

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Polümersoomide kasutamine epigeneetiliste ravimite vektorina inimese makrofaagides

Magistritöö (30 EAP)

Rait Vetik

Juhendajad PhD Pärt Peterson

PhD Tambet Teesalu

TARTU 2019

Polümersoomide kasutamine epigeneetiliste ravimite vektorina inimese makrofaagides

Epigeneetilised ravimid pakuvad lahendusi mitmete haiguste ravimiseks, kuid omavad tihti laialdasi kõrvalmõjusid. Polümeeridest koosnevad vesiikulid – polümersoomid – on stabiilsed, olenevalt koostisosadest ning modifikatsioonidest keskkonnareaktiivsed ning sihtmärgistatud osakesed. Polümersoomid omavad hüdrofiilset sisekeskkonda ning hüdrofoobset membraani, mis on võimelised talletama molekule ilma struktuurimuutusteta. Polümersoomid võivad pakkuda ravimi transpordivektorit muust keskkonnast eraldatud kujul nii hüdrofiilsetele kui hüdrofoobsetele ainetele. Polümersoomi kapseldatud ravim võib seega muuta epigeneetiliste ravimite manustamise, transpordi ja vabanemise sihtkohas täpsemaks ning seeläbi vähendada mittesoovitud seandumisi ning ravimi doosi.

Märksõnad: Epigeneetilised ravimid, polümersoomid, THP-1 rakuliin

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Use of polymersomes as a drug vector for epigenetic drugs in human macrophages

Epigenetic drugs offer numerous solutions for curing diseases but are hampered by their wide array of side effects. Polymersomes – vesicles consisting of polymers – are stable and, depending on polymer modifications, offer both environmentally reactive and targeted delivery. Polymersomes contain an inner hydrophilic area with a hydrophobic membrane, allowing the particle to store molecules without disrupting its shape regardless of their hydrophobic or hydrophilic properties. Polymersome encapsulation may thus offer a solution to the practical use of epigenetic drugs for a more precise and less global delivery of epigenetic drugs, thus reducing drug quantity while increasing effectiveness.

Keywords: Epigenetic drugs, polymersomes THP-1 cell line

CERCS: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Nanomediitsiin.....	7
1.1.1 Nanoosakesed	8
1.1.2 Polümersoomid.....	9
1.2 Epigeneetika.....	11
1.2.1 Epigeneetilised ravimid	14
1.3 Epigeneetika rakkudes	18
1.3.1 Monotsüüdid ja makrofaagid.....	18
1.3.2 THP-1 rakuliin.....	19
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1 Eesmärk	21
2.2 Materjalid ja meetodid	21
2.2.1 Polümersoomide süntees	21
2.2.2 THP-1 rakkude kasvatamine ja diferentseerimine.....	22
2.2.3 Polümersoomide fagotsüteerimine THP-1 rakkudes.....	23
2.2.4 Ekspressioonianalüüs	24
2.2.5 Kromatiini analüüs	26
2.2.6 Primaarsete rakkude ekspressioonianalüüs	29
2.3 Tulemused.....	31
2.3.1 Polümersoomid moodustuvad ühtlaselt, omandavad ravimeid ning on rakkudele omastatavad	31
2.3.2 Ekspressioon.....	35
2.3.3 Histoone modifikatsioonid	39

2.3.4	Mõju PBMCdele.....	43
2.4	Arutelu ja järeldused.....	44
	KOKKUVÕTE.....	46
	SUMMARY.....	47
	TÄNUAVALDUSED.....	48
	KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....	49
	KASUTATUD VEEBILEHED.....	56
	LIHTLITSENTS.....	57

KASUTATUD LÜHENDID

THP-1 – inimese monotsüüdi rakuliin

RPMI sööde – *Roswell Park Memorial Institute*

PEG – polüetüleenglükool (*polyethylene glycol*)

PCL – polükaprolaktaat (*polycaprolactone*)

PLA – polülaktiline hape (*polylactic acid*)

TEM – transmissioonelektronmikroskoop (*transmission electron microscope*)

CCL2 – kemokiini ligand 2 (*chemokine C-C ligand 2*)

IL1B – interleukiin 1 beeta (*interleukin 1 beta*)

SOCS3 – tsütokiinisignaliseerimise supressor 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)

ACTB – beeta aktiin (*beta actin*)

IC50 – pool maksimaalsest inhibeerivast kogusest (*half maximal inhibitory concentration*)

SAHA – suberanihüdroksoam hape e. Vorinostat (*suberanihydroxamic acid*)

H3K4me3 – histoon 3 lpsiin 4 trimetülatsioon (*histone 3 lysin 4 trimethylation*)

H3K27ac – histoon 3 lüsiin 27 atsetülatsioon (*histone 3 lysin 27 acetylation*)

IgG – immuunoglobuliin G (*immunoglobulin G*)

NCP -

GM-CSF – granulotsüüt makrofaagi kolooniat stimuleeriv faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

RT-qPCR – reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*real-time quantitative polymerase chain reaction*)

SISSEJUHATUS

Epigeneetilised ravimid on leidmas kasutust eelnevalt ravimatute vähkhaiguste piiramisel ja allasurumisel. Tegu on molekulidega, mis pärsivad DNA ja histoonide epigeneetiliste lugejate, kirjutajate ja kustutajate tööd ning muudavad epigeneetilist koodi. Epigeneetilise koodi muutumisega muutub ka geenide avaldumine. Epigeneetilised ravimid omavad spetsiifilisi sihtmärke, kuid pole piiratud rakkude või kudede ning omavad seetõttu hulgaliselt kõrvalmõjusid. Epigeneetiliste ravimite kõrvalmõjude vähendamiseks on vajalik leida sobiv vektor transpordiks organismis.

Polümersoomid on amfiifilsetest polümeeridest koosnevad kahekihilise membraaniga osakesed, mis vesilahuses hoiavad sees hüdrofiilset keskkonda, samas kui membraani sisemus on hüdrofoobne. See lubab kapseldada ühte osakesse erinevate omadustega molekule. Lisaks on polümersoomide pinnale võimalik siduda mitmeid sihtmärgistatud molekule, kontrastaineid, keskkonnast sõltuvaid vabanemismehhanisme ning muid huvipakkuvaid osakesi.

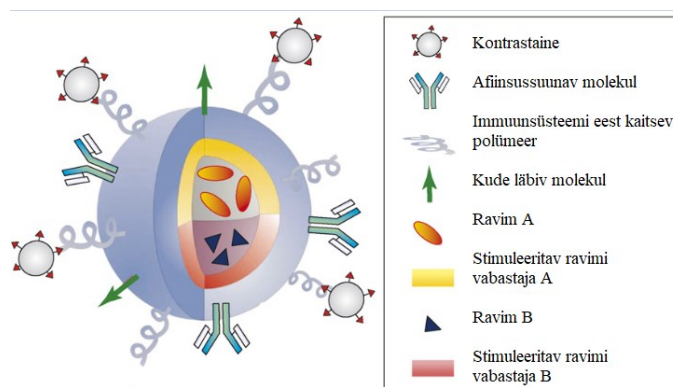
Antud töös uuriti epigeneetiliste ravimite Vorinostat, JQ-1 ja C646 kapseldamist ja sellest tulenevaid mõjusid. Vaadeldi geeniekspressiooni ja epigeneetiliste markerite muutusi THP-1 rakuliinis ning inimese primaarsetes monotsüütides. Eesmärgiks oli võrrelda kapseldatud ja kapseldamata ravimi mõju ning tuvastada võimalikud süsteemsed erinevused.

Käesolev magistritöö on kirjutatud Tartu Ülikooli Biomeditsiini õppekava raames. Töös tehtud katsed teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, bio-ja siirdemeditsiini instituudis, molekulaarpatoloogia ja vähibioloogia uurimisgruppides.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Nanomeditsiin

Nanomeditsiin käsitleb nanomaterjalide, suurusjärgus 1-100 nm [1], kasutamist meditsiinilistel eesmärkidel. Näited nanomeditsiinist on ravimi transport, diagnostika, vere puhastamine (Herrmann et al. 2013) ja kudede kasvatamine (Lalwani et al. 2013). Kuigi nanomaterjalid on muudes valdkondades kasutuses oma füüsikaliste omaduste tõttu – valguse murdumine, magnetism, jäikus ja tugevus jne. – muudab nanoosakesi meditsiinile intrigeerivaks nende lai valik potentsiaalseid rakendusi tänu nii nanomaailma materjalide drastiliselt erinevatele omadustele kui võimalusele nanoosakesi modifitseerida huvipakkuvate molekulidega (Hewakuruppu et al. 2013; Taylor et al. 2013). See on võimaldanud ravimite poolestusaja pikendamist, ravimite sihtmärgistatud kohaletoimetamist ning vabastamist kapslist soovitud hetkel. Seoses üha enam relevantseks muutuvate populatsiooni vananemisega seotud haiguste esiletõusuga on täpsemate ravimite ning ravimite kohaletoimetamismeetodite väljatöötamine muutunud keskseks fookuseks meditsiinitehnoloogias. Toksiliste ravimite või kontrastainete sihtmärgistatud ja/või muust keskkonnast eraldatud kohaletoimetamine võib pakkuda lahendusi mitmetele olemasolevatele probleemidele vähiravis ja diagnostikas – eriti kõrvalmõjude vältimisel (Ranganathan et al. 2012). Lisaks on tähelepanuväärsed ka nanoosakeste suurusest tulenevad eelised vähikolde veresoonekonna läbimisel ja vähikoldes püsimisel (Wong et al. 2011). Näiteid tänapäeval edukalt kasutuses olevatest nanorakendustest on ravimid Abraxane ja Doxil [2,3] ning suur hulk nanoosakesi nii kliinilises kui laboratoorses diagnostikas (Choi et al. 2018; Nune et al. 2009). Erilist huvi on äratanud nanoosakesed, mis on võimelised teostama mitut ülesannet korraga ning täitma nii diagnostilist kui terapeutilist eesmärki (Joonis 1.) (Sanvicens ja Marco 2008).



Joonis 1. Multifunktsionaalne nanoosake, võimeline transportima erinevaid ravimeid, kontrastained ning reageerima erinevatele keskkonna stiimulitele ja läbima valitud kudesid. (Sanvicens ja Marco 2008) Modifitseeritud.

Meditsiini arenedes kerkivad esile üha keerukamate haiguste ravimismeetodid. Erilist tähelepanu on saamas vähiravi. Tulenevalt potentsiaalsete rakenduste mitmekesisusest on investeeringud ja huvi nanomeditsiini vastu tõusnud järjepidevalt. [4] (Bellavite Pellegrini et al. 2012) Sellele vaatamata on turule jõudnud vaid üksikud preparaadid, mis kasutavad ära nanoosakesi. On täitmata nõudlus paremate ja spetsiifilisemate nanoosakeste jaoks, mis võimaldaksid pikemat ringlust organismis, täpsemat sihtmärgistamist, paremat koeläbivust jne.

1.1.1 Nanoosakesed

Kasutusel on lai hulk erineva struktuuri ja koostisosadega nanoosakesi. Kuigi hästituntud nanotorud ja aatomkihtsadestamine on leidmas üha rohkem rakendusi muudes alades (Oviroh et al. 2019; Volder et al. 2013), on meditsiinivaldkonnas suurema tähelepanu all nanoosakesed, mis võimaldavad molekulide kapseldamist või muul moel kandjaga sidumist ning, mis lubavad molekulidel liikuda organismis immuunsüsteemi ärritamata. Levimumad nanoosakesed on järgmised:

- Liposoomid on lipiidse kaksikkihiga sfäärjad kehad. Liposoomid on üks esimesi ja ka üks laialdasemalt kasutatavaid nanoosakesi meditsiinis (Bangham, Standish, ja Watkins 1965). Liposoomi on võimalik toota orgaanilist lipiidkihti segades, näiteks sonikeerides. Tänu lipiidsele kaksikkihile võimaldavad liposoomid nii hüdrofiilsete kui hüdrofoobsete molekulide samaaegset transporti. Afinsussuunatuna koospetsiifilistele pinnamarkeritele on liposoomi võimalik kasutada ravimite transpordiks raskesti ligipääsetavatesse kohtadesse nagu ajukude (Lam et al. 2018) või näiteks

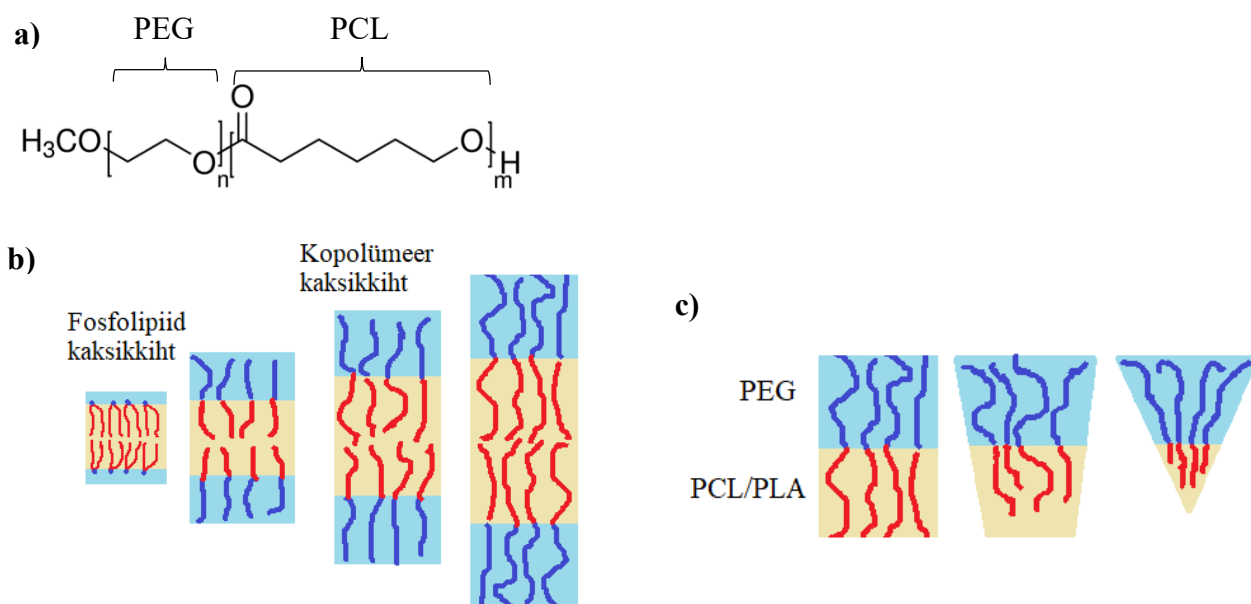
transstoosiks läbi gastrointestinaal süsteemi (Nguyen et al. 2016). (Fendler ja Romero 1977)

- Mitsellide moodustamiseks kasutatakse samu komponente nagu liposoomides, kuid mitsellid ei oma kaksikkihti vaid koosnevad ühest ühtsest hüdrofoobsest tuumast ja hüdrofiilsest väliskihist (Geng et al. 2005).
- Polümersoomid on struktuurilt sarnased liposoomidele, kuid ehituslikult koosnevad erinevatest sünteetilistest polümeeridest ja nende kombinatsioonidest. Sünteetiliste molekulide eeliseks on parem stabiilsus, väiksem läbilaskvus ning võimalus mõjutada osakese läbilaskvust, ravimi vabanemiskiirust ja teisi parameetreid (B. M. Discher et al. 1999)
- Metall-nanoosakesed on metalse tuuma ja orgaanilise kattega osakesed, mis kombineerivad metalli omadused (näiteks magnetism) ning orgaaniliste molekulide püsivuse organismis ja laia valiku modifikatsioone. Laialdaselt on uuritud raudoksiididest koosneva tuumaga superparamagneetilisi osakesi. Metall-nanoosakesi töötatakse välja nii diagnostilistel kui terapeutilistel eesmärkidel. (Cole, Yang, ja David 2011)
- Dendrimeerid on haruneva struktuuriga molekulid, mis moodustavad sfäärjaid kehakesi. Hargnev struktuur võimaldab sünteesida makromolekule, mille pinnal on mitmeid funktsionaalgruppe. Funktsionaalgruppide hulk ja võimalus dendriimeeri kasvatada huvipakkuvate molekulide ümber teeb dendriimeeridest potentsiaalse transpordi vektori mitmete lisafunktsioonidega. (Hecht ja Fréchet 2001)

1.1.2 Polümersoomid

Polümersoomi kopolümeerid on ehituselt sarnased liposoomide amfiilsetele lipiididele, kuid koosnevad suure molekulmassiga polümeeridest (B. M. Discher et al. 1999) (Joonis 2). Polümersoomide ehitust võib võrrelda viiruskapsiidide ehitusega, kus viiruskapsli polüpeptiidid assembleeruvad vastupidavaks kapsliks, mis kaitseb väliskeskkonna eest. Liposoomile omaste amfiilsete omaduste saavutamiseks peab polümeer koosnema nii hüdrofiilsest kui hüdrofoobsest osast. Sõltuvalt temperatuurist, koostisest ja muudest omadustest, jääb lipiidsete osakeste amfiilse kaksikkihi paksus keskeltläbi alla 10 nm (Balgavý et al. 2001). Seevastu varieerub polümersoomi kaksikkihi paksus oluliselt sõltuvalt

amfiifilse kopolümeeri suuruselt. See võib tähendada, et kaksikkihi paksus võib ulatuda ka 30 nm-ni. Molekulmassi poolest on enamus lipiide suurusjärgus 1 kDa, samas kui kopolümeerid ja polüpeptiidid on suurusjärgus 10 kDa. Liposoomide õhem membraan on tingitud membraaniga seotud molekulide bioloogilisest funktsioonist nagu fagotsütoos ja pinnamarkerite liikumine (Lipowsky ja Sackmann 1995). Kuna polümersoome disainides rakumembraanide bioloogilised funktsioonid rolli ei mängi on polümersoome võimalik struktuur suuresti varieeruv ja omane osakese eesmärgile (Meng ja Zhong 2011)



Joonis 2. PEG-PCL kopolümeeri struktuur (a), kopolümeeri ja fosfolipiidse kaksikkihi võrdlus ning kihi paksuse sõltuvus polümeeri suuruselt (b), PEG-PLA/PCL vahekorrast või PLA/PCL hüdrolüüsi astmest sõltuv osakese kuju (c).

Oluliselt paksem kaksikkiht tagab suurema vastupidavuse mehhaanilisele stressile ning väiksema läbilaskvuse. Sellest tulenevad ka polümersoome eelised ravimitranspordis kergemini lagunevate ja lekkivate liposoomide ees. Nii liposoomi kui polümersoomi amfiifilset kaksikihti moodustab ühest hüdrofiilsest ja ühest hüdrofoobsest järjestusest koosnev kopolümeer (B. M. Discher et al. 1999). Muutes hüdrofiilse ja hüdrofoobse polümeeri osakaalu kopolümeeris on võimalik muuta osakese kuju. Kuigi võimalikke polümeere on palju, on laialdasemat tähelepanu omandanud PEG (polüetüleenglükool), PCL (polükaprolaktaat) ja PLA (polulaktiline hape) polümeeridest koosnevad kopolümeerid (Ahmed ja Discher 2004). PCL ja PLA polümeerid on kopolümeeri hüdrofoobsed, samas kui PEG on hüdrofiilne osa. Hüdrofiilne osa, kui partikli väljapoole ulatuv pool, on oluline nanoosakese interaktsioonide jaoks väliskeskkonnaga nagu plasmavalkudega ja rakkudega. Hüdratsioonikihist tingitud

vähene reaktiivsus opsoniinide (ja seega immuunsüsteemiga) on muutnud PEG polümeeri huvitavaks uurimisobjektiks ja ka praktiliseks rakenduseks (Woodle 1993; Christian et al. 2009). Näiteks kasutatakse liposoomidel põhinevas DOXIL'is[®] (liposomaalne doksorubitsiin) PEG polümeere, et vältida organismi immuunreaktsiooni [2]. PCL/PLA polümeeride iseärasuste hulka kuulub vees hüdrolüüsumine ja sellest tulenev progressiivne kaksikkihi stabiilsuse vähenemine ja osakeste kuju muutused. (Ahmed ja Discher 2004) PLC/PLA polümeeri vähenedes muutub kopolümeeri materjalide vahekord, muutes teatud vorme energeetiliselt soodsamaks kui teised. Samuti võib see tekitada poore polümeeris endas, viies transportitava molekuli vabanemiseni osakesest (D. Discher ja Ahmed 2006).

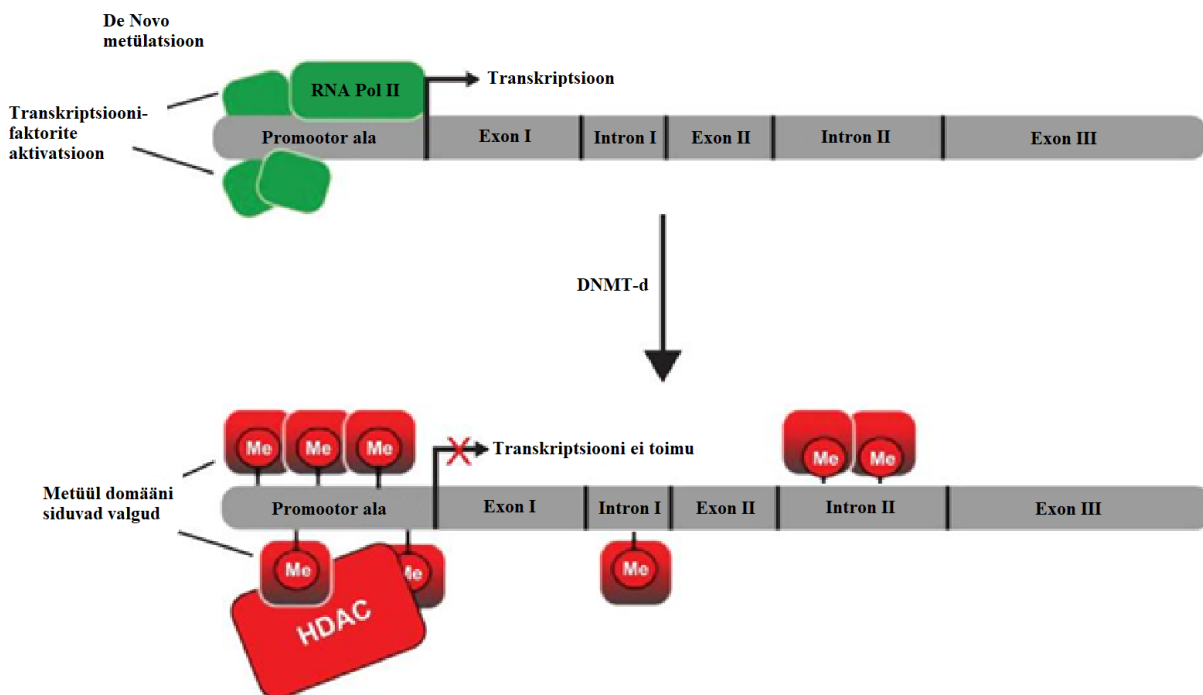
Sarnaselt liposoomile on polümersoomi kaksikkiht võimeline kandma hüdrofiilseid molekule. Koos osakeste sisemuses oleva vesikeskkonnaga võimaldab see omadus polümersoomidel transportida nii hüdrofiilseid kui hüdrofoobseid ravimeid, kontrastained või nende kombinatsioone. (Danafar, s.a.). Sellest tulenevalt võimaldavad polümersoomid ainete transporti ilma orgaaniliste lahusteta, mis võivad omada kõrvalmõjusid. See, koos osakese stabiilsuse ja võimalike pinnamodifikatsioonidega, muudab polümersoomid huvipakkuvaks nanoplatvormiks. (D. Discher ja Ahmed 2006)

1.2 Epigeneetika

Epigeneetika all mõistetakse „geenide funktsiooni või avaldumise muutusi, mis päranduvad mitootiliselt ja/või meiootiliselt ilma DNA järjestuse muutusteta“ (Wu 2001; Dupont, Armant, ja Brenner 2009). Lisaks rakkude diferentseerumisele on epigeneetikal keskne ülesanne raku funktsiooni ja transkriptsiooni reguleerimises – näiteks võib epigeneetiline vaigistamine või aktiveerimine reguleerida geeniekspressiooni raku erinevates staadiumites, kontrollida transponeeruvaid elemente ja tagada korrektse kromatiini pakkimise tuumas (Daskalos et al. 2009; Dodge et al. 2005).

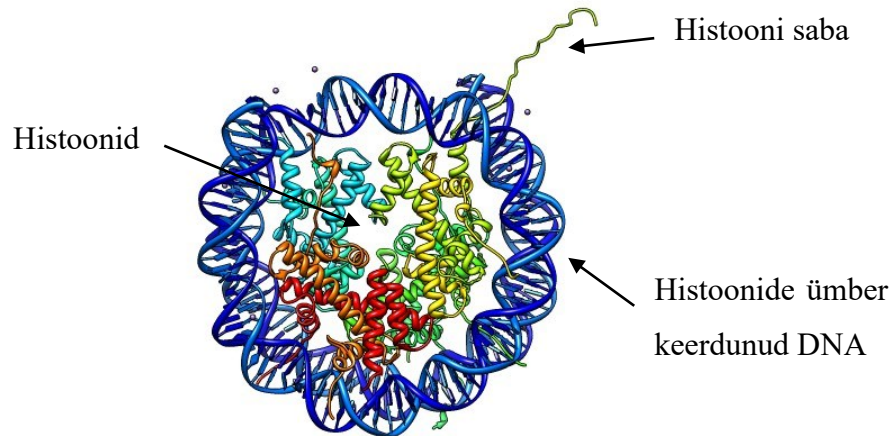
Peamine DNA modifikatsioon imetaja rakkudes on tsütosiini metüülatsioon (Hotchkiss 1948), mis on seotud CpG dinukleotiididega. DNA metüülatsioon esineb sageli geenide promootoralades, kuid on leitav ka mujal genoomis (Woodcock, Crowther, ja Diver 1987). Kuna metüleeritud CpG dinukleotiidide arv on märgatavalt suurem vaigistatud geenide promootoralades, esinedes sageli nn CpG-saarena, siis on seda modifikatsiooni seostatud

transkriptsiooni repressiooniga (Watt ja Molloy 1988). See võib tuleneda otsestest DNA konformatsioonimuutustest või DNA topoloogiat mõjutavate faktorite seondumisest metüleeritud CpG dinukleotiidide lähedusse (Boyes ja Bird 1991). Sel viisil on võimalik kontrollida geenide avaldumist (Joonis 3.). Imetajates tagab mitoosijärgset DNA metülatsiooni DNA metüültransferaas 1 (DNMT1) (Leonhardt et al. 1992), samas kui ensüümid DNMT3A ja DNMT3B vastutavad *de novo* metülatsiooni eest (Okano, Xie, ja Li 1998).



Joonis 3. DNA metülatsiooni mõju geenide avaldumisele. (Heerboth et al. 2014)
Modifitseeritud

Lisaks DNA metülatsioonile mõjutavad geenide avaldumist histoonide modifikatsioonid. (Biterge ja Schneider 2014). Histoone jagatakse viieks peamiseks histooniks – H1, H2A, H2B, H3 ja H4 - ning nende alatüüpideks (Luger et al. 1997). Neljast histoonist, H2A, H2B, H3 ja H4, moodustub nn oktameer. Histoone oktameer koos selle ümber keerdnud DNA-ga moodustab nukleosoomi, mis on põhiliseks kromatiini ruumilise organiseerumise ühikuks (Kornberg 1974) (Joonis 4.). Histoone H1 seondub oktameeri ümber keerdnud DNA külge, stabiliseerides seeläbi kromatiini. (Farkas ja American Association for Clinical Chemistry 1996) Lai hulk ensüüme lisavad või eemaldavad erinevate histoonide sabades olevatele arginiini-, lüsiini- ja seriinijääkidele spetsiifilisi modifikatsioone.



Joonis 4. Histooidid ja nukleosoomi struktuur. Kaheksa histooidi moodustavad kromatiini tuumiku, ümber mille on kerdunud 147 aluspaari DNA ahelat. (Luger et al. 1997)
Modifitseeritud

Spetsiifiliste histoonimodifikatsioonide seostamine transkriptsioonimuutustega on viinud nn. histooni koodi hüpoteesini, mille kohaselt on DNA ekspressioon osaliselt kontrollitud histoonide nukleosoomist väljaulatuvate sabade posttranslatsiooniliste modifikatsioonide poolt (Strahl ja Allis 2000). Kõige paremini on kirjeldatud histoonide H3 ja H4 lüsiinijääkide atsetüleerimist ja metüleerimist. Lüsiinijääkide atsetüleerimist antud histoonidel on seostatud transkriptsioonilise aktiivsusega, samas kui metüleerimist on seostatud nii aktiveerimisega (H3K4, H3K36) kui repressiooniga (H3K9, H3K27, H4K20), olenevalt metülatsiooni ulatusest (me, me₂, me₃ – mono-, di- ja trimetülatsioon) ja metüleeritud jäägi asukohast ahelas (Sims, Nishioka, ja Reinberg 2003). Sarnaselt DNA modifikatsioonidele sõltuvad ka histoonide modifikatsioonid järjestus-spetsiifiliste ensüümide tööst, lisaks tritooraks ning *polycomb* valkudest või bromodomääni omavatest ensüümidest või ka RNA interferentsist. Erinevalt aga DNA metülatsioonist pole veel täiesti selge kuidas tagatakse histoonimodifikatsioonide järjepidevus replitseeritud DNAs mitoosi järgselt (Henikoff, Furuyama, ja Ahmad 2004).

1.2.1 Epigeneetilised ravimid

Epigeneetiliste markerite modifitseerimiseks esineb organismis hulgaliselt ensüüme, mis kas üksi või koostöös teiste molekulidega loevad, kirjutavad või kustutavad epigeneetilisi märke. Näiteid histoonide modifikatsioone muutvatest valkudest on tritooraks (TrxG) ja *polycomb* (PcG) valgud. TrxG valgud kontrollivad kromatiini struktuuri ja histoonidega seotud DNA avaldumist, trimetüleerides nt. H3K4 lüsiini. Seevastu PcG valgu histoonide metüleerimist on seostatud geenide vaigistamisega (Schuettengruber et al. 2007). Ensüümide ja nende komplekside omavaheline koostöö on keskse tähtsusega mitte ainult raku korrektseks arenguks vaid ka rakkude diferentseerumiseks. Nende süsteemide kahjustumise korral võivad tekkida mitmed haigused, sh kardiovaskulaarsed, metaboolsed ja neuroloogilised haigused ning vähid (Moosavi ja Ardekani 2016; Heerboth et al. 2014). Üheks võimaluseks haigusi ravida on epigeneetilised ravimid. Epigeneetilist mustrit mõjutavaid molekule saab klassifitseerida nende sihtmärgi ja efekti alusel. Näiteid klassifikatsioonist:

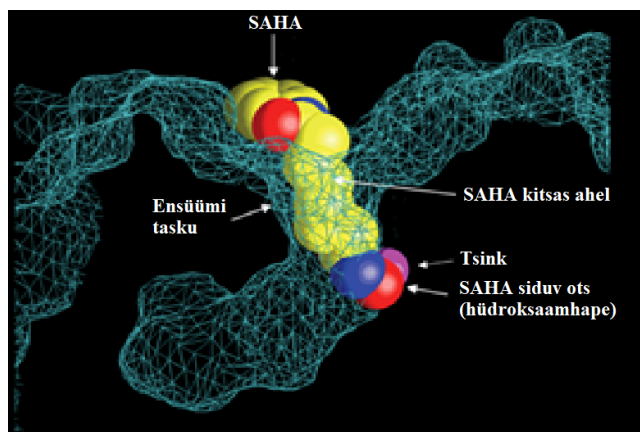
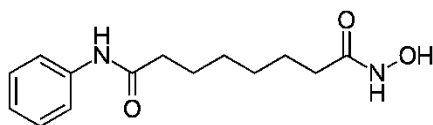
- DNA metüültransferaasi inhibiitorid (DNMTi). Inhibeerivad DNMT ensüüme ning alandavad DNA metüleeritust, nt. Decitabine müelodüsplastiliste sündroomide jaoks. [5]
- Histooni atsetüültransferaasi inhibiitorid (HATi). Inhibeerivad HAT ensüüme, alandavad histoonide atsetüleeritust ja seega geenide avaldumist, nt. C646, mis inhibeerib p300 HAT ensüümi, pärssides seega raku kasvu ja jagunemist. (Yan et al. 2013)
- Histooni deatsetülaasi inhibiitorid (HDACi). Inhibeerivad HDAC ensüümide tegevust, tõstes histoonide atsetüleeritust ja geenide avaldumist, nt. Givinostat, mis inhibeerib proimflamatoorsete geenide avaldumist ja on katsetustes müeloomide raviks. [6]
- Histooni metüültransferaasi inhibiitorid (HMTi). Inhibeerivad histoonide metüültransferaase, alandades metüleeritust. Olenevalt sihtmärgist võivad omada erinevaid toimeid, nt. 3-deazaneplanocin A, mis omab potentsiaali vähiravis. (Kikuchi et al. 2012)
- Histooni demetülaasi inhibiitorid (HDMi). Inhibeerivad histoonide demetüleerimist, hoiavad histoonide metüleeritust, nt. Bizine, mis kaitseb neuroneid oksüdatiivse stressi eest. (Prusevich et al. 2014)

- Atsetüleeritud histooniga seostumise inhibiitorid (PAHi). Inhibeerivad valkude seostumist atsetüleeritud histooniga, häirides histooni atsetüülignaali lugemist ja sellele järgnevat reaktsiooni, nt. CPI203, bromodomääni inhibiitor mis pakub võimalusi kartsinoomi raviks. [7]
- Metüleeritud histooniga seostumise inhibiitorid (PMHi). Inhibeerivad valkude seostumist metüleeritud histoonidega, häirides metüülisignaali lugemist ja sellest sõltuvaid reaktsioone, nt. UNC119, mis on seostatud gliooma-vastase toimega. (James et al. 2013)

Kuigi epigeneetilised ravimid on tihtipeale märklaua spetsiifilised pole need märklauad koe või raku spetsiifilised. Sellest tuleneb epigeneetiliste ravimite lai spekter kõrvalmõjusid ja tihtipeale võivad kõrvalmõjud olla tõsisemad kui ravimist tulenev kasu. (Heerboth et al. 2014) Sellest tulenevalt ei pruugi epigeneetilise ravimi kasu üles kaaluda potentsiaalseid kõrvalmõjusid.

1.2.1.1 SAHA

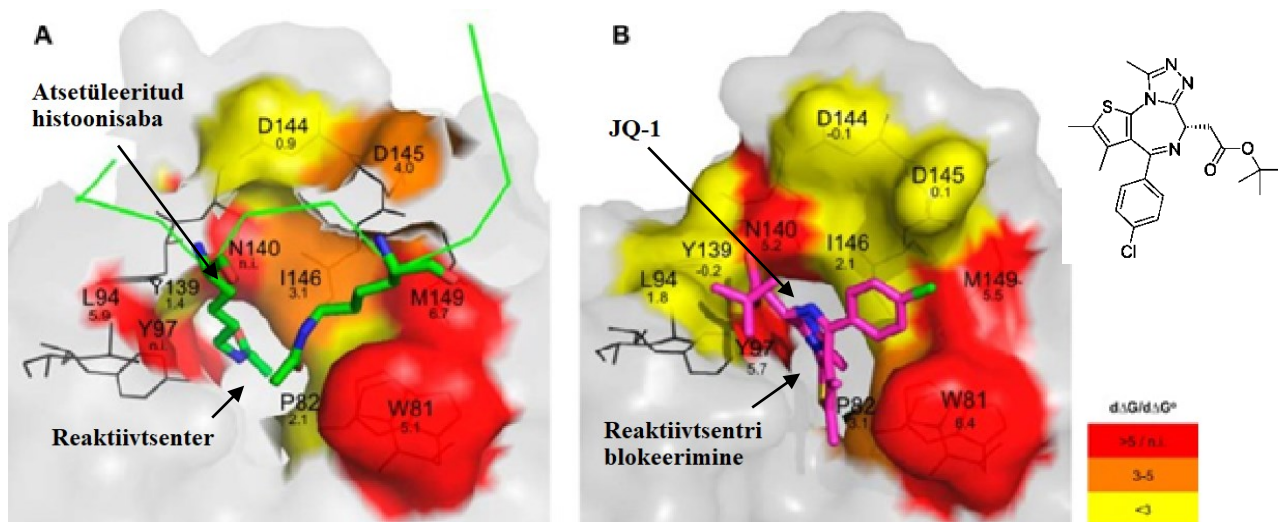
SAHA, tuntud kui Vorinostat, on hüdroksaamhape ning histooni deatsetülaasi inhibiitor (HDACi). Inimeses on kolm klassi HDAC ensüüme: HDAC I ja II, mis seovad Zn aatomeid ning alluvad vorinostatile nanomolaarsetes kontsentratsioonides ning HDAC III ensüümid, mis ei seo Zn, ei allu SAHAle ning ei oma peamise sihtmärgina histoonide (Marks et al. 2001; Lehrmann, Pritchard, ja Harel-Bellan 2002). HDAC I ja II klassi ensüümide sihtmärkide hulka kuuluvad lisaks histoonidele ka transkriptsiooni faktorid ja proliferatsiooni mõjutavad valgud. Näiteks on leukeemias ja lümfoomides leitud vigast HDAC regulatsiooni (Bolden, Peart, ja Johnstone 2006). SAHA interaktsioon HDACidega seisneb aktiivtsentri Zn aatomiga seostumises ja seeläbi substraadi reaktsiooni blokeerimises. (Finnin et al. 1999) Sellest tulenevalt ei suuda HDAC ensüüm oma funktsiooni täita ning histoonide atsetüleerituse taset ei alandata (Joonis 5.). SAHA-le anti USA *Food and Drug Administration*-i (FDA) poolt müügiluba 2006. aastal kasutamiseks naha T-rakulise lümfoomia raviks [8]. Lisaks sellele on SAHA ka kliinilistes katsetes mitmete teiste kasvaja puhul nagu glioblastoom [9] ja ka HIV infektsiooni prekliinilistes uuringutes [10]. Tihtipeale kasutatakse SAHA-t kliinilistes katsetes koos teiste ravimitega.



Joonis 5. Vorinostati interaktsioon HDAC ensüümi katalüütilise tsentriga. (Marks ja Breslow 2007) Modifitseeritud

1.2.1.2 JQ-1

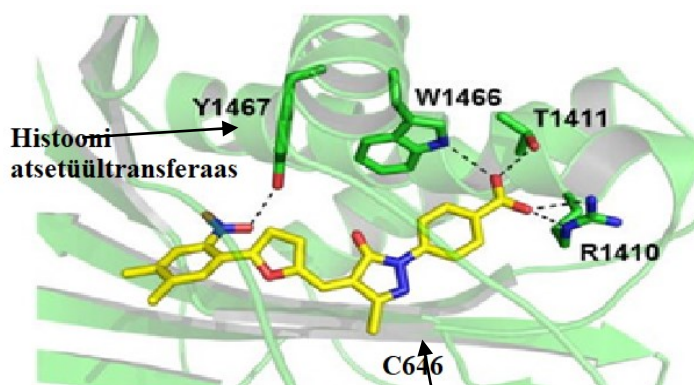
JQ-1 on tienotriasolodiasepiin, mis inhibeerib bromodomään ja terminali motiivi (BET) struktuuriga valke (PAHi) (Delmore et al. 2011). Ravimi sihtmärkide hulka kuuluvad BRD2, BRD3, BRDT ja teised valgud. Bromodomään on ligikaudu 110 aminohappe pikkune valgudomään, mis tunneb ära histoonisabas olevaid atsetüleeritud lüsiinijääke (Owen et al. 2000). Bromodomään seondub valkude, muuhulgas ka histoonide, atsetüleeritud lüsiiniga (Ntranos ja Casaccia 2016). JQ-1 on konkurentne BET bromodomääni inhibiitor ning signaali lugeva valgu aktiivtsentriga seostudes väldib atsetüleeritud lüsiini lugemist ja signaali edasikandumist (Filippakopoulos et al. 2010) (Joonis 6.). JQ-1 on uuritud potentsiaalse NUT kartsinoomi ravina tänu BRD-NUT kimäärsete valkude sidumisele (Filippakopoulos et al. 2010; Schwartz et al. 2011). Samuti on näidatud JQ-1 potentsiaal HIV ja hüpertroofia ravis (Banerjee et al. 2012; Anand et al. 2013). Lisaks on JQ-1 uuritud võimaliku epilepsia ravina ning isegi potentsiaalse rasestumisvastase vahendina (Younus ja Reddy 2017). Probleemaatiliseks on ravimi lühike poolestusaeg organismis (Matzuk et al. 2012).



Joonis 6. JQ-1 konkurentne inhibitsioon atsetüleeritud H4 sabaga võrreldes. (Jung et al. 2014) Modifitseeritud.

1.2.1.3 C646

C646 on pürasooloon grupp sisaldav histooni atsetüültransferaasi (HATi), p300 valgu, selektiivne inhibiitor (Bowers et al. 2010). p300 valk vastutab kromatiini remodelleerimise eest ja seeläbi mõjutab transkriptsiooni. p300 on keskse tähtsusega raku kasvamisel, jagunemisel, diferentseerumisel ja vähkkasvajate vältimisel (Ogryzko et al. 1996). C646 seondub p300 aktiivtsentriga ja seeläbi takistab atsetüül-CoA seostumist ja atsetüülrühma ülekannet histoonisabale (Joonis 7.). See võib viia üldise H3K4me3 atsetüleerimise vähenemiseni genoomis ja on seega vahendiks epigeneetilise mustri muutmiseks (Crump et al. 2011). C646 omab kõrget spetsiifilisust ning tal on madal efektiivne kontsentratsioon. C646 mõju on näidatud esnäärmevähi alla surumisel. (Santer et al. 2011)



Joonis 7. C646 seostumine aktiivtsentrisse. (Bowers et al. 2010) Modifitseeritud.

1.3 Epigeneetika rakkudes

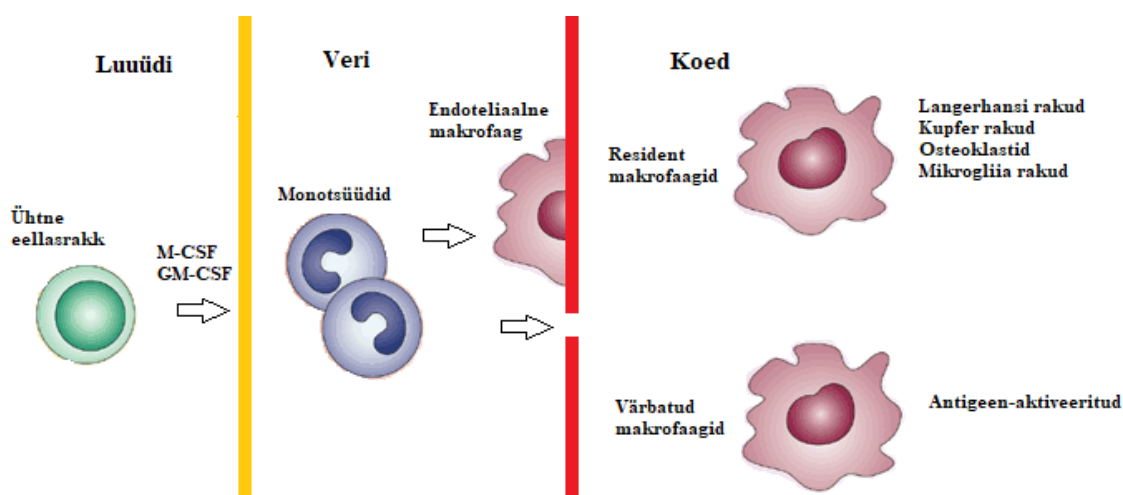
Rakkude funktsiooni organismis määrab nii geneetiline kui epigeneetiline kood. Seega on rakkude normaalseks käitumiseks vajalik korrektne epigeneetiline muster genoomis. Epigenoomi muutused võivad viia geeniavaldumise mustri muutuste või raku arengustaadiumi regressioonini diferentseerumata vormi, mis võib omakorda viia vähkkasvajateni (Mussa et al. 2016). Näiteks on varasemalt teada vale DNA metülatsioonimustri esinemist vähkkasvajates, kus on täheldatud üldist hüpometülatsiooni, samas kui promootoralade CpG saartel on leitud hüpermetülatsiooni (Lapeyre ja Becker 1979; Ohtani-Fujita et al. 1993). Märkimisväärne on, et hüpermetüleeritud alade hulka kuuluvad hästi kirjeldatud tuumor supressor alad, mis metülatsiooni tulemusel vaigistatakse. Sarnane olukord on nähtav muutunud histoonide modifikatsioonide mustri ja kromatiini remodelleerivate ensüümide vigases töös (Dawson ja Kouzarides 2012). Lisaks DNA metülatsioonile ja histoonimodifikatsioonidele on roll ka mittekodeerival RNA-l, mis võib nii positiivselt või negatiivselt mõjutada geenide avaldumist ja vähki (Lujambio ja Lowe 2012). Et mõista epigeneetiliste markerite mõju ja epigeneetiliste ravimite toimet, on kasutatud erinevaid mudelorganisme ja rakuliine.

1.3.1 Monotsüüdid ja makrofaagid

Monotsüüdid, makrofaagid ja müeloidsed dendriitrakud on müeloidsed mononukleaarsed rakud, mis vastutavad kaasasündinud immuunsuse sensor-funktsiooni ja omandatud immuunsuse antigeeni esitlemise funktsiooni eest. Kollektiivselt võib neid kirjeldada mononukleaarseks fagotsütoosi süsteemiks (MPS) (van Furth et al. 1972). Monotsüüdid on heterogeensed ja väga plastilised rakud, mis on võimelised oma fenotüüpi muutma ning diferentseeruma vastavalt keskkonnatingimustele pro- või anti-inflammatoorseteks makrofaagideks või dendriitrakkudeks (Yang et al. 2014). Monotsüüdid pärinevad hematopoeetilistest tüvirakkudest luuüdis, järgnedes arengus müeloidsele eelarakule (McGovern et al. 2014, 14). Olles diferentseerunud luuüdis, liiguvad monotsüüdid verre, kus nad ringlevad kuni 2 päeva kuni läbivad veresooneid ning migreeruvad erinevatesse kudedesse. Kus täpselt monotsüüdid veresooni läbivad sõltub neile mõjuvatest kemoatraktantidest. Näiteks on vigastuse ja põletiku korral kemokiin ligand 2 (CCL2) üheks keskseks faktoriks monotsüütide värbamisel nakatuskoldesse (Tsou et al. 2007, 2). Olles jõudnud kudedesse, diferentseeruvad monotsüüdid makrofaagideks. Kudedes võivad makrofaagid oodata kuid või

aastaid signaale edasiste funktsioonide täitmiseks. (Shi ja Pamer 2011) Monotsüütide ja neist diferentseerunud makrofaagidel on kolm peamist ülesannet: võõrkehade või rakujäänuste fagotsütoos, antigeenide esitlemine ja tsütokiinide tootmine.

Monotsüüdid diferentseeruvad makrofaagideks läbi signaalmolekulide nagu näiteks granulotsüüti-makrofaagi kolooniat stimuleeriv faktor (GM-CSF) ja makrofaagi kolooniat stimuleeriv faktor (M-CSF) (Jang et al. 2006; Francisco-Cruz et al. 2013) või bakteritele omane lipopolüsahhariid (LPS) (Joonis 8.). Olles diferentseerunud, alustavad makrofaagid võõrkehade või rakujäänuste fagotsüteerimist ning antigeenide esitlemist teistele immuunrakkudele. Makrofaage on jaotunud üle kogu organismi kõigis kudedes, kus nad vastutavad patogeenide fagotsüteerimise eest (Ovchinnikov 2008). Makrofaagide omadus kõike võõrast fagotsüteerida teeb neist võimaliku mudeli, et vaadelda nende poolt fagotsüteeritud nanoosakeste omadusi.



Joonis 8. Monotsüütide diferentseerumine makrofaagideks. (Gordon 2003) Modifitseeritud

1.3.2 THP-1 rakuliin

THP-1 rakuliin eraldati 1-aastaselt ägeda monotsüütiline leukeemiapatsiendilt aastal 1980 (Tsuchiya et al. 1980). THP-1 on olnud tähtsaks rakuliiniks monotsüütide uurimisel, võimaldades vaadelda ka makrofaagiks diferentseerumist. Diferentseerumist on võimalik läbi viia phorbol-12-müristaat-13-atsetaadi (PMA), kaltsitriooli või M-CSF (Daigneault et al. 2010). Neist PMA omab eriti head võimet diferentseerida THP-1 rakke makrofaagideks (Chanput et al. 2013). THP-1 rakuliin omab inimese primaarsete monotsüütidega sarnaseid retseptoreid ja ekspressiooni mustreid ja annab sarnase vastuse bakterite rakupinnal olevatele

polüsahhariididele (Gao et al. 2000). Kuigi ekspresseeritavate geenide muustrid primaarsetes monotsüütides ja THP-1 rakuliinis on sarnased, võivad need erineda tasemete poolest (Bruckmeier et al. 2012). Vaatamata olemasolevatele tasemete muutustele on mudelorganismid nagu THP-1 robustsed ja sobivad rakuliinid simuleerimaks primaarsete rakkude vastet stiimulitele. THP-1 pole mitte ainult kiirelt paljunev ja stabiilne vaid lihtsasti käsitlev ja kättesaadav. Rakuliini stabiilsus ja järjepidevus, vaatamata mõningatele erinevustele primaarsetest rakkudest, võimaldab hästi simuleerida rakkuvastet *in vitro* ning võrrelda erinevate stiimulite ning keskkondade efekti. (Chanput, Mes, ja Wichers 2014)

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Eesmärk

Uurimustöö eesmärk oli kirjeldada PEG(5000)-PCL(10000) polümersoomide sobivust erinevate hüdrofiilsete ja hüdrofoobsete ravimite transpordivektorina, kasutades THP-1 rakuliini ning inimese primaarseid monotsüüte mudelitena. Selleks kasutati RNA ekspressiooni analüüsi ning H3K4me3 ja H3K27ac epigeneetiliste markerite analüüsi CHIP-qPCR meetodiga.

2.2 Materjalid ja meetodid

2.2.1 Polümersoomide süntees

Töös kasutati PEG-PCL polümersoome PEG(5000)-PCL(10000) polümeeridest. Polümersoomide sünteesiks lahustati glaasanumas (7 mL Clear Vial, Merck, Saksamaa) 0,5 mg FAM-PEG-PCL (mPEG(5000)-b-PCL(10000), Advanced Polymer Materials Inc., USA) ja 4,5 mg PEG-PCL polümeeri 300 µl atsetoonis (Merck, Saksamaa). Atsetoon aurustati lämmastikgaasiga klaasi aeglaselt keerutades, jättes klaasi põhja ~1cm laiuse kuivanud polümeeri ala. Klaas jäeti 15. minutiks kuivama, misjärel lisati 0,5 ml lämmastikuga puhastatud PBS-i (*Phosphate Buffered Saline*, Lonza, Šveits). Klaasi vaheldumisi kuumutati 60°C vesivannis ja sonikeeriti (*Sonorex Super RK52*, Bandelin, Saksamaa), kuni lahus oli kaotanud hägususe ja oli läbipaistev. Lahus kanti seejärel sefaroos-kolonnile (Sephacrose 4B, Merck, Saksamaa), kus lahust filtreeriti fosfaadiga puhverdatud soolalahuse (PBS – *Phosphate Buffered Saline*, Merck, Saksamaa) voolu abil. Korjati 0,5 ml filtreeritud lahust uude 1,5 ml tuubi ning osakesi hoiustati 4°C.

Sünteesitud polümersoomide suuruse ja kuju kontrollimiseks vaadeldi osakesi elektronmikroskoobis (Tecnai 10 TEM, Philips, Holland). Selleks lahjendati polümersoomi lahust PBS-is (1/20) ning tõsteti 10 µl vaatlusalusele (*Formvar/Carbon, 300 Mesh Cu*, Agar Scientific, Inglismaa) kuivama 1 minutiks. Osakesi värviti 0,75% fosfowolfram happega mille pH oli viidud 7-ni 1M NaOH-ga (Merck, Saksamaa) ning alust kuivatati ettevaatlikult paberiga ja lasti üleöö kuivada. Seejärel vaadeldi polümersoome elektronmikroskoobiga vastavalt tootja juhiste.

Erinevate ravimite pakendamisel võeti arvesse ravimite IC50 väärtusi. Ravimite Vorinostat (Merck, USA) ja JQ-1 (Merck, USA) kapseldamisel kasutati 200 µM atsetooni lahust polümeeri lahustamisel, C646 (Merck, USA) puhul 2 mM lahust. Ravimeid sisaldavaid atsetooni lahuseid kasutati esmases polümeeride lahustamise etapis ning nende lisamisega sünteesi protokoll ei muutunud. Ravimite kontsentratsiooni polümersoomides kontrolliti Nanodrop-i abil (ND-2000, Thermo-Fisher, USA). Selleks loodi kalibreerimisgraafik nelja teadaoleva kontsentratsiooniga (Vorinostat/JQ-1 200 µM, 100 µM, 50 µM ja 25 µM; C646 0,5 nM, 0,1 mM, 0,02 mM ja 0,004 mM) (Merck, Saksamaa) UV-Vis spektris ning võrreldi mõõtmistulemusi kapseldatud ravimi neeldumisega. Vastavalt kaliibergraafikule määrati kapseldatud ravimi kontsentratsioon lahuses.

2.2.2 THP-1 rakkude kasvatamine ja diferentseerimine

THP-1 rakuliin kasvatati RPMI 1640 (Corning, USA) söötmel, mis sisaldas 10% 56°C töödeldud veise loote seerumit (FBS - *Fetal Bovine Serum*, Merck, Saksamaa), penitsilliini (100 IU/ml) ja streptomütsiini (100 µg/ml) (Lonza, Šveits). Rakud kasvasid inkubaatoris (MCO 18-AIC, Sanyo, Jaapan) 37°C ja 5% CO₂ tasemel veega küllastunud keskkonnas. Rakkude ümberkõlvamisel tõsteti sööde koos rakkudega tassilt (10/30 cm diameeter) (CELLSTAR 100x20 mm, greiner bio-one, Austria) falkon katsutisse (15/50 ml) ning fuugiti 300 rcf juures 10 minutit 37°C (Eppendorf 5810 R, rootor A-4-62, Saksamaa). Supernatant aspireeriti ning lisati 5 ml uut söödet. Rakud resuspendeeriti ning võeti 10 µl lahust rakkude lugemiseks. Rakkudele lisati 90 µl trüpaan sinise lahust (0,4 % *Trypan Blue solution*, Merck, Saksamaa) ja loeti loenduskambris (Bürker, Saksamaa) värvimata ehk elus rakke. Sobiva rakutiheduse saavutamiseks külvati rakud uutele tassidele kontsentratsiooniga 10⁵ rakku/ml.

Rakkude diferentseerimiseks lisati rakkudele forbol 12-müristaat-13-atsetaati (10 ng/ml) (PMA - *phorbol 12-myristate 13-acetate*, Merck, Saksamaa) ning inkubeeriti 24h. Seejärel lisati lipopolüsahhariidi (15 ng/ml) (*Escherichia Coli*, Merck, Saksamaa) ning inkubeeriti järgmised 24h. Pärast 48h diferentseerimist eemaldati sööde ning pesti rakke 2x 5ml PBS-iga. Pärast pesemist lisati 0,25% trüpsiini lahust (*Trypsin-EDTA solution*, Merck, Saksamaa) vastavalt tassi suurusele (0,5 ml 6-kannuga, 2 ml 10cm) (CELLSTAR 100x20 mm, greiner bio-one, Austria) ning inkubeeriti 37°C ja 5% CO₂ 5 minutit. Seejärel tõsteti rakud 15 ml falkon

katustisse ning pesti tassi söötmega, vajadusel kraabiti allesjäänud rakud lahti (*Cell lifter*, Corning, USA). Rakud fuugiti 300 rcf 10 minutit ning sööde aspireeriti, asendati uuega ning rakud resuspendeeriti. Seejärel loendati rakud lugemiskambris trüpaan sinise värvinguga. Diferentseerunud rakke kasutati edasi vastavalt katseplaanile.

2.2.3 Polümersoomide fagotsüteerimine THP-1 rakkudes

Kontrollimaks polümersoomide fagotsüteerimist vaadeldi rakke neljas ajapunktis fluorestseeruvate markeritega. Käivitati THP-1 diferentseerimise katse 24-kannuga plaadil (*Greiner CELLSTAR*, Merck, Saksamaa). Selleks pandi 10^5 rakku kasvama 1 ml söötmes iga kannu kohta, kusjuures iga kannu põhja paigutati 12 mm diameetriga katteklaas (*Microscope Cover Glasses 12mm* \varnothing , Marienfeld-Superior, Saksamaa). Pärast 48h diferentseerimise möödumist eemaldati sööde ning asendati 300 μ l uue söötmega, lisades polümersoome neljas erinevas ajapunktis (4h, 2h, 1h ja 0,5h). Igas ajapunktis lisati FAM märgistatud polümersoome, et lõppkontsentratsioon söötmes oleks 1/20. Pärast inkubeerimist eemaldati sööde ning pesti 3x 0,5 ml PBS-iga. Seejärel fikseeriti rakud 0,5 ml 4% paraformaldehüüdiga (Merck, Saksamaa) PBS-is ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Rakke pesti seejärel 3x 0,5 ml PBS-iga ning permeabiliseeriti 300 μ l 0,2% Triton-X (Merck, Saksamaa) lahusega PBS-is 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke 3x 0,5 ml 0,05% Tween-20 lahusega (PBST) (Merck, Saksamaa) ning blokeeriti 5% BSA (Merck, Saksamaa), 5% kitse seerumi (Merck, Saksamaa) ning 5% FBS (Merck, Saksamaa) PBST blokeerimis lahusega tund aega toatemperatuuril. Blokeerimislahusest lahjendati 1/5 inkubeerimislahus. Blokeerimislahus eemaldati ning asendati 250 μ l primaarse antikeha (*Rat anti-Mouse CD11b*, Becton Dickinson, USA) 1/200 inkubeerimislahusega ning inkubeeriti tund aega toatemperatuuril. Lahus eemaldati, pesti 3x 0,5 ml PBST lahusega ning lisati 200 μ l sekundaarse antikeha (*Goat anti-Rat IgG Alexa Fluor 647*, Thermo-Fisher, USA) 1/500 lahjendust inkubeerimislahuses ning inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel eemaldati sekundaarse antikeha lahus, pesti 3x 0,5 ml PBST ning 3x 0,5 ml PBS-iga ja lisati 250 μ l 1/1000 DAPI (Merck, Saksamaa) lahust PBS-is ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril pimedas. Järgnes viimane pesu 3x 0,5 ml PBS. Võeti alusklaas (SUPERFROST PLUS, Thermo-Fisher, USA), kuhu lisati 15 μ l lahust (*Fluoromount-G*, Electronic Microscopy Sciences, USA) ning tõsteti katteklaasid kannudest lahusele, et rakud jääksid kahe klaasi vahele. Seejärel lasti klaasidel üleöö kuivada ning katteklaaside ääred lakiti küünelakiga, et proovid liigselt ei kuivaks. Klaase hoiustati 4°C juures pimedas. Rakkude

vaatlemiseks kasutati konfokaal mikroskoopi (Olympus FV1200MPE, Olympus, Jaapan), ja *FV10-ASW4.2 viewer/Imaris software/Fiji ImageJ* programme.

THP-1 diferentseerimisel tekkivat rakupopulatsiooni võrreldi läbivoolutsütomeetriaga (BD Accuri C6, Becton Dickinson, USA) ajapunktidel 1h ja 4h. Selleks kasvatati rakke tassi asemel 14 ml polüpropüleen tuubides (Corning, USA). Igasse tuubi tõsteti 1 ml söödet ning 10^5 rakku. Pärast 48h diferentseerimist tõsteti rakud 1,5 ml tuubidesse ja fuugiti 10 min 300 rcf toatemperatuuril (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Saksamaa), misjärel asendati sööde ning lisati FAM sildistatud polümersoomid vastavatel ajapunktidel. Rakke inkubeeriti 37°C 5% CO₂ veega küllastunud keskkonnas 14 ml polüpropüleen tuubides. Pärast inkubeerimist tõsteti rakud 1,5 ml tuubidesse ning fuugiti. Supernatant eemaldati ning rakke pesti 3x 0,5 ml PBS-iga ja supernatant eemaldati. Järgnevalt inkubeeriti rakke tund aega 1/200 anti-CD11b antikeha lahusega (*CD11b Monoclonal Antibody (M1/70)*, Thermo-Fisher, USA), millele järgnes 3x 0,5 ml PBST lahusega pesemine ja sekundaarse antikehaga värvimine. Lisati 200 µl sekundaarse antikeha (*Goat anti-Rat IgG Alexa Fluor 647*, Thermo-Fisher, USA) 1/500 lahjendust inkubeerimislahuses ning inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril pimedas. Proove pesti 3x 0,5 ml PBST ja seejärel PBS-iga. Pärast sekundaarse antikehaga värvimist jäeti rakud PBS-i ning viidi läbi voolutsütomeetria analüüs vastavalt tootja juhiste programm *C6 Analysis Software* (Becton Dickinson, USA).

2.2.4 Ekspressioonianalüüs

Võrdlemaks geenide ekspressiooni erinevusi stimuleeritud ja stimuleerimata rakkude vahel teostati THP-1 rakkude diferentseerimine ja RNA eraldamine. THP-1 rakke diferentseeriti ja samaaegselt stimuleeriti ravimite Vorinostat, JQ-1 ja C646 kapseldatud ja kapseldamata ravimite kontsentratsioonidega 6-kannulistest plaatides (*6-Well Cell Culture Plate*, greiner bio-one, Austria) 37°C 5% CO₂ veega küllastunud keskkonnas. Vastavalt ravimi IC₅₀ väärtusele olid uuritavad ravimite kontsentratsioonid Vorinostatil 0,32 nM, 1,6 nM ning 8 nM, JQ-1 puhul 8 nM, 40 nM ning 200 nM ja C646 puhul 160 nM, 800 nM ning 4000 nM. Pärast 48h diferentseerimise lõppu tõsteti mitte-adherentsed rakud koos söötmelega 15 ml falkon katsutisse. Adhereerunud rakke töödeldi trüpsiiniga ja vajadusel kaabiti tassilt ning suspendeeriti söötmesse, misjärel tõsteti rakud katsutisse. Rakke fuugiti 300 rcf 10 min toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes ning loeti tihedus. Vähemalt 10^5

rakku jäeti RNA eraldamiseks, ülejäänud tõsteti kõrvale ChIP analüüsiks. Rakud fuugiti ning eraldati sööde. Lisati 0,5 ml QIAzol lahust (QIAGEN, Holland) ning tuube segati. Lisati 100 µl kloroformi (Merck, Saksamaa) ning tuube segati raputades ja lasti seista toatemperatuuril 5 minutit. Tuube fuugiti 12 000 ref 4°C 15 minutit ning vesifaas tõsteti uude tuubi, lisati 250 µl 70% EtOH lahust ning tõsteti Rneasy MinElute kolonnidele. Edasine puhastamine toimus tootja juhiste järgi (*Rneasy Micro Kit*, QIAGEN, Holland). Saadud RNA kontsentratsiooni mõõdeti Nanodrop-iga ja vajadusel külmutati -80°C. RNA ahelale komplementaarse DNA (cDNA) sünteesimiseks hoiti proove jääl ning lisati pöördtranskriptsiooni (RT) reaktsiooni jaoks RNA proovile Oligo(dT)18 praimer (TAG Copenhagen, Taani) ja nukleotiidide segu (Thermo Scientific, USA) (Tabel 1.). Proove inkubeeriti 5 minutit 65°C juures ning asetati tagasi jääle ja lisati 5x FBS, DTT, Ribolock RNase Inhibitor ja SuperScriptIII (Tabel 1.). Proove inkubeeriti 60 minutit 50°C ja seejärel 15 minutit 70°C termomikseril (*Thermomixer Comfort*, Eppendorf, Saksamaa), misjärel proovid vajadusel külmutati -20°C.

Tabel 1. cDNA sünteesiks kasutatud ainete hulgad.

Komponent	Kogus 1 proovi kohta (µl)	Tootja
RNA	11	-
100 µM Oligo(dT)18	1	Thermo-Fisher, USA
10 mM dNTP segu	1	Thermo-Fisher, USA
5x FSB	4	Thermo-Fisher, USA
DTT 0,1 M	1	Thermo-Fisher, USA
Ribolock	1	Thermo-Fisher, USA
SuperScript III	1	Thermo-Fisher, USA

cDNA sünteesile järgnes reaajas kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (RT-qPCR). Selleks segati cDNA proovid 2xSYBR Mix-i, F+R praimerite (metabion, Saksamaa) (Tabel 3.) ja mQ veega (Tabel 2). Reaktsioon viidi läbi 384-kannuga plaadil (*384-Well Plate FULL*, BIOplastics, Holland) koos kattedekilega (*Opti-Seal Optical Disposable Adhesive*, BIOplastics, Holland) 10 µl reaktsiooniseguga *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA) masinas. Reaktsioon viidi läbi kolmes tehnilises korduses, kasutades referentsgeenidena beeta 2 mikroglobuliini (B2M) ja beeta aktiini (ACTB). Kasutatud programm on nähtav Tabelis 4.

Tabel 2. RT-qPCR segu

Komponent	Kogus 1 proovi kohta (µl)	Tootja
Lahjendatud cDNA	1	-
2xSYBR Master Mix	4,5	Thermo-Fisher, USA
mQ H2O	4	-
5 µM F+R praimerid	0,5	Metabion, Saksamaa

Tabel 3. Praimerite järjestused

Praimer		Järjestus 5' 3' suunas
CCL2	F	AAA CTG AAG CTC GCA CTC TCG C
	R	AGG TGA CTG GGG CAT TGA TTG
IL1b	F	GTG GCA ATG AGG ATG ACT TGT TCT
	R	TGT AGT GGT GGT CGG AGA TTC G
SOCS3	F	GGA ATG TAG CAG CGA TGG AA
	R	CCT GTC CAG CCC AAT ACC TGA
ACTB	F	CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA
	R	CGG CCA CAT TGT GAA CTT TG

Tabel 4. RT-qPCR programm

Reaktsiooni etapp	Kestvus	Temperatuur	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	10 minutit	95	1
Denaturatsioon	15 sekundit	95	40
Paljundamine	1 minut	60	
Dissotsiatsioon ja sulamiskõver	15 sekundit	95	1
	1 minut	60	1
	15 sekundit	95	1

2.2.5 Kromatiini analüüs

Kontrollimaks ravimite mõju kromatiinile teostati kromatiini immuunsadestamise (*Chromatin ImmunoPrecipitation* - ChIP) analüüs kasutades H3K4me3 ja H3K27ac markereid. Töö etapid teostati jäa peal. Diferentseerimisest saadud rakkudele lisati söödet kuni maht oli 1 ml. Seejärel lisati 1/10 mahust (100 µl) Formaldehuudi lahust (Tabel 5.), tuube segati ning inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit. Lisati 1/10 mahust (110 µl) 1,25 M glütsiini (Merck, Saksamaa) lahust ning inkubeeriti veel 10 minutit toatemperatuuril. Tuube seejärel fuugiti 10 minutit 500 rcf 4°C ja supernatant eemaldati ning asendati 1 ml külma PBS-iga. PBS pesuetappi korrati ning supernatant eemaldati. Vajadusel rakud välk-külmutati ning hoiti -80°C. Sellele järgnes rakkude lüüsimine. Rakud resuspendeeriti 500 µl NCP1 (Tabel 5.) lahuses, fuugiti 7 minutit 1000 rcf 4°C ning supernatant eemaldati. Seejärel korrati etappi NCP2 (Tabel 5.) lahusega. Lisati 115 µl Lüüsiipuhvrit (Tabel 5.) ning proove inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril enne kui proovid tagasi jääle tõsteti. Järgnes proovide sonikeerimine 2x10 + 4 minutit külmas vees,

pauside ajal proove 15 000 rcf mõned sekundid fuugides. Proove fuugiti seejärel 10 minutit 15 000 rcf 4°C ning supernatant koos kromatiiniga tõsteti uude tuubi, sade visati ära.

Tabel 5. Kasutatud lahused

Lahus	Komponent	Kogus 1 proovi kohta (µl)	Tootja
Formaldehüüd	0,5 M Hepes pH 7,3	10	Merck, Saksamaa
	5M NaCl	2	Thermo-Fisher, USA
	0,5 M EDTA	0,2	Merck, Saksamaa
	0,1 M EGTA	0,5	Merck, Saksamaa
	16% Formaldehüüdi lahus	68,6	Thermo-Fisher, USA
	mQ H2O	18,7	-
NCP1 1	0,5 M EDTA	10	Merck, Saksamaa
	0,1 M EGTA	2,5	Merck, Saksamaa
	10% Triton X-100	12,5	Merck, Saksamaa
	mQ H2O	475	-
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	5	Thermo-Fisher, USA
	Naatrium Butüraat ACROS Organics	5	Thermo-Fisher, USA
NCP2 2	0,5 M EDTA	1	Merck, Saksamaa
	0,1 M EGTA	2,5	Merck, Saksamaa
	0,5 M Hepes pH 7,3	10	Merck, Saksamaa
	5M NaCl	20	Thermo-Fisher, USA
	mQ H2O	466,5	-
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	5	Thermo-Fisher, USA
	Naatrium Butüraat ACROS Organics	5	Thermo-Fisher, USA
Lüüsi puhver	0,5 M EDTA	2,3	Merck, Saksamaa
	1M Tris	2,3	Thermo-Fisher, USA
	10% NP-40	5,75	Thermo-Fisher, USA
	10% SDS	5,75	Merck, Saksamaa
	mQ H2O	98,9	-
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	1,15	Thermo-Fisher, USA
	Naatrium Butüraat ACROS Organics	1,15	Thermo-Fisher, USA

ChIP analüüsiks kasutati pipeteerimismasinat (*Ipstar SX-8G*, diagenode, Belgia) ja selle *ChIP Ipure16 100vol* programmi. Selleks segati kokku elueerimis, blokeerimis, radioimmunosadestamise analüüsi (RIPA), Tris-EDTA (TE) ja Triton-X puhvrid (Tabel 6.). Kasutati 3 µl lamba küüliku-vastaste antikehadega magnetkuule (*Dynabeads™ M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG*, Thermo-Fisher, USA), mida eelnevalt blokeeriti 3x 200 µl blokeerimislahusega pestes ning seejärel 10 µl blokeerimislahuses üles võttes. Samuti segati kokku antikeha lahused 98 µl BSA ja 2 µl antikeha lahusega. Kasutati kolme antikeha – H3K4me3 (*Anti-H3K4me3 rabbit polyclonal*, Merck, Saksamaa), H3K27ac (*Anti-Histone H3 antibody - ChIP Grade rabbit*, abcam, USA) ja IgG (*Normal Rabbit IgG Polyclonal Antibody*, Merck, Saksamaa). Valmistati kromatiini segu 33,3 µl kromatiini, 25 µl Triton-X lahuse ja 42 µl TE puhvriga ning katse teostati skeemi alusel (Tabel 7.) 200 µl 8 tuubi ribades. Programmi esimene etapp kestis ~17 tundi, misjärel lisati esimesse ritta kontroll ehk immuunsadestamata 20% proovi lahus elueerimispuhvril. Seejärel inkubeeriti masinas proove ~4,5 tundi, misjärel

magnetväljas magnetkuule sadestades koguti supernatant uutesse tuubidesse. Proovidele lisati 5 µl RNase A (Thermo-Fisher, USA) ning inkubeeriti 60 minutit 37°C 700 rpm loksutil. Seejärel lisati 5 µl Proteinase K (Merck, Saksamaa) ning inkubeeriti 60 minutit 55°C 700 rpm loksutil. Pärast inkubatsioone puhastati proovid *DNA Clean & Concentrator Kit*-iga (Zymo Research, USA) vastavalt tootja juhenditele. Saadud DNA hoiti -20°C.

Tabel 6. Kasutatud lahused

Lahus	Komponent	Kogus 1 proovi kohta (µl)	Tootja
Elueerimis puhver	1 M Tris pH 8,0	1	Thermo-Fisher, USA
	0,5 M EDTA	0,2	Merck, Saksamaa
	10% SDS	10	Merck, Saksamaa
	mQ H ₂ O	88,8	-
Blokeerimis puhver	Probumin®	4,04 mg	Merck, Saksamaa
	mQ H ₂ O	808	-
RIPA puhver	0,5 M HEPES-KOH pH 7,6	40	Merck, Saksamaa
	5 M LiCl	40	Merck, Saksamaa
	0,5 M EDTA	0,8	Merck, Saksamaa
	10% NP-40	40	Thermo-Fisher, USA
	mQ H ₂ O	28	-
	10% Naatrium deoksükolaat	251,2	Merck, Saksamaa
	10 ⁶ U/ml Protease Inhibitor Cocktail (100x)	5	Thermo-Fisher, USA
Naatrium Butüraat ACROS Organics	5	Thermo-Fisher, USA	
TE puhver	0,5 M EDTA	0,084	Merck, Saksamaa
	1 M Tris pH 8,0	0,42	Thermo-Fisher, USA
	mQ H ₂ O	41,5	-
Triton-X puhver	10% Triton-X-100	10,83	Merck, Saksamaa
	10% Naatrium deoksükolaat	1,08	Merck, Saksamaa
	10 ⁶ U/ml Protease Inhibitor Cocktail (100x)	2,16	Thermo-Fisher, USA
	Naatrium Butüraat ACROS Organics	0,25	Thermo-Fisher, USA
	TE puhver	10,85	-

Tabel 7. ChIP katse skeem masinas

Rida	Lahus	Kogus 1 proovi kohta (µl)
12	Elueerimis puhver	100
11	RIPA	100
10	RIPA	100
9	RIPA	100
8	RIPA	100
7	Kromatiini lahus	100
6	Antikeha lahus	100
5	Blokeerimis puhver	50
4	Blokeerimis puhver	50
3	Magnetkerad	10
2		
1	INPUT järgmisel päeval	100

Pärast puhastatud DNA saamist viidi läbi ChIP proovide RT-qPCR reaktsioon. Selleks kasutati identseid komponente ekspressioonianalüüsis väljatoodutele, kuid erinesid praimerid (Tabel 8.) ning reaktsiooni programm (Tabel 9.).

Tabel 8. ChIP RT-qPCR parimerid

Praimer		Järjestus 5' 3' suunas
CCL2	F	TGT GGC CTG AAG GTA AGC TG
	R	GGT GCC ATT AAG CCC AGA CT
IL1b	F	TCT GCG TCA AAG CTG GGA TT
	R	CCA AAA ATG CTG CCT CCA CC
SOCS3	F	GGT CCC GAA TCG AAG TCT CC
	R	CGA AGG CTC CTT TGT GGA CT
ACTB	F	GCT AAG TGT GCT GGG GTC TT
	R	AAC ACT GGC TCG TGT GAC AA
MYOD1	F	GTA GGA GAG GCG GGA GAA CT
	R	TAG GTC TGC GAG GGT CTC AC

Tabel 9. ChIP RT-qPCR programm

Reaktsiooni etapp	Kestvus	Temperatuur	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	10 minutit	95	1
Denaturatsioon	15 sekundit	95	45
Paljundamine	1 minut	60	
Dissotsiatsioon ja sulamisköver	15 sekundit	95	1
	1 minut	60	1
	15 sekundit	95	1

2.2.6 Primaarsete rakkude ekspressioonianalüüs

Uurimaks pakendatud ja pakendamata ravimite mõju primaarsetele inimese makrofaagidele kasutati tervelt 25-aastaselt doonorilt võetud vereproove millest eraldati perifeerse vere mononukleaarrakud (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Pärast vere võtmist EDTA tuubidesse (*BD Vacutainer K2E 18.0 mg*, Becton Dickinson, Inglismaa) pipeteeriti veri 50 ml falkon katsutitesse ning lisati võrdne kogus PBS-i. Järgnevalt tõsteti veri ettevaatlikult 50 ml falkon katsutisse, kuhu oli eelnevalt lisatud 10 ml Ficolli lahust (Ficoll 400, Merck, Saksamaa), ilma et kihid seguneks. Proovi tsentrifuugiti 30 minutit 400 rcf toatemperatuuril ilma masinat pidurdamata, et kihid ei seguneks. Pärast fuugimist tõsteti lümfotsüütidega pealmine vesifaas uude falkon katsutisse ning lisati PBS-i kuni lahuse maht oli 50 ml. Rakke seejärel fuugiti 10 minutit 300 rcf toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Rakud

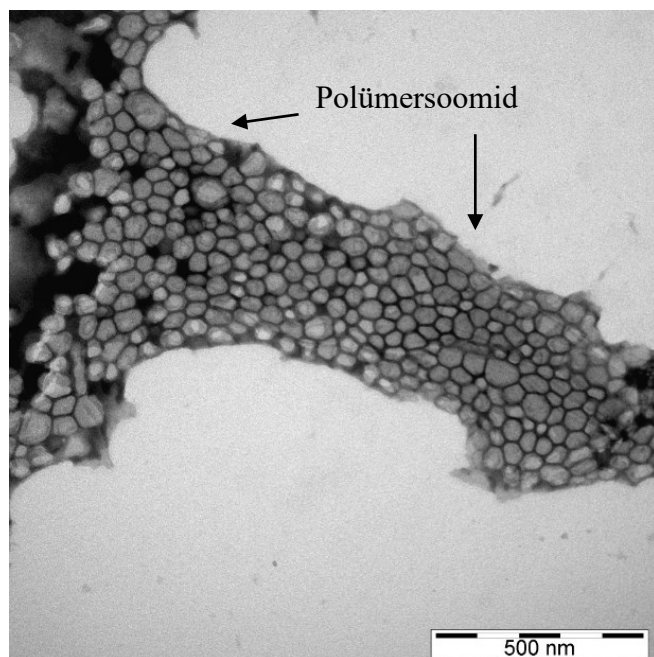
suspendeeriti seejärel 50 ml 0,5% BSA 2mM EDTA lahuses ning võeti 10 µl rakke loendamiseks trüpaan sinise värvinguga. Rakke fuugiti 10 minutit 300 rcf toatemperatuuril, eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 5 ml RPMI 1640 söötmes mis sisaldas 10% 56°C töödeldud veise loote seerumit, penitsilliini (100 IU/ml) ja streptomütsiini (100 µg/ml). Rakud jaotati 24-kannuga plaadile $1,5 \times 10^6$ rakku/ml/kann ning inkubeeriti 2 tundi 37°C, et lasta monotsüütidel kinnituda kannu põhja. Pärast inkubeerimist aspireeriti sööde ning selles suspendeeritud mitteadhereerunud rakud. Kannudesse lisati 1 ml söödet koos 50 ng/ml granulotsüüdi makrofaagi kolooniat stimuleeriva faktori (GM-CSF) ning katsele vastavate polümersoomide (võrdne hulk kapseldatud ravimiga võrreldes), DMSO (1 µl) ja JQ-1 ravimi kapseldatud ja kapseldamata kontsentratsioonidega (8 nM, 40 nM ning 200 nM). Rakke kasvatati 6 ööpäeva, vahetades kolmandal ja viiendal päeval söödet ning lisades kogu mahu tsütokiini ja stimulante. Pärast stimulatsiooni aspireeriti kannudest sööde ning pesti 0,5 ml toasooja PBS-iga. Lahus aspireeriti, lisati 0,5 ml QIAzol lahust ning proove inkubeeriti 5 minutit. Seejärel tõsteti lahus 1,5 ml tuubidesse ning katsega jätkati identselt THP-1 rakkude ekspressioonianalüüsi ülesehitusele, kasutades samu lahuseid, reagente ja programme.

2.3 Tulemused

2.3.1 Polümersoomid moodustuvad ühtlaselt, omandavad ravimeid ning on rakkudele omastatavad

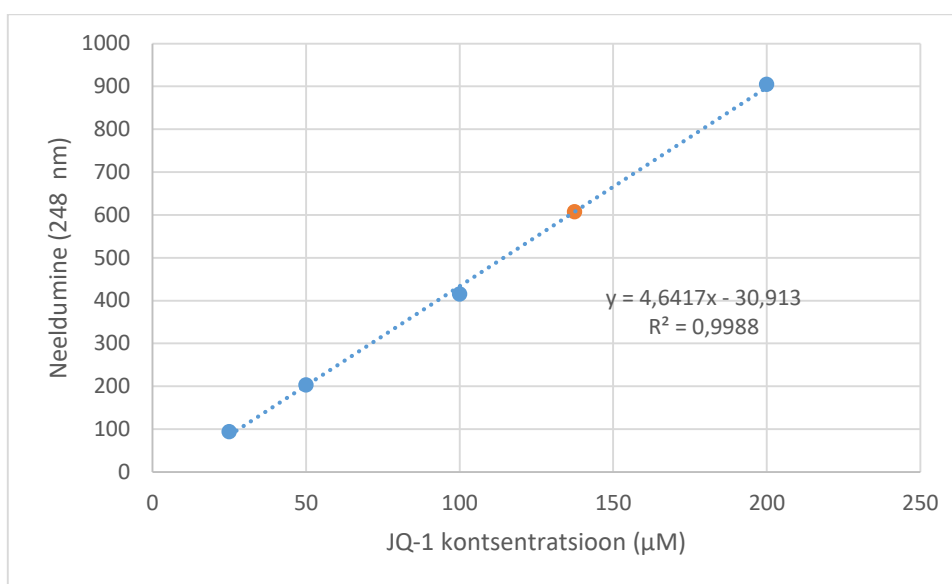
Kinnitamaks polümersoomide ühtlase kuju, ravimi säilitavuse ning fagotsüteeritavuse rakkude poolt, uuriti polümersoomide füüsikalisi omadusi. Selleks vaadeldi osakesi transmissioonelektronmikroskoobis, mõõdeti ravimi kontsentratsiooni pärast kapseldamist ning teostati immunofluorestsentsvärvimine polümersoomide lokaliseerimiseks THP-1 rakkudes.

Polümersoomide vaatlemisel mikroskoobis ilmnes ümar kuju ja suurus. Vaatamata kuivamisest tingitud deformatsioonile olid osakesed ühtlased ning samas ~100 nm suurusjärgus. Puudusid artefaktid, tuubulid ja muud mittesoovitavad struktuurid. (Joonis 9.)



Joonis 9. PEG-PCL polümersoomide morfoloogia TEM mikroskoobis. PEG-PCL polümersoomid sünteesiti PEG(5000)-PCL(10000) polümeerist ning puhastati sefaroos kolonnis. Polümersoome värviti 0,75% fosfowolfram happega ja kuivatati. Osakesi vaadeldi TEM mikroskoobiga, kust on näha hulk polümersoome ühtlase kuju ja suurusega.

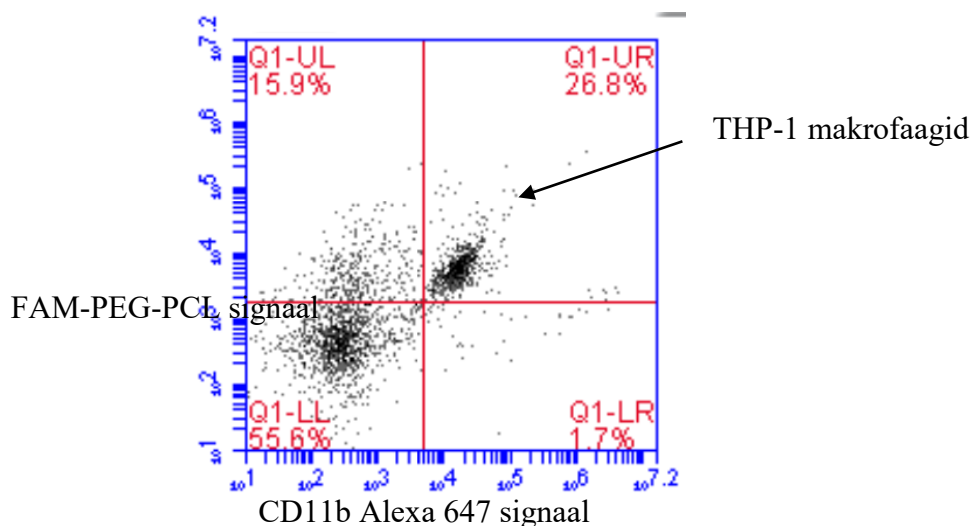
Pärast polümersoomide sünteesi edukuse kinnitamist sooviti näha ravimi kapseldumist ja selle saagikust. Mõõdeti ravimi kontsentratsiooni polümersoomis vaba ravimi kaliibergraafikuga võrreldes. UV-Vis spektris mõõtes oli nähtav ravimi kapseldamine ~70% efektiivsusega. Kapseldamise alguses olnud 200 µM JQ-1 lahusest oli pärast sünteesi ning kolonn puhastamist alles jäänud ~137 µM JQ-1 kontsentratsiooniga polümersoomid. (Joonis 10.) Sarnased tulemused saavutati kõigi kolme ravimiga.



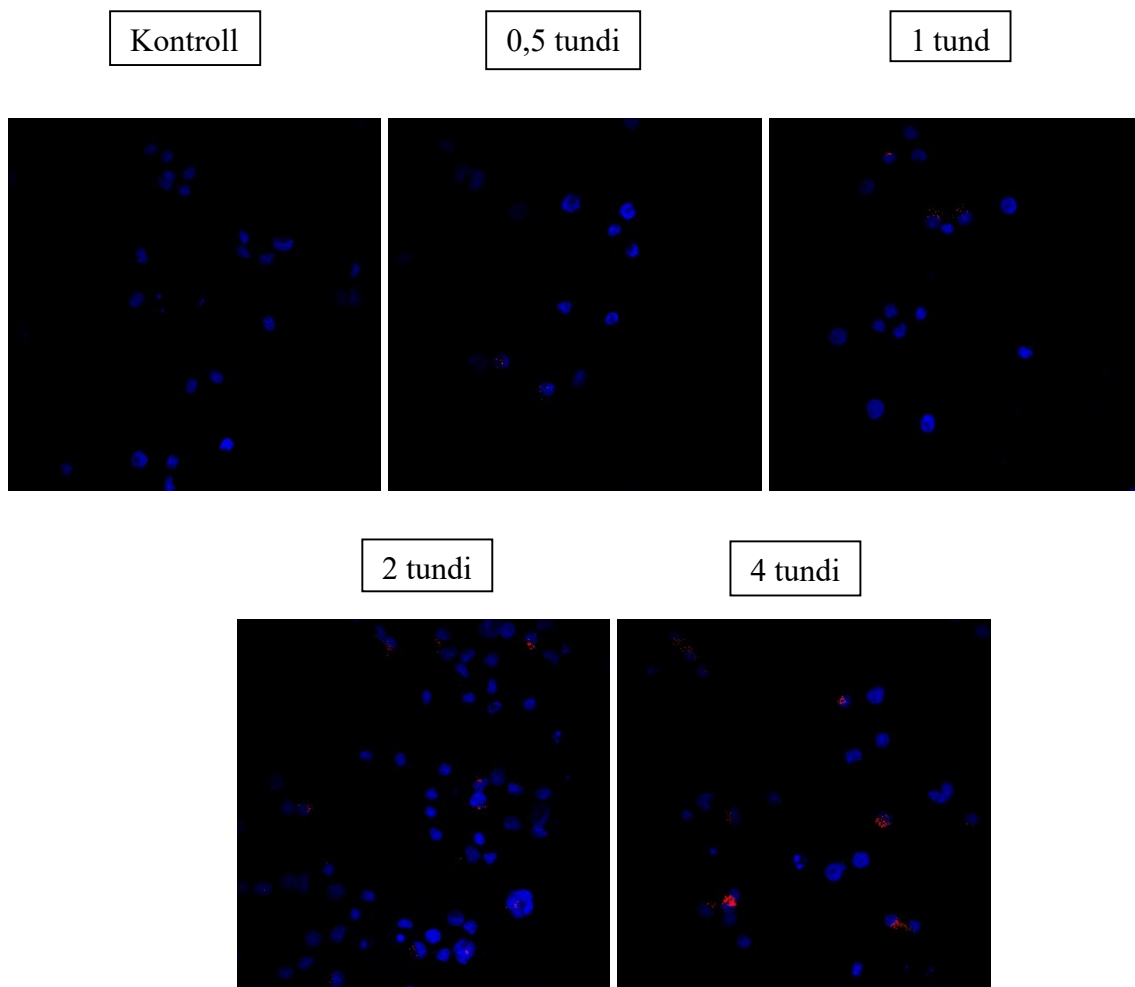
Joonis 10. JQ-1 ravimi kapseldamise saagikus UV-Vis neelduvuse alusel. Ravimi JQ-1 200 µM lahuse lahjendustest *Nanodrop*-iga 248 nm lainepikkusel tehtud kaliibergraafik. Neli lahjendust kontsentratsioonidega 200, 100, 50 ja 25 µM. Uuritav polümersoom valmistati 300 µl JQ-1 200 µM lahusega atsetoonis. Sinisega on näidatud kaliibergraafik ning oranžiga uuritav kapseldatud ravimiga lahus.

Olles kontrollinud nii polümersoomide korrektset moodustumist ja ravimi kapseldamise saagikust sooviti viimaks kinnitada polümersoomide fagotsüteerimist ning transporti rakkudesse, välistamaks võimaliku valesignaali rakupinnal lagunenud polümersoomist. Selleks teostati diferentseerunud rakkude läbivoolutsütomeetria (Joonis 11.) immunofluorestsentsvärvimine ning võrreldi fagotsüteeritud polümersoomide hulka neljas erinevas ajapunktis. Oli näha selget polümersoomide hulga suurenemist aja möödudes ja makrofaagide küllastumist polümersoomidega. Kontrollgrupi taustasignaali võrreldes oli 4h ajapunkt omastanud ~72 korda rohkem signaali. Samuti olid suured erinevused ajapunktide

vahel, kus signaali tugevus poole tunni möödudes oli taustaga võrreldes kolmekordistunud, pool tundi hiljem aga kaheksakordistunud. Kontrollgrupis puudus etteaimatavalt polümersoomi signaal, esines mittespetsiifilist tausta. Märkimisväärne oli polümersoomide signaali kontsentreerumine, kus signaal oli tugev, kuid mitte igas rakus lokaliseerunud. (Joonis 12.)



Joonis 11. Diferentseerunud THP-1 populatsiooni kirjeldamine. PMA ja LPS stimulatsiooniga saadud THP-1 makrofaagi laadsed rakud märgistati anti-CD11b primaarse ja Alexa 647 sekundaarse antikehaga. Võrreldi signaali suurst ning rakkude suuruse/kuju jaotust läbivoolutsütomeetrias. Mõõdeti nii adherentseid kui mitteadherentseid rakke.



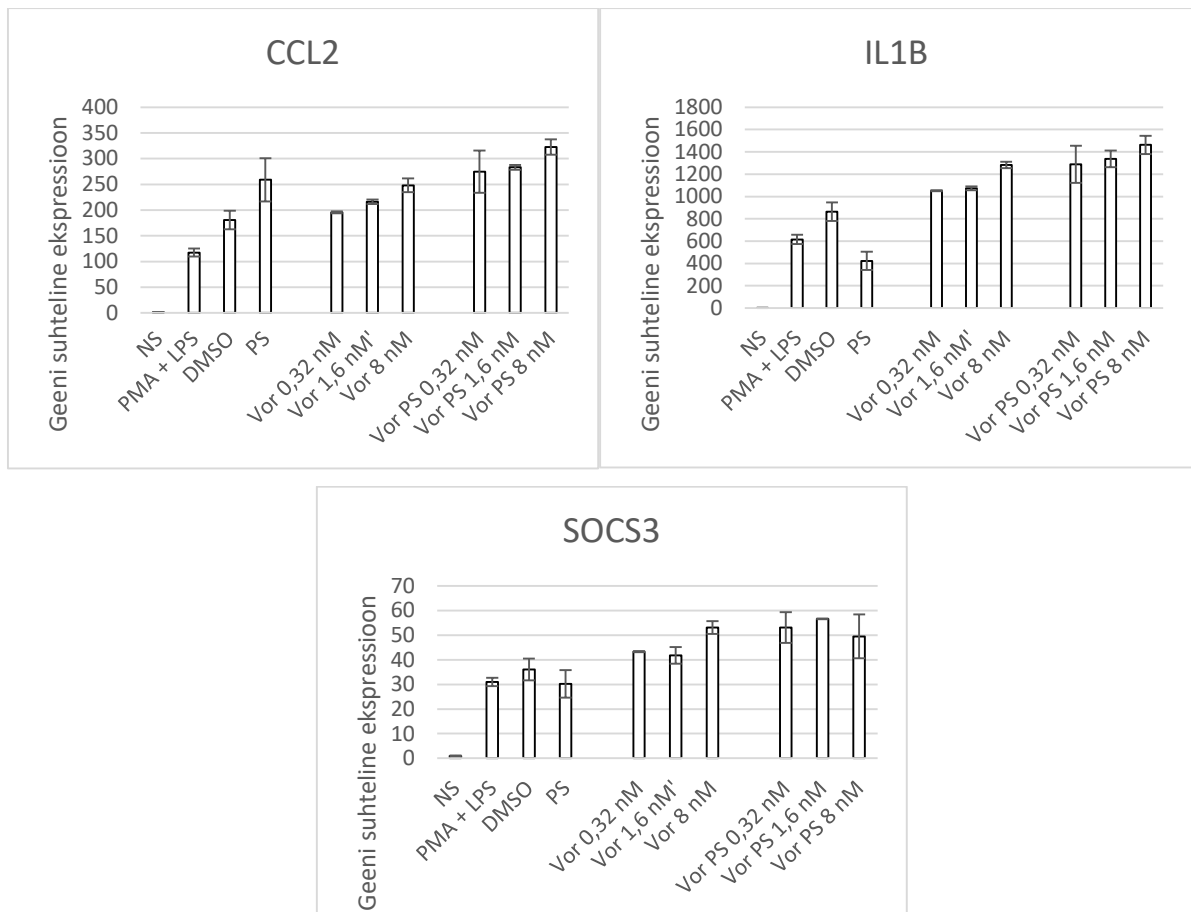
Joonis 12. DAPI ja Anti-FAM immuonoflorestsents värvitud THP-1 rakud FAM märgistatud polümersoomidega. THP-1 rakke diferentseeriti ning seejärel inkubeeriti 1/20 FAM-märgistatud polümersoomi lahusega neljas ajapunktis (0.5, 1, 2 ja 4 tundi). Rakud läbisid immuonoflorestsents värvimise anti-FAM markeri (punane) ning DAPI-ga (sinine). Punase anti-FAM signaali kasvu järgi ajapunktide jooksul on näha polümersoomide kiiret omastamist rakkudesse. Nähtav on Efekt on tugev, kuid piiratud.

Kokkuvõttes näidati et polümersoome on võimalik sünteesida erinevaid ravimeid kapseldades ning et protsess ei mõjuta teatud ravimi kontsentratsioonides polümersoomi stabiilsust ja kuju. Samuti näidati ravimi ligikaudu 70% saagikust kapseldamisel. Viimaks tehti kindlaks polümersoomide omastamine THP-1 rakkude poolt ilma sihtmärkmolekulide abita.

2.3.2 Ekspressioon

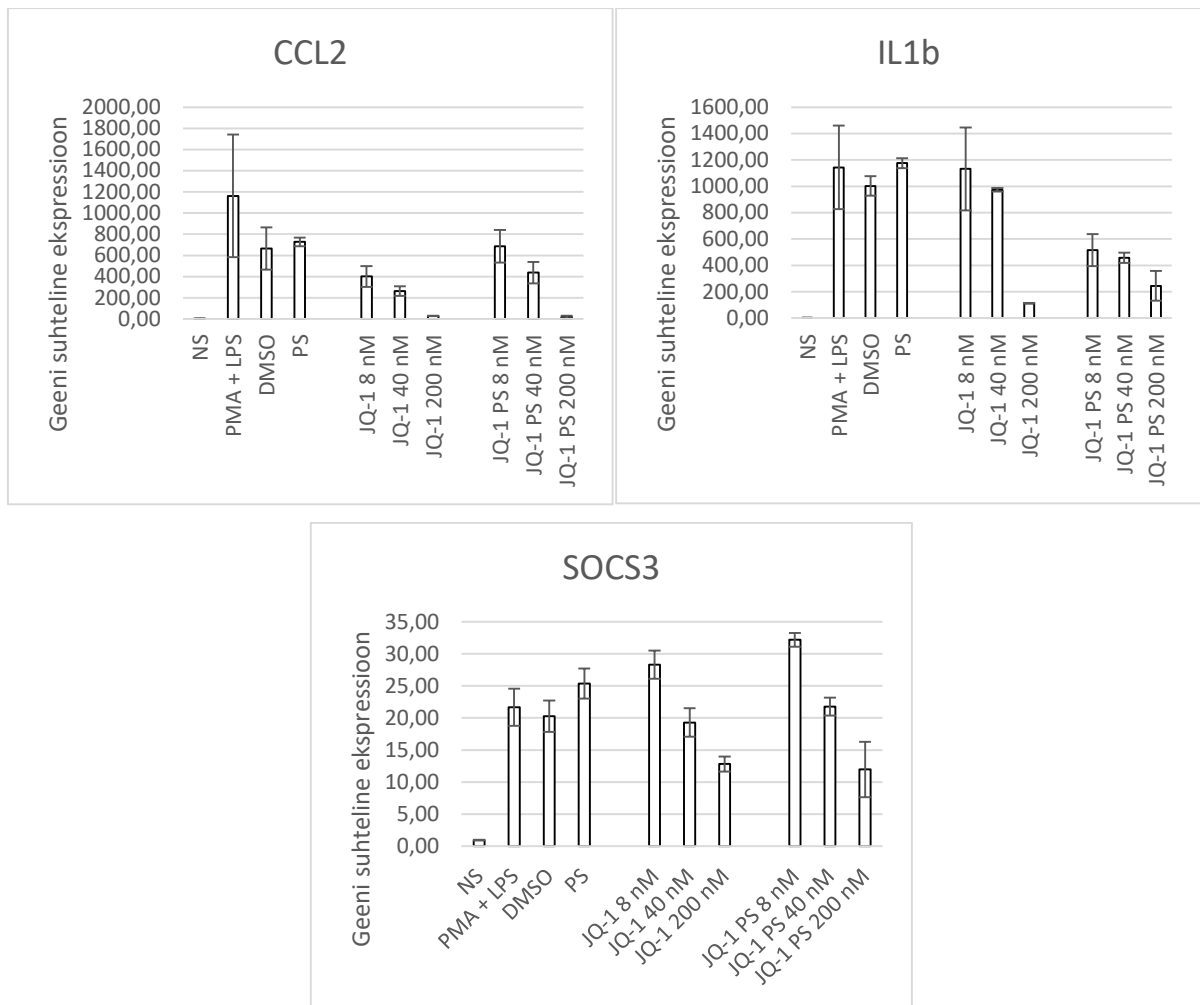
Eelmistes katsetes nähti, et polümersoom moodustub ühtlaselt ning on võimeline kapseldama ravimit ning seda ka rakkudesse edasi kandma. Mõistmaks ravimi mõju võimalikke erinevusi pärast polümersoomidesse kapseldamist viidi läbi THP-1 monotsüüdi rakuliini diferentseerimine PMA ja LPS abil makrofaagideks. Samal ajal stimuleeriti rakke kolme erineva ravimiga – Vorinostat, JQ-1 ja C646. Pärast 48h stimulatsiooni eraldati rakkudest RNA ning pöördtranskriptsiooni abil toodeti komplementaarne DNA, mida analüüsiti RT-qPCR-iga. Lähemalt uuriti CCL2, IL1B ja SOCS3 geenide muutusi koduhoidja geeni ACTB-ga võrreldes.

Vorinostat ehk SAHA on histooni deatsetülaasi inhibiitor (HDACi), mille töö tulemusena tõuseb histoonide atsetüleerituse tase ja sellega koos ekspressioon. Vorinostat on kasutuses naha T-rakulise lümfoomi raviks, kuid tänu oma hüdrofiilsele ehitusele vajab orgaanilisi lahusteid nagu DMSO. Vorinostat kapseldatuna polümersoomi on aga lahustuv vees. Selgus et Vorinostat omab ka pärast polümersoomi kapseldamist doosist sõltuvat efekti ning olenevalt uuritavast geenist võib esineda erinevusi efektiivsuses. CCL2 ning IL1B puhul esineb märgatav erinevus geeni ekspressioonitasemes, kuid efekt puudub SOCS3 geeni puhul (Joonis 13.)



Joonis 13. Kapseldatud ja kapseldamata Vorinostati mõju diferentseeritud THP-1 rakkude geeniekspressioonile. 48h diferentseerimise käigus stimuleeriti rakke Vorinostati kontsentratsioonidega 0,32 nM, 1,6 nM ning 8 nM kapseldatud ja kapseldamata vormides (Vor/Vor PS). Teostati RT-qPCR ning tulemused normaliseeriti ACTB koduhoidja geeni ning töötlemata proovi (NS) vastu. Graafikul on kujutatud kahe bioloogilise korduse keskmised väärtused. Esines selge sarnasus kapseldatud ja kapseldamata ravimi efektides.

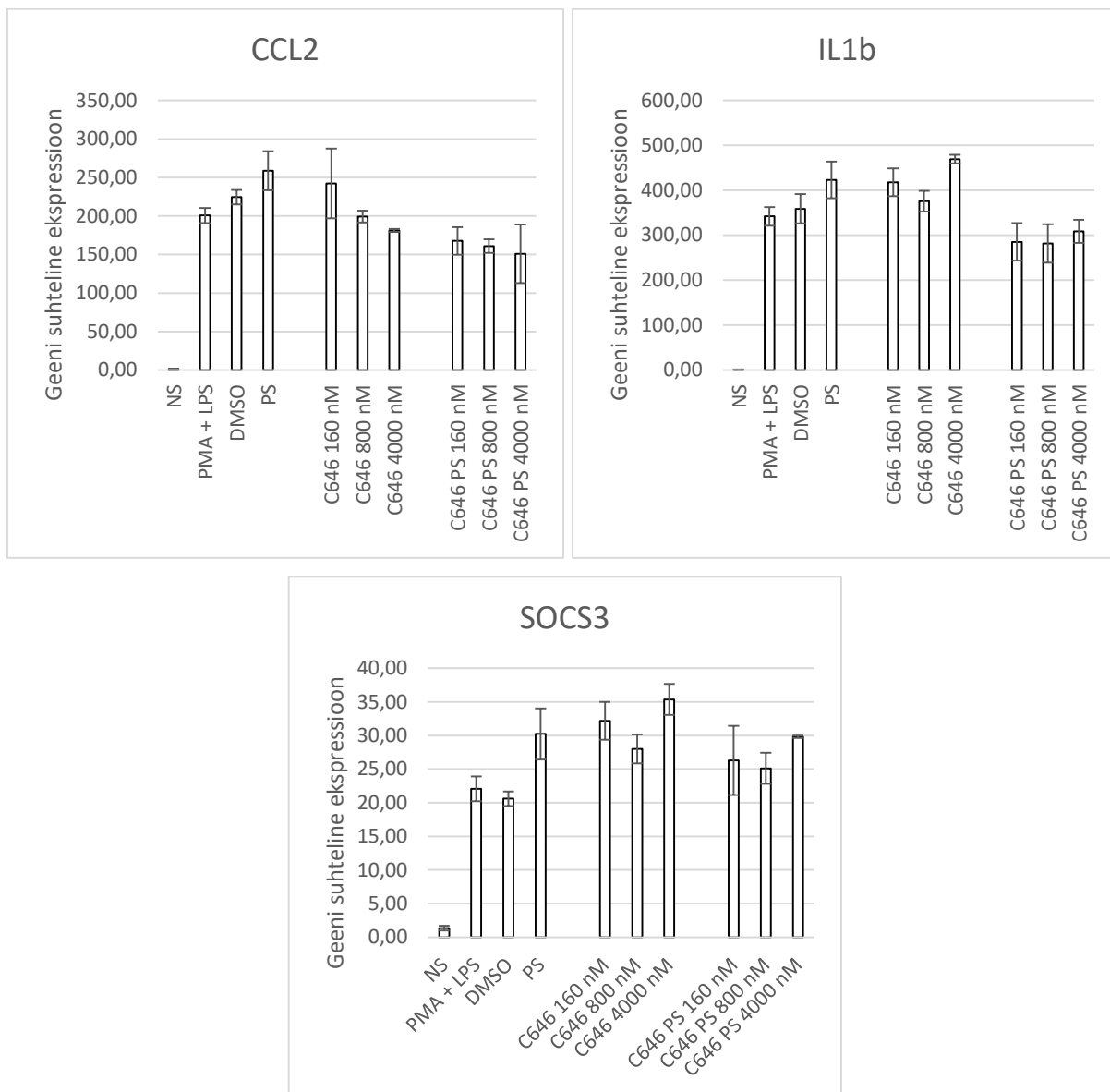
JQ-1 on bromodomääni inhibiitor ning takistab histoonimarkeri lugeja valkudel seostuda atsetüül jäägiga. Selle tulemusel langeb geeni ekspressioonitase. JQ-1 on kasutatud leidnud laboratoorses keskkonnas ning on ka kliinilistes katsetes. Kapseldatud kujul omab JQ-1 sarnaseid efekte kapseldamata ravimile. Märkata on nii kõrgemat kui madalamat efekti kapseldatud ravimi poolt vaba ravimiga võrreldes. (Joonis 14.)



Joonis 14. Kapseldatud ja kapseldamata JQ-1 mõju diferentseeritud THP-1 rakkude geeniekspressioonile. 48h diferentseerimise käigus stimuleeriti rakke JQ-1 kontsentratsioonidega 8 nM, 40 nM ning 200 nM kapseldatud ja kapseldamata vormides (JQ-1/JQ-1 PS). Teostati RT-qPCR ning tulemused normaliseeriti ACTB koduhoidja geeni ning töötlemata prooviga (NS). Graafikul on kujutatud kahe bioloogilise korduse keskmised väärtused. Esines selge sarnasus kapseldatud ja kapseldamata ravimi efektides.

C646 on histooni atsetültransferaasi inhibiitor (HATi) ning inhibeerib spetsiifiliselt ning pöördvalt atsetültransferaas p300 tööd. Sellest tulenevalt väheneb atsetüleerituse tase ning vastav geeniekspressioon. C646 on näidatud efektiivsena akuutse müeloidse leukeemia allasurumises, kuid on problemaatiline kõrge efektiivne doos, mis võib süsteemse manustamise puhul problemaatiliseks osutada. C646 kapseldamine õnnestus kontsentratsioonil 2 μ M, üle mille ravimi hulk ei lahustunud ning ei lubanud efektiivset polümersoomide moodustumist. Sarnaselt eelnevale kahele ravimile omab ka C646 sarnaseid efekte kapseldatud ja

kapseldamata kujul, esineb aga trend kapseldatud ravimi madalamale ekspressioonile ehk kapseldatud ravimi suuremale efektile vaba ravimiga võrreldes. (Joonis 15.)



Joonis 15. Kapseldatud ja kapseldamata C646 mõju diferentseeritud THP-1 rakkude geeniekspressioonile. 48h diferentseerimise käigus stimuleeriti rakke C646 kontsentratsioonidega 4000 nM, 800 nM ning 160 nM kapseldatud ja kapseldamata vormides (C646/C646 PS). Teostati RT-qPCR ning tulemused normaliseeriti ACTB koduhoidja geeni ning töötlemata prooviga (NS). Graafikul on kujutatud kahe bioloogilise korduse keskmised väärtused. Esines selge sarnasus kapseldatud ja kapseldamata ravimi efektides, kusjuures esineb kapseldatud ravimi tugevama efekti trend.

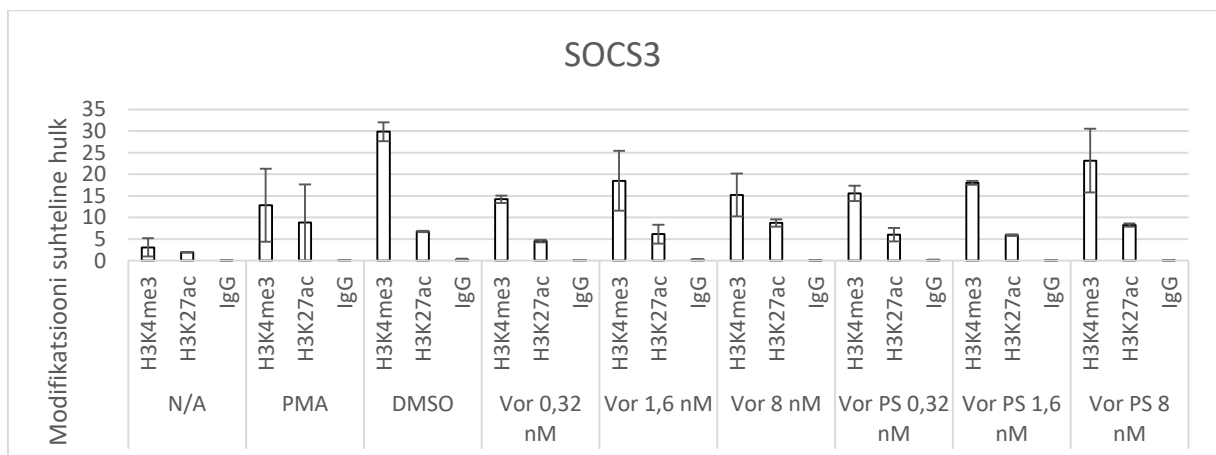
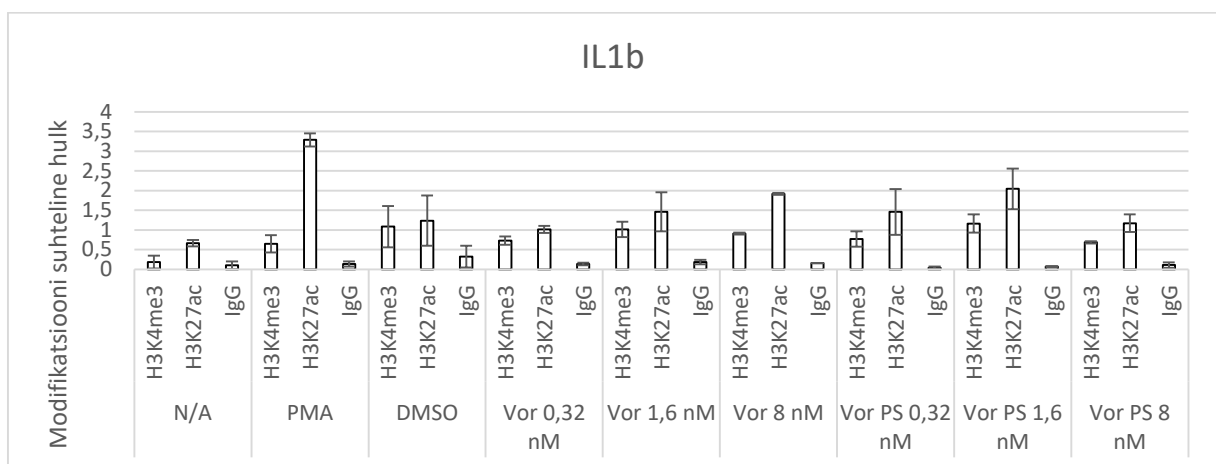
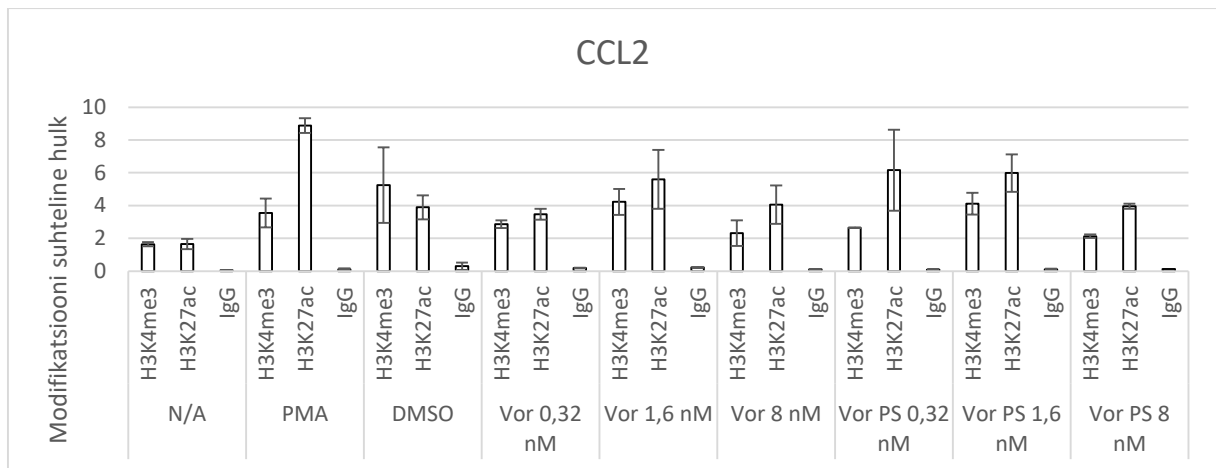
2.3.3 Histooneid modifikatsioonid

Kuna ekspresioonianalüüs näitas sarnaseid efekte kapseldatud ja kapseldamata ravimite vahel, vaadati järgmisena ravimite sihtmärkide – histoonimarkerite – muutusi. Vaadeldi kahte sagedast sihtmärki H3K4me3 ning H3K27ac markereid kromatiini immuunsadestamise (ChIP) meetodiga, kasutades mittespetsiifilist IgG antikeha, töötlemata proovi ning stimuleerimata rakke tulemuste normaliseerimiseks pärast RT-qPCR reaktsiooni. Ravimite mõjud ekspresioonianalüüsis ei olnud aga nii selged kromatiini muustrites.

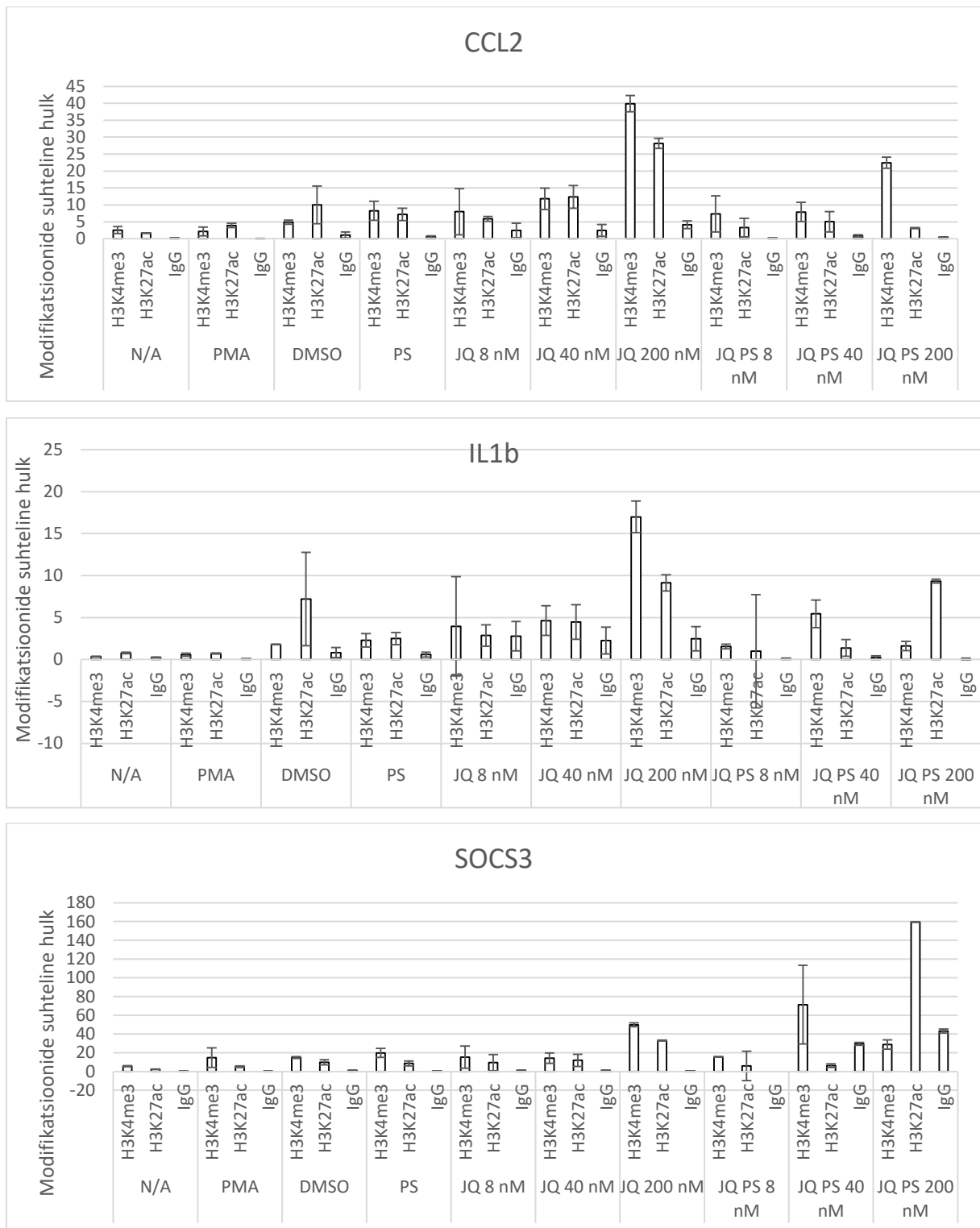
Vorinostati puhul võiks oodata ravimi tulemusel atsetüleerituse tõusu. Markereid võrreldes ei tõuse aga esile selgeid mustreid. Samuti on märkimisväärne taustasüsteemi – diferentseerimiseks kasutatud PMA ja LPS ning vabaravimi orgaanilise lahusti DMSO – võrdlemisi suur efekt katsegruppidega võrreldes. Kapseldatud ja kapseldamata ravimi muustrid on suuresti samas suurusjärgus, kuid ei esine selget doosist sõltuvust ega trendi. (Joonis 16.)

JQ-1 kui bromodomeeni inhibiitor takistab valkudel seonduda atsetüleeritud piirkondadega, sidudes valkude retseptoralad. JQ-1 mõju tulemusena esineb doosist sõltuv trend, kuid tulemused pole piisavalt selged. Samuti esineb varieeruvust geenide vahel, kuid muster on sarnane (Joonis 17.).

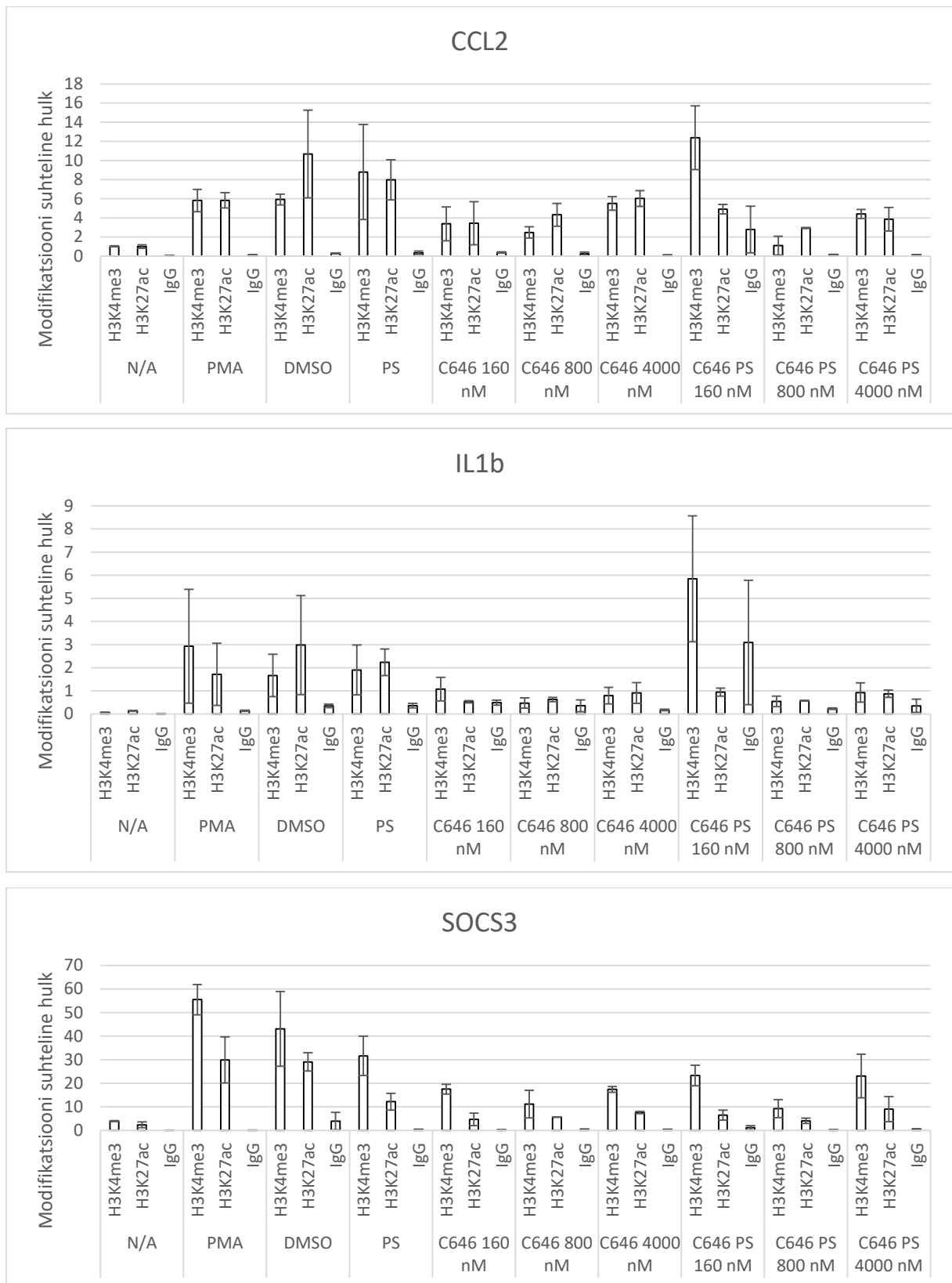
C646 kui histooni atsetültransferaasi inhibiitor seob p300 atsetültransferaasi ning pärsib seega atsetüülsignaali teket kromatiinil. Sellest tulenevalt peaks C646 inkubeerimine näitama madalamat H3K27ac väärtust. ChIP analüüsi tulemusena on näha taustasüsteemi (DMSO ja polümersoomid) kõrget atsetüleeritus/metüleeritus taset ravimiga töödeldud proovidega võrreldes. See efekt on eriti silmapaistev IL1b puhul (Joonis 18.).



Joonis 16. Kapseldatud ja kapseldamata Vorinostati mõju histooni markeritele. Pärast 48h diferentseerimist ning stimuleerimist teostati rakkudega kromatiini immuunsadestamise reaktsioon. Sihtmärkideks kasutati histoon 3 4. lüsiinjäägi trimetüülatsiooni markerit (H3K4me3) ning 27. lüsiinjäägi atsetüleerimis markerit (H3K27ac). Mõlemad on tugevalt seostatud geeniväljundiga. Saadud kromatiini alusel määrati RT-qPCR meetodiga modifikatsioonide suhteline hulk immuunsadestamata kromatiiniga võrreldes. Kujutatud on kapseldatud ja kapseldamata ravimite (0,32 nM, 1,6 nM ning 8 nM Vor/Vor PS – 3, 2, 1) ning tausta – diferentseerumata/diferentseerunud rakkude ning DMSO väärtused.



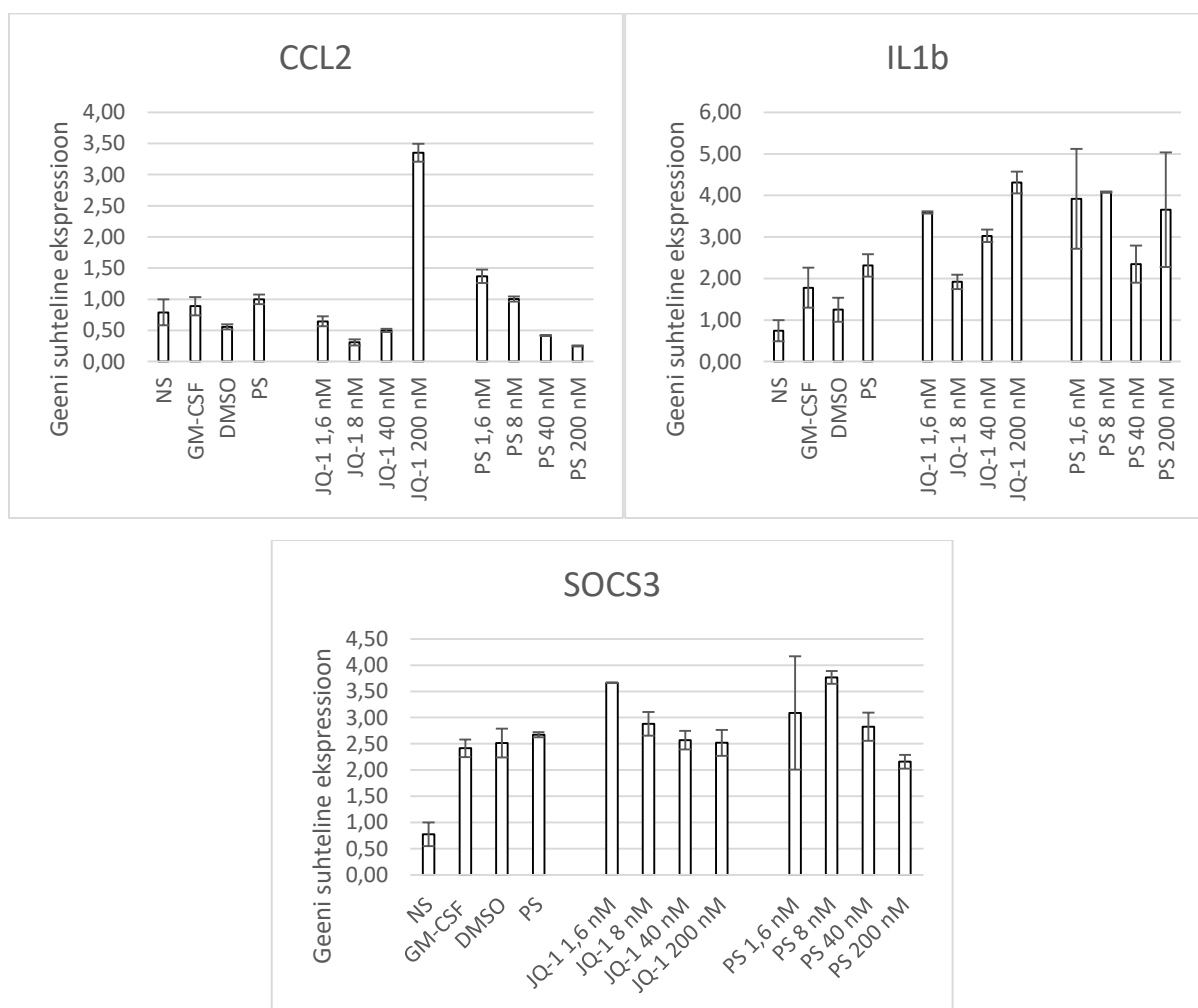
Joonis 17. Kapseldatud ja kapseldamata JQ-1 mõju histoonimarkeritele. Polümersoomidesse kapseldati 8 nM, 40 nM ja 200 nM (JQ/JQ PS) kontsentratsiooniga JQ-1 ravimit ning rakke diferentseriti ja inkubeeriti 48h. Pärast töötlust teostati kromatiini immuunsadestamine H3K4me3 ja H3K27ac markerite suhtes. Saadud proovid läbisid RT-qPCR valitud geenidega (CCL2, IL1B ja SOCS3) ning tulemused normaliseeriti rikastamata kromatiini, ebaspetsiifilise IgG ja koduhoidja geeni ACTB vastu.



Joonis 18. Kapseldatud ja kapseldamata C646 mõju histoonimarkeritele. C646 kapseldati kontsentratsioonil 2000 nM, kuid IC50 väärtusest tulenevalt olid inkubeerimisel individuaalsete proovide kontsentratsioonid 160 nM, 800 nM ja 4000 nM (C646/C646 PS). C646 Chip ja RT-qPCR töötlus oli identne Vorinostat ja JQ-1 töötlusele.

2.3.4 Mõju PBMCdele

Olles kinnitanud kapseldatud ravimite sarnase efekti THP-1 rakuliinil, võrreldi efekti inimese primaarsete monotsüütide peal. Selleks eraldati doonorverest primaarsed monotsüüdid, mis GM-CSF tsütokiini abil diferentseeriti makrofaagideks. Selle protsessi käigus lisati ka kapseldatud ja kapseldamata JQ-1 ravimit. Erinevalt robustsest THP-1 rakuliinist esineb primaarsete rakkudega suurem mitmekesisus, seda nii geeni kui doosi alusel. Küll aga on jätkuvalt märgatav THP-1 rakuliiniga sarnane muster kapseldatud ja kapseldamata osakeste mõju vahel (Joonis 19.).



Joonis 19. JQ-1 mõju inimese primaarsete monotsüütide geeniekspressioonile. Doonorverest eraldatud leukotsüüdid inkubeeriti 2h 37°C ja 5% CO₂ tasemel veega küllastunud keskkonnas, misjärel eemaldati sööde ja mitteadherentsed rakud ning jätkati põhja kinnitunud monotsüütidega. Monotsüüte diferentseeriti GM-CSF tsütokiini abil (50 ng/ml) ning

stimuleeriti samaaegselt JQ-1 kapseldatud ja kapseldamata kontsentratsioonidega (200 nM, 40 nM, 8 nM ja 1,6 nM). Rakke inkubeeriti 6 ööpäeva ning söödet vahetati 3. ja 5. päeval, lisades iga kord täis koguse relevantseid aineid. Inkubatsiooni lõppedes eraldati RNA ning pöördtranskriptsiooniga saadud cDNA kasutati ekspressioonianalüüsiks RT-qPCR-is.

Kokkuvõttes on näha et ka inimese primaarsetes rakkudes funktsioneerivad polümersoomid sarnaselt THP-1 rakuliinile ja *in vitro* tingimuste piires on polümersoomid potentsiaalseks vektoriks ravimitele mis muidu vajaksid orgaanilisi lahusteid.

2.4 Arutelu ja järeldused

Vähi ning teiste keerukate haiguste ravimisel pakuvad epigeneetilised ravimid uut ravilähendamist, võimaldades alla suruda vähirakkude jagunemise, kasvu ning metastaseerumise. Erilist tähelepanu on saanud vereloome vähid (Kelly ja Issa 2017). Tulenevalt aga epigeneetiliste ravimite madalast spetsiifilisusest on nendega seotud suur hulk kõrvalmõjusid erinevates organsüsteemides. Üks meetod kõrvalmõjusid vältida on ravimite transportimine muust keskkonnast eraldatuna. Sellel otstarbel on polümersoomid potentsiaalseks lahenduseks tänu oma lihtsasti modifitseeritavale pinnale ja stabiilsusele organismis. Lisaks pakuvad polümersoomid tänu oma amfiifilsele ehitusele võimalikku vektorit nii hüdrofiilsetele kui hüdrofoobsetele ravimitele.

Töö esimeses osa uuriti PEG-PCL polümersoomi stabiilsust, suurust ja kuju ning võimet kapseldada ja transportida ravimeid sihtmärgini. Mudeliks võeti THP-1 rakuliin. Selgus, et polümersoomid on vaatamata oma lihtsale sünteesiprotsessile võimelised hea saagikuse ja konstantsete tulemustega pakkuma odavat ja mitmekesisist ravimikandjat. Polümersoomide eelis hetkel turul olevate liposoomsete kandjate üle on parem stabiilsus, vähene lekkimine ning võimalus disainida ravimi vabanemistingimusi, pinnamarkereid, sihtmärgistatud molekule ja teisi modifikatsioone (Hu et al. 2017). Samuti pakuvad polümersoomid eeliseid mitmete antikeha ravimite ees tänu võimele ravimeid transportida ning sihtmärgis vabastada, lubades vabanenud ravimit transportida sügavamale kudedesse kuhu ravimite mõõtmega võrreldes suur antikeha ligi ei pruugi pääseda. PEG-PCL polümersoomide hea omastamine makrofaagide poolt ning sellele järgnev ravimi vabanemine koostöös olemasolevate sihtmärkmolekulidega

võib pakkuda võimalust drastiliselt tõsta ravimi doosi sihtmärgil võrreldes eksisteerivate antikeha ravimite ja liposoomidega. (Rideau et al. 2018)

Järgmisena võrreldi kapseldatud ravimite efektiivsust söötmes oleva vaba ravimiga, et tuvastada võimalikke erinevusi ja probleeme ravimi vabanemisel polümersoomist või polümersoomide omastamises makrofaagide poolt. Võrreldes kapseldatud ja vabaravimi mõju valitud geenide ekspressioonile leiti, et polümersoomidele on omane mõningane geeniekspressiooni muutmine, kuid võrreldes ravimi mõjuga pole see märkimisväärne. Kuna antud töö käsitles vaid mõnda ravimit ei saa polümersoomide efekti olulisust ravis aga välistada. See püstitab küsimuse ravimikombinatsiooni suhtes – kas polümersoom on võimeline tagama paremaid tulemusi ravimitega mille toime ühtib nende enda omaga? Kuigi see võimalus eksisteerib on samuti tõenäoline polümersoomidest tingitud marginaalselt parem ravimi omastamine raku poolt. Kuigi antud töö katsete põhjal ei ole võimalik kumbagi varianti tõestada on võimalus, et polümersoomid omavad ka *in vitro* paremat ravimi transpordi mehhanismi kui vaba ravim ning antud lähenemine väärrib edasist uurimist.

Viimaks taheti kindlaks määrata kapseldatud ravimite mõju epigeneetilisele koodile ning võimalikud kõrvalekalded sellest vaba ravimiga võrreldes. Uuriti histoonimarkerite H3K4me3 ning H3K27ac muutusi erinevate ravimite ja dooside mõju all. Katsetest selgus, et kuigi epigeneetilised markerid on varieeruvad, ei esinenud märkimisväärseid erinevusi kapseldatud ja kapseldamata ravimite vahel. Võib seega järeldada et vähemalt antud ravimitega ei mõjuta polümersoomid oluliselt epigeneetilist pilti.

Kuigi antud töö raames ei avaldanud polümersoomid ravimit ületavat mõju, on nad võimelised transportima nii hüdrofiilseid kui hüdrofoobseid molekule ning mitte ainult ei luba ravimi liikumist endosoomi vaid ka sellest välja tsütoplasmasse. Polümersoomid pakuvad potentsiaalset sammu edasi täppismeditsiini poole, vahetades globaalselt mansutatud ravimi sihtmärgistatud ja nii immuunsüsteemi kui degradatsiooni eest kaitstud vektori vastu. Polümersoomide ravimi kontsentreerimine võimaldab patsiendile väiksema doosi manustamisega saavutada paremaid tulemusi, vältides liposoomidele omaseid lekkeid ja lagunemisi, antikehadele omaseid probleeme koe läbimises ning vaba epigeneetilise ravimi laialdasi kõrvalmõjusid süsteemsel manustamisel. Koos eelnevalt leitud osakeste tendentsidega ja erialase kirjanduse viidetega (Chidanguro et al. 2018) on arusaadav miks polümersoomid on muutumas tähtsaks tööriistaks kaasaegses meditsiinis.

KOKKUVÕTE

Epigeneetilised ravimid pakuvad uudseid lahendusi eelnevalt raskesti ravitavate vähihaigustega võitlemiseks. Probleemseks osutuvad aga kõrvalmõjud mis epigenoomi muutvate ravimite puhul on tavalised ja tihtipeale tõsised. Antud töös uuriti amfiifilsete polümersoomide potentsiaali ravivektorina Vorinostati, JQ-1 ja C646 ravimi jaoks.

Leiti et polümersoomid on võimelised talletama nii hüdrofiilseid kui hüdrofoobseid molekule ilma et osake muudaks struktuuri. Samuti kinnitati selliste kandjate funktsionaalsus nii ravimi säilitamises kui transpordis raku endosoomidesse ja sealt edasi tsütoplasmasse.

Uuriti kapseldatud ravimite võimalikke eripärasid geeniekspressioonile vaba ravimiga võrreldes. Selleks teostatud RT-qPCR ei toonud välja olulisi erinevusi kahe ravimivormi vahel, viidates polümersoomide sobivusele geeniekspressiooni tasemel mõjutuste tegemiseks. Olles kinnitanud seda, uuriti polümersoomidesse kapseldamise võimalikke kõrvalmõjusid epigeneetiliste ravimite epigeneetilise koodi mõjutamisele. Teostati kromatiini immuunosadestamine ning vaadeldi H3K4me3 ning H3K27ac histoonimarkerite muutusi uuritavate gruppide vahel RT-qPCR abil. Histoonimodifikatsioonide puhul ei tuvastatud olulisi erinevusi.

Viimaks uuriti polümersoomi kapseldatud JQ-1 ravimi mõju inimese primaarsetele monotüütide geeniekspressioonile *in vitro*. Ka siin näitasid kaks gruppi märkimisväärseid sarnasusi.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva magistritöö tulemused, et polümersoomidesse kapseldatud ravimid ei kaota efektiivsuses ega spetsiifilisuses ning on võimelised vabanema polümersoomidest sihtpunktis. Polümersoomidesse pakendamine aga pakub ohtralt võimalusi ravimite spetsiifiliseks ning muust keskkonnast eraldatud kohaletoimetamiseks soovitud kudedesse soovitud hetkedel.

Polymersomes as a drug vector for human macrophages

Rait Vetik

SUMMARY

Epigenetic drugs are becoming ever more prevalent as potential answers to various kinds of hard to treat cancers, uncommon leukemias among them. However, epigenetic drugs often come with numerous side effects making their use on a global scale impractical. Encapsulating the drug as to keep it from interacting with unwanted targets may be the key to utilizing them to treat a variety of conditions more effectively.

Polymersomes are liposome-like spheroids consisting of an amphiphilic bilayer of polymers. This not only gives them better survivability in the body but also allows for modifications to the particle, leading to targeted delivery, conditional release of payloads, imaging and more. Thus the aim of this study was to characterize the effects of encapsulating an epigenetic drug in a PEG-PCL polymersome to test the viability of this platform as an *in vivo* application.

First it was shown that encapsulating Vorinostat, JQ-1 and C646 had no negative effects on polymersome size or shape. Furthermore, the polymersomes were able to achieve a 70% encapsulation rate with little fine tuning and were also capable of delivering the drug to target cells via phagocytosis of the particle.

From there, the possible side effects of encapsulation were explored via gene expression analysis of the drugs at various quantities. After RT-qPCR analysis, no discernible differences were observed, with the trend of encapsulated drugs being slightly more exaggerated in their effect, though this was not significant. Furthermore, the epigenetic effects were explored with chromatin immunoprecipitation of H3K4me3 and H3K27ac epigenetic markers, which also found no evident differences in effect.

Finally, donor primary monocytes were used to test encapsulated JQ-1 effects on cells, which resulted in much the same outcome as the previous experiments.

Taken together, the results of this study show very little if any difference in the effect of encapsulated epigenetic drugs compared to free drug variants. This suggests that PEG-PCL polymersomes can offer a safe alternative to global epidrug delivery, potentially resulting in more effective treatment with fewer side effects.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajaid, Pärt Petersoni ja Tambet Teesalu, vastutulelikuse ja juhendamise eest vaatamata mu vigadele. Sooviksin samuti tänada Maire Pihlapit näpunäidete ja võtete eest ning Lorena Simón Gracia't suurepärase õpetuse eest keemia poole peal. Lisaks sooviksin tänada Molekulaarpatoloogia töögruppi vapustava kollektiivi eest ning Vähibioloogia gruppi lahkuse ja abivalmiduse eest. Viimaks sooviksin tänada Anett-Hildegard Laarmanni toe ja julgustuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Ahmed, Fariyal, ja Dennis E Discher. 2004. „Self-Porating Polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: Hydrolysis-Triggered Controlled Release Vesicles“. *Journal of Controlled Release* 96 (1): 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.12.021>.
- Anand, Priti, Jonathan D. Brown, Charles Y. Lin, Jun Qi, Rongli Zhang, Pedro Calderon Artero, M. Amer Alaiti, et al. 2013. „BET Bromodomains Mediate Transcriptional Pause Release in Heart Failure“. *Cell* 154 (3): 569–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.013>.
- Balgavý, Pavol, Martina Dubničková, Norbert Kučerka, Mikael A Kiselev, Sergey P Yaradaikin, ja Daniela Uhríková. 2001. „Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1512 (1): 40–52. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00298-X).
- Banerjee, Camellia, Nancie Archin, Daniel Michaels, Anna C. Belkina, Gerald V. Denis, James Bradner, Paola Sebastiani, David M. Margolis, ja Monty Montano. 2012. „BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1“. *Journal of Leukocyte Biology* 92 (6): 1147–54. <https://doi.org/10.1189/jlb.0312165>.
- Bangham, A. D., M. M. Standish, ja J. C. Watkins. 1965. „Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids“. *Journal of Molecular Biology* 13 (1): 238–IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- Bellavite Pellegrini, Carlo, Valentina Morigi, Alessandro Tocchio, J. H. Sakamoto, Marco Arnone, ja Ennio Tasciotti. 2012. „Nanotechnology in Medicine: From Inception to Market Domination“ 2012 (1): 1–7. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/389485>.
- Biterge, Burcu, ja Robert Schneider. 2014. „Histone Variants: Key Players of Chromatin“. *Cell and Tissue Research* 356 (3): 457–66. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>.
- Bolden, Jessica E., Melissa J. Peart, ja Ricky W. Johnstone. 2006. „Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors“. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (9): 769–84. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>.
- Bowers, Erin M., Gai Yan, Chandrani Mukherjee, Andrew Orry, Ling Wang, Marc A. Holbert, Nicholas T. Crump, et al. 2010. „Virtual Ligand Screening of the p300/CBP Histone Acetyltransferase: Identification of a Selective Small Molecule Inhibitor“. *Chemistry & biology* 17 (5): 471–82. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.006>.
- Boyes, J., ja A. Bird. 1991. „DNA Methylation Inhibits Transcription Indirectly via a Methyl-CpG Binding Protein“. *Cell* 64 (6): 1123–34.
- Bruckmeier, Martin, Andreas Kuehnl, Mihaela Culmes, Jaroslav Pelisek, ja Hans-Henning Eckstein. 2012. „Impact of OxLDL and LPS on C-Type Natriuretic Peptide System Is Different between THP-1 Cells and Human Peripheral Blood Monocytic Cells“. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 30 (1): 199–209. <https://doi.org/10.1159/000339044>.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, Huub F. J. Savelkoul, ja Harry J. Wichers. 2013. „Characterization of Polarized THP-1 Macrophages and Polarizing Ability of LPS and Food Compounds“. *Food & Function* 4 (2): 266–76. <https://doi.org/10.1039/c2fo30156c>.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan J. Mes, ja Harry J. Wichers. 2014. „THP-1 Cell Line: An in Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach“. *International Immunopharmacology* 23 (1): 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>.
- Chidanguro, Tamuka, Elina Ghimire, Cheyenne H. Liu, ja Yoan C. Simon. 2018. „Polymersomes: Breaking the Glass Ceiling?“ *Small* 14 (46): 1802734. <https://doi.org/10.1002/sml.201802734>.

- Choi, Daeil, Sangmin Jeon, Dong Gil You, Wooram Um, Jeong-Yeon Kim, Hong Yeol Yoon, Hyeyoun Chang, et al. 2018. „Iodinated Echogenic Glycol Chitosan Nanoparticles for X-Ray CT/US Dual Imaging of Tumor“. *Nanotheranostics* 2 (2): 117–27. <https://doi.org/10.7150/ntno.18643>.
- Christian, David A., Shenshen Cai, Diana M. Bowen, Younghoon Kim, J. David Pajeroski, ja Dennis E. Discher. 2009. „Polymersome Carriers: from Self-Assembly to siRNA and Protein Therapeutics“. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 71 (3): 463–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.025>.
- Cole, Adam J., Victor C. Yang, ja Allan E. David. 2011. „Cancer Theranostics: The Rise of Targeted Magnetic Nanoparticles“. *Trends in biotechnology* 29 (7): 323–32. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.001>.
- Crump, Nicholas T., Catherine A. Hazzalin, Erin M. Bowers, Rhoda M. Alani, Philip A. Cole, ja Louis C. Mahadevan. 2011. „Dynamic Acetylation of All Lysine-4 Trimethylated Histone H3 Is Evolutionarily Conserved and Mediated by P300/CBP“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (19): 7814–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100099108>.
- Daigneault, Marc, Julie A. Preston, Helen M. Marriott, Moira K. B. Whyte, ja David H. Dockrell. 2010. „The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages“. *PLoS ONE* 5 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.
- Danafar, Hossein. s.a. „Synthesis and Characterization of Mpeg-PCL Copolymers as a Polymersomes for Delivery of Enalapril as a Model Hydrophilic Drug“, 14.
- Daskalos, Alexandros, Georgios Nikolaidis, George Xinarianos, Paraskevi Savvari, Adrian Cassidy, Roubini Zakopoulou, Athanasios Kotsinas, Vassilis Gorgoulis, John K. Field, ja Triantafillos Liloglou. 2009. „Hypomethylation of Retrotransposable Elements Correlates with Genomic Instability in Non-Small Cell Lung Cancer“. *International Journal of Cancer* 124 (1): 81–87. <https://doi.org/10.1002/ijc.23849>.
- Dawson, Mark A., ja Tony Kouzarides. 2012. „Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy“. *Cell* 150 (1): 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.
- Delmore, Jake E., Ghayas C. Issa, Madeleine E. Lemieux, Peter B. Rahl, Junwei Shi, Hannah M. Jacobs, Efstathios Kastritis, et al. 2011. „BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target C-Myc“. *Cell* 146 (6): 904–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>.
- Discher, Bohdana M., You-Yeon Won, David S. Ege, James C.-M. Lee, Frank S. Bates, Dennis E. Discher, ja Daniel A. Hammer. 1999. „Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers“. *Science* 284 (5417): 1143–46. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1143>.
- Discher, Dennis, ja Fariyal Ahmed. 2006. „Polymersomes“. *Departmental Papers (CBE)*, august. https://repository.upenn.edu/cbe_papers/75.
- Dodge, Jonathan E., Masaki Okano, Fred Dick, Naomi Tsujimoto, Taiping Chen, Shumei Wang, Yoshihide Ueda, Nick Dyson, ja En Li. 2005. „Inactivation of Dnmt3b in Mouse Embryonic Fibroblasts Results in DNA Hypomethylation, Chromosomal Instability, and Spontaneous Immortalization“. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (18): 17986–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413246200>.
- Dupont, Cathérine, D. Randall Armant, ja Carol A. Brenner. 2009. „Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective“. *Seminars in reproductive medicine* 27 (5): 351–57. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>.
- Farkas, Daniel H, ja American Association for Clinical Chemistry. 1996. *DNA Simplified: The Hitchhiker's Guide to DNA*. Washington, D.C.: AACC Press.
- Fendler, Janos H., ja Alejandro Romero. 1977. „Liposomes as Drug Carriers“. *Life Sciences* 20 (7): 1109–20. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90481-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(77)90481-7).

- Filippakopoulos, Panagis, Jun Qi, Sarah Picaud, Yao Shen, William B. Smith, Oleg Fedorov, Elizabeth M. Morse, et al. 2010. „Selective Inhibition of BET Bromodomains“. *Nature* 468 (7327): 1067–73. <https://doi.org/10.1038/nature09504>.
- Finnin, Michael S., Jill R. Donigian, Alona Cohen, Victoria M. Richon, Richard A. Rifkind, Paul A. Marks, Ronald Breslow, ja Nikola P. Pavletich. 1999. „Structures of a Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors“. *Nature* 401 (6749): 188. <https://doi.org/10.1038/43710>.
- Francisco-Cruz, Alejandro, Miguel Aguilar-Santelises, Octavio Ramos-Espinosa, Dulce Mata-Espinosa, Brenda Marquina-Castillo, Jorge Barrios-Payan, ja Rogelio Hernandez-Pando. 2013. „Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor: Not Just Another Haematopoietic Growth Factor“. *Medical Oncology* 31 (1): 774. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0774-6>.
- Furth, R. van, Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. H. Humphrey, W. G. Spector, ja H. L. Langevoort. 1972. „The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and Their Precursor Cells“. *Bulletin of the World Health Organization* 46 (6): 845–52.
- Gao, X. X., B. X. Wang, X. F. Fei, J. Zhang, Y. J. Gong, M. Minami, T. Nagata, ja T. Ikejima. 2000. „Effects of Polysaccharides (FIO-c) from Mycelium of Ganoderma Tsugae on Proinflammatory Cytokine Production by THP-1 Cells and Human PBMC (II)“. *Acta Pharmacologica Sinica* 21 (12): 1186–92.
- Geng, Yan, Fariyal Ahmed, Nishant Bhasin, ja Dennis E. Discher. 2005. „Visualizing Worm Micelle Dynamics and Phase Transitions of a Charged Diblock Copolymer in Water“. *The Journal of Physical Chemistry B* 109 (9): 3772–79. <https://doi.org/10.1021/jp0459559>.
- Gordon, Siamon. 2003. „Alternative Activation of Macrophages“. *Nature Reviews Immunology* 3 (1): 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>.
- Hecht, Stefan, ja Jean M. J. Fréchet. 2001. „Dendritic Encapsulation of Function: Applying Nature’s Site Isolation Principle from Biomimetics to Materials Science“. *Angewandte Chemie International Edition* 40 (1): 74–91. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010105\)40:1<74::AID-ANIE74>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010105)40:1<74::AID-ANIE74>3.0.CO;2-C).
- Heerboth, Sarah, Karolina Lapinska, Nicole Snyder, Meghan Leary, Sarah Rollinson, ja Sibaji Sarkar. 2014. „Use of Epigenetic Drugs in Disease: An Overview“. *Genetics & Epigenetics* 6 (mai): 9–19. <https://doi.org/10.4137/GEG.S12270>.
- Henikoff, Steven, Takehito Furuyama, ja Kami Ahmad. 2004. „Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance“. *Trends in Genetics* 20 (7): 320–26. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.05.004>.
- Herrmann, Inge K., Andrea Schlegel, Rolf Graf, Christoph M. Schumacher, Nico Senn, Melanie Hasler, Sabrina Gschwind, et al. 2013. „Nanomagnet-Based Removal of Lead and Digoxin from Living Rats“. *Nanoscale* 5 (18): 8718–23. <https://doi.org/10.1039/C3NR02468G>.
- Hewakuruppu, Yasitha L., Leonid A. Dombrovsky, Chuyang Chen, Victoria Timchenko, Xuchuan Jiang, Sung Baek, ja Robert A. Taylor. 2013. „Plasmonic “Pump–Probe” Method to Study Semi-Transparent Nanofluids“. *Applied Optics* 52 (24): 6041–50. <https://doi.org/10.1364/AO.52.006041>.
- Hotchkiss, R. D. 1948. „The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography“. *The Journal of Biological Chemistry* 175 (1): 315–32.
- Hu, Xiuli, Yuqi Zhang, Zhigang Xie, Xiabin Jing, Adriano Bellotti, ja Zhen Gu. 2017. „Stimuli-Responsive Polymersomes for Biomedical Applications“. *Biomacromolecules* 18 (3): 649–73. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01704>.

- James, Lindsey I., Victoria K. Korboukh, Liubov Krichevsky, Brandi M. Baughman, J. Martin Herold, Jacqueline L. Norris, Jian Jin, et al. 2013. „Small-Molecule Ligands of Methyl-Lysine Binding Proteins: Optimization of Selectivity for L3MBTL3“. *Journal of medicinal chemistry* 56 (18). <https://doi.org/10.1021/jm400919p>.
- Jang, Mei-Huei, Deborah M. Herber, Xinnong Jiang, Sayan Nandi, Xu-Ming Dai, Geraldine Zeller, E. Richard Stanley, ja Vicki R. Kelley. 2006. „Distinct In Vivo Roles of Colony-Stimulating Factor-1 Isoforms in Renal Inflammation“. *The Journal of Immunology* 177 (6): 4055–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.4055>.
- Jung, Marie, Martin Philpott, Susanne Müller, Jessica Schulze, Volker Badock, Uwe Eberspächer, Dieter Moosmayer, et al. 2014. „Affinity Map of Bromodomain Protein 4 (BRD4) Interactions with the Histone H4 Tail and the Small Molecule Inhibitor JQ1“. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (13): 9304–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523019>.
- Kelly, Andrew D, ja Jean-Pierre J Issa. 2017. „The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome“. *Current Opinion in Genetics & Development, Cancer genomics*, 42 (vebruar): 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.015>.
- Kikuchi, Junko, Taichi Takashina, Ichiro Kinoshita, Eiki Kikuchi, Yasushi Shimizu, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Oizumi, Victor E. Marquez, Masaharu Nishimura, ja Hirotohi Dosaka-Akita. 2012. „Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells“. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 78 (2): 138–43. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.08.003>.
- Kornberg, Roger D. 1974. „Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA“. *Science* 184 (4139): 868–71. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>.
- Lalwani, Gaurav, Allan M. Henslee, Behzad Farshid, Liangjun Lin, F. Kurtis Kasper, Yi-Xian Qin, Antonios G. Mikos, ja Balaji Sitharaman. 2013. „Two-Dimensional Nanostructure-Reinforced Biodegradable Polymeric Nanocomposites for Bone Tissue Engineering“. *Biomacromolecules* 14 (3): 900–909. <https://doi.org/10.1021/bm301995s>.
- Lam, Fred C., Stephen W. Morton, Jeffrey Wyckoff, Tu-Lan Vu Han, Mun Kyung Hwang, Amanda Maffa, Elena Balkanska-Sinclair, Michael B. Yaffe, Scott R. Floyd, ja Paula T. Hammond. 2018. „Enhanced Efficacy of Combined Temozolomide and Bromodomain Inhibitor Therapy for Gliomas Using Targeted Nanoparticles“. *Nature Communications* 9 (1): 1991. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04315-4>.
- Lapeyre, Jean-Numa, ja Frederick F. Becker. 1979. „5-Methylcytosine Content of Nuclear DNA during Chemical Hepatocarcinogenesis and in Carcinomas Which Result“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 87 (3): 698–705. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)92015-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)92015-1).
- Lehrmann, Heike, Linda Louise Pritchard, ja Annick Harel-Bellan. 2002. „Histone Acetyltransferases and Deacetylases in the Control of Cell Proliferation and Differentiation“. *Advances in Cancer Research* 86: 41–65.
- Leonhardt, H., A. W. Page, H. U. Weier, ja T. H. Bestor. 1992. „A Targeting Sequence Directs DNA Methyltransferase to Sites of DNA Replication in Mammalian Nuclei“. *Cell* 71 (5): 865–73.
- Lipowsky, R, ja E Sackmann. 1995. *Structure and Dynamics of Membranes*. Amsterdam; New York: Elsevier Science.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, ja T. J. Richmond. 1997. „Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution“. *Nature* 389 (6648): 251–60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Lujambio, Amaia, ja Scott W. Lowe. 2012. „The Microcosmos of Cancer“. *Nature* 482 (7385): 347–55. <https://doi.org/10.1038/nature10888>.

- Marks, Paul A., ja Ronald Breslow. 2007. „Dimethyl Sulfoxide to Vorinostat: Development of This Histone Deacetylase Inhibitor as an Anticancer Drug“. *Nature Biotechnology* 25 (1): 84–90. <https://doi.org/10.1038/nbt1272>.
- Marks, Paul A., Richard A. Rifkind, Victoria M. Richon, Ronald Breslow, Thomas Miller, ja William K. Kelly. 2001. „Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies“. *Nature Reviews Cancer* 1 (3): 194. <https://doi.org/10.1038/35106079>.
- Matzuk, Martin M., Michael R. McKeown, Panagis Filippakopoulos, Qinglei Li, Lang Ma, Julio E. Agno, Madeleine E. Lemieux, et al. 2012. „Small-Molecule Inhibition of BRDT for Male Contraception“. *Cell* 150 (4): 673–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.045>.
- McGovern, Naomi, Andreas Schlitzer, Merry Gunawan, Laura Jardine, Amanda Shin, Elizabeth Poyner, Kile Green, et al. 2014. „Human Dermal CD14⁺ Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages“. *Immunity* 41 (3): 465–77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.006>.
- Meng, Fenghua, ja Zhiyuan Zhong. 2011. „Polymersomes Spanning from Nano- to Microscales: Advanced Vehicles for Controlled Drug Delivery and Robust Vesicles for Virus and Cell Mimicking“. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2 (13): 1533–39. <https://doi.org/10.1021/jz200007h>.
- Moosavi, Azam, ja Ali Motevalizadeh Ardekani. 2016. „Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases“. *Iranian Biomedical Journal* 20 (5): 246–58. <https://doi.org/10.22045/ibj.2016.01>.
- Mussa, A., S. Russo, L. Larizza, A. Riccio, ja G. B. Ferrero. 2016. „(Epi)Genotype–Phenotype Correlations in Beckwith–Wiedemann Syndrome: A Paradigm for Genomic Medicine“. *Clinical Genetics* 89 (4): 403–15. <https://doi.org/10.1111/cge.12635>.
- Nguyen, Thanh Xuan, Lin Huang, Mario Gauthier, Guang Yang, ja Qun Wang. 2016. „Recent Advances in Liposome Surface Modification for Oral Drug Delivery“. *Nanomedicine* 11 (9): 1169–85. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.9>.
- Ntranos, Achilles, ja Patrizia Casaccia. 2016. „Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair“. *Neuroscience Letters, Epigenetics and Disorders of the Nervous System*, 625 (juuni): 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.015>.
- Nune, Satish K., Padmaja Gunda, Praveen K. Thallapally, Ying-Ying Lin, M. Laird Forrest, ja Cory J. Berkland. 2009. „Nanoparticles for biomedical imaging“. *Expert Opinion on Drug Delivery* 6 (11): 1175–94. <https://doi.org/10.1517/17425240903229031>.
- Ogryzko, Vasily V, R. Louis Schiltz, Valya Russanova, Bruce H Howard, ja Yoshihiro Nakatani. 1996. „The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases“. *Cell* 87 (5): 953–59. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)82001-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)82001-2).
- Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, A. Aoike, N.E. Osifchin, P.D. Robbins, ja T. Sakai. 1993. „CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene“. *Oncogene* 8 (4): 1063–67.
- Okano, M., S. Xie, ja E. Li. 1998. „Cloning and Characterization of a Family of Novel Mammalian DNA (Cytosine-5) Methyltransferases“. *Nature Genetics* 19 (3): 219–20. <https://doi.org/10.1038/890>.
- Ovchinnikov, Dmitry A. 2008. „Macrophages in the Embryo and beyond: Much More than Just Giant Phagocytes“. *Genesis* 46 (9): 447–62. <https://doi.org/10.1002/dvg.20417>.
- Oviroh, Peter Ozaveshe, Rokhsareh Akbarzadeh, Dongqing Pan, Rigardt Alfred Maarten Coetzee, ja Tien-Chien Jen. 2019. „New Development of Atomic Layer Deposition: Processes, Methods, and Applications“. *Science and Technology of Advanced Materials* 0 (ja): null. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1599694>.

- Owen, David J., Prisca Ornaghi, Ji-Chun Yang, Nicholas Lowe, Philip R. Evans, Paola Ballario, David Neuhaus, Patrizia Filetici, ja Andrew A. Travers. 2000. „The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p“. *The EMBO Journal* 19 (22): 6141–49. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6141>.
- Prusevich, Polina, Jay H. Kalin, Shonoi A. Ming, Manuela Basso, Jeffrey Givens, Xin Li, Jianfei Hu, et al. 2014. „A Selective Phenelzine Analogue Inhibitor of Histone Demethylase LSD1“. *ACS Chemical Biology* 9 (6): 1284–93. <https://doi.org/10.1021/cb500018s>.
- Ranganathan, Ramya, Shruthilaya Madanmohan, Akila Kesavan, Ganga Baskar, Yoganathan Ramia Krishnamoorthy, Roy Santosham, D. Ponraju, Suresh Kumar Rayala, ja Ganesh Venkatraman. 2012. „Nanomedicine: Towards Development of Patient-Friendly Drug-Delivery Systems for Oncological Applications“. *International Journal of Nanomedicine*. 23. veebruar 2012. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25182>.
- Rideau, Emeline, Rumiana Dimova, Petra Schwille, Frederik R. Wurm, ja Katharina Landfester. 2018. „Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking“. *Chemical Society Reviews* 47 (23): 8572–8610. <https://doi.org/10.1039/C8CS00162F>.
- Santer, Frédéric R., Philipp P. S. Höschele, Su Jung Oh, Holger H. H. Erb, Jan Bouchal, Ilaria T. Cavarretta, Walther Parson, David J. Meyers, Philip A. Cole, ja Zoran Culig. 2011. „Inhibition of the Acetyltransferases P300 and CBP Reveals a Targetable Function for P300 in the Survival and Invasion Pathways of Prostate Cancer Cell Lines“. *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (9): 1644–55. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0182>.
- Sanvicens, Nuria, ja M. Pilar Marco. 2008. „Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine“. *Trends in Biotechnology* 26 (8): 425–33. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
- Schuettengruber, Bernd, Daniel Chourrout, Michel Vervoort, Benjamin Leblanc, ja Giacomo Cavalli. 2007. „Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins“. *Cell* 128 (4): 735–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.009>.
- Schwartz, Brian E., Matthias D. Hofer, Madeleine E. Lemieux, Daniel E. Bauer, Michael J. Cameron, Nathan H. West, Elin S. Agoston, et al. 2011. „Differentiation of NUT Midline Carcinoma by Epigenomic Reprogramming“. *Cancer research* 71 (7): 2686–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3513>.
- Shi, Chao, ja Eric G. Pamer. 2011. „Monocyte recruitment during infection and inflammation“. *Nature reviews. Immunology* 11 (11): 762–74. <https://doi.org/10.1038/nri3070>.
- Sims, Robert J., Kenichi Nishioka, ja Danny Reinberg. 2003. „Histone Lysine Methylation: A Signature for Chromatin Function“. *Trends in Genetics: TIG* 19 (11): 629–39. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007>.
- Strahl, Brian D., ja C. David Allis. 2000. „The Language of Covalent Histone Modifications“. *Nature* 403 (6765): 41. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Taylor, Robert, Sylvain Coulombe, Todd Otanicar, Patrick Phelan, Andrey Gunawan, Wei Lv, Gary Rosengarten, Ravi Prasher, ja Himanshu Tyagi. 2013. „Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids“. *Journal of Applied Physics* 113 (1): 011301. <https://doi.org/10.1063/1.4754271>.
- Tsou, Chia-Lin, Wendy Peters, Yue Si, Sarah Slaymaker, Ara M. Aslanian, Stuart P. Weisberg, Matthias Mack, ja Israel F. Charo. 2007. „Critical Roles for CCR2 and MCP-3 in Monocyte Mobilization from Bone Marrow and Recruitment to Inflammatory Sites“. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 902–9. <https://doi.org/10.1172/JCI29919>.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, ja K. Tada. 1980. „Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1)“. *International Journal of Cancer* 26 (2): 171–76.

- Volder, Michael F. L. De, Sameh H. Tawfick, Ray H. Baughman, ja A. John Hart. 2013. „Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications“. *Science* 339 (6119): 535–39. <https://doi.org/10.1126/science.1222453>.
- Watt, F., ja P. L. Molloy. 1988. „Cytosine Methylation Prevents Binding to DNA of a HeLa Cell Transcription Factor Required for Optimal Expression of the Adenovirus Major Late Promoter“. *Genes & Development* 2 (9): 1136–43.
- Wong, Cliff, Triantafyllos Stylianopoulos, Jian Cui, John Martin, Vikash P. Chauhan, Wen Jiang, Zoran Popović, Rakesh K. Jain, Mounqi G. Bawendi, ja Dai Fukumura. 2011. „Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (6): 2426–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018382108>.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, ja W. P. Diver. 1987. „The Majority of Methylated Deoxycytidines in Human DNA Are Not in the CpG Dinucleotide“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 145 (2): 888–94.
- Woodle, Martin C. 1993. „Surface-modified liposomes: assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation“. *Chemistry and Physics of Lipids* 64 (1): 249–62. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90069-F](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90069-F).
- Wu, C.-t. 2001. „Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence“. *Science* 293 (5532): 1103–5. <https://doi.org/10.1126/science.293.5532.1103>.
- Yan, Gai, Mark S. Eller, Courtney Elm, Cecilia A. Larocca, Byungwoo Ryu, Izabela P. Panova, Beverley M. Dancy, et al. 2013. „Selective Inhibition of p300 HAT Blocks Cell Cycle Progression, Induces Cellular Senescence and Inhibits the DNA Damage Response in Melanoma Cells“. *The Journal of investigative dermatology* 133 (10): 2444–52. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.187>.
- Yang, Jiyeon, Lixiao Zhang, Caijia Yu, Xiao-Feng Yang, ja Hong Wang. 2014. „Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases“. *Biomarker Research* 2 (jaanuar): 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>.
- Younus, Iyan, ja Doodipala Samba Reddy. 2017. „Epigenetic interventions for epileptogenesis: A new frontier for curing epilepsy“. *Pharmacology & Therapeutics* 177 (september): 108–22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.002>.

KASUTATUD VEEBILEHED

- [1] „Standards for Nanotechnology | Nano“. s.a. Vaadatud 25. aprill 2019. <https://www.nano.gov/you/standards>.
- [2] „Doxil - Drug Information - Chemocare“. s.a. Vaadatud 25. aprill 2019. <https://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/doxil.aspx>.
- [3] „Abraxane (Paclitaxel protein-bound) Chemotherapy Drug Information“. s.a. Vaadatud 25. aprill 2019. <https://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/abraxane.aspx>.
- [4] „Increased Investments in Global Nanomedicine Market Push it to Reach US\$177.60 bn by 2019“. s.a. Vaadatud 25. aprill 2019. <https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/global-nanomedicine-market.htm>.
- [5] PubChem. s.a. „Decitabine“. Vaadatud 13. mai 2019a. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/451668>.
- [6] PubChem. s.a. „Givinostat“. Vaadatud 13. mai 2019b. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9804992>.
- [7] „CPI203 SML1212“. s.a. Sigma-Aldrich. Vaadatud 13. mai 2019. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1212>.
- [8] „Drug Approval Package: Zolinza (Vorinostat) NDA #021991“. s.a. Vaadatud 14. mai 2019. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021991s000_ZolinzaTOC.cfm.
- [9] „Pembrolizumab, Vorinostat, Temozolomide and Radiation Therapy in Treating Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma - NCT03426891“. 2011. NciAppModulePage. National Cancer Institute. 2. veebruar 2011. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/v?id=NCI-2018-00503>.
- [10] „Vorinostat Clinical Trials, Side Effects“. s.a. AIDSinfo. Vaadatud 14. mai 2019. <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/529/vorinostat/0/patient>.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rait Vetik

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose:

Polümersoomide kasutamine epigeneetiliste ravimite vektorina inimese makrofaagides mille juhendajad on Pärt Peterson ning Tambet Teesalu

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Rait Vetik

30.05.2019