta, jo aktivētās grupas spontāni nehidrolizējās.

Reakcija parasti tiek veikta buferšķīdumā ar pH 6,0 un tajā nedrīkst būt citas karbonskābes un amīni, tādēļ šim mērķim parasti tiek izmantots MES (4-morfolinoetānsulfoskābe). Šajā darbā eksperimentos tika veikta konjugācija pie pH 4,5, lai nodrošinātu orientētu elektrostātisku mijiedarbību starp antivielu un negatīvi lādētām MNPs. Šim mērķim jāizvēlas reakcijas vides pH, kas ir vismaz 0,5 iedaļas zem proteīna (antivielas) izoelektriskā punkta, lai antiViela iegūtu pozitīvu lādiņu. Lādiņa sadalījuma specifika antivielas molekulā nodrošina to, ka elektrostātiskā mijiedarbība ir orientēta (antiViela “pielīp” *flat-on* orientācijā, kas ir viena no divām optimālajām orientācijām, lai saglabātu maksimālu paratopu pieejamību; šādā orientācijā antiViela pēc tam arī piesaistās kovalenti). Izelektriskais punkts PSMA un CD63 antivielām tika noteikts iepriekš: PSMA Ab:  $pI=5,00-5,55$ ; CD63 Ab:  $pI=5,2-8,45$  (E.Endzeliņa iegūtie dati Aragonas Nanozinātņu institūtā, Dr. Jesus de la Fuente laboratorijā). Pēc konjugācijas, atlikušās aktivētās karboksilgrupas tiek bloķētas, ar BSA.

1. 2 mL *Protein Low-bind* stobriņos pie 400  $\mu\text{L}$  MNPs (10 mg) tika pievienoti 600  $\mu\text{L}$  10 mM MES pH 5,0 buferšķīduma atmazgāšanai. MNP mazgāšana ar 1 mL šī buferšķīdumu tika atkārtota trīs reizes, starp mazgāšanas reizēm stobriņi tika likti pie magnēta, lai atsūktu buferi bez MNPs.

2. MNPs tika aktivētas ar EDC un Sulfo-NHS iekš 10 mM MES pH 5,0 buferšķīduma; uz katru 1 mg MNPs tika ņemts 1 mg EDC un 1 mg Sulfo-NHS. Abu aktivācijas reaģentu šķīdums tika sagatavots nekavējoties pirms tā izmantošanas. Aktivācija tika veikta 30 min, 37°C uz stobriņu

rotatora. Pēc MNP aktivizēšanas tika veikta atmazgāšana ar 1 mL 10 mM MES pH 5,0 buferšķīdumu, kā tas aprakstīts iepriekš.

3. Tika pagatavots vēlamais anti-antivielas daudzums iekš 10 mM MES pH 4,5, lai uz vienu stobriņu būtu 750 µL. Ab-MNP-5 konstruktam tika izmantoti 5 µg anti-antivielas uz katru 1 mg MNPs, Ab-MNP-10 konstruktam – 10 µg anti-antivielas uz katru 1 mg MNPs, Ab-MNP-15 konstruktam – 15 µg anti-antivielas uz katru 1 mg un Ab-MNP-20 konstruktam – 20 µg anti-antivielas uz katru 1 mg, bet kontrolei 0 µg anti-antivielas. Tālāk aktivētās MNPs tika resuspendētas iekš 10 mM MES pH 4,5, lai uz vienu stobriņu nepieciešamais daudzums būtu 250 µL. Tad stobriņam ar 750 µL anti-antivielas šķīdumu tika pievienota 250 µL aktivētu MNP suspensija. Konjugāciju veica 2 h, 37°C uz stobriņu rotatora. Stobriņi tika uzlikti uz magnēta un tika atsūkts konjugācijas supernatants, kuru izmantoja *DotBlot* analīzei. MNPs uz magnēta tika nomazgātas ar 10 mM MES pH 4,5 buferi.

4. Bloķēšanai izmantoja 2% BSA šķīdumu iekš 10 mM MES pH 4,5 bufera. Inkubāciju veica 2 h istabas temperatūrā uz stobriņu rotatora. Pēc bloķēšanas MNPs uz magnēta tika atmazgātas trīs reizes ar 1 mL 10 mM MES pH 6,0 buferšķīdumu.

5. Uzglabāšanai konjugētās MNPs tika resuspendētas MNP uzglabāšanas buferšķīdumā ar 0,1% BSA, 0,05% NaN<sub>3</sub> iekš PBS. Ar anti-antivielas konjugētās nanodaļiņas tika uzglabātas +4°C temperatūrā.

#### 2.2.4. *DotBlot* analīze

*DotBlot* analīzei tika ņemti šādi paraugi: (1) supernatants no Ab-MNP kontroles konjugācijas reakcijas, kurai netika pievienotas MNPs (pozitīvā kontrole salīdzinājumam ar citām paraugu grupām); (2) supernatants no Ab-MNP konjugācijas reakcijas (gaidāms, ka nesatur anti-antivielas, ja reakcija noritējusi 100% efektīvi); (3) Ab-MNP konstrukti atšķaidījumā, kas atbilst konjugācijas reakcijai. Paraugi tika uzpildināti uz 0,45 µm nitrocelulozes membrānas (1 µl uz punktu), kurai pēc tam 1 h ļāva nožūt +37 °C temperatūrā. Membrāna tika bloķēta ar 10% beztauku piena pulvera šķīdumu iekš TBST 0,05%, 1 h +37°C temperatūrā uz orbitālā maisītāja (60 RPM). Pēc tam membrāna tika inkubēta ar sekundārās anti-antivielas atšķaidījumu: 1:2000 anti-peles-HRP (sc516102) (peles anti-PSMA konjugētajām MNPs) un 1:2000 anti-truša-HRP (sc2357) (truša anti-CD63 konjugētajām MNPs). Pēc inkubācijas membrānas tika secīgi skalotas 5 min ar TBST 0,05%, 10 min TBST 0,1%, 5 min TBST 0,1 % un 10 min ar TBST 0,05% istabas temperatūrā, 90 RPM. Tika veikta detekcija, uz membrānas uznesot svaigi pagatavotu *Western blot* detekcijas reaģentu

maisījumu (GE HealthCare Lifesciences, Vācija) un luminescento signālu fotografējot ar dSLR kameru.

### 2.2.5. Dzelzs satura noteikšana

Ar aprakstīto dzelzs satura noteikšanas metodi, ir iespējams raksturot dzelzs saturu paraugā, salīdzinot to ar zināmu koncentrāciju standartu sēriju. Tika sagatavoti sekojoši paraugi iekš MNP uzglābšanas buferšķīduma: (1) Ab-MNP konjugāti (atbilst 5 mg/mL konjugācijā izmantotajām MNPs); (2) Aktivētās MNPs 1:2 atšķaidījumā (atbilst 5 mg/mL konjugācijā izmantotajām MNPs); (3) MNP standartšķīdumu sērija (FluidMAG-ARA: 200 nm, 25 mg/mL) koncentrācijās – 10; 7,5; 5; 3,75; 2,5; 1,25 un 0 mg/mL. Katrs testējama vai standartlīknes paraugs tālāk trijos tehniskajos atkārtojumos izšķīdināts karaļūdenī. Tā veikšanai, 1,5 mL stobriņos pie 45 µL ultratīra ūdens tika pievienoti 5 µL parauga un stobriņu vāciņi tika caurdurti ar adatu. Stobriņi tālāk tika papildināti ar 100 µL karaļūdens un karsēti 15 min +60°C temperatūrā, tad katram tika pievienoti 350 µL ultratīra ūdens. No katra stobriņa 50 µL tika iepildīti 96 bedrīšu platē. Katrai parauga bedrītei tika pievienoti 60 µL Tirona/KOH šķīduma, kas pagatavots tieši pirms izmantošanas (1 mL svaigi izšķīdinātu 0,25 M Tiron samaisa ar 5 mL 4 M KOH šķīdumu), un 100 µL 0,2M NaP pH 9,7 buferšķīduma. Nekavējoties tika nolasīta šķīdumu absorbcija pie 562 nm viļņa garuma ar mikroplašu spektrofotometru UQuant (BioTek, ASV). MNP koncentrāciju aprēķinam tika konstruēta standartlīkne no MNP standartšķīdumu sērijas absorbcijas mērījumu vērtībām, pret kuru salīdzināti mērāmie paraugi (Microsoft Excel).

### 2.2.6. EV imunoizolēšana

Imunoizolēšanā tika izmantotas MNPs, kas konjugētas ar izvēlēto antivielu – pret noteiktu EV virsmas proteīnu – CD63 (universāls EV marķieris) vai PSMA (prostatas izcelsmes EV marķieris), kā arī identiski konstruētas antivielu nesaturošas kontroles MNPs, lai novērtētu nespecifisko reakciju. Konjugētās MNPs tika atmazgātas ar PBS (pirms reakcijas optimizācijas) vai 1x MNP R/W buferi 2 mL *Protein Low-bind* stobriņos, pēc kā tika atsūkts supernatants. Neoptimizētajos reakcijas apstākļos Ab-MNPs un LNCaP EVs tika inkubētas to daļiņu attiecībā 10:1 iekš PBS; pēc apstākļu optimizācijas Ab-MNPs un LNCaP EVs attiecībā 10:1 tika inkubētas iekš 1x MNP R/W buferšķīduma; reakcijās ar bioloģiskajiem šķidrumiem (urīna koncentrāts) stobriņos tika iepildīts 2x MNP R/W buferšķīdums un bioloģiskais šķidrums tilpumu attiecībā 1:1 un izmantoti 250 µg Ab-MNPs ( $5,5 \cdot 10^{10}$  daļiņas) uz katriem 500 µL bioloģiskā šķidruma.

Imunoafinitātes reakcija tika inkubēta pa nakti +4°C temperatūrā stobriņu rotatorā. Nākamajā dienā stobriņu saturs tika pārnests jaunā stobriņā un, uzliekot tos uz magnēta, tika atsūkts supernatants. MNP nogulsni mazgāja trīs reizes ar inkubācijā izmantoto buferšķīdumu (neoptimizētajos apstākļos – PBS, optimizētajos un ar biofluīdiem – 1x MNP R/W buferšķīdums). Katra mazgāšana tika veikta 5 min uz stobriņu rotatora, istabas temperatūrā, starp katru mazgāšanas reizi atsūcot supernatantu. Pēc pēdējās mazgāšanas nogulsne tika izšķīdināta iekš PBS.

*Western Blot* analīzei MNP nogulsne tālāk tika resuspendēta iekš nereducējošā Laemmli (bez BME) priekš analīzes ar anti-CD63 vai iekš reducējošā Laemmli (ar BME) priekš analīzes ar anti-PSMA, un tika veikta paraugu karsēšana 5 min, +95°C temperatūrā. Pēc karsēšanas stobriņi tika centrifugēti 10 min pie 12 000 x g un supernatants ar EV lizātu tika pārnests jaunā stobriņā. Lizāts tika gatavots iekš 8-10µL Laemmli uz katru gēla joslu. Ja lizāts *Western blot* analīzei netika izmantots tajā pašā dienā, tad to sasaldēja (-20°C).

Alternatīvi, priekš RNS izdalīšanas MNP PBS suspensija tika lizēta ar 700 µL QIAzol līzes šķīdumu, kas papildināts ar UniSp6 RNS kontroli. Priekš kDNS sintēzes bez RNS izdalīšanas soļa PBS tika aizvākts un MNPs resuspendētas UniSp6 saturošā nukleāžu brīvā ūdenī ar vai bez RiboLock RNāžu inhibitora un tika turpināts pēc kDNS sintēzes protokola.

### 2.2.7. Šūnu lizāta sagatavošana

Šūnu lizāta pagatavošanai 1,5 mL stobriņā tika iepildīti 250 µL auksta 4x RIPA uz ledus bloka. Otram stobriņam ar sasaldēto šūnu nogulsni tika pievienoti 750 µL auksta PBS un 10 µL 100x Halt proteināžu inhibitoru kokteiļa (PI). Šūnu nogulsne tika resuspendēta un 750 µL šūnu suspensijas nekavējoties pārnesta sagatavotajā stobriņā ar 250 µL 4x RIPA, rūpīgi sapipetē. Paraugs tika homogenizēts vairākas reizes to iesūcot un izspiežot no šļirces caur tās adatu un vorteksējot. Ja paraugā bija pārāk daudz šūnu un bija grūtības to homogenizēt, tad pievienoja papildus 1x RIPA (1 daļa 4x RIPA, 3 daļas PBS, 1:100 PI). Paraugs tika inkubēts uz ledus visā 30 min homogenizēšanas laikā (homogenizēšana ar šļirci tiek atkārtota ik pēc aptuveni 5 min). Stobriņš ar paraugu tika centrifugēts 15 min pie 14000 x g, +4°C. Supernatants tika pārnests jaunā stobriņā, neparaujot līdzī sedimentu. Lizāts tika uzglabāts pie -20°C.

### 2.2.8. *Western blot* analīze

*Western blot* analīzi veic, lai raksturotu konkrētu interesējošo proteīnu klātbūtni bioparaugā. Ar šo metodi var gūt priekšstatu par to, cik tīrs ir izdalītais EV paraugs, nosakot specifisko EV

marķieru un EV-neraksturīgo proteīnu (kalneksīns) klātbūtni. Šī metode ietver vairākus secīgus soļus – proteīnu sadalīšanu pēc to molekulārās masas poliakrilamīda gēlā ar elektroforēzes palīdzību; tālāku to pārnesi uz nitrocelulozes membrānas; proteīnu iezīmēšanu, izmantojot ar specifiskas primārās antivielas un ar detekcijas enzīmu (šajā gadījumā - HRP) vai citu iezīmi konjugētas sekundārās antivielas; līdz, visbeidzot, detekcijas soli, kurā HRP katalizē luminiscentu reakciju.

*Western blot* analīzei tika sagatavoti 10% SDS-PAGE gēli un bedrītēs ienesti 8–10  $\mu$ L EV lizāti iekš Laemmli (karsēti 5 min, +95°C temperatūrā) vai 3  $\mu$ L krāsota proteīnu molekulmasas marķiera. Elektroforēzes kamera tika novietota aukstajā istabā (+4°C) uz magnētiskā maisītāja un tika veikta elektroforēze 10–15 min/90V līdz paraugi koncentrējas uz koncentrējošā un sadalošā gēla robežas, tad turpina ~1 h/150V līdz marķiera vieglākā zona (10 kDa) tuvojās gēla apakšai. Pēc elektroforēzes proteīni no gēla tika pārnesti uz membrānu ar standarta slapjās pārneses metodi Īsumā, 15 min 1x pārneses buferī tika izmērcētas 0,45  $\mu$ m nitrocelulozes membrānas, *Whatman* filtru papīri un sūkli. Tālāk sekojošā secībā tika konstruēts “Sendvičs”: (+) sūklis > filtrpapīrs > membrāna > gēls > filtrpapīrs > sūklis (-). Pārnese tika veikta 1 h/100 V, aukstajā istabā. Pēc pārneses membrāna tika krāsota ar Ponceau Red šķīdumu, lai pārlicinātos par veiksmīgu proteīnu pārnesi un gūtu priekšstatu par kopējo proteīnu saturu paraugā. Vadoties pēc Ponceau Red, ar skalpeli membrāna tika sagriezta sloksnēs iezīmēšanai ar atšķirīgām primārajām antivielām. Katra membrānas sloksne tika bloķēta ar 20 mL 10% beztauku piena pulvera šķīdumu iekš TBST 0,05%, 1 h uz orbitālā kratītāja pie 60 RPM istabas temperatūrā. Tālāk membrānas tika inkubētas (pa nakti pie 60 RPM +4°C temperatūrā) primāro antivielu šķīdumos 5% pienā/TBST 0,05% (12 mL uz katrai veselai membrānai 10x10cm platē vai zemākā tilpumā membrānas sloksnei mazāka virsmas laukuma platē, saglabājot identisku tilpuma/virsmas attiecību). *Western blot* izmantotie primāro antivielu atšķaidījumi norādīti xxx tabulā. Nākamajā dienā membrānas tika noskalotas ar TBST 0,05%, pārnestas jaunā 10x10cm platē un secīgi skalotas 5 min ar TBST 0,05%, 10 min TBST 0,1%, 5 min TBST 0,1 % un 10 min ar TBST 0,05% (istabas temperatūrā, 90 RPM). Tad membrānas tika inkubētas (istabas temperatūrā, 60 RPM) sekundāro antivielu šķīdumos 5% pienā/TBST 0,05% – 1:2000 Anti-Truša-HRP (lieto truša primārajām antivielām pret kalneksīnu un TSG101) un 1:2000 Anti-Peles-HRP (lieto peles primārajām antivielām pret ALIX, PSMA, CD63, CD9). Pēc inkubācijas membrānas atkal tika skalotas kā iepriekšējā reizē. Tika veikta detekcija, uz membrānas uznesot svaigi pagatavotu *Western blot* detekcijas reaģentu maisījumu (GE HealthCare Lifesciences, Vācija), un luminescento signālu fotografējot ar dSLR kameru.

10.tabula.  
*Western blot* izmantotās primārās antivielas.  
 Table 10  
 Primary antibodies used in *Western blot*.

Primārā antiViela	Gala atšķaidījums	Suga	Kataloga nr.	Sagaidāmā molekulmasa, kDa	Apraksts
CD9	1:250	Peles	Sc-13118,	22–27	EV marķieris
CD63	1:500	Peles	Sc-5275	40–65	EV marķieris
Kalneksīns	1:1000	Truša	ab22595	67–90	Endoplazmatiskā tīkla marķieris; nevajadzētu būt EVs/minimāli
ALIX	1:1000	Peles	Sc-166952	96	EV marķieris
TSG101	1:1000	Truša	ab125011	46	EV marķieris
PSMA	1:500	Peles	Sc-59674	100+180	Prostatas specifiskais marķieris

### 2.2.9. Urīna paraugu apstrāde

No šūnām brīvi (centrifugēti 15 min pie 2000 x g, +4°C), sasaldēti (–80°C) urīna paraugi tika atkausēti uzsildītā (+37°C) ūdens vannā. Tad urīns tika iepildīts ultracentrifūgas stobriņos un centrifugēts 15 min pie 10 000 x g, +4°C temperatūrā, lai atbrīvotos no uromodulīna. Tika savākts supernatants un Amicon Ultra–15 100 kDa ultrafiltrācijas stobrā pie 3000 x g, +4°C iekoncentrēts 15 reizes (piemēram, no 15 mL urīna līdz 1 mL). Koncentrētais urīns no ultrafiltrācijas stobriņa tika pārnesti 2 mL *Protein Low-bind* stobriņos un uzglabāti +4°C temperatūrā līdz izmantošanas brīdim tajā pašā dienā.

### 2.2.10. EV-noplicināta urīna iegūšana

Nesaldēts, svaigs urīns tika centrifugēts 15 min pie 2000 x g, +4°C temperatūrā, lai atbrīvotos no šūnām. Supernatants tika pārnesti ultracentrifūgas stobriņos un centrifugēts 15 min pie 10 000 x g, +4°C temperatūrā, lai atbrīvotos no uromodulīna. Iegūtais supernatants tika izfiltrēti caur Amicon Ultra–15 100 kDa centrifūgas filtru pie 3000 x g, +4°C temperatūrā, kā to aprakstīja Kornilov R. et al. (2018). Pēc tam EV-noplicinātais urīns tika alikvotēti 15 mL stobriņos un uzglabāti –80°C temperatūrā. EV noplicināšanas efektivitāte tika raksturota, veicot nanodaļiņu izsekošanas analīzi.

### 2.2.11. Nanodaļiņu izsekošanas analīze

Ar nanodaļiņu izsekošanas analīzi (NTA) var noteikt individuālu nanodaļiņu izmērus un to koncentrāciju šķīdumā, izmantojot sakarību starp daļiņas hidrodinamisko diametru un tādiem parametriem kā Brauna kustības ātrums, vides temperatūra un vides viskozitāte. Daļiņu suspensiju ievada ierīces plūsmas kambarī, kuru caurstaro lāzera stars tādā leņķī, ka tikai daļiņu izkliedētā, bet ne tiešā lāzera gaisma nonāk mikroskopa objektīvā. Ierīces digitālā kamera uzņem video ar daļiņu izkliedētās gaismas punktiem, kas pārvietojas, reprezentējot Brauna kustību pašā paraugā. Mazākās daļiņas kustās ātrāk nekā lielākās daļiņas un daļiņu izmērus ierīces datorprogramma aprēķina automātiski, izmantojot Stoksa un Einšteina formulu. Programma aprēķina arī daļiņu koncentrāciju, jo ir zināms redzeslaukam atbilstošais parauga tilpums.

NTA veica, izmantojot *Nanosight instrument NS300* (Malvern, Lielbritānija) ar zaļu 532 nm lāzeru. Pirms darba ierīces kambari izskaloja ar filtrētu (20 nm) 15% etanolu un filtrētu (20 nm) DEPC-PBS. Pirms paraugu analīzes testēja ierīci ar 100 nm lateksa lodīšu standartiem pēc ražotāja protokola. EVs atšķaidīja ar PBS un veica mērījumus. Lodīšu standartam un katram paraugam uzņēma piecus 60 s video. Beigās testa paraugiem identiskos apstākļos nomērīja tukšu bufera paraugu, kas izmantots atšķaidījumu gatavošanai, lai pārlicinātos, ka atšķaidīšanas buferis pats nesatur būtisku daļiņu koncentrāciju un, nepieciešamības gadījumā, varētu to kompensēt. Uzņemtos video analizēja, izmantojot NTA 3.4 programmatūru, pie individuāli piemeklētas detekcijas pakāpes (*threshold*). Tukšajam paraugam, pret kuru veica salīdzinājumu, izmantoja šos pašus iestatījumus.

### 2.2.12. Proteīnu koncentrācijas noteikšana ar BCA metodi

Šim nolūkam izmantoja *Pierce BCA Protein Assay* reaģentu komplektu (Thermo Fisher Scientific, ASV). BCA metodes princips ir tāds, ka sārmainā vidē proteīnu peptīdsaišu klātbūtnē  $\text{Cu}^{2+}$  reducējas līdz  $\text{Cu}^{1+}$ , kas tālāk veido violetas krāsas kompleksu ar BCA reaģentu. Violetās krāsas attīstība ir proporcionāla proteīnu koncentrācijai paraugā un var tikt kvantitēta spektrofotometriski, mērot absorbciju pie 562 nm. Proteīnu absolūto koncentrāciju paraugā var noteikt, salīdzinot analizējamo paraugu absorbcijas lasījumus ar standartlīkni, kura konstruēta pēc zināmas koncentrācijas BSA atšķaidījumu sērijas absorbcijas datiem. Standartlīknes BCA testa reakcijas katru reizi jāveic paralēli analizējamo paraugu reakcijām.

Testa veikšanai gan BSA kontroles atšķaidījumu sērija (pēc ražotāja protokola), gan analizējamo bioparaugu atšķaidījumi tika gatavoti identiskā buferšķīdumā (1x RIPA). Analizējamie paraugi un BSA standartlīknes paraugi tika sapildīti 96 bedrīšu platē divos tehniskajos replikātos pa 25 μL un katrai parauga bedrītei tika pievienoti 200 μL BCA darba šķīduma (gatavo pēc ražotāja protokola, uz katru reakciju 200 μL BCA-A šķīdumam pievienojot 4 μL BCA-B šķīdumu). Plate tika inkubēta 30 min termokamerā +37°C temperatūrā. Pēc inkubācijas tika nolasīta šķīdumu absorbcija pie 562 nm viļņa garuma ar spektrofotometru UQuant (BioTek, ASV). Proteīnu koncentrāciju aprēķinam tika konstruēta standartlīkne no BSA standartšķīdumu sērijas absorbcijas mērījumu vērtībām, pret kuru salīdzināti mērāmie paraugi (Microsoft Excel).

### 2.2.13. RNS izdalīšana

RNS izdalīšana veikta izmantojot miRNeasy Micro Kit reaģentu un materiālu komplektu (Qiagen, ASV) pēc ražotāja instrukcijām.

Mikrocentrifūgas stobriņā katram EV paraugam tika pievienoti 700 μL QIAzol līzes reaģenta, stobriņš savorteksēts un inkubēts 5 min istabas temperatūrā. Katram paraugam tika pievienoti 2 μL UniSp6 RNS kontroles 1:20 atšķaidījumā, stobriņš tika īsi savorteksēts un tajā pievienoja 140 μL hloroforma. Stobriņi tika 15 sekundes kratīti un inkubēti 3 min istabas temperatūrā, tad centrifugēti 15 min pie 12 000 x g, +4°C temperatūrā. Pēc tam augšējais ūdens slānis tika pārnests jaunā mikrocentrifūgas stobriņā un tam tika nomērīts tilpums. Tālāk tika pievienoti 1,55 tilpumi 97% etanola, maisījums viegli sapipetēts un nekavējoties 700 μL no tā uznesti uz *MinElute spin* kolonnas. *MinElute* kolonna 15 sekundes tika centrifugēta pie 1000 x g, istabas temperatūrā. Tika aizvākts caurplūdušais šķidrums un kolonna uzpildīta atkārtoti, līdz viss paraugs tika uzlādēts. Tad kolonnā tika ienesti 700 μL RWT buferšķīduma un 15 sekundes tā tika centrifugēta pie 8000 x g istabas temperatūrā, lai noskalotu membrānu. Tika aizvākts caurplūdušais šķidrums un pievienoti 500 μL RPE buferšķīduma, atkal 15 sekundes tika veikta centrifugēšana pie 8000 x g, lai noskalotu membrānu. Pēc caurplūdušā šķīduma aizvākšanas kolonnai tika pievienoti 500 μL 80% etanola, tā 2 min tika centrifugēta pie 8000 x g. Tika aizvākts caurplūdušais šķidrums. Kolonna tika pārnesta jaunā stobriņā un ar atvērtā veidā centrifugētā pie maksimālā ātruma 5 min, lai nožāvētu membrānu. Kolonnu pārnesa 1,5 mL *Non-Stick* stobriņā un uz tās membrānas uzlādēja 14 μL RNāžu brīva ūdens. Pēc 1 min centrifugēšanas maksimālajā ātrumā RNS eluāts tika pārnests jaunā *Non-Stick* stobriņā uz ledus bloka. Ja paraugs netika uzreiz izmantots, tad to sasaldēja (-80°C temperatūrā).

#### 2.2.14. kDNS sintēze

Komplementārās DNS (kDNS) sintēzei izmantoja izdalīto RNS vai arī tiešā veidā termiski šokētus EVs paraugus bez RNS izdalīšanas. No RNS ar reversās transkripcijas palīdzību tika iegūta kDNS, ko tālāk izmantoja digitālās pilienu polimerāzes ķēdes reakcijā (ddPCR).

kDNS sintēze tika veikta izmantojot miRCURY LNA RT komplektu (Qiagen, ASV) pēc ražotāja instrukcijām. Tika sagatavots reakcijas maisījums 0,2 mL PCR mikrostobriņos, uz katriem 10 µL izmantojot 7 µL RNS vai termiski šokētas EVs (paraugi bez RNS izolēšanas), 2 µL 5x miRCURY SYBR Green RT buferšķīdumu un 1 µL 10x miRCURY enzīmu maisījuma. Visos paraugos tika iekļauta arī definētas koncentrācijas pozitīvās kontroles RNS (UniSp6) atšķaidījumi. Tika veikta kDNS sintēze izmantojot PCR iekārtu pēc sekojošas programmas: +42°C 60 min, +95°C 5 min, +4°C ∞. kDNS tika uzreiz izmantota ddPCR vai iesaldēta -20°C temperatūrā uzglabāšanai līdz 5 nedēļām.

#### 2.2.15. Digitālā pilienu polimerāzes ķēdes reakcija

ddPCR ir digitāla PCR metode, kuras pamatā ir ūdens un eļļas emulsijas pilienu tehnoloģija. Paraugs tiek sadalīts līdz 20 000 pilieniem, kur katrā pilienā individuāli notiek mērķa sekvenču PCR amplifikācija. Pēc reakcijas katrs pilienš, atkarībā no mērķa sekvenču klātbūtnes, tiek detektēts kā pozitīvs vai nekatīvs un datu analīzes programma, izmantojot Puasona statistiku, spēj sarēķināt mērķa sekvenču kopiju koncentrāciju testētajā paraugā. Pateicoties absolūtai kvantifikācijai, atšķirībā no qPCR, nav nepieciešama papildus normalizācija.

Katras mērķa RNS detekcijai tika sagatavots atsevišķs PCR maisījums (*MasterMix*), kas uz katru vienu reakciju satur 10 µL 2x *QX200 ddPCR EvaGreen Supermix*, 5 µL nukleāžu brīvu ūdeni un 1 µL *miRCURY LNA miRNA* PCR praimerus (20x) + 20% no katras reakcijas komponentes tika ņemti rezervei. Katrai reakcijai 0,2 mL PCR mikrostobriņos tika apvienoti 17,6 µL *MasterMix* un 4,4 µL kDNS atšķaidījuma. Kārtridža turētājā tika ievietots DG8 kārtridžs un tā vidējās rindas bedrītēs iepildīja 20 µL sagatavotā PCR maisījuma no 0,2 mL mikrostobriņiem. Tālāk kārtridža apakšējā bedrīšu rindā tika iepildīti pa 70 µL eļļas (*Droplet Generation Oil for EvaGreen*), tam tika pārlikta pāri kārtridžam speciāli paredzēta gumija un kārtridžs ievietots *QX200 Droplet Generator* iekārtā pilienu ģenerēšanai. Pēc pilienu izveidošanās no kārtridža tika noņemta gumija un no augšējās bedrīšu līnijas savākti 40 µL katra parauga, un iepildīti 96 bedrīšu PCR platē.

Svarīgi ir darīt to lēnām un neļaujot rasties gaisa burbuļiem, kas var traumēt reakcijas pilienus. PCR plate tika noslēgta ar termoadhezīvu folijas loksni, izmantojot iekārtu termiskai plašu noslēgšanai.

Lai veiktu PCR, plate tika ievietota PCR iekārtā un palaista 10. tabulā redzamā amplifikācijas programma. Pēc PCR amplifikācijas beigām platei tika ļauts atdzist 15 min +4°C temperatūrā. Pēc *QX200 Droplet Reader* iekārtas ieslēgšanas, tā tika sagatavota mērījumiem programmā *Quanta Soft* (opcija *Prime*). Tad tika ievietota plate, norādīti tās iestatījumi un veikta pilienu nolasīšana, kuras dati tika analizēti *QuantaSoft Analysis Pro* programmā.

11. tabula.  
PCR amplifikācijas programma.  
Table 11  
PCR amplification programme.

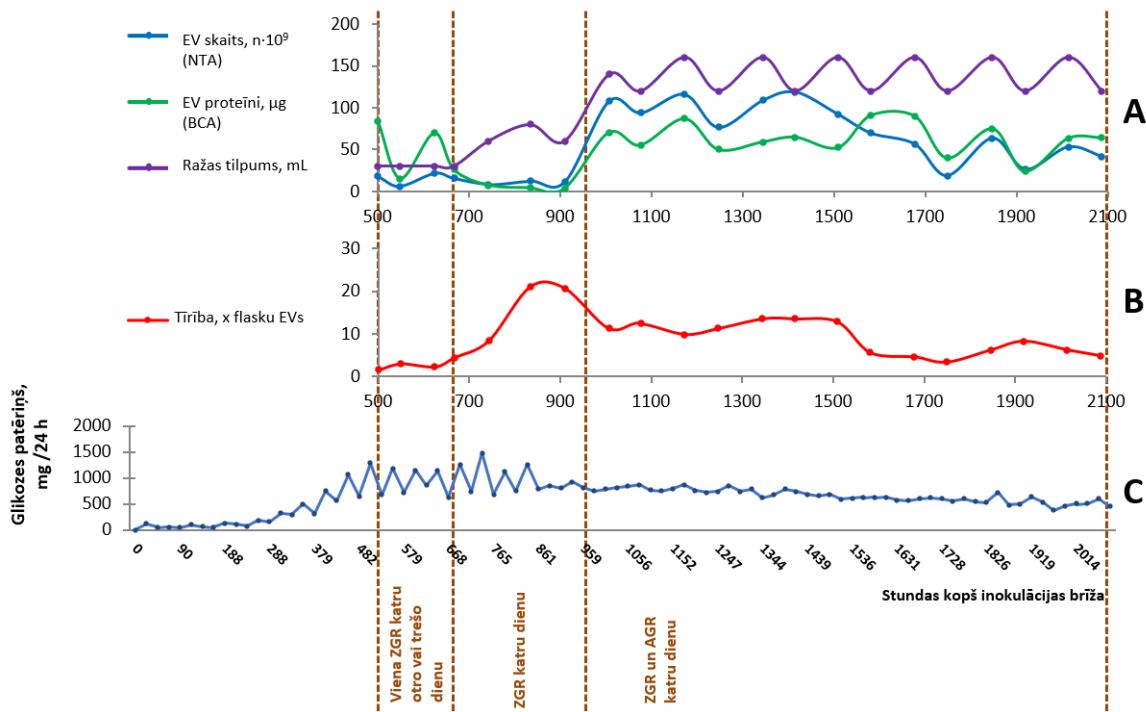
Solis	Temperatūra, °C	Laiks	Cikli (2°/s)
Enzīmu aktivizācija	95	5 min	1
Denaturācija	95	30 sec	40
Hibridizācija/Sintēze	58	1 min	40
Signāla stabilizācija	4	5 min	1
	90	5 min	1
Uzturēšana	4	∞	1

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. EV iegūšana no dobo šķiedru bioreaktora apstākļos kultivētām LNCaP šūnām

Bioreaktora EKT inokulācija tika veikta ar  $4,48 \cdot 10^8$  adherentos apstākļos pavairotām LNCaP šūnām un sākotnējā šūnu kultivēšana bioreaktorā tika veikta, saglabājot adherentajās kultūrās izmantoto barotnes sastāvu, taču papildinot to ar glikozi līdz  $\sim 4$  g/L gala koncentrācijai (RPMI ar 10% FBS, 2 mM L-glu, 1 mM nātrija piruvātu, 1x antibiotiku-antimikotiku kokteili, 2 g/L glikozi).

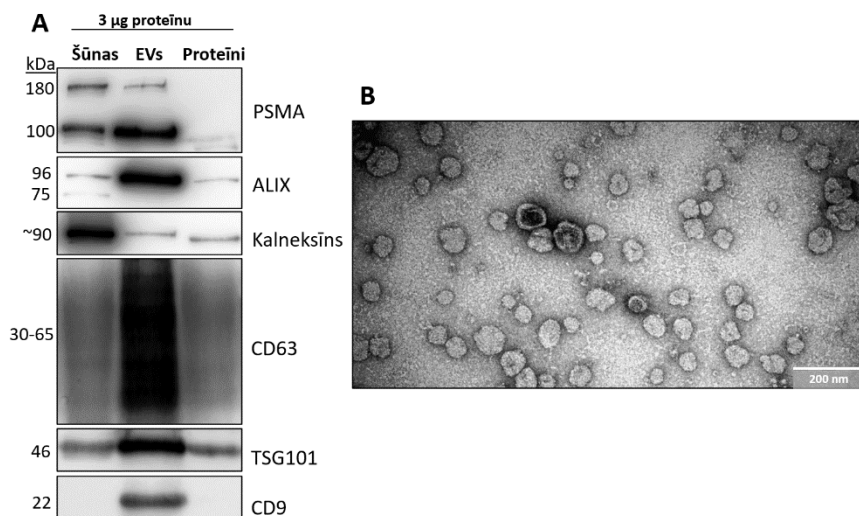
Balstoties uz glikozes patēriņa ātrumu (7.attēls), tika izdarīti lēmumi par cirkulējošās barotnes nomaiņas nepieciešamību, cirkulējošās barotnes tilpuma celšanu un, visbeidzot, pāriešanu uz bezseruma vidi. Lai nodrošinātu tālāku sekmīgu šūnu adaptāciju bezseruma apstākļiem, pirmās 11 dienas tika veikta pakāpeniska pāreja uz DMEM-F12 balstītu barotni ar identiskām piedevām. Glikozes patēriņam būtiski pieaugot ( $\geq 0,5$  g dienā), no 17. dienas tika aizsākta pakāpeniska pāreja no 10% FBS uz 10% CDM-HD, saglabājot nemainīgas pārējās barotnes komponentes. Optimāla EKT kolonizācija tika sasniegta 20. dienā kopš inokulācijas, par ko liecināja glikozes patēriņa pieaugums līdz  $\geq 1$  g dienā. No 22. līdz 29. dienai EKT barotnes ZGR ievākšana tika veikta ik pēc divām vai trim dienām. No 29. dienas tika veikta ZGR ievākšana katru dienu. Tā kā sākotnēji iegūtie EV daudzumi bija niecīgi (7.A.attēls), tika optimizēts ražas ievākšanas protokols un pēc 41. dienas katru dienu ievāca gan ZGR, gan AGR. Agresīvākā AGR protokola primārais mērķis parasti ir šūnu blīvuma kontrole bioreaktorā, taču, par cik LNCaP augšana blīvos mezglveida agregātos starp EKT šķiedrām padarīja tās rezistentas pret šūnu blīvuma kontroli (būtisks šūnu daudzums ar šo protokolu netika izskalots no EKT), pavērās iespēja īstenot šo protokolu katru dienu, kas ievērojami paaugstināja kopējo EV iznākumu (7.A.attēls). Lai glikozes patēriņš būtu stabilāks, saskaņā ar bioreaktora ražotāja pārstāvju ieteikumiem tika pieņemts lēmums no 36. dienas barotni mainīt katru dienu nevis katru otro dienu, kā līdz tam, taču samazinot cirkulējošās barotnes tilpumu uz pusi (no 1 L uz 0,5 L).



7.attēls. LNCaP kultūras glikozes patēriņa ātrums dobo šķiedru bioreaktorā, ražas ievākšanas intervāli; iegūto EV raksturlielumi. NTA – nanodaļiņu izsekošanas analīze; BCA – BCA tests.

Figure 7. Glucose consumption rate of LNCaP culture in a hollow fibre bioreactor, harvesting intervals; characteristics of obtained EVs. NTA, nanoparticle tracking analysis; BCA, BCA test.

EV izdalīšana tika veikta divas reizes nedēļā no vairākām apvienotām ražām, kuras līdz tam tika uzglabātas pie  $+4^{\circ}\text{C}$ . Visas izdalītās EVs tika raksturotas ar BCA testu un NTA, kā arī, izlases kārtā, ar TEM (8.B.attēls) un *Western blot* (PSMA, ALIX, kalneksīns, TSG101, CD63, CD9; 8.A.attēls). Kopumā no 66 dienu laikā ievāktām bioreaktora ražām ar SEC tika attīrītas  $1,14 \cdot 10^{12}$  EV daļiņas (NTA) ar kopējo EV proteīnu saturu 1096  $\mu\text{g}$  (BCA). Tika novērots būtisks EV proteīnu satura attiecības pret daļiņu skaitu (vidēji 0,96  $\mu\text{g}$  proteīnu uz  $10^9$  daļiņu) samazinājums (vidēji, 7,6 reizes) salīdzinājumā ar iepriekš mūsu laboratorijā iegūtajām LNCaP EVs flasku kultūru apstākļos (7,34  $\mu\text{g}$  proteīnu uz  $10^9$  daļiņu), norādot uz ievērojami paaugstinātu EV tīrību (7.B.attēls).

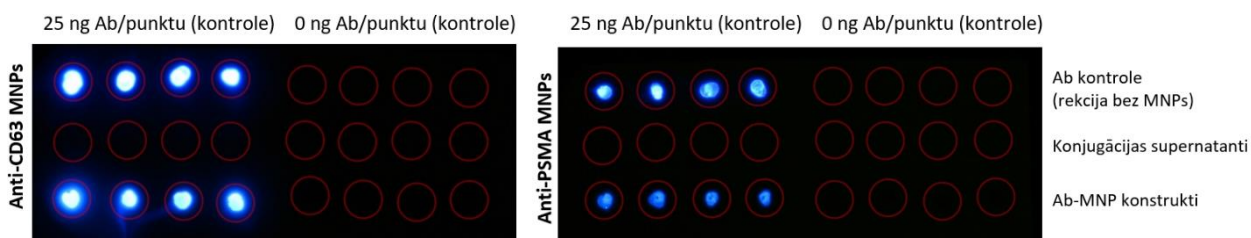


8.attēls. A – Dobo šķiedru bioreaktora LNCaP šūnu, EV un barotnē sekretēto proteīnu salīdzinājums *Western blot* analizē; B – LNCaP EV TEM fotouzņēmums. EVs – ekstracelulārās vezikulas.

Figure 8. A – Comparison of hollow fibre bioreactor LNCaP cells, EVs and EV proteins in Western blot analysis; B – TEM photo of LNCaP EVs. EV, extracellular vesicle.

### 3.2. Dažāda antivielu blīvuma MNP konjugātu efektivitātes salīdzinājums un imunoizolēšanas apstākļu optimizācija

Katra Ab-MNP konjugēšana tika apstiprināta ar *DotBlot* analīzi (9.attēls). Antivielu konjugācijas kontroles tika sagatavotas un uzglabātas tāpat kā konjugācijas reakcijas supernatanti, kas savākti pēc Ab-MNP konjugācijas, bet reakcijas maisījumā nepievienojot MNPs. Visos konjugācijas eksperimentos tika novērota pilnīga vai gandrīz pilnīga konjugēšanās efektivitāte – konjugācijas supernatanti neuzrāda būtisku konjugācijā izmantotās antivielas klātbūtni, turpretim, tā ir novērojama uz MNPs.



9.attēls. *DotBlot* analīze Ab-MNP-10 konjugācijas apstiprināšanai. Reprēzentatīvs attēls no viena konjugācijas eksperimenta. Ab – antiViela; MNP – magnētiskā nanodaļiņa.

Figure 9. DotBlot analysis to confirm Ab-MNP-10 conjugation. Representative picture from one conjugation experiment. Ab, antibody; MNP, magnetic nanoparticle.

Ab-MNP gala koncentrācijas tika raksturotas, nosakot dzelzs saturu MNP suspensijā. Tāpat šie dati parādīja, ka konjugācijas protokola gaitā vidēji tiek pazaudēti ap 25% no sākotnēji reakcijā izmantotajām MNPs un lielākie zudumi notiek MNP skalošanas un aktivēšanas laikā pirms pašas konjugācijas reakcijas. Katram konjugācijas iznākumam arī tika aprēķināts tai specifiskais vidējais IgG molekulu skaits pret MNP daļiņu skaitu, kas starp reakcijām būtiski neatšķīrās. Reprezentatīvs viena konjugācijas eksperimenta raksturojums, kurā izmantoti 10 µg antivielas uz katru mg sākotnējo MNP, parādīts 12. tabulā. Salīdzināmi MNP procentuālie iznākumi iegūti arī atkārtotos konjugācijas eksperimentos.

12. tabula.

Ab-MNP iznākuma raksturojums. Reprezentatīvi dati no viena konjugācijas eksperimenta.

Table 12

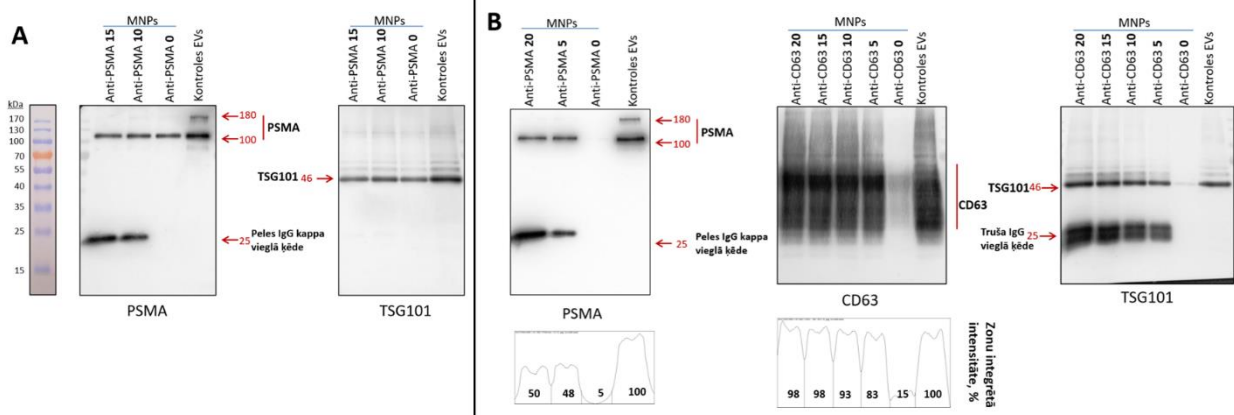
Ab-MNP outcome characteristics. Representative data from one conjugation experiment.

Paraugs	MNPs, mg/mL	IgG/aktivētās MNPs (molekulas pret daļiņu skaitu)	Kopējais tilpums, mL	Kopējās MNPs, mg	Iznākums, % no sākotnējām MNPs
Aktivētās MNPs (izmantotas konjugācijas reakcijā)	4,288	-	-	-	<b>85,8</b>
PSMA-10 MNPs	3,793	212,8	5	18,96	<b>75,9</b>
CD63-10 MNPs	3,810	212,8	2	7,62	<b>76,2</b>
P/C-0 MNPs	3,726	0	3	11,18	<b>74,5</b>

Lai noskaidrotu kāda ir optimālā antivielu un MNP attiecība efektīvai EV izolēšanai, tika testēti Ab-MNP konstrukti ar atšķirīgiem piesaistīto antivielu blīvumiem uz virsmas – sākot no 5 līdz 20 µg antivielas uz katru mg MNP, paralēli iekļaujot arī identiski konstruētu antivielu nesaturošu kontroles konstruktu (10.A., B. attēls). Visu konstruktu sākotnējai testēšanai tika izmantotas PSMA pozitīvas bioreaktora apstākļos iegūtās LNCaP EVs 1:10 attiecībā pret izmantoto MNP daļiņu skaitu. Pirmais imunoizolēšanas tests ar Anti-PSMA konstruktiem parādīja augstu nespecifisku reakciju starp EVs un antivielu nesaturošo MNP konstruktu (Anti-PSMA-0) (10.A.attēls). Tālākos eksperimentos tika optimizēti reakcijas apstākļi, reakcijas un skalošanas vidi (PBS) papildinot ar bloķēšanas aģentu – BSA (0,1%) un deterģentu – Tween-20 (0,01%), kas samazināja nespecifisko reakciju līdz nebūtiskam līmenim (10.B.attēls).

Salīdzinot Ab-MNP variantus, tika novērots ļoti minimāls EV piesaistes efektivitātes uzlabojums virs 10 µg Ab/1 mg MNP proporcijas, tāpēc šis variants tika izvēlēts izmantošanai

tālākajos eksperimentos (10.B.attēls). WB specifisko zonu integrētā intensitāte tika analizēta ar ImageJ programmu.

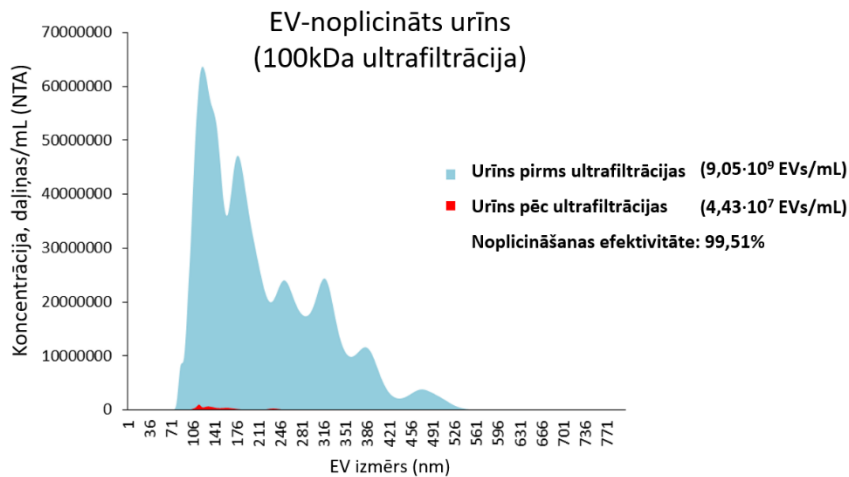


10.attēls. LNCaP EV imunoizolēšanas eksperimentu *Western blot* analīzes. A – PSMA-10 MNP izolētās LNCaP EVs; dažādu Ab/MNP proporciju konstruktu efektivitātes salīdzinājums pirms reakcijas apstākļu optimizēšanas; B – PSMA-10 un CD63-10 MNP izolētās LNCaP EVs, dažādu Ab/MNP proporciju konstruktu efektivitātes salīdzinājums pēc reakcijas apstākļu optimizēšanas. EV – ekstracelulārā vezikula; MNPs – magnētiskās nanodaļiņas.

Figure 10. Western blot analysis of LNCaP EV immunoprecipitation experiments. A – LNCaP EVs isolated with PSMA-10 MNPs; comparison of the efficiency of different Ab/MNP ratio constructs before optimization of reaction conditions; B – LNCaP EVs isolated with PSMA-10 and CD63-10 MNPs; comparison of the efficiency of different Ab/MNP ratio constructs after optimization of reaction conditions. EV, extracellular vesicle; MNPs, magnetic nanoparticles.

### 3.3. EV-noplicināta urīna iegūšana un raksturošana

Ar NTA tika veikta 100kDa ultrafiltrēta urīna EV-noplicināšanas efektivitātes pārbaude, kā kontroli izmantojot to pašu urīna paraugu pirms ultrafiltrācijas. Teju visas urīnā esošās EVs (99,51%) ar ultrafiltrācijas metodi tika aizvāktas (11.attēls).

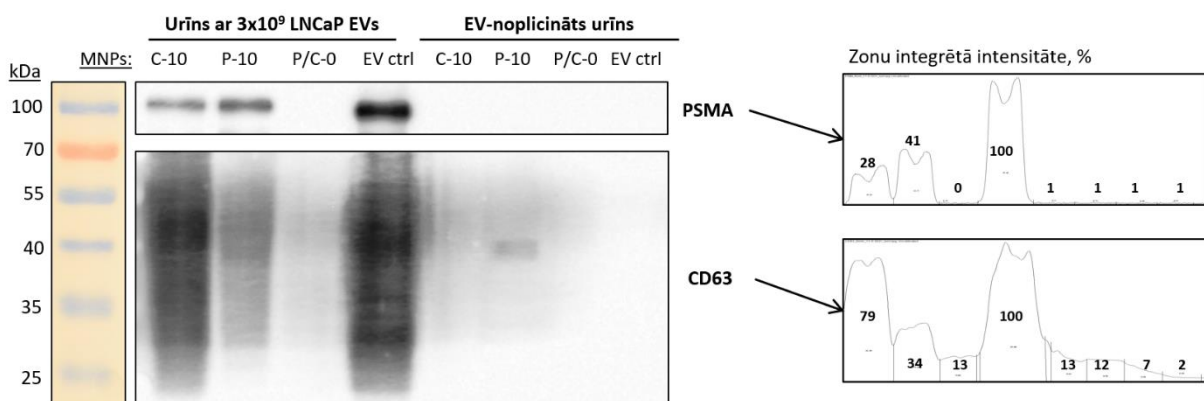


11.attēls. Daļiņu koncentrācijas raksturošana (NTA) urīnā pirms un pēc 100kDa ultrafiltrācijas. EVs – ekstracelulārās vezikulas; NTA – nanodaļiņu izsekošanas analīze.

Figure 11. Particle concentration characterisation (PCC) in urine before and after 100 kDa ultrafiltration. EVs, extracellular vesicles; NTA, nanoparticle tracking analysis.

### 3.4. Konjugēto MNP efektivitāte un specifiskums

Lai pārbaudītu, kā Ab-MNP konstrukti spēj piesaistīt EVs no kompleksa bioloģiska šķidruma – urīna, kā arī raksturotu šīs reakcijas specifiskumu un katra konstrukta efektivitāti, imunoizolēšanas reakcija tika veikta ar EV-noplicinātu urīnu, kas papildināts ar definētu LNCaP EV koncentrāciju. Pie 0,5 mL EV-noplicināta urīna parauga tika pievienotas  $6 \cdot 10^9$  LNCaP bioreaktora EVs (kontrolēi tika izmantots no EV-noplicināts urīns bez LNCaP EVs) un inkubētas pa nakti 1 mL kopējā reakcijas tilpumā ar 0,25 mg MNP (CD63-10, PSMA-10, P/C-0 varianti). Reakcija tika veikta 0,2% BSA un 0,02% Tween-20 klātbūtnē un MNP skalošanai (3x pa 5 min) izmantots PBS ar šīm pašām piedevām. Pēc mazgāšanas katru paraugu resuspendēja PBS un sadalīja divās vienādās daļās, kurām uz magnēta tika atdalīts un aizvākts supernatants; vienu no variantiem tālāk lizēja ar 10  $\mu$ L reducējošu Laemmli (ar BME, iezīmēšanai ar anti-PSMA), otru – ar 10  $\mu$ L nereducējošu Laemmli (bez BME, iezīmēšanai ar anti-CD63). No tās pašas LNCaP EV kopas tika sagatavoti atbilstoši  $3 \cdot 10^9$  EVs saturoši kontroles lizāti 10  $\mu$ L tilpumos ar katru no Laemmli variantiem. Tika veikta *Western blot* analīze, uz katru gēla joslu ņemot 100% no katra lizāta parauga, kam atbilst  $3 \cdot 10^9$  sākotnēji reakcijā pievienoto EVs. Rezultāti parādīja, ka CD63-MNPs un PSMA-MNPs spēj piesaistīt LNCaP EVs urīna vidē, CD63-MNP gadījumā ar augstāku efektivitāti. CD63 iezīmētā membrānā tika novērota neliela nespecifika EV-noplicināta urīna joslās (12. attēls).



12.attēls. Ab-MNP konstruktu specifiskuma un efektivitātes raksturojums ar LNCaP EVs papildinātā EV-noplicinātā urīnā. EVs – ekstracelulārās vezikulas; MNPs – magnētiskās nanodaļiņas; C-10 – CD63-10 MNP konstrukts; P-10 – PSMA-10 MNP konstrukts; P/C-0 – PSMA/CD63-0 konstrukts

Figure 12. Characterisation of the specificity and efficacy of Ab-MNP constructs in EV-depleted urine supplemented with LNCaP EVs. EVs, extracellular vesicles; MNPs, magnetic nanoparticles; C-10, CD63-10 MNP construct; P-10, PSMA-10 MNP construct; P/C-0, PSMA/CD63-0 construct.

### 3.5. Darbplūsmas optimizācija EV ietverto RNS kvantitēšanai: RNS izdalīšanas soļa nepieciešamības izvērtējums

Lai izvērtētu RNS izdalīšanas soļa nepieciešamību, tika salīdzināti divi darbplūsmas varianti Ab-MNP izolēto EV ietverto RNS kvantitēšanai ar ddPCR metodi. Īsumā, tika veikta imunoizolēšanas reakcija starp  $6 \cdot 10^{10}$  PSMA-10 MNP daļiņām un  $6 \cdot 10^9$  LNCaP EVs 1 mL reakcijas tilpumā. Pēc reakcijas konstrukti tika resuspendēti 150  $\mu$ L auksta DEPC-PBS un dalīti divās daļās: (A) 100  $\mu$ L suspensija tika lizēta 700  $\mu$ L QIAzol līzes šķīdumā, lizātu papildinot ar 2  $\mu$ L 1:20 UniSp6 atšķaidījuma; tālāk tika izdalīta RNS (Qiagen miRNeasy micro) un eluēta 14  $\mu$ L nukleāžu brīvā ūdenī; (B) 50  $\mu$ L suspensijas supernatants tika aizvākts uz mangēta un MNP nogulsne resuspendēta 7  $\mu$ L 1:140 UniSp6 atšķaidījuma nukleāžu brīvā ūdenī un nokarsēta 5 min pie +95°C, pēc kā supernatants tika savākts, atdalot MNPs ar magnēta palīdzību. No katra parauga varianta 7  $\mu$ L tika izmantoti 10  $\mu$ L kDNS sintēzes reakcijā. Visas kDNS tika atšķaidītas 1:2 un nestas pa 4  $\mu$ L katrā ddPCR reakcijā ar praimeriem pret UniSp6 vai miR-375.

Tika novērots, ka variantā bez RNS izolēšanas vidējā miR-375 koncentrācija ir augstāka nekā variantā ar RNS izolēšanu (13. tabula).

RNS satura detekcijas salīdzinājums ar un bez RNS izolēšanas no EVs, izmantojot ddPCR.

Table 13.

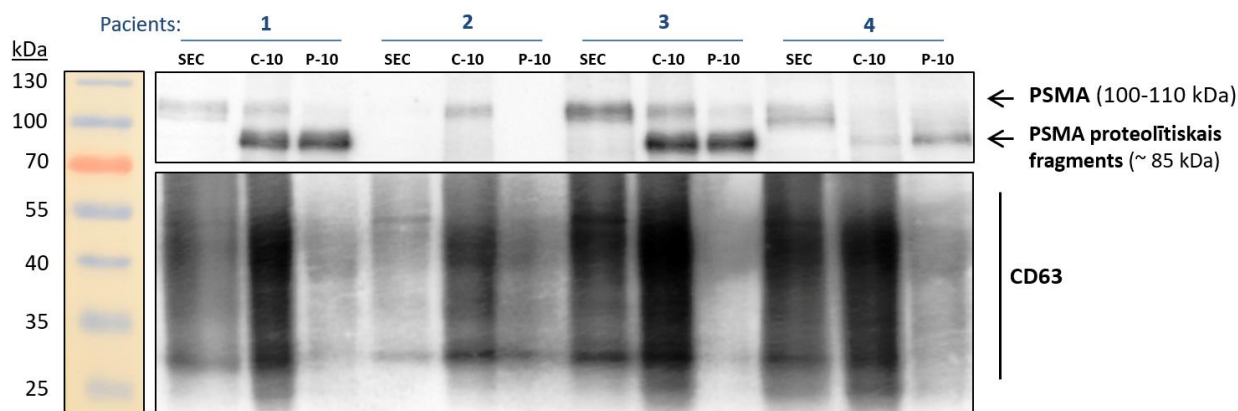
Comparison of RNA detection with and without RNA isolation from EVs using ddPCR.

PSMA-10 MNP	Mērķa RNS	Koncentrācija (kopijas/ $\mu$ L)	Vidējā konc. (kopijas/ $\mu$ L)
Bez RNS izolēšanas	UniSp6	Pārlādēts	Pārlādēts
	UniSp6	Pārlādēts	
	miR-375	16,8	16,0
	miR-375	15,2	
Ar RNS izolēšanu	UniSp6	3277,0	3311,8
	UniSp6	3346,5	
	miR-375	10,1	10,3
	miR-375	10,5	

### 3.6. Imunoizolēšanas un SEC efektivitātes salīdzinājums PV pacientu urīna paraugos

PV pacientu urīna paraugu koncentrāti tika iegūti kā tas aprakstīts metodēs (šajā gadījumā tika iekoncentrēti 30 mL urīna līdz 2 mL. No katra pacienta urīna koncentrāta 1 mL tika frakcionēts, izmantojot SEC, tālāk apvienotas EVs saturošās frakcijas un iekoncentrētas līdz 32  $\mu$ L. *Western blot* analīzei priekš katras joslas ar Laemmlī (reducējošais variants iezīmēšanai ar anti-PSMA; nereducējošais variants iezīmēšanai ar anti-CD63) tika nolizēti 25% no šī tilpuma, kas atbilst imunoizolēšanas paraugam pēc sākotnējā reakcijā izmantotā urīna tilpuma. Atlikušās EVs tika raksturotas ar NTA un BCA testu. Atlikušais urīna koncentrāts tika izmantots EV imunoizolēšanas reakcijām – pie 250  $\mu$ g CD63-10 un PSMA-10 MNPs tika pievienots pa 500  $\mu$ L urīna koncentrāta tilpuma. Reakcija tika veikta 0,2% BSA un 0,02% Tween-20 klātbūtnē, 1 mL reakcijas tilpumā un MNP skalošanai (3x pa 5 min) izmantots PBS ar šīm pašām piedevām. Pēc mazgāšanas katru paraugu resuspendēja PBS un sadalīja divās vienādās daļās, kurām uz magnēta tika atdalīts un aizvākts supernatants; vienu no variantiem tālāk lizēja ar 10  $\mu$ L reducējošu Laemmlī, otru – ar 10  $\mu$ L nereducējošu Laemmlī. Tika veikta *Western blot* analīze, uz katru gēla joslu ņemot visu lizāta tilpumu (10  $\mu$ L).

Rezultāti liecināja, ka CD63 un PSMA saturošās EV subpopulācijas efektīvāk tiek izolētas ar uz tām mērķētām Ab-MNP nekā ar SEC metodi (13.attēls). PSMA zonas, ieskaitot tā proteolītisko fragmentu, ar PSMA-10 MNP konstruktū izolētā EV paraugā bija izteiktākas salīdzinot ar SEC paraugu. Tāda pati aina redzama, salīdzinot CD63 līmeni ar CD63-10 MNPs un ar SEC izolētās EVs.



13.attēls. EV imunoizolēšanas un SEC efektivitāšu salīdzinājums PV pacientu urīna paraugos. SEC – izmēru izslēgšanas hromatogrāfija; C-10 – CD63-10 MNP konstrukts; P-10 – PSMA-10 MNP konstrukts.

Figure 9. Comparison of EV immunoprecipitation and SEC efficiencies in urine samples from PCa patients. SEC, size exclusion chromatography; C-10, CD63-10 MNP construct; P-10, PSMA-10 MNP construct.

### 3.7. RNS marķieru kvantitēšana imunoizolētās PV pacientu urīna EVs

PV pacientu urīna paraugu koncentrāts tika iegūts kā tas aprakstīts metodēs, taču šajā gadījumā imūnreakcijā tika izmantots 15x (pacientiem 1, 3 un 4) vai 10x (pacientam 2) urīna koncentrāts. Īsumā, 125 µg CD63-10 un PSMA-10 MNP konstruktu tika inkubēti ar katra urīna koncentrāta 250 µL tilpumu 0,5 mL reakcijas tilpumos un tālāk skaloti, kā tas darīts iepriekš. Pēc atmazgāšanas MNPs tika resuspendētas 50 µL DEPC–PBS. Pēc DEPC-PBS atsūkšanas uz magnēta, sausas MNPs tika resuspendētas 21 µL RiboLock RNāzes inhibitora 1:20 atšķaidījumā (1 U uz 1 µL) un tālāk pievienoti 2 µL UniSp6 1:400 atšķaidījuma. Paraugi tika 5 min karsēti +95°C temperatūrā, supernatants atdalīts ar magnēta palīdzību un paraugs izmantots kDNS sintēzei. Tālāk ar ddPCR šajās kDNS tika raksturota miR-375 koncentrācija un rezultāti parādīja (14.tabula), ka ar šīm MNPs var izolēt EVs no klīniskajiem paraugiem un tajās detektēt miR-375.

14.tabula.

miR-375 satura salīdzinājums no CD63 un PSMA imunoizolēto PV pacientu urīna EVs.

Table 14

Comparison of miR-375 content from CD63 and PSMA positive immunisolated Prostate Cancer patient urinary EVs.

Pacients	1				2				3				4			
EV marķieris	CD63		PSMA		CD63		PSMA		CD63		PSMA		CD63		PSMA	
Mērķa RNS	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375	Uni Sp6	miR -375
Vidējā konc. (kopijas/ $\mu$ L)	603,2	<b>34,6</b>	570,5	<b>4,3</b>	633,1	<b>11,3</b>	676,9	<b>2,9</b>	673,1	<b>57,9</b>	731,5	<b>1,8</b>	647,0	<b>3,2</b>	777,6	<b>0,9</b>

## 4. DISKUSIJA

### 4.1. EV producēšana bioreaktorā

Tika novērots, ka LNCaP šūnu kultūra dobo šķiedru bioreaktorā veidoja blīvus mezglveida saaugumus starp kapilāriem, kas bija noturīgi pēc AGR. Autori, kas savos darbos apraksta cilvēka embrionālo nieru šūnu HEK293 (Yoo K. et al., 2018), žultsvadu epitēlija karcinomas HuCCA-1 (Weeraphan C. et al., 2012) un cilvēka aknu vēža šūnu HepG2 (Wen Y. et al., 2011) kultūru izmantošanu dobo šķiedru bioreaktorā, nepiemin īpašus šūnu morfoloģijas novērojumus. Parasti tās aug vienmērīgi uz šķiedru virsmas. Līdzīgi mezglveida agregāti mūsu laboratorijā tika novēroti arī citām PV līnijām – VCaP (rezultāti autores kursa darbā, 2020) un PC3 (šobrīd notiekošs eksperiments, npublicēti rezultāti), taču abos gadījumos tie nebija tik blīvi un AGR veikšana ik reizi izskaloja no EKT ievērojamu šūnu masu. Parasti AGR protokols izskalo lielu daļu šūnu no EKT, tādā veidā kontrolējot šūnu daudzumu kārtreizē. Pateicoties šiem blīvajiem šūnu saaugumiem, radās iespēja veikt AGR protokolu katru dienu, kas netiek darīts audzējot citas šūnu līnijas šajā bioreaktorā. Šāda pieeja tika izvēlēta, jo sākotnēji izmantotais LGR protokols sniedza salīdzinoši zemu EV iznākumu, savukārt, papildinot to ar AGR, tika sasniegts daudzkārtīgs EV iznākuma pieaugums, kas redzams 7. attēlā.

Jāpiemin, ka tika novērots arī ļoti ievērojams EV daļiņu koncentrācijas pret proteīnu koncentrāciju attiecības pieaugums salīdzinājumā ar iepriekš mūsu laboratorijā sasniegtajiem rezultātiem flasku kultūrās (7.B.attēls), kas, saskaņā ar literatūru, liecina par augstāku EV tīrību (Webber J., Clayton A., 2013). Šie rezultāti norāda, ka EV producēšana bioreaktorā nodrošina kvalitatīvas EVs ar mazām to atšķirības variācijām, par cik visas kultivēšanas laikā EVs ir no vienām šūnām. Vēl jāatzīmē, ka bioreaktora gadījumā EVs tiek producētas fizioloģiskos šūnu kultūras apstākļos bez šūnu pakļaušanas stresam atšķirībā no EVs producēšanas flasku (kultivēšanas rutīnā tiek strauji izmainīta šūnu kultūras vide). *Western blot* analīzē salīdzinot bioreaktora LNCaP šūnu, EV un barotnē sekretēto proteīnu daudzumu (8.A.attēls), ir domājams, ka zemais kalneksīna līmenis EV frakcijā liecina, ka tās ir tīras no šūnu atliekām un apoptotiskajiem ķermeņiem (pateicoties zemajam šūnu stresa līmenim).

Neraugoties uz to, ka šajā darbā aprakstītā LNCaP bioreaktora kultūras dinamika, kā arī mūsu laboratorijas pieredze ar citu PV līniju kultivēšanu bioreaktora apstākļos, liecina, ka PV līniju stabilu bioreaktora kultūru iegūšana ir ilgstošāka un komplicētāka, nekā vairumam citu šūnu, pēc pilnīgas EKT kolonizācijas sasniegšanas ( $\geq 1$ g/dienā glikozes patēriņš) dobo šķiedru reaktors kļūst

par ilglaicīgu un stabilu augstas tīrības un koncentrācijas EV avotu, apmierinot turpmāko eksperimentu vajadzības pēc PV EV standartiem. Jāteic, ka nevar paredzēt identisku EV ražas dinamiku no visām šūnu kultūrām, jo kultivēšanas un ražas vākšanas apstākļus nākas tām pielāgot, kā tas bija LNCaP gadījumā ar cirkulējošās barotnes tilpumu un ražas ievākšanas protokolu. Mūsu laboratorijas pieredze rāda, ka pat trīs PV šūnu līniju starpā (VCaP, LNCaP, PC3) katras sekmīgai uzturēšanai nepieciešama individuāla pieeja.

## 4.2. Ar antivielām konjugēto MNP konstruktū raksturošana

Tā kā šī darba fokusā ir EV imunoizolēšanas princips, tad bija svarīgi veikt darba ietvaros konstruēto imunoizolēšanas reaģentu – Ab-MNP – padziļinātu raksturošanu ne vien, lai noteiktu to koncentrācijas un raksturotu MNP virsmas piesātinājumu ar antivielu, bet arī, lai atrastu optimālo antivielas piesātinājumu efektīvai EV piesaistei. Kā redzams 9.attēlā, darbā izmantotais Ab-MNP konjugēšanas protokols sasniedz ļoti augstu konjugācijas efektivitāti, jo pēc tā konstruētās MNPs ir pilnībā piesaistījušas visu reakcijas vidē pieejamo antivielu. Salīdzināms rezultāts tika sasniegts visos konjugācijas procesa atkārtojumos.

Šāda konjugācijas efektivitāte ir pateicoties pielāgotajam protokolam. Informācija par individuāli noteikto izmantoto antivielu izoelektrisko punktu ļāva pielāgot konjugācijas reakcijas vides pH. Tas nodrošināja jonisku mijiedarbību starp antivielām un MNPs pirms kovalentās konjugācijas, kā rezultātā antivielas piesaiste notiek funkcionālā *flat-on* orientācijā. Tas nozīmē, ka antivielas paratops nav tiešā veidā pret MNP virsmu un tiek prezentēts antigēna epitopa saistīšanai, tādējādi tiek sasniegta augstāka imunoizolēšanas efektivitāte (Montenegro J. et al., 2013). Gluži kā šajā konjugēšanas eksperimentā, arī citi pētnieki ir izmantojuši Sulfo-NHS konjugēšanas efektivitātes paaugstināšanai (Haghighi A. et al., 2020; Ivanova A. et al., 2021).

Konjugācijas procesa raksturošana parādīja, ka tā gaitā tiek zaudētas ap 25% no sākotnēji reakcijā izmantotajām MNPs. Par cik lielākie zudumi tika novēroti MNP skalošanas un aktivēšanas soļos pirms konjugācijas ar antivielu (13. tabula), tie ieviesa nelielas variācijas reālajā antivielu piesātinājumā uz MNP virsmas. Ņemot vērā teju pilnīgu konjugācijas efektivitāti, kā arī katrā individuālajā konjugācijas reakcijā ienesto aktivēto MNP reāli nomērīto koncentrāciju, tika aprēķināts arī aktuālais antivielu virsmas piesātinājums, kas starp konjugācijas atkārtojumiem variēja robežās no 193 līdz 212 IgG molekulām uz katru MNP (Ab-10 MNP varianti). Šāda variācija ir ļoti minimāla un, ņemot vērā sākotnējos dažāda IgG virsmas piesātinājuma MNP variantu testus, tai nevajadzētu būtiski ietekmēt ar antivielām konjugēto MNP efektivitāti.

Interesanti rezultāti tika iegūti salīdzinot EV marķieru līmeni pēc imunoizolēšanas pret EV kontroli (sākotnējam identisks, tīru EV daudzums), ar mērķi noteikt EV piesaistei optimālo IgG virsmas piesātinājumu uz MNP. Maksimālā CD63-MNP konstruktū EV izolēšanas efektivitāte bija 98%, kas ir ievērojami augsts rezultāts (10.B.attēls). Tomēr jāievēro, ka būtiskas atšķirības *Western blot* signālā starp MNP-10, -15, -20 variantiem netika parādītas, tādēļ nešķita racionāli izmantot vairāk antivielas, nekā nepieciešams un turpmākajos eksperimentos tika izmantoti Ab-MNP-10 konstrukti. Savukārt PSMA-MNP izolēšanas efektivitāte nebija tika augsta – ar augstākā IgG piesātinājuma MNP konstruktū (Anti-PSMA-20) tika sasniegta vien 50% efektivitāte, kas neatšķiras daudz no Anti-PSMA-5 rezultāta – 48%. Iespējams, ka iemesls šim varētu būt EV heterogenitāte pēc attiecīgajiem virsmas marķieriem; pieļaujams, ka ne visas LNCaP EVs ir ar augstu virsmas PSMA saturu. Kowal J. (2016) pētījumā no vienas dendrītisko šūnu barotnes ar diferenciālo centrifugēšanu tika izdalītas vairākas EV frakcijas un *Western blot* analīzēs bija redzama proteīnu (CD63, CD9, MHC II) daudzumu atšķirība frakciju starpā. Iespējams, ka arī PSMA ekspresētās EVs atšķiras pēc PSMA satura tajās, taču pēc šiem rezultātiem to nevar apgalvot.

### **4.3. Ar antivielām konjugēto MNP konstruktū veikspējas testēšana urīnā bioparaugos**

Tā kā Ab-MNPs konstruktus tālāk paredzēts izmantot EV izolēšanai no PV pacientu bioloģiskajiem šķidrumiem, šī darba ietvaros tika testēta to spēja izolēt EVs no urīna vides. Urīns tika izvēlēts, jo vairākos pētījumos ir pierādīts, ka tas satur PV biomarķierus – PV šūnas, specifiskus proteīnus (piem., PSMA, mucīns-1), cf-DNS, miRNS (Fujita K., Nonomura N., 2018; Dejous C., Krishnan U., 2021). Taču, lai veiktu Ab-MNP izolēšanas efektivitātes eksperimentu, bija nepieciešams iegūt urīnu, kas nesatur EVs. Visbiežāk EV-noplicinātu urīnu iegūst ar ultracentrifugācijas metodi, kas ir laikietilpīga. Kornilov R. (2018) tika izmantojis ultrafiltrācijas metodi, lai iegūtu EV-noplicinātu FBS, sasniedzot augstāku efektivitāti kā ar ultracentrifugācijas metodi. Veicot literatūras netika konstatēts, ka kāds šo metodi būtu izmantojis EV-noplicināta urīna iegūšanai. Kā redzams, šajā darbā iegūtie rezultāti saskan ar Kornilov R. aprakstīto attiecībā uz EV-noplicinātu FBS (11.attēls) un var secināt, ka šī varētu būt optimālākā metode EV-noplicināta urīna iegūšanai.

Ab-MNP testi EV-noplicinātā urīnā, kas papildināts ar definētu LNCaP EV daudzumu, parādīja, ka CD63-MNP izolēšanas efektivitāte no urīna vides ir nedaudz zemāka nekā sākotnējos

testos ar LNCaP EVs PBS buferšķīduma vidē – 79%, taču joprojām izolēšana var tikt uzskatīta par ļoti efektīvu (12.attēls). Nespecifiskie signāli EV-noplicinātā urīnā radušies EV proteīniem horizontāli difundējot gēlā. To varētu novērst, ja nākamajos eksperimentos tiktu ņemts mazāks EV daudzums kontroles paraugā, kā arī samazinot ņemto parauga tilpumu uz katru gēla bedrīti (ar augstāku urīna iekonzentrēšanas faktoru, kā arī ņemot mazāku tilpumu MNP saistīto EV lizātu). Savukārt PSMA-MNPs saistīja mazāk kā pusi no PSMA-pozitīvajām urīna EVs. Tika novērots arī sagaidāmais – CD63 saturs anti-PSMA-MNPs un PSMA signāls anti-CD63-MNP izolātos, jo EVs ir dubultpozitīvas pēc CD63 un PSMA (taču ne visos gadījumos). Pie tam šie rezultāti apliecina, ka izolētas tiek EVs, nevis brīvi proteīni. To, ka EVs savā starpā ir heterogēnas pēc abiem marķieriem, norāda tas, ka anti-CD63-MNPs izolē mazāk PSMA nekā anti-PSMA-MNPs, kā arī, ka anti-PSMA-MNPs izolē mazāk CD63 nekā anti-CD63-MNPs.

Salīdzinot Ab-10 MNP konstruktus ar Ab-0 MNP konstruktus, var spriest par to specifiku. Anti-PSMA MNPs uzrāda pilnīgu specifiskumu, bet anti-CD63 MNPs ne (12.attēls). Šāds rezultāts tika iegūts, jo PSMA/CD63-0 konstrukts uzrāda nespecifisku signālu, bet, kā tika minēts iepriekš, tas radies *Western blot* elektroforēzes laikā un nav saistīts ar Ab-MNP specifiskumu. Šis eksperiments ir jāatkārto, lai pilnībā pārlicinātos par CD63-10 MNPs specifiskumu.

Tālāk tika salīdzināta abu antivielu MNP konstruktus imunoizolēšanas efektivitāte ar SEC metodi PV pacientu urīna paraugos. Ar imunoizolēšanu teju visur *Western blot* analīzē tika sasniegts pārliecinoši augstāks imunoizolēšanas mērķa marķiera signāls nekā SEC paraugos (13.attēls), liecinot par šīs metodes priekšrocībām gan totālo EV (anti-CD63), gan mazāk izplatītu to subpopulāciju (anti-PSMA) izolēšanā un pacientu paraugiem. Īpašu uzmanību piesaistīja papildus zemākas molekulmasas (~85kDa) PSMA zona, kas šeit bija redzamas tikai ar Ab-MNP izolēto EV paraugiem, savukārt, iepriekš mūsu laboratorijā novērota arī LNCaP EV paraugos. Līdzšinējos eksperimentos mūsu laboratorijā PSMA *Western blot* analīzē pārsvarā tika novērotas literatūrā plašāk aprakstītās 100–110 kDa (glikozilēts PSMA) un ~180 kDa (PSMA dimērs) zonas. Līdzīgu par 100 kDa mazākas molekulmasas PSMA variantu novēroja Liu T. (2014), uzskatot to par proteolītisku PSMA fragmentu. PSMA 100-110 kDa molekulmasa tiek sasniegta pēc tā glikozilācijas, kas ir nepieciešama PSMA enzimatiskai aktivitātei. Par PSMA atbildīgā mRNS kodē 750 aminoskābes garu proteīnu, kura paredzamā molekulmasa ir 84 kDa (O'Keefe D. et al., 2018). Tā kā 13.attēlā redzamā vieglākā PSMA zona ir ļoti tuva šai molekulmasai, nevar tikt izslēgts, ka ir notikusi PSMA deglikozilācija.

#### 4.4. RNS biomarkieru analīze no PV pacientu urīna imunoizolētām EVs

Viens no sastopamākajiem miRNS PV biomarkieriem ir miR-375, kas PV pacientiem atrodams gan plazmā un urīnā, tai skaitā EV saturā, kas iegūtas no šiem šķidrumiem (Foj L. et al., 2017; Endzeliņš E. et al., 2017). Urīns var kalpot par parocīgu biomarkieru avotu, jo, atšķirībā no plazmas vai seruma, nesatur daudz proteīnu, kas samazina traucējumus iegūto RNS biomarkieru izolēšanā. Taču arī urīnam ir mīnusi, piemēram, nevar tikt konstatētas attālas PV metastāzes pēc prostatas audzēja ķirurģiskas izņemšanas, tādēļ tādos gadījumos plazma vai serums būtu informatīvāki biomarkieru avoti.

EVs saturošo RNS noteikšanai tika izmantota ddPCR metode, kas ir piemērota absolūtā interesējošās sekvenses kopiju skaita noteikšanai, līdz ar ko, atšķirībā no qPCR, nav nepieciešama papildus normalizācija. Vispirms tika pārbaudīts, vai ar imunoizolēšanu iegūtās EVs var tieša veidā izmantot kDNS sintēzē bez RNS izolēšanas soļa. Šāda pieeja izrādījās ne vien piemērota RNS satura analīzei, bet arī ievērojami paaugstināja detekcijas jutību, novēršot ar papildus RNS izdalīšanas soli saistītos RNS zudumus (13. tabula), līdz ar ko tika izmantota arī turpmākajā darba gaitā. Tika sagaidīts, ka urīnā CD63-pozitīvas EVs ir vairāk kā PSMA-pozitīvas EVs un tās saturēs miR-375, ko 14.tabulā redzamie rezultāti apstiprināja. Ar CD63-10 MNPs izolēto EV miR-375 koncentrācija bija diezgan variabla – no 3,2 līdz 57,9 kopijām/ $\mu$ L, vidējā vērtība 27 kopijas/ $\mu$ L. PSMA-10 MNP izolēto miR-375 koncentrācija bija mazāka – no 0,9 līdz 4,3 kopijām/ $\mu$ L, vidējā vērtība 2,5 kopijas/ $\mu$ L. Šis eksperiments parāda, ka ar uzkonstruētajām MNPs ir iespējams izolēt vēlamās EV subpopulācijas no PV klīniskajiem paraugiem un tajās detektēt PV asociētu miRNS biomarkieri.

Nākotnes eksperimentos būtu noderīgi veikt šīs un SEC metodes salīdzinājumu, lai noskaidrotu, vai un cik lielā mērā imunoizolēšana ir priekšrocīgāka miRNS biomarkieru izgūšanā. Šādus salīdzinošus eksperimentus varētu veikt arī ar PV pacientu plazmu, lai noskaidrotu, vai ar antivielām konjugētas MNPs ir spējīgas piesaistīt PV izcelsmes EVs plazmas vidē, un tālāk tikt izmantotas klīniski nozīmīgu PV miRNS biomarkieru analīzē. Īpaši noderīgi būtu noskaidrot, vai šāda EV imunoizolēšana un RNS biomarkieru satura analīze ir spējīga izšķirt PV un LPH gadījumus. Šī pētījuma nākotnē, papildus PSMA, tiek plānots izmantot arī citus PV marķierus MNP konjugēšanai – PSCA un STEAP (Saeki N. et al., 2010; Yamamoto T. et al., 2013). Kā iegūstamais produkts varētu būt MNP maisījums ar specifiku pret vairākiem prostatas marķieriem. Sagaidāms, ka tas būs gan universālāks, gan ar augstāku PV EV specifiku, jo ir maz ticams, ka

pilnīgi visos PV gadījumos PV EVs būtu ar augstu viena konkrēta marķiera saturu. Turklāt, arī mūsu laboratorijas dati ar PV šūnu līniju EVs liecina, ka ne visas PV vezikulas ir PSMA-pozitīvas.

Stuopelyte K. (2016) pētījumā tika salīdzināti PV asociētu miRNS līmeņi trīs grupās – PV pacientos, LPH pacientos un veselos pacientos. Salīdzinot pret LPH un veselu pacientu grupām, miR-148a un miR-375 daudzumi urīnā tika identificēti kā specifiski PV biomarķieri. Ja rezultāti parādītu, ka EV imunoizolēšanas metodes iegūtās miRNS ļauj ne tikai identificēt slimu cilvēku no pilnībā vesela, bet arī atšķirt LPH gadījumus no PV, tad šādi rezultāti ļautu izstrādāt precīzākus miRNS testus PV diagnosticēšanai. Šādu jautājumu varētu adresēt turpmākajos šī darba pētījuma projekta ietvaros.

## 5. SECINĀJUMI

1. Dobo šķiedru bioreaktors ļāva no LNCaP līnijas iegūt augstas tīrības un koncentrācijas PSMA-pozitīvas EVs lielā apjomā, kas nepieciešams ar antivielām konjugēto MNP konstruktū testēšanai;

2. Pateicoties pielāgotajam Ab-MNP konjugēšanas protokolam, tika sasniegta ļoti augsta antivielu un MNP konjugācijas efektivitāte. Antivielas ar MNPs tika konjugētas ļoti augstā efektivitātē;

3. Netika novērotas būtiskas atšķirības EV izolēšanas efektivitātē starp trīs augstākajiem IgG piesātinājumiem un MNP virsmas (Ab-MNP -10, -15, -20), tādēļ turamākajā darbā tika izmantots Ab-MNP-10;

4. Ar ultrafiltrācijas metodi ir iespējams iegūt augstas tīrības EV-noplicinātu urīnu;

5. CD63-MNPs un PSMA-MNPs spēj piesaistīt LNCaP EVs urīna vidē ar 79% (CD-63-MNP) un 41% (PSMA-MNP) efektivitāti;

6. Papildus RNS izdalīšanas soļa neiekļaušana EV RNS satura ddPCR raksturošanas darbplūsmā atļāva sasniegt augstāku detekcijas jutību;

7. CD63 un PSMA saturošās PV pacientu urīna EV subpopulācijas efektīvāk tiek izolētas ar uz tām mērķētām Ab-MNP nekā ar SEC metodi;

8. Ar CD63-MNPs un PSMA-MNPs var izolēt EVs no PV pacientu paraugiem un tajās detektēt miR-375.

## 6. PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību darba vadītājam Edgaram Endzeliņam par palīdzību metožu apmācībā, sniegtajiem ieteikumiem un padomiem bakalaura darba tapšanas laikā. Vēlos pateikties Dr. Aijai Linē par doto iespēju izstrādāt šo kursa darbu Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā. Izsaku pateicību Dr. Jurim Jansonam par TEM veikšanu, Guntai Resevičiai par palīdzību paraugu apstrādē ar ultracentrifugēšanu. Pateicos Dr. Jesus de la Fuente par konsultēšanu Ab-MNP konstruēšanas jautājumos, kā arī Anthony Rutt par padomiem šūnu kultivēšanas jautājumos dobo šķiedru bioreaktorā. Darbs tika izstrādāts “Prostatas vēža šūnu producētās ekstracelulārās vezikulas kā šķidrās biopsijas un terapijas mērķi” (Izp-2018/1-0269) ietvaros.

## 7. LITERATŪRAS SARAKSTS

### Raksti žurnālos

1. Aliotta J. M., Sanchez-Guijo F. M., Dooner G. J., Johnson K. W., Dooner M. S., Greer K. A., Greer D., Pimentel J., Kolankiewicz L. M., Puente N., Faradyan S., Ferland P., Bearer E. L., Passero M. A., Adedi M., Colvin G. A., & Quesenberry P. J. 2007. Alteration of Marrow Cell Gene Expression, Protein Production, and Engraftment into Lung by Lung-Derived Microvesicles: A Novel Mechanism for Phenotype Modulation. *STEM CELLS*, 25(9), 2245–2256.
2. An Y., Chang W., Wang W., Wu H., Pu K., Wu A., Qin Z., Tao Y., Yue Z., Wang P., & Wang Z. 2020. A novel tetrapeptide fluorescence sensor for early diagnosis of prostate cancer based on imaging Zn<sup>2+</sup> in healthy versus cancerous cells. *Journal of Advanced Research*, 24, 363–370.
3. Arroyo J. D., Chevillet J. R., Kroh E. M., Ruf I. K., Pritchard C. C., Gibson D. F., Mitchell P. S., Bennett C. F., Pogosova-Agadjanyan E. L., Stirewalt D. L., Tait J. F., & Tewari M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–5008.
4. Battistelli M., & Falcieri E. 2020. Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology* (Vol. 9, Issue 1, p. 21). MDPI AG.
5. Borges F. T., Reis L. A., & Schor N. 2013. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(10): 824–830.
6. Brouwers J. F., Aalberts M., Jansen J. W. A., van Niel G., Wauben M. H., Stout T. A. E., Helms J. B., & Stoorvogel W. 2013. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *PROTEOMICS*, 13(10–11), 1660–1666.
7. Carlsson S., Maschino A., Schröder F., Bangma C., Steyerberg E. W., Van Der Kwast T., Van Leenders G., Vickers A., Lilja H., & Roobol M. J. 2013. Predictive value of four kallikrein markers for pathologically insignificant compared with aggressive prostate cancer in radical prostatectomy specimens: Results from the European randomized study of screening for prostate cancer section Rotterdam. *European Urology*, 64(5), 693–699.
8. Caruso S., & Poon I. K. H. 2018. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris. *Frontiers in Immunology*, 9, 486.
9. Catalona W. J., Partin A. W., Sanda M. G., Wei J. T., Klee G. G., Bangma C. H., Slawin

K. M., Marks L. S., Loeb S., Broyles D. L., Shin S. S., Cruz A. B., Chan D. W., Sokoll L. J., Roberts W. L., Van Schaik R. H. N., & Mizrahi I. A. 2011. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *Journal of Urology*, 185(5), 1650–1655.

10. Catalona W. J., Partin A. W., Slawin K. M., Brawer M. K., Flanigan R. C., Patel A., Richie J. P., DeKernion J. B., Walsh P. C., Scardino P. T., Lange P. H., Subong E. N. P., Parson R. E., Gasior G. H., Loveland K. G., & Southwick P. C. 1998. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 279(19), 1542–1547.

11. Chairoungdua A., Smith D. L., Pochard P., Hull M., & Caplan M. J. 2010. Exosome release of  $\beta$ -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*, 190(6), 1079–1091.

12. Charras G. T., Yarrow J. C., Horton M. A., Mahadevan L., & Mitchison T. J. 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435(7040), 365–369.

13. Chen N., & Zhou Q. 2016. The evolving gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*. 28(1), 58–64.

14. Colombo M., Raposo G., & Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255–289.

15. Crawford E. D. 2003. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*, 62(6), 3–12.

16. Croft D. R., Coleman M. L., Li S., Robertson D., Sullivan T., Stewart C. L., & Olson M. F. 2005. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *Journal of Cell Biology*, 168(2), 245–255.

17. Datta K., Muders M., Zhang H., & Tindall D. J. 2010. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Future Oncology*, 6(5), 823–836.

18. Dejous C., & Krishnan U. M. 2021. Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 173, p. 112790). Elsevier Ltd.

19. Dijkstra S., Govers T. M., Hendriks R. J., Schalken J. A., Van Criekinge W., Van Neste L., Grutters J. P. C., Sedelaar J. P. M., & van Oort I. M. 2017. Cost-effectiveness of a new urinary

biomarker-based risk score compared to standard of care in prostate cancer diagnostics – a decision analytical model. *BJU International*, 120(5), 659–665.

20. Dörsam B., Reiners K. S., & von Strandmann E. P. 2018. Cancer-derived extracellular vesicles: Friend and foe of tumour immunosurveillance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1737).

21. Doyle L., & Wang M. 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727.

22. Endzelinš E., Berger A., Melne V., Bajo-Santos C., Sobolevska K., Abols A., Rodriguez M., Šantare D., Rudnickiha A., Lietuviētis V., Llorente A., & Line A. 2017. Detection of circulating miRNAs: Comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer*, 17(1).

23. Escrevente C., Keller S., Altevogt P., & Costa J. 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11(108).

24. Felder S., Miller K., Moehren G., Ullrich A., Schlessinger J., & Hopkins C. R. 1990. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*, 61(4), 623–634.

25. Février B., & Raposo G. 2004. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 415–421.

26. Foj L., Ferrer F., Serra M., Arévalo A., Gavagnach M., Giménez N., & Filella X. 2017. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate*, 77(6), 573–583.

27. Fradet Y., Saad F., Aprikian A., Dessureault J., Elhilali M., Trudel C., Mâsse B., Piché L., & Chypre C. 2004. UPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology*, 64(2), 311–315.

28. Fujita K., & Nonomura N. 2018. Urinary biomarkers of prostate cancer. *International Journal of Urology*, 25(9), 770–779.

29. Ganesh B., Saoba S. L., Sarade M. N., & Pinjari S. V. 2011. Risk factors for prostate cancer: An hospital-based case-control study from Mumbai, India. *Indian Journal of Urology*, 27(3), 345–350.

30. Genkinger J. M., Wu K., Wang M., Albanes D., Black A., van den Brandt P. A., Burke K. A., Cook M. B., Gapstur S. M., Giles G. G., Giovannucci E., Goodman G. G., Goodman P. J., Håkansson N., Key T. J., ..., Smith-Warner S. A. 2020. Measures of body fatness and height in

early and mid-to-late adulthood and prostate cancer: risk and mortality in The Pooling Project of Prospective Studies of Diet and Cancer. *Annals of Oncology*, 31(1), 103–114.

31. Gleason D. F. 1992. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human Pathology*, 23(3), 273–279.

32. Gobin J., Muradia G., Mehic J., Westwood C., Couvrette L., Stalker A., Bigelow S., Luebbert C. C., Bissonnette F. S. D., Johnston M. J. W., Sauvé S., Tam R. Y., Wang L., Rosu-Myles M., & Lavoie J. R. 2021. Hollow-fiber bioreactor production of extracellular vesicles from human bone marrow mesenchymal stromal cells yields nanovesicles that mirrors the immunomodulatory antigenic signature of the producer cell. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 127.

33. Gosselaar C., Roobol M. J., Roemeling S., & Schröder F. H. 2008. The Role of the Digital Rectal Examination in Subsequent Screening Visits in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC), Rotterdam. *European Urology*, 54(3), 581–588.

34. Grabuschnig S., Bronkhorst A. J., Holdenrieder S., Rodriguez I. R., Schliep K. P., Schwendenwein D., Ungerer V., & Sensen C. W. 2020. Putative origins of cell-free DNA in humans: A review of active and passive nucleic acid release mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–24.

35. Grange C., Tapparo M., Collino F., Vitillo L., Damasco C., Deregibus M. C., Tetta C., Bussolati B., & Camussi G. 2011. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Research*, 71(15), 5346–5356.

36. Guescini M., Genedani S., Stocchi V., & Agnati L. F. 2010. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission*, 117(1), 1–4.

37. Gurunathan S., Kang M.-H., Jeyaraj M., Qasim M., & Kim J.-H. 2019. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307.

38. Hamada T., Dubois J. L. N., Bellamy V., Pidial L., Hagège A., Pereira M. N., & Menasché P. 2020. In vitro controlled release of extracellular vesicles for cardiac repair from poly(glycerol sebacate) acrylate-based polymers. *Acta Biomaterialia*, 115, 92–103.

39. Hasan A., Linkon M., Labib M., Hasan T., Hossain M., E-Jannat M., Labib T., Hasan M., & Hossain M.-E.-J. 2021. Deep Learning in Prostate Cancer Diagnosis and Gleason Grading in Histopathology Images: An Extensive Study Deep Learning in Prostate Cancer Diagnosis and Gleason Grading in Histopathology Images: An Extensive Study. To appear in: *Informatics in*

Medicine Unlocked, 24.

40. Henne W. M., Buchkovich N. J., & Emr S. D. 2011. The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*, 21(1).

41. Henry G. H., Malewska A., Joseph D. B., Malladi V. S., Lee J., Torrealba J., Mauck R. J., Gahan J. C., Raj G. V., Roehrborn C. G., Hon G. C., MacConmara M. P., Reese J. C., Hutchinson R. C., Vezina C. M., & Strand D. W. 2018. A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Reports*, 25(12).

42. Huang X., Yuan T., Tschannen M., Sun Z., Jacob H., Du M., Liang M., Dittmar R. L., Liu Y., Liang M., Kohli M., Thibodeau S. N., Boardman L., & Wang L. 2013. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013, 14, 319.

43. Huggins C., & Hodges C. V. 1941. Studies on prostatic cancer i. the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research*, 1(4), 293–297.

44. Hugosson J., Carlsson S., Aus G., Bergdahl S., Khatami A., Lodding P., Stranne J., Hugosson J., Carlsson S., Aus G., Bergdahl S., Khatami A., Lodding P., Pihl C.-G., Stranne J., Holmberg E., & Lilja H. 2010. Mortality results from the Göteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncology*, 11, 725–732.

45. Humphrey P. A. ;, Moch H. ;, Cubilla A. L. ;, Ulbright T. M. ;, & Reuter V. E. 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, 70(1).

46. Inamura K. 2018. Prostatic cancers: Understanding their molecular pathology and the 2016 WHO classification. *Oncotarget*, 9(18), 14723–14737).

47. Juan T., & Fürthauer M. 2018. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 74, 66–77.

48. Kakarla R., Hur J., Kim Y. J., Kim J., & Chwae Y. J. 2020. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(1), 1–6.

49. Keller L., Belloum Y., Wikman H., & Pantel K. 2021. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *British Journal of Cancer*, 124(2), 345–358).

50. Kim C. W., Lee M., Lee H., Kang C., Kleinman H. K., & Gho Y. S. 2002. Extracellular Membrane Vesicles from Tumor Cells Promote Angiogenesis via Sphingomyelin 1. *Cancer Research*, 62, 6312–6317.

51. Knezevic D., Goddard A. D., Natraj N., Cherbavaz D. B., Clark-Langone K. M., Snable J.,

Watson D., Falzarano S. M., Magi-Galluzzi C., Klein E. A., & Quale C. 2013. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics*, 14(1), 690.

52. Kohaar I., Petrovics G., & Srivastava S. 2019. A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1813.

53. Konoshenko M. Y., Lekchnov E. A., Vlassov A. V., & Laktionov P. P. 2018. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, 2018. Hindawi Limited.

54. Kornilov R., Puhka M., Mannerström B., Hiidenmaa H., Peltoniemi H., Siljander P., Seppänen-Kaijansinkko R., & Kaur S. 2018. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1).

55. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J. P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), 968–977.

56. Kretschmer A., Tilki D. 2017. Biomarkers in prostate cancer – Current clinical utility and future perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120, 180–193.

57. Lee C. H., Akin-Olugbade O., & Kirschenbaum A. 2011. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 40, 565–575.

58. Liu T., Mendes D. E., & Berkman C. E. 2014. Functional prostate-specific membrane antigen is enriched in exosomes from prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 44(3), 918–922.

59. Mall C., Rocke D. M., Durbin-Johnson B., & Weiss R. H. 2013. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomarkers in Medicine*, 7(4), 623–631.

60. McNeal J. E. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35–49.

61. McNeal J. E. 1988. Normal Histology of the Prostate. *The American Journal of Surgical Pathology*, 12(8), 619–633.

62. Miller K. D., Siegel R. L., Lin C. C., Mariotto A. B., Kramer J. L., Rowland J. H., Stein K. D., Alteri R., & Jemal A. 2016. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271–289.

63. Minciacchi V. R., Freeman M. R., & Di Vizio D. 2015. Extracellular Vesicles in Cancer:

Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 40, 41–51.

64. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K. C., Allen A., Lin D. W., Urban N., Drescher C. W., Knudsen B. S., Stirewalt D. L., Gentleman R., Vessella R. L., Nelson P. S., Martin D. B., & Tewari M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–10518.

65. Morgan T. M., Lange P. H., & Vessella R. L. 2007. Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells. *Frontiers in Bioscience*, 12(8), 3000–3009.

66. Murphy D. E., de Jong O. G., Brouwer M., Wood M. J., Lavieu G., Schiffelers R. M., & Vader P. 2019. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(3), 1–12.

67. Nguyen-Nielsen M., & Borre M. 2016. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Seminars in Nuclear Medicine*, 46(6), 484-490.

68. O'Keefe D. S., Bacich D. J., Huang S. S., & Heston W. D. W. 2018. A perspective on the evolving story of PSMA biology, PSMA-based imaging, and endoradiotherapeutic strategies. *Journal of Nuclear Medicine*, 59(7), 1007–1013.

69. Okotie O. T., Roehl K. A., Han M., Loeb S., Gashti S. N., & Catalona W. J. 2007. Adult Urology Characteristics of Prostate Cancer Detected by Digital Rectal Examination Only. *Urology*, 70(6), 1117-20.

70. Otake A. H., de Freitas Saito R., Duarte A. P. M., Ramos A. F., & Chammas R. 2019. GD3 ganglioside-enriched extracellular vesicles stimulate melanocyte migration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(3), 422–432.

71. Partin A. W., Van Neste L., Klein E. A., Marks L. S., Gee J. R., Troyer D. A., Rieger-Christ K., Jones J. S., Magi-Galluzzi C., Mangold L. A., Trock B. J., Lance R. S., Bigley J. W., Van Criekinge W., & Epstein J. I. 2014. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *Journal of Urology*, 192(4), 1081–1087.

72. Pizzirani C., Ferrari D., Chiozzi P., Adinolfi E., Sandonà D., Savaglio E., & Di Virgilio F. 2007. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 $\beta$ -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*, 109(9), 3856–3864.

73. Platz E. A., Rimm E. B., Willett W. C., Kantoff P. W., & Giovannucci E. 2000. Racial Variation in Prostate Cancer Incidence and in Hormonal System Markers Among Male Health

Professionals. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(24).

74. Price C., & Chen J. 2014. MicroRNAs in cancer biology and therapy: Current status and perspectives. *Genes and Diseases*, 1(1), 53–63.

75. Pusic A. D., & Kraig R. P. 2014. Youth and environmental enrichment generate serum exosomes containing miR-219 that promote CNS myelination. *GLIA*, 62(2), 284–299.

76. Qazi K. R., Gehrman U., Jordö E. D., Karlsson M. C. I., & Gabrielsson S. 2009. Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B cell dependent mechanism. *Blood*, 113(12), 2673–2683.

77. Rodríguez M., Bajo-Santos C., Hessvik N. P., Lorenz S., Fromm B., Berge V., Sandvig K., Linē A., & Llorente A. 2017. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Molecular Cancer*, 16(1), 156.

78. Rosario D. J., Lane J. A., Metcalfe C., Donovan J. L., Doble A., Goodwin L., Davis M., Catto J. W. F., Avery K., Neal D. E., & Hamdy F. C. 2012. Short term outcomes of prostate biopsy in men tested for cancer by prostate specific antigen: Prospective evaluation within ProtecT study. *BMJ*, 344(7840).

79. Salinas C. A., Tsodikov A., Ishak-Howard M., & Cooney K. A. 2014. Prostate cancer in young men: An important clinical entity. *Nature Reviews Urology*, 11(6), 317–323.

80. Sardana G., & Diamandis E. P. 2009. The kallikrein family of proteins as urinary biomarkers for the detection of prostate cancer. *Clinical Biochemistry*, 42(13–14), 1483–1486.

81. Serefoglu E. C., Altinova S., Ugras N. S., Akincioglu E., Asil E., & Balbay M. D. 2013. How reliable is 12-core prostate biopsy procedure in the detection of prostate cancer? *Journal of the Canadian Urological Association*, 7(5–6).

82. Shen M. M., & Abate-Shen C. 2010. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes and Development*, 24(18), 1967–2000.

83. Shurtleff M. J., Temoche-Diaz M. M., & Schekman R. 2018. Extracellular Vesicles and Cancer: Caveat Lector. *Annual Review of Cancer Biology*, 2(1), 395–411.

84. Simard J., Dumont M., Soucy P., & Labrie F. 2002. Perspective: Prostate Cancer Susceptibility Genes. *Endocrinology*, 143(6), 2029–2040.

85. Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D. H., Gainche L., Curry W. T., Carter B. S., Krichevsky A. M., & Breakefield X. O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476.

86. Skriner K., Adolph K., Jungblut P. R., & Burmester G. R. 2006. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis & Rheumatism*, 54(12), 3809–3814.
87. Smith D. S., & Catalona W. J. 1995. Interexaminer variability of digital rectal examination in detecting prostate cancer. *Urology*, 45(1), 70–74.
88. Stattin P., Vickers A. J., Sjoberg D. D., Johansson R., Granfors T., Johansson M., Pettersson K., Scardino P. T., Hallmans G., & Lilja H. 2015. Improving the Specificity of Screening for Lethal Prostate Cancer Using Prostate-specific Antigen and a Panel of Kallikrein Markers: A Nested Case-Control Study. *European Urology*, 68(2), 207–213.
89. Storm M. P., Sorrell I., Shipley R., Regan S., Luetchford K. A., Sathish J., Webb S., & Ellis M. J. 2016. Hollow fiber bioreactors for In Vivo-like mammalian tissue culture. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(111), 53431.
90. Stuopelyte K., Daniunaite K., Bakavicius A., Lazutka J. R., Jankevicius F., & Jarmalaite S. 2016. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 115(6), 707–715.
91. Talcott J. A., Manola J., Clark J. A., Kaplan I., Beard C. J., Mitchell S. P., Chen R. C., O’Leary M. P., Kantoff P. W., & D’Amico A. V. 2003. Time course and predictors of symptoms after primary prostate cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 21(21), 3979–3986.
92. Tarasov V. V., Svistunov A. A., Chubarev V. N., Dostdar S. A., Sokolov A. V., Brzecka A., Sukocheva O., Neganova M. E., Klochkov S. G., Somasundaram S. G., Kirkland C. E., & Aliev G. 2021. Extracellular vesicles in cancer nanomedicine. *Seminars in Cancer Biology*, 69, 212–225.
93. Tewari A., Indudhara R., Shinohara K., Schallow E., Woods M., Lee R., Anderson C., & Narayan P. 1996. Comparison of Transrectal Ultrasound Prostatic Volume Estimation with Magnetic Resonance Imaging Volume Estimation and Surgical Specimen Weight in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia. *J Clin Ultrasound*, 24.
94. Thakur B. K., Zhang H., Becker A., Matei I., Huang Y., Costa-Silva B., Zheng Y., Hoshino A., Brazier H., Xiang J., Williams C., ..., Lyden D. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766–769.
95. Thalgott M., Rack B., Maurer T., Souvatzoglou M., Eiber M., Kreß V., Heck M. M., Andergassen U., Nawroth R., Gschwend J. E., & Retz M. 2013. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(5), 755–763.
96. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P.,

Brügger B., & Simons M. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247.

97. Truman L. A., Ford C. A., Pasikowska M., Pound J. D., Wilkinson S. J., Dumitriu I. E., Melville L., Melrose L. A., Ogden C. A., Nibbs R., Graham G., Combadiere C., & Gregory C. D. 2008. CX3CL 1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, 112(13), 5026–5036.

98. Turturici G., Tinnirello R., Sconzo G., & Geraci F. 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: Advantages and disadvantages. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 306(7), 621–633.

99. van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Fex Svenningsen Å., Honegger P., Knudsen L. E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M. L., & Gstraunthaler G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063.

100. van Niel G., phanie Charrin S., Simoes S., Romao M., Rochin L., Saftig P., Marks M. S., Rubinstein E., & Raposo G. 2011. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and-Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell* 21, 708–721.

101. Vittorelli M. L., Rigogliuso S., Donati C., Cassarà D., Taverna S., Salamone M., & Bruni P. 2010. An active form of sphingosine kinase-1 is released in the extracellular medium as component of membrane vesicles shed by two human tumor cell lines. *Journal of Oncology*, 2010.

102. Vu L. T., Peng B., Zhang D. X., Ma V., Mathey-Andrews C. A., Lam C. K., Kiomourtzis T., Jin J., McReynolds L., Huang L., Grimson A., Cho W. C., Lieberman J., & Le M. T. 2019. Tumor-secreted extracellular vesicles promote the activation of cancer-associated fibroblasts via the transfer of microRNA-125b. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1599680.

103. Wang G., Zhao D., Spring D. J., & Depinho R. A. 2018. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, 32, 1105–1140.

104. Wang T., Gilkes D. M., Takano N., Xiang L., Luo W., Bishop C. J., Chaturvedi P., Green J. J., & Semenza G. L. 2014. Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31).

105. Wang Z., Wu H. J., Fine D., Schmulen J., Hu Y., Godin B., Zhang J. X. J., & Liu X. 2013. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab on a Chip*, 13(15), 2879–2882.

106. Watson D. C., Yung B. C., Bergamaschi C., Chowdhury B., Bear J., Stellas D., Morales-Kastresana A., Jones J. C., Felber B. K., Chen X., & Pavlakis G. N. 2018. Scalable, cGMP-compatible purification of extracellular vesicles carrying bioactive human heterodimeric IL-15/lactadherin complexes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1).

107. Weir J. M., & Dunn J. E. 1970. Smoking and mortality: A prospective study. *Cancer*, 25(1), 105–112.

108. Winau F., Weber S., Sad S., De Diego J., Hoops S. L., Breiden B., Sandhoff K., Brinkmann V., Kaufmann S. H. E., & Schaible U. E. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*, 24(1), 105–117.

109. Witwer K. W., Buzás E. I., Bemis L. T., Bora A., Lässer C., Lötval J., Nolte-t Hoen E. N., Piper M. G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M. H., & Hochberg F. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 20360.

110. Xiao Y., Zhong J., Zhong B., Huang J., Jiang L., Jiang Y., Yuan J., Sun J., Dai L., Yang C., Li Z., Wang J., & Zhong T. 2020. Exosomes as potential sources of biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Letters*, 476, 13–22.

111. Yáñez-Mó M., Siljander P. R.-M., Andreu Z., Bedina Zavec A., Borràs F. E., Buzas E. I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., ... De Wever O. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066.

112. Zhao Y., Li X., Zhang W., Yu L., Wang Y., Deng Z., Liu M., Mo S., Wang R., Zhao J., Liu S., Hao Y., Wang X., Ji T., Zhang L., & Wang C. 2021. Trends in the biological functions and medical applications of extracellular vesicles and analogues. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.

#### Rakstu krājumi, monogrāfijas

1. Yan I.K., Shukla N., Borrelli D.A., Patel T. 2018. Use of a Hollow Fiber Bioreactor to Collect Extracellular Vesicles from Cells in Culture. – In: T.Patel (ed.), *Extracellular RNA*, New York, Humana Press: 35-41.

#### Interneta vietnes

1. American Cancer Society. 2019. Prostate Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8795.00.pdf>

2. Cadwell J. J. S. 2017. Production of Exosomes in a Hollow Fiber Bioreactor. <https://www.kdbio.com/wp-content/uploads/2017/11/FiberCell-Systems-Production-of-Exosomes-in-a-Hollow-Fiber-Bioreactor.pdf>
3. Globocan. 2021. Population Fact Sheets. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>
4. N. Mottet, P. Cornford, R.C.N. van den Bergh, E. Briers, ..., P-P.M. Willemse. 2021. Prostate Cancer Guidelines. <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/#5>
5. National Comprehensive Cancer Network. 2020. NCCN guidelines for patients: Advanced-Stage Prostate Cancer. <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/prostate-advanced-patient.pdf>
6. World Health Organization. 2018. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Bakalaura darbs „Jauna pieeja prostatas vēža cirkulējošu ekstracelulāro vezikulu selektīvai izolēšanai un to ietverto RNS biomarkieru analīze” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Sindija Šmite                      02.06.2021.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Msc.biol. Edgars Endzeliņš                      02.06.2021.

Recenzents:                      Dr.biol. Inese Čakstiņa

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 02.06.2021.

Lietvede: .....

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.                      , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: