



**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ**  
Polskiej Akademii Nauk

**Wykorzystanie nanotechnologii w badaniach  
właściwości biologicznych i biomechanicznych  
komórek nowotworowych**

**Konrad Kuczyński**

Praca doktorska zrealizowana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej

Promotor: dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN

Promotor pomocniczy: dr inż. Bartosz Grześkowiak

Serdeczne podziękowania składam

Pani dr hab. Katarzynie Rolle, prof. ICHB PAN  
za możliwość realizacji wielu interesujących projektów, merytoryczną krytykę i opiekę przez  
czas trwania doktoratu;

Panu prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu  
za wiele ciepłych słów i inspirujące dyskusje;

mgr Małgorzacie Grabowskiej za wiele cierpliwości w życiu prywatnym i zawodowym,  
wsparcie każdego dnia i najlepsze żarty;

dr inż. Bartoszowi Grześkowiakowi z Centrum NanoBioMedycznego UAM;  
śp. prof. Stefanowi Jurdze z Centrum NanoBioMedycznego UAM;  
dr hab. Radosławowi Mrówczyńskiemu z Wydziału Chemii UAM;  
prof. dr hab. Małgorzacie Lekkiej z Instytutu Fizyki Jądrowej PAN;  
dr Agnieszce Rybak-Wolf z The Berlin Institute for Medical Systems Biology MDC;  
dr Ewelinie Ratajczak z Instytutu Dendrologii PAN;  
oraz innym osobom z instytucji partnerskich, które pomogły w realizacji badań;

dr Dariuszowi Wawrzyniakowi;  
dr Julii Misiorek;  
dr inż. Pawłowi Głodowiczowi;  
mgr Adrianie Grabowskiej;  
mgr Julii Latowskiej-Łysiak;  
mgr Żanecie Zarębskiej;  
za motywację do pracy i wspaniałą atmosferę każdego dnia;

Rodzicom i siostrze  
za wsparcie w dążeniu do zamierzonych celów;

mgr inż. Bednarkiewiczowi, inż. Rakowskiemu oraz inż. Witkowskiemu  
za brak merytorycznych uwag.

## Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy .....	6
Streszczenie .....	8
Abstract .....	10
1. Wprowadzenie.....	11
1.1 Poznanie unikalnych cech nowotworów kluczem do zrozumienia procesu nowotworzenia i opracowania nowych form terapii przeciwnowotworowych.....	11
1.2 Inwazja komórek nowotworowych .....	12
1.3 Macierz zewnątrzkomórkowa.....	13
1.3.1 Badania mechanobiologiczne nowotworów z użyciem mikroskopii sił atomowych .....	15
1.4 Mechanobiologia glejaka.....	17
1.4.1 Tenascyna-C .....	18
1.5 Glejak – nowotwór .....	19
1.5.1 Epidemiologia .....	20
1.5.2 Objawy .....	20
1.5.3 Diagnostyka obrazowa.....	21
1.5.4 Diagnostyka molekularna oraz wyznaczanie prawdopodobieństwa przeżywalności .....	21
1.5.5 Czynniki zwiększające szansę na rozwój glejaka .....	22
1.6 Terapia glejaka .....	23
1.6.1 Resekcja .....	24
1.6.2 Radioterapia .....	25
1.6.3 Chemioterapia .....	26
1.6.4 Immunoterapia .....	27
1.6.5 Nowe podejścia w terapii glejaka .....	28
1.6.6 Przyszłość terapii glejaka.....	29
1.7 Nanomateriały jako nowe narzędzia przeciwnowotworowe .....	29
1.7.1 Nanocząstki węglowe .....	30
1.7.2 Nanocząstki metaliczne.....	31
1.7.3 Nanocząstki tlenków metali .....	32
1.7.4 Nanocząstki polimerowe.....	33
1.7.5 Zastosowanie nanomateriałów w medycynie .....	34

1.7.6 Dotychczasowe zastosowanie nanocząstek w terapeutycznym podejściu do nowotworów mózgu.....	34
1.8 Modele glejaka stosowane w badaniach podstawowych i aplikacyjnych .....	38
2. Cel pracy .....	41
3. Wyniki.....	43
3.1 Badanie wpływu miR-218-5p na zmiany właściwości mechanicznych komórek glejaka .....	43
3.1.1 Analiza wpływu miR-218-5p na ekspresję białek związanych z migracją, adhezją oraz macierzą zewnątrzkomórkową.....	44
3.1.2 Badanie adhezji pojedynczych komórek.....	47
3.1.3 Pomiar sztywności pojedynczych komórek.....	47
3.1.4 Wyznaczanie szorstkości komórek .....	48
3.1.5 Badanie zmian w cytoszkielecie aktynowym .....	50
3.2 Ewaluacja cytotoksyczności nanocząstek Mag@PEI .....	51
3.2.1 Badanie cytotoksyczności.....	52
3.2.2 Badanie genotoksyczności .....	54
3.2.3 Ocena stresu oksydacyjnego pod wpływem nanomateriałów.....	55
3.2.4 Badanie mitotoksyczności.....	59
3.3 Badanie wpływu wielkości nanocząstek na ich właściwości cytotoksyczne .....	60
3.3.1. Charakterystyka nanomateriału.....	61
3.3.2. Analiza cytotoksyczności za pomocą testu MTT .....	61
3.3.2. Analiza cytotoksyczności za pomocą testu LDH.....	63
3.4 Ustanowienie nowych modeli organoidów pochodzenia glejaka.....	66
3.4.1 Otrzymanie linii pierwotnych glejaka.....	68
3.4.3 Obrazowanie struktury cytoszkieletu aktynowego .....	69
3.4.5 Assembloid HBO-GBO .....	72
4. Dyskusja .....	75
4.1 Wprowadzenie .....	76
4.2 Regulacja właściwości fizycznych komórek przez czynniki wewnątrzkomórkowe.....	78
4.3 Bezpieczeństwo nanomateriałów .....	81
4.3.1 Stres oksydacyjny .....	81
4.3.2 Wielkość nanomateriałów a ich toksyczność.....	85
4.4 Nowe modele w badaniu inwazji glejaka .....	88
5. Wnioski .....	90
6. Materiały i metody .....	91
6.1 Wykorzystane odczynniki oraz zestawy odczynników .....	91

6.2 Hodowla komórkowa i procedury przeprowadzane na komórkach .....	91
6.2.1 Linie komórkowe użyte w przygotowaniu pracy.....	93
6.2.2 Pozyskanie tkanek nowotworowych do hodowli pierwotnych organoidów glejaka	93
6.2.3 Optymalizacja warunków hodowli organoidów glejaka.....	93
6.2.4 Otrzymanie assembloidu GBO-HBO.....	94
6.2.5 Mrożenie i sekcjonowanie kultur organoidów .....	94
6.2.6 Lipofekcja .....	94
6.2.7 Transfekcja nanocząstkami .....	95
6.3 Badanie cytotoksyczności nanomateriałów .....	95
6.3.1 Test cytotoksyczności – pomiar aktywności metabolicznej (MTT) .....	95
6.3.2 Test cytotoksyczności – pomiar wpływu dehydrogenazy mleczanowej (LDH)....	96
6.3.3 Test potencjału błony mitochondrialnej.....	97
6.3.4 Test genotoksyczności .....	99
6.3.5 Badanie poziomu aktywności katalazy w ekstrakcie komórkowym .....	99
6.3.6 Badanie poziomu aktywności peroksydazy glutationowej w ekstrakcie komórkowym .....	100
6.3.7 Badanie ilości H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> w ekstrakcie komórkowym.....	100
6.4 Badanie fizycznych właściwości komórek nowotworowych.....	100
6.4.1 Spektroskopia sił pojedynczej komórki .....	100
6.4.2 Wyznaczanie szorstkości komórek .....	102
6.4.3 Barwienia komórkowe .....	102
6.5 Badanie ekspresji genów .....	102
6.5.1 Izolacja RNA .....	102
6.5.2 Oczyszczenie RNA z zanieczyszczeń DNA .....	102
6.5.3 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym.....	103
6.5.4 Odwrotna transkrypcja.....	103
6.5.5 Real time PCR.....	103
6.6 Przygotowanie manuskryptu .....	104
7. Literatura .....	105
8. Załączniki .....	131
Załącznik 1 – Publikacja „miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells” .....	131

## Wykaz skrótów stosowanych w pracy

AFM	mikroskop sił atomowych (ang. atomic force microscopy)
BBB	bariera krew-mózg (ang. blood-brain barrier)
CAF	fibroblasty zrekrutowane przez nowotwór (ang. cancer-associated fibroblast)
CAR-T	limfocyty T z chimerowym receptorem antygenowym (ang. chimeric antigen receptor)
CVT	chemiczne osadzanie z fazy gazowej (ang. chemical vapour deposition)
DIPG	rozlany glejak pnia mózgu (ang. diffuse intrinsic pontine glioma)
DMG	rozsiany glejak linii środkowej kręgosłupa (ang. diffuse midline glioma)
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	5'trifosforan nukleotydu
dsRNA	dwuniciowe RNA (ang. double stranded RNA)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe
FBS	plądowa surowica bydłęca (ang. fetal bovine serum)
FDA	Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych Ameryki (ang. Food and Drug Administration)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GBO	organoid pochodzący od komórek glejaka (ang. glioblastoma organoid)
GBM	glejak
HBO	organoid o strukturze zdrowego mózgu (ang. healthy brain organoid)
HPRT	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
HRT	hipofrakcjonowana radioterapia (ang. hypofractionated radiotherapy)
HSV	wirus opryszczki pospolitej
iPSC	indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. induced pluripotent stem cells)
lncRNA	długie, niekodujące RNA
mRNA	informacyjny RNA (ang. messenger RNA)
miRNA	jednonicowa cząsteczka RNA o długości od 21 do 23 nukleotydów
MNP	magnetyczna nanocząstka

MMP	metaloproteinaza (ang. matrix metalloproteinase)
MRI	obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging)
NaCl	chlorek sodu
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PDA	polidopamina
PDT	terapia fotodynamiczna (ang. photodynamic therapy)
PEG	polietyloglikol
PEI	polietylenoimina
PLGA	kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego
qPCR	ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative PCR)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
rpm	obroty na minutę (ang. revolutions per minute)
RT	odwrotna transkrypcja (ang. reverse transcription)
SCFS	spektroskopia sił pojedynczej komórki (ang. single cell force spectroscopy)
SDC-2	syndekan 2
SFRT	standardowo frakcjonowana radioterapia (ang. standard fractionated radiotherapy)
TK	obrazowanie metodą tomografii komputerowej
TN-C	tenascyna-C
TMZ	temozolomid
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

## Streszczenie

Rozwój medycyny od lat napędzany jest przez rozwój nauk takich jak biologia molekularna i biofizyka. Interdyscyplinarne podejście jest szczególnie istotne w przypadku badania i leczenia nowotworów – jednej z najczęstszych przyczyny przedwczesnych śmierci na świecie. Pomimo wzmózonych wysiłków społeczności naukowej nadal nie są znane skuteczne metody leczenia nowotworów szczególnie złośliwych takich jak glejak. Nowotwór ten lokalizuje się w obrębie mózgu przez co jego leczenie za pomocą konwencjonalnych metod nie przynosi zadowalających efektów. Jedną z przyczyn tego stanu może być wysoki potencjał komórek glejaka do inwazji i migracji wskroś sąsiadującej tkanki.

Dogłębne poznanie mechanizmów inwazji może w przyszłości prowadzić do wyznaczenia nowych celów molekularnych terapii przeciwko temu nowotworowi. W pierwszej części tej pracy doktorskiej skupiono się na określeniu wpływu miR-218-5p na właściwości migracyjne komórek glejaka. Równolegle do badań molekularnych zastosowano analizy biofizyczne obejmujące mikroskopię i spektroskopię sił atomowych w badaniu właściwości biomechanicznych pojedynczych komórek glejaka. Wyniki tych badań wskazują na złożoność reakcji fizycznej komórek na zmiany stężenia miR-218-5p – wewnątrzkomórkowego regulatora ekspresji genów.

W przypadku nowotworów występujących w obrębie centralnego układu nerwowego leczenie może nie być skuteczne przez brak możliwości interwencji chirurgicznej w obrębie mózgu, obecność bariery krew-mózg czy neurotoksyczność środków stosowanych miejscowo. W drugiej części pracy dokonano analizy toksyczności hybrydowego nanomateriału złożonego z magnetytu oraz polietylenoiminy. Szczegółowa charakterystyka właściwości takich nanocząstek pod kątem ich właściwości cytotoksycznych jest kluczowa dla ich potencjalnego wykorzystania w podejściach terapeutycznych, m.in. w wykorzystaniu do ograniczenia proliferacji, migracji i inwazji komórek nowotworowych.

Trzecia część wykonanych prac jest związana z konstrukcją nowych trójwymiarowych modeli komórkowych glejaka. Tego typu modele mogą w przyszłości zastąpić obecnie używane dwuwymiarowe modele komórkowe w badaniach procesów inwazji nowotworowej oraz zostać wykorzystane do oceny efektywności nowych terapeutyków o potencjale antyinwazyjnym. Pierwszy zaproponowany model opiera się na zaawansowanych kulturach organoidowych



pochoǳących bezpośrednio z tkanki nowotworowej i może być wykorzystany do badania przenikania substancji do wnętrza nowotworu oraz oddziaływań między komórkami nowotworu. Drugi proponowany model jest nowoczesną kulturą assembloidową, która ma za zadanie replikować oddziaływanie między komórkami glejaka a tkanką zdrowego mózgu.

## Abstract

For years, the development of medicine has been driven by the development of sciences such as molecular biology and biophysics. An interdisciplinary approach is particularly important in the study and treatment of cancer - one of the most common causes of premature death in the world. Despite the increased efforts of the scientific community, effective methods of treating malignant neoplasms, such as glioblastoma, are still unknown. This tumor is located in the brain, thus its treatment using conventional methods does not bring satisfactory results. One of the causes of this phenomenon may be the high potential of glioblastoma cells to invade and migrate through adjacent tissue.

In-depth understanding of the invasion mechanisms may lead to the discovery of new molecular targets for therapy against this cancer. The first part of this dissertation is focused on determining the effect of miR-218-5p on the migration properties of glioblastoma cells. Parallel to molecular studies, biophysical analyzes including atomic force microscopy and single cell force spectroscopy were used to study the biomechanical properties of individual glioblastoma cells. The results of these studies indicate the complexity of the physical reaction of cells to changes in the level of miR-218-5p - an intracellular regulator of gene expression.

In the case of tumors developing within the central nervous system, treatment may not be effective due to the impossibility of surgical intervention in the brain, presence of the blood-brain barrier, or the neurotoxicity of used therapeutics. In the second part of the work, the toxicity analysis of the hybrid nanomaterial composed of magnetite and polyethyleneimine was performed. Detailed characterization of the properties of such nanoparticles in terms of their cytotoxic properties is crucial for their potential use in therapeutic approaches, including its use to decrease the proliferation, migration and invasion of cancer cells.

The third part of this dissertation is related to the construction of new three-dimensional glioblastoma cell models. These types of models may in the future replace currently used two-dimensional cell models in the study of neoplastic invasion processes and be used to assess the effectiveness of new therapeutics with anti-invasive potential. The first proposed model is based on advanced organoid cultures derived directly from the tumor tissue and can be used to study the penetration of substances into the tumor and the interactions between tumor cells. The second proposed model is a modern assembloid culture that aims to replicate the interactions between glioblastoma cells and healthy brain tissue.

# 1. Wprowadzenie

Pomimo wzmoczonych wysiłków środowisk naukowego i lekarskiego, nowotwory w 2020 r. nadal stanowiły jedną z wiodących przyczyn przedwczesnej śmierci w 134 z 183 badanych krajów według Światowego Raportu o Nowotworach publikowanego przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization - WHO). Badania prowadzone do roku 2016 wskazują dodatkowo, że aż 29,8% przypadków śmierci na choroby niezakaźne było związane z przebiegiem choroby nowotworowej. Jedyną grupą chorób o wyższym wpływie na śmiertelność wśród osób w wieku 30-69 lat są choroby układu krążenia (IARC World Cancer Report, WHO 2020). Dane te pokazują, że pomimo znacznego rozwoju wiedzy o nowotworach – ich powstawaniu, rozwoju i przerzutowaniu, nadal brakuje skutecznych środków, które pozwoliłyby na obniżenie śmiertelności chorób nowotworowych, zwłaszcza w krajach o średnim i niskim przychodzie na osobę [1]. Dodatkowo, literatura wskazuje, że starzejące się społeczeństwa krajów o wysokim przychodzie, mogą w przyszłości zmagać się ze zwiększoną liczbą osób chorych i umierających na choroby nowotworowe [2].

## 1.1 Poznanie unikalnych cech nowotworów kluczem do zrozumienia procesu nowotworzenia i opracowania nowych form terapii przeciwnowotworowych.

Nowotworów nie można scharakteryzować jako jednolitej grupy chorób o wspólnym podłożu. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy opisuje się ponad 200 ich typów pochodzących z różnych tkanek i narządów. Niestety, nawet w obrębie jednego rodzaju nowotworu występuje duża zmienność genetyczna i fizjologiczna, która utrudnia ich charakterystykę [3,4]. Nowotwory jako grupę chorób można natomiast scharakteryzować poprzez określenie zestawu unikatowych cech molekularnych, leżących u podstawy procesu nowotworzenia. Jednej z najciekawszych prób skatalogowania najważniejszych cech nowotworów dokonali w roku 2000 Douglas Hanahan i Robert Weinberg, tworząc sześć obszernie opisanych cech rozpoznawczych nowotworów [5]. Lista ta została uzupełniona w latach 2011 i 2022 o kolejne cechy, które nie były wcześniej wystarczająco poznane i opisane. Aktualnie zawiera ona dziesięć pozycji, będących jednocześnie przedmiotem zainteresowania środowiska naukowego skupionego na badaniu nowotworów oraz procesów z nimi związanych (Tabela 1) [6,7].

Tabela 1. Najważniejsze cechy nowotworów wg. Hanahana [6]

1.	Podtrzymanie sygnalizacji pro-proliferacyjnej
2.	Niewrażliwość na inhibitory wzrostu
3.	Wymykanie się spod kontroli układu immunologicznego
4.	Nieograniczony potencjał replikacyjny
5.	Wytwarzanie stanów zapalnych promujących wzrost nowotworowy
6.	Aktywacja inwazji komórkowej i mechanizmów przerzutowania
7.	Promocja angiogenezy bądź rekrutacja komórek układu krążenia
8.	Niestabilność genomowa i częste mutacje
9.	Stawianie oporu śmierci komórkowej
10.	Deregulacja metabolizmu komórkowego

## 1.2 Inwazja komórek nowotworowych

Jedną z najważniejszych cech nowotworów, która została umieszczona już w pierwszym wydaniu teorii Hanahana i Weinberga, jest aktywacja inwazji komórkowej i mechanizmów przerzutowania. Kompetencje te dają możliwość rozprzestrzeniania się nowotworu zarówno w obrębie tkanki zajętej przez nowotwór (inwazja) jak i poza nią (przerzutowanie) [8]. Nawroty nowotworu oraz przerzutowanie są niezwykle istotnymi mechanizmami, które mogą znacząco wpływać na przebieg leczenia i czas przeżycia osób dotkniętych chorobą nowotworową. Współcześnie, zagadnienia te są szczegółowo badane w zakresie dziedziny biologii systemowej – są to wielowątkowe procesy regulowane przez czynniki zarówno genetyczne jak i mikrośrodowiskowe [9]. Inwazja jest procesem wieloetapowym rozpoczynającym się od polaryzacji komórek i zmiany ich kształtu [10]. Następnie formowane są pseudopodia – struktury w formie wypustki wydłużające się poza zarys komórki. Struktury te dokonują adhezji w obszarze wcześniej niezajmowanym przez komórkę, generując tym samym siłę pozwalającą całej komórce przemieścić się w kierunku formowania się pseudopodiów [11]. Początkowo wytwarzanie tych struktur jest zależne od polimeryzacji aktyny oraz formowania się filamentów aktynowych na obrzeżach komórki [12]. Wydłużające się wypustki przez kontakt z macierzą zewnątrzkomórkową (ang. extracellular matrix – ECM) inicjują mechanizmy adhezji oparte na oddziaływaniu integryn obecnych w ECM z cytoszkieletem aktynowym komórki [13]. Kontakt adhezyjny między komórką a otaczającą macierzą w przeciągu minut stabilizuje się i wytwarza się pole kontaktu o wielkości od 1 do kilkunastu um. [14]

Równocześnie w cytoplazmie komórek inwazyjnych zachodzi proces dalszej przebudowy cytoszkieletu aktynowego i formowanie się włókien stresowych [15]. Włókna te zostają następnie skurczone przez miozynę II – białko będące jednym z najważniejszych motorów molekularnych poza komórkami mięśniowymi [16]. W trakcie tego procesu komórka znacząco się skraca w osi pól kontaktu i generuje wewnętrzne naprężenie w ich kierunku. W ostatnim etapie dochodzi do rozkładu punktów adhezyjnych i rozładowania naprężeń występujących w komórce przez przemieszanie się komórki [17]. Mechanizm ten powtarza się cyklicznie i prowadzi do ruchu komórek w określonym kierunku.

### **1.3 Macierz zewnątrzkomórkowa**

Macierz zewnątrzkomórkowa, która jest kluczowym elementem strukturalnym dla inwazji komórek nowotworowych jest, równocześnie pierwszą przeszkodą, którą nowotwór musi pokonać w celu wydostania się z uprzednio zajmowanej pozycji. ECM to trójwymiarowa struktura pozakomórkowa składająca się głównie z białek produkowanych przez komórki, które otacza. Pod względem ilościowym głównym składnikiem ECM jest kolagen, a występowanie jego poszczególnych typów można określić jako tkankowo specyficzne – kolageny I, II oraz III są charakterystyczne dla błony podstawnej a kolagen XVIII jest obecny w macierzy okalającej naczynia krwionośne [18,19]. Innym kluczowym elementem ECM jest fibronektyna – glikoproteina posiadająca dwie fizjologiczne formy – rozpuszczalną fibronektynę plazmową wydzielaną przez komórki wątroby i obecną w krwi oraz fibronektynę w formie nierozpuszczalnej będącą składnikiem macierzy, który reguluje adhezję między komórką a innymi składnikami ECM [20,21]. Skład ECM nie jest stały i podlega częstym zmianom zarówno podczas rozwoju organizmu jak i w procesach patologicznych związanych zarówno z chorobami nowotworowymi jak i nienowotworowymi. Podejścia *in silico* do analizy macierzy zewnątrzkomórkowej pozwoliły wyodrębnić „macierzosom” (ang. matrisome) – sztuczny zbiór białek, które można zidentyfikować jako powiązane z przestrzenią międzykomórkową. Przykładowo macierz mysiego płuca liczy ponad 100 białek w których skład wchodzi zarówno białka ECM, białka transbłonowe oddziałujące z białkami ECM oraz białka regulujące ich funkcje [22]. Lepiej poznana ludzka macierz może składać się z ponad 300 elementów występujących w różnych konfiguracjach zależnych od funkcji komórek produkujących macierz w danej niszy [23]. CAF W skład macierzy zewnątrzkomórkowej kręgowców wchodzi zarówno białka konserwowane ewolucyjnie u większości królestwa zwierząt (kolagen IV, lamininy czy entaktyna) oraz białka relatywnie nowe powstałe w czasie powstawania

wtórnych (np. tenascyny i fibronektyny) [24,25]. Fizjologicznie macierz zewnątrzkomórkowa pełni rolę spajającą tkanki, jest odpowiedzialna za mechanotransdukcję sygnałów zewnątrzkomórkowych oraz bierze udział w zasklepieniu się ran i urazów [26-28].

Skład macierzy zewnątrzkomórkowej jest ściśle regulowany na wielu poziomach i kluczowy dla jej prawidłowego funkcjonowania [29]. Bezpośrednimi regulatorami macierzy zewnątrzkomórkowej są proteazy rozkładające białka macierzy podczas fizjologicznych procesów rozwoju tkanek i organów [29]. Do najważniejszych klas proteaz działających w tych procesach zalicza się metaloproteinazy [30,31], adamalizyny [32] oraz mepryny [33]. Pośrednio na skład ECM mogą również wpływać niekodujące RNA takie jak mikro RNA [34]. Ich działanie polega na regulacji ekspresji białek macierzy takich jak tenascyna-C [35,36]. Alternatywnie, miRNA mogą prowadzić do degradacji transkryptów enzymów rozkładających ECM, powodując nadreprezentację białek, które bez udziału miRNA zostałyby strawione przez zewnątrzkomórkowe proteazy [37].

Komórki nowotworowe mają zdolność do restrukturyzacji macierzy zewnątrzkomórkowej pod względem jakościowym oraz ilościowym. Podczas nowotworzenia w ECM pojawiają się inne typy komórek takie jak zrekrutowane przez nowotwór fibroblasty typu CAF (ang. cancer-associated fibroblast - CAF), komórki układu odpornościowego oraz komórki nowotworu stymulujące przeobrażenie macierzy. [38,39] Działania niepożądane w strukturze ECM są widoczne również w składzie białek będących jej głównym budulcem. Niektóre nowotwory wytwarzają duże ilości kolagenu I, który odkłada się w formie włókien kolagenowych utwardzając macierz i usztywniając obszar objęty nowotworzeniem. [40] Sztywnienie macierzy zewnątrzkomórkowej może natomiast powodować aktywację szlaków sygnałowych promujących rozpoczęcie przejścia epitelialno-mezenchymalnego [41] Przejście epitelialno-mezenchymalne jest dobrze opisanym w literaturze zjawiskiem, w którym stacjonarne komórki epitelialne przechodzą proces transformacji w komórki podobne do komórek mezenchymalnych o wysokim potencjalnie inwazyjnym i migracyjnym [42]. Równocześnie, w tym samym procesie komórki nowotworowe mogą nabyć właściwości podobne do komórek macierzystych, co prowadzi do ich transformacji w komórki macierzyste nowotworu [43,44]. Komórki nowotworowe przybierające taki charakter mogą dalej wzmacniać potencjał inwazyjny, chemiooporność oraz proliferację [45-47].

Aktywowane mechanizmy inwazji i migracji wymagają od komórek nowotworowych uwolnienia się z uprzednio zajmowanych nisz. Dlatego też właściwości nowotworu do modulacji macierzy zewnątrzkomórkowej nie ograniczają się do przebudowy i zwiększania

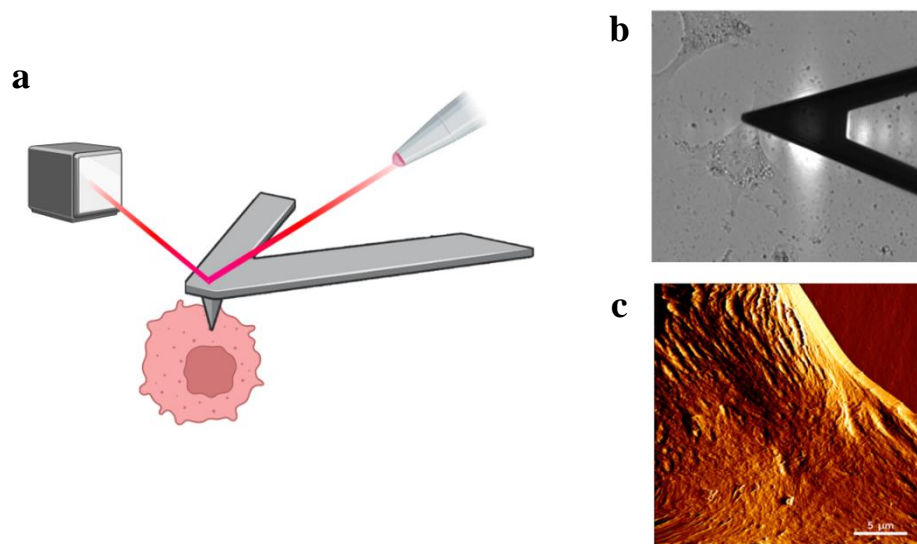
objętości ECM. W pierwszym etapie metastazy i inwazji komórek nowotworowych dochodzi do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej przez proteazy wydzielane aktywnie przez komórki nowotworu [48]. Zhang i inni w 2019 r. wyodrębnili w raku piersi liderowe komórki nowotworowe będące zewnętrzną częścią frontu inwazyjnego. Komórki o tym fenotypie odpowiadają głównie za rozkładanie ECM tkanki w której przebiega proces nowotworzenia. Proces ten wymaga wysokiego wkładu energii przeznaczonej na syntezę enzymów trawiących ECM i jest koordynowany z komórkami podążającymi w kolejnych warstwach frontu. Komórki frontowe po wyczerpaniu energii są usuwane w głąb tkanki nowotworowej a komórki podążające przemieszczają się w stronę frontu, gdzie rozpoczynają zwiększoną produkcję enzymów [49]. Ciągłe procesy budowania i rozkładania ECM są szczególnie widoczne w agresywnych nowotworach, takich jak glejak, rak piersi czy nowotwory złośliwe jajnika [18,23,50]. Szczególną rolę w migracji komórek nowotworowych odgrywiają metaloproteinazy – metaloproteinaza 2 (ang. matrix metalloproteinase 2 - MMP-2) oraz metaloproteinaza 9 (ang. matrix metalloproteinase 9 -MMP-9) produkowane przez komórki glejaka w warunkach *in vivo* [51,52]. Badania jasno wskazują, że ich ilość w ECM rośnie wraz z progresją nowotworu i stanowią one kluczowe enzymy pozwalające komórkom glejaka uwalniać się z niszy nowotworowej [52,53]. Obie żelatynazy wykazują podobną aktywność enzymatyczną a do puli ich wspólnych substratów należą między innymi: kolagen typu IV, V, VII, X, XIV, żelatyna, elastyna i fibronektyna – kluczowe składniki ECM nowotworów [54,55].

### **1.3.1 Badania mechanobiologiczne nowotworów z użyciem mikroskopii sił atomowych**

Współpraca między znacząco różniącymi się na pierwszy rzut oka dziedzinami jak biologia i fizyka pozwoliła stwierdzić, że istotny wpływ na rozwój, agresywność oraz chemiooporność mają nie tylko czynniki molekularne, ale również fizyczne środowisko w którym znajdują się komórki nowotworowe [56]. Ocena faktycznej zmiany sztywności ECM oraz komórek nowotworowych przez długi czas nie była możliwa z powodu braku odpowiednich narzędzi zdolnych badać te parametry w żywych komórkach. Niestety badanie komórek utrwalonych nie jest idealną metodą, gdyż utrwalanie niszczy pewne struktury białkowe, będące podstawą oddziaływań fizycznych między komórką a otoczeniem. Badania właściwości fizycznych komórek wymagają specjalistycznej aparatury, często zmodyfikowanej w celu możliwości obserwacji przyżyciowych. Jednym z podstawowych narzędzi biofizyki nowotworów jest mikroskop sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM) – wielofunkcyjne narzędzie

będące w stanie mierzyć zarówno topografię powierzchni komórek żywych, siły adhezji pomiędzy pojedynczymi cząstkami białek czy sztywność pojedynczych komórek [57].

Podstawowym trybem działania mikroskopu sił atomowych jest badanie topografii obiektów w skali nanometrycznej (Ryc. 1). Przewagą takiego obrazowania nad skaningową mikroskopią elektronową jest możliwość badania komórek żywych bez uprzedniego utrwalania bądź znakowania obiektów, co mogłoby wpływać na pomiar [57]. Badania takie skupiają się często na komórkach bakteryjnych oraz pomiarach związanych z antybiotykami niszczącymi ich ściany i błony biologiczne [58,59]. Możliwe jest również badanie rozmieszczenia i zmian w cytoszkieletcie aktynowym komórek nowotworowych w korelacji z mikroskopią fluorescencyjną [60].



**Rycina 1. Schematyczne przedstawienie działania AFM w trybie badania topografii komórki.**

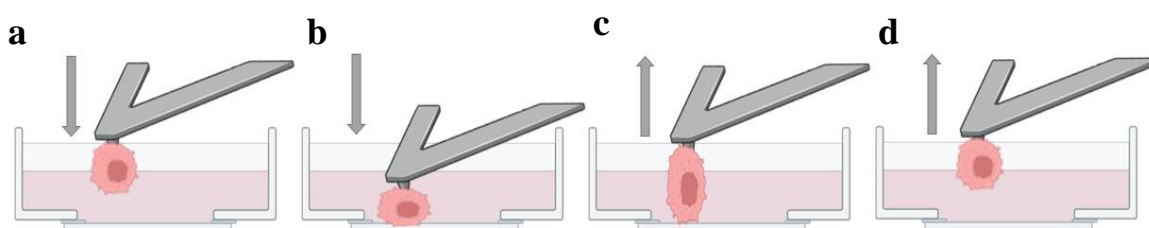
**a** – schemat badania topografii komórki w mikroskopie sił atomowych

**b** – widok operatora na sondę skanującą powierzchnię komórki

**c** – przykładowy obraz powierzchni komórki



Jednym z najnowszych zastosowań mikroskopii sił atomowych w biologii nowotworów jest użycie jej w trybie spektroskopii sił pojedynczych komórek (ang. single cell force spectroscopy - SCFS) [61]. Tego typu pomiary zakładają użycie żywych badanych komórek jako sond, które przytwierdza się do ramienia pozbawionego końcówki próbnikowej [62]. Dzięki takiemu zabiegowi można badać adhezję pojedynczych komórek względem różnych substratów, zarówno heterogennych jak i homogennych powierzchni [61]. Podczas całości procedury jest mierzona siła z jaką komórka przylega do podłoża i praca jaką mikroskop sił atomowych musi wykonać by dokonać odzepienia komórki (Ryc. 2 c). Ten typ SCFS pozwala na mierzenie sił w zakresie 10 pN to 10<sup>6</sup> pN, co daje dużą rozdzielczość i pozwala na porównywanie adhezji między wieloma typami komórek i substratów powierzchniowych [61]. W tym samym eksperymencie, ale podczas zbliżania się komórki do substratu można ocenić sztywność badanej komórki. Komórka dociskana do podłoża jest poddana liniowej kompresji, która jest proporcjonalna do sztywności komórki badanej (Ryc. 2 b) [63].



**Rycina 2. Schematyczne przedstawienie działania AFM w trybie spektroskopii sił pojedynczej komórki.** Na schemacie przedstawiono zachowanie sondy komórka/mikrodrożwignia w czterech kolejnych fazach pomiaru. Szarą strzałką oznaczono kierunek poruszania się sondy w czasie każdej fazy.

- a** – zbliżanie się sondy do powierzchni na której zachodzi pomiar
- b** – dociskanie sondy do powierzchni (wyznaczanie sztywności komórki)
- c** – stopniowe odrywanie sondy od powierzchni pomiarowej (wyznaczanie adhezji komórki)
- d** – oddalenie się sondy od powierzchni i przygotowanie do kolejnego pomiaru

## 1.4 Mechanobiologia glejaka

Obecnie rozwijane są nowe techniki mapowania topografii i elastyczności komórek nowotworowych za pomocą mikroskopii sił atomowych [64]. Obecny stan wiedzy wskazuje na możliwość określania typów komórek oraz dyskryminacji między komórkami nowotworowymi a prawidłowymi komórkami ludzkimi tylko za pomocą technik mikroskopii sił atomowych [65]. Warte odnotowania są również próby korelacji mikroskopii optycznej z technikami AFM w celu zwiększenia przepustowości i dokładności oceny histologicznej nowotworów mózgu [66].

Komórki glejaka pochodzenia postoperacyjnego kultywowane w obecności hydrożeli mogą znacząco zmieniać swoje zachowanie w zależności od sztywności zastosowanego hydrożelu. W hydrożelach o wysokiej gęstości kultury 3D komórek glejaka wykazują większą oporność na temozolomid [67]. Obserwowane jest również zwiększenie się szybkości przemieszczania pojedynczych komórek glejaka oraz procent komórek poruszających się w hodowli przy zwiększającej się sztywności otoczenia [68]. Niestety duża heterogenność w obrębie grup badanych jest dużą przeszkodą w tego typu badaniach i konieczne jest opracowanie nowych modeli bądź znaczne zwiększenie ilości testowanych linii komórkowych pochodzących z resekcji guza [68]. Badania z użyciem elastografii rezonansu magnetycznego wskazują, że sama tkanka nowotworowa może cechować się wysoką heterogennością sztywności [69], a obszary o niższej sztywności są charakterystyczne dla obszarów o większym unaczynieniu [70]. Taka heterogenność nie występuje w zdrowej tkance mózgowej ani w guzach o niższej złośliwości i może być w przyszłości użyta jako kolejny parametr pozwalający na lepszą diagnostykę nowotworów mózgu [71]. Aktualnie w przygotowaniu są algorytmy pozwalające określić stopień złośliwości guzów mózgu za pomocą obrazów tkanek pochodzących z mikroskopii sił atomowych [66].

Sztywność nowotworu może zależeć zarówno od sztywności komórek [72] jak i otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej. [73] Komórki glejaka o inwazyjnym fenotypie są sztywniejsze i wytwarzają wyższe siły mechaniczne na podłożu hodowlanym niż komórki pochodzenia glejakowego o niższej sztywności [72]. Wysoka sztywność ECM wpływa na zwiększoną szybkość poruszania się inwazyjnych komórek nowotworowych glejaka oraz ich właściwości molekularne [74]. Obecność sztywnej ECM promuje również macierzysty fenotyp komórek glejaka i prowadzi do utrzymania wysokiego tempa proliferacji i wzrostu nowotworu przez aktywację ścieżki sygnałowej BCL9L/Wnt/ $\beta$ -katenina [75]. Za jeden z proponowanych mechanizmów zwiększających sztywność komórek glejaka uważa się aktywację szlaku HIF1a-Tenascyna-C zależnego od mutacji IDH1. Tenascyna-C zostaje odkładana w ECM pod wpływem wysokiej ekspresji HIF1a, który w warunkach wysokiej sztywności macierzy zewnątrzkomórkowej ulega nadekspresji. Depozycja tenascyny-C w ECM wtórnie zwiększa sztywność tej struktury i prowadzi do pętli o pozytywnym wzmocnieniu, gdzie nowotwór stale zwiększa sztywność macierzy [76].

#### **1.4.1 Tenascyna-C**

Tenascyna-C jest zewnątrzkomórkową glikoproteiną będącą jednym z wielu składników macierzy zewnątrzkomórkowej [77]. W zdrowych dorosłych organizmach jej ekspresja jest

ograniczona do pewnych warstw skóry, gojących się ran oraz stanów patologicznych, jak zmiany łuszczykowe oraz nowotworowe [78,79]. W rozwoju oraz patologii glejaków najczęściej występuje ona w okolicach naczyń krwionośnych, [80-82] a jej wysoka ekspresja koreluje ze stopniem złośliwości nowotworów mózgu [83]. W innym nowotworze złośliwym – czerniaku, został potwierdzony aktywny udział tego białka w angiogenezie związanej z nowotworzeniem [84]. Pomimo zewnątrzkomórkowej lokalizacji białka TN-C, jest ono w stanie regulować procesy wewnątrzkomórkowe między innymi przez heterodimery integrzyn, takie jak  $\alpha 2/7/8/9\beta 1$  oraz  $\alpha v\beta 1/3/6$ . Integryny pełnią w tym wypadku funkcję przekaźnika sygnału obecności TN-C w ECM do komórek epitelialnych [85]. Mnogość oddziaływań między TN-C a integrzynami powoduje aktywację wielu szlaków sygnałowych przez co TN-C jest w stanie modulować wiele aspektów działania komórek nowotworowych [85]. W stanie fizjologicznym może ona zwiększać migrację komórek [86], zmniejszać ich adhezję [87] oraz promować przejście epitelialno-mezenchymalne podczas embriogenezy [88]. W procesach nowotworowych TN-C dodatkowo wzmacnia glikogenezę [89], promuje angiogenezę [90] oraz wywołuje zmiany w układzie immunologicznym, takie jak kierowanie rozwoju makrofagów w kierunku fenotypu podobnego do M1 czy działa immunosupresyjnie na komórki T [91]. Tenascyna-C może być molekularnym celem terapii glejaka z użyciem dwuniciowego RNA kierowanej na obniżenie ekspresji TN-C. Badania wskazują na zwiększenie się przeżywalności w grupie pacjentów objętych tego typu terapią [92]. Obniżenie poziomu TN-C z użyciem tego samego systemu w komórkach raka piersi zmniejsza adhezję, szybkość migracji i proliferację traktowanych komórek [93]. Naturalnie występującym bezpośrednim regulatorem ekspresji TN-C jest miR-218-5p, który przyłącza się do 3' regionu mRNA TN-C i prowadzi do degradacji transkryptu [35].

## **1.5 Glejak – nowotwór**

Jednym z nowotworów w których tenascyna-C oraz fizyczne właściwości ECM i komórek odgrywają kluczową rolę w rozwoju i inwazji jest glejak (tabela 2) [91,94]. Jest to najpowszechniejszy powstający *de novo* nowotwór centralnego układu nerwowego [95]. Powstanie glejaka łącznie jest z transformacją nowotworową komórek glejowych takich jak astrocyty i oligodendrocyty w obszarze centralnego układu nerwowego [96].

Tabela 2. Funkcje tenascyny-C w komórkach glejaka

modulacja plastyczności komórek	[94,97]
indukcja angiogenezy	[98,99]
aktywacja mechanizmów inwazji i migracji	[100-103]
promowanie fagocytozy	[104]
stymulacja produkcji czynników pro-zapalnych	[104]
immunomodulacja niszy nowotworowej	[105,106]
zwiększanie proliferacji komórek guza	[107-109]

### 1.5.1 Epidemiologia

Mniej niż 1% wszystkich diagnozowanych każdego roku nowotworów jest klasyfikowanych klinicznie jako glejaki. Jednocześnie jest to jeden z nowotworów, które są wyjątkowo trudne w leczeniu, a mediana przeżywalności mieści się w zakresie 14 do 17 miesięcy od diagnozy [110,111]. Prawdopodobieństwo zachorowania na glejaka szczególnie rośnie dla osób po 74 roku życia a liczba przypadków glejaka u mężczyzn jest 40-50% wyższa niż u kobiet [112,113].

### 1.5.2 Objawy

Najczęściej występującymi w populacji objawami przypisywanymi glejakowi są bóle głowy, osłabienie, występowanie spontanicznych ataków drgawkowych, zaburzenia pamięci, funkcji kognitywnych oraz zaburzenia mowy [114]. Niestety, wymienione objawy często nie są początkowo traktowane poważnie przez pacjentów, co stanowczo zmniejsza szanse na szybkie wykrycie rozwijającego się glejaka. Niewątpliwie uwagę należy również zwrócić na zaburzenia psychologiczne takie jak zachowania historyczne, depresyjne oraz schizofreniczne. Takie zaburzenia połączone z objawami somatycznymi powinny prowadzić do diagnostyki zogniskowanej w kierunku nowotworów mózgu [115]. Innymi objawami, które mogą sugerować rozwijający się nowotwór mózgu są szybko postępujące zaburzenia kognitywne. Standaryzowane badania neurologiczne wykonane przed resekcją zostały przeprowadzone na grupie 139 niemieckich pacjentów zdiagnozowanych z nowotworami mózgu. 91% pacjentów posiadało ubytki w co najmniej jednym polu kognitywnym mózgu, podczas gdy aż 71% pacjentów tej samej grupy wykazywało nieprawidłowości w trzech polach kognitywnych. Najczęstszymi upośledzeniami kognitywnymi były trudności z abstrakcyjnym myśleniem, konceptualizacją oraz myśleniem dywergencyjnym [116]. Niestety neuropsychiatryczne jak i somatyczne objawy glejaka w przeszłości zostały pomyłone z takimi chorobami jak depresja

czy zez i nie mogą być jedyną podstawą do stwierdzenia bądź wykluczenia jego występowania [115,117].

### **1.5.3 Diagnostyka obrazowa**

W poprawnej diagnozie guzów mózgu niezbędne jest zastosowanie obrazowania całego organu. Najczęściej używanymi do tego celu technikami są jądrowy rezonans magnetyczny (MRI) oraz tomografia komputerowa (TK) [118]. Proces diagnozy zazwyczaj rozpoczyna się od wykonania tomografii komputerowej, gdzie szuka się niestandardowych struktur w obrębie mózgowia. Pozwala ona również na wstępną diagnostykę różnicową pomiędzy nowotworem a krwotokiem wewnątrz mózgu. Kolejnym krokiem w standardowej procedurze wykrywania i klasyfikowania guzów mózgu jest wykonanie rezonansu magnetycznego zależnego od T2 pozwalającego na rozpoznanie pomiędzy torbielą a masą nowotworową oraz dalszą diagnostykę w kierunku wewnętrznego krwotoku [119]. Za wyjątkowo przydatne w planowaniu późniejszej resekcji nowotworu uznaje się echo gradientowe zależne od T2 w wysokiej rozdzielczości (0,5-1,2mm na obraz). Obraz tego typu pozwala na rozpoznanie trudno dostępnych struktur mózgu i dokonanie resekcji przy zmniejszonym prawdopodobieństwie uszkodzenia zdrowych części mózgu [120].

### **1.5.4 Diagnostyka molekularna oraz wyznaczanie prawdopodobieństwa przeżywalności**

Literatura wskazuje, że aktualnie nie ma żadnych wiarygodnych molekularnych markerów glejaka związanych z przeżywalnością dłuższą niż 36 miesięcy [121]. Jednocześnie największa dotychczasowa 10-letnia analiza wskazuje na 0,71% przeżywalności w okresie 10 lat od diagnozy. Metaanaliza ta potwierdza korelację pomiędzy ogólną przeżywalnością i czasem wolnym od progresji [122]. Grupa pacjentów, która przeżyła ponad 10 lat od diagnozy jest szczególnie często badana pod względem określenia czynników odpowiadających za tak rzadki przebieg choroby, ale nie udało się zidentyfikować żadnych pojedynczych markerów tego wyjątkowego stanu. Analiza wielomarkerowa pokazała, że na dłuższą przeżywalność szczególnie pozytywnie wpływa kombinacja niskiego wieku, brak mutacji w genie TERTp, zmutowane geny IDH1 bądź IDH2 oraz metylację genu MGMTp [123]. Jednym z czynników epigenetycznych mających prawdopodobnie duży wpływ na ogólną przeżywalność jak i czas bez progresji nowotworu jest metylacja w obrębie genu metylotransferazy O<sup>6</sup> metyloguaniny (ang. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyl-transferase, MGMT) [124]. Metaanaliza przeprowadzona w roku 2018 wskazuje na wydłużenie się okresu całkowitej przeżywalności

u pacjentów z wyciszonym genem MGMT, ale nie potwierdziła wydłużenia czasu wolnego od progresji nowotworu [125].

Jak wskazują powyższe przypadki określenie czasu przeżywalności może być trudne nie tylko przez małą ilość wiarygodnych wskaźników, ale również przez dużą heterogenność pomiędzy guzami u różnych pacjentów. Aktualnie wprowadzane są również podejścia wykorzystujące uczenie maszynowe i analizy predykcyjne do projektowania internetowych narzędzi mających pomóc w oszacowaniu potencjalnego czasu przeżywalności dla indywidualnych pacjentów [126,127].

### **1.5.5 Czynniki zwiększające szansę na rozwój glejaka**

Niska przeżywalność chorujących, ciężki przebieg choroby oraz brak wiarygodnych markerów pozwalających na szybkie wykrycie tego nowotworu spowodowały, że w zbiorowej wyobraźni glejak zaistniał jako niezwykle niebezpieczny nowotwór. O zwiększenie liczby zachorowań na glejaka zaczęto obwiniać nowoczesne technologie, które pojawiły się na świecie w tym samym czasie, gdy znaczącej poprawie uległy procedury diagnostyczne pozwalające na diagnostykę nowotworów mózgu. Wiele czynników, które podejrzewano o bycie przyczyną nowotworów mózgu zostało szczegółowo przebadanych w szeroko zakrojonych analizach na dużych populacjach, co umożliwiło wyeliminowanie podejrzeń o ich właściwości karcynogenne. Dotychczasowe wielkoskalowe badania nie wykazały wzrostu zachorowań na glejaka w populacji angielskiej oraz skandynawskiej (Dania, Finlandia, Norwegia i Szwecja) wśród osób używających w umiarkowany sposób telefonów komórkowych. Badania są jednak nadal prowadzone, gdyż telefonia komórkowa nadal jest rozwijana i wprowadzane do użytku są pasma radiowe obsługujące sieć komórkową o nowych częstotliwościach [128,129]. Kolejnym utrwalonym w społeczeństwie mitem jest korelacja między występowaniem glejaka a ekspozycją na stałe źródła promieniowania elektromagnetycznego takiego jak prąd elektryczny o wysokim natężeniu. W odpowiedzi na obawy społeczeństwa przebadana została długotrwała ekspozycja na pole magnetyczne o ekstremalnie niskich częstotliwościach występujące np. pod liniami wysokiego napięcia dostarczającymi prąd do odbiorców. Badania wykonane między innymi na grupie 20 tysięcy maszynistów pracujących w zawodzie średnio 30 lat, nie wskazują na korelację między występowaniem nowotworów mózgu a długotrwałą ekspozycją na pole magnetyczne o ekstremalnie niskich częstotliwościach [130,131]. Niekonkluzywne są natomiast badania, które miały za zadanie sprawdzić korelację między długoletnim używaniem pestycydów. Większość badań nie wskazuje na zależności między ekspozycją na pestycydy [131-133], jednakże badania francuskich grup ujawniają wzrost

zachorowań na glejaka zwłaszcza w grupie pracowników winnic znanych ze stosowania dużych ilości pestycydów [134,135]. Jedynym czynnikiem środowiskowym, który jest szeroko uznany jako sprzyjający powstawaniu glejaka jest ekspozycja na promieniowanie radiacyjne [136]. Badania przeprowadzone na największej znanej próbie osób poddanych działaniu promieniowania jonizującego - ocalałych z ataków nuklearnych na Hiroszimę i Nagasaki, wskazują na zwiększone prawdopodobieństwo występowania wszystkich nowotworów centralnego układu nerwowego z wyjątkiem nerwiaka osłonkowego. Ryzyko nie zostało jednak określone względem otrzymanej dawki promieniowania ze względu na brak możliwości jej oszacowania [137]. Publikacje badające wpływ znanych dawek promieniowania wskazują, że na radiacyjną indukcję glejaka bardziej narażone są osoby młode [138,139]. Metaanalizy wskazują również na powstawanie wtórnych ognisk glejaka wywoływanych przez stosowanie radioterapii mózgu w leczeniu zarówno glejaków jak i innych nowotworów w obrębie głowy [140,141]. Przerzuty glejaka występują najczęściej w obrębie 2cm od lokalizacji pierwotnego guza a przerzuty poza obręb czaszki występują niezwykle rzadko [3,142]. Taka charakterystyka sprawia, że za główne mechanizmy rozprzestrzeniania się komórek glejaka uznaje się inwazję oraz migrację [143].

## **1.6 Terapia glejaka**

Terapia glejaków jest nadal jednym z największych wyzwań we współczesnej onkologii. Utrudniony dostęp do guza, duża heterogenność oraz oporność części komórek na radiację stawiają wiele przeszkód w praktyce klinicznej. Do roku 2005 najczęściej stosowaną terapią glejaka była chirurgiczna resekcja połączona z radioterapią. Wspólne badanie prowadzone przez Europejską Organizację Badań i Leczenia Guzów Mózgu oraz Narodowy instytut Badań Nowotworów Kanadyjskiej Grupy Badań Klinicznych wyznaczył nowy standard leczenia glejaka na całym świecie. Obecnie protokół, nazwany od nazwiska autora protokołem Stupp'a został opublikowany w roku 2005 i nadal używany jest w większości przypadków leczenia glejaka [144]. Zakłada on synergiczne działanie radioterapii i chemioterapii stosowanej po chirurgicznej resekcji guza. Pacjenci byli napromieniowywani w protokole frakcjonowanych dawek (2Gy przez pięć dni w tygodniu przy łącznym czasie 6 tygodni) oraz otrzymywali 75mg temozolomidu na metr kwadratowy powierzchni ciała każdego dnia podczas 6-tygodniowego leczenia radiacyjnego. Dodatkowo zastosowano leczenie za pomocą TMZ w sześciu 28 dniowych cyklach po zakończeniu terapii radiacyjnej (150-200mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała przez 5 z 28 dni cyklu). Dwuletnia przeżywalność u pacjentów leczonych protokołem Stuppa

wyniosła 26,5% podczas gdy poprzedni protokół z zastosowaniem wyłącznie radioterapii wskazywał na wynik dwuletniej przeżywalności na poziomie 10,4% [144]. W badaniu retrospektywnym z roku 2020 wykazano, że kohorta leczona według protokołu Stupp'a wykazuje bardzo podobne do oryginalnego badania wyniki, a skuteczność tego podejścia może być nawet wyższa przy szybkim rozpoczęciu terapii od czasu rozpoznania nowotworu [145].

Pomimo ustanowienia protokołu Stuppa jako złotego standardu w leczeniu glejaka, nadal prowadzone są prace nakierowane zarówno na ulepszenie poszczególnych elementów tego podejścia, jak i zastosowanie zupełnie nowych technik terapeutycznych. Poza klasycznymi metodami – resekcją/chemioterapią/radioterapią szczególnie atrakcyjne wydają się być badania wykazujące skuteczność różnych form immunoterapii oraz nowoczesne podejście do transportu chemioterapeutyków oparte na zastosowaniu nanonośników.

### **1.6.1 Resekcja**

Pierwszym krokiem w każdej terapii glejaków jest chirurgiczne usunięcie tkanki nowotworowej. Niestety umiejscowienie guza we wrażliwych rejonach mózgu często ogranicza możliwość pełnej resekcji. Celem neurochirurgów jest znalezienie balansu pomiędzy pełnym usunięciem tkanki nowotworowej a zachowaniem wszystkich funkcji neurologicznych mózgu pacjenta [146]. Obecnie najczęściej stosowanym środkiem mającym wspomagać operacje neurologiczne na pacjentach z tego typu nowotworem jest fluoronawigacja będąca śródoperacyjną wersją mikroskopii fluorescencyjnej. Procedura polega na znakowaniu guza poprzez podanie przedoperacyjne kwasu 5-aminolewulinowego, który w komórkach nowotworowych powoduje akumulację protoporfiryny IX. Związek ten może być następnie obrazowany za pomocą śródoperacyjnej mikroskopii fluorescencyjnej, co pomaga wyznaczyć granice guza i dokonać resekcji [147]. Podczas badań klinicznych z zastosowaniem tego systemu zaobserwowano zwiększenie się o połowę liczby pacjentów nie wykazujących wznowy nowotworu w przeciągu 6 miesięcy od operacji [148]. Stosowane są również inne śródoperacyjne metody obrazowania takie jak śródoperacyjny rezonans magnetyczny (ang. - intraoperative MRI, iMRI) [149], śródoperacyjna spektrometria mas (ang. intraoperative mass spectrometry, iMS) [150] czy optyczna tomografia koherencyjna (ang. optical coherence tomography, OCT) [151]. Każdy z tych systemów pozwala zwiększyć precyzję chirurga i pozwolić mu na lepsze rozróżnienie między tkanką nowotworową a zdrową podczas operacji. Niestety są to systemy bardzo drogie i niemożliwe do zastosowania na tak szeroką skalę jak systemy oparte na fluoronawigacji.



## 1.6.2 Radioterapia

Największym znanym problemem w stosowaniu radioterapii jest oporność glejaka na długotrwałe promieniowanie. Jednym z mechanizmów tej oporności jest obecność komórek nazywanych komórkami macierzystymi glejaka, których ilość znacząco zwiększa się po odbyciu radioterapii. Komórki te odznaczają się powierzchniowym antygenem CD133 (Prominina) i są charakterystyczne zarówno dla glejaka jak i nerwowych komórek macierzystych. Molekularny mechanizm, który odpowiedzialny jest za oporność komórek CD133+ na radiację jest powiązany z aktywacją odpowiedzi na uszkodzenia DNA co powoduje natychmiastowe zwiększenie możliwości naprawy uszkodzeń powodowanych przez terapię [152]. Jedną ze strategii przezwyciężenia mechanizmu radiooporności glejaka była próba zmiany frakcjonowania dawek promieniowania. Hipofrakcjonowana radioterapia (ang. hypofractionated radiotherapy, HRT) w połączeniu z jednoczesnym stosowaniem temozolomidu miała w założeniu zmniejszyć ilość następujących frakcji promieniowania przyjętego przez pacjenta z jednoczesnym zwiększeniem dawki promieniowania. Taka strategia miała docierać do większej ilości komórek nowotworowych bez pogarszania stanu pacjenta przez długie trwanie radioterapii. Niestety to podejście nie wykazało znaczącej przewagi HRT nad standardowo frakcjonowaną radioterapią (ang. standard fractionated radiotherapy, SFRT) i nie zwiększyło istotnie okresu przeżywalności w prowadzonych badaniach [153-155]. Przy braku skuteczności nowoczesnych podejść w radioterapii glejaka szybko rozwijającym się polem farmakologicznym została produkcja radiouczulaczy - leków uwrażliwiających komórki nowotworowe na skutki radioterapii [156]. Środki te mają różne molekularne zadania, proponowane mechanizmy obejmują głównie inhibowanie mechanizmów naprawczych [157] bądź tworzenie substancji cytotoksycznych dla komórek nowotworowych przyspieszających procesy apoptotyczne [158]. Niestety, ten kierunek badań nadal nie doczekał się leku, który przeszedłby pozytywnie III fazę badań klinicznych i został dopuszczonym do stosowania w standardowej terapii glejaka. [159] Postęp nastąpił w dziedzinie brachyterapii. Tego typu terapia z użyciem  $^{131}\text{Cs}$  umieszczonym na kolagenowych płytkach została dopuszczona do użycia w leczeniu przez FDA w Stanach Zjednoczonych. Terapia ta wyróżnia się krótkim czasem półtrwania izotopu  $^{131}\text{Cs}$  (ok 9,7 dnia) oraz łatwością umieszczenia kolagenowej płytki podczas operacji [160]. Terapie radiacyjne w obrębie centralnego układu nerwowego zawsze budziły kontrowersje związane z możliwością uszkodzeń neurokognitywnych, zarówno wśród pacjentów obawiających się o stan swojego zdrowia neurologicznego po zabiegu jak i lekarzy. Obecne metaanalizy wskazują, że powikłania neurokognitywne mogą występować podczas leczenia w kombinacji radio

i chemioterapii, ale poziom ryzyka nie jest oszacowany przez brak długoterminowych badań zdrowia neurologicznego pacjentów poddanych [161]. Natomiast najnowsze doniesienia potwierdzają, że konwencjonalna radioterapia z jednoczesnym zastosowaniem chemioterapii jest względnie bezpieczna nawet u pacjentów ze zdiagnozowanym wieloogniskowym glejakiem, gdzie pole mózgu ulegające napromieniowaniu jest stosunkowo duże i obawiano się radiacyjnego uszkodzenia tkanki mózgowej [162].

### 1.6.3 Chemioterapia

Najczęściej stosowany w terapii glejaka temozolomid został zsyntezowany w latach 80' jako jeden z serii nowatorskich imidazotetrazinonów [163]. Lek ten jest niebezpośrednim czynnikiem metylującym, który pierwszy raz w terapii nowotworów został użyty podczas badań klinicznych w roku 1997. Badania te obejmowały pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem oraz czerniakiem skóry [164]. TMZ nie jest bezpośrednim czynnikiem aktywnym w komórkach ludzkich, a w terapii pełni rolę proleku – cząsteczki wprowadzanej do organizmu w formie nieaktywnej, której aktywacja zachodzi dopiero w organizmie pacjenta [165]. W fizjologicznym pH ~7 roztworów wodnych takich jak krew ulega on hydrolizie w wyniku której powstaje monometylo-triazenoimidazolo-karboksamid (MTIC) – związek o aktywności w komórkach ludzkich. Jego działanie polega na metylowaniu DNA co powoduje późniejsze błędy podczas transkrypcji ponieważ metylowana guanina zostaje podstawiona tyminą. Takie błędnie podstawienie guanin w wielu losowych miejscach w DNA może prowadzić komórkę na ścieżkę apoptozy bądź utrwalić substytucję T:C i wprowadzić poważne błędy w transkrypcji, translacji i aktywności zmutowanych genów. Najczęstszymi modyfikacjami DNA powstałymi podczas terapii TMZ są: metylacja w pozycji N7 guaniny, O3 adeniny oraz O6 guanozyny [165]. Najprawdopodobniej to właśnie metylacja O6 guanozyny jest kluczowa w mechanizmie skuteczności temozolomidu. Wniosek taki zaproponowano po opublikowaniu badań, w których znacząco większą aktywność cytotoksyczną *in vitro* uzyskano dla komórek, które wykazują niski poziom ekspresji i aktywności enzymu transaminazy alaninowo-glioksyłanowej (AGT). Enzym ten odpowiada za usuwanie adduktu metylowego z miejsca O<sup>6</sup> cząsteczki guaniny i przenoszenia go bezpośrednio na cysteinową resztę samego enzymu. Mechanizm ten zapobiega dalszym uszkodzeniom DNA uniemożliwiając podstawianie błędnego nukleotydu podczas replikacji i hamuje efekt cytotoksyczny TMZ [166]. Enzym ten stał się też pierwszym celem dla badaczy starających się wzmocnić działanie terapii opartej na temozolomidzie. Inhibicja tego enzymu pozwalałaby na zmniejszenie liczby napraw DNA pomiędzy cyklami replikacji i wprowadzenie większości komórek w stan aresztu komórek w fazie G2-M [167].

Alternatywnym podejściem do wzmocnienia efektu cytotoksycznego TMZ jest inhibicja szlaku naprawy DNA przez wycinanie zasady co skutecznie obniża żywotność komórek nowotworowych [168].

Tak jak w przypadku wszystkich chemioterapeutyków stosowanie TMZ jest obarczone wieloma możliwymi skutkami ubocznymi. Badania wskazują głównie na powszechne powikłania związane z chemioterapeutykami takie jak wymioty, nudności czy przewlekłe zmęczenie [169]. Dużo bardziej groźne dla pacjentów są powikłania hematologiczne, do których zaliczamy niedokrwistość aplastyczną oraz zespoły mielodysplastyczne [170]. Podczas stosowania TMZ można też spodziewać się zwiększonej podatności na przewlekłe infekcje bakteriami takimi jak *Pneumocystis Carinii* [171,172].

Zastosowanie leczenia temozolomidem było niewątpliwym przełomem w skuteczności leczenia glejaka, niestety nadal nie są znane metody leczenia, które zwiększyłyby 10 letnią przeżywalność wśród pacjentów. [122] W związku z tym rozpoczęto szeroko zakrojone badania mające na celu zwiększenie skuteczności radioterapii oraz poszukiwanie zamienników dla temozolomidu. Molekularną przesłanką do ograniczenia stosowania TMZ jest zjawisko zezłośliwienia niższych glejaków poprzez mechanizm hipermutacji typu G:C>A:T. [173] Mechanizm ten nie jest ostatecznie poznany, ale literatura wskazuje, że może on powodować gorszy przebieg choroby bądź nawroty nowotworu jeśli TMZ zastosowany będzie do glejaka WHO I-III błędnie rozpoznanego jako glejak IV WHO. [174,175]

#### **1.6.4 Immunoterapia**

Jednym z nowoczesnych podejść w terapii glejaka jest immunoterapia z użyciem zmodyfikowanych limfocytów T - terapia CAR-T (ang. chimeric antigen receptor). Terapia ta opracowywana od roku 1989 opiera się na modyfikowaniu limfocytów T za pomocą chimerycznych receptotów w taki sposób, aby możliwe było wybranie dla nich dowolnego celu molekularnego na powierzchni atakowanej komórki [176]. Dzięki takiemu narzędziu możliwe jest nakierowanie układu immunologicznego pacjenta na pojedyncze populacje komórek posiadających wybrany antygen. Pierwsze udane próby kliniczne takiej terapii przeprowadzono na osobach cierpiących na chroniczną i ostrą białaczkę szpikową [177,178]. Terapia ta spotkała się z dużym uznaniem i liczne grupy na świecie zaczęły testować jej warianty na innych typach nowotworów takich jak nowotwory jajnika, rak piersi czy neuroblastoma [179-181]. Pierwsze próby z użyciem limfocytów T typu CAR kierowanych na antygen EGFRvIII zostały przeprowadzone na pacjentach z powracającym glejakiem w roku 2017. Badanie potwierdziło, że modyfikowane limfocyty dotarły do tkanki nowotworowej, jednak metoda ta wymaga

przeprowadzenia dalszych badań, gdyż mikrośrodowisko tworzone przez glejaka jest trudne do penetracji dla limfocytów, a sama ekspresja antygeny EGFRvIII wykazuje dużą heterogenność zarówno wewnątrz nowotworu jak i pomiędzy nimi. Taka sytuacja powoduje, że tego typu terapia nakierowana na antygen EGFRvIII nie może być rozpatrywana jako nowe, powszechnie stosowane rozwiązanie terapeutyczne [182]. Odpowiedzią na heterogenność nowotworu może być wybranie innego celu molekularnego dla tego typu terapii bądź wykorzystanie systemu nakierowanego na więcej niż jeden antygen. Najnowsze doniesienia opisują terapię typu CAR-T, w której limfocyty zostały skierowane na dwa niezależne cele molekularne – synNotch jako antygen „kierujący” oraz drugi cel molekularny taki jak EphA2 czy IL13R $\alpha$ 2 jako antygen „oznaczający”. Atakowane są tylko komórki posiadające oba antygeny. W tym podejściu jako antygen „oznaczający” używa się celów będących obecnymi poza komórkami glejaka, dodatkowy czynnik synNotch obecny w glejaku powoduje śmierć tylko komórek nowotworowych [183]. Najnowszym podejściem w zakresie stosowania CAR-T w leczeniu glejaka jest skierowana do pierwszej fazy badań klinicznych terapia nakierowana na komórki posiadające antygen GD2 obecny na powierzchni rozlanego glejaka pnia mózgu (DIPG) oraz rozsianych glijaków linii środkowej kręgosłupa (DMG) [184].

### **1.6.5 Nowe podejścia w terapii glejaka**

Jednym z najnowszych osiągnięć w dziedzinie leczenia glijaków jest opracowanie oraz wdrożenie pilotażowego leczenia za pomocą zmiennych pól elektrycznych o niskim natężeniu (TTFields). Zmienne pole elektryczne o częstotliwości 150kHz może zaburzać mitozę komórek nowotworowych poprzez oddziaływanie na białka posiadające duży moment dipolowy. Poprzez zaburzenie lokalizacji takich białek w trakcie mitozy dochodzić może do wytworzenia się nieprawidłowej organizacji materiału genetycznego co skutkuje zatrzymaniem mitozy i skierowaniem komórek w stronę apoptozy [185]. W opublikowanych badaniach klinicznych terapia skojarzona – TTFields oraz standardowa terapia temozolomidem wydłużyła średni czas bez remisji o 3 miesiące w grupie 210 pacjentów [186]. Rozwój TTFields nadal trwa i przeprowadzanych jest obecnie 25 zarejestrowanych badań klinicznych z zastosowaniem tej technologii. Niesprzyjającymi okolicznościami są wysoki koszt takiej terapii oraz potrzeba używania urządzenia generującego pole przez minimum 18 godzin dziennie [187].

Kolejnym nowatorskim podejściem jest miejscowa radioterapia z użyciem peptydów znakowanych radioaktywnie – analogów somatostatyny oraz neurokininy 1 [188,189]. Takie peptydy przyłączają się do specyficznych dla glejaka receptorów glikoproteinowych dzięki czemu zostają unieruchomione na powierzchni komórek i dostarczają promieniowanie

miejscowo do ognisk nowotworowych [190] Innym badanym aktualnie sposobem dotarcia do komórek nowotworowych jest użycie onkolitycznych wersji wirusów opryszczki pospolitej (HSV). Pierwsze udane próby zastosowania takich wirusów zdolnych do replikacji wyłącznie w komórkach glejaka miały miejsce w roku 1991 [191]. W badaniach wykorzystuje się wirusy modyfikowane genetycznie w celu zmniejszenia ich neurotoksyczności [192], okresu latencji wirusa [193] oraz uwrażliwienia go na acyklowir [194]. Niestety nadal żadna terapia oparta na tej technologii nie przeszła III fazy badań klinicznych na ludziach [195]. Większość z obecnie stosowanych i testowanych terapii przeciwko glejakowi skupia swoje wysiłki na obniżeniu potencjału proliferacyjnego komórek.

### **1.6.6 Przyszłość terapii glejaka**

Obecnie stosowane rozwiązania terapeutyczne oparte na użyciu środków farmakologicznych skupiają się na obniżeniu potencjału proliferacyjnego komórek glejaka. Niestety tego typu podejście ignoruje inne kluczowe cechy nowotworowe takie jak jego inwazyjność. Skierowanie badań w kierunku inhibicji potencjału inwazyjnego komórek może mieć wiele korzyści w zahamowaniu rozwoju najbardziej agresywnych nowotworów [196]. Ten sposób walki z guzem może polegać na obniżeniu ekspresji enzymów rozkładających macierz [197], deregulacji ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za aktywację inwazji [198], czy też blokowaniu przejścia epitelialno-mezenchymalnego będącego aktywatorem mobilności komórek nowotworowych [199]. Glejak jako nowotwór o dużej mobilności w obrębie mózgu oraz wysokim potencjale inwazyjnym jest doskonałym modelem, na którym tego typu terapie mogłyby być zastosowane [200]. Wyraźnym atutem tego podejścia jest dobre poznanie mechanizmów inwazji glejaka [201]. W przeszłości podejmowano już próby oddziaływania na macierz glejaka w celu obniżenie potencjału inwazyjnego [202] ale trudności w dostarczaniu terapeutyków do ognisk nowotworowych glejaka spowodowały zahamowanie rozwoju tego typu terapii. Zastosowanie nowoczesnych nanonośników może spowodować rozwinięcie się nowych terapii antyinwazyjnych glejaka opartych o terapie genowe jako uzupełnienie klasycznych terapii mających na celu zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych.

### **1.7 Nanomateriały jako nowe narzędzia przeciwnowotworowe**

Alternatywnym sposobem na zwiększenie skuteczności terapii przeciwnowotworowych w przypadku glejaków jest zastosowanie nowych nośników dla znanych już leków onkologicznych. Takie podejście mogłoby prowadzić do zmniejszenia całkowitej dawki chemioterapeutyków podawanych pacjentowi przy zwiększeniu ilości leku, który trafia

bezpośrednio do komórek nowotworowych. W tym celu testowane są nanomateriały – wyspecjalizowane struktury chemiczne o unikalnych właściwościach fizycznych. Będące podklasą nanomateriałów nanocząstki mogą potencjalnie służyć jako nośniki leków [203], czynniki generujące wolne formy tlenu [204] czy struktury pośredniczące w nowy formach terapii opartych o zjawiska fototermiczne oraz magnetotermiczne [205].

Nanocząstki, według rekomendacji Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej z roku 2012 dotyczącej nazywania polimerów, to cząstki dowolnego kształtu o wymiarach mieszczących się w zakresie od  $1 \times 10^{-9}$  do  $1 \times 10^{-7}$  metra. Cząstki o podobnych właściwościach, a posiadające wymiary w zakresie od  $1 \times 10^{-7}$  do  $1 \times 10^{-4}$  metra, według tego samego dokumentu powinny być nazywane mikrocząstkami. Jednakże, przewidziano możliwość wykorzystania przedrostka „nano” dla cząstek o wielkości do  $5 \times 10^{-7}$  metra ze względu na ich właściwości oraz trudności w pomiarze [206]. Pomimo szybko rozwijających się badań nad nanocząstkami nie opracowano jeszcze żadnych nadrzędnych kategorii pozwalających klasyfikować nanomateriały ze względu na ich atrybuty. Literatura najczęściej dzieli te cząstki ze względu na: materiał użyty do syntezy, typ syntezy, ilość elementów składowych nanocząstki oraz przeznaczenie materiału.

### **1.7.1 Nanocząstki węglowe**

Odrębną grupą nanocząstek są nanocząstki węglowe. W tej grupie wyodrębniamy fulereny, nanorurki oraz nanodiamenty.

Fulereny to rozpuszczalne w wodzie [207] formy węgla charakteryzujące się zamkniętą trójwymiarową budową z pustą przestrzenią wewnątrz węglowego szkieletu. Najbardziej znanym przedstawicielem fulerenów jest C<sub>60</sub> – cząstka o kształcie dwudziestościanu ściętego zbudowanego z 60 atomów węgla. Ze względu na tę charakterystyczną budowę sugeruje się, że fulereny mogą być transporterami leków takich jak ibuprofen [208]. Niestety ich użyteczność może być ograniczona przez profil biodystrybucji tego nanomateriału. Badania tej właściwości na zwierzętach laboratoryjnych wykazało, że C<sub>60</sub> podany dożylnie szczurom już po pół godzinie opuszcza całkowicie układ krwionośny a ostatecznie odkłada się głównie w wątrobie i nie jest wydalany z ekskrementami. Wskazuje to na potencjalne problemy z akumulacją takiego nanomateriału w organizmach zwierząt, co niestety wyklucza zastosowanie niemodyfikowanych fulerenów u ludzi podczas podawania dożylnego [209]. Obecnie postulowane są zastosowania nanomateriałów węglowych w dziedzinach dermatologii oraz produkcji kosmetyków [210]. Podczas gdy tak administrowane fulereny nie akumulują w organizmie w takim samym stopniu co fulereny podawane dożylnie, zastosowanie ich w

formie kosmetyku zwiększa szansę na dostanie się tego typu materiałów do zbiorników wodnych w środowisku. Dane zebrane z wielu publikacji sugerują natomiast negatywny wpływ tego rodzaju nanocząsteczek na zwierzęta wodne [211].

Nanodiamenty to nanocząstki węglowe o charakterystycznej budowie diamentu. Posiadają zróżnicowaną wielkość oraz kształty i mogą być produkowane za pomocą wielu opisanych technik takich jak synteza w wysokiej temperaturze i ciśnieniu [212], wzrost poprzez chemiczne osadzanie fazy gazowej (CVT) [213] czy synteza podczas eksplozji z użyciem materiałów wybuchowych [214]. W zastosowaniach biologicznych najciekawsze wydają się być nanomateriały detonacyjne, gdyż przy małej wielkości posiadają stosunkowo dużą powierzchnię. Może mieć to zastosowanie w użyciu nanodiamentów jako nośników dla innych cząsteczek takich jak leki [215]. Jednocześnie wysoce oczyszczone niemodyfikowane nanodiamenty mogą być wykorzystywane jako czynnik wychytujący cytokiny wytwarzane podczas syndromu wyrzutu cytokin u myszy [216]. Niestety obecny stan wiedzy wskazuje na to, że nanodiamenty mogą być toksyczne dla systemu reprodukcyjnego ssaków przez co dalsze badania nad ich cytotoksycznością muszą zostać wykonane przed szerokim zastosowaniem ich w badaniach biomedycznych [217].

Ostatnią szeroko badaną grupą węglowych nanocząstek są nanorurki. Składają się one z atomów węgla ułożonych w sposób zbliżony do arkusza grafenu, lecz o strukturze przypominającej pustą w środku rurę. Można wyodrębnić dwie grupy nanorurek – jednościenne oraz wielościenne [218,219]. Oba typy nanorurek węglowych są obecnie badane pod kątem zastosowań w biologii i medycynie – między innymi jako podłoża w inżynierii tkanek [220,221], nośniki leków onkologicznych [222,223] czy sensory wykrywające związki chemiczne takie jak witamina D [224].

### **1.7.2 Nanocząstki metaliczne**

Nanocząstki metaliczne najczęściej wykonywane są z metali szlachetnych – złota, srebra oraz platyny [225]. Pojawiają się jednak próby syntezy biokompatybilnych nanocząstek metali ziem rzadkich opłaszczanych biokompatybilnymi otoczkami z polietylenoglikolu czy kwasu poliakrylowego [226-228]. Klasyczną metodą syntezy nanocząstek złota opublikowaną w roku 1951 jest metoda Turkevicha polegająca na redukcji kwasu tetrachlorozłotowego (III) z użyciem cytrynianu sodu [229]. Kolejne modyfikacje tej metody pozwoliły na zmianę wielkości uzyskiwanych nanocząstek i są nadal stosowane jako sprawdzone metody syntezy złotych nanocząstek, pomimo odkrycia nowych metod syntezy pozwalających na więcej możliwości modyfikacji końcowego produktu [230]. Nanocząstki srebra oprócz chemicznej

redukcji jonów srebra [231-233] można natomiast otrzymywać metodami fizycznymi - za pomocą laserowej ablacji metalu w roztworze [231] czy metodą elektrołukową z zastosowaniem drutu srebrnego [232].

W ostatnich latach wiele ośrodków naukowych skupia się na odejściu od fizycznych i chemicznych metod syntezy nanocząstek metalicznych na rzecz nowych „zielonych” rozwiązań opierających się na prowadzeniu reakcji chemicznych za pomocą ekstraktów z roślin i mikroorganizmów [234,235]. Taka zielona synteza nanocząstek opiera się na wykorzystaniu materiału roślinnego jako czynników redukujących jony metali. Redukcja zachodzi w ekstraktach roślinnych a wzrost nanomateriałów jest ograniczany przez ilość materiału roślinnego [236]. Dużą zaletą pozyskiwania nanocząstek poprzez metody zielonej chemii jest brak toksycznych zanieczyszczeń w otrzymanym materiale co zwiększa jego biokompatybilność [237]. Do syntezy nanocząstek srebra wykorzystuje się takie surowce jak: ekstrakty skórek *Benincasa hispida* [238] czy miazgę pochodzącą z liści *Brassica oleracea* [239].

Inną eksplorowaną obecnie drogą syntezy jest biosynteza z użyciem mikroorganizmów morskich [240,241]. Niestety taka droga syntezy może powodować powstanie warstwy zewnątrzkomórkowych polimerów pochodzenia mikrobiotycznego na powierzchni nanocząstek. Tego typu otoczki mogą wtórnie wiązać metale ciężkie i prowadzić do ich akumulacji przy zastosowaniu nanomateriałów w środowiskach wodnych [242].

Najnowsze osiągnięcia w dziedzinie syntezy nanomateriałów za pomocą litografii kopolimerowej pozwalają na otrzymanie różnorodnych nanocząstek wykonanych ze stopów metali takich jak złoto, srebro, nikiel, miedź czy platyna [243]. Aktualnie jedynym zastosowaniem biologicznym takich multimetalicznych nanomateriałów jest użycie ich jako czynniki antybakteryjne [244-246].

### **1.7.3 Nanocząstki tlenków metali**

W tej grupie najpopularniejsze są nanocząstki wykonane z prostych tlenków żelaza na różnych stopniach utlenienia ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) jak i tlenku żelaza(II) diżelaza(III), gdzie w jednej cząsteczce żelazo występuje na dwóch stopniach utlenienia ( $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ ). Tlenek ten wstępuje w literaturze również pod nazwą magnetyt pochodzącą od naturalnego minerału, którego jest głównym składnikiem.

Biokompatybilne nanocząstki magnetytu do zastosowań związanych z przenoszeniem kwasów nukleinowych do komórek ludzkich uzyskuje się za pomocą serii reakcji chemicznych, w których chlorek żelaza (III) oraz chlorek żelaza (II) zostają przekształcone w wodorotlenki



a następnie w tlenek żelaza(II) diżelaza(III) [247] Nanocząstki tlenków metali można również otrzymywać z użyciem zielonej chemii – udokumentowane są metody syntezy z użyciem substratów bogatych w żelazo takich jak hemoglobina [248] Innym rodzajem ekologicznej syntezy tego typu nanocząstek jest jednoetapowa synteza z użyciem polifenoli pochodzących z herbaty chińskiej [249]. Magnetytowe nanocząstki są również wytwarzane naturalnie przez bakterie *Magnetospirillum gryphiswaldense*, które wykorzystują je w procesie magneto-tlenotaksji do pozycjonowania się względem gradientu tlenowego oraz pola magnetycznego ziemi [250-252]. Obecnie podejmowane są próby syntezy tych nanomateriałów w reakcjach inspirowanych rozwiązaniami pochodzącymi z magnetobakterii [253].

Innymi wykorzystywanymi często w badaniach biologicznych nanocząstkami tlenków metali są nanocząstki tlenku cynku (ZnO). Tego typu nanocząstki wykazują silne właściwości antybakteryjne [254], niestety ich akumulacja może prowadzić u organizmów wyższych do wystąpienia hepatotoksyczności, uszkodzeń komórek układu oddechowego [255] oraz może przyczyniać się do męskiej niepłodności [256]. Mechanizmy toksyczności nanocząstek tlenku cynku zarówno dla mikroorganizmów jak i organizmów wyższych związane są z generacją dużych ilości aktywnych form tlenu przez te nanocząstki w kontakcie z żywymi komórkami [257].

#### **1.7.4 Nanocząstki polimerowe**

Pojawienie się kolejnej klasy nanocząstek jest wynikiem dążenia do otrzymania nanomateriałów o jeszcze większej biokompatybilności, biodegradowalności oraz o dużych możliwościach funkcjonalizacji powierzchniowej. Nanocząstki polimerowe najczęściej zbudowane są z polimerów występujących naturalnie (np. lignina czy chitozan [258,259]) bądź polimerów inspirowanych przez związki i struktury obserwowane w naturze (np. polidopamina [260]). Nanocząstki polimerowe mogłyby dostarczać lek do obszaru objętego leczeniem, a następnie być rozkładane przez enzymy traktowanego organizmu do prostych związków, mogących zostać wydalonymi z organizmu w naturalny sposób [261]. Niewątpliwą zaletą tego typu nanomateriałów jest również możliwość funkcjonalizacji nie tylko powierzchni nanocząstki, ale również jej wnętrza przez modyfikację monomerów podczas polimeryzacji, warstwowe nadbudowywanie polimeru tworząc struktury podobne do cebuli czy tworzenie nanokapsuł polimerowych gdzie transportowane związki zamknięte są w polimerowej otoczce [262,263].

Jednymi z pierwszych typów nanocząstek polimerowych zaakceptowanych przez środowisko naukowe jak i amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) są nanocząstki oparte

o kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) [264,265]. Synteza nanocząstek PLGA może odbywać się z użyciem wielu metod, rozpoczynając od bardzo prostych takich jak tworzenie emulsji olej/woda a kończąc na współosiowym elektroprzędzeniu emulsyjnym [266,267]. W przedklinicznych badaniach nanokapsuły wykonane z PLGA są w stanie przenosić interleukinę 12 do ognisk kostniakomięsaka bez zaburzenia homeostazy otaczających ich tkanek [268].

Innym polimerem wykorzystywanym w procesie tworzenia polimerowych nanocząstek jest polidopamina [260]. Należy ona do grupy substancji melaniopodobnych i jak większość przedstawicieli tej grupy charakteryzuje się właściwościami antyoksydacyjnymi [269], absorpcją promieniowania widzialnego w szerokim zakresie UV-Vis-NIR [270], oddawaniem pochłoniętego promieniowania w formie wydzielanego lokalnie ciepła [271] i łatwością funkcjonalizacji np. z zastosowaniem polietylenoglikolu (PEG) [272]. Te właściwości sprawiają, że polidopamina jest jednym z najchętniej używanych polimerów do syntezy nanocząstek. Równocześnie może być użyty do funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek np. metalicznych [273].

### **1.7.5 Zastosowanie nanomateriałów w medycynie**

Nanocząstki boru funkcjonalizowane grupami OH wykazują lepsze właściwości antymalaryczne niż obecnie stosowane leki w warunkach in-vitro [274]. Natomiast lipidowe nanomateriały wykazują właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne przy użyciu powierzchniowym [275]. Właściwości bakteriobójcze nanocząstek srebra mogą być również stosowane jako wspomaganie terapii trądziku. W podobnych zastosowaniach używa się nanocząstek złota w połączeniu z terapią fotodynamiczną [276]. Badana jest również możliwość dostarczania leków przeciwwirusowych za pomocą nanomateriałów. Hybrydowe nanocząstki alginianowo-polietylenoglikolowe skutecznie przenoszą azydetymidynę – lek antyretrowirusowy popularny w leczeniu infekcji wirusem HIV [277]. Różnego rodzaju nanocząstki złota oraz tlenków żelaza mogą też być stosowane jako adiuwanty w szczepionkach [278-280]. Takie zastosowanie nanocząstek wykorzystuje ich właściwości, które są niepożądane w innych zastosowaniach, takie jak indukcja aktywacji makrofagów, wzmocnienie odpowiedzi przeciwciał IgG czy pobudzenie limfocytów typu Th1 i Th17 [281-283].

### **1.7.6 Dotychczasowe zastosowanie nanocząstek w terapeutycznym podejściu do nowotworów mózgu.**

W większości publikacji naukowych opisujących użycie nanomateriałów jako nowych potencjalnych nośników leków wykorzystuje się znane terapeutyki przeciwnowotworowe takie

jak doksorubicyna czy docetaksel [284-286]. Rzadkością jest użycie leków będących potencjalnie skutecznych przeciwko glejakowi, ale nie używanych obecnie w terapii takich jak Disulfiram [287]. Równocześnie prowadzone są badania z użyciem związków chemicznych nie będącymi obecnie lekami, ale posiadającymi właściwości toksyczne specyficzne dla komórek nowotworowych [288-290]. Wszystkie wymienione powyżej badania mają na celu wykazać zwiększenie skuteczności dostarczania związków aktywnych do komórek glejaka przy użyciu różnorodnych nanomateriałów. Alternatywnymi ładunkami przenoszonymi przez nanocząstki mogą być kwasy nukleinowe stosowane do terapii z użyciem interferencyjnego RNA, siRNA oraz małe niekodujące RNA [291-293]. Więcej przykładów użycia nanocząstek w badaniach i terapii glejaka zamieszczono w tabeli 3.

Problemem z dostarczaniem nanomateriałów do obszaru centralnego układu nerwowego poprzez układ krwionośny jest obecność bariery krew-mózg. Bariera ta jest selektywnie przepuszczalną strukturą, która ma za zadanie separację substancji mogących znajdować się w krwi, a których obecność w obrębie mózgu jest niepożądana. Aktualne badania na mysim modelu sugerują, że niemodyfikowane nanocząstki złota o wielkości 10nm mogą przenikać przez taką fizjologiczną strukturę, podczas gdy większe materiały o wielkościach 50 i 100nm zostają zatrzymane w obrębie naczyń krwionośnych [294]. Niestety wiele rodzajów nanocząstek nie może osiągnąć tak małych rozmiarów bez utraty swoich właściwości, dlatego prowadzi się badania nad syntezę nanomateriałów mogących przekraczać barierę krew-mózg na inne sposoby [295,296]. Jedną z najciekawszych grupą nanocząstek mogących przekraczać biologiczne bariery takie jak bariera krew-mózg są wykonane z grafenu kropki kwantowe [297]. Takie nanocząstki o rozmiarach nieprzekraczających 20nm mogą wchodzić w interakcje z błoną komórkową komórek nowotworowych, destabilizować ją i ułatwiać penetrację guza przez leki takie jak doksorubicyna. Efekt ten jest osiągany dzięki modyfikacjom powierzchniowym tych nanomateriałów zmieniającymi całkowity ładunek powierzchniowy nanocząstki [203].

Grafenowe kropki kwantowe mogą być również stosowane w tak zwanej terapii fotodynamicznej. Tego typu terapia zakłada użycie nanomateriałów jako czynnika generującego reaktywne formy tlenu po pochłonięciu energii dostarczonej z użyciem źródła światła o odpowiedniej długości fali i dostarczanej mocy. Badania na liniach komórkowych pochodzących z glejaka wykazują, że takie zastosowanie kropek kwantowych może prowadzić do apoptozy bądź autofagii komórek nowotworowych [204]. Niestety nadal nie jest znany pełny profil toksyczności kropek kwantowych i obecnie trwają prace nad ewaluacją ich wpływu na organizmy żywe [298]. Terapia fotodynamiczna nie jest jednak ograniczona do

wykorzystywanie wyłącznie kropek kwantowych. Bardziej skomplikowane układy takie jak nanocząstki złożone z polietylenoglikolu, chloryny e6 oraz jonów gadolinu zostały również przedstawione jako zdolne do wytwarzania wolnych form tlenu dzięki obecności chloryny e6- silnego opisywanego już w literaturze fotouczulacza. Dodatkowo obecność jonów gadolinu pozwala na obserwację takich nanomateriałów z użyciem rezonansu magnetycznego już po administracji terapeutycznej [299].

Inne proponowane zastosowanie nanomateriałów zakłada wykorzystanie ich jako czynniki fototermalne. Takie nanocząstki pochłaniają energię np. lasera bliskiej podczerwieni i oddają je miejscowo w formie ciepła przekraczającego standardowe ciepło komórek ludzkich prowadząc do ich uszkodzenia. Nanomateriały tego typu mogą być wykonane z jednego materiału – węglowych nanorurek [300], złota [301], tlenków żelaza [302] czy polidopaminy [303]. Równocześnie badane jest zastosowanie nanomateriałów wielowarstwowych, które mają za zadanie wydłużać bądź potęgować efekt fototermiczny wywoływany przez jeden z komponentów [304,305].

Nanocząstki złota mogą być również czynnikiem kontrastującym w obrazowaniu guzów mózgu za pomocą rezonansu magnetycznego. Potencjalna wysoka biokompatybilność oraz możliwość sfunkcjonalizowania ich do zastosowań łączących obrazowanie z terapią sprawia, że stają się bardzo popularnym wyborem do testów związanych z terapią glejaka [306-308].

Nanocząsteczki złożone z polimeru kwasu krokonowego opłaszczone peptydem ARG-GLY-ASP i znakowane radioaktywnym izotopem  $^{125}\text{I}$  wykazują akumulację w komórkach glejaka wykazujących ekspresję  $\alpha_v\beta_3$  integryny. Cząstki tego typu po akumulacji mogą działać jako miejscowa zlokalizowana brachyterapia nowotworu jednocześnie zachowując inne właściwości nanocząstek, takich jak zdolność przenoszenia leków przeciwnowotworowych czy możliwość obserwacji za pomocą tomografii komputerowej [309].

Tabela 3. Nanocząstki dotychczas wykorzystywane w badaniach glejaka

Typ nanocząstek	Skład rdzenia	Skład otoczki	Przenoszona substancja
<i>metaliczne</i>	metaliczne srebro	-	- [310]
	metaliczne srebro, chlorek srebra	-	- [311]
	metaliczne złoto	peptyd TAT	doksorubicyna, jony gadolinu [306]
	metaliczne złoto	cytrynian	przeciwciężła przeciwko VEGF [312]
<i>związki metali</i>	tlenki żelaza	-	siRNA, jony platyny [313]
	tlenki żelaza	-	chlorotoksyna [288]
	tlenki żelaza	-	- [314]
	tlenki żelaza	polietylenoimina (PEI)	dsRNA [315]
	tlenek miedzi	cynk	- [316]
	tlenek gadolinu, kwas poliakrylowy	-	- [317]
	siarczek miedzi	transferyna	disulfiram [287]
	chlorek srebra	-	- [318]
<i>niemetaliczne</i>	krzem	-	- [319]
	krzem	PEG	doksorubicyna [284]
<i>polimerowe</i>	dendrymery poliamidoaminowe	-	kurkumina [290]
	PEG	Distearoilofosfatydylo- etanolamina (DSPE)	doksorubicyna [285]
	PEG, kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA)	peptyd RVG29	- [286]
	PEG, plazmidowe DNA	szczurza błona komórkowa	- [320]
	PLGA	-	temozolomid [321]
	PLGA	aklitaksel	podjednostka B toksyny cholery [322]
	polimer ludzkiej albuminy	peptyd penetrujący iRGD	siRNA [323]
	chitozan	-	sylibina [324]
	chitozan	-	trygonelina [289]
	H-ferrytyna	-	- [295]
<i>węglowe</i>	nanodiamenty	polidopamina, zieleń indocyjaninowa	- [304]

## 1.8 Modele glejaka stosowane w badaniach podstawowych i aplikacyjnych

Pomimo wielu lat starań badanie właściwości glejaków oraz ich wrażliwości na różne metody leczenia nadal sprawia problemy w badaniach laboratoryjnych oraz praktyce klinicznej. W powszechnej praktyce laboratoryjnej wykorzystywane są obecnie komercyjnie dostępne linie komórkowe pochodzenia ludzkiego. Niestety wysoka heterogenność tego rodzaju nowotworu utrudnia translację odkryć dokonanych z użyciem klasycznej adherentnej hodowli komórkowej do praktyki klinicznej [325]. Adherentne linie komórkowe pochodzenia glejakowego różnią się od siebie zauważalnie nawet w odpowiedzi na podstawowy terapeutyczny przeciwnowotworowy - temozolomid co utrudnia ewaluację innych potencjalnych leków w czasie badań. [326] Może być to związane z dużymi różnicami genetycznymi i morfologicznymi dostępnymi na rynku linii komórkowych [327]. Kolejnym ograniczeniem tego modelu jest jego dwuwymiarowa natura będąca wynikiem standardowych technik hodowli komórek [328]. Tego typu hodowle mogą nie oddawać całości oddziaływań między komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową oraz wykazywać odmienne właściwości mechanobiologiczne od komórek izolowanych z guzów pochodzenia ludzkiego [329].

Jednym z proponowanych rozwiązań tego problemu jest skierowanie badań na zwierzęce modele glejaka oparte na ksenotransplantacji ludzkich komórek nowotworowych. W takim modelu ludzkie komórki uzyskują środowisko zbliżone do tego panującego w ludzkim mózgu. W przypadku glejaków, jak w większości badań nad rozwojem nowotworów za standardowy model zwierzęcy uznaje się model myszy. W ramach tego modelu wykonuje się badania z użyciem wielu technik takich jak ksenotransplantacje ludzkiego glejaka, chemiczne indukowanie wzrostu nowotworu czy modele oparte na manipulacji genetycznej w celu indukcji wzrostu glejaka [330,331]. Niestety model myszy nie jest optymalny do tego celu z powodu znacznych różnic anatomicznych w budowie mózgu pomiędzy gryzoniem a człowiekiem [332]. W obliczu tych wyzwań badania związane z glejakiem przeprowadza się również na modelach zwierzęcych opartych o duże zwierzęta posiadające mózgi o budowie bardziej przypominającej ludzkie, takie jak transgeniczne świny, oraz psy [333,334]. Badania na naczelnych ograniczają się wyłącznie do zwierząt o spontanicznym przebiegu choroby, a same naczelnice nie są rozpatrywane jako potencjalny model glejaka [335]. Modele zwierzęce jakkolwiek potrzebne i wartościowe w zastosowaniach badawczych nie mogą być stosowane w każdym laboratorium do badania wszystkich potencjalnych terapeutyków przeciwnowotworowych z powodów etycznych oraz wysokich kosztów.

Również, ze względów etycznych i moralnych niemożliwe jest badanie terapeutyków na pacjentach chorujących na glejaka. Badania takie ogranicza się tylko do badań klinicznych związków o aktywności przeciwglejakowej udowodnionej już wcześniej w badaniach na modelu komórkowym oraz zwierzęcym. Niestety wysoka złośliwość nowotworu, ciężki przebieg choroby oraz stosunkowo krótki okres życia pacjentów sprawia, że tylko ok. 21% z nich bierze udział w badaniach klinicznych nowych form leczenia [336].

Odpowiedzią współczesnej nauki na problemy wynikające z niedoskonałych modeli badawczych tego nowotworu jest nowa generacja modeli komórkowych przeznaczonych do badań glejaka.

Najpopularniejszym obecnie modelem glejaka nowej generacji jest kultura komórkowa oparta na próbkach pobranych podczas ekstrakcji chirurgicznej nowotworu [328]. Kultury takie zawierają komórki macierzyste nowotworu przez co stanowią bardziej heterogeny model komórkowy w porównaniu z komercyjnymi liniami komórkowymi [337]. Dodatkową zaletą posiadania w hodowli populacji komórek macierzystych nowotworu jest ich wysoki potencjał do proliferacji co wzmacnia potencjał hodowli do regeneracji [338]. Hodowla tego typu może być prowadzona zarówno w formie hodowli komórek adherentnych jak i zawieszinowych zlepek komórkowych określanych jako neurosfery [339,340]. Hodowla sferoidów pochodzenia glejakowego zyskuje popularność w ostatnich latach zwłaszcza w wysokoprzepustowym testowaniu nowych związków mających potencjalne właściwości przeciwnowotworowe [341,342].

Zupełnie odmiennym trójwymiarowym modelem komórkowym w badaniu glejaka jest model oparty na biodruku 3D, pozwalającym na dowolne umieszczenie komórek w przestrzeni trójwymiarowej wypełnionej sztuczną macierzą zewnątrzkomórkową [343]. Biodrukowane struktury glejaka mogą powstawać zarówno z komercyjnych linii komórkowych jak i z dysocjatu guza pobranego od pacjenta co pozwala na uzyskanie wysokiego poziomu spersonalizowania modelu [344]. Dodatkowym benefitem samodzielnego rozmieszczania komórek przy pomocy drukarki 3D jest możliwość odtworzenia struktur guza takich jak rdzeń hipoksyjny czy proliferujące obrzeże guza [343].

Wymienione powyżej rodzaje kultur komórek glejakowych niestety nie mają obecnie zastosowania w wyspecjalizowanych badaniach takich jak obrazowanie inwazji nowotworu w zdrowej tkance mózgowej. Aktualnie stosowanym hybrydowym modelem badania inwazji glejaka proponowanym w celu obserwacji przyżyciowej infiltracji tkanek zdrowego mózgu jest

organotypowa hodowla skrawkowa. W tej metodzie komórki glejaka umieszcza się na pobranym mysim skrawku mózgu i obserwuje zachowanie komórek glejaka w obecności zróżnicowanego środowiska komórek mózgowych. Wadą tej metody jest wykorzystanie ze względów etycznych mysiego mózgu jako środowiska inwazji oraz dwuwymiarowa natura skrawków hodowlanych [345,346].

Kolejnym krokiem w rozwoju kultur trójwymiarowych glejaka jest ustanowienie stabilnych linii organoidów - hodowli tkankowej w warunkach *in vitro*. Organoidy glejaka zwane też tumoroidami można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwsza z nich to generowane za pomocą inżynierii genetycznej przekształcone organoidy mózgowie. Taki model zakłada transformację komórek uprzednio wyhodowanego organoidu poprzez indukcję onkogenezy spowodowaną aktywacją onkogenu HRas<sup>G12V</sup> z jednoczesnym zaburzeniem ekspresji supresora nowotworowego TP53 [347]. Tego typu model może być używany w celu obserwacji rozwoju spontanicznego nowotworu a następnie transplantowany do modelu mysiego w celu zmaksymalizowania heterogenności nowotworu i zapewnienia mu odpowiedniego środowiska do rozwoju. [347]. Problemem tego typu kultury organoidowej jest jego niska złożoność – komórki nowotworowe indukowane w organoidzie mózgowym znajdują się na początku mechanizmu nowotworzenia. Alternatywnym podejściem jest generowanie tumoroidów glejakowych z użyciem materiału pobranego od pacjentów poddanych procedurze resekcji guza. Tkanka taka posiada już wszystkie cechy „dojrzałego” nowotworu i cechuje się wyższym poziomem heterogenności [348]. Tumoroidy pochodzące z materiału pobranego od pacjenta zachowują podobny poziom heterogenności i potencjału proliferacyjnego co tkanka nowotworowa z której pochodzą [349].



## 2. Cel pracy

Głównym celem pracy doktorskiej było badanie właściwości migracyjnych komórek nowotworowych oraz charakterystyka nanocząstek w celu określenia ich potencjału terapeutycznego. Ze względu na brak modeli komórkowych odpowiednio odzwierciedlających procesy migracji i inwazji nowotworowej w specyficznym typie nowotworu, jakim jest glejak wielopostaciowy, celem pracy było również stworzenie i optymalizacja modelu opartego o kulturę trójwymiarową, pozwalającego w przyszłości na badanie mechanizmów inwazji oraz testowanie nowych leków o potencjale przeciwmigracyjnym i przeciwinwazyjnym.

Cel pracy został zrealizowany w oparciu o następujące hipotezy badawcze oraz etapy ich realizacji:

**1. Określenie wpływu miR-218 na właściwości migracyjne komórek glejaka wielopostaciowego.** W tym celu zastosowano szereg technik biologii molekularnej w podejściu typu „nabycie funkcji” (ang. „*gain-of-function*” ) z użyciem syntetycznego miR-218, aby wykazać jego udział w regulacji ekspresji genów macierzy zewnątrzkomórkowej. Równoległe do badań molekularnych zastosowano analizy biofizyczne obejmujące spektroskopię sił atomowych w badaniu właściwości biomechanicznych komórek glejaka.

**2. Ocena cytotoksyczności nanocząstek mogących przenosić terapeutyki przeciwnowotworowe.** W celu realizacji tego zadania przeprowadzono analizę biokompatybilności i bezpieczeństwa nanocząstek magnetycznych opłaszczonych polietylenoiminą oraz nanocząstek polimerowych zbudowanych z polidopaminy. Szczegółowa charakterystyka właściwości nanocząstek pod kątem ich właściwości cytotoksycznych jest kluczowa dla ich potencjalnego wykorzystania w podejściach terapeutycznych, m.in. w wykorzystaniu do ograniczenia, proliferacji, migracji i inwazji komórek nowotworowych, a co za tym idzie wzrostu i tworzenia ognisk wtórnych nowotworu.

**3. Budowa nowego trójwymiarowego modelu komórkowego glejaka przeznaczonego do badania procesów inwazji nowotworowej oraz do oceny efektywności nowych terapeutyków o potencjale antyinwazyjnym.** Model ten oparty został o zaawansowane kultury komórkowe - organoidy. W budowie nowego modelu wykorzystano hybrydową kulturę zawierającą organoid odzwierciedlający budowę zdrowy mózg (ang. *cerebral organoid*) oraz organoid wywodzący się bezpośrednio z tkanki glejaka. Tak zbudowany model może pozwolić

na lepsze zrozumienie zarówno potencjału inwazyjnego komórek glejaka, jak i mechanizmów działania terapeutyków, w tym także nowych nanomateriałów w środowisku maksymalnie zbliżonym do nowotworu obecnego u ludzi.

Założone cele zostały osiągnięte, a uzyskane wyniki zostały przedstawione w rozprawie doktorskiej.

Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy została opublikowana, a publikacja ta jest załączona do tej pracy dyplomowej:

Grabowska, M, Kuczyński, K, et al. miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells. *J Cell Mol Med.* 2022; 26: 3913- 3930. doi: 10.1111/jcmm.17428 [35]

## 3. Wyniki

### 3.1 Badanie wpływu miR-218-5p na zmiany właściwości mechanicznych komórek glejaka

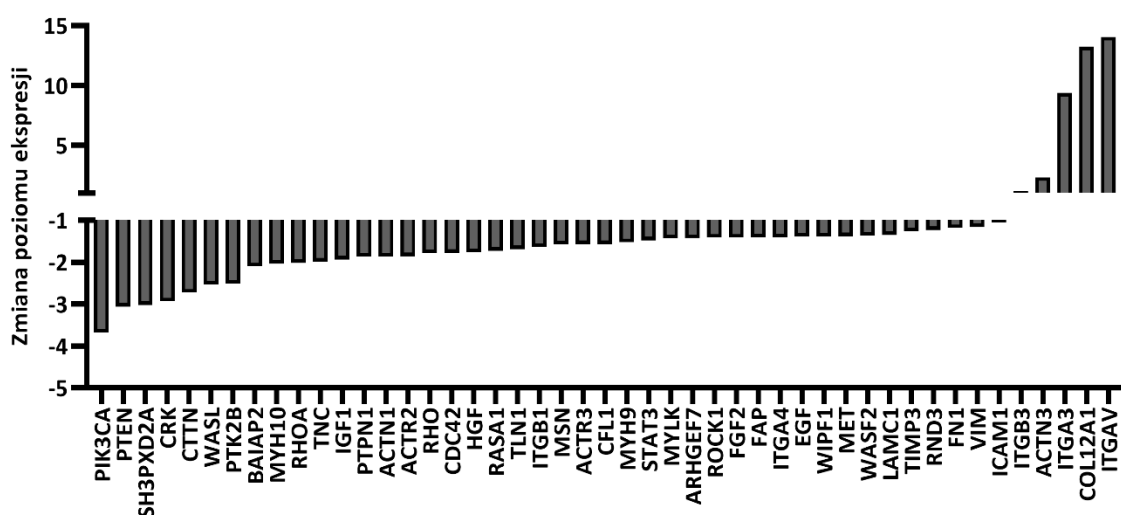
Wyniki zawarte w tej części pracy zostały opublikowane w roku 2022 w pracy, której jestem pierwszym współautorem [35].

Głównym celem badań opublikowanych w wymienionej wyżej publikacji było określenie wpływu miR-218-5p na macierz zewnątrzkomórkową i właściwości biomechaniczne komórek glejaka. W pierwszym etapie badań wykazaliśmy, że poziom ekspresji miR-218 ulega znaczącemu obniżeniu w tkankach nowotworowych pochodzących z resekcji nowotworu u pacjentów. Analizy bioinformatyczne wskazały na prawdopodobne oddziaływanie miR-218 z dwoma białkami macierzy zewnątrzkomórkowej – tenasciną C oraz syndekanem 2. Badanie poziomu ekspresji wytypowanych białek macierzy wykazało kilkukrotne jego podniesienie zarówno TN-C, jak i SDC-2. Analizy funkcjonalne przeprowadzone w układzie reporterowym z lucyferazą potwierdziły, że zarówno TN-C jak i SDC-2 mogą być transkryptami docelowymi dla miR-218-5p, a ich ekspresja może być bezpośrednio regulowana przez ten miRNA. W kolejnych analizach potwierdziliśmy bezpośrednie oddziaływanie miR-218 z TN-C oraz SDC-2 stosując podejście typu „*gain- of function*” z użyciem syntetycznego miR-218 i linii komórkowych glejaka. Przeprowadzone badania potwierdziły obniżenie poziomu ekspresji docelowych genów w obecności syntetycznego miR-218 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. W celu oceny udziału miR-218 w procesach związanych z przemieszczaniem się komórek glejaka, wykonano również analizę migracji komórek w czasie rzeczywistym oraz test zablizniania się ran. Oba przeprowadzone badania wskazują na zmniejszenie się potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych po zwiększeniu poziomu miR-218-5p. Jednocześnie zaobserwowano zwiększenie tempa proliferacji komórek glejaka po poddaniu ich działaniu tego miRNA. Uzupełnieniem powyższych badań molekularnych są analizy właściwości biomechanicznych komórek z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych, jak również badania rearanżacji cytoszkieletu, które przeprowadziłem w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Wszystkie badania z użyciem mikroskopii sił atomowych zostały wykonane w ramach współpracy w Zakładzie Badań Mikroukładów Biofizycznych Instytutu Fizyki Jądrowej PAN im. Henryka Niewodniczańskiego w Krakowie.

### 3.1.1 Analiza wpływu miR-218-5p na ekspresję białek związanych z migracją, adhezją oraz macierzą zewnątrzkomórkową

W celu zbadania wpływu miR-218-5p na inne białka związane z ECM oraz z adhezją komórek wykonano analizę ekspresji genów za pomocą dwóch paneli genów wyselekcjonowanych i dostępnych w zestawach Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array oraz Human Cell Motility RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array. Obie macierze PCR wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, a wyniki zostały poddane analizie za pomocą systemu kalkulacyjnego dostarczonego przez producenta macierzy. Łącznie przebadano ekspresję 168 wybranych genów pod wpływem suplementacji miR-218-5p w stężeniu 50nM (Tabela 4). Po odrzuceniu nieistotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji oraz wybraniu genów o ekspresji zmienionej względem ekspresji w próbie kontrolnej uzyskano listę 47 genów ulegających deregulacji pod wpływem miR-218-5p (Ryc. 3). Pośród genów ulegających różnicowej ekspresji, poziom transkryptu kodującego TN-C został obniżony 1,96- krotnie w stosunku do komórek nietraktowanych, co potwierdza wpływ miR-218-5p na poziom ekspresji TN-C.



Rycina 3. Analiza ekspresji badanych transkryptów. Przedstawiono wyłącznie wyniki istotne statystycznie ( $p$ -wartość  $< 0.05$ ) oraz o ekspresji różnej od kontrolnej ( $(-\infty, -1) \cup (1, \infty)$ ). Ekspresja normalizowana do komórek kontrolnych suplementowanych randomizowanym siRNA. Przygotowano na podstawie publikacji Grabowska, M, Kuczyński, K, et al. miR-218 affects the ECM composition... [35]

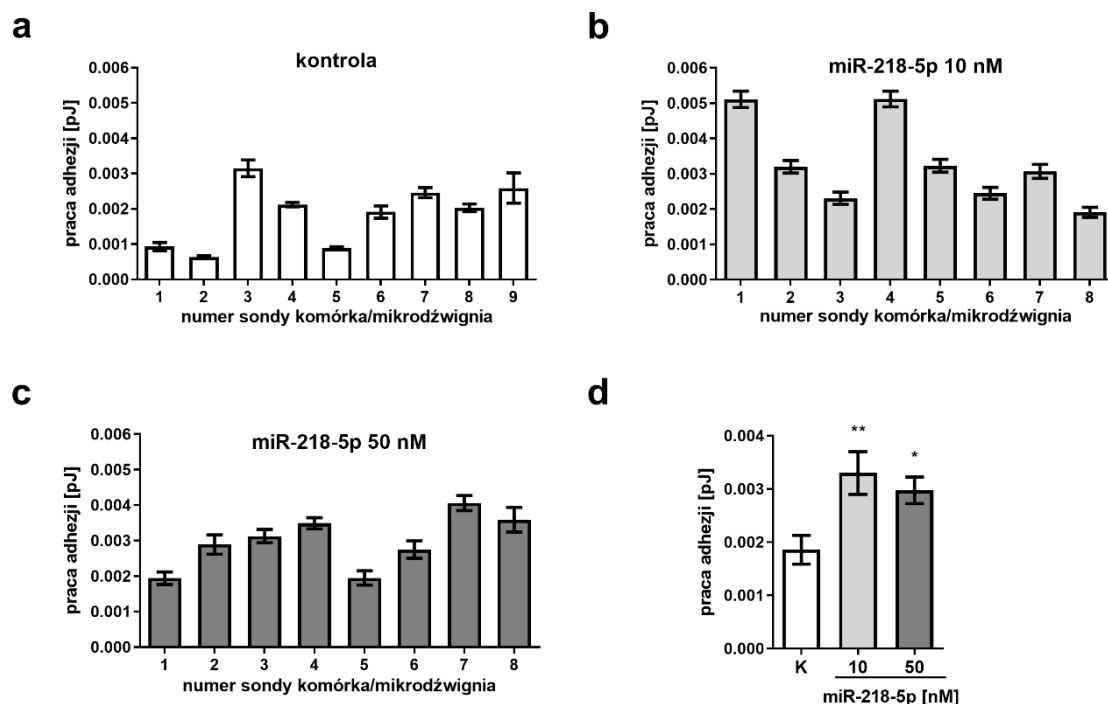
Tabela 4. Zmiany w ekspresji badanych genów pod wpływem suplementacji miR-218-5p

Symbol genu	Zmiana ekspresji	p-wartość	Refseq ID	Symbol genu	Zmiana ekspresji	p-wartość	Refseq ID
ACTN1	-1,8682	0,01462	NM_001102	ADAMTS1	6,1974	0,50784	NM_006988
ACTN3	2,3268	0,03773	NM_001104	ADAMTS13	31,669	0,06061	NM_139025
ACTN4	-1,355	0,05287	NM_004924	ADAMTS8	-1,2184	0,55934	NM_007037
ACTR2	-1,8553	0,00493	NM_005722	CD44	17,9802	0,30119	NM_000610
ACTR3	-1,5674	0,02728	NM_005721	CDH1	-1917,5	0,21656	NM_004360
AKT1	-1,318	0,28516	NM_005163	CLEC3B	6,1688	0,0734	NM_003278
ARF6	-1,2731	0,20059	NM_001663	CNTN1	-169,48	0,2178	NM_001843
ARHGDI A	-1,3364	0,17919	NM_004309	COL11A1	2,1312	0,09729	NM_080629
ARHGEF7	-1,4224	0,00922	NM_003899	COL12A1	13,2538	0,04331	NM_004370
BAIAP2	-2,1019	0,00048	NM_006340	COL14A1	52,7708	0,14952	NM_021110
BCAR1	-1,1394	0,84086	NM_014567	COL15A1	13,0111	0,09954	NM_001855
CAPN1	-1,4191	0,30135	NM_005186	COL16A1	38,0986	0,09427	NM_001856
CAPN2	-1,1447	0,09868	NM_001748	COL1A1	15,2246	0,12894	NM_000088
CAV1	-1,2326	0,11476	NM_001753	COL4A2	-1,3333	0,38228	NM_001846
CDC42	-1,7715	0,03254	NM_001791	COL5A1	3,5186	0,08054	NM_000093
CFL1	-1,5637	0,03513	NM_005507	COL6A1	7,5075	0,06173	NM_001848
CRK	-2,9383	0,00659	NM_016823	COL6A2	41,5949	0,0508	NM_001849
CSF1	-1,5529	0,06783	NM_000757	COL7A1	4,5368	0,09379	NM_000094
CTTN	-2,7226	0,0009	NM_005231	COL8A1	4,3419	0,18086	NM_001850
DIAPH1	-1,4257	0,12851	NM_005219	CTGF	46,6887	0,05217	NM_001901
DPP4	-1,3241	0,08106	NM_001935	CTNNA1	36,3781	0,10048	NM_001903
EGF	-1,3867	0,02599	NM_001963	CTNNB1	58,0142	0,07296	NM_001904
EGFR	-1,3488	0,10233	NM_005228	CTNND1	9,2856	0,06372	NM_001331
ENAH	-1,21	0,22455	NM_001008493	CTNND2	1,9119	0,05848	NM_001332
EZR	-1,3835	0,10435	NM_003379	ECM1	17,3276	0,09793	NM_004425
FAP	-1,4093	0,01642	NM_004460	FN1	92,0917	0,05848	NM_002026
FGF2	-1,4126	0,0147	NM_002006	HAS1	-2,8514	0,4142	NM_001523
HGF	-1,7634	0,03199	NM_000601	ICAM1	8,4464	0,2821	NM_000201
IGF1	-1,9341	0,02068	NM_000618	ITGA1	35,5473	0,09193	NM_181501
IGF1R	-1,2614	0,28612	NM_000875	ITGA2	20,4638	0,20672	NM_002203
ILK	-1,2297	0,20857	NM_004517	ITGA3	9,3718	0,03991	NM_002204
ITGA4	-1,4093	0,0256	NM_000885	ITGA4	9,4153	0,05385	NM_000885
ITGB1	-1,6339	0,04056	NM_002211	ITGA5	3,9404	0,15611	NM_002205
ITGB2	1,318	0,49406	NM_000211	ITGA6	188,054	0,12507	NM_000210
ITGB3	1,1824	0,04562	NM_000212	ITGA7	17,6101	0,05376	NM_002206
LIMK1	-1,1906	0,48132	NM_002314	ITGA8	4,8849	0,0802	NM_003638
MAPK1	-1,2241	0,30233	NM_002745	ITGAL	-2,4766	0,36838	NM_002209
MET	-1,3771	0,01372	NM_000245	ITGAM	-2,2842	0,28196	NM_000632
MMP14	-1,1554	0,74662	NM_004995	ITGAV	14,0419	0,04903	NM_002210
MMP2	-1,1634	0,5198	NM_004530	ITGB1	16,0555	0,05369	NM_002211

<b>MMP9</b>	-1,6301	0,10306	NM_004994	<b>ITGB2</b>	1,2297	0,38102	NM_000211
<b>MSN</b>	-1,571	0,00119	NM_002444	<b>ITGB3</b>	-1,7634	0,13105	NM_000212
<b>MYH10</b>	-2,035	0,02153	NM_005964	<b>ITGB4</b>	9,2428	0,11349	NM_000213
<b>MYH9</b>	-1,5245	0,02159	NM_002473	<b>ITGB5</b>	5,8361	0,05783	NM_002213
<b>MYL9</b>	-1,4557	0,06689	NM_006097	<b>ANOS1</b>	-456,67	0,21694	NM_000216
<b>MYLK</b>	-1,4257	0,01747	NM_053025	<b>LAMA1</b>	54,6317	0,37037	NM_005559
<b>PAK1</b>	-1,2998	0,05885	NM_002576	<b>LAMA2</b>	3,3597	0,0808	NM_000426
<b>PAK4</b>	-1,4423	0,11554	NM_005884	<b>LAMA3</b>	-1,7151	0,66826	NM_000227
<b>PFN1</b>	-1,476	0,10762	NM_005022	<b>LAMB1</b>	2,6789	0,11249	NM_002291
<b>PIK3CA</b>	-3,6765	0,04265	NM_006218	<b>LAMB3</b>	486,063	0,36749	NM_000228
<b>PLAUR</b>	-1,4028	0,15396	NM_002659	<b>LAMC1</b>	1793,22	0,36543	NM_002293
<b>PLCG1</b>	-1,2156	0,48077	NM_002660	<b>MMP1</b>	19,3599	0,06076	NM_002421
<b>PLD1</b>	-1,3771	0,05337	NM_002662	<b>MMP10</b>	2,2475	0,41717	NM_002425
<b>PRKCA</b>	-1,2909	0,05274	NM_002737	<b>MMP11</b>	2,4823	0,26956	NM_005940
<b>PTEN</b>	-3,056	0,04465	NM_000314	<b>MMP12</b>	6,2694	0,24315	NM_002426
<b>PTK2</b>	-1,1688	0,22308	NM_005607	<b>MMP13</b>	-2,0209	0,43141	NM_002427
<b>PTK2B</b>	-2,5111	0,01809	NM_004103	<b>MMP14</b>	51,8043	0,05308	NM_004995
<b>PTPN1</b>	-1,8682	0,00047	NM_002827	<b>MMP15</b>	-1,116	0,82237	NM_002428
<b>PXN</b>	-1,2879	0,11907	NM_002859	<b>MMP16</b>	5,2841	0,06102	NM_005941
<b>RAC1</b>	-1,6799	0,10042	NM_006908	<b>MMP2</b>	12,2525	0,06238	NM_004530
<b>RAC2</b>	-2,0162	0,08416	NM_002872	<b>MMP3</b>	72,7563	0,10234	NM_002422
<b>RASA1</b>	-1,7231	0,01121	NM_002890	<b>MMP7</b>	1,3582	0,39667	NM_002423
<b>RDX</b>	-1,1961	0,13442	NM_002906	<b>MMP8</b>	-160,34	0,21805	NM_002424
<b>RHO</b>	-1,7839	0,0441	NM_000539	<b>MMP9</b>	35,4652	0,1556	NM_004994
<b>RHOA</b>	-2,0162	0,04874	NM_001664	<b>NCAM1</b>	-3,7364	0,20985	NM_000615
<b>RHOB</b>	-1,4489	0,09477	NM_004040	<b>PECAM1</b>	2,1361	0,07851	NM_000442
<b>RHOC</b>	-1,244	0,18528	NM_175744	<b>SELE</b>	-11,781	0,33909	NM_000450
<b>RND3</b>	-1,2241	0,04413	NM_005168	<b>SELL</b>	-2,0116	0,29006	NM_000655
<b>ROCK1</b>	-1,4126	0,006	NM_005406	<b>SELP</b>	-4,7076	0,35784	NM_003005
<b>SH3PXD2A</b>	-3,0209	0,00097	NM_014631	<b>SGCE</b>	66,0277	0,07595	NM_003919
<b>SRC</b>	-1,2938	0,09094	NM_005417	<b>SPARC</b>	269,66	0,05485	NM_003118
<b>STAT3</b>	-1,4828	0,04272	NM_003150	<b>SPG7</b>	3,3831	0,07	NM_003119
<b>SVIL</b>	-1,2156	0,3806	NM_003174	<b>SPP1</b>	1,9611	0,156	NM_000582
<b>TGFB1</b>	-1,1394	0,64626	NM_000660	<b>TGFB1</b>	23,2367	0,09382	NM_000358
<b>TIMP2</b>	-1,1006	0,64714	NM_003255	<b>THBS1</b>	6,6576	0,18597	NM_003246
<b>TLN1</b>	-1,6876	0,00097	NM_006289	<b>THBS2</b>	7,8808	0,10718	NM_003247
<b>VASP</b>	-1,3835	0,06571	NM_003370	<b>THBS3</b>	4,2428	0,05625	NM_007112
<b>VCL</b>	-1,3333	0,07962	NM_003373	<b>TIMP1</b>	8,604	0,06002	NM_003254
<b>VEGFA</b>	-1,4692	0,08558	NM_003376	<b>TIMP2</b>	5,3579	0,11193	NM_003255
<b>VIM</b>	-1,3645	0,09595	NM_003380	<b>TIMP3</b>	-1,1742	0,7585	NM_000362
<b>WASF1</b>	-1,3519	0,09099	NM_003931	<b>TNC</b>	-1,9852	0,03146	NM_002160
<b>WASF2</b>	-1,3645	0,045	NM_006990	<b>VCAM1</b>	10,4953	0,17307	NM_001078
<b>WASL</b>	-2,5344	0,00436	NM_003941	<b>VCAN</b>	55,5225	0,15202	NM_004385
<b>WIPF1</b>	-1,3835	0,02022	NM_003387	<b>VTN</b>	2,9725	0,19205	NM_000638

### 3.1.2 Badanie adhezji pojedynczych komórek

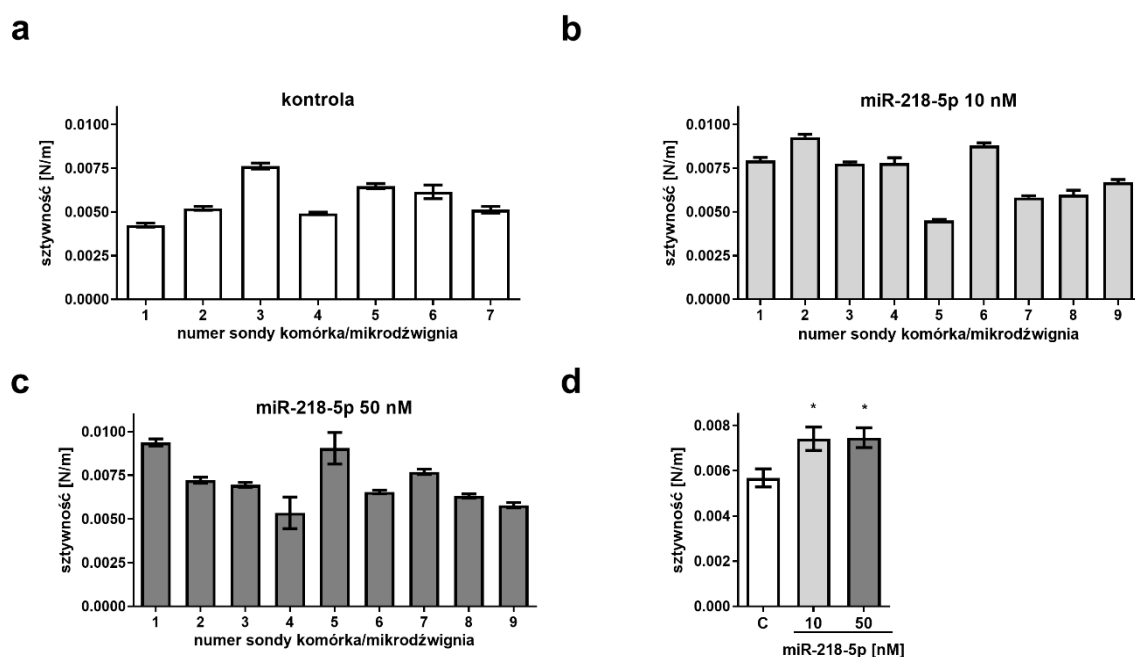
W celu określenia wpływu miR-218-5p na procesy związane z migracją komórek glejaka, wykonano pomiar całkowitej adhezji za pomocą spektroskopii sił pojedynczej komórki z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych. W eksperymencie wykorzystano komercyjnie dostępną linię komórkową U-118-MG. Komórki suplementowano miR-218-5p w stężeniach 10 i 50nM na 24h przed wykonaniem pomiaru. W pomiarach użyto sond wykonanych z żywych komórek przytwierdzonych do bezostrzowych mikrodźwigni. Wartością pomiarową uzyskaną w trakcie eksperymentu była tzw. praca adhezji. Została ona zbadana dla 9 komórek w grupie kontrolnej (Ryc. 4 a), 8 komórek suplementowanych miR-218-5p w stężeniu 10nM (Ryc. 4 b) oraz 8 komórek suplementowanych miR-218-5p w stężeniu 50 nM (Ryc. 4 c). Dane na rycinie 4 d przedstawiają uśrednioną pracę adhezji potrzebną do oderwania komórek glejaka od podłoża. Adhezja komórek glejaka opisywana przez pracę adhezji rośnie po suplementacji komórek miR-218-5p o 78% przy zastosowanym stężeniu 10 nM miRNA oraz 60% przy stężeniu 50 nM.



**Rycina 4. (a-c) Analiza adhezji pojedynczych komórek. (d) Uśredniona adhezja badanych grup kmórek.** Wyniki istotne statystycznie zostały oznaczone symbolem „\*\*” (p-wartość<0.05) oraz „\*\*\*” (p-wartość<0.005). Komórki kontrolne oznaczone jako K. Przygotowano na podstawie publikacji Grabowska, M, Kuczyński, K, et al. miR-218 affects the ECM composition... [35]

### 3.1.3 Pomiar sztywności pojedynczych komórek

Sztywność komórek glejaka suplementowanych miR-218-5p została określona także za pomocą spektroskopii sił pojedynczej komórki. Pomiary wykonywane były podczas dociskania komórki do podłoża za pomocą próbników identycznych jak w procedurze badania adhezji. W grupie kontrolnej analizowano 7 komórek (Ryc. 5 a), a w grupach komórek suplementowanych miR-218-5p w stężeniu 10 nM oraz 50 nM analizowano po 9 komórek w grupie (Ryc. 5 b,c). Dane na rycinie 5d przedstawiają uśrednioną adhezję komórek badanych. Wyniki wskazują na wzrost sztywności komórek glejaka o 30% po wprowadzeniu do hodowli syntetycznego miR-218-5p. Wzrost sztywności nie jest zależny od zastosowanego stężenia miRNA. Obserwacje te wskazują tym samym na wpływ miR-218-5p na procesy związane z właściwościami biomechanicznymi komórek.

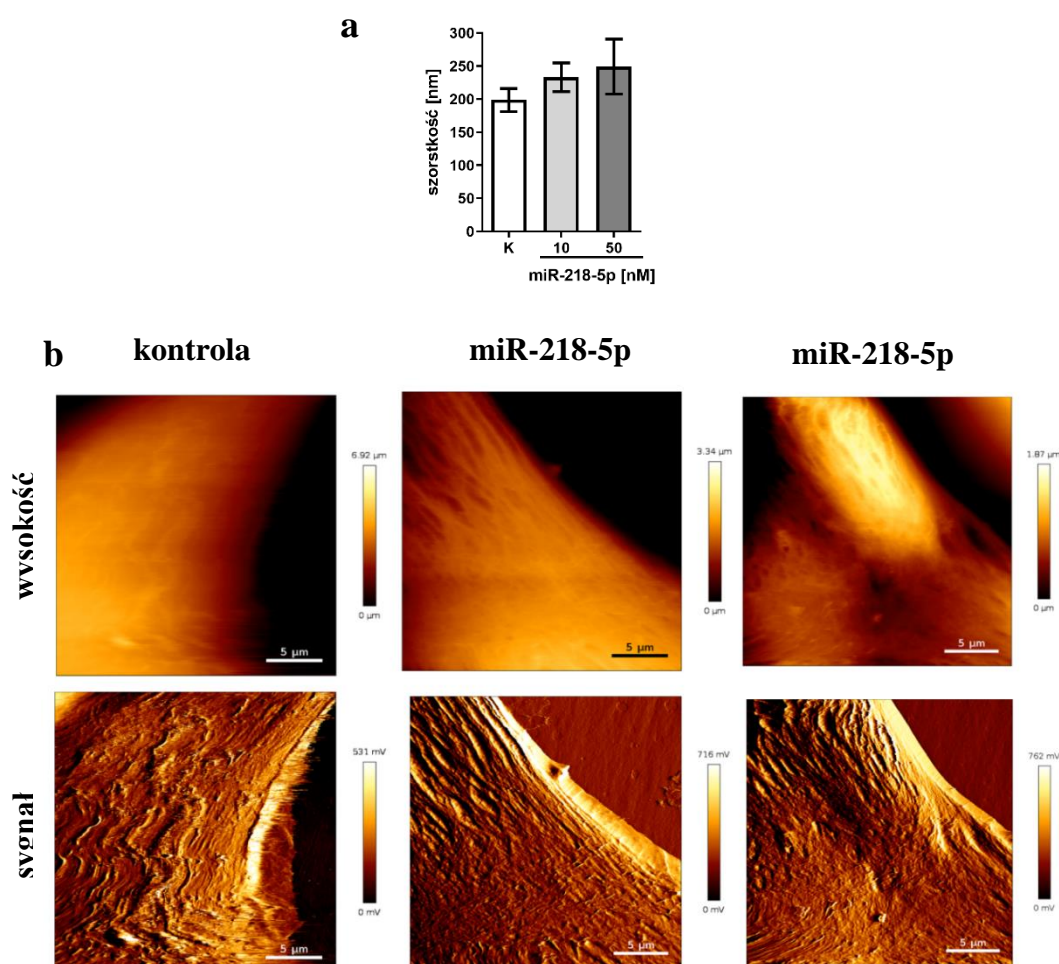


**Rycina 5. (a-c) Analiza sztywności pojedynczych komórek. (d) Uśredniona sztywność badanych grup komórek.** Wyniki istotne statystycznie zostały oznaczone symbolem „\*” (p-wartość<0.05). Komórki kontrolne oznaczone jako K. Przygotowano na podstawie publikacji Przygotowano na podstawie publikacji Grabowska, M, Kuczyński, K, et al. miR-218 affects the ECM composition... [35]



### 3.1.4 Wyznaczanie szorstkości komórek

Inną cechą związaną z właściwościami mechanicznymi komórek jest ich tzw. szorstkość. Szorstkość jest właściwością wynikającą ze zmian wysokości błony komórkowej mierzona na małych dystansach za pomocą AFM. Średnia szorstkości jest parametrem zdefiniowanym jako średnia wartości bezwzględnych wysokości powierzchni powyżej i poniżej płaszczyzny badanego obszaru (powierzchni komórki). W odróżnieniu od analiz adhezji i sztywności, badanie to zostało wykonane w tzw. trybie bezkontaktowym. Przeanalizowano powierzchnię 5 komórek każdej grupy badanej. Każda komórka została przeskanowana w trzech miejscach poza obrębem jądra komórkowego. Obszar badany wynosił za każdym razem 10x10µm. Z przeprowadzonego badania wynika, że szorstkość zwiększa się o 17% i 25% odpowiednio dla stężeń 10 nM i 50 nM miRNA. Analizy statystyczne nie pozwoliły jednak na uzyskanie istotności statystycznej dla badanych próbek, najprawdopodobniej ze względu na niską ilość przeprowadzonych pomiarów. (Ryc. 6 a) Dodatkowo podczas pomiarów wykonano mapy

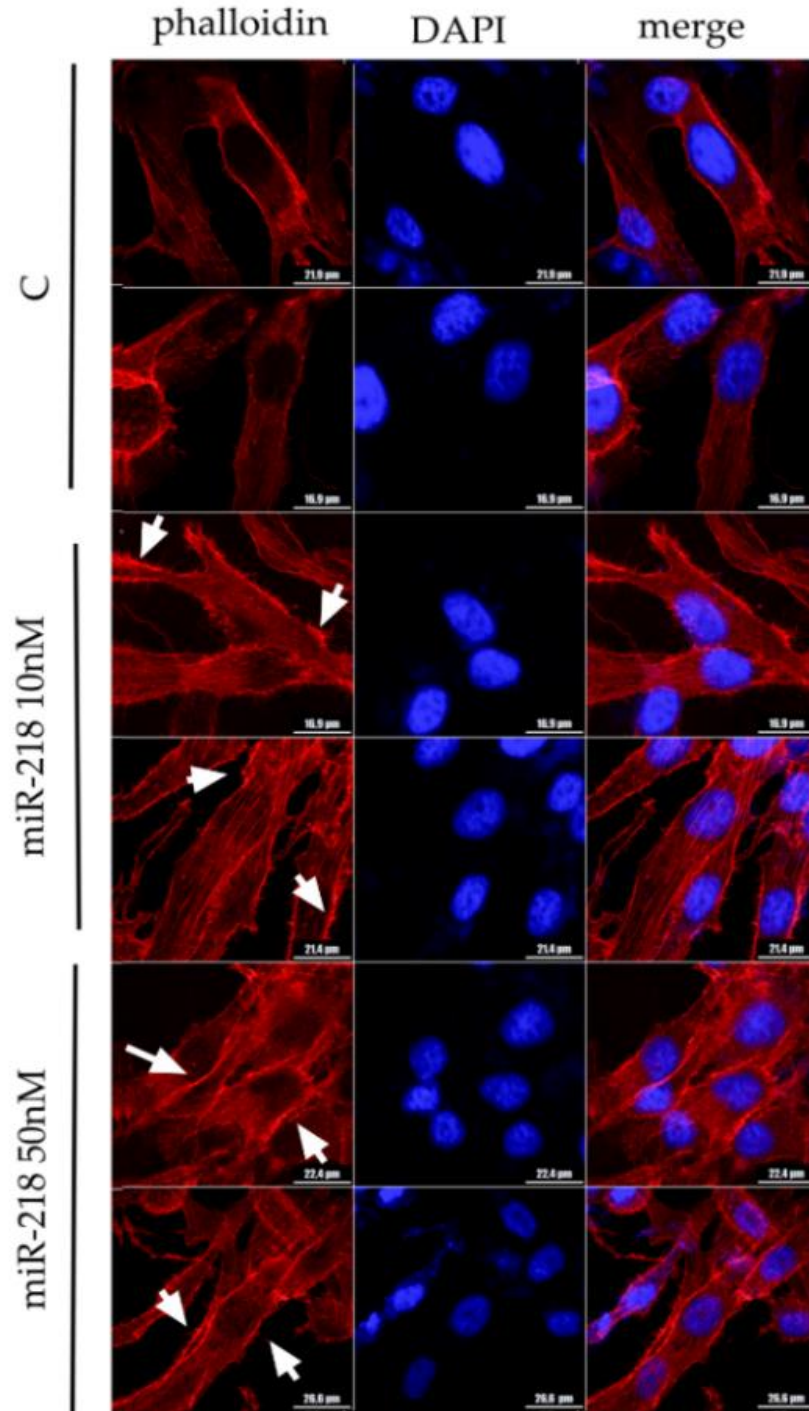


**Rycina 6. (a) Analiza szorstkości pojedynczych komórek.** Wyniki istotne statystycznie zostały oznaczone symbolem „\*„ (p-wartość<0.05). Komórki kontrolne zostały oznaczone jako K. **(b) Poglądowe mikrografie powierzchni komórek badanych podczas analizy szorstkości.** Przedstawiono zarówno zbadaną bezpośrednio wysokość oraz normalizowany do sygnału błędu obraz powierzchni komórek.

wysokości obrazujące powierzchnie komórek kontrolnych oraz suplementowanych miR-218-5p (Ryc. 6 b). Wykonane mikografie nie wykazują istotnych zmian wizualnych powierzchni komórki.

### **3.1.5 Badanie zmian w cytoszkielecie aktynowym**

W celu oceny wpływu miR-218-5p na budowę i tworzenie cytoszkieletu, przeprowadzono analizę mikroskopową obecności i kształtu włókien aktynowych w komórek glejaka. Obrazy mikroskopowe zostały uzyskane w oparciu o utrwalone komórki. 24h po suplementacji syntetycznym miR-218-5p, komórki wybarwiono falloidyną – łączącą się z włóknami F-aktyny oraz DAPI – barwnikiem pozwalającym na wyodrębnienie jądra komórkowego (Ryc. 7). Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wykazały, iż cytoszkieleł badanych komórek uległ pewnym zmianom, a reorganizacje w strukturze F-aktyny widoczne są już przy 10nM stężeniu suplementowanego mikroRNA i nasilają się wraz ze wzrostem jego stężenia. Zauważalną zmianą jest tworzenie się widocznych, wzdłużnych do dłuższej osi komórki włókien aktyny, które w komórkach nietraktowanych występują w mniejszej ilości. Szczególnie widoczne jest to w obszarze wokół jądra komórkowego, które samo jednocześnie nie zmienia się morfologicznie przy zastosowanym barwieniu. Jednocześnie zaobserwować można tworzenie się kolczystych aktynowych struktur na brzegach komórki, które mogą odpowiadać miejscowym umocnieniom komórki i tworzeniu się miejsc adhezyjnych. Miejsca te oznaczono białymi strzałkami (Ryc. 7).



**Rycina 7. Fluorescencyjne obrazowanie cytoszkieletu oraz jąder komórkowych komórek glejaka suplementowanych miR-218-5p.** Kolor czerwony – barwienie F-aktyny za pomocą koniugatu falloidyny z rodaminą. Kolor niebieski – jądra komórkowe barwione DAPI. Komórki kontrolne oznaczone jako K. Powiększenie 20x Przygotowano na podstawie publikacji Grabowska, M, Kuczyński, K, et al. miR-218 affects the ECM composition... [35]

## 3.2 Ewaluacja cytotoksyczności nanocząstek Mag@PEI

Nanocząstki złożone z magnetytu opłaszczonego polietylenoiminą (Mag@PEI) są efektywnym nośnikiem dwuniciowego RNA (dsRNA) do komórek glejaka [273,315]. Badania przeprowadzone w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej IChB PAN we współpracy z Centrum NanoBioMedycznym UAM wykazały, że nanocząstki Mag@PEI mogą być doskonałym narzędziem pozwalającym na skuteczne dostarczenie dsRNA do komórek glejaka. W przeprowadzonych pracach wykazano, że zastosowanie opisywanego nanomateriału zwiększa efektywność dostarczania kwasów nukleinowych do komórek glejaka w porównaniu do komercyjnie stosowanego lipidowego nośnika kwasów nukleinowych – Lipofectamine™. Jako ładunek nanocząstek wykorzystano dsRNA o sekwencji homologicznej do sekwencji transkryptyu tenascyny-C (ATN-RNA), który po dostarczeniu do komórki powoduje znaczące obniżenie poziomu tenascyny-C – ważnego białka macierzy zewnątrzkomórkowej glejaka [202].

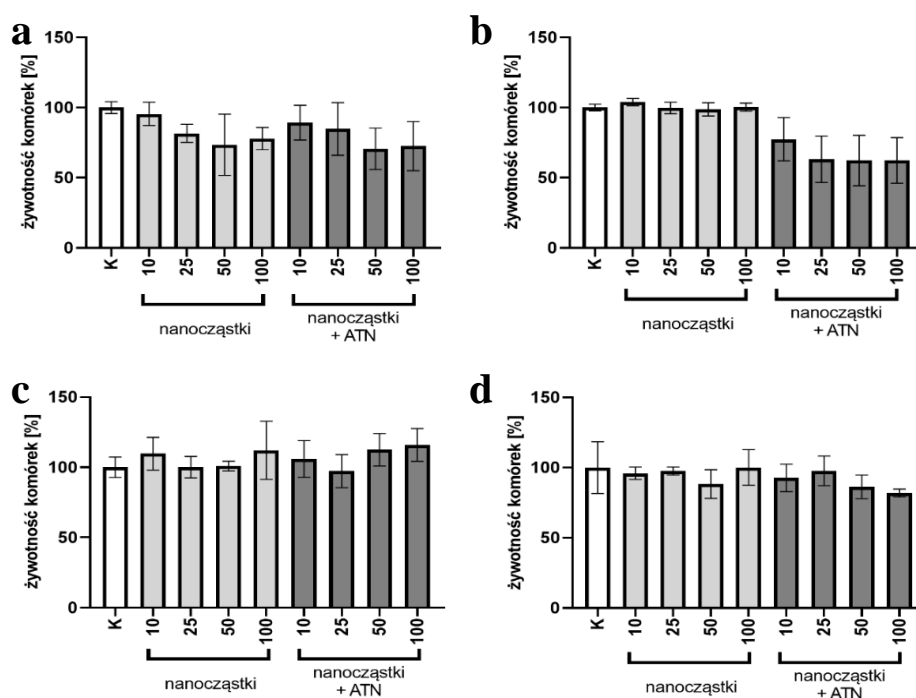
Nanocząstki otrzymano w Centrum NanoBioMedycznym UAM w oparciu o opisane wcześniej procedury, a ich pełna charakterystyka jest dostępna w publikacji „*Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme*” autorstwa Grabowskiej i współpracowników [273]. W przytoczonej publikacji nie zaobserwowano zmniejszenia się żywotności komórek ludzkich przy zastosowaniu nanomateriałów Mag@PEI ani aktywacji mechanizmów komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Mając na uwadze potencjalne terapeutyczne zastosowanie nowych nośników, konieczne jest jednak przeprowadzenie szczegółowych badań wpływu nanocząstek na komórki ludzkie. Celem tej części prac było określenie toksyczności nanocząstek typu Mag@PEI na poziomie toksyczności ogólnej, genotoksyczności, mitotoksyczności oraz toksyczności zależnej od aktywnych form tlenu.

### 3.2.1 Badanie cytotoksyczności

Cytotoksyczność nanocząstek zbadano w dwóch niezależnych testach opierających się na badaniu komórek ludzkich hodowanych w standardowych warunkach i obserwacji cytotoksyczności 24h po podaniu nanomateriału. Do pomiarów cytotoksyczności użyto dwie ludzkie linie komórkowe - linię nowotworową glejaka U-118-MG oraz prawidłową linię fibroblastów MRC-5. Zastosowano dwa testy cytotoksyczności: MTT oraz LDH. Analiza została wykonana z zastosowaniem techniki MTT, opiera się na pomiarze aktywności metabolicznej komórek w celu określenia ich żywotności. Drugi zastosowany test - LDH ma na celu pomiar żywotności komórek w zależności od stopnia uszkodzenia ich błony

komórkowej i może być dokładniejszy w przypadku badań nośników charakteryzujących się potencjałem wnikania do wnętrza komórek żywych. W obu zastosowanych testach badano zarówno wpływ samych nanocząstek, jak również kompleksów w połączeniu z dsRNA (ATN-RNA). Do badania cytotoksyczności zastosowano różne ilości nanocząstek oraz różne ilości odpowiadających im dsRNA w zakresie 12,5- 100 nM.

W teście MTT w linii komórkowej U-118-MG nie zaobserwowano zmniejszenia żywotności o więcej niż 20% (Ryc. 8 a,b). W linii komórkowej MRC-5 zaobserwowano obniżenie żywotności komórek taktowanych jednocześnie Mag@PEI i ATN-RNA o 40% w zakresie 25-100 nM. Podobnego efektu nie zaobserwowano w drugim teście. Drugi test, oparty o metodę LDH nie wykazał obniżenia żywotności komórek U-118-MG (Ryc. 8 c), a w wypadku komórek MRC-5 (Ryc. 8 d) obniżenie żywotności nieprzekraczające 15% występuje jedynie w stężeniach 50 nM i 100 nM.



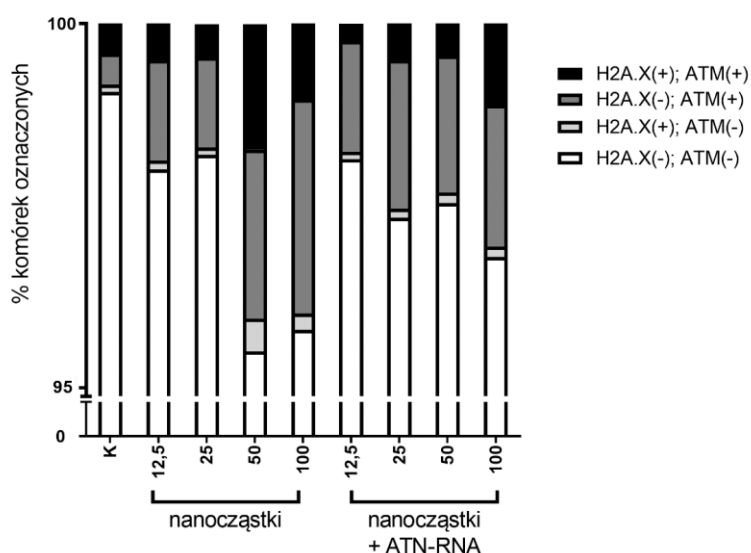
**Rycina 8. Analiza cytotoksyczności nanocząstek Mag@PEI. Wykresy normalizowane do kontroli nietraktowanej; a – test MTT przeprowadzony na komórkach U-118-MG; b – test MTT przeprowadzony na komórkach MRC-5; c – test LDH przeprowadzony na komórkach U-118-MG; d – test LDH przeprowadzony na komórkach MRC-5. K - Komórki nietraktowane. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey’a: ns – nieistotne statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .**

Wyniki otrzymane w dwóch niezależnych testach nie wskazują na znaczące obniżenie żywotności komórek U-118-MG oraz MRC-5 pod wpływem nanocząstek Mag@PEI. Znaczące

obniżenie żywotności zaobserwowano jedynie w linii MRC-5 przy zastosowaniu kompleksu Mag@PEI + ATN-RNA.

### 3.2.2 Badanie genotoksyczności

W celu analizy potencjalnej toksyczności nanocząstek w odniesieniu do uszkodzeń DNA, przeprowadzono test genotoksyczności. Wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw pozwalający na ocenę ilości dwuniciowych pęknięć DNA w trzech grupach – kontrolnej, traktowanej nanocząstkami oraz traktowanej nanocząstkami wraz z dsRNA. Badanie opierało się na pomiarze poziomu fosforylacji histonu H2A.X oraz kinazy ATM. Fosforylacja każdego z tych białek wskazuje na aktywację komórkowych szlaków naprawy uszkodzeń DNA. Komórki, w których nie wykryto fosforylowanych białek H2A.X bądź ATM nie posiadają dwuniciowych pęknięć w strukturze DNA. W badaniu użyto linii komórkowej U-118-MG, która charakteryzuje się mierzalnym natywnym poziomem dwuniciowych pęknięć w strukturze DNA na poziomie ok. 1%. W żadnej z badanych prób procentowa ilość dwuniciowych pęknięć DNA nie przekroczyła jednak 5% (Ryc. 9). Zauważalny jest pewien trend zwiększania się ilości pęknięć w dsDNA przy rosnącym stężeniu zastosowanych nanomateriałów w zakresie 12,5 nM - 100 nM, ale nie jest to wzrost istotny statystycznie. Nanocząstki typu Mag@PEI nie powodują znaczącego zwiększania się ilości podwójnoniciowych pęknięć w strukturze DNA i tym samym nie są genotoksyczne na tym poziomie obserwacji.



**Rycina 9. Analiza ilości dwuniciowych pęknięć w strukturze DNA powodowanych przez nanomateriały.** Komórki oznaczone jako H2A.X(-); ATM(-) nie posiadają wykrywalnych uszkodzeń w strukturze DNA.

K - Komórki nietraktowane. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$

### 3.2.3 Ocena stresu oksydacyjnego pod wpływem nanomateriałów

Jednym ze znanych czynników powodujących powstanie stresu oksydacyjnego w komórkach jest obecność metali, ich tlenków i jonów. Ze względu na obecność magnetytu w rdzeniu badanych nanocząstek niezbędne było zatem przeprowadzenie badań określających czy użyte nanomateriały mogą mieć wpływ na generowanie takiego stresu w komórce. Ocena wpływu nanocząstek na procesy związane ze stresem oksydacyjnym została przeprowadzona na kilku poziomach:

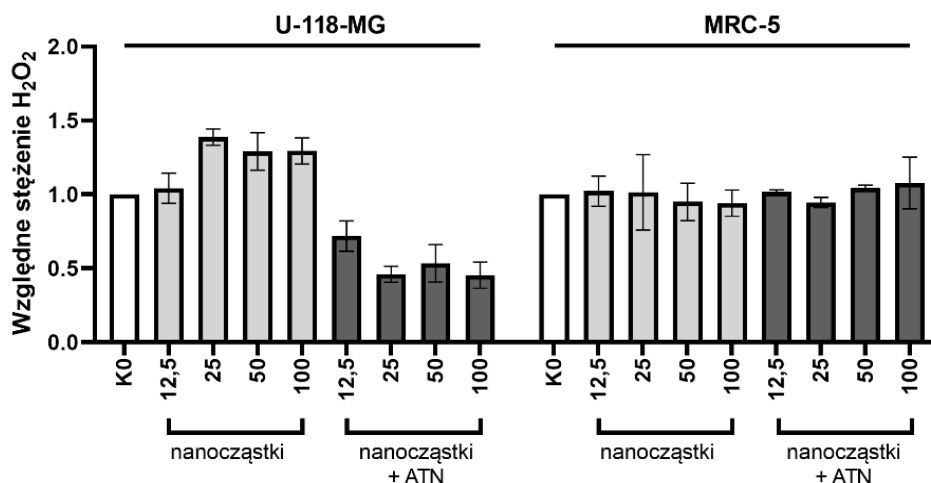
1. pojawiania się wolnych rodników,
2. poziomie ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny,
3. badaniu aktywności enzymatycznej białek związanych ze stresem oksydacyjnym.

W badaniu użyto dwóch ludzkich linii komórkowych – linii nowotworowej pochodzącej z komórek glejaka (U-118-MG) oraz linii pochodzącej z ludzkich fibroblastów (MRC-5).

#### 3.2.3.1 Badanie obecności wolnych rodników w komórkach traktowanych nanocząstkami

Nadtlenek wodoru jest jednym z najczęściej występujących czynników wewnątrzkomórkowych indukujących stres oksydacyjny [350]. W celu oceny jego ilości w wyniku obecności nanocząstek, linie komórkowe traktowane były nanocząstkami Mag@PEI oraz nanokompleksami z dsRNA. Pomiar ilości  $H_2O_2$  w ekstraktach komórkowych wykonano za pomocą obserwacji absorpcji w zakresie fali 480 nm. Absorpcja ta rośnie wraz z powstaniem czerwonego kompleksu rodanku żelaza (III) formującego się w obecności  $H_2O_2$  (III).

Analiza stężenia nadtlenku wodoru w linii komórkowej ludzkich fibroblastów nie wykazała jego podniesienia ilości w żadnej z badanych prób (Ryc. 10). Zmiany w poziomie  $H_2O_2$  zostały natomiast zaobserwowane w linii komórkowej glejaka. Podanie nanocząstek bez dsRNA, czyli nie niosących ładunku zwiększa ilość wewnątrzkomórkowego nadtlenku wodoru o maksymalnie 42% przy stężeniu 25 nM nanocząstek, natomiast nanocząstki z dwuniciowym RNA wpływają na obniżenie jego poziomu o maksymalnie 55% w przypadku najwyższego zastosowanego stężenia nanocząstek oraz dsRNA.



**Rycina 10. Badanie ilościowe obecności nadtlenu wodoru w komórkach ludzkich traktowanych nanocząstkami Mag@PEI.** K - Komórki nietraktowane. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .

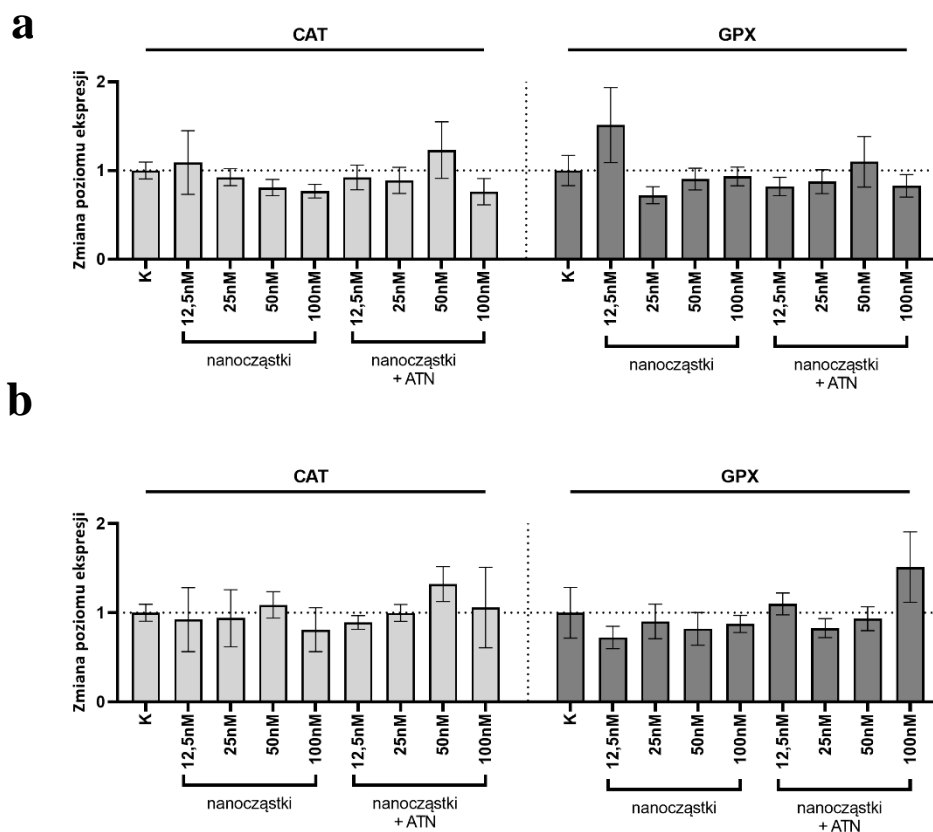
### 3.2.3.2 Analiza ekspresji oraz aktywności katalitycznej markerów stresu oksydacyjnego

W odpowiedzi na stres oksydacyjny komórka uruchamia mechanizmy obronne powiązane z aktywnością enzymów mających rozkładać wolne formy tlenu do związków nie stanowiących zagrożenia dla homeostazy. Enzymy takie wykazują aktywność antyoksydacyjną, a jej wzmożenie jest ściśle powiązane z generacją wolnych form tlenu. Sam poziom nadtlenu wodoru nie może być zatem traktowany jako rozstrzygające badanie w analizie obecności stresu oksydacyjnego.

W celu oceny aktywności antyoksydacyjnej w odpowiedzi na obecność w kulturze komórkowej nanocząstek, przeprowadzono badanie poziomu ekspresji dwóch genów kodujących enzymy będących markerami występowania stresu oksydacyjnego – katalazę (CAT; EC 1.11.1.6) oraz peroksydazę glutationową (GPX; EC 1.11.1.9). Katalaza jest enzymem z grupy oksydoreduktaz, który katalizuje rozkład nadtlenu wodoru regulując ilość tej aktywnej formy tlenu w komórkach. Drugi enzym, który został użyty w analizie również rozkłada nadtlenek wodoru, jednak jego aktywność została jednak również potwierdzona w przypadku rozkładu wodorotlenków lipidów.

Opisywane w literaturze znaczące podniesienie poziomu ekspresji genu katalazy mieści się w zakresie podwojenia ekspresji genu [350]. W badaniu wykonanym na potrzeby tej pracy nie zaobserwowano zwiększenia ekspresji genu GPX bądź CAT o wartość większą niż 50% w żadnej z badanych próbek w liniach komórkowych U-118-MG (Ryc. 11 a) oraz MRC-5 (Ryc.11 b).



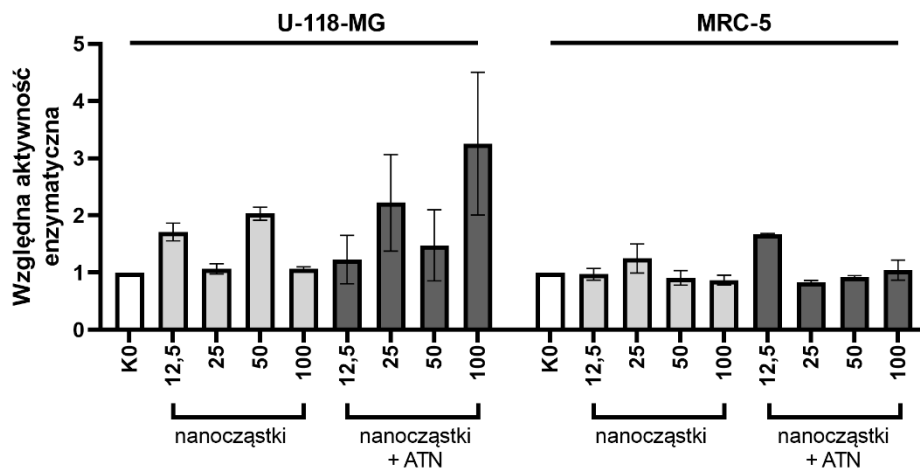


**Rycina 11. Analiza zmian ekspresji genów katalazy i peroksydazy glutationowej w komórkach U-118-MG oraz MRC-5. a** – analiza przeprowadzona na linii U-118-MG; **b** – analiza przeprowadzona na linii MRC-5

CAT – katalaza; GPX – peroksydaza glutationowa; K - Komórki nietraktowane. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .

Wykazany w poprzednich badaniach brak zmian na poziomie ekspresji genów katalazy i peroksydazy glutationowej (Ryc. 11) nie jest wystarczającym dowodem na brak aktywności enzymów. W następnym etapie wykonano zatem badanie aktywności enzymatycznej enzymów. W komórkach MRC-5 nie zaobserwowano znaczących zmian w aktywności enzymatycznej katalazy (Ryc. 12), co jest spójne z poprzedzającym wynikiem wskazującym na zwiększoną pod wpływem nanomateriałów ilość  $H_2O_2$  (Ryc. 10). W komórkach glejakowych aktywność enzymu wzrasta, ale nie jest powiązana z zastosowaniem nanomateriałów bądź nanomateriałów załadowanych podwójnoniciowym RNA (Ryc. 12).

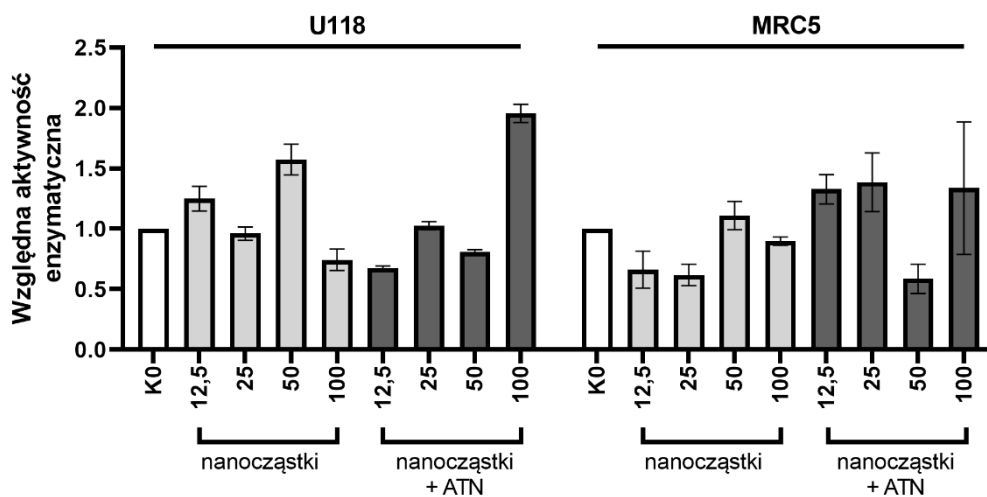
### Aktywność enzymatyczna katalazy



**Rycina 12.** Badanie aktywności enzymatycznej katalazy. K - Komórki nietraktowane. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .

W badaniu poziom GPX wzrósł w komórkach taktowanych w obu testowanych liniach komórkowych (Ryc. 13). Nie została zaobserwowana korelacja między zbadanym poziomem nadtlenu wodoru a aktywnością enzymu co może wskazywać na inne pochodzenie zaobserwowanego stresu oksydacyjnego niż obecność  $H_2O_2$ .

### Aktywność enzymatyczna peroksydazy glutationowej

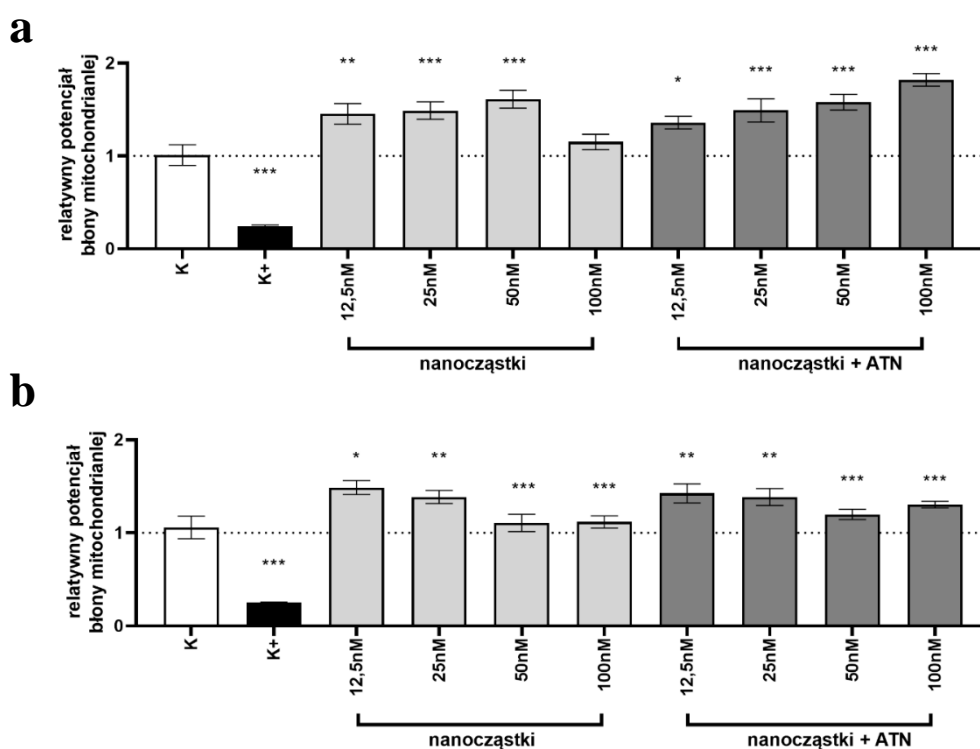


**Rycina 13.** Badanie aktywności enzymatycznej peroksydazy glutationowej. K - Komórki nietraktowane. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .

### 3.2.4 Badanie mitotoksyczności

Kolejnym poziomem badania toksyczności nanocząstek Mag@PEI było zbadanie ich wpływu na funkcjonowanie mitochondriów. Obecność żelaza, oprócz potencjalnego wpływu na pojawienie się wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego może powodować także uszkodzenie mitochondriów, sygnalizowane przez depolaryzację błony mitochondrialnej i utratę funkcji tych organelli. W celu oceny takiego wpływu wykorzystano test oparty na reakcji fluorescencyjnego barwnika JC-1. Barwnik ten akumuluje się wewnątrz mitochondriów, a podczas depolaryzacji błony mitochondrialnej i zmniejszenia się potencjału błonowego barwnik wypływa z mitochondriów do cytoplazmy.

Stosunek fluorescencji pochodzącej z mitochondriów i cytozolu wskazuje bezpośrednio na ilość zdepolaryzowanych błon mitochondrialnych, co związane jest mitotoksycznością badanej substancji.



**Rycina 14. Analiza wpływu nanomateriału na potencjał błony mitochondrialnej**

**a** – linia komórkowa U-118MG; **b** – linia komórkowa MRC-5

K - Komórki nietraktowane; K+ - kontrola dodatnia depolaryzacji błony mitochondrialnej

Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotnie statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\* brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .

Test wykonano za pomocą pomiaru całkowitej fluorescencji barwionej hodowli komórkowej z użyciem czytnika fluorescencji (Ryc 14 a,b). W przypadku komórek w kontroli pozytywnej traktowanej związkiem CCCP obniżającym potencjał błony mitochondrialnej, obserwowano obniżenie potencjału błony o ok. 85% w obu liniach komórkowych. W żadnej z badanych prób nie zaobserwowano toksyczności w stosunku do mitochondriów. Komórki traktowane nanomateriałami wykazały natomiast podniesiony potencjał błony mitochondrialnej o maksymalnie 50% w linii U-118-MG w zakresie stężeń 12,5-50 nM (Ryc. 14 a) i maksymalnie 40% w przypadku linii MRC-5 w stężeniu 12,5 nM (Ryc. 14 b). Analogiczne testy z wykorzystaniem kompleksów Mag@PEI + ATN-RNA nie wykazały zwiększenia się poziomu depolaryzacji błony komórek MRC-5 (Ryc. 14 b). W przypadku linii komórkowej U-118-MG zaobserwowano niewielkie zwiększenie się potencjału błony (w zakresie 20-50%) wraz ze wzrostem stężenia zastosowanych nanomateriałów (Ryc. 14 a).

### **3.3 Badanie wpływu wielkości nanocząstek na ich właściwości cytotoksyczne**

Badanie wpływu na komórki żywe nie mogą być prowadzona w oderwaniu od właściwości fizycznych tych materiałów. Jedną z najważniejszych właściwości nanocząstek jest ich nanometryczny rozmiar. Dotychczas publikowane badania wykazywały wpływ rozmiaru nanocząstek na ich farmakokinetykę i możliwość oddziaływania z komórkami. W przedstawionych w tej pracy badaniach przebadano żywotność komórek traktowanych nanocząstkami polimerowymi o różnej wielkości. W tym celu wykorzystano jednoskładnikowe cząstki polimerowe wykonane z polidopaminy (PDA) – biomimetycznego polimeru otrzymanego po raz pierwszy w 2007 roku [351]. Materiał ten jest szeroko wykorzystywany w nanotechnologii, głównie do produkcji nanocząstek [352-354]. Nanocząstki polimerowe wykonane z polidopaminy występują w szerokim spektrum wielkości pojedynczej cząstki. W ramach realizacji pracy doktorskiej wykorzystałem nanocząstki PDA w trzech różnych rozmiarach - 100nm, 140nm oraz 240nm.

Celem przedstawionej analizy było zatem określenie właściwości cytotoksycznych nanocząstek w zależności od ich wielkości w ludzkich liniach komórkowych różnego typu, ze szczególnym uwzględnieniem komórek nowotworowych. Wykorzystano cztery linie komórkowe: U-118-MG pochodzenia glejaka, MRC-5 – linia embrionalnych fibroblastów płucnych, HEK-293 – nieśmiertelna linia embrionalnych komórek nerki oraz HEP G2 – linia nowotworowa pochodząca z raka wątroby.

Nanocząstki zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Stereochemii Organicznej Wydziału Chemii UAM w Poznaniu oraz Centrum NanoBioMedycznym UAM w Poznaniu w ramach współpracy naukowej.

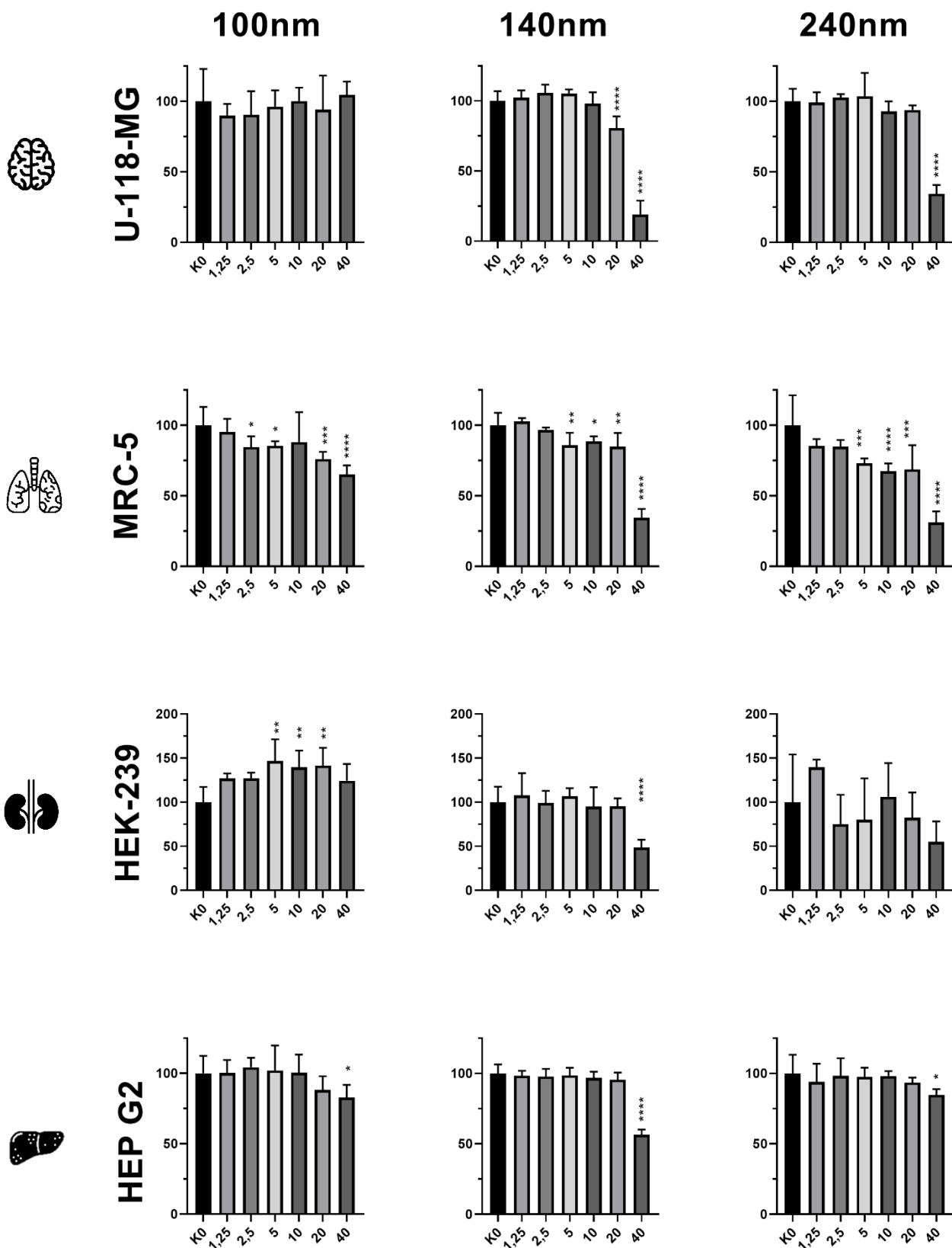
### **3.3.1. Charakterystyka nanomateriału**

Nanocząstki PDA zostały zsyntetyzowane przez naszych partnerów w NanoBioMedycznym UAM w Poznaniu z użyciem zmodyfikowanego protokołu opublikowanego w 2021 roku [355].





### **3.3.2. Analiza cytotoksyczności za pomocą testu MTT**

Analizę cytotoksyczności nanocząstek PDA wykonano za pomocą dwóch niezależnych testów na czterech różnych ludzkich liniach komórkowych.

Z przeprowadzonej analizy MTT wynika, że niezależnie od wielkości nanomateriału najbardziej wrażliwe na działanie nanocząstek PDA są komórki MRC-5 (Ryc. 15). W tych komórkach nanocząstki o wielkości 100 nm powodują obniżenie żywotności komórek o 10-30% zwiększające się wraz ze wzrostem stężenia zastosowanego nanomateriału. Dla tych samych komórek nanocząstki o wielkości 140 nm wykazują mniejszą cytotoskyczność w zakresie 1,25-20  $\mu\text{g/mL}$  stężenia użytych nanocząstek. W przypadku stężenia 40  $\mu\text{g/mL}$  cytotoskyczność drastycznie rosła, a żywotność komórek wynosiła 30%. Największe nanomateriały wykazywały podobną do najmniejszych nanocząstek cytotoskyczność w zakresie 1,25-20  $\mu\text{g/mL}$  stężenia użytych nanocząstek. Cytotoskyczność nanomateriałów o wielkości 240 nm w najwyższym stężeniu jest taka sama jak materiałów o wielkości 140 nm. Pomimo wyjątkowej staranności wyniki badania wykonane z użyciem testu MTT są istotnie statystyczne tylko dla prób traktowanych nanocząstkami o najwyższym stężeniu. Równocześnie jedynie w tych próbach zaobserwowano spadek żywotności badanych komórek. Dane liczbowe opisane jako procent żywotności komórek kontrolnych zostały przedstawione w tabeli 5.



**Rycina 15.** Analiza wpływu nanomateriału PDA na aktywność metaboliczną komórek ludzkich. Wykresy normalizowane do kontroli nietraktowanej. Oś X stężenie cząstek w nM ; Oś Y - procentowa żywotność nanocząstek K0 - Komórki nietraktowane; Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotnie statystycznie; \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p > 0,05$

Rodzaj linii komórkowej	rozmiar nanomateriału	stężenie nanomateriału					
		1,25 µg	2,5 µg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
U-118-MG 	100 nm	89,74%	90,47%	96,24%	100,16%	94,01%	104,60%
	140 nm	102,26%	105,82%	105,13%	98,15%	80,71%	18,99%
	240 nm	99,22%	102,68%	103,56%	92,83%	93,89%	34,53%
MRC-5 	100 nm	95,41%	84,63%	85,48%	88,08%	76,08%	65,26%
	140 nm	102,68%	96,75%	86,03%	88,66%	84,77%	34,53%
	240 nm	85,37%	84,75%	73,07%	67,43%	68,67%	31,14%
HEK-293 	100 nm	126,91%	127,16%	146,93%	139,66%	141,55%	124,38%
	140 nm	107,82%	99,25%	106,78%	94,97%	95,64%	48,70%
	240 nm	139,52%	74,94%	80,16%	106,19%	82,33%	55,09%
HEP G2 	100 nm	100,15%	104,30%	102,07%	100,46%	88,17%	82,89%
	140 nm	98,38%	97,81%	98,56%	96,74%	95,43%	56,41%
	240 nm	93,99%	98,16%	97,59%	98,04%	93,52%	84,76%

**Tabela 5. Analiza wpływu nanomateriału PDA na aktywność metaboliczną komórek ludzkich (test MTT).**

Tabela przedstawia zmiany żywotności komórek traktowanych nanomateriałami o różnej wielkości. Wartość 100% oznacza przeżywalność wyznaczoną dla komórek kontrolnych nietraktowanych nanocząstkami PDA.

Kolorem zielonym oznaczono próby których przeżywalność komórek spadła o mniej niż 25%. Kolor żółty wskazuje na próby gdzie żywotność spadła o wartości w przedziale 25%-50%. Kolor czerwony oznacza próby gdzie żywotność komórek stanowi mniej niż 50% żywotności komórek kontrolnych.

### 3.3.2. Analiza cytotoksyczności za pomocą testu LDH

W drugiej niezależnej analizie użyto dokładnie takich samych grup eksperymentalnych, jednakże wykorzystano technikę pomiarową opartą na pomiarze wpływu dehydrogenazy mleczanowej do medium komórkowego (Ryc. 16).

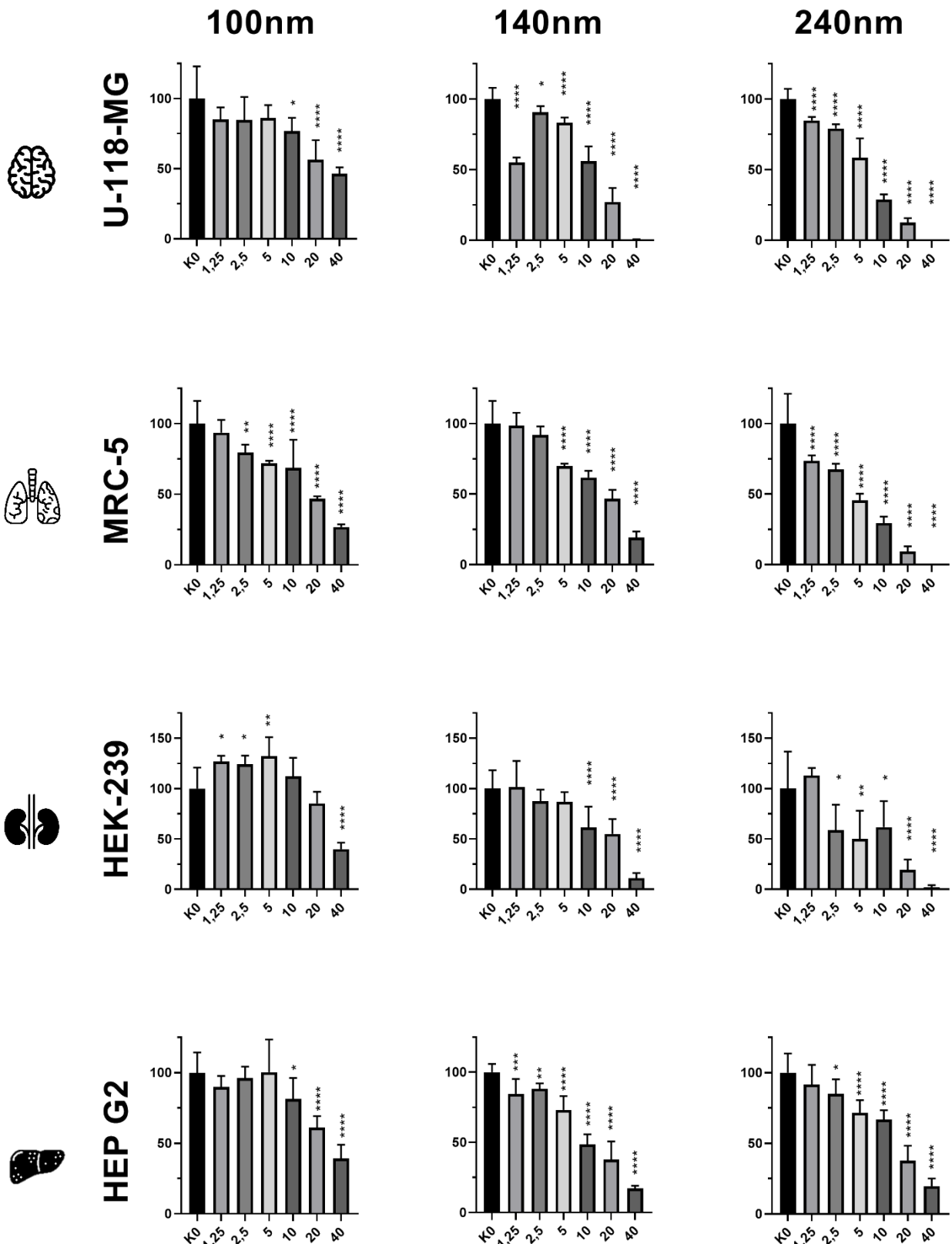
Otrzymane wyniki znacząco odbiegają od tych otrzymanych z wykorzystaniem metody MTT. Jedynie w jednej grupie pomiarowej (komórki HEK-239 traktowane nanocząstkami o wielkości 100nm) nie zaobserwowano zmian w żywotności, niezależnie od zastosowanego stężenia podanych nanomateriałów. Dodatkowo zaobserwowano znaczące (~50%) zmniejszenie się żywotności wszystkich linii komórkowych po podaniu nanocząstek w stężeniu 20 oraz 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pożywki. W przypadku nanocząstek o wielkości 240 nm stosowanych w stężeniu 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  żywotność linii komórkowej HEP G2 została zredukowana do 20% a w trzech kolejnych badanych liniach przeżywalność wynosiła jedynie 1-2%. We wszystkich istotnie statystycznie pomiarach odnotowano zwiększanie się toksyczności wraz ze wzrostem stężenia stosowanego nanomateriału.

Przeprowadzona analiza pozwala stwierdzić, że z przetestowanych kombinacji linii komórkowych i wielkości nanomateriałów największe obniżenie żywotności obserwujemy: dla wielkości nanomateriałów 100 nm – w linii MRC-5; dla wielkości 140 nm – w linii U-118-MG a dla rozmiaru 240 nm – wysoki spadek w liniach U-118-MG oraz MRC-5.





Otrzymane

w obu testach wyniki wskazują, że dla wszystkich typów komórek najbardziej toksyczne są nanocząstki PDA o wielkości 240 nm. Nanomateriały o tej wielkości wykazują zmniejszanie żywotności komórek w każdym stosowanym stężeniu we wszystkich badanych liniach komórkowych. Dane liczbowe opisane jako procent żywotności komórek kontrolnych zostały przedstawione w tabeli 6.





**Rycina 16. Analiza wpływu nanomateriału PDA na żywotność komórek ludzkich badanych za pomocą analizy wpływu dehydrogenazy mleczanowej (test LDH). Oś X stężenie cząstek w nM ; Oś Y - procentowa żywotność nanocząstek**  
Wykresy normalizowane do kontroli nietraktowanej. K0 - Komórki nietraktowane;  
Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie;  
\* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* dla  $p < 0,0001$  brak istotności statystycznej dla  $p \geq 0,05$ .

Rodzaj linii komórkowej	rozmiar nanomateriału	stężenie nanomateriału					
		1,25 µg	2,5 µg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
U-118-MG 	100 nm	85,13%	84,87%	86,20%	76,67%	56,52%	46,55%
	140 nm	55,19%	90,69%	83,13%	55,90%	27,16%	0,06%
	240 nm	83,84%	78,26%	56,40%	28,61%	15,05%	0,16%
MRC-5 	100 nm	93,61%	79,57%	71,78%	68,72%	46,83%	26,77%
	140 nm	98,61%	92,03%	69,78%	61,72%	46,73%	19,11%
	240 nm	73,60%	67,59%	45,57%	29,58%	9,27%	0,15%
HEK-293 	100 nm	126,59%	123,91%	132,01%	111,93%	85,17%	39,92%
	140 nm	101,48%	87,34%	86,64%	61,38%	54,97%	10,97%
	240 nm	88,41%	84,99%	78,93%	71,78%	47,07%	33,11%
HEP G2 	100 nm	81,08%	87,58%	78,57%	65,86%	40,78%	19,56%
	140 nm	84,53%	88,14%	73,10%	48,57%	37,74%	17,14%
	240 nm	91,70%	85,10%	71,66%	66,89%	37,62%	19,67%

**Tabela 6. Analiza wpływu nanomateriału PDA na żywotność komórek ludzkich badanych za pomocą analizy wpływu dehydrogenazy mleczanowej (test LDH).**

Tabela przedstawia zmiany żywotności komórek traktowanych nanomateriałami o różnej wielkości. Wartość 100% oznacza przeżywalność wyznaczoną dla komórek kontrolnych nietraktowanych nanocząstkami PDA.

Kolorem zielonym oznaczono próby których przeżywalność komórek spadła o mniej niż 25%. Kolor żółty wskazuje na próby gdzie żywotność spadła o wartości w przedziale 25%-50%. Kolor czerwony oznacza próby gdzie żywotność komórek stanowi mniej niż 50% żywotności komórek kontrolnych.

### 3.4 Ustanowienie nowych modeli organoidów pochodzenia glejakaowego

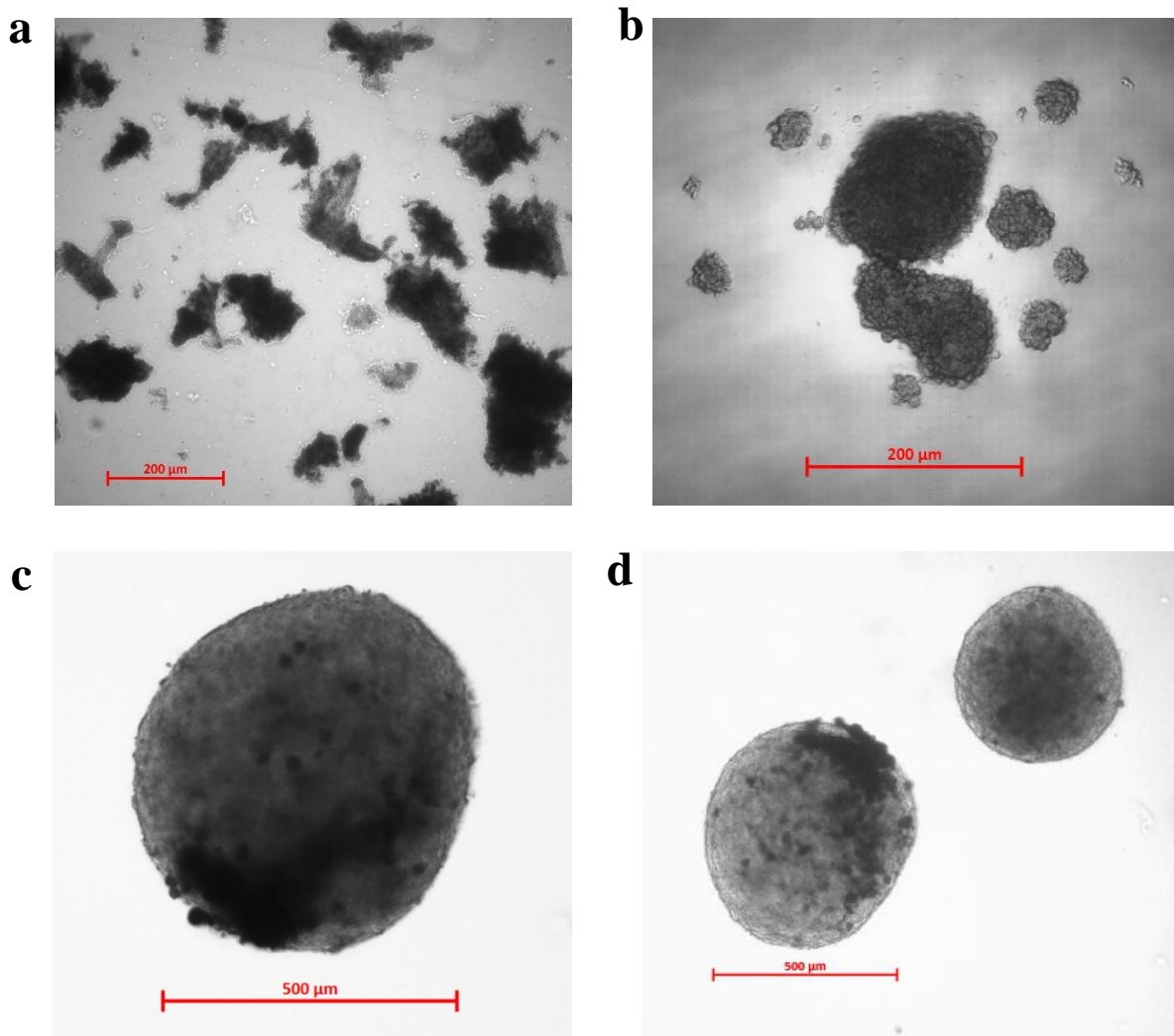
Badania właściwości glejaka takie jak migracja i inwazja wymagają przygotowania odpowiednich układów eksperymentalnych. Procesy te są bowiem zależne nie tylko od właściwości samych komórek nowotworu, ale również od otoczenia komórkowego i pozakomórkowego, w którym odbywa się wzrost guza. Szczególną rolę pełni w nich macierz zewnątrzkomórkowa, która podczas inwazji i migracji ulega silnej przebudowie [356]. Bardzo istotne dla procesów migracji i inwazji są również warunki hipoksji powstające naturalnie w guzie nowotworowym oraz obecność komórek macierzystych nowotworu. Standardowe kultury komórkowe prowadzone w układach w dwuwymiarowych układach adherentnych nie są w stanie w pełni odzwierciedlić wspomnianych powyżej właściwości. Zdecydowanie lepszym modelem do badań inwazji i migracji są modele trójwymiarowe, które jednocześnie mogą być także szerzej wykorzystywane w badaniach z zakresu farmakokinetyki leków oraz oceny toksyczności substancji czynnych, w tym nanomateriałów [357,358].

Założeniem tej części pracy było:

1. optymalizacja hodowli zaawansowanych trójwymiarowych kultur komórkowych – organoidów bazujących na pierwotnych komórkach glejaka pochodzących bezpośrednio od pacjentów (organoid GBM);
2. budowa i optymalizacja hodowli nowego hybrydowego modelu badawczego opartego o organoid przypominający budowę zdrowy mózg (HBO, ang. *cerebral organoid*) oraz organoid bazujący na komórkach glejaka. Tę część pracy realizowałem w ramach stażu badawczego, który odbyłem w Berlin Institute for Medical Systems Biology, Max Delbrück Center for Molecular Medicine (BIMSB, MDC) Berlinie. Staż odbywał się w laboratorium Organoid Platform kierowanym przez dr Agnieszkę Rybak-Wolf.

### 3.4.1 Otrzymanie linii pierwotnych glejaka

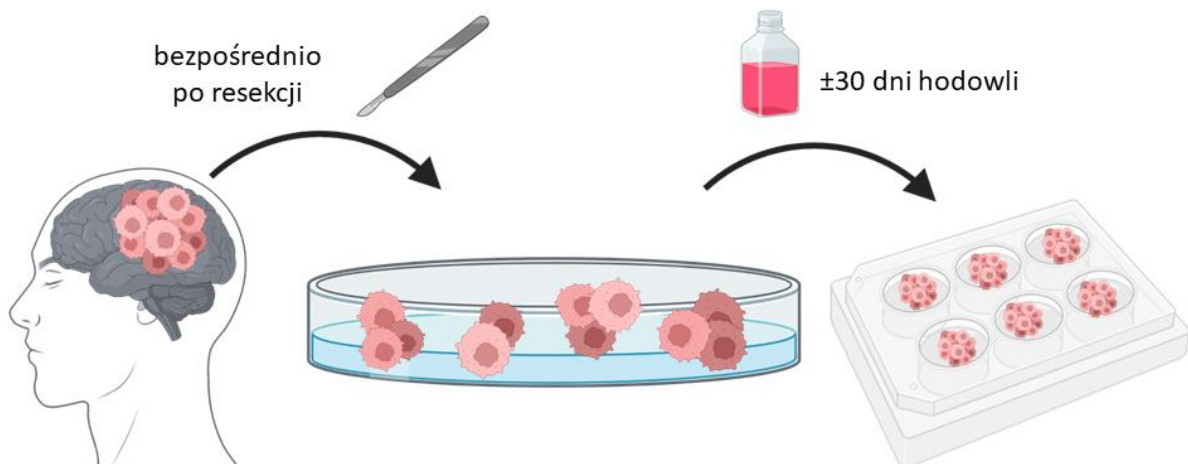
W celu otrzymania nowego trójwymiarowego modelu do badań glejaka *in vivo* wykorzystano komórki ludzkie pochodzące z resekcji nowotworów mózgu wykonanych w Katedrze i Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. W wyniku optymalizacji otrzymano dwie pierwotne linie komórkowe kultywowane w formie organoidu. Linię nazwano P051-GBO i P048-GBO zdeponowano w bazie linii komórkowych Zakładu Neuroonkologii Molekularnej IChB PAN. Otrzymane kultury utrzymywano w ciągłej hodowli opisanej w podrozdziale metody 6.2.3.



**Rycina 17. Obrazowanie mikroskopowe komórek glejaka hodowanych w kulturze organoidu P051-GBO.**

**a** – tkanka nowotworowa po procedurze rozdrobnienia; **b** – linia organoidów P048-GBO po 10 dniach hodowli; **c** – linia organoidów P048-GBO po 30 dniach hodowli; **d** – linia organoidów P051-GBO po 30 dniach hodowli

Pozyskane tkanki zostały oczyszczone, rozdrobnione i umieszczone w pożywce hodowlanej przystosowanej do hodowli pierwotnych linii komórkowych glejaka wg procedury zaproponowanej przez Jacob i współpracowników (Ryc. 17a, 18) [349]. W trakcie hodowli otrzymano struktury o kształcie zbliżonym do okrągłego o wielkościach mieszczących się w zakresie 200 - 500  $\mu\text{m}$  (Ryc. 17 b-d).



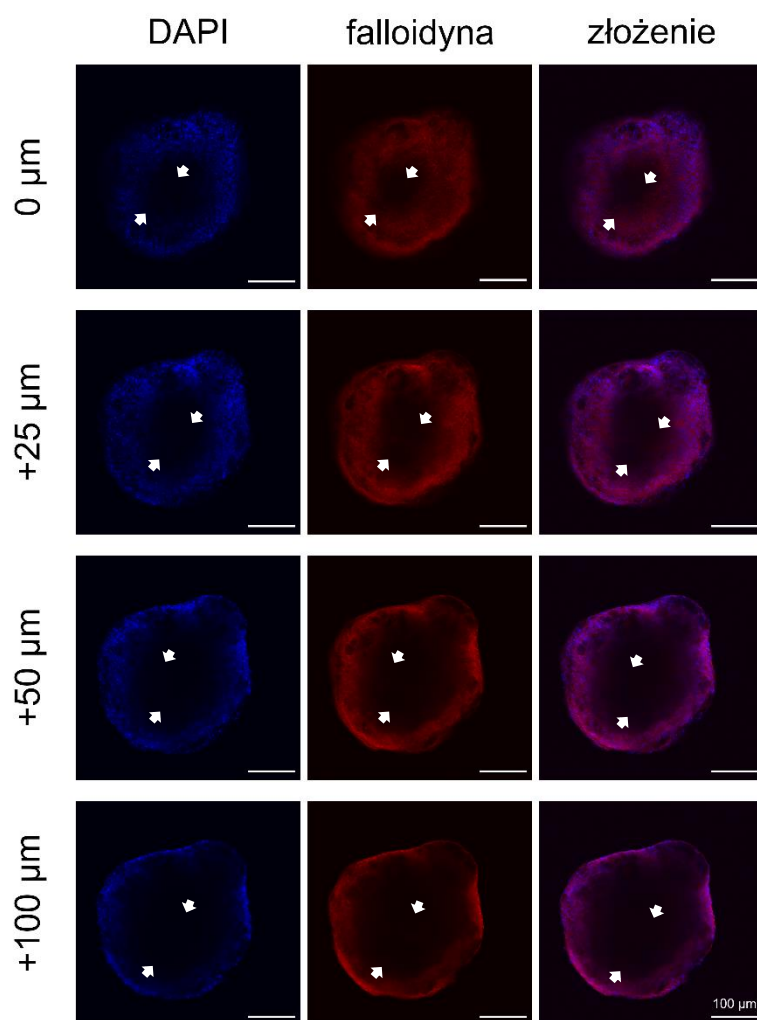
**Rycina 18.** Schemat ideowy postępowania w celu generacji organoidów glejakowych.

### 3.4.3 Obrazowanie struktury cytoszkieletu aktynowego

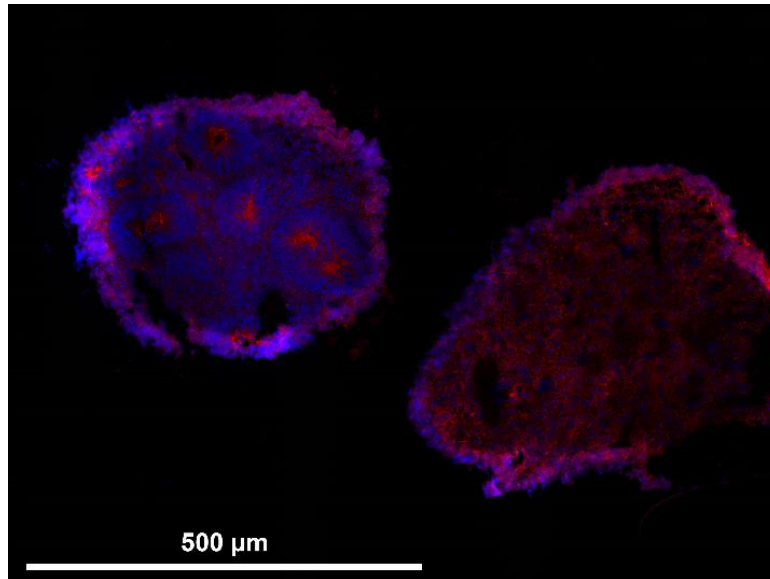
Otrzymane trójwymiarowe kultury utrwalono i wybarwiono w celu oszacowania kształtu i stopnia jednorodności uzyskanych struktur. W tym badaniu wykorzystano całe organoidy. W badaniu użyto barwników ukazujących jądra komórkowe oraz cytoszkielet aktynowy a obrazowanie wykonano z użyciem mikroskopu konfokalnego co pozwoliło na separację poszczególnych oddalonych o 25  $\mu\text{m}$  warstw otrzymanego organoidu (Ryc. 19). Seria mikrografii na których utrwalono obrazy fluorescencyjne poszczególnych warstw struktury wskazuje na wyższe zagęszczenie komórek w zewnętrznej warstwie kultury. Szczególnie interesujący jest obraz centralnej części struktury, która w głębokich warstwach organoidu zostaje niewybarwiona (oznaczono białymi strzałkami na ryc.19).

Dodatkowo, dla potwierdzenia prawidłowości otrzymanej kultury, przeprowadzono identyczne barwienie porównawcze między organoidem P051-GBO a organoidem mózgowym HBO, użyczonym do badań przez laboratorium Organoid Platform, BIMSB, MDC (Ryc 20).

Wykonane obrazowanie wykazało znaczące różnice w strukturze wewnątrz barwionych organoidów. Hodowla pochodząca z komórek glejaka nie wykazuje wewnętrznej struktury charakterystycznej dla organoidów mózgowych.



**Rycina 19. Fluorescencyjne obrazowanie cytoszkieletu oraz jąder komórkowych komórek glejaka hodowanych w kulturze organoidu P051-GBO. Na mikrografii przedstawiono wybrane przekroje z barwienia całego organoidu. Kolor czerwony – barwienie F-aktyny za pomocą koniugatu falloidyny z rodaminą. Kolor niebieski – jądra komórkowe barwione DAPI. Powiększenie 20x.**

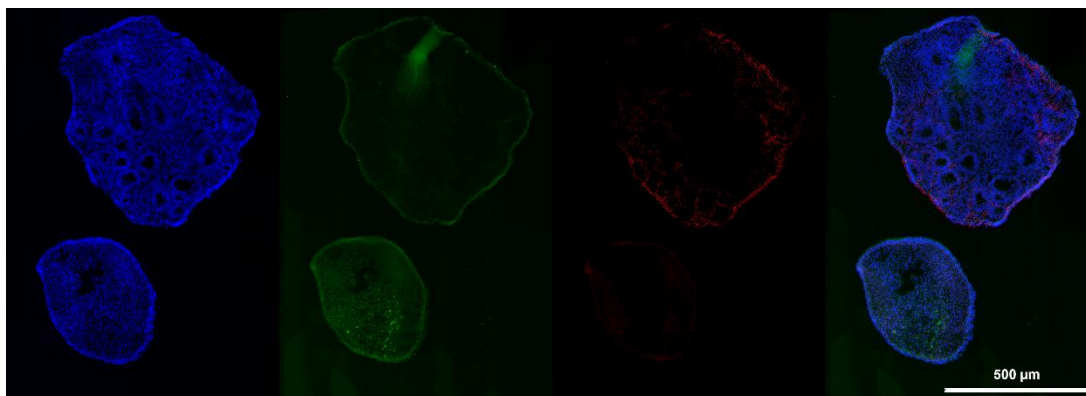


**Rycina 20. Fluorescencyjne obrazowanie cytoszkieletu oraz jąder komórkowych organoidu zdrowego HBO (po lewej) oraz komórek glejaka hodowanych w kulturze organoidu P051-GBO (po prawo).** Na mikrografii przedstawiono wybrane przekroje z barwienia całego organoidu. Kolor czerwony – barwienie F-aktyny za pomocą koniugatu falloidyny z rodaminą. Kolor niebieski – jądra komórkowe barwione DAPI.

#### **3.4.4 Badanie ekspresji wybranych białek w otrzymanym modelu**

Kolejnym etapem charakteryzacji uzyskanego organoidu było określenie ekspresji i lokalizacji tenascyny-C – białka macierzy zewnątrzkomórkowej, które w hodowlach dwuwymiarowych wykazuje niską ekspresję charakterystyczną dla białek ECM w kulturach 2D. W celu porównania otrzymanych wyników do innych organoidów znów posłużono się organoidem zdrowym. Jako kontrbarwienie pozwalające zlokalizować potencjalne neurony wykorzystano przeciwciała przeciwko białku TBR1 – charakterystycznemu dla rozwijających się neuronów obecnych w organoidzie zdrowym (Ryc. 21).

Przeprowadzone barwienia wykazują zwiększoną ilość TN-C w organoidzie glejakowym, przy jednocześnie niskim poziomie fluorescencji białka TBR1.

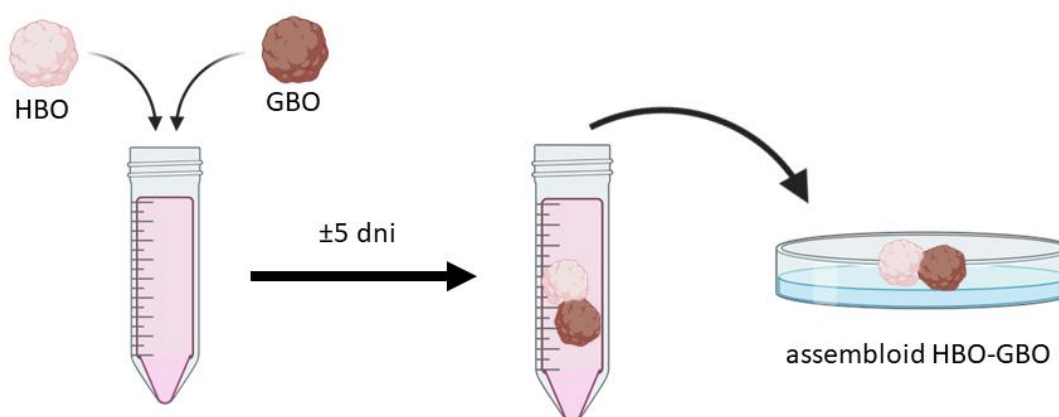


**Rycina 21. Fluorescencyjne obrazowanie ekspresji białek TN-C, TBR1 oraz jąder komórkowych komórek glejaka hodowanych w kulturze organoidu (na dole) oraz organoidu zdrowego (na górze).** Na mikrografii przedstawiono wybrane przekroje z barwienia całego organoidu.

Kolor czerwony – białko TBR1 charakteryzujące neurony; Kolor zielony – tenascyna C; Kolor niebieski – jądra komórkowe barwione DAPI.

### 3.4.5 Assembloid HBO-GBO

Drugim otrzymanym w ramach wykonywania prac modelem badawczym był assembloid HBO-GBO uzyskany w wyniku fuzji organoidu P051-GBO z organoidem o strukturze mózgu. Assembloidy przygotowano przez kokulturę organoidu GBO z organoidem HBO w medium hodowlanym dostosowanym do organoidu GBO (Ryc. 22). W przypadku assembloidy P051-GBO-HBO wspólna hodowla organoidów była prowadzona przez 5 dni (Ryc. 23). W ramach wykonywanych prac przygotowano również assembloid P048-GBO-HBO, jednak te linie nie stworzyły stabilnego połączenia i uzyskanej hodowli nie można było uznać za assembloid.

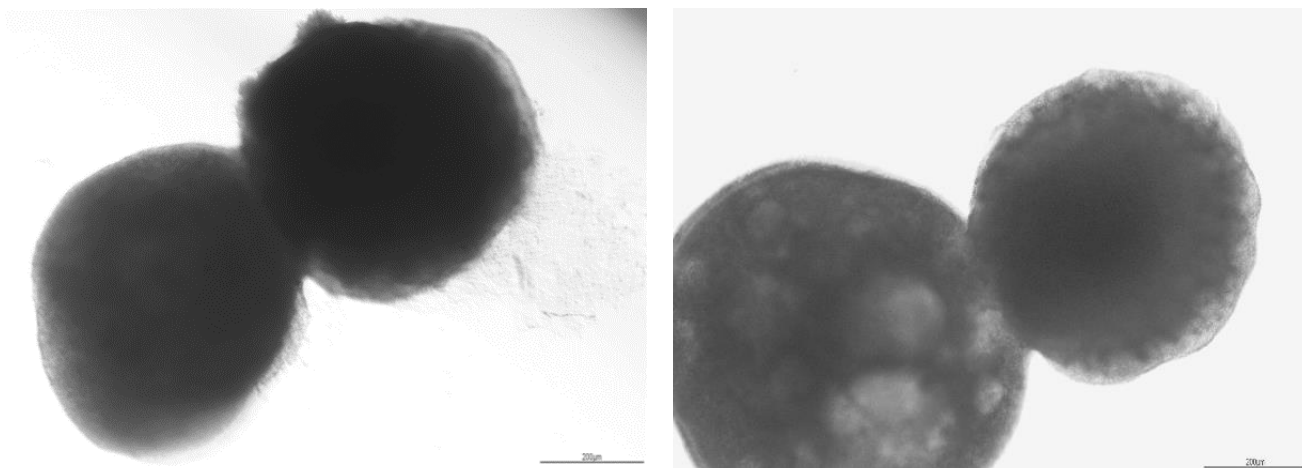


**Rycina 22. Schemat ideowy postępowania w celu otrzymania assembloidów HBO-GBO.**

HBO – organoid zdrowego mózgu generowany z komórek iPSC

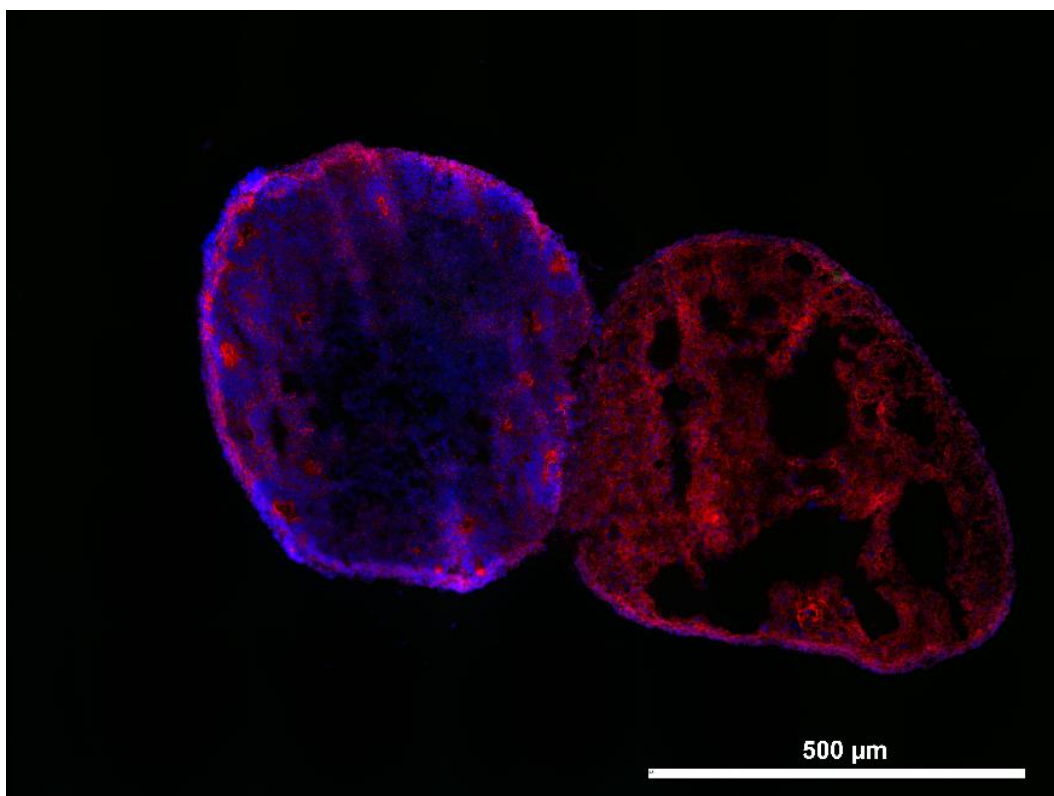
GBO – organoid glejakowy powstały z ludzkiej tkanki nowotworowej





**Rycina 23. Obrazowanie mikroskopowe komórek assembloidu HBO-GBO po 5 dniach kokultury.**

Na obu mikrografiach część HBO assembloidu umiejscowiona jest po lewej stronie.

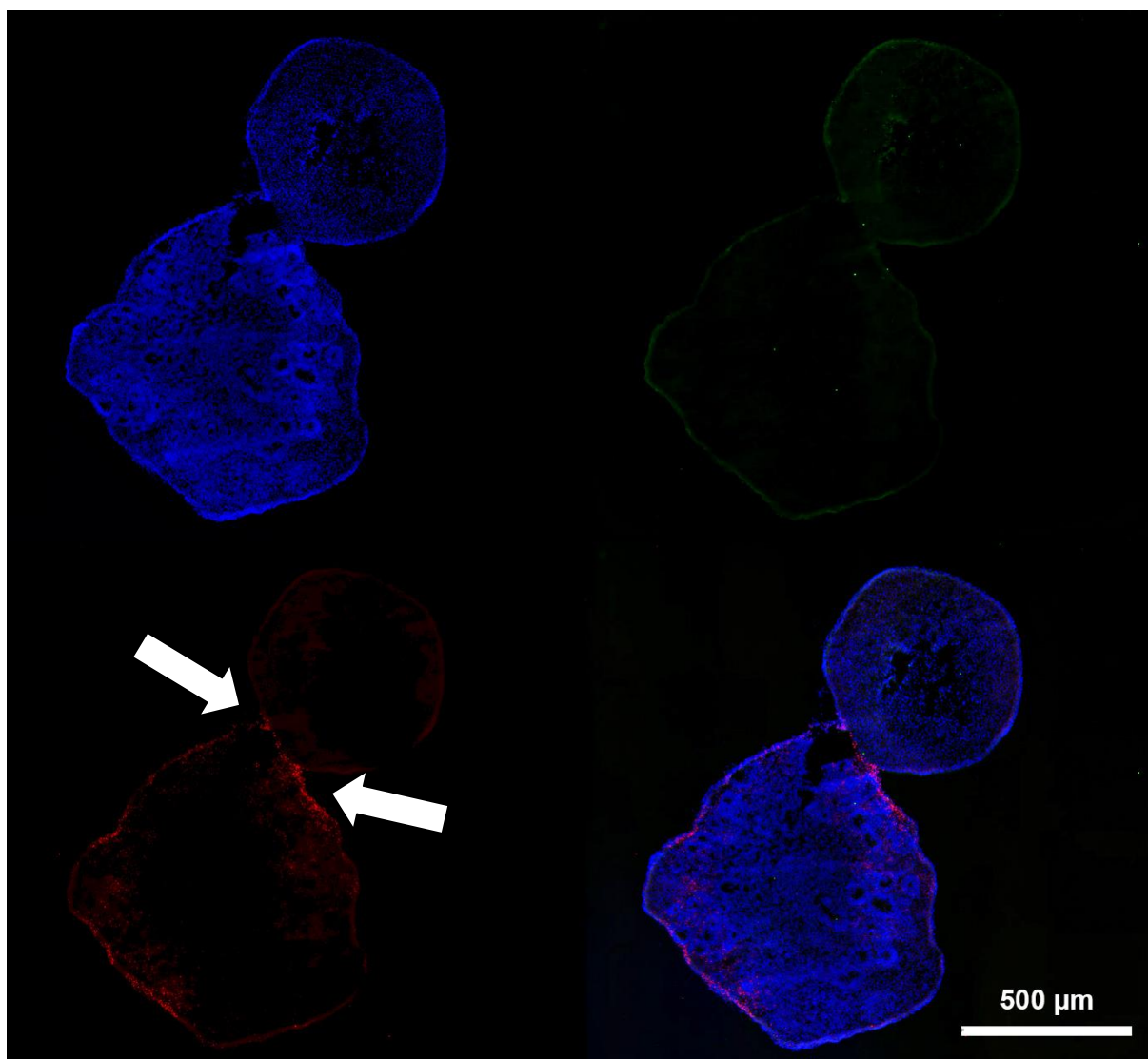


**Rycina 24. Fluorescencyjne obrazowanie cytoszkieletu oraz jąder komórkowych assembloidu złożonego z organoidu HBO (po lewej) oraz organoidu P051-GBO (po prawo). Na mikrografii przedstawiono wybrane przekroje z barwienia całego organoidu. Kolor czerwony – barwienie F-aktyny za pomocą koniugatu falloidyny z rodaminą. Kolor niebieski – jądra komórkowe barwione DAPI.**

W celu charakteryzacji struktury otrzymanych assembloidów wykonano barwienie cytoszkieletu komórek assembloidu (Ryc. 24) oraz barwienie immunofluorescencyjne białek TN-C oraz TBR1 (Ryc. 25). Wykonane barwienia pozwoliło na charakteryzację dwóch niezależnych części assembloidu pochodzących od wykorzystanych do hodowli organoidów.

Barwienie F-aktyny oraz jąder komórkowych (Ryc. 24) wskazuje na duże różnice w budowie wewnętrznej dwóch części organoidu. Część pochodząca od organoidu GBO posiada bardziej zorganizowaną strukturę F-aktyny i znacząco mniejszą ilość komórek. W części GBO organoidu można również zaobserwować puste przestrzenie mogące być centrami hipoksyjnymi organoidu.

Obrazowanie za pomocą immunofluorescencji (Ryc. 25) wykazało obecność białka TBR1 wyłącznie w komórkach części assembloidu pochodzącego od organoidu HBO. Obrazowanie wykazało również, że komórki organoidu HBO nie wnikają do części assembloidu pochodzącej z organoidu HBO (obszar zaznaczono białymi strzałkami). Niestety w assembloidzie użytym w badaniu nie zaobserwowano różnicowej ekspresji TN-C.



**Rycina 25.** Fluorescencyjne obrazowanie ekspresji białek TN-C, TBR1 oraz jąder komórkowych komórek glejaka hodowanych w kulturze organoidu (na dole) oraz organoidu zdrowego (na górze). Na mikrografii przedstawiono wybrane przekroje z barwienia całego organoidu.

Kolor czerwony – białko TBR1 charakteryzujące neurony; Kolor zielony – tenascyna C. Kolor niebieski – jądra komórkowe barwione DAPI.

## 4. Dyskusja

### 4.1 Wprowadzenie

Pomimo ogromnego postępu technologicznego i naukowego, od czasu wprowadzenia protokołu Stuppa, przeżywalność chorych cierpiących na glejaka nie zwiększa się znacząco, a większość potencjalnych nowoczesnych terapii nie przechodzi fazy testów klinicznych. Większość obecnych terapii polega przede wszystkim na obniżeniu tempa proliferacji komórek nowotworowych. W celu dywersyfikacji badań rozpoczęto więc poszukiwania innych mechanizmów, które mogą stać się molekularnym celem terapii przeciwko glejakowi. Ponieważ wzmożona inwazja jest powszechnie uznawana za jedną z najważniejszych cech charakterystycznych nowotworów jednym z najbardziej obiecujących kierunków badań w tym aspekcie jest charakterystyka mechanizmów inwazji komórek nowotworowych a w aspekcie klinicznym - poszukiwanie sposobów na jej hamowanie [5,359].

Komórki glejaka migrują w sposób, który jest bardzo uporządkowany i nosi znamiona zewnętrznej koordynacji [360]. Początkowo adherentne komórki nowotworowe przylegają do komórek mózgu i ich macierzy zewnątrzkomórkowej. W stanie fizjologicznym adhezja komórkowa jest regulowana przez białka takie jak integryny i kadheryny [48]. Podczas inwazji macierz jest modyfikowana poprzez wydzielane przez komórki glejaka enzymy trawiące białka takie jak metaloproteinazy. Pozwala to komórkom nowotworowym na zerwanie połączenia z ECM i rozpoczęcie inwazji na przylegającą tkankę [361]. Białka rozkładające macierz zewnątrzkomórkową są produkowane również przez komórki mikrogleju oraz astrocyty zwerbrowane przez komórki glejaka [362]. Proces ten jest możliwy dzięki zdolnościom komórek nowotworowym do wytwarzania nowych mikrotubul zapewniających bezpośredni kontakt z rekrutowanymi komórkami [363]. Niezależnie od zmian zachodzących w ECM, dochodzi do przebudowania błony komórkowej oraz cytoszkieletu komórek nowotworowych, co pozwala zwiększyć mobilność komórek glejaka [364,365]. Wiele dostępnych danych wskazuje, że proces inwazji nowotworowej nie jest regulowany jedynie przez pojedyncze czynniki możliwe do zbadania na poziomie ekspresji genów, a raczej zależy od wzajemnego oddziaływania wielu czynników. Za szczególnie istotne można uznać: skład macierzy zewnątrzkomórkowej [366], jej sztywność [367], obecność naczyń krwionośnych [368], miejscowe występowanie hipoksji [369] czy mechaniczna stymulacja komórek nowotworowych [370].

Znaczny stopień skomplikowania oddziaływań, które zachodzą zarówno w samych komórkach, jak i w ich otoczeniu podczas procesu inwazji sprawia, że badanie tego aspektu biologii glejaka jest trudnym procesem wymagającym podejść interdyscyplinarnych. Pierwsza część prac przedstawiona w tej rozprawie miała na celu poznanie mechanizmów regulacji właściwości biomechanicznych komórek, a co za tym idzie, procesów adhezji i modulacji ECM przez regulatorowe RNA, w tym miR-218-5p. Do badań, poza standardowymi technikami biologii molekularnej, wykorzystano nowoczesne metody biofizyczne pozwalające na dokładne określenie zmian adhezji oraz sztywności komórek glejaka poddanych wpływowi miR-218-5p. Wykazaliśmy, że zwiększony potencjał migracyjny komórek glejaka, obniżona zdolność przylegania komórek do podłoża oraz niższa sztywność komórek korelują z niskim poziomem ekspresji miR-218-5p przy jednocześnie wysokim poziomie białek macierzy - tenascyny-C i syndekanu-2. Przeprowadzone prace potwierdziły, że miR-218 wpływa bezpośrednio na wybrane białka ECM, jak również bezpośrednio i pośrednio - na wiele innych genów związanych z procesami migracji, w tym tych związanych z przebudową cytoszkieletu.

Druga część pracy dotyczyła określenia cytotoksyczności nanomateriałów, które mogłyby być potencjalnie wykorzystane jako nośniki w terapii hamującej inwazję glejaka. Specyfika glejaka jako nowotworu występującego w obszarze centralnego układu nerwowego wymusza opracowanie nowych metod dostarczania terapeutyków do komórek nowotworowych z zachowaniem maksymalnego bezpieczeństwa dla zdrowych komórek mózgu. Zastosowane w analizach nanocząstki mogą przenosić stosowane wcześniej w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej IChB PAN terapeutyczne dsRNA stosowane w celu obniżenia ekspresji białka tenascyny-C [202,273]. Szczególna uwaga została położona na określenie toksyczności użytych nanomateriałów przez generowanie reaktywnych form tlenu, które generowane w nadmiarze mogą stanowić zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek mózgu [371].

#### Badanie migracji i inwazji komórek nowotworowych

Trzeci cel pracy związany jest z ustanowieniem nowego modelu badawczego trójwymiarowej hodowli komórek glejaka. Model proponowany w naszych badaniach charakteryzuje się obecnością trójwymiarowej struktury przestrzennej oraz wykorzystaniem komórek pobranych z naturalnie występującego nowotworu, przez co może być lepiej dopasowany do badań związanych z inwazją glejaka.

## **4.2 Regulacja właściwości fizycznych komórek przez czynniki wewnątrzkomórkowe**

Złośliwość glejaka opiera się na jego wysokiej inwazyjności i zdolności do naciekania na sąsiadujące tkanki [372]. Zmiany w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej i deregulacja mikroRNA są mechanizmami dobrze poznanymi w rozwoju i progresji tego nowotworu [373,374]. Regulacja ekspresji białek macierzy przez czynniki działające na poziomie transkrypcji, takie jak m.in., miRNA dotychczas pozostaje jednak ciągle słabo poznana. Nasze prace wykazały, że miR-218-5p obniża poziom białek macierzy zewnątrzkomórkowej – tenascyny-C i syndekanu-2 w komórkach glejaka [35]. W celu pogłębienia analizy o inne białka związane z macierzą zewnątrzkomórkową, adhezją oraz ruchliwością komórek wykonano szeroko zakrojone badanie ekspresji genów zależnych od miR-218-5p. Wykonana analiza nie tylko potwierdziła obniżenie poziomu TN-C w komórkach o zwiększonej ekspresji miR-218-5p, ale również pozwoliła wyodrębnić grupę 47 transkryptów, których ekspresja uległa znaczącej zmianie.

Ekspresja miRNA-218-5p w glejaku jest znacząco obniżona w porównaniu z tkankami zdrowego mózgu [375,376]. Wpływ miR-218-5p na komórki glejaka przez inhibicję różnych celów molekularnych nadal nie został w pełni wyjaśniony i wciąż prowadzone są szeroko zakrojone badania nad jego rolą. Wysoki poziom miR-218-5p może prowadzić do molekularnej inhibicji złośliwego fenotypu komórek glejaka przez wpływ na oś TN-C/AKT/AP-1/TGFβ1 zmniejszając proliferację komórek nowotworu, obniżając inwazyjność i migrację komórek [36]. Jednocześnie miR-218-5p wpływa na poziom ekspresji innych ważnych transkryptów związanych z macierzą zewnątrzkomórkową takich jak syndekan-2 czy metaloproteinaza-9 [35,376].

Nasze badania wskazują, że miR-218-5p bezpośrednio i pośrednio, również poprzez białka ECM, wpływa na poziom ekspresji wielu genów odpowiedzialnych za fizyczne cechy komórki, takie jak jej zdolności do przemieszczania się oraz na otoczenie komórkowe modyfikując skład macierzy zewnątrzkomórkowej.

Dane literaturowe pokazują, że właściwości modulujące macierz zewnątrzkomórkową mogą mieć także cyrkularne RNA (cricRNA). Te regulatorowe RNA mogą aktywnie wpływać na skład macierzy poprzez wychwyt miRNA odpowiedzialnych za regulację ekspresji elementów składowych ECM. Wykazano, że obecność cricRNA\_010383 w tubularnych komórkach nabłonkowych nerki prowadzi do inhibicji syntezy białek macierzy takich jak E-kadheryna czy

TRPC1 poprzez blokowanie działania miR-135a i dezaktywacja jego funkcji. Obniżenie poziomu ekspresji circRNA\_0103 prowadzi do akumulacji białek ECM takich jak fibronektyny czy kolagen I [377]. W przypadku miR-218-5p nie przeprowadzono jeszcze podobnych badań, jednak znany jest co najmniej jeden circRNA oraz jeden długi niekodujący RNA (lncRNA) mogący potencjalnie wiązać miR-218-5p. Literatura wskazuje, że oś hsa\_circ\_0023305/miR-218-5p/TRPM7 może regulować rozwój raka płaskonabłonkowego krtani, lecz nie zostały przeprowadzone żadne analizy dotyczące zmian w ECM komórek [378]. Innym przykładem niekodującego RNA będącego modulatorem składu macierzy zewnątrzkomórkowej jest miRNA-140, który obniża poziom ekspresji metaloproteinazy 13 (MMP-13) i jednocześnie zwiększa ekspresję kolagenu II w mysich chondrocytach [37]. Podobny mechanizm modulacji składu ECM obserwowano w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów. Obecne tam działanie osi efektorowej circ\_0000423/miRNA-27b-3p/MMP-13 prowadzi do modulacji ekspresji MMP13. Efektem działania tego białka jest chorobowa degradacja macierzy [379].

Szerokie spektrum działania cząsteczek RNA i ograniczona możliwość przewidzenia skutków jego stosowania w komórkach ludzkich sprawia, że efektywnymi molekularnymi celami potencjalnych terapii mogą stać się białka będące efektorami w osiach, w których miRNA jest kluczowym transduktorem sygnału. W przypadku miR-218-5p takim celem mogłaby być tenascyna-C, której funkcje związane są z procesami inwazji komórek glejaka.

Dotychczasowe badania fizycznej charakterystyki komórek glejaka można podzielić na analizy właściwości komórek nowotworowych, właściwości środowiska je otaczającego oraz jego wpływu na nowotwór [380]. Nowoczesne metaanalizy dużych zbiorów danych dotyczących ekspresji genów w nowotworach pozwalają na wstępną ocenę, które z genów mogą mieć szczególne znaczenie w regulacji mikrośrodowiska guza oraz składu ilościowego i jakościowego ECM [381]. Niestety zmiany poziomu ekspresji genów mogą nie przekładać się bezpośrednio na zmiany fizyczne komórek ze względu na bardzo skomplikowany mechanizm regulacji macierzy zewnątrzkomórkowej zależny zarówno od ekspresji genów białek budujących ECM jak i ekspresji metaloproteinaz rozkładających składniki ECM [29]. W związku z tym fenomenem właściwości fizyczne komórek takie jak sztywność czy adhezja komórkowa powinny być badane za pomocą metod zapożyczonych z fizyki materiałowej. Jednym z najciekawszych przykładów użycia tego typu rozwiązań jest badanie sztywności komórek za pomocą spektroskopii sił pojedynczej komórki [382].

Wynik analizy zmian adhezji przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wskazują na znaczące podniesienie zdolności przylegania komórek do podłoża w obecności miR-218-5p. Obserwowane zmiany w adhezji komórek, poza wykazanym bezpośrednim wpływem na poziom ekspresji białek macierzy, mogą być związane także z obserwowanym przez nas obniżeniem ekspresji genu  $\alpha$ -aktyniny. Dane literaturowe wskazują również, że obniżenie ekspresji niektórych izoform tego genu może skutkować zwiększoną zdolnością adhezyjną komórek glejaka [383].

Równie istotną co adhezja cechą fizyczną komórek nowotworowych jest ich sztywność. Badania z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych dowiodły, że komórki raka pęcherza sztywnieją wraz ze ułożliwieniem nowotworu. Badania te wykazały również, że właściwości sztywności komórek mogą nie być ściśle powiązane ze zmianami cytoszkieletu komórki, a wynikają z innych, niepoznanych jeszcze czynników [384]. W przypadku glejaka większość dostępnych badań skupiała się dotychczas na wpływie sztywności otoczenia komórek na ich rozwój oraz potencjał inwazyjny [385,386]. Prezentowane w tej pracy wyniki wskazują na zmiany sztywności pojedynczych komórek nowotworowych glejaka w obecności miR-218-5p, co po raz pierwszy zostało udokumentowane z użyciem metody SCFS.

Komórki wykorzystane do pomiaru taktowano identycznie jak komórki w analizie adhezji. Sztywność komórek suplementowanych miR-218-5p wzrosła o 30% w stosunku do komórek kontrolnych dla obu testowanych stężeń podanego miRNA.

W warunkach fizjologicznych sztywność komórkowa zwiększa się wraz z dojrzewaniem i formowaniem się cytoszkieletu aktynowego [387,388]. Tkanka mózgu otaczająca glejaka jest jedną z najbardziej miękkich tkanek w ludzkim ciele [389], a jej sztywnienie jest powiązane z procesami nowotworzenia [390]. Sztywność komórek jest ściśle powiązana z ich mobilnością. Za to zjawisko odpowiedzialna jest jądrowa laminina A/C, która jest łącznikiem regulacji tych dwóch ścieżek sygnałowych [391]. Komórki wykazujące dużą sztywność wynikającą z organizacji cytoszkieletu posiadają mniejszy potencjał inwazyjny [392]. Jest to podstawa hipotezy „go or grow”, która zakłada dwie możliwości rozwoju nowotworu – przez proliferację, bądź migrację [393]. W przypadku usztywnienia struktury komórki i zwiększenia adhezji komórek szanse na inwazję maleją co może zapobiegać rozprzestrzenianiu się nowotworu.

Cytoszkielet aktynowy i zmiany w jego obrębie są więc niezwykle ważnym elementem regulowanym przez glejaka w celu utrzymania komórek w stanie aktywnego potencjału inwazyjnego [394]. Zmiany obserwowane w przypadku suplementacji komórek glejaka



miRNA-218-5p są zbieżne ze zwiększającą się adhezją i sztywnością komórek uzyskane w poprzednich eksperymentach. Usztywnianie cytoszkieletu jest widoczne w postaci widocznych, wzdłużnych do dłuższej osi komórki włókien aktyny. Innym zauważalnym elementem cytoszkieletu aktynowego, który uległ zmianie pod wpływem miR-218 jest większe zagęszczenie F-aktyny na obrzeżach komórki. Fakt taki może sugerować pojawienie się płytek adhezyjnych, a to z kolei wpływać na tworzenie lokalnych miejsc kontaktu komórki z podłożem. Obserwowane zmiany w strukturze cytoszkieletu aktynowego mogą wynikać również z, obserwowanego przez nas w analizie wielogenowej, obniżonego poziomu ekspresji genu *HGF*. Dostępne dane literaturowe wskazują, że wysoka ekspresja tego genu wpływa na kształtowanie włókien aktynowych w liniach komórkowych glejaka [395].

### **4.3 Bezpieczeństwo nanomateriałów**

Nanocząstki będące obiektami o wymiarach mieszczących się w zakresie od  $1 \times 10^{-9}$  do  $5 \times 10^{-7}$  metra są stosunkowo dużymi strukturami wykraczającymi poza rozmiary klasycznych cząsteczek terapeutycznych stosowanych w obecnej medycynie [206]. Pomimo wielu zalet wynikających z potencjalnego użycia nanocząstek jako nośników leków oraz cząstek o samodzielnym działaniu terapeutycznym, kluczowe jest określenie ich bezpieczeństwa zarówno dla komórek ludzkich jak i dla środowiska [396]. W ramach przygotowania tej pracy doktorskiej moja badania skupiły się na zbadaniu bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów polimerowych oraz hybrydowych w różnych typach komórek ludzkich.

#### **4.3.1 Stres oksydacyjny**

Jednym z rodzajów stresu potencjalnie generowanego przez nanocząstki jest stres wynikający z uwolnienia się w komórce bądź jej otoczeniu reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS). Do grupy najważniejszych przedstawicieli tego typu związków zaliczamy tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oraz rodniki – anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) oraz rodnik hydroksylowy ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) [397]. W każdej żywej komórce można zaobserwować pewien fizjologiczny poziom aktywnych form tlenu, gdyż są one cyklicznie generowane przez mitochondria podczas reakcji zachodzących w łańcuchu oddechowym [398]. Poziom ROS jest ściśle regulowany przez aktywność enzymów takich jak dysmutaza, katalaza i peroksydaza glutationowa [399,400]. Wysokie poziomy stresu oksydacyjnego biorą udział w patogenezie chorób autoimmunologicznych (reumatoidalne zapalenie stawów, nieswoiste zapalenie jelit [401], chorób układu oddechowego (astma, mukowiscydoza, przewlekła obturacyjna choroba płuc) [402] oraz chorób

neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona) [403]. Na poziomie molekularnym podwyższony poziom reaktywnych form tlenu powoduje oksydacyjne uszkodzenia DNA [404], białek [405] oraz lipidów [406,407]. Wysoki poziom ROS jest też ważnym aktywatorem mechanizmów śmierci komórkowej [408]. ROS historycznie były traktowane jako główny mechanizm starzenia się komórek ludzkich [409]. Obecnie teoria ta jest szeroko podważana i nie stanowi już głównej podstawy do wyjaśniania teorii związanej ze starzeniem komórkowym [410,411].

Wyżej opisane właściwości reaktywnych form tlenu związane z uszkodzaniem komórek na wielu poziomach sprawiły, że mechanizmy miejscowego generowania tych czynników oksydacyjnych zostały wykorzystane w terapiach przeciwnowotworowych [412]. Wysoki poziom reaktywnych form tlenu w komórce uwrażliwia je na promieniowanie jonizujące poprzez zwiększanie ilości uszkodzeń radiacyjnych kwasów nukleinowych i wysycenie komórkowych mechanizmów naprawy DNA. Komórki, które nie są w stanie sprostać nadmierowej ilości tego typu uszkodzeń stają się komórkami apoptotycznymi [413].

Nowoczesne podejścia do radioterapii zakładają wykorzystanie radioczulaczy – związków chemicznych stosowanych przed naświetlaniem z pomocą promieniowania jonizującego, które mają za zadanie uczulić komórki na uszkodzenia spowodowane przez radioterapię [156]. Niektóre nanocząstki mogą działać jako selektywny radioczulacz generujący reaktywne formy tlenu pod wpływem promieniowania. Takie nanomateriały nie powinny generować ROS przez cały czas po podaniu do organizmu a tylko pod wpływem promieniowania. Dzięki temu tylko nanocząstki w miejscu napromieniowanym wykazują swoje działanie wspierające apoptozę [412]. Do produkcji tego typu nanomateriałów używane są zwykle pierwiastki o wysokiej liczbie atomowej, gdyż ich właściwości pochłaniania promieniowania oraz oddawania do układu wolnych elektronów są wysokie. Nanomateriałami tego typu są nanocząstki złota [414], selenku bizmutu [415,416], tlenku tantalu [417,418] czy metalo-organiczne materiały porowate (MOF) zawierające jony hafnu [419,420]. Promieniowanie X zostaje pochłonięte przez atomy metalu budujące nanocząstki w których następuje efekt fotoelektryczny pozwalający na uwolnienie się elektronów do otoczenia nanomateriału. Dodatkowo, w tym układzie produkowane są również elektrony Augera oraz elektrony wzbudzone przez zjawisko Comptona. Wszystkie uwolnione z powierzchni nanocząstek elektrony następnie oddziałują z obecnym w organizmie H<sub>2</sub>O generując reaktywne formy tlenu [421].

Niezależną od promieniowania jonizującego formą terapii przeciwnowotworowej z użyciem reaktywnych form tlenu jest terapia fotodynamiczna (PDT). Cytotoksyczność pod wpływem

światła została odkryta już w roku 1900 [422], ale jej pierwsze wykorzystanie w kontrolowanych badaniach i opisanie jako terapii fotodynamicznej przypada na rok 1978 [423]. Najbardziej popularne związki stosowane w PDT są wrażliwe na światło w zakresie UV-światło widzialne (długość fali 400-700 nm), które nie wykazuje dużej przenikalności przez tkanki zwierzęce [424]. Nowoczesne nanocząstki, które mogą być stosowane w PDT są wrażliwe na fale światła z zakresu bliskiej podczerwieni, wykazujące zdolność do głębokiej penetracji tkanek zwierzęcych (zakresy 700-950 nm, 1000-1350 nm oraz 1550-1870 nm) [425]. Literatura wyróżnia trzy generacje czynników używanych w terapii fotodynamicznej. Pierwsza opierała się na pochodnych porfiryn, druga na związkach pochodzących od chloryn a trzecia, aktualnie badana, wykorzystuje właściwości nanocząstek do generowania ROS [426]. Pierwsze nanocząstki zastosowane w tym podejściu zostały wykonane z tlenku tytanu i zostały wykorzystane do aktywacji apoptozy w komórkach glejaka [428]. Współcześnie nanocząstki generujące aktywne formy tlenu pod wpływem fal świetlnych mogą być wykonane z wielu materiałów takich jak: grafen [204], krzem [427], fosfokrzemian wapnia [428] czy różne polimery organiczne [429].

Wysoki poziom reaktywnych form tlenu, choć pożądanym w terapii PDT, jest szczególnie niebezpieczny dla zdrowych komórek występujących w obrębie mózgu. Dane literaturowe wskazują na wpływ wysokiego poziomu ROS na przyspieszone starzenie się komórek mózgu oraz aktywację patologicznych mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych [403,430,431]. W związku z tymi doniesieniami kluczowe jest określenie czy nanocząstki mające mieć zastosowanie w terapii nowotworów mózgu są bezpieczne pod względem samoistnego generowania ROS. Przeprowadzona w ramach prac przedstawionych w tej pracy analiza aktywności reaktywnych form tlenu w komórkach wpisuje się w to założenie.

Stres oksydacyjny jest jednym z kluczowych mechanizmów nanotoksyczności nowoczesnych materiałów. Zagrożeniem, które wynika z generowania stresu oksydacyjnego przez nanocząstki jest zwiększenie ilości ROS ponad poziom fizjologiczny. Obecność w układzie nanomateriałów zaburza homeostazę powstawania i rozkładania wolnych form tlenu co prowadzi do dalszych uszkodzeń takich jak zaburzenie balansu redoks komórki, utlenianie lipidów, białek i DNA [432].

Mechanizm wywoływania tego typu stresu nie jest jednorodny i można wyróżnić dwa znaczące mechanizmy mające wpływ na jego indukcję [432]. Pierwszym z nich jest bezpośrednie generowanie stresu oksydacyjnego przez nanocząstki wprowadzane do układu. Ten typ stresu jest szczególnie powszechny w zastosowaniu nieopłaszczonych nanocząstek metalicznych

bądź opłaszczonych nanomateriałów metalicznych po zniszczeniu otoczki ochronnej przez enzymy komórkowe. Stres wywoływany przez takie nanomateriały jest porównywalny do stresu generowanego przez podanie metali w innej formie niż nanocząstki [433]. Możliwe jest również uwalnianie się jonów metali z nanocząstek opartych o tlenki metali. Przykładem takiego przebiegu reakcji są nanocząstki ZnO, które po wprowadzeniu do mysich makrofagów uwalniały jony  $Zn^{2+}$  i tym samym zwiększały poziom wewnątrzkomórkowych ROS. W wyniku działania drugiego mechanizmu toksyczności oksydacyjnej nanocząstek, dochodzi do nadmiarowego generowania wolnych form tlenu w łańcuchu transportowym mitochondriów pod wpływem uwolnionych nanocząstek [398].

W celu minimalizacji możliwości wystąpienia stresu oksydacyjnego generowanego przez nanomateriały może być synteza nanocząstek o rdzeniu składającym się z metali bądź ich tlenków, pokrytych polimerową otoczką. Taką budową charakteryzują się używane w ramach pracy doktorskiej nanocząstki Mag@PEI. Obecność otoczki polietylenoiminowej może być czynnikiem blokującym uwalnianie się jonów żelaza z magnetytowego rdzenia. Tym samym stres oksydacyjny nie występuje, bądź występuje w małym stopniu przy użyciu omawianego nanomateriału. Wyniki badań nad strukturami węglowymi wskazują również, że nanocząstki żelaza zamknięte w wielościennych nanorurkach węglowych nie są w stanie wygenerować mierzalnej ilości ROS [434]. Niestety same nanorurki węglowe mogą powodować generowanie wolnych form tlenu, zwłaszcza jeśli nie zostały poddane rygorystycznemu procesowi oczyszczania z zanieczyszczeń powstających podczas ich syntezy [435].

Głównym mechanizmem uszkodzeń kwasów nukleinowych generowanym przez obecność nanomateriałów są uszkodzenia oksydacyjne generowane przez podwyższony poziom ROS [404]. Wykazano jednak, że niektóre rodzaje nanocząstek mogą powodować niezależne od ROS pęknięcia obu nici DNA. Takie uszkodzenia mogą powodować nanocząstki wykonane między innymi ze złota [436], tlenku grafenu [437] czy tlenku krzemu [438]. Uszkodzenia DNA występują również przy stosowaniu nanocząstek opartych o tlenki żelaza, jednak nie można w tym przypadku stwierdzić czy uszkodzenia powstały na skutek zwiększenia poziomu ROS czy bezpośredniego wpływu na DNA [439,440].

Wykorzystane w pracy doktorskiej nanocząstki tlenku żelaza opłaszczone polietylenoiminą, zgodnie z dostępną wiedzą literaturową powinny wykazywać niską cytotoksyczność. Fakt ten przypisuje się również osłonowej funkcji PEI na magnetytowy rdzeń. Wynik naszych badań są zatem zgodne z danymi literaturowymi, a użyte nanocząstki Mag@PEI nie wykazują wpływu na znaczący wzrost ilości dwuniciowych uszkodzeń DNA w badanych liniach komórkowych.

Jednymi z najczęstszych zaburzeń komórkowych generowanych przez nanocząstki dostające się do wnętrza komórki są także zmiany w potencjale błony mitochondrialnej [441,442]. W większości przypadków uszkodzenia mitochondriów są bezpośrednio związane z działającymi mechanizmami stresu oksydacyjnego [443-445]. Jednym z następstw oksydacyjnej degradacji mitochondriów może być ich całkowity rozpad, co wykazano wcześniej dla nanomateriałów zawierających tlenku kobaltu. Badania potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem nanocząstek magnetytu opłaszczonego polietylenoiminą nie zmieniają drastycznie potencjału błony mitochondrialnej. Obserwacja ta wydaje się być zgodna z wcześniejszą analizą poziomu powstawania reaktywnych form tlenu, która nie wykazała znaczącego podniesienia ilości wolnych rodników.

#### **4.3.2 Wielkość nanomateriałów a ich toksyczność**

Wielkość, obok kształtu i sztywności, jest jedną z kluczowych właściwości fizycznych nanomateriałów [446]. Dostępne w nielicznych publikacjach dane wykazują, że rozmiar nanomateriałów ma szczególny wpływ na żywotność komórek ludzkich, oraz zdolności komórek do wchłaniania się danego nanomateriału [447].

Szeroko zakrojone badania przeprowadzone na muszkach owocówkach wykazały istotne zmiany toksyczności nanocząstek srebra w zależności od ich rozmiaru. Larwy muszek traktowano nanocząstkami o rozmiarach poniżej i powyżej 100nm średnicy. Materiały o mniejszej średnicy wykazały niższą toksyczność w komórkach owadziech [450]. Inną właściwością zmieniającą się wraz z rozmiarem nanomateriałów jest ich zdolność do wnikania do wnętrza komórek. W zależności od przeznaczenia badanych nanocząstek pożądanym rezultatem może być zarówno wnikięcie do komórki, pozostanie w przestrzeni pozakomórkowej bądź naczyniach krwionośnych (np. nanocząstki służące do obrazowania za pomocą MRI). Efekt wnikania do wnętrza komórek jest szczególnie cenny w przypadku nanomateriałów pełniących funkcję nośników, np. narzędzi terapii genowej, takich jak siRNA, których działanie polega na ograniczeniu poziomu ekspresji docelowego mRNA. Jak najbardziej efektywne dostarczenie siRNA do komórki skutkuje znaczącym obniżeniem ekspresji mRNA, a co za tym idzie wpływa na drastyczne obniżenie ilości patologicznego białka. Takie podejście wykorzystano dla zastosowania Mag@PEI jako nośnika siRNA ograniczającego ilość tenascyny-C w komórkach glejaka [273]. Dane literaturowe wskazują na tendencję mniejszych nanocząstek (<100nm) do lepszej penetracji większości typów komórek. Znaczna część opisanych w literaturze nanomateriałów po dożylnym podaniu zostaje wychwycona i immobilizowana przez komórki fagocytujące układu odpornościowego.

Zdarzeniom takim można jednak zapobiegać opłaszczając komórki glikolem polietylenowym bądź manipulując ich wielkością. Dane literaturowe pokazują, że nanocząstki polimerowe wykonane z polistyrenu o wielkości poniżej 200nm mogą nie być jednak rozpoznane przez system retikularno-endotelialny komórek Caco-2, co potencjalnie wydłuża czas ich półtrwania w układzie krwionośnym człowieka [448]. Chociaż literatura wskazuje, że w przypadku nanomateriałów metalicznych za optymalną wielkość pozwalającą na dostanie się do wnętrza komórki uznaje się przedział 40-50nm [449-451] w przypadku naszych badań to nanocząstki o wielkości 100nm wykazały największą zdolność penetracji komórek ludzkich [448]. Badania przeprowadzone na ludzkich komórkach HeLa z wykorzystaniem nanocząstek krzemowych wskazują na brak cytotoksyczności tych nanomateriałów w teście MTT dla nanocząstek o wielkościach 55.6 nm, 167.8 nm oraz 307 nm. Jednocześnie, w tej samej publikacji autorzy wykazują, że występuje zależność między rozmiarem nanomateriału a efektywnością ich wnikania do komórek. Niestety nie przebadano stanu cytotoksyczności zależnej od stanu błony komórkowej [452]. Wielkość zastosowanych nanomateriałów może również modulować ich działanie bakteriostatyczne i antybakteryjne. Efekt ten jest spowodowany rozdrobnieniem materiału antybakteryjnego na mniejsze nanocząstki, co znacząco zwiększa jego zewnętrzną powierzchnię, która wchodzi w kontakt z mikroorganizmami i wywołuje toksyczny efekt [453]. W przypadku nanocząstek wykonanych z minerałów - kłacytu, antymonitu oraz skalenia zmniejszanie się średnicy użytych cząstek potęgowało właściwości antybakteryjne tych materiałów [454].

W niniejszej pracy wykazano wpływ nanomateriałów wykonanych z polidopaminy o wielkościach 100, 140 oraz 240 nm na żywotność komórek ludzkich. Analogicznie jak w przypadku powyżej opisywanego badania nie zaobserwowano zwiększenia się cytotoksyczności w teście aktywności metabolicznej komórek. Jednakże w naszym badaniu analiza została pogłębiona o przetestowanie cytotoksyczności zależnej od stanu błony komórkowej. W tym podejściu wykazano, że nanocząstki o wielkości 100 nm są znacznie bezpieczniejsze niż nanocząstki o wielkościach 140nm oraz 240nm. Otrzymane w obu testach wyniki wskazują, że najbezpieczniejsze dla wszystkich typów komórek są nanocząstki PDA o wielkości 100 nm stosowane do stężenia końcowego 5µg/uL pożywki hodowlanej.

Badanie wpływu rozmiaru nanocząstek na stan komórki może być kluczowe w przypadku prób dostarczania ich do centralnego układu nerwowego. Ludzki mózg chroniony jest przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier, BBB*), która jest złożoną strukturą blokującą dostęp do mózgu większości substancji znajdujących się we krwi obwodowej [455]. Badania

przeprowadzone z wykorzystaniem nanocząstek złota o rozmiarach 3,15 oraz 120 nm wykazały, że w wypadku czasowego rozszczelnienia bariery krew-mózg za pomocą ultradźwięków, nanocząstki 15 nm najlepiej przenikają przez wytworzone pory w mysiej BBB [456]. Tego typu podejście, rozluźniające czasowo ściśle połączenia między komórkami BBB zakłada użycie niemodyfikowanych nanocząstek i pasywny transport nanomateriałów przez przestrzeń zewnątrzkomórkową. Innym podejściem jest wykorzystanie modyfikowanych nanocząstek do aktywnego transportowania ich do mózgu za pomocą komórek tworzących barierę. Przy zastosowaniu większych nanocząstek kluczowe do penetracji BBB przez nanocząstki może być zastosowanie odpowiednich modyfikacji na ich powierzchni. W badaniu na nanomateriałach o rozmiarach 67-464 nm opłaszczonych niejonowymi surfaktantami wykazano, że zastosowanie tej klasy związków jako pokrycia nanomateriałów pozwala na przekraczanie BBB niezależnie od rozmiaru stosowanego materiału [457]. Zbudowane z tego typu surfaktantów struktury o wielkościach 200-390 nm są w stanie przenieść 10% całkowitego ładunku przez BBB [458].

Inną właściwością zmienną wraz z rozmiarem nanomateriałów jest mechanizm ich wnikania do wnętrza komórek. Nie przeprowadzające aktywnej fagocytozy komórki ludzkie mogą internalizować za pomocą różnych szlaków dostarczania dokomórkowej cząstki mniejsze niż 1µm takie jak patogeny, liposomy czy nanocząstki [459]. Badania przeprowadzone na linii ludzkich nefagocytujących komórek B16 wykazują, że cząstki o wielkości do 200 nm są internalizowane przy pomocy endocytozy zależnej od klatryny, podczas gdy cząstki większe niż 200nm ale mniejsze niż 1µm wnikają do komórek w procesie endocytozy kawolarniej. Zaobserwowano również, że małe nanocząstki (do 100 nm) są internalizowane znacząco szybciej niż ich większe odpowiedniki a czas internalizacji rośnie wraz ze wzrostem wielkości badanych cząstek [459].

Pomimo wielu badań, rola wielkości nanomateriałów w ich terapeutycznym zastosowaniu jest nadal niedostatecznie przebadana i konieczne jest większe zaangażowanie społeczności naukowej w celu określenia idealnego rozmiaru nanocząstek do specyficznych zastosowań. Szczególnie ważnym rodzajem stresu wywołwanego przez nanomateriały jest stres oksydacyjny, który może działać destrukcyjnie na wiele elementów komórkowych i rozpoczynać kaskadę dalszych uszkodzeń komórki, ostatecznie prowadząc do apoptozy.

## 4.4 Nowe modele w badaniu inwazji glejaka

Organoidy pochodzące z komórek glejaka w ostatnich latach stają się jednymi z najbardziej interesujących modeli badawczych tego nowotworu. Pierwszy model tego typu powstał na przełomie 2018 i 2019 roku i zakładał użycie komórek guza pochodzących od pacjenta w połączeniu z ustanowioną wcześniej kulturą organoidów mózgowych pochodzących z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych. Tego typu model może służyć do badania inwazji pojedynczych komórek glejaka na strukturę przypominającą ludzki mózg, niestety nie modeluje on złożonego środowiska, które komórki nowotworowe tworzą w miejscu powstawania guza [460]. Model oparty na tej samej metodzie generowania organoidów glejaka wykorzystano w 2020 roku do obserwacji mechanizmów inwazji komórek nowotworowych za pomocą metod transkryptomiki przestrzennej. Badania z wykorzystaniem tej technologii pozwoliły na identyfikację pewnej populacji komórek przeprowadzających inwazję bardziej efektywnie niż inne komórki glejaka. Wskazuje to na wysoki stopień heterogenności komórek nowotworowych tego guza. Również ten model zakładał podanie komórek glejaka w formie zawiesiny pojedynczokomórkowej co wyeliminowało z przeprowadzanego eksperymentu wpływ oddziaływań między komórkami guza [461].

Interakcje między komórkami nowotworowymi oraz komórkami zdrowymi są bardzo istotne w procesie rozwoju i inwazji glejaka [462]. Zastosowana przez nas procedura oparta na protokole opublikowanym przez Jacoba i innych w 2020 roku zakłada użycie do generowania organoidów tkanki nowotworowej, która nie została wcześniej rozbita do formy zawiesiny pojedynczych komórek [349]. Tego typu hodowla pozwala części komórek nowotworowych na pozostanie w naturalnym kontakcie co może przyspieszać generowanie struktury organoidu oraz promować dalsze oddziaływania międzykomórkowe. Wygenerowane przez nas organoidy wykazywały się dużą gęstością komórek, co może wskazywać na silne połączenia między komórkami nowotworu. Jednocześnie wysoka gęstość uzyskanego organoidu znacząco ograniczyła możliwości penetracji tej struktury przez barwniki używane przez nas do oznaczenia struktur komórkowych pomimo wykorzystania procedur utrwalania i permabilizacji błon komórek organoidów.

Jedną z największych przeszkód stojących przed modelami organoidowymi jest ich długi wzrost oraz wymagające warunki hodowli. W celu wykorzystania tego modelu w badaniach wymagających wysokiej przepustowości – np. testowania nowych niskocząsteczkowych leków przeciwnowotworowych muszą zostać opracowane nowe modele pozwalające na



automatyzację procesu hodowli oraz zmniejszenie jej kosztów. Proponowanym w literaturze rozwiązaniem tego problemu mogą być hodowle organoidów wykonane z użyciem druku 3d. Technologia ta opiera się na zawieszeniu komórek glejaka w medium imitującym macierz zewnątrzkomórkową a następnie uformowanie kropeł tej zawiesiny zawierającej komórki nowotworowe. Przygotowane w ten sposób sfery żelatynowe umieszczane są w standardowej hodowli zawieszinowej gdzie dochodzi do zarośnięcia sfery przez komórki glejaka. Model ten przez użycie czynnika imitującego macierz i pojedyncze zawieszony w niej komórki jest bardzo powtarzalny i łatwy w przygotowaniu, niestety nie oddaje on warunków środowiska w których naturalnie rozwija się glejak[463].

Organoidy wyprodukowane w 2021r. w procesie zbliżonym do procesu użytego w tej publikacji zostały wykorzystane do wysokoprzepustowej analizy z użyciem 22 związków hamujących inwazję komórek nowotworowych. W tym badaniu wykorzystano test polegający na rozprzestrzenianiu się komórek organoidu w sztucznym środowisku imitującym ECM mózgu. Wyniki zamieszczone przez autorów wskazują, na wysoką użyteczność organoidów w badaniu inhibicji inwazji nowotworowej [464].

Naturalnym rozwinięciem glejakowego modelu organoidowego jest stworzenie modelu hybrydowego – struktury złożonej z organoidu mózgu i organoidu glejakowego. Model tego typu mógłby zostać doskonałym narzędziem pozwalającym na badanie inwazji komórek glejaka na struktury mózgu przy zachowaniu struktury wewnętrznej zarówno guza jak i tkanki mózgowej. Najnowsze doniesienia literaturowe opisują kultury hybrydowe złożone z organoidu mózgowego, organoidu rdzenia nerwowego oraz sferoidu wykonanego z neuronów motorycznych. Jest to aktualnie struktura hybrydy komórkowej o najwyższym stopniu skomplikowania [465]. Procesy inwazji nowotworowej są ciągle niezwykle trudne do identyfikacji i charakterystyki w oparciu o istniejące modele badawcze. Ortotopowo szczepione modele zwierzęce nie oddają skomplikowanej struktury mózgu ludzkiego, a etapy inicjacji czy postępu rozwoju inwazji są niemożliwe do uchwycenia.

Opracowany w ramach realizacji pracy doktorskiej model hybrydowy zawierający komórki zdrowego mózgu oraz komórki nowotworowe GBM może stanowić doskonały model do badania mechanizmów inwazji nowotworowej, choć jego optymalizacja i charakterystyka wymaga dalszych badań. Po pełnej synchronizacji hodowli i charakterystyce modelu możliwe będzie jego wykorzystanie do badania nowych terapeutyków wpływających na procesy inwazji.

## 5. Wnioski

1. miR-218-5p jest niekodującym regulatorem wielu procesów komórkowych mających wpływ na fizyczne właściwości komórek glejaka. Obniżony poziom tego miRNA w komórkach nowotworowych zmniejsza jego sztywność i adhezję co może promować aktywację mechanizmów inwazji i migracji nowotworowej. Wpływ miR-218-5p na komórki glejaka jest wielowątkowy a jego część opiera się na deregulacji ekspresji białek zaangażowanych w migrację komórkową i skład macierzy zewnątrzkomórkowej guza.
2. Wpływ miR-218 na fizyczne właściwości komórek nowotworowych może być badany za pomocą spektroskopii sił pojedynczej komórki co pozwala na dokładną obserwację zmian tych wartości z nanometryczną precyzją.
3. Nanocząstki Mag@PEI nie powodują efektów cytotoksycznych w komórkach glejaka ani w ludzkich fibroblastach. Podczas przeprowadzonych badań nie zaobserwowano znaczącego spadku żywotności komórek, toksyczności względem DNA ani względem mitochondriów. Nanomateriał ten nie generuje w komórkach stresu związanego z podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu i może być stosowany do bezpiecznego przenoszenia dsRNA do komórek ludzkich.
4. Toksyczność nanocząstek PDA jest zmienna, a jednym z czynników ją determinujących jest wielkość zastosowanego nanomateriału. Badania przeprowadzone na czterech ludzkich liniach komórkowych wskazują, że z grup nanocząstek o wielkościach 100/140/240 nm najmniejszą toksycznością charakteryzują się nanocząstki o rozmiarze 100 nm.

## 6. Materiały i metody

### 6.1 Wykorzystane odczynniki oraz zestawy odczynników

Odczynnik/zestaw odczynników	numer katalogowy	Producent
TRI Reagent® Solution	AM9738	Invitrogen
Sybr® Safe	S33102	Invitrogen
DNA-free™ DNA Removal Kit	AM1906	Invitrogen
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	04379012001	Roche
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix	04707516001	Roche
MTT		
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	G7891	Promega
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit	M34152	Thermo Fisher
Muse® Multi-Color DNA Damage Kit	MCH200107	Luminex
Image-iT™ Fixation/Permeabilization Kit	R37602	Invitrogen
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek USA

### 6.2 Hodowla komórkowa i procedury przeprowadzane na komórkach

Jeśli w kolejnych metodach nie stoi inaczej hodowla komórkowa była prowadzona w standardowych warunkach wysokiej wilgotności, 37°C oraz 5% CO<sub>2</sub> w inkubatorze z automatyczną kontrolą temperatury oraz stężenia dwutlenku węgla. Komórki w hodowli stałej pasażowano po osiągnięciu 80% konfluencji w hodowli z użyciem 1% trypsyny do odklejania komórek od powierzchni naczyń hodowlanych. Wszystkie pożywki w hodowli stałej były suplementowane do 10% zawartości FBS oraz 1% zestawu antybiotyków odpowiednich do użytego medium. Pożywki przechowywano w temperaturze 4°C i podgrzewano do temperatury 37°C bezpośrednio przed dodaniem do hodowli komórkowej.

Użyte linie komórkowe mrożono celem ich długoterminowego przechowania. Komórki zawieszano w roztworze medium hodowlanego suplementowanym 20% FBS i 10% dimetylosulfotlenkiem (ang. dimethyl sulfoxide, DMSO), stopniowo schładzano 24h w łaźni wypełnionej izopropanolem w -80°C. Ostatecznie zamrożone kultury komórkowe umieszczano w oparach ciekłego azotu.

Gotowe media hodowlane do kultur komórkowych używane podczas pracy:

<b>Rodzaj medium</b>	<b>Producent</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	American Type Culture Collection (ATCC)
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Corning
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco
Medium GBO	produkcja własna

Skład medium GBO używanego w hodowli organoidów:

<b>Składnik</b>	<b>ilość na 25 ml gotowej pożywki</b>	<b>producent numer katalogowy</b>
medium DMEM:F12	11,735 ml	Gibco #11320033
medium Neurobasal	11,735 ml	Gibco #21103049
suplement GlutaMAX™ (100X)	250 µl	Gibco #35050061
roztwór aminokwasów (100X)	250 µl	Gibco #11140050
roztwór penicyliny i streptomycyny (100X)	250 µl	ATCC #302300
suplement N2 (100X)	250 µl	Gibco #17502048
suplement B27 bez witaminy A (50X)	500 µl	Gibco #12587010
2-merkaptoetanol (1000X)	25 µl	Gibco #21985023
ludzka insulina	5 µl	Sigma-Aldrich #19278

### 6.2.1 Linie komórkowe użyte w przygotowaniu pracy

Linia komórkowa	pochodzenie komórek	warunki hodowli	stosowana pożywka	producent
<b>linie komórkowe adherentne dostępne komercyjnie</b>				
<b>U-118-MG</b>	Glejak	5% CO <sub>2</sub> , temp. 37°C wilgotność względna 95%	DMEM 10% FBS 1% antybiotyki	American Type Culture Collection (ATCC)
<b>MRC-5</b>	fibroblasty płucne		EMEM 10% FBS 1% antybiotyki	American Type Culture Collection (ATCC)
<b>HEP G2</b>	nowotwór wątroby			American Type Culture Collection (ATCC)
<b>HEK-293</b>	endotelium nerki			American Type Culture Collection (ATCC)
<b>linie organoidowe</b>				
<b>P048-GBO</b>	Glejak	5% CO <sub>2</sub> , temp. 37°C wilgotność względna 95%, wytrząsanie ciągle 70 RPM	pożywka do organoidów opisana w metodzie 6.2.	Uzyskane osobiście z tkanki pobranej podczas resekcji i procedury generacji organoidu
<b>P051-GBO</b>	Glejak			Otrzymano od partnerów z OP, BIMSB, MDC
<b>HBO</b>	struktura zdrowego mózgu, komórki iPSC			

### 6.2.2 Pozyskanie tkanek nowotworowych do hodowli pierwotnych organoidów glejaka

W celu otrzymania nowego trójwymiarowego modelu do badań glejaka in vivo wykorzystano komórki ludzkie pochodzące z resekcji nowotworów mózgu wykonanych w Katedrze i Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pozyskane tkanki zostały oczyszczone, rozdrobnione i umieszczone w pożywce hodowlanej przystosowanej do hodowli pierwotnych linii komórkowych glejaka wg procedury zaproponowanej przez Jacob i współpracowników [349].

Tkanki zostały pobrane i przetwarzane na podstawie pozwolenia Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Nr. 46/13).

### 6.2.3 Optymalizacja warunków hodowli organoidów glejaka

Hodowla otrzymanych kultur była prowadzona przez 90 dni w inkubatorze do hodowli komórkowych z platformą wytrząsającą. Z trzech założonych hodowli dwie po upływie 14 dni zaczęły formować się w struktury przypominające opisywane w literaturze organoidy. Hodowlę, która nie wytworzyła struktur większych niż 50uM zutilizowano.

#### **6.2.4 Otrzymanie assembloidu GBO-HBO**

Assembloidy użyte w badaniach prowadzących do powstania tej pracy uzyskano poprzez kokulturę organoidów HBO i GBO. Po około 30 dniach hodowli organoidy o podobnej średnicy przenoszono do wspólnego naczynia (probówka typu falcon 15ml z korkiem pozwalające na wymianę gazową) wypełnionego pożywką odpowiednią do hodowli organoidów GBO. Naczynie hodowlane umieszczano w standardowych warunkach hodowli komórek ludzkich (5% CO<sub>2</sub>, temp. 37°C, wilgotność względna 95%, bez wytrząsania). Po okresie 3-5 dni gotowe fuzje przenoszono na płytkę typu 6-well i hodowano w warunkach standardowych dla organoidów GBO (5% CO<sub>2</sub>, temp. 37°C wilgotność względna 95%, wytrząsanie ciągle 70 RPM). Przygotowane w ten sposób assembloidy mogą być hodowane do czasów kolejnego eksperymentu.

#### **6.2.5 Mrożenie i sekcjonowanie kultur organoidów**

Organoidy i assembloidy mające być poddane barwieniu immunofluorescencyjnemu płukano z użyciem buforu PBS i transportowano do jednorazowych form. Następnie preparat zalewano odczynnikiem Tissue-Tek® O.C.T. Compound mającym za zadanie utrzymanie struktury preparatu oraz stabilizację temperatury podczas mrożenia. Mrożenie odbywało się przez umieszczenie preparatu na kostce suchego lodu do czasu pełnego zamrożenia. Od momentu zamrożenia do czasu sekcjonowania preparaty przechowywane były w niskotemperaturowej zamrażarce (-80°C).

Przygotowanie skrawków preparatu do barwienia wykonywano z użyciem kriostatu Epredia™ CryoStar™ NX50. Podczas cięcia organoidów temperatura komory kriostatu wynosiła -17°C a temperatura ostrza -13°C. Grubość skrawków wynosiła 12 μm. Skrawki przenoszono na czyste szkiełka podstawowe i inkubowano 1h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie przeprowadzano barwienie immunofluorescencyjne.

#### **6.2.6 Lipofekcja**

Jednym ze sposobów dostarczania kwasów nukleinowych do wnętrza komórek stosowanym w niniejszej pracy było wykorzystanie liposomów opłaszczających (lipofekcja). Stosowanym w przypadku mimic miRNA i SCR siRNA czynnikiem transfekcyjnym była Lipofectamine™ 2000.

Procedurę rozpoczynano od pasażowania komórek na oczka płytek hodowlanych. Eksperymenty zawarte w niniejszej pracy przeprowadzane były na płytkach: 96-dołkowych, na których umieszczano 10tyś. komórek lub 6-dołkowych, gdzie używano 350tyś. komórek. Po

osiągnięciu przez komórki około 80% konfluencji (ok. 24h od pasażu), dokonywano wymiany medium na jego niesuplementowany odpowiednik w ilości pomniejszonej o objętość mieszaniny transfekcyjnej.

Przygotowanie mieszanin transfekcyjnych przeprowadzano zgodnie z protokołami dostarczonym przez producenta odczynnika transfekcyjnego Lipofectamine™ 2000. Oddzielnie mieszano 250 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium z Lipofectamine™ 2000 oraz 250 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium z odpowiednią ilością krótkiego RNA lub plazmidu. Następnie przeprowadzano inkubację 5 min w temperaturze pokojowej i łączono oba roztwory. Przygotowaną w ten sposób mieszaninę reakcyjną inkubowano 20 min w temperaturze pokojowej, po czym przenoszono do odpowiednich dołków z komórkami. Przedstawione wartości dotyczą końcowej objętości transfekcji 2 ml, odpowiadającej eksperymentom przeprowadzanym na płytkach 6-dołkowych. Badania zawarte w niniejszej pracy oparte są na materiale 24h po transfekcji

### **6.2.7 Transfekcja nanocząstkami**

W przedstawionych badaniach zastosowano nanocząstki Mag@PEI (rdzeń magnetytowy + otoczka polietylenoiminowa) oraz PDA (polidopamina). Nanocząstki Mag@PEI zostały również zastosowane jako czynnik transfekcyjny mogący przenosić dsRNA (ATN-RNA) do wnętrza komórek. Zastosowanie nanocząstek Mag@PEI w dostarczaniu tego typu kwasów nukleinowych zostało opisane w publikacji naszego zespołu badawczego z roku 2019 [273] a opis syntezy i działania ATN-RNA w publikacji z roku 2010 [202].

Komórki poddawane transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek traktowano analogicznie do komórek poddawanych lipofekcji. Przygotowanie mieszaniny transfekcyjnej przebiegało jednoetapowo – odpowiadające przewidzianym w eksperymencie stężeniom końcowym ilości dsRNA mieszano z nanocząstkami i inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksów. Tworzenie mieszanin opierało się na zachowaniu stosunku wagowego RNA : nanocząstki. Dla Mag@PEI stosunek ten wyniósł 1:3.

Dalsze eksperymenty przeprowadzano 24 h po wykonaniu transfekcji.

## **6.3 Badanie cytotoksyczności nanomateriałów**

### **6.3.1 Test cytotoksyczności – pomiar aktywności metabolicznej (MTT)**

Pierwszy z testów cytotoksyczności wykorzystany w tej pracy oparty jest na powiązaniu żywotności komórek ludzkich z ich aktywnością metaboliczną. Test ten opiera się na redukcji

żółtej soli tetrazolowej 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) do fioletowych kryształów soli formazanu. Taka redukcja jest przeprowadzana jedynie przez aktywne metabolicznie komórki, które posiadają oksydoreduktazy zależne od NAD(P)H. Następnie utworzone kryształy rozpuszcza się i mierzy absorbancję powstałego roztworu. Wyższy współczynnik absorbancji mówi o wyższej aktywności metabolicznej badanych komórek. Test MTT jest jednym z najprostszych i powszechnie znanych testów cytotoksyczności opartych na aktywności metabolicznej.

Komórki ludzkie hodowano w standardowej 96 dołkowej płytce do hodowli ludzkich linii komórkowych. Gęstość komórek wysiewanych do tego testu wynosiła 10 tysięcy komórek na każdy dołek eksperymentalny. Komórki po wysianiu hodowano przez 24h w standardowych warunkach i manualnie sprawdzano ich konfluencję przed przeprowadzeniem testu. W teście brały udział tylko dołki o poziomie konfluencji >75%. Na płytce pozostawiono dołki bez komórek w celu późniejszego odczytania wartości tła absorbancji. Do komórek gotowych do wykonania testu dodano odczynnik MTT do końcowego stężenia 0,5mg/ml i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Następnie usunięto pożywkę z odczynnikiem MTT a do dołków w których wykrystalizowała się sól formazanowa dodano 100uL DMSO i inkubowano przez 2h z wytrząsaniem XXX w celu całkowitego rozpuszczenia kryształów i uzyskania roztworu dalej używanego do badania absorbancji. Płytkę przeniesiono do czytnika absorbancji i odczytano absorbancję o długości fali 550nm oraz 690nm. Wartość absorbancji dla długości fali 690nm służyła w obliczeniach jako wartość referencyjna.

$$\text{Żywotność komórek} = 100 - \left(100 * \frac{(\text{absorbancja próby badanej [A550 - A690]} - \text{absorbancja pożywki})}{(\text{absorbancja kontroli [A550 - A690]} - \text{absorbancja pożywki})}\right)$$

### **6.3.2 Test cytotoksyczności – pomiar wpływu dehydrogenazy mleczanowej (LDH)**

W celu oceny żywotności komórek użyto testu opartego na pomiarze wpływu enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) z komórek o uszkodzonej błonie komórkowej. Do medium komórek badanych dodaje się mieszaninę związków takich jak mleczan, dehydrogenaza NADH oraz resazuryna. LDH przekształca mleczan do pirogronianu z równoczesnym przekształceniem NAD<sup>+</sup> do NADH. Powstały NADH zostaje wykorzystany przez dehydrogenazę NADH do przekształcenia nieaktywnej fluorescencyjnie resazuryny do resorufiny. Poziom fluorescencji Resorufin jest wprost proporcjonalny do ilości LDH w medium komórkowym. Badany w ten sposób poziom LDH w medium komórkowym nie



prowadzi do uszkodzeń komórki podczas pomiaru co jest bardzo ważne w wypadku badania potencjalnych transporterów dokomórkowych, które same mogą powodować uszkodzenia błony komórkowej.

Komórki ludzkie hodowano w 96 dołkowej płytce hodowlanej o przezroczystym dnie oraz czarnych ściankach w celu późniejszego ich użycia w czytniku fluorescencji oraz ochronie przed przenoszeniem się sygnału fluorescencyjnego między poszczególnymi dołkami. Gęstość komórek wysiewanych do tego testu wynosiła 10 tysięcy komórek na każdy dołek eksperymentalny. Komórki po wysianiu hodowano przez 24h w standardowych warunkach i manualnie sprawdzano ich konfluencję przed przeprowadzeniem testu. W teście brały udział tylko dołki o poziomie konfluencji >75%. Komórki dzielono na trzy grupy eksperymentalne – kontrolę nietraktowaną, grupę badaną oraz kontrolę pozytywną o maksymalnym wpływie LDH z komórek. Dodatkowo część dołków bez komórek uzupełniono tym samym medium w którym testowane były komórki w celu otrzymania wartości tła fluorescencji użytego medium. Jako czynnik powodujący maksymalny wpływ LDH z komórek ludzkich użyto rekomendowanego przez producenta buforu lizującego dołączonego do zestawu odczynników. Wszystkie komórki hodowano w standardowych warunkach a 24h przed eksperymentem zmieniono pożywkę na nie zawierającą zwierzęcego serum, które może zawierać znaczące ilości LDH, które mogą wpłynąć na wynik pomiaru. Po tym czasie płytki z hodowlami komórkowymi wyjęto z inkubatora o standardowych warunkach dla hodowli ludzkich linii komórkowych ( 37stC, 5% CO<sub>2</sub>) i przeniesiono do temperatury 22stC w celu wyrównania temperatury komórek do temperatury w której przeprowadzany jest ten test. Do dołków oznaczonych jako kontrola pozytywna dodano 2uL buforu lizującego na 100uL pożywki. Po 30 minutowej inkubacji do wszystkich dołków eksperymentalnych dodano przygotowany przez producenta zestaw związków i inkubowano 10min w 22stC. Po tym czasie do wszystkich dołków dodano 50uL mieszaniny Stop Solution przygotowanej przez producenta i mającej na celu zahamowanie dalszego rozwijania się reakcji. Następnie płytka była wytrząsana przez 10 sekund i przeniesiona do fluorometru w celu badania fluorescencji o długości fali 590±nm przy ekscytacji światłem o długości fali 560±nm. Cytotoksyczność liczono według wzoru:

$$\text{Procent cytotoksyczności} = 100 * \frac{(\text{Wpływ LDH w próbie} - \text{tło fluorescencji medium})}{(\text{Maksymalny wpływ LDH} - \text{tło fluorescencji medium})}$$

### 6.3.3 Test potencjału błony mitochondrialnej

Test oparty na barwieniu żywych komórek barwnikiem 1,1',3,3'-Tetraethyl-5,5',6,6'-tetrachloroimidacarbocyanine iodide (JC-1) pozwala na określenie potencjału błony

mitochondrialnej żywych komórek. Test pozwala na wykrycie depolaryzacji tej błony co jest zazwyczaj związane ze zjawiskiem apoptozy oraz śmierci komórkowej. Barwnik JC-1 może w komórce znajdować się w formie monomeru, który wykazuje emisję zielonej fluorescencji o długości fali około 529nm oraz w formie J-agregatów, które wykazują czerwoną fluorescencję o długości fali około 590nm. Fluorescencja obu form barwnika JC-1 jest wzbudzana przez światło o długości fali 514nm. Podczas depolaryzacji błony mitochondrialnej i zmniejszenia się potencjału błonowego barwnik wypływa z mitochondriów do cytoplazmy gdzie rozpadają się J-agregaty. W wyniku tego zjawiska w komórce zmniejsza się ilość cząsteczek wykazujących fluorescencję w zakresie 590nm długości fali a zwiększa się ilość cząsteczek wykazujących ją w zakresie 529nm długości fali. Jako kontrolę pozytywną zastosowano m-Chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (CCCP), który przez działanie jonoforowe działa jako transporter jonów do wnętrza mitochondrium i bezpośrednio powoduje znaczące zmniejszenie potencjału błony mitochondrialnej.

Komórki ludzkie hodowano w 96 dołkowej płytce hodowlanej o przezroczystym dnie oraz czarnych ściankach w celu późniejszego ich użycia w czytniku fluorescencji oraz ochronie przed przenoszeniem się sygnału fluorescencyjnego między poszczególnymi dołkami. Gęstość komórek wysiewanych do tego testu wynosiła 10 tysięcy komórek na każdy dołek eksperymentalny. Komórki po wysianiu hodowano przez 24h w standardowych warunkach i manualnie sprawdzano ich konfluencję przed przeprowadzeniem testu. W teście brały udział tylko dołki o poziomie konfluencji >75%. Do dołków oznaczonych jako kontrola pozytywna 30 minut przed rozpoczęciem testu dodano CCCP do stężenia 10uM JC-1 w standardowym medium do hodowli komórkowej. Komórki inkubowano w 37stC przez 30 minut. Następnie do każdego dołka badanego oraz kontroli pozytywnej dodano JC-1 do stężenia końcowego 2uM i inkubowano przez 30 min w standardowych warunkach hodowli komórek ludzkich (37stC, 5% CO<sub>2</sub>). Po zakończeniu inkubacji delikatnie odciągano medium z JC-1 oraz dodawano nowe ciepłe medium. Płytkę z komórkami umieszczano w czytniku fluorescencji i dokonywano odczytu fluorescencji w zakresach 529±5nm oraz 590±5nm. Następnie płytkę przenoszono do pracowni mikroskopii i tam wykonywano zdjęcia mikroskopowe komórek w tym samym zakresie fluorescencji. Potencjał błony mitochondrialnej liczono przez porównanie współczynników fluorescencji 590nm/529nm dla poszczególnych grup badanych gdzie jako wzorcowy uznano odczyt dla komórek nie będących poddanym kontaktowi z nanomateriałami. Do odczytów przypisano mikrografie fluorescencyjne potwierdzające wyniki uzyskane za pomocą czytnika fluorescencji.

### **6.3.4 Test genotoksyczności**

Genotoksyczność nanomateriałów badano za pomocą cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał kierowanych przeciwko fosforylowanemu histonowi H2A.X oraz fosforylowanej kinazie serynowo-treoninowej (EC 2.7.1.11). Metoda ta została opisana w roku 2007 i jest używana w celu określenia ilościowo podwójnoniciowych pęknięć DNA pod wpływem zewnętrznych czynników [466].

Komórki hodowano zgodnie z opisanym wcześniej protokołem a następnie transfekowano kompleksem nanocząstki-ATN oraz samymi nanocząstkami. Komórki 24h po podaniu nanocząstek zbierano przez trypsynizację, wirowano przez 5 minut (prędkość 300 x g) a następnie przemywano jednokrotnie w buforze PBS. Następnie zgodnie z protokołem producenta zestawu odczynników komórki zostały utrwalone z użyciem buforu utrwalającego przez 10 min na lodzie. Permabilizacja komórek została przeprowadzona przez inkubację komórek z użyciem buforu permabilizującego – 20 min na lodzie. Komórki przemyto buforem PBS i 200tyś komórek z każdej próby przeniesiono do osobnych probówek. Barwienie przeciwciałami zostało przeprowadzone przez 30 min w ciemności z użyciem 10 µL każdego przeciwciała dostarczonego przez producenta. Przed pomiarem próby zwirowanie przez 5 min przy prędkości 300 g a następnie uzyskany pellet zawieszono w 200µL buforu przeznaczonego do analizy.

Pomiar przeprowadzono przy użyciu cytometr przepływowego Luminex Guava Muse Cell Analyzer zgodnie z protokołem „Multicolor DNA Damage” przygotowanego przez producenta. W wyniku analizy otrzymano wartości procentowe ilości komórek w których zaszły zjawiska fosforylacji histonu H2A.X oraz fosforylacji kinazy serynowo-treoninowej. Komórki, które nie wykazały fosforylacji żadnego z badanych białek zostały oznaczone jako komórki, które nie posiadają dwuniciowych pęknięć w strukturze DNA.

### **6.3.5 Badanie poziomu aktywności katalazy w ekstrakcie komórkowym**

Ekstrakcja białek była prowadzone w temperaturze 4 °C. Komórki homogenizowano z użyciem buforu sodowo fosforanowego o pH 7.0, zawierającego 2% Poliwinylpirolidonu oraz kwas wersenowy (EDTA) w stężeniu 0,2mM. Ekstrakcja była prowadzona przez 1h. Otrzymany homogenat był wirowany przy prędkości 20,000 × g przez 20 min w temperaturze 4°C. Aktywność katalazy była przeprowadzona zgodnie z protokołem opublikowanym przez Chance i Maehly w roku 1955 [467]. Mieszanina reakcyjna zawierała 1 mL 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7.0, 1 mL 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oraz 50 µL ekstraktu enzymatycznego.

Aktywność została wyliczona z obniżenia absorbancji otrzymanego roztworu przy długości fali równej 240nm. Jednostką właściwą dla tego pomiaru jest mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg białka opisane jako aktywność enzymatyczna katalazy.

### **6.3.6 Badanie poziomu aktywności peroksydazy glutationowej w ekstrakcie komórkowym**

Aktywność enzymatyczną peroksydazy glutationowej oceniono za pomocą protokołu opublikowanego w publikacji Nagalakshmi i Prasad (2001) [468]. Mieszanina reakcyjna zawierała po 100 µL 0.5 M buforu fosforanowego (pH 8.2,) 10 mM EDTA, 1.14 M NaCl, 10 mM GSH, 2 mM NADPH, oraz 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reakcja została zainicjowana przez dodanie 2U GR, oraz 50 µL of ekstraktu enzymatycznego. Zużycie obecnego w roztworze NADPH wyznaczono przez obserwację spadku absorbancji w zakresie 340 nm długości fali światła. Jednostką właściwą dla tego pomiaru jest nmol NADPH \* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> białka opisane jako aktywność enzymatyczna peroksydazy glutationowej.

### **6.3.7 Badanie ilości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w ekstrakcie komórkowym**

Zawartość nadtlenu wodoru w badanych próbkach była ustalona z użyciem metody opartej na rodanku żelaza (III) opisanej w publikacji Ratajczak i inni (2015) [469]. Próby były homogenizowane z użyciem 5mL 5% (w/v) roztworu kwasu trichlorooctowego (TCA) zawierającego kwas wersenowy (EDTA) w stężeniu 10mM. Uzyskany homogenat wirowano przy prędkości 26,000 × g przez 20 min w temperaturze 4°C. Analizowana była cała objętość uzyskanego supernatantu.

## **6.4 Badanie fizycznych właściwości komórek nowotworowych**

### **6.4.1 Spektroskopia sił pojedynczej komórki**

Sztywność i adhezję komórek badano za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) w trybie spektroskopii sił pojedynczej komórki (SCFS), za pomocą głowicy CellHesion (JPK Instruments). W trybie SCFS adhezję określano ilościowo jako pracę adhezji określoną jako obszar pod częścią krzywej siły odpowiadającą sile/pracy potrzebnej do oderwania pojedynczej komórki od powierzchni [470,471]. Komórki przytwierdzano do bezostrzowych mikrodźwigni Arrow-TL (NanoWorld), których bazowa stała sprężystości wynosi 0,06 N/m. Nowe mikrodźwignie zostały oczyszczone i aktywowane za pomocą plazmy tlenowej przez 2 minuty z wykorzystaniem mocy 100W w urządzeniu Zepto 1. Następnie sondy zanurzono w roztworze konkanawaliny A (2mg/mL konkanawaliny A rozpuszczone w PBS) na 1 godzinę.

Sfunkcjonalizowane mikroźwignie zostały następnie trzykrotnie płukane w buforze PBS w celu usunięcia niezwiązanej konkanawaliny z powierzchni.

Komórki hodowane w standardowych warunkach pasażowano na płytki 6-dołkowe w których prowadzono transfekcję zgodnie z protokołem opisanym wcześniej. Po 24 godzinach za pomocą standardowej procedury trypsynizacji komórki odklejano od podłoża a otrzymaną zawiesinę komórkową w medium DMEM przelewano na sterylną szalkę Petriego o średnicy 3,5cm.

Sfunkcjonalizowana mikroźwignia umieszczana była bezpośrednio nad pojedynczą komórką w roztworze za pomocą mikroskopu świetlnego. Mikroźwignia opuszczana była bezpośrednio na komórkę i dociskano ją do powierzchni przez 5 sekund z siłą 5 nN. Następnie próbnik oddalano od powierzchni szalki aż do momentu pełnego odklejenia się komórki od podłoża. Przygotowaną sondę komórka/mikroźwignia inkubowano przez 15-20 minut w celu uzyskania pełnego połączenia. Przygotowane w ten sposób sondy używano bezpośrednio do przeprowadzania pomiarów.

Sondę delikatnie opuszczano na badaną powierzchnię i doprowadzano do kontaktu powierzchni szalki z komórką. Następnie ramię mikroskopu sił atomowych z nanometrową precyzją odsuwano od powierzchni co prowadziło do deformacji komórki, która wytworzyła wiązania adhezyjne z podłożem. Następnie dochodziło do sekwencyjnego zrywania kontaktu między powierzchnią komórki a podłożem. Podczas całości procesu zapisywano krzywą siły każdego podejścia. Prędkość przybliżania i oddalania się sondy do powierzchni była stała i wynosiła 8  $\mu\text{m/s}$ . Dla każdej grupy badanej użyto 8-9 sond z żywymi komórkami i wykonano średnio 1800 pojedynczych krzywych siły. Dla każdej przygotowanej sondy wykonano 5 map siły (obszar badania 20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ , siatka 6x6 pixeli). Lokalizacja pomiaru na powierzchni szalki była losowa.

Z części krzywej siły przypadającej na zbliżanie się sondy do powierzchni wyznaczono parametr sztywności komórki (N/m). Głębokość pomiaru wynosiła 200nm. Analogicznie z części krzywej siły przypadającej na oddalanie się sondy od powierzchni szalki obliczono pracę adhezji. W obliczeniach zastosowano modele adhezji i sztywności opisane i opublikowane wcześniej przez Sadera i Omidvara [470,471]

### **6.4.2 Wyznaczanie szorstkości komórek**

Średnia szorstkość komórek została wyznaczona z użyciem mikroskopu sił atomowych w trybie spektroskopii sił pojedynczej komórki (SCFS), za pomocą głowicy NanoWizard 4 (JPK Instrument). Badana była średnie odchylenie głębokości na powierzchni komórki w trybie bezkontaktowym. Każda komórka została przeskanowana w trzech miejscach poza obrębem jądra komórkowego. Obszar badany wynosił za każdym razem 10x10µm.

### **6.4.3 Barwienia komórkowe**

Analiza struktury cytoszkieletu aktynowego została wykonana na komórkach hodowanych w standardowych warunkach. Komórki 24h po transfekcji zostały utrwalone i premabilizowane zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu Image-iT™ Fixation/Permeabilization Kit (Invitrogen). Włókna F-aktyny zostały wybarwione z użyciem falloidyny koniugowanej z tetrametylorodaminą a jądra komórkowe za pomocą barwnika jądrowego 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI). Barwienia wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.

## **6.5 Badanie ekspresji genów**

### **6.5.1 Izolacja RNA**

Izolację RNA z linii komórkowych rozpoczynano od usunięcia z nich medium hodowlanego i przemycia ich buforem PBS. Następnie zalewano je 500 µl TRI Reagent® Solution i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Lizat przenoszono do probówek o pojemności 1,5 ml i dodawano do nich 100 µl chloroformu celem rozdzielenia frakcji wodnej i organicznej. Próby wytrząsano 15 sekund, inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, następnie wirowano przez 15 minut przy 13000 rcf w 4 °C. Frakcję wodną przenoszono do nowych 1,5 ml probówek i wytrącono z niej RNA poprzez dodanie 250 µl izopropanolu. Próby inkubowano 15 minut w -20 °C , po czym przez następne 15 min wirowano przy 13000 rcf w 4°C. Supernatant usuwano, osad przemywano 1 ml zimnego 75% etanolu i wirowano przez 8 minut przy 7000 rpm w 4°C. Supernatant ponownie odrzucano, a osad suszono 10 min w temperaturze pokojowej. RNA zawieszano w 20 µl wody wolnej od RNaz, traktowanej pirowęglanem dietylu (ang. diethyl pyrocarbonate, DEPC). Stężenie otrzymanego roztworu RNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ260 nm aparatem NanoDrop 2000. Jakość materiału oceniano na żelu agarozowym.

### **6.5.2 Oczyszczenie RNA z zanieczyszczeń DNA**

Materiał po procedurze izolacji RNA. oczyszczano z pozostałości DNA gotowym zestawem odczynników DNA-free™ DNA Removal Kit. W celu zachowania integralności RNA, próby

przetrzymano na lodzie, z wyłączeniem czasu inkubacji. Proces rozpoczynano od przygotowania w probówkach o pojemności 1,5 ml mieszaniny reakcyjnej, w której skład wchodziły: 1 µl enzymu rDNase I, 1 µl buforu 10x DNase I, 4000 ng RNA w 8 µl wody wolnej od RNaz. Próby inkubowano przez 25 min w 37 °C, po czym przerywano reakcję dodając 2 µl DNase Inactivation Reagent i delikatnie mieszając przez 2 min w temperaturze pokojowej. Aby oddzielić inaktywator od pozostałych składników reakcji, całość wirowano przez 1,5 min przy 7500 rpm. Fazę wodną zawierającą oczyszczony RNA przenoszono do nowych probówek 1,5 ml. Stężenie uzyskanego roztworu mierzono przy długości fali  $\lambda$  260 nm aparatem NanoDrop2000. Jakość uzyskanego RNA sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny.

### **6.5.3 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym**

W toku przeprowadzanych analiz stosowano rozdział kwasów nukleinowych w 1,2% żelu agarozowym: agarozą 1,2 g, bufor TBE 1x 100 ml, Sybr® Safe 10 µl. Do kieszonek nakładano po 500 ng DNA lub RNA w 10 µl wody wolnej od nukleaz, całość obciążonego 2 µl buforu 6x DNA Loading. Rozdział materiału prowadzono przez 30 min, przy natężeniu 75 mA i napięciu 300 V. Wizualizacji w świetle UV dokonywano wykorzystując system obrazowania żeli G-Box.

### **6.5.4 Odwrotna transkrypcja**

W reakcji odwrotnej transkrypcji, której produktem jest cDNA (ang. complementary DNA) matrycę dla polimerazy stanowiło 500 ng oczyszczonego z reszt DNA RNA. Wykorzystano gotowy zestaw odczynników Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit. Reakcję prowadzono zgodnie z protokołem producenta, a jej produkt końcowy rozcieńczano do objętości końcowej 40 µl.

### **6.5.5 Real time PCR**

Reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) przeprowadzano przy użyciu termocyklera CFX96 Real-Time System, na 96-dołkowych płytkach z przezroczystym dnem (BioRad). Procedurę rozpoczynano od przygotowywania mieszanin reakcyjnych: 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix, 1 µl oligodeoksynukleotydu starterowego forward 5 µM, 1 µl oligodeoksynukleotydu starterowego reverse 5µM, 2 µl H<sub>2</sub>O. Rozpipetowywano je w tryplikatach po 9 µl na studzienkę, następnie dodawano po 1 µl odpowiedniej matrycy cDNA. Przed umieszczeniem gotowej płytki w termocyklerze, zaklejano ją uszczelnianą termicznie folią (BioRad) i wirowano 1 min przy 1000 rpm. Profil reakcji analizy ekspresji genów przedstawia tabela 6. Uzyskane wartości cyklu granicznego (ang. treshold cycle, Ct) przyrównywano do poziomu

ekspresji genu referencyjnego, fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HPRT). Interpretacji wyników dokonywano przy użyciu dedykowanego do termocyklera oprogramowania Bio-Rad CFX Maestro w wersji 2.0.

Podczas analizowania paneli genów dostępnych w zestawach Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array oraz Human Cell Motility RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array stosowano się do protokołu dołączonego przez producenta a dane analizowano z wykorzystaniem platformy online do analizy wyników.

## **6.6 Przygotowanie manuskryptu**

Ryciny zawierające wykresy oraz mikrografie zamieszczone w manuskrypcie zostały wykonane z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 8. Ryciny 1,2, 18 oraz 21 zostały przygotowane z wykorzystaniem dostępnego online oprogramowania BioRender.com zgodnie z licencją.

Analiza statystyczna została wykonana w oprogramowaniu GraphPad Prism 8. Mikrografie zostały wykonane z użyciem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 oraz oprogramowania LAS X SP8, mikroskopu konfokalnego OLYMPUS FV1200, mikroskopu fluorescencyjnego Keyence BZ-X700 z oprogramowaniem BZ-X700 analyzer oraz mikroskopu świetlnego ZEISS Primovert z oprogramowaniem ZEN Blue.



## 7. Literatura

1. Kanavos, P. The rising burden of cancer in the developing world. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2006**, *17 Suppl 8*, viii15-viii23, doi:10.1093/annonc/mdl983.
2. Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **2015**, *65*, 87-108, doi:10.3322/caac.21262.
3. Anghileri, E.; Castiglione, M.; Nunziata, R.; et al. Extraneural metastases in glioblastoma patients: two cases with YKL-40-positive glioblastomas and a meta-analysis of the literature. *Neurosurgical review* **2016**, *39*, 37-45; discussion 45-36, doi:10.1007/s10143-015-0656-9.
4. Prasetyanti, P.R.; Medema, J.P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer* **2017**, *16*, 41, doi:10.1186/s12943-017-0600-4.
5. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
6. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery* **2022**, *12*, 31-46, doi:10.1158/2159-8290.Cd-21-1059.
7. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
8. Nagai, T.; Ishikawa, T.; Minami, Y.; et al. Tactics of cancer invasion: solitary and collective invasion. *Journal of biochemistry* **2020**, *167*, 347-355, doi:10.1093/jb/mvaa003.
9. Suhail, Y.; Cain, M.P.; Vanaja, K.; et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell systems* **2019**, *9*, 109-127, doi:10.1016/j.cels.2019.07.003.
10. Friedl, P.; Bröcker, E.B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2000**, *57*, 41-64, doi:10.1007/s000180050498.
11. Adams, J.C. Cell-matrix contact structures. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2001**, *58*, 371-392, doi:10.1007/pl00000864.
12. Cramer, L.P. Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochemical Society symposium* **1999**, *65*, 173-205.
13. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110*, 673-687, doi:10.1016/s0092-8674(02)00971-6.
14. Zamir, E.; Katz, M.; Posen, Y.; et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature cell biology* **2000**, *2*, 191-196, doi:10.1038/35008607.
15. Byers, H.R.; Fujiwara, K. Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J Cell Biol* **1982**, *93*, 804-811, doi:10.1083/jcb.93.3.804.
16. Chew, T.L.; Wolf, W.A.; Gallagher, P.J.; et al. A fluorescent resonant energy transfer-based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows. *J Cell Biol* **2002**, *156*, 543-553, doi:10.1083/jcb.200110161.
17. Ballestrem, C.; Hinz, B.; Imhof, B.A.; et al. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* **2001**, *155*, 1319-1332, doi:10.1083/jcb.200107107.
18. Myllyharju, J.; Kivirikko, K.I. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine* **2001**, *33*, 7-21, doi:10.3109/07853890109002055.
19. Frantz, C.; Stewart, K.M.; Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* **2010**, *123*, 4195-4200, doi:10.1242/jcs.023820.
20. Maurer, L.M.; Ma, W.; Mosher, D.F. Dynamic structure of plasma fibronectin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **2015**, *51*, 213-227, doi:10.1080/10409238.2016.1184224.

21. Sottile, J.; Hocking, D.C. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Molecular biology of the cell* **2002**, *13*, 3546-3559, doi:10.1091/mbc.e02-01-0048.
22. Yamada, K.M.; Collins, J.W.; Cruz Walma, D.A.; et al. Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *International journal of experimental pathology* **2019**, *100*, 144-152, doi:10.1111/iep.12329.
23. Hynes, R.O.; Naba, A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2012**, *4*, a004903, doi:10.1101/cshperspect.a004903.
24. Whittaker, C.A.; Bergeron, K.F.; Whittle, J.; et al. The echinoderm adhesome. *Developmental biology* **2006**, *300*, 252-266, doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.044.
25. Hynes, R.O. The evolution of metazoan extracellular matrix. *J Cell Biol* **2012**, *196*, 671-679, doi:10.1083/jcb.201109041.
26. Chatterjee, M.; Muljadi, P.M.; Andarawis-Puri, N. The role of the tendon ECM in mechanotransduction: disruption and repair following overuse. *Connective tissue research* **2022**, *63*, 28-42, doi:10.1080/03008207.2021.1925663.
27. Alcorta-Sevillano, N.; Macías, I.; Infante, A.; et al. Deciphering the Relevance of Bone ECM Signaling. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9122630.
28. Lenselink, E.A. Role of fibronectin in normal wound healing. *International wound journal* **2015**, *12*, 313-316, doi:10.1111/iwj.12109.
29. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 786-801, doi:10.1038/nrm3904.
30. Reinhard, S.M.; Razak, K.; Ethell, I.M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* **2015**, *9*, 280, doi:10.3389/fncel.2015.00280.
31. Watanabe, A.; Hoshino, D.; Koshikawa, N.; et al. Critical role of transient activity of MT1-MMP for ECM degradation in invadopodia. *PLoS computational biology* **2013**, *9*, e1003086, doi:10.1371/journal.pcbi.1003086.
32. White, J.M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Current opinion in cell biology* **2003**, *15*, 598-606, doi:10.1016/j.ceb.2003.08.001.
33. Broder, C.; Arnold, P.; Vadon-Le Goff, S.; et al. Metalloproteases meprin  $\alpha$  and meprin  $\beta$  are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 14219-14224, doi:10.1073/pnas.1305464110.
34. Cazzanelli, P.; Wuertz-Kozak, K. MicroRNAs in Intervertebral Disc Degeneration, Apoptosis, Inflammation, and Mechanobiology. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103601.
35. Grabowska, M.; Kuczyński, K.; Piwecka, M.; et al. miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells. *J Cell Mol Med* **2022**, *26*, 3913-3930, doi:10.1111/jcmm.17428.
36. Dang, S.; Zhang, R.; Tian, S.; et al. MicroRNA-218 inhibits the malignant phenotypes of glioma by modulating the TNC/AKT/AP-1/TGF $\beta$ 1 feedback signaling loop. *International journal of molecular medicine* **2021**, *48*, doi:10.3892/ijmm.2021.5038.
37. Si, H.B.; Zeng, Y.; Liu, S.Y.; et al. Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats. *Osteoarthritis and cartilage* **2017**, *25*, 1698-1707, doi:10.1016/j.joca.2017.06.002.
38. Erdogan, B.; Webb, D.J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochemical Society transactions* **2017**, *45*, 229-236, doi:10.1042/bst20160387.
39. Mao, X.; Xu, J.; Wang, W.; et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer* **2021**, *20*, 131, doi:10.1186/s12943-021-01428-1.

40. Jung, H.Y.; Fattet, L.; Yang, J. Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 962-968, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-13-3173.
41. Rice, A.J.; Cortes, E.; Lachowski, D.; et al. Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e352, doi:10.1038/oncsis.2017.54.
42. Antony, J.; Thiery, J.P.; Huang, R.Y. Epithelial-to-mesenchymal transition: lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention. *Physical biology* **2019**, *16*, 041004, doi:10.1088/1478-3975/ab157a.
43. Wilson, M.M.; Weinberg, R.A.; Lees, J.A.; et al. Emerging Mechanisms by which EMT Programs Control Stemness. *Trends in cancer* **2020**, *6*, 775-780, doi:10.1016/j.trecan.2020.03.011.
44. Ota, I.; Masui, T.; Kurihara, M.; et al. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. *Oncol Rep* **2016**, *35*, 261-266, doi:10.3892/or.2015.4348.
45. Balaji, S.; Santhi, R.; Kim, U.; et al. Cancer Stem Cells with Overexpression of Neuronal Markers Enhance Chemoresistance and Invasion in Retinoblastoma. *Current cancer drug targets* **2020**, *20*, 710-719, doi:10.2174/1568009620666200504112711.
46. Bao, B.; Wang, Z.; Ali, S.; et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* **2012**, *5*, 355-364, doi:10.1158/1940-6207.Capr-11-0299.
47. Steinbichler, T.B.; Savic, D.; Dudás, J.; et al. Cancer stem cells and their unique role in metastatic spread. *Seminars in cancer biology* **2020**, *60*, 148-156, doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.007.
48. Nakada, M.; Nakada, S.; Demuth, T.; et al. Molecular targets of glioma invasion. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2007**, *64*, 458-478, doi:10.1007/s00018-007-6342-5.
49. Zhang, J.; Goliwas, K.F.; Wang, W.; et al. Energetic regulation of coordinated leader-follower dynamics during collective invasion of breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 7867-7872, doi:10.1073/pnas.1809964116.
50. Yan, J.; Zhao, Y.; Lin, F.; et al. Monitoring the extracellular matrix remodeling of high-grade serous ovarian cancer with nonlinear optical microscopy. *Journal of biophotonics* **2021**, *14*, e202000498, doi:10.1002/jbio.202000498.
51. Rao, J.S.; Steck, P.A.; Mohanam, S.; et al. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* **1993**, *53*, 2208-2211.
52. Forsyth, P.A.; Wong, H.; Laing, T.D.; et al. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* **1999**, *79*, 1828-1835, doi:10.1038/sj.bjc.6690291.
53. Sawaya, R.E.; Yamamoto, M.; Gokaslan, Z.L.; et al. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clinical & experimental metastasis* **1996**, *14*, 35-42, doi:10.1007/bf00157684.
54. Shipley, J.M.; Doyle, G.A.; Fliszar, C.J.; et al. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 4335-4341, doi:10.1074/jbc.271.8.4335.
55. Gioia, M.; Monaco, S.; Van Den Steen, P.E.; et al. The collagen binding domain of gelatinase A modulates degradation of collagen IV by gelatinase B. *Journal of molecular biology* **2009**, *386*, 419-434, doi:10.1016/j.jmb.2008.12.021.
56. Spill, F.; Reynolds, D.S.; Kamm, R.D.; et al. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current opinion in biotechnology* **2016**, *40*, 41-48, doi:10.1016/j.copbio.2016.02.007.
57. Dufrêne, Y.F.; Viljoen, A.; Mignolet, J.; et al. AFM in cellular and molecular microbiology. *Cellular microbiology* **2021**, *23*, e13324, doi:10.1111/cmi.13324.

58. Viljoen, A.; Foster, S.J.; Fantner, G.E.; et al. Scratching the Surface: Bacterial Cell Envelopes at the Nanoscale. *mBio* **2020**, *11*, doi:10.1128/mBio.03020-19.
59. Andre, G.; Kulakauskas, S.; Chapot-Chartier, M.P.; et al. Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nature communications* **2010**, *1*, 27, doi:10.1038/ncomms1027.
60. Pogoda, K.; Jaczewska, J.; Wiltowska-Zuber, J.; et al. Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data. *European biophysics journal : EBJ* **2012**, *41*, 79-87, doi:10.1007/s00249-011-0761-9.
61. Helenius, J.; Heisenberg, C.P.; Gaub, H.E.; et al. Single-cell force spectroscopy. *Journal of cell science* **2008**, *121*, 1785-1791, doi:10.1242/jcs.030999.
62. Benoit, M.; Gabriel, D.; Gerisch, G.; et al. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nature cell biology* **2000**, *2*, 313-317, doi:10.1038/35014000.
63. Velegol, S.B.; Logan, B.E.J.L. Contributions of bacterial surface polymers, electrostatics, and cell elasticity to the shape of AFM force curves. **2002**, *18*, 5256-5262.
64. Wala, J.; Das, S. Mapping of biomechanical properties of cell lines on altered matrix stiffness using atomic force microscopy. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* **2020**, *19*, 1523-1536, doi:10.1007/s10237-019-01285-4.
65. Stylianou, A.; Lekka, M.; Stylianopoulos, T. AFM assessing of nanomechanical fingerprints for cancer early diagnosis and classification: from single cell to tissue level. *Nanoscale* **2018**, *10*, 20930-20945, doi:10.1039/c8nr06146g.
66. Huml, M.; Silye, R.; Zauner, G.; et al. Brain tumor classification using AFM in combination with data mining techniques. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 176519, doi:10.1155/2013/176519.
67. Wang, C.; Sinha, S.; Jiang, X.; et al. Matrix Stiffness Modulates Patient-Derived Glioblastoma Cell Fates in Three-Dimensional Hydrogels. *Tissue engineering. Part A* **2021**, *27*, 390-401, doi:10.1089/ten.TEA.2020.0110.
68. Grundy, T.J.; De Leon, E.; Griffin, K.R.; et al. Differential response of patient-derived primary glioblastoma cells to environmental stiffness. *Sci Rep* **2016**, *6*, 23353, doi:10.1038/srep23353.
69. Streitberger, K.J.; Reiss-Zimmermann, M.; Freimann, F.B.; et al. High-resolution mechanical imaging of glioblastoma by multifrequency magnetic resonance elastography. *PLoS One* **2014**, *9*, e110588, doi:10.1371/journal.pone.0110588.
70. Fløgstad Svensson, S.; Fuster-Garcia, E.; Latysheva, A.; et al. Decreased tissue stiffness in glioblastoma by MR elastography is associated with increased cerebral blood flow. *European journal of radiology* **2022**, *147*, 110136, doi:10.1016/j.ejrad.2021.110136.
71. Cieśluk, M.; Pogoda, K.; Deptuła, P.; et al. Nanomechanics and Histopathology as Diagnostic Tools to Characterize Freshly Removed Human Brain Tumors. *International journal of nanomedicine* **2020**, *15*, 7509-7521, doi:10.2147/ijn.S270147.
72. Monzo, P.; Crestani, M.; Chong, Y.K.; et al. Adaptive mechanoproperties mediated by the formin FMN1 characterize glioblastoma fitness for invasion. *Developmental cell* **2021**, *56*, 2841-2855.e2848, doi:10.1016/j.devcel.2021.09.007.
73. Kim, S.N.; Jeibmann, A.; Halama, K.; et al. ECM stiffness regulates glial migration in *Drosophila* and mammalian glioma models. *Development (Cambridge, England)* **2014**, *141*, 3233-3242, doi:10.1242/dev.106039.
74. Pathak, A.; Kumar, S. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 10334-10339, doi:10.1073/pnas.1118073109.
75. Tao, B.; Song, Y.; Wu, Y.; et al. Matrix stiffness promotes glioma cell stemness by activating BCL9L/Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Aging* **2021**, *13*, 5284-5296, doi:10.18632/aging.202449.
76. Miroshnikova, Y.A.; Mouw, J.K.; Barnes, J.M.; et al. Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1 $\alpha$ -tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nature cell biology* **2016**, *18*, 1336-1345, doi:10.1038/ncb3429.

77. Brösicke, N.; Faissner, A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell adhesion & migration* **2015**, *9*, 131-140, doi:10.1080/19336918.2014.1000071.
78. Latijnhouwers, M.A.; de Jongh, G.J.; Bergers, M.; et al. Expression of tenascin-C splice variants by human skin cells. *Archives of dermatological research* **2000**, *292*, 446-454, doi:10.1007/s004030000152.
79. Latijnhouwers, M.; Bergers, M.; Ponec, M.; et al. Human epidermal keratinocytes are a source of tenascin-C during wound healing. *The Journal of investigative dermatology* **1997**, *108*, 776-783, doi:10.1111/1523-1747.ep12292170.
80. Herold-Mende, C.; Mueller, M.M.; Bonsanto, M.M.; et al. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer* **2002**, *98*, 362-369, doi:10.1002/ijc.10233.
81. Brösicke, N.; van Landeghem, F.K.; Scheffler, B.; et al. Tenascin-C is expressed by human glioma in vivo and shows a strong association with tumor blood vessels. *Cell Tissue Res* **2013**, *354*, 409-430, doi:10.1007/s00441-013-1704-9.
82. Jallo, G.I.; Friedlander, D.R.; Kelly, P.J.; et al. Tenascin-C expression in the cyst wall and fluid of human brain tumors correlates with angiogenesis. *Neurosurgery* **1997**, *41*, 1052-1059, doi:10.1097/00006123-199711000-00007.
83. Kim, C.H.; Bak, K.H.; Kim, Y.S.; et al. Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surgical neurology* **2000**, *54*, 235-240, doi:10.1016/s0090-3019(00)00307-4.
84. Tanaka, K.; Hiraiwa, N.; Hashimoto, H.; et al. Tenascin-C regulates angiogenesis in tumor through the regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* **2004**, *108*, 31-40, doi:10.1002/ijc.11509.
85. Yoshida, T.; Akatsuka, T.; Imanaka-Yoshida, K. Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell adhesion & migration* **2015**, *9*, 96-104, doi:10.1080/19336918.2015.1008332.
86. Orend, G.; Chiquet-Ehrismann, R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett* **2006**, *244*, 143-163, doi:10.1016/j.canlet.2006.02.017.
87. Murphy-Ullrich, J.E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The Journal of clinical investigation* **2001**, *107*, 785-790, doi:10.1172/jci12609.
88. Nagaharu, K.; Zhang, X.; Yoshida, T.; et al. Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells. *Am J Pathol* **2011**, *178*, 754-763, doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.015.
89. Qian, Y.; Liu, X.; Feng, Y.; et al. Tenascin C regulates cancer cell glycolysis and tumor progression in prostate cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* **2022**, *29*, 578-585, doi:10.1111/iju.14830.
90. Kawamura, T.; Yamamoto, M.; Suzuki, K.; et al. Tenascin-C Produced by Intestinal Myofibroblasts Promotes Colitis-associated Cancer Development Through Angiogenesis. *Inflammatory bowel diseases* **2019**, *25*, 732-741, doi:10.1093/ibd/izy368.
91. Yalcin, F.; Dzaye, O.; Xia, S. Tenascin-C Function in Glioma: Immunomodulation and Beyond. *Adv Exp Med Biol* **2020**, *1272*, 149-172, doi:10.1007/978-3-030-48457-6\_9.
92. Rolle, K.; Nowak, S.; Wyszko, E.; et al. Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). **2010**, *9*, 397-407.
93. Wawrzyniak, D.; Grabowska, M.; Głodowicz, P.; et al. Down-regulation of tenascin-C inhibits breast cancer cells development by cell growth, migration, and adhesion impairment. *PLoS One* **2020**, *15*, e0237889, doi:10.1371/journal.pone.0237889.
94. Angel, I.; Pilo Kerman, O.; Rousso-Noori, L.; et al. Tenascin C promotes cancer cell plasticity in mesenchymal glioblastoma. *Oncogene* **2020**, *39*, 6990-7004, doi:10.1038/s41388-020-01506-6.
95. Hess, K.R.; Broglio, K.R.; Bondy, M.L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. *Cancer* **2004**, *101*, 2293-2299, doi:10.1002/cncr.20621.

96. Sanai, N.; Alvarez-Buylla, A.; Berger, M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 811-822, doi:10.1056/NEJMra043666.
97. Rauch, U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2004**, *61*, 2031-2045, doi:10.1007/s00018-004-4043-x.
98. Rupp, T.; Langlois, B.; Koczorowska, M.M.; et al. Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis by Modulation of Pro- and Anti-angiogenic Signaling. *Cell reports* **2016**, *17*, 2607-2619, doi:10.1016/j.celrep.2016.11.012.
99. Behrem, S.; Zarković, K.; Eskinja, N.; et al. Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. *Pathology oncology research : POR* **2005**, *11*, 229-235, doi:10.1007/bf02893856.
100. Hirata, E.; Arakawa, Y.; Shirahata, M.; et al. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer science* **2009**, *100*, 1451-1459, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01189.x.
101. Zhang, J.F.; Tao, T.; Wang, K.; et al. IL-33/ST2 axis promotes glioblastoma cell invasion by accumulating tenascin-C. *Sci Rep* **2019**, *9*, 20276, doi:10.1038/s41598-019-56696-1.
102. Zagzag, D.; Shiff, B.; Jallo, G.I.; et al. Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Cancer Res* **2002**, *62*, 2660-2668.
103. Deryugina, E.I.; Bourdon, M.A. Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. *Journal of cell science* **1996**, *109 ( Pt 3)*, 643-652, doi:10.1242/jcs.109.3.643.
104. Ma, D.; Liu, S.; Lal, B.; et al. Extracellular Matrix Protein Tenascin C Increases Phagocytosis Mediated by CD47 Loss of Function in Glioblastoma. *Cancer Res* **2019**, *79*, 2697-2708, doi:10.1158/0008-5472.Can-18-3125.
105. Mirzaei, R.; Sarkar, S.; Dzikowski, L.; et al. Brain tumor-initiating cells export tenascin-C associated with exosomes to suppress T cell activity. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1478647, doi:10.1080/2162402x.2018.1478647.
106. Huang, J.Y.; Cheng, Y.J.; Lin, Y.P.; et al. Extracellular matrix of glioblastoma inhibits polarization and transmigration of T cells: the role of tenascin-C in immune suppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2010**, *185*, 1450-1459, doi:10.4049/jimmunol.0901352.
107. Huang, W.; Chiquet-Ehrismann, R.; Moyano, J.V.; et al. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res* **2001**, *61*, 8586-8594.
108. Alves, T.R.; da Fonseca, A.C.; Nunes, S.S.; et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental cell research* **2011**, *317*, 2073-2085, doi:10.1016/j.yexcr.2011.06.006.
109. Sarkar, S.; Mirzaei, R.; Zemp, F.J.; et al. Activation of NOTCH Signaling by Tenascin-C Promotes Growth of Human Brain Tumor-Initiating Cells. *Cancer Res* **2017**, *77*, 3231-3243, doi:10.1158/0008-5472.Can-16-2171.
110. Miranda-Filho, A.; Piñeros, M.; Soerjomataram, I.; et al. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. *Neuro Oncol* **2017**, *19*, 270-280, doi:10.1093/neuonc/now166.
111. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* **2019**, *144*, 1941-1953, doi:10.1002/ijc.31937.
112. Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Truitt, G.; et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol* **2018**, *20*, iv1-iv86, doi:10.1093/neuonc/noy131.
113. Molinaro, A.M.; Taylor, J.W.; Wiencke, J.K.; et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature reviews. Neurology* **2019**, *15*, 405-417, doi:10.1038/s41582-019-0220-2.

114. Mrowczynski, O.D.; Yang, A.L.; Liao, J.; et al. The Potential of Glioblastoma Patient Symptoms to Diagnose and Predict Survival. *Cureus* **2021**, *13*, e16675, doi:10.7759/cureus.16675.
115. Leo, R.J.; Frodey, J.N.; Ruggieri, M.L. Subtle neuropsychiatric symptoms of glioblastoma multiforme misdiagnosed as depression. *BMJ case reports* **2020**, *13*, doi:10.1136/bcr-2019-233208.
116. Tucha, O.; Smely, C.; Preier, M.; et al. Cognitive deficits before treatment among patients with brain tumors. *Neurosurgery* **2000**, *47*, 324-333; discussion 333-324, doi:10.1097/00006123-200008000-00011.
117. Khan, F.; Khan, S.; Masud, S.; et al. Glioblastoma multiforme misdiagnosed as squint: A case report. *Journal of family medicine and primary care* **2020**, *9*, 4418-4420, doi:10.4103/jfmpc.jfmpc\_541\_20.
118. Wen, P.Y.; Macdonald, D.R.; Reardon, D.A.; et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 1963-1972, doi:10.1200/jco.2009.26.3541.
119. Young, G.S. Advanced MRI of adult brain tumors. *Neurologic clinics* **2007**, *25*, 947-973, viii, doi:10.1016/j.ncl.2007.07.010.
120. Price, S.J.; Gillard, J.H. Imaging biomarkers of brain tumour margin and tumour invasion. *The British journal of radiology* **2011**, *84 Spec No 2*, S159-167, doi:10.1259/bjr/26838774.
121. Richardson, T.E.; Kumar, A.; Xing, C.; et al. Overcoming the Odds: Toward a Molecular Profile of Long-Term Survival in Glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* **2020**, *79*, 1031-1037, doi:10.1093/jnen/nlaa102.
122. Tykocki, T.; Eltayeb, M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *J Clin Neurosci* **2018**, *54*, 7-13, doi:10.1016/j.jocn.2018.05.002.
123. Marton, E.; Giordan, E.; Siddi, F.; et al. Over ten years overall survival in glioblastoma: A different disease? *Journal of the neurological sciences* **2020**, *408*, 116518, doi:10.1016/j.jns.2019.116518.
124. Rao, A.M.; Quddusi, A.; Shamim, M.S. The significance of MGMT methylation in Glioblastoma Multiforme prognosis. *J Pak Med Assoc* **2018**, *68*, 1137-1139.
125. Binabaj, M.M.; Bahrami, A.; ShahidSales, S.; et al. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 378-386, doi:10.1002/jcp.25896.
126. Senders, J.T.; Staples, P.; Mehrtash, A.; et al. An Online Calculator for the Prediction of Survival in Glioblastoma Patients Using Classical Statistics and Machine Learning. *Neurosurgery* **2020**, *86*, E184-E192, doi:10.1093/neuros/nyz403.
127. Wang, Z.; Wang, Y.; Yang, T.; et al. Machine learning revealed stemness features and a novel stemness-based classification with appealing implications in discriminating the prognosis, immunotherapy and temozolomide responses of 906 glioblastoma patients. *Brief Bioinform* **2021**, *22*, doi:10.1093/bib/bbab032.
128. Deltour, I.; Auvinen, A.; Feychting, M.; et al. Mobile phone use and incidence of glioma in the Nordic countries 1979-2008: consistency check. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* **2012**, *23*, 301-307, doi:10.1097/EDE.0b013e3182448295.
129. Benson, V.S.; Pirie, K.; Schüz, J.; et al. Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study. *International journal of epidemiology* **2013**, *42*, 792-802, doi:10.1093/ije/dyt072.
130. Koeman, T.; van den Brandt, P.A.; Slottje, P.; et al. Occupational extremely low-frequency magnetic field exposure and selected cancer outcomes in a prospective Dutch cohort. *Cancer causes & control : CCC* **2014**, *25*, 203-214, doi:10.1007/s10552-013-0322-x.
131. Navas-Acién, A.; Pollán, M.; Gustavsson, P.; et al. Interactive effect of chemical substances and occupational electromagnetic field exposure on the risk of gliomas and meningiomas in Swedish men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **2002**, *11*, 1678-1683.

132. Samanic, C.M.; De Roos, A.J.; Stewart, P.A.; et al. Occupational exposure to pesticides and risk of adult brain tumors. *American journal of epidemiology* **2008**, *167*, 976-985, doi:10.1093/aje/kwm401.
133. Ménégos, F.; Little, J.; Colonna, M.; et al. Contacts with animals and humans as risk factors for adult brain tumours. An international case-control study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2002**, *38*, 696-704, doi:10.1016/s0959-8049(01)00423-3.
134. Viel, J.F.; Challier, B.; Pitard, A.; et al. Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. *Archives of environmental health* **1998**, *53*, 65-70, doi:10.1080/00039899809605690.
135. Provost, D.; Cantagrel, A.; Lebailly, P.; et al. Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occupational and environmental medicine* **2007**, *64*, 509-514, doi:10.1136/oem.2006.028100.
136. Braganza, M.Z.; Kitahara, C.M.; Berrington de González, A.; et al. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol* **2012**, *14*, 1316-1324, doi:10.1093/neuonc/nos208.
137. Brenner, A.V.; Sugiyama, H.; Preston, D.L.; et al. Radiation risk of central nervous system tumors in the Life Span Study of atomic bomb survivors, 1958-2009. *European journal of epidemiology* **2020**, *35*, 591-600, doi:10.1007/s10654-019-00599-y.
138. Taylor, A.J.; Little, M.P.; Winter, D.L.; et al. Population-based risks of CNS tumors in survivors of childhood cancer: the British Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 5287-5293, doi:10.1200/jco.2009.27.0090.
139. Neglia, J.P.; Robison, L.L.; Stovall, M.; et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of the National Cancer Institute* **2006**, *98*, 1528-1537, doi:10.1093/jnci/djj411.
140. Yamanaka, R.; Hayano, A.; Kanayama, T. Radiation-induced gliomas: a comprehensive review and meta-analysis. *Neurosurgical review* **2018**, *41*, 719-731, doi:10.1007/s10143-016-0786-8.
141. Prasad, G.; Haas-Kogan, D.A. Radiation-induced gliomas. *Expert review of neurotherapeutics* **2009**, *9*, 1511-1517, doi:10.1002/pmic.200800802.
142. Sun, Q.; Xu, R.; Xu, H.; et al. Extracranial metastases of high-grade glioma: the clinical characteristics and mechanism. *World J Surg Oncol* **2017**, *15*, 181, doi:10.1186/s12957-017-1249-6.
143. Nørøxe, D.S.; Poulsen, H.S.; Lassen, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO open* **2016**, *1*, e000144, doi:10.1136/esmoopen-2016-000144.
144. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
145. Lakomy, R.; Kazda, T.; Selingerova, I.; et al. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front Oncol* **2020**, *10*, 840, doi:10.3389/fonc.2020.00840.
146. D'Amico, R.S.; Englander, Z.K.; Canoll, P.; et al. Extent of Resection in Glioma-A Review of the Cutting Edge. *World Neurosurg* **2017**, *103*, 538-549, doi:10.1016/j.wneu.2017.04.041.
147. Nabavi, A.; Thurm, H.; Zountsas, B.; et al. Five-aminolevulinic acid for fluorescence-guided resection of recurrent malignant gliomas: a phase ii study. *Neurosurgery* **2009**, *65*, 1070-1076; discussion 1076-1077, doi:10.1227/01.NEU.0000360128.03597.C7.
148. Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* **2006**, *7*, 392-401, doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
149. Coburger, J.; Nabavi, A.; König, R.; et al. Contemporary use of intraoperative imaging in glioma surgery: A survey among EANS members. *Clinical neurology and neurosurgery* **2017**, *163*, 133-141, doi:10.1016/j.clineuro.2017.10.033.
150. Agar, N.Y.; Golby, A.J.; Ligon, K.L.; et al. Development of stereotactic mass spectrometry for brain tumor surgery. *Neurosurgery* **2011**, *68*, 280-289; discussion 290, doi:10.1227/NEU.0b013e3181ff9cbb.



151. Kut, C.; Chaichana, K.L.; Xi, J.; et al. Detection of human brain cancer infiltration ex vivo and in vivo using quantitative optical coherence tomography. *Science translational medicine* **2015**, *7*, 292ra100, doi:10.1126/scitranslmed.3010611.
152. Bao, S.; Wu, Q.; McLendon, R.E.; et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **2006**, *444*, 756-760, doi:10.1038/nature05236.
153. Combs, S.E.; Thilmann, C.; Edler, L.; et al. Efficacy of fractionated stereotactic reirradiation in recurrent gliomas: long-term results in 172 patients treated in a single institution. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 8863-8869, doi:10.1200/JCO.2005.03.4157.
154. Fogh, S.E.; Andrews, D.W.; Glass, J.; et al. Hypofractionated stereotactic radiation therapy: an effective therapy for recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 3048-3053, doi:10.1200/JCO.2009.25.6941.
155. Wang, T.J.C.; Wu, C.C.; Jani, A.; et al. Hypofractionated radiation therapy versus standard fractionated radiation therapy with concurrent temozolomide in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma. *Pract Radiat Oncol* **2016**, *6*, 306-314, doi:10.1016/j.prro.2015.12.001.
156. Wardman, P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **2007**, *19*, 397-417, doi:10.1016/j.clon.2007.03.010.
157. Raleigh, D.R.; Haas-Kogan, D.A. Molecular targets and mechanisms of radiosensitization using DNA damage response pathways. *Future Oncol* **2013**, *9*, 219-233, doi:10.2217/fon.12.185.
158. Bache, M.; Zschornak, M.P.; Passin, S.; et al. Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions. *Radiation oncology (London, England)* **2011**, *6*, 111, doi:10.1186/1748-717x-6-111.
159. Ali, M.Y.; Oliva, C.R.; Noman, A.S.M.; et al. Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12092511.
160. Gessler, D.J.; Ferreira, C.; Dusenbery, K.; et al. GammaTile<sup>®</sup>: Surgically targeted radiation therapy for glioblastomas. *Future Oncol* **2020**, *16*, 2445-2455, doi:10.2217/fon-2020-0558.
161. Lawrie, T.A.; Gillespie, D.; Dowswell, T.; et al. Long-term neurocognitive and other side effects of radiotherapy, with or without chemotherapy, for glioma. *The Cochrane database of systematic reviews* **2019**, *8*, Cd013047, doi:10.1002/14651858.CD013047.pub2.
162. Fleischmann, D.F.; Schön, R.; Corradini, S.; et al. Multifocal high-grade glioma radiotherapy safety and efficacy. *Radiation oncology (London, England)* **2021**, *16*, 165, doi:10.1186/s13014-021-01886-3.
163. Stevens, M.F.; Hickman, J.A.; Stone, R.; et al. Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3 H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *Journal of medicinal chemistry* **1984**, *27*, 196-201, doi:10.1021/jm00368a016.
164. Dhodapkar, M.; Rubin, J.; Reid, J.M.; et al. Phase I trial of temozolomide (NSC 362856) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **1997**, *3*, 1093-1100.
165. Denny, B.J.; Wheelhouse, R.T.; Stevens, M.F.; et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9045-9051, doi:10.1021/bi00197a003.
166. Pegg, A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation research* **2000**, *462*, 83-100, doi:10.1016/s1383-5742(00)00017-x.
167. Hirose, Y.; Berger, M.S.; Pieper, R.O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* **2001**, *61*, 1957-1963.
168. Trivedi, R.N.; Almeida, K.H.; Fornsgaglio, J.L.; et al. The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res* **2005**, *65*, 6394-6400, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0715.
169. Dario, A.; Tomei, G. The safety of the temozolomide in patients with malignant glioma. *Current drug safety* **2006**, *1*, 205-222, doi:10.2174/157488606776930535.
170. Scaringi, C.; De Sanctis, V.; Minniti, G.; et al. Temozolomide-related hematologic toxicity. *Onkologie* **2013**, *36*, 444-449, doi:10.1159/000353752.

171. Trent, S.; Kong, A.; Short, S.C.; et al. Temozolomide as second-line chemotherapy for relapsed gliomas. *J Neurooncol* **2002**, *57*, 247-251, doi:10.1023/a:1015788814667.
172. Kocher, M.; Kunze, S.; Eich, H.T.; et al. Efficacy and toxicity of postoperative temozolomide radiochemotherapy in malignant glioma. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* **2005**, *181*, 157-163, doi:10.1007/s00066-005-1314-x.
173. Choi, S.; Yu, Y.; Grimmer, M.R.; et al. Temozolomide-associated hypermutation in gliomas. *Neuro Oncol* **2018**, *20*, 1300-1309, doi:10.1093/neuonc/noy016.
174. Johnson, B.E.; Mazor, T.; Hong, C.; et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science (New York, N.Y.)* **2014**, *343*, 189-193, doi:10.1126/science.1239947.
175. Hunter, C.; Smith, R.; Cahill, D.P.; et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Res* **2006**, *66*, 3987-3991, doi:10.1158/0008-5472.Can-06-0127.
176. Eshhar, Z.; Waks, T.; Gross, G.; et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 720-724, doi:10.1073/pnas.90.2.720.
177. Grupp, S.A.; Kalos, M.; Barrett, D.; et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 1509-1518, doi:10.1056/NEJMoa1215134.
178. Porter, D.L.; Levine, B.L.; Kalos, M.; et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **2011**, *365*, 725-733, doi:10.1056/NEJMoa1103849.
179. Koneru, M.; Purdon, T.J.; Spriggs, D.; et al. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e994446, doi:10.4161/2162402X.2014.994446.
180. Kunkele, A.; Taraseviciute, A.; Finn, L.S.; et al. Preclinical Assessment of CD171-Directed CAR T-cell Adoptive Therapy for Childhood Neuroblastoma: CE7 Epitope Target Safety and Product Manufacturing Feasibility. *Clin Cancer Res* **2017**, *23*, 466-477, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0354.
181. Priceman, S.J.; Tilakawardane, D.; Jeang, B.; et al. Regional Delivery of Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells Effectively Targets HER2(+) Breast Cancer Metastasis to the Brain. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 95-105, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2041.
182. O'Rourke, D.M.; Nasrallah, M.P.; Desai, A.; et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science translational medicine* **2017**, *9*, doi:10.1126/scitranslmed.aaa0984.
183. Choe, J.H.; Watchmaker, P.B.; Simic, M.S.; et al. SynNotch-CAR T cells overcome challenges of specificity, heterogeneity, and persistence in treating glioblastoma. *Science translational medicine* **2021**, *13*, doi:10.1126/scitranslmed.abe7378.
184. Majzner, R.G.; Ramakrishna, S.; Yeom, K.W.; et al. GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature* **2022**, *603*, 934-941, doi:10.1038/s41586-022-04489-4.
185. Gera, N.; Yang, A.; Holtzman, T.S.; et al. Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit. *PLoS One* **2015**, *10*, e0125269, doi:10.1371/journal.pone.0125269.
186. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama* **2017**, *318*, 2306-2316, doi:10.1001/jama.2017.18718.
187. Liu, S.; Shi, W.; Zhao, Q.; et al. Progress and prospect in tumor treating fields treatment of glioblastoma. *Biomed Pharmacother* **2021**, *141*, 111810, doi:10.1016/j.biopha.2021.111810.

188. Heute, D.; Kostron, H.; von Guggenberg, E.; et al. Response of Recurrent High-Grade Glioma to Treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC. **2010**, *51*, 397-400, doi:10.2967/jnumed.109.072819 %J Journal of Nuclear Medicine.
189. Kneifel, S.; Cordier, D.; Good, S.; et al. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance p. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 3843-3850, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-2820.
190. Waitz, D.; Putzer, D.; Kostron, H.; et al. Treatment of high-grade glioma with radiolabeled peptides. *Methods (San Diego, Calif.)* **2011**, *55*, 223-229, doi:10.1016/j.ymeth.2011.09.004.
191. Martuza, R.L.; Malick, A.; Markert, J.M.; et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science (New York, N.Y.)* **1991**, *252*, 854-856, doi:10.1126/science.1851332.
192. Todo, T.; Martuza, R.L.; Rabkin, S.D.; et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 6396-6401, doi:10.1073/pnas.101136398.
193. Whitley, R.J.; Kern, E.R.; Chatterjee, S.; et al. Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. *The Journal of clinical investigation* **1993**, *91*, 2837-2843, doi:10.1172/jci116527.
194. Sundaresan, P.; Hunter, W.D.; Martuza, R.L.; et al. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *Journal of virology* **2000**, *74*, 3832-3841, doi:10.1128/jvi.74.8.3832-3841.2000.
195. Foreman, P.M.; Friedman, G.K.; Cassady, K.A.; et al. Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2017**, *14*, 333-344, doi:10.1007/s13311-017-0516-0.
196. van der Meel, R.; Symons, M.H.; Kudernatsch, R.; et al. The VEGF/Rho GTPase signalling pathway: a promising target for anti-angiogenic/anti-invasion therapy. *Drug discovery today* **2011**, *16*, 219-228, doi:10.1016/j.drudis.2011.01.005.
197. Wan, G.; Liu, Y.; Zhu, J.; et al. SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Cellular signalling* **2019**, *59*, 1-12, doi:10.1016/j.cellsig.2019.03.004.
198. Liao, G.; Ma, H.; Li, Y.; et al. Selenium nanoparticles inhibit tumor metastasis in prostate cancer through upregulated miR-155-5p-related pathway. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2021**, *85*, 287-296, doi:10.1093/bbb/zbba089.
199. Lin, T.H.; Hsu, W.H.; Tsai, P.H.; et al. Dietary flavonoids, luteolin and quercetin, inhibit invasion of cervical cancer by reduction of UBE2S through epithelial-mesenchymal transition signaling. *Food & function* **2017**, *8*, 1558-1568, doi:10.1039/c6fo00551a.
200. Fabian, C.; Han, M.; Bjerkgvig, R.; et al. Novel facets of glioma invasion. *International review of cell and molecular biology* **2021**, *360*, 33-64, doi:10.1016/bs.ircmb.2020.08.001.
201. Salhia, B.; Tran, N.L.; Symons, M.; et al. Molecular pathways triggering glioma cell invasion. *Expert review of molecular diagnostics* **2006**, *6*, 613-626, doi:10.1586/14737159.6.4.613.
202. Rolle, K.; Nowak, S.; Wyszko, E.; et al. Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer Biol Ther* **2010**, *9*, 396-406, doi:10.4161/cbt.9.5.10958.
203. Perini, G.; Palmieri, V.; Ciasca, G.; et al. Graphene Quantum Dots' Surface Chemistry Modulates the Sensitivity of Glioblastoma Cells to Chemotherapeutics. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21176301.
204. Markovic, Z.M.; Ristic, B.Z.; Arskin, K.M.; et al. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7084-7092, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.060.
205. Bucharskaya, A.B.; Khlebtsov, N.G.; Khlebtsov, B.N.; et al. Photothermal and Photodynamic Therapy of Tumors with Plasmonic Nanoparticles: Challenges and Prospects. *Materials (Basel, Switzerland)* **2022**, *15*, doi:10.3390/ma15041606.

206. Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) %J Pure and Applied Chemistry. **2012**, *84*, 377-410, doi:doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04.
207. Prylutsky, Y.I.; Petrenko, V.I.; Ivankov, O.I.; et al. On the origin of C<sub>60</sub> fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2014**, *30*, 3967-3970, doi:10.1021/la404976k.
208. Alipour, E.; Alimohammady, F.; Yumashev, A.; et al. Fullerene C60 containing porphyrin-like metal center as drug delivery system for ibuprofen drug. *Journal of molecular modeling* **2019**, *26*, 7, doi:10.1007/s00894-019-4267-1.
209. Shipkowski, K.A.; Sanders, J.M.; McDonald, J.D.; et al. Disposition of fullerene C60 in rats following intratracheal or intravenous administration. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **2019**, *49*, 1078-1085, doi:10.1080/00498254.2018.1528646.
210. Zhou, Z.; Lenk, R.; Dellinger, A.; et al. Fullerene nanomaterials potentiate hair growth. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2009**, *5*, 202-207, doi:10.1016/j.nano.2008.09.005.
211. Malhotra, N.; Audira, G.; Castillo, A.L.; et al. An Update Report on the Biosafety and Potential Toxicity of Fullerene-Based Nanomaterials toward Aquatic Animals. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2021**, *2021*, 7995223, doi:10.1155/2021/7995223.
212. Boudou, J.P.; Curmi, P.A.; Jelezko, F.; et al. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 235602, doi:10.1088/0957-4484/20/23/235602.
213. Tzeng, Y.K.; Zhang, J.L.; Lu, H.; et al. Vertical-Substrate MPCVD Epitaxial Nanodiamond Growth. *Nano letters* **2017**, *17*, 1489-1495, doi:10.1021/acs.nanolett.6b04543.
214. Pichot, V.; Risse, B.; Schnell, F.; et al. Understanding ultrafine nanodiamond formation using nanostructured explosives. *Sci Rep* **2013**, *3*, 2159, doi:10.1038/srep02159.
215. Lu, M.; Wang, Y.K.; Zhao, J.; et al. PEG Grafted-Nanodiamonds for the Delivery of Gemcitabine. *Macromolecular rapid communications* **2016**, *37*, 2023-2029, doi:10.1002/marc.201600344.
216. Yoo, W.; Lee, W.; Kim, H.N.; et al. Nanodiamond as a Cytokine Sponge in Infectious Diseases. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2022**, *10*, 862495, doi:10.3389/fbioe.2022.862495.
217. Holmannova, D.; Borsky, P.; Svadlakova, T.; et al. Reproductive and Developmental Nanotoxicity of Carbon Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2022**, *12*, doi:10.3390/nano12101716.
218. Bekyarova, E.; Ni, Y.; Malarkey, E.B.; et al. Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine. *Journal of biomedical nanotechnology* **2005**, *1*, 3-17, doi:10.1166/jbn.2005.004.
219. Awasthi, K.; Srivastava, A.; Srivastava, O.N. Synthesis of carbon nanotubes. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2005**, *5*, 1616-1636, doi:10.1166/jnn.2005.407.
220. Mirmusavi, M.H.; Ahmadian, M.; Karbasi, S. Polycaprolactone-chitosan/multi-walled carbon nanotube: A highly strengthened electrospun nanocomposite scaffold for cartilage tissue engineering. *Int J Biol Macromol* **2022**, *209*, 1801-1814, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.152.
221. Lemos, R.; Maia, F.R.; Ribeiro, V.P.; et al. Carbon nanotube-reinforced cell-derived matrix-silk fibroin hierarchical scaffolds for bone tissue engineering applications. *Journal of materials chemistry. B* **2021**, *9*, 9561-9574, doi:10.1039/d1tb01972d.
222. Maleki, R.; Afrouzi, H.H.; Hosseini, M.; et al. pH-sensitive loading/releasing of doxorubicin using single-walled carbon nanotube and multi-walled carbon nanotube: A molecular dynamics study. *Computer methods and programs in biomedicine* **2020**, *186*, 105210, doi:10.1016/j.cmpb.2019.105210.
223. Pippa, N.; Chronopoulos, D.D.; Stellas, D.; et al. Design and development of multi-walled carbon nanotube-liposome drug delivery platforms. *Int J Pharm* **2017**, *528*, 429-439, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.043.

224. Bora, H.; Mandal, D.; Chandra, A. High-Performance, Nitrogen-Doped, Carbon-Nanotube-Based Electrochemical Sensor For Vitamin D3 Detection. *ACS applied bio materials* **2022**, *5*, 1721-1730, doi:10.1021/acsabm.2c00094.
225. Rai, M.; Ingle, A.P.; Birla, S.; et al. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical reviews in microbiology* **2016**, *42*, 696-719, doi:10.3109/1040841x.2015.1018131.
226. Liu, C.; Hou, Y.; Gao, M. Are rare-earth nanoparticles suitable for in vivo applications? *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2014**, *26*, 6922-6932, doi:10.1002/adma.201305535.
227. Xiong, L.; Yang, T.; Yang, Y.; et al. Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7078-7085, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.065.
228. Boyer, J.C.; Manseau, M.P.; Murray, J.I.; et al. Surface modification of upconverting NaYF4 nanoparticles with PEG-phosphate ligands for NIR (800 nm) biolabeling within the biological window. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26*, 1157-1164, doi:10.1021/la902260j.
229. Turkevich, J.; Stevenson, P.C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75, doi:10.1039/DF9511100055.
230. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The journal of physical chemistry. B* **2006**, *110*, 15700-15707, doi:10.1021/jp061667w.
231. Dolgaev, S.I.; Simakin, A.V.; Voronov, V.V.; et al. Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. *Applied Surface Science* **2002**, *186*, 546-551, doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00634-1).
232. Tien, D.-C.; Tseng, K.-H.; Liao, C.-Y.; et al. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. *Journal of Alloys and Compounds* **2008**, *463*, 408-411, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2007.09.048>.
233. Huang, H.; Yang, Y. Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions. *Composites Science and Technology* **2008**, *68*, 2948-2953, doi:<https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2007.10.003>.
234. Malik, P.; Shankar, R.; Malik, V.; et al. Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis. *Journal of Nanoparticles* **2014**, *2014*, 302429, doi:10.1155/2014/302429.
235. Kowshik, M.; Ashtaputre, S.; Kharrazi, S.; et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology* **2002**, *14*, 95-100, doi:10.1088/0957-4484/14/1/321.
236. Si, S.; Mandal, T.K. Tryptophan-based peptides to synthesize gold and silver nanoparticles: a mechanistic and kinetic study. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2007**, *13*, 3160-3168, doi:10.1002/chem.200601492.
237. Anila, P.A.; Keerthiga, B.; Ramesh, M.; et al. Synthesis and characterization of palladium nanoparticles by chemical and green methods: A comparative study on hepatic toxicity using zebrafish as an animal model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2021**, *244*, 108979, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.108979>.
238. Soliman, W.E.; Khan, S.; Rizvi, S.M.D.; et al. Therapeutic Applications of Biostable Silver Nanoparticles Synthesized Using Peel Extract of Benincasa hispida: Antibacterial and Anticancer Activities. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2020**, *10*, doi:10.3390/nano10101954.
239. Ansar, S.; Tabassum, H.; Aladwan, N.S.M.; et al. Eco friendly silver nanoparticles synthesis by Brassica oleracea and its antibacterial, anticancer and antioxidant properties. *Sci Rep* **2020**, *10*, 18564, doi:10.1038/s41598-020-74371-8.
240. Nordmeier, A.; Merwin, A.; Roeper, D.F.; et al. Microbial synthesis of metallic molybdenum nanoparticles. *Chemosphere* **2018**, *203*, 521-525, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.02.079.

241. Manivasagan, P.; Nam, S.Y.; Oh, J. Marine microorganisms as potential biofactories for synthesis of metallic nanoparticles. *Critical reviews in microbiology* **2016**, *42*, 1007-1019, doi:10.3109/1040841x.2015.1137860.
242. Zhang, P.; Xu, X.Y.; Zhang, X.L.; et al. Nanoparticles-EPS corona increases the accumulation of heavy metals and biotoxicity of nanoparticles. *Journal of hazardous materials* **2021**, *409*, 124526, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124526.
243. Chen, P.C.; Liu, G.; Zhou, Y.; et al. Tip-Directed Synthesis of Multimetallic Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 9167-9173, doi:10.1021/jacs.5b05139.
244. Yang, M.; Lu, F.; Zhou, T.; et al. Biosynthesis of nano bimetallic Ag/Pt alloy from Crocus sativus L. extract: Biological efficacy and catalytic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, *212*, 112025, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112025>.
245. Yang, M.; Lu, F.; Zhou, T.; et al. Biosynthesis of nano bimetallic Ag/Pt alloy from Crocus sativus L. extract: Biological efficacy and catalytic activity. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2020**, *212*, 112025, doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.112025.
246. Argueta-Figueroa, L.; Morales-Luckie, R.A.; Scougall-Vilchis, R.J.; et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu–Ni nanoparticles for potential use in dental materials. *Progress in Natural Science: Materials International* **2014**, *24*, 321-328, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2014.07.002>.
247. Mykhaylyk, O.; Antequera, Y.S.; Vlaskou, D.; et al. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature protocols* **2007**, *2*, 2391-2411, doi:10.1038/nprot.2007.352.
248. Sayyad, A.S.; Balakrishnan, K.; Ci, L.; et al. Synthesis of iron nanoparticles from hemoglobin and myoglobin. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 055602, doi:10.1088/0957-4484/23/5/055602.
249. Hoag, G.E.; Collins, J.B.; Holcomb, J.L.; et al. Degradation of bromothymol blue by 'greener' nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19*, 8671-8677, doi:10.1039/B909148C.
250. Bennet, M.; Bertinetti, L.; Neely, R.K.; et al. Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday discussions* **2015**, *181*, 71-83, doi:10.1039/c4fd00240g.
251. Bennet, M.; McCarthy, A.; Fix, D.; et al. Influence of magnetic fields on magneto-aerotaxis. *PLoS One* **2014**, *9*, e101150, doi:10.1371/journal.pone.0101150.
252. Lefèvre, C.T.; Bennet, M.; Landau, L.; et al. Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria. *Biophys J* **2014**, *107*, 527-538, doi:10.1016/j.bpj.2014.05.043.
253. Mirabello, G.; Lenders, J.J.; Sommerdijk, N.A. Bioinspired synthesis of magnetite nanoparticles. *Chemical Society reviews* **2016**, *45*, 5085-5106, doi:10.1039/c6cs00432f.
254. Gharpure, S.; Ankamwar, B. Synthesis and Antimicrobial Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2020**, *20*, 5977-5996, doi:10.1166/jnn.2020.18707.
255. Keerthana, S.; Kumar, A. Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. *Critical reviews in toxicology* **2020**, *50*, 47-71, doi:10.1080/10408444.2020.1726282.
256. Pinho, A.R.; Rebelo, S.; Pereira, M.L. The Impact of Zinc Oxide Nanoparticles on Male (In)Fertility. *Materials (Basel, Switzerland)* **2020**, *13*, doi:10.3390/ma13040849.
257. Singh, S. Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology mechanisms and methods* **2019**, *29*, 300-311, doi:10.1080/15376516.2018.1553221.
258. Schneider, W.D.H.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. Lignin nanoparticles enter the scene: A promising versatile green tool for multiple applications. *Biotechnology advances* **2021**, *47*, 107685, doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107685.
259. Mikušová, V.; Mikuš, P. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22179652.

260. Li, H.; Yin, D.; Li, W.; et al. Polydopamine-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and therapy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2021**, *199*, 111502, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111502.
261. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *75*, 1-18, doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>.
262. Kim, J.; Wilson, D.R.; Zamboni, C.G.; et al. Targeted polymeric nanoparticles for cancer gene therapy. *Journal of drug targeting* **2015**, *23*, 627-641, doi:10.3109/1061186x.2015.1048519.
263. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2012**, *161*, 505-522, doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
264. Zhi, K.; Raji, B.; Nookala, A.R.; et al. PLGA Nanoparticle-Based Formulations to Cross the Blood-Brain Barrier for Drug Delivery: From R&D to cGMP. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13040500.
265. Han, F.Y.; Thurecht, K.J.; Whittaker, A.K.; et al. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Frontiers in pharmacology* **2016**, *7*, 185, doi:10.3389/fphar.2016.00185.
266. Varde, N.K.; Pack, D.W. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert opinion on biological therapy* **2004**, *4*, 35-51, doi:10.1517/14712598.4.1.35.
267. Lee, Y.H.; Bai, M.Y.; Chen, D.R. Multidrug encapsulation by coaxial tri-capillary electrospray. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, *82*, 104-110, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.08.022.
268. Markel, J.E.; Lacinski, R.A.; Lindsey, B.A. Nanocapsule Delivery of IL-12. *Adv Exp Med Biol* **2020**, *1257*, 155-168, doi:10.1007/978-3-030-43032-0\_13.
269. Cao, W.; Mantanona, A.J.; Mao, H.; et al. Radical-Enriched Artificial Melanin. *Chemistry of Materials* **2020**, *32*, 5759-5767, doi:10.1021/acs.chemmater.0c01573.
270. Xiao, M.; Shawkey, M.D.; Dhinojwala, A.J.A.O.M. Bioinspired melanin-based optically active materials. **2020**, *8*, 2000932.
271. Son, J.; Yi, G.; Yoo, J.; et al. Light-responsive nanomedicine for biophotonic imaging and targeted therapy. *Advanced drug delivery reviews* **2019**, *138*, 133-147, doi:10.1016/j.addr.2018.10.002.
272. Hoang Thi, T.T.; Pilkington, E.H.; Nguyen, D.H.; et al. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers* **2020**, *12*, doi:10.3390/polym12020298.
273. Grabowska, M.; Grześkowiak, B.F.; Szutkowski, K.; et al. Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme. *PLoS One* **2019**, *14*, e0213852, doi:10.1371/journal.pone.0213852.
274. Zhu, Y.; Prommana, P.; Hosmane, N.S.; et al. Functionalized Boron Nanoparticles as Potential Promising Antimalarial Agents. *ACS omega* **2022**, *7*, 5864-5869, doi:10.1021/acsomega.1c05888.
275. Imran, M.; Jha, S.K.; Hasan, N.; et al. Overcoming Multidrug Resistance of Antibiotics via Nanodelivery Systems. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14030586.
276. Artounian, K.; Bundogji, N.; Hoss, E.; et al. Applications of Gold and Silver Nanoparticles in the Treatment of Acne Vulgaris: A Systematic Review. *Journal of drugs in dermatology : JDD* **2021**, *20*, 666-670, doi:10.36849/jdd.2021.5762.
277. Joshy, K.S.; George, A.; Jose, J.; et al. Novel dendritic structure of alginate hybrid nanoparticles for effective anti-viral drug delivery. *Int J Biol Macromol* **2017**, *103*, 1265-1275, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.094.
278. Behzadi, M.; Vakili, B.; Ebrahiminezhad, A.; et al. Iron nanoparticles as novel vaccine adjuvants. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2021**, *159*, 105718, doi:10.1016/j.ejps.2021.105718.

279. Dykman, L.A.; Staroverov, S.A.; Fomin, A.S.; et al. Gold nanoparticles as an adjuvant: Influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production. *International Immunopharmacology* **2018**, *54*, 163-168, doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.008>.
280. Kumar, R.; Ray, P.C.; Datta, D.; et al. Nanovaccines for malaria using Plasmodium falciparum antigen Pfs25 attached gold nanoparticles. *Vaccine* **2015**, *33*, 5064-5071, doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.025>.
281. Carroll, E.C.; Jin, L.; Mori, A.; et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity* **2016**, *44*, 597-608, doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004>.
282. Fischer, N.O.; Infante, E.; Ishikawa, T.; et al. Conjugation to nickel-chelating nanolipoprotein particles increases the potency and efficacy of subunit vaccines to prevent West Nile encephalitis. *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*, 1018-1022, doi:10.1021/bc100083d.
283. Neto, L.M.M.; Zufelato, N.; de Sousa-Júnior, A.A.; et al. Specific T cell induction using iron oxide based nanoparticles as subunit vaccine adjuvant. *Human vaccines & immunotherapeutics* **2018**, *14*, 2786-2801, doi:10.1080/21645515.2018.1489192.
284. Aragon-Sanabria, V.; Aditya, A.; Zhang, L.; et al. Ultrasmall Nanoparticle Delivery of Doxorubicin Improves Therapeutic Index for High-Grade Glioma. *Clin Cancer Res* **2022**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-4053.
285. Lan, W.; Zhang, H.; Yang, B. Preliminary Study on the Therapeutic Effect of Doxorubicin-Loaded Targeting Nanoparticles on Glioma. *Appl Bionics Biomech* **2022**, *2022*, 6405400, doi:10.1155/2022/6405400.
286. Hua, H.; Zhang, X.; Mu, H.; et al. RVG29-modified docetaxel-loaded nanoparticles for brain-targeted glioma therapy. *Int J Pharm* **2018**, *543*, 179-189, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.03.028.
287. Lan, Q.H.; Du, C.C.; Yu, R.J.; et al. Disulfiram-loaded copper sulfide nanoparticles for potential anti-glioma therapy. *Int J Pharm* **2021**, *607*, 120978, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120978.
288. Fu, Y.; An, N.; Li, K.; et al. Chlorotoxin-conjugated nanoparticles as potential glioma-targeted drugs. *J Neurooncol* **2012**, *107*, 457-462, doi:10.1007/s11060-011-0763-6.
289. Sathiyaseelan, A.; Saravanakumar, K.; Jayalakshmi, J.; et al. Trigonelline-loaded chitosan nanoparticles prompted antitumor activity on glioma cells and biocompatibility with pheochromocytoma cells. *Int J Biol Macromol* **2020**, *163*, 36-43, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.165.
290. Gamage, N.H.; Jing, L.; Worsham, M.J.; et al. Targeted Theranostic Approach for Glioma Using Dendrimer-Based Curcumin Nanoparticle. *J Nanomed Nanotechnol* **2016**, *7*, doi:10.4172/2157-7439.1000393.
291. Grabowska, M.; Grzeskowiak, B.F.; Szutkowski, K.; et al. Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme. *PLoS One* **2019**, *14*, e0213852, doi:10.1371/journal.pone.0213852.
292. Mirzaei, S.; Mahabady, M.K.; Zabolian, A.; et al. Small interfering RNA (siRNA) to target genes and molecular pathways in glioblastoma therapy: Current status with an emphasis on delivery systems. *Life sciences* **2021**, *275*, 119368, doi:10.1016/j.lfs.2021.119368.
293. Yoo, J.Y.; Yeh, M.; Kaur, B.; et al. Targeted delivery of small noncoding RNA for glioblastoma. *Cancer Lett* **2021**, *500*, 274-280, doi:10.1016/j.canlet.2020.11.004.
294. Kang, J.H.; Cho, J.; Ko, Y.T. Investigation on the effect of nanoparticle size on the blood-brain tumour barrier permeability by in situ perfusion via internal carotid artery in mice. *Journal of drug targeting* **2019**, *27*, 103-110, doi:10.1080/1061186x.2018.1497037.
295. Fan, K.; Jia, X.; Zhou, M.; et al. Ferritin Nanocarrier Traverses the Blood Brain Barrier and Kills Glioma. *ACS Nano* **2018**, *12*, 4105-4115, doi:10.1021/acsnano.7b06969.
296. Zhou, Y.; Peng, Z.; Seven, E.S.; et al. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2018**, *270*, 290-303, doi:10.1016/j.jconrel.2017.12.015.



297. Wang, X.Y.; Lei, R.; Huang, H.D.; et al. The permeability and transport mechanism of graphene quantum dots (GQDs) across the biological barrier. *Nanoscale* **2015**, *7*, 2034-2041, doi:10.1039/c4nr04136d.
298. Bai, C.; Tang, M. Progress on the toxicity of quantum dots to model organism-zebrafish. *Journal of applied toxicology : JAT* **2022**, doi:10.1002/jat.4333.
299. Xu, D.; Baidya, A.; Deng, K.; et al. Multifunctional nanoparticle PEG-Ce6-Gd for MRI-guided photodynamic therapy. *Oncol Rep* **2021**, *45*, 547-556, doi:10.3892/or.2020.7871.
300. Eldridge, B.N.; Bernish, B.W.; Fahrenholtz, C.D.; et al. Photothermal therapy of glioblastoma multiforme using multiwalled carbon nanotubes optimized for diffusion in extracellular space. *ACS biomaterials science & engineering* **2016**, *2*, 963-976, doi:10.1021/acsbomaterials.6b00052.
301. Kim, H.S.; Lee, D.Y. Photothermal therapy with gold nanoparticles as an anticancer medication. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2017**, *47*, 19-26, doi:10.1007/s40005-016-0292-6.
302. Estelrich, J.; Busquets, M.A. Iron Oxide Nanoparticles in Photothermal Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23071567.
303. Cao, H.; Yang, Y.; Liang, M.; et al. Pt@polydopamine nanoparticles as nanozymes for enhanced photodynamic and photothermal therapy. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2021**, *57*, 255-258, doi:10.1039/d0cc07355e.
304. Maziukiewicz, D.; Grzeńkowiak, B.F.; Coy, E.; et al. NDs@PDA@ICG Conjugates for Photothermal Therapy of Glioblastoma Multiforme. *Biomimetics (Basel, Switzerland)* **2019**, *4*, doi:10.3390/biomimetics4010003.
305. Jiang, Q.; Liu, Y.; Guo, R.; et al. Erythrocyte-cancer hybrid membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhancing photothermal therapy efficacy in tumors. *Biomaterials* **2019**, *192*, 292-308, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.11.021.
306. Cheng, Y.; Dai, Q.; Morshed, R.A.; et al. Blood-brain barrier permeable gold nanoparticles: an efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2014**, *10*, 5137-5150, doi:10.1002/smll.201400654.
307. Brindle, K.M.; Izquierdo-García, J.L.; Lewis, D.Y.; et al. Brain Tumor Imaging. *J Clin Oncol* **2017**, *35*, 2432-2438, doi:10.1200/jco.2017.72.7636.
308. Huang, R.; Harmsen, S.; Samii, J.M.; et al. High Precision Imaging of Microscopic Spread of Glioblastoma with a Targeted Ultrasensitive SERRS Molecular Imaging Probe. *Theranostics* **2016**, *6*, 1075-1084, doi:10.7150/thno.13842.
309. Tang, L.; Sun, X.; Liu, N.; et al. Radiolabeled Angiogenesis-Targeting Croconaine Nanoparticles for Trimodality Imaging Guided Photothermal Therapy of Glioma. *ACS applied nano materials* **2018**, *1*, 1741-1749, doi:10.1021/acsanm.8b00195.
310. Fuster, E.; Candela, H.; Estévez, J.; et al. Effects of silver nanoparticles on T98G human glioblastoma cells. *Toxicology and applied pharmacology* **2020**, *404*, 115178, doi:10.1016/j.taap.2020.115178.
311. Eugenio, M.; Campanati, L.; Müller, N.; et al. Silver/silver chloride nanoparticles inhibit the proliferation of human glioblastoma cells. *Cytotechnology* **2018**, *70*, 1607-1618, doi:10.1007/s10616-018-0253-1.
312. Silva, V.; Silva, R.N.O.; Colli, L.G.; et al. Gold nanoparticles carrying or not anti-VEGF antibody do not change glioblastoma multiforme tumor progression in mice. *Heliyon* **2020**, *6*, e05591, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05591.
313. Zhang, Y.; Fu, X.; Jia, J.; et al. Glioblastoma Therapy Using Codelivery of Cisplatin and Glutathione Peroxidase Targeting siRNA from Iron Oxide Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces* **2020**, *12*, 43408-43421, doi:10.1021/acscami.0c12042.
314. Arriaga, M.A.; Enriquez, D.M.; Salinas, A.D.; et al. Application of iron oxide nanoparticles to control the release of minocycline for the treatment of glioblastoma. *Future medicinal chemistry* **2021**, *13*, 1833-1843, doi:10.4155/fmc-2021-0098.

315. Grabowska, M.; Grześkowiak, B.F.; Rolle, K.; et al. Magnetic Nanoparticles as a Carrier of dsRNA for Gene Therapy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2021**, *2211*, 69-81, doi:10.1007/978-1-0716-0943-9\_6.
316. Wu, N.; Zhang, C.; Wang, C.; et al. Zinc-doped copper oxide nanocomposites reverse temozolomide resistance in glioblastoma by inhibiting AKT and ERK1/2. *Nanomedicine (London, England)* **2018**, *13*, 1303-1318, doi:10.2217/nnm-2017-0359.
317. Shen, Z.; Liu, T.; Yang, Z.; et al. Small-sized gadolinium oxide based nanoparticles for high-efficiency theranostics of orthotopic glioblastoma. *Biomaterials* **2020**, *235*, 119783, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119783.
318. Müller, N.; Eugenio, M.; Romão, L.F.; et al. Assessing the antiproliferative effect of biogenic silver chloride nanoparticles on glioblastoma cell lines by quantitative image-based analysis. *IET nanobiotechnology* **2021**, *15*, 558-564, doi:10.1049/nbt2.12038.
319. Krętowski, R.; Kusaczuk, M.; Naumowicz, M.; et al. The Pro-Apoptotic Effect of Silica Nanoparticles Depends on Their Size and Dose, as Well as the Type of Glioblastoma Cells. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22073564.
320. Han, S.; Lee, Y.; Lee, M. Biomimetic cell membrane-coated DNA nanoparticles for gene delivery to glioblastoma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2021**, *338*, 22-32, doi:10.1016/j.jconrel.2021.08.021.
321. Ananta, J.S.; Paulmurugan, R.; Massoud, T.F. Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation. *Neurological research* **2016**, *38*, 51-59, doi:10.1080/01616412.2015.1133025.
322. Guan, J.; Qian, J.; Zhan, C. Preparation of Cholera Toxin Subunit B Functionalized Nanoparticles for Targeted Therapy of Glioblastoma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2020**, *2059*, 207-212, doi:10.1007/978-1-4939-9798-5\_10.
323. Gregory, J.V.; Kadiyala, P.; Doherty, R.; et al. Systemic brain tumor delivery of synthetic protein nanoparticles for glioblastoma therapy. *Nature communications* **2020**, *11*, 5687, doi:10.1038/s41467-020-19225-7.
324. Alipour, M.; Reza Bigdeli, M.; Aligholi, H.; et al. Sustained release of silibinin-loaded chitosan nanoparticle induced apoptosis in glioma cells. *J Biomed Mater Res A* **2020**, *108*, 458-469, doi:10.1002/jbm.a.36827.
325. Nicholson, J.G.; Fine, H.A. Diffuse Glioma Heterogeneity and Its Therapeutic Implications. *Cancer discovery* **2021**, *11*, 575-590, doi:10.1158/2159-8290.Cd-20-1474.
326. Poon, M.T.C.; Bruce, M.; Simpson, J.E.; et al. Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines - a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 1240, doi:10.1186/s12885-021-08972-5.
327. Timerman, D.; Yeung, C.M. Identity confusion of glioma cell lines. *Gene* **2014**, *536*, 221-222, doi:10.1016/j.gene.2013.11.096.
328. Paolillo, M.; Comincini, S.; Schinelli, S. In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. *Cancers* **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13102449.
329. Paradiso, F.; Serpelloni, S.; Francis, L.W.; et al. Mechanical Studies of the Third Dimension in Cancer: From 2D to 3D Model. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms221810098.
330. Stylli, S.S.; Luwor, R.B.; Ware, T.M.; et al. Mouse models of glioma. *J Clin Neurosci* **2015**, *22*, 619-626, doi:10.1016/j.jocn.2014.10.013.
331. Miyai, M.; Tomita, H.; Soeda, A.; et al. Current trends in mouse models of glioblastoma. *J Neurooncol* **2017**, *135*, 423-432, doi:10.1007/s11060-017-2626-2.
332. Hicks, W.H.; Bird, C.E.; Pernik, M.N.; et al. Large Animal Models of Glioma: Current Status and Future Prospects. *Anticancer research* **2021**, *41*, 5343-5353, doi:10.21873/anticancer.15347.
333. Tora, M.S.; Texakalidis, P.; Neill, S.; et al. Lentiviral Vector Induced Modeling of High-Grade Spinal Cord Glioma in Minipigs. *Sci Rep* **2020**, *10*, 5291, doi:10.1038/s41598-020-62167-9.

334. Salcman, M.; Scott, E.W.; Schepp, R.S.; et al. Transplantable canine glioma model for use in experimental neuro-oncology. *Neurosurgery* **1982**, *11*, 372-381, doi:10.1227/00006123-198209000-00007.
335. Remick, A.K.; Van Wettere, A.J.; Williams, C.V. Neoplasia in prosimians: case series from a captive prosimian population and literature review. *Veterinary pathology* **2009**, *46*, 746-772, doi:10.1354/vp.08-VP-0154-R-FL.
336. Lee, E.Q.; Chukwueke, U.N.; Hervey-Jumper, S.L.; et al. Barriers to accrual and enrollment in brain tumor trials. *Neuro Oncol* **2019**, *21*, 1100-1117, doi:10.1093/neuonc/noz104.
337. Lathia, J.D.; Mack, S.C.; Mulkearns-Hubert, E.E.; et al. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & development* **2015**, *29*, 1203-1217, doi:10.1101/gad.261982.115.
338. Conti, L.; Crisafulli, L.; Caldera, V.; et al. REST controls self-renewal and tumorigenic competence of human glioblastoma cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e38486, doi:10.1371/journal.pone.0038486.
339. Rahman, M.; Reyner, K.; Deleyrolle, L.; et al. Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. *Anatomy & cell biology* **2015**, *48*, 25-35, doi:10.5115/acb.2015.48.1.25.
340. Tanaka, S.; Luk, S.; Kiyokawa, J.; et al. Genetically distinct glioma stem-like cell xenografts established from paired glioblastoma samples harvested before and after molecularly targeted therapy. *Sci Rep* **2019**, *9*, 139, doi:10.1038/s41598-018-37437-2.
341. Suvà, M.L.; Tirosh, I. The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer Cell* **2020**, *37*, 630-636, doi:10.1016/j.ccell.2020.04.001.
342. Akay, M.; Hite, J.; Avci, N.G.; et al. Drug Screening of Human GBM Spheroids in Brain Cancer Chip. *Sci Rep* **2018**, *8*, 15423, doi:10.1038/s41598-018-33641-2.
343. Yi, H.G.; Jeong, Y.H.; Kim, Y.; et al. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nature biomedical engineering* **2019**, *3*, 509-519, doi:10.1038/s41551-019-0363-x.
344. Dai, X.; Ma, C.; Lan, Q.; et al. 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility. *Biofabrication* **2016**, *8*, 045005, doi:10.1088/1758-5090/8/4/045005.
345. Humpel, C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* **2015**, *305*, 86-98, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.086.
346. Jensen, S.S.; Meyer, M.; Petterson, S.A.; et al. Establishment and Characterization of a Tumor Stem Cell-Based Glioblastoma Invasion Model. *PLoS One* **2016**, *11*, e0159746, doi:10.1371/journal.pone.0159746.
347. Ogawa, J.; Pao, G.M.; Shokhirev, M.N.; et al. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell reports* **2018**, *23*, 1220-1229, doi:10.1016/j.celrep.2018.03.105.
348. Pernik, M.N.; Bird, C.E.; Traylor, J.I.; et al. Patient-Derived Cancer Organoids for Precision Oncology Treatment. *Journal of personalized medicine* **2021**, *11*, doi:10.3390/jpm11050423.
349. Jacob, F.; Salinas, R.D.; Zhang, D.Y.; et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* **2020**, *180*, 188-204.e122, doi:10.1016/j.cell.2019.11.036.
350. Rezaee, F.; Ghanati, F.; Behmanesh, M. Antioxidant activity and expression of catalase gene of (*Eustoma grandiflorum* L) in response to boron and aluminum. *South African Journal of Botany* **2013**, *84*, 13-18, doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.09.006>.
351. Lee, H.; Dellatore, S.M.; Miller, W.M.; et al. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science (New York, N.Y.)* **2007**, *318*, 426-430, doi:10.1126/science.1147241.
352. Chen, H.; Fu, Y.; Feng, K.; et al. Polydopamine-coated UiO-66 nanoparticles loaded with perfluorotributylamine/tirapazamine for hypoxia-activated osteosarcoma therapy. *Journal of nanobiotechnology* **2021**, *19*, 298, doi:10.1186/s12951-021-01013-0.

353. Zmerli, I.; Michel, J.P.; Makky, A. Bioinspired polydopamine nanoparticles: synthesis, nanomechanical properties, and efficient PEGylation strategy. *Journal of materials chemistry. B* **2020**, *8*, 4489-4504, doi:10.1039/c9tb02769f.
354. Zhang, M.; Zhang, F.; Liu, T.; et al. Polydopamine Nanoparticles Camouflaged by Stem Cell Membranes for Synergistic Chemo-Photothermal Therapy of Malignant Bone Tumors. *International journal of nanomedicine* **2020**, *15*, 10183-10197, doi:10.2147/ijn.S282931.
355. Grześkowiak, B.F.; Maziukiewicz, D.; Kozłowska, A.; et al. Polyamidoamine Dendrimers Decorated Multifunctional Polydopamine Nanoparticles for Targeted Chemo- and Photothermal Therapy of Liver Cancer Model. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22020738.
356. He, X.; Lee, B.; Jiang, Y. Cell-ECM Interactions in Tumor Invasion. *Adv Exp Med Biol* **2016**, *936*, 73-91, doi:10.1007/978-3-319-42023-3\_4.
357. Sims, L.B.; Huss, M.K.; Frieboes, H.B.; et al. Distribution of PLGA-modified nanoparticles in 3D cell culture models of hypo-vascularized tumor tissue. *Journal of nanobiotechnology* **2017**, *15*, 67, doi:10.1186/s12951-017-0298-x.
358. Wang, H.; Brown, P.C.; Chow, E.C.Y.; et al. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. *Clinical and translational science* **2021**, *14*, 1659-1680, doi:10.1111/cts.13066.
359. Te Boekhorst, V.; Friedl, P. Plasticity of Cancer Cell Invasion-Mechanisms and Implications for Therapy. *Advances in cancer research* **2016**, *132*, 209-264, doi:10.1016/bs.acr.2016.07.005.
360. Ridley, A.J.; Schwartz, M.A.; Burridge, K.; et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)* **2003**, *302*, 1704-1709, doi:10.1126/science.1092053.
361. Cuddapah, V.A.; Robel, S.; Watkins, S.; et al. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature reviews. Neuroscience* **2014**, *15*, 455-465, doi:10.1038/nrn3765.
362. Schiffer, D.; Annovazzi, L.; Casalone, C.; et al. Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers* **2018**, *11*, doi:10.3390/cancers11010005.
363. Osswald, M.; Jung, E.; Sahm, F.; et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **2015**, *528*, 93-98, doi:10.1038/nature16071.
364. Soroceanu, L.; Manning, T.J., Jr.; Sontheimer, H. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **1999**, *19*, 5942-5954, doi:10.1523/jneurosci.19-14-05942.1999.
365. Beadle, C.; Assanah, M.C.; Monzo, P.; et al. The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Molecular biology of the cell* **2008**, *19*, 3357-3368, doi:10.1091/mbc.e08-03-0319.
366. Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *Journal of cellular biochemistry* **2019**, *120*, 2782-2790, doi:10.1002/jcb.27681.
367. Acerbi, I.; Cassereau, L.; Dean, I.; et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb)* **2015**, *7*, 1120-1134, doi:10.1039/c5ib00040h.
368. Onishi, M.; Ichikawa, T.; Kurozumi, K.; et al. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain tumor pathology* **2011**, *28*, 13-24, doi:10.1007/s10014-010-0007-z.
369. Zhang, J.; Jin, H.Y.; Wu, Y.; et al. Hypoxia-induced LncRNA PCGEM1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer through regulating SNAI1. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* **2019**, *21*, 1142-1151, doi:10.1007/s12094-019-02035-9.
370. Menon, S.; Beningo, K.A. Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS One* **2011**, *6*, e17277, doi:10.1371/journal.pone.0017277.
371. Angelova, P.R.; Abramov, A.Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS letters* **2018**, *592*, 692-702, doi:10.1002/1873-3468.12964.
372. Ohgaki, H.; Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **2007**, *170*, 1445-1453, doi:10.2353/ajpath.2007.070011.

373. Xu, T.J.; Qiu, P.; Zhang, Y.B.; et al. MiR-148a inhibits the proliferation and migration of glioblastoma by targeting ITGA9. *Hum Cell* **2019**, *32*, 548-556, doi:10.1007/s13577-019-00279-9.
374. Li, Y.; Wang, Y.; Yu, L.; et al. miR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16. *Cancer Lett* **2013**, *339*, 260-269, doi:10.1016/j.canlet.2013.06.018.
375. Piwecka, M.; Rolle, K.; Belter, A.; et al. Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues. *Mol Oncol* **2015**, *9*, 1324-1340, doi:10.1016/j.molonc.2015.03.007.
376. Song, L.; Huang, Q.; Chen, K.; et al. miR-218 inhibits the invasive ability of glioma cells by direct downregulation of IKK- $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *402*, 135-140, doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.003.
377. Peng, F.; Gong, W.; Li, S.; et al. circRNA\_010383 Acts as a Sponge for miR-135a, and Its Downregulated Expression Contributes to Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **2021**, *70*, 603-615, doi:10.2337/db20-0203.
378. Zhang, Y.; Tian, K.; Zhou, E.; et al. hsa\_circ\_0023305 Enhances Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Progression and Modulates TRPM7 via miR-218-5p Sponging. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, 9968499, doi:10.1155/2021/9968499.
379. Li, X.; Xie, C.; Xiao, F.; et al. Circular RNA circ\_0000423 regulates cartilage ECM synthesis via circ\_0000423/miRNA-27b-3p/MMP-13 axis in osteoarthritis. *Aging* **2022**, *14*, 3400-3415, doi:10.18632/aging.204018.
380. Grossen, A.; Smith, K.; Coulibaly, N.; et al. Physical Forces in Glioblastoma Migration: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23074055.
381. Jia, D.; Li, S.; Li, D.; et al. Mining TCGA database for genes of prognostic value in glioblastoma microenvironment. *Aging* **2018**, *10*, 592-605, doi:10.18632/aging.101415.
382. Zemla, J.; Danilkiewicz, J.; Orzechowska, B.; et al. Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues. *Semin Cell Dev Biol* **2018**, *73*, 115-124, doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.029.
383. Sen, S.; Dong, M.; Kumar, S. Isoform-specific contributions of alpha-actinin to glioma cell mechanobiology. *PLoS One* **2009**, *4*, e8427, doi:10.1371/journal.pone.0008427.
384. Ramos, J.R.; Pabijan, J.; Garcia, R.; et al. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Beilstein J Nanotechnol* **2014**, *5*, 447-457, doi:10.3762/bjnano.5.52.
385. Zhu, D.; Trinh, P.; Li, J.; et al. Gradient hydrogels for screening stiffness effects on patient-derived glioblastoma xenograft cellfates in 3D. *J Biomed Mater Res A* **2021**, *109*, 1027-1035, doi:10.1002/jbm.a.37093.
386. Wang, S.; Wang, Y.; Xiong, J.; et al. Novel Brain-Stiffness-Mimicking Matrix Gel Enables Comprehensive Invasion Analysis of 3D Cultured GBM Cells. *Frontiers in molecular biosciences* **2022**, *9*, 885806, doi:10.3389/fmolb.2022.885806.
387. Minelli, E.; Sassun, T.E.; Papi, M.; et al. Nanoscale mechanics of brain abscess: An atomic force microscopy study. *Micron* **2018**, *113*, 34-40, doi:10.1016/j.micron.2018.06.012.
388. Lee, S.M.; Nguyen, T.H.; Na, K.; et al. Nanomechanical measurement of astrocyte stiffness correlated with cytoskeletal maturation. *J Biomed Mater Res A* **2015**, *103*, 365-370, doi:10.1002/jbm.a.35174.
389. van Dommelen, J.A.; van der Sande, T.P.; Hrapko, M.; et al. Mechanical properties of brain tissue by indentation: interregional variation. *J Mech Behav Biomed Mater* **2010**, *3*, 158-166, doi:10.1016/j.jmbbm.2009.09.001.
390. Paszek, M.J.; Zahir, N.; Johnson, K.R.; et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 241-254, doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010.
391. Harada, T.; Swift, J.; Irianto, J.; et al. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J Cell Biol* **2014**, *204*, 669-682, doi:10.1083/jcb.201308029.

392. Chen, L.; Jiang, F.; Qiao, Y.; et al. Nucleoskeletal stiffness regulates stem cell migration and differentiation through lamin A/C. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 5112-5118, doi:10.1002/jcp.26336.
393. Hatzikirou, H.; Basanta, D.; Simon, M.; et al. 'Go or grow': the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Math Med Biol* **2012**, *29*, 49-65, doi:10.1093/imammb/dqq011.
394. Caspani, E.M.; Echevarria, D.; Rottner, K.; et al. Live imaging of glioblastoma cells in brain tissue shows requirement of actin bundles for migration. *Neuron glia biology* **2006**, *2*, 105-114, doi:10.1017/s1740925x06000111.
395. Catizone, A.; Ricci, G.; Caruso, M.; et al. HGF Modulates Actin Cytoskeleton Remodeling and Contraction in Testicular Myoid Cells. *Biomedicines* **2015**, *3*, 89-109, doi:10.3390/biomedicines3010089.
396. Lei, C.; Sun, Y.; Tsang, D.C.W.; et al. Environmental transformations and ecological effects of iron-based nanoparticles. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **2018**, *232*, 10-30, doi:10.1016/j.envpol.2017.09.052.
397. Hayyan, M.; Hashim, M.A.; AlNashef, I.M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews* **2016**, *116*, 3029-3085, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00407.
398. Votyakova, T.V.; Reynolds, I.J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* **2001**, *79*, 266-277, doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00548.x.
399. Marchi, S.; Giorgi, C.; Suski, J.M.; et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *Journal of signal transduction* **2012**, *2012*, 329635, doi:10.1155/2012/329635.
400. Lee, S.; Tak, E.; Lee, J.; et al. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation. *Cell research* **2011**, *21*, 817-834, doi:10.1038/cr.2011.55.
401. Glennon-Alty, L.; Hackett, A.P.; Chapman, E.A.; et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free radical biology & medicine* **2018**, *125*, 25-35, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.049.
402. Rosanna, D.P.; Salvatore, C. Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Current pharmaceutical design* **2012**, *18*, 3889-3900, doi:10.2174/138161212802083716.
403. Umeno, A.; Biju, V.; Yoshida, Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free radical research* **2017**, *51*, 413-427, doi:10.1080/10715762.2017.1315114.
404. Srinivas, U.S.; Tan, B.W.Q.; Vellayappan, B.A.; et al. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology* **2019**, *25*, 101084, doi:10.1016/j.redox.2018.101084.
405. Amin, F.; Bano, B. Damage of cystatin due to ROS-generation and radical-scavenging activity of antioxidants and associated compounds. *Int J Biol Macromol* **2018**, *119*, 369-379, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.100.
406. Su, L.J.; Zhang, J.H.; Gomez, H.; et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2019**, *2019*, 5080843, doi:10.1155/2019/5080843.
407. Zhang, S.; He, Y.; Sen, B.; et al. Reactive oxygen species and their applications toward enhanced lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Bioresource technology* **2020**, *307*, 123234, doi:10.1016/j.biortech.2020.123234.
408. Villalpando-Rodriguez, G.E.; Gibson, S.B. Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2021**, *2021*, 9912436, doi:10.1155/2021/9912436.
409. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **1956**, *11*, 298-300, doi:10.1093/geronj/11.3.298.
410. Gladyshev, V.N. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxidants & redox signaling* **2014**, *20*, 727-731, doi:10.1089/ars.2013.5228.
411. Liochev, S.I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free radical biology & medicine* **2013**, *60*, 1-4, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011.

412. Yang, B.; Chen, Y.; Shi, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chemical reviews* **2019**, *119*, 4881-4985, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00626.
413. Dayal, R.; Singh, A.; Pandey, A.; et al. Reactive oxygen species as mediator of tumor radiosensitivity. *Journal of cancer research and therapeutics* **2014**, *10*, 811-818, doi:10.4103/0973-1482.146073.
414. Cheng, K.; Sano, M.; Jenkins, C.H.; et al. Synergistically Enhancing the Therapeutic Effect of Radiation Therapy with Radiation Activatable and Reactive Oxygen Species-Releasing Nanostructures. *ACS Nano* **2018**, *12*, 4946-4958, doi:10.1021/acs.nano.8b02038.
415. Ma, M.; Huang, Y.; Chen, H.; et al. Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>-embedded mesoporous silica nanoparticles for efficient drug delivery and interstitial radiotherapy sensitization. *Biomaterials* **2015**, *37*, 447-455, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.001.
416. Song, G.; Liang, C.; Gong, H.; et al. Core-Shell MnSe@Bi<sub>2</sub>Se<sub>3</sub> Fabricated via a Cation Exchange Method as Novel Nanotheranostics for Multimodal Imaging and Synergistic Thermoradiotherapy. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2015**, *27*, 6110-6117, doi:10.1002/adma.201503006.
417. Song, G.; Chao, Y.; Chen, Y.; et al. All-in-One Theranostic Nanoplatfom Based on Hollow TaOx for Chelator-Free Labeling Imaging, Drug Delivery, and Synergistically Enhanced Radiotherapy. *Advanced Functional Materials* **2016**, *26*, 8243-8254, doi:<https://doi.org/10.1002/adfm.201603845>.
418. Song, G.; Chen, Y.; Liang, C.; et al. Catalase-Loaded TaOx Nanoshells as Bio-Nanoreactors Combining High-Z Element and Enzyme Delivery for Enhancing Radiotherapy. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2016**, *28*, 7143-7148, doi:10.1002/adma.201602111.
419. Liu, J.; Yang, Y.; Zhu, W.; et al. Nanoscale metal-organic frameworks for combined photodynamic & radiation therapy in cancer treatment. *Biomaterials* **2016**, *97*, 1-9, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.04.034.
420. Lu, K.; He, C.; Guo, N.; et al. Low-dose X-ray radiotherapy-radiodynamic therapy via nanoscale metal-organic frameworks enhances checkpoint blockade immunotherapy. *Nature biomedical engineering* **2018**, *2*, 600-610, doi:10.1038/s41551-018-0203-4.
421. Guo, Z.; Zhu, S.; Yong, Y.; et al. Synthesis of BSA-Coated BiOI@Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> Semiconductor Heterojunction Nanoparticles and Their Applications for Radio/Photodynamic/Photothermal Synergistic Therapy of Tumor. **2017**, *29*, 1704136, doi:<https://doi.org/10.1002/adma.201704136>.
422. Raab, O. *Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien*; R. Oldenbourg: 1900.
423. Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; Goldfarb, A.; et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* **1978**, *38*, 2628-2635.
424. Fan, W.; Huang, P.; Chen, X. Overcoming the Achilles' heel of photodynamic therapy. *Chemical Society reviews* **2016**, *45*, 6488-6519, doi:10.1039/C6CS00616G.
425. Hemmer, E.; Benayas, A.; Légaré, F.; et al. Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm. *Nanoscale Horizons* **2016**, *1*, 168-184, doi:10.1039/C5NH00073D.
426. Li, Y.; Lin, T.Y.; Luo, Y.; et al. A smart and versatile theranostic nanomedicine platform based on nanoporphyrin. *Nature communications* **2014**, *5*, 4712, doi:10.1038/ncomms5712.
427. Kovalev, D.; Fujii, M. Silicon Nanocrystals: Photosensitizers for Oxygen Molecules. **2005**, *17*, 2531-2544, doi:<https://doi.org/10.1002/adma.200500328>.
428. Tselosky, D.M.; Creecy, A.E.; Shanmugavelandy, S.S.; et al. Calcium phosphosilicate nanoparticles for imaging and photodynamic therapy of cancer. *Discovery medicine* **2012**, *13*, 275-285.
429. Conte, C.; Maiolino, S.; Pellosi, D.S.; et al. Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy. *Topics in current chemistry* **2016**, *370*, 61-112, doi:10.1007/978-3-319-22942-3\_3.
430. Stefanatos, R.; Sanz, A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS letters* **2018**, *592*, 743-758, doi:10.1002/1873-3468.12902.

431. Simpson, D.S.A.; Oliver, P.L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9080743.
432. Horie, M.; Tabei, Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free radical research* **2021**, *55*, 331-342, doi:10.1080/10715762.2020.1859108.
433. Leonard, S.S.; Harris, G.K.; Shi, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free radical biology & medicine* **2004**, *37*, 1921-1942, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.010.
434. Porter, D.W.; Hubbs, A.F.; Chen, B.T.; et al. Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 1179-1194, doi:10.3109/17435390.2012.719649.
435. Pulskamp, K.; Diabaté, S.; Krug, H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology letters* **2007**, *168*, 58-74, doi:10.1016/j.toxlet.2006.11.001.
436. May, S.; Hirsch, C.; Rippl, A.; et al. Transient DNA damage following exposure to gold nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10*, 15723-15735, doi:10.1039/c8nr03612h.
437. Mohamed, H.R.H.; Welson, M.; Yaseen, A.E.; et al. Induction of chromosomal and DNA damage and histological alterations by graphene oxide nanoparticles in Swiss mice. *Drug and chemical toxicology* **2021**, *44*, 631-641, doi:10.1080/01480545.2019.1643876.
438. El-Demerdash, F.M.; El-Magd, M.A.; El-Sayed, R.A. Panax ginseng modulates oxidative stress, DNA damage, apoptosis, and inflammations induced by silicon dioxide nanoparticles in rats. *Environmental toxicology* **2021**, *36*, 1362-1374, doi:10.1002/tox.23132.
439. Alarifi, S.; Ali, D.; Alkahtani, S.; et al. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. *Biological trace element research* **2014**, *159*, 416-424, doi:10.1007/s12011-014-9972-0.
440. Ghosh, S.; Ghosh, I.; Chakrabarti, M.; et al. Genotoxicity and biocompatibility of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Influence of surface modification on biodistribution, retention, DNA damage and oxidative stress. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2020**, *136*, 110989, doi:10.1016/j.fct.2019.110989.
441. Chen, Z.; Shi, J.; Zhang, Y.; et al. DNA Oxidative Damage as a Sensitive Genetic Endpoint to Detect the Genotoxicity Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2022**, *12*, doi:10.3390/nano12152616.
442. Tang, Q.; Li, T.; Chen, K.; et al. PS-NPs Induced Neurotoxic Effects in SHSY-5Y Cells via Autophagy Activation and Mitochondrial Dysfunction. *Brain sciences* **2022**, *12*, doi:10.3390/brainsci12070952.
443. Jiang, H.; Guo, Y.; Wei, C.; et al. Nanocatalytic Innate Immunity Activation by Mitochondrial DNA Oxidative Damage for Tumor-Specific Therapy. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2021**, *33*, e2008065, doi:10.1002/adma.202008065.
444. Li, J.; Zhang, B.; Chang, X.; et al. Silver nanoparticles modulate mitochondrial dynamics and biogenesis in HepG2 cells. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **2020**, *256*, 113430, doi:10.1016/j.envpol.2019.113430.
445. Huerta-García, E.; Pérez-Arizti, J.A.; Márquez-Ramírez, S.G.; et al. Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free radical biology & medicine* **2014**, *73*, 84-94, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026.
446. Nowak, M.; Brown, T.D.; Graham, A.; et al. Size, shape, and flexibility influence nanoparticle transport across brain endothelium under flow. *Bioengineering & translational medicine* **2020**, *5*, e10153, doi:10.1002/btm2.10153.
447. Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G.U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of nanobiotechnology* **2014**, *12*, 5, doi:10.1186/1477-3155-12-5.
448. Kulkarni, S.A.; Feng, S.S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceutical research* **2013**, *30*, 2512-2522, doi:10.1007/s11095-012-0958-3.



449. Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters* **2006**, *6*, 662-668, doi:10.1021/nl052396o.
450. Jiang, W.; Kim, B.Y.; Rutka, J.T.; et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology* **2008**, *3*, 145-150, doi:10.1038/nnano.2008.30.
451. Liu, X.; Huang, N.; Li, H.; et al. Surface and size effects on cell interaction of gold nanoparticles with both phagocytic and nonphagocytic cells. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2013**, *29*, 9138-9148, doi:10.1021/la401556k.
452. Zhu, J.; Liao, L.; Zhu, L.; et al. Size-dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells. *Talanta* **2013**, *107*, 408-415, doi:10.1016/j.talanta.2013.01.037.
453. Saafan, A.; Zaazou, M.H.; Sallam, M.K.; et al. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. *Open access Macedonian journal of medical sciences* **2018**, *6*, 1289-1295, doi:10.3889/oamjms.2018.241.
454. Bardhan, S.; Pal, K.; Roy, S.; et al. Nanoparticle Size-Dependent Antibacterial Activities in Natural Minerals. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2019**, *19*, 7112-7122, doi:10.1166/jnn.2019.16658.
455. Daneman, R.; Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2015**, *7*, a020412, doi:10.1101/cshperspect.a020412.
456. Ohta, S.; Kikuchi, E.; Ishijima, A.; et al. Investigating the optimum size of nanoparticles for their delivery into the brain assisted by focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *Sci Rep* **2020**, *10*, 18220, doi:10.1038/s41598-020-75253-9.
457. Voigt, N.; Henrich-Noack, P.; Kockentiedt, S.; et al. Surfactants, not size or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2014**, *87*, 19-29, doi:10.1016/j.ejpb.2014.02.013.
458. Woods, S.; O'Brien, L.M.; Butcher, W.; et al. Glucosamine-NISV delivers antibody across the blood-brain barrier: Optimization for treatment of encephalitic viruses. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2020**, *324*, 644-656, doi:10.1016/j.jconrel.2020.05.048.
459. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I.S.; et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* **2004**, *377*, 159-169, doi:10.1042/bj20031253.
460. Linkous, A.; Balamatsias, D.; Snuderl, M.; et al. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell reports* **2019**, *26*, 3203-3211.e3205, doi:10.1016/j.celrep.2019.02.063.
461. Krieger, T.G.; Tirier, S.M.; Park, J.; et al. Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. *Neuro Oncol* **2020**, *22*, 1138-1149, doi:10.1093/neuonc/noaa091.
462. Venkataramani, V.; Yang, Y.; Schubert, M.C.; et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell* **2022**, *185*, 2899-2917.e2831, doi:10.1016/j.cell.2022.06.054.
463. Maloney, E.; Clark, C.; Sivakumar, H.; et al. Immersion Bioprinting of Tumor Organoids in Multi-Well Plates for Increasing Chemotherapy Screening Throughput. *Micromachines* **2020**, *11*, doi:10.3390/mi11020208.
464. Darrigues, E.; Zhao, E.H.; De Loose, A.; et al. Biobanked Glioblastoma Patient-Derived Organoids as a Precision Medicine Model to Study Inhibition of Invasion. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms221910720.
465. Son, J.; Park, S.J.; Ha, T.; et al. Electrophysiological Monitoring of Neurochemical-Based Neural Signal Transmission in a Human Brain-Spinal Cord Assembloid. *ACS sensors* **2022**, *7*, 409-414, doi:10.1021/acssensors.1c02279.
466. Tanaka, T.; Huang, X.; Halicka, H.D.; et al. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry*.



- Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **2007**, *71*, 648-661, doi:10.1002/cyto.a.20426.
467. Maehly, A.C.; Chance, B. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis* **1954**, *1*, 357-424, doi:10.1002/9780470110171.ch14.
468. Nagalakshmi, N.; Prasad, M.N. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **2001**, *160*, 291-299, doi:10.1016/s0168-9452(00)00392-7.
469. Ratajczak, E.; Małecka, A.; Bagniewska-Zadworna, A.; et al. The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* **2015**, *174*, 147-156, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.021>.
470. Sader, J.E.; Larson, I.; Mulvaney, P.; et al. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. **1995**, *66*, 3789-3798, doi:10.1063/1.1145439.
471. Omidvar, R.; Tafazzoli-Shadpour, M.; Shokrgozar, M.A.; et al. Atomic force microscope-based single cell force spectroscopy of breast cancer cell lines: an approach for evaluating cellular invasion. *J Biomech* **2014**, *47*, 3373-3379, doi:10.1016/j.jbiomech.2014.08.002.

## **8. Załączniki**

### **Załącznik 1 – Publikacja „miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells”**

Grabowska, M, Kuczyński, K, et al. miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells. J Cell Mol Med. 2022; 26: 3913- 3930. doi: 10.1111/jcmm.17428 [35]

# miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells

Małgorzata Grabowska<sup>1</sup> | Konrad Kuczyński<sup>1,2</sup>  | Monika Piwecka<sup>1</sup> | Alicja Rabiasz<sup>3</sup> | Joanna Zemła<sup>4</sup> | Paweł Głodowicz<sup>1</sup> | Dariusz Wawrzyniak<sup>1</sup> | Małgorzata Lekka<sup>4</sup> | Katarzyna Rolle<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

<sup>2</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

<sup>3</sup>Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

<sup>4</sup>Institute of Nuclear Physics, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland

## Correspondence

Katarzyna Rolle, Department of Molecular Neurooncology, Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Poland.  
Email: [kbug@ibch.poznan.pl](mailto:kbug@ibch.poznan.pl)

## Funding information

KK was supported by the National Centre for Research and Development (grant no. POWR.03.02.00-00-I032/16); MP was supported by the Polish National Agency for Academic Exchange (grant no. PPN/PPO/2019/1/00035/U/0001) and the National Science Centre (grant no. 2018/30/E/NZ3/00624); and KR was supported by the National Science Centre (grant no. 2017/26/E/NZ3/01004 and grant no. 2017/25/B/NZ3/02173)

## Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most common malignant brain tumour. GBM cells have the ability to infiltrate into the surrounding brain tissue, which results in a significant decrease in the patient's survival rate. Infiltration is a consequence of the low adhesion and high migration of the tumour cells, two features being associated with the highly remodelled extracellular matrix (ECM). In this study, we report that ECM composition is partially regulated at the post-transcriptional level by miRNA. Particularly, we show that miR-218, a well-known miRNA suppressor, is involved in the direct regulation of ECM components, tenascin-C (TN-C) and syndecan-2 (SDC-2). We demonstrated that the overexpression of miR-218 reduces the mRNA and protein expression levels of TN-C and SDC-2, and subsequently influences biomechanical properties of GBM cells. Atomic force microscopy (AFM) and real-time migration analysis revealed that miR-218 overexpression impairs the migration potential and enhances the adhesive properties of cells. AFM analysis followed by F-actin staining demonstrated that the expression level of miR-218 has an impact on cell stiffness and cytoskeletal reorganization. Global gene expression analysis showed deregulation of a number of genes involved in tumour cell motility and adhesion or ECM remodelling upon miR-218 treatment, suggesting further indirect interactions between the cells and ECM. The results demonstrated a direct impact of miR-218 reduction in GBM tumours on the qualitative ECM content, leading to changes in the rigidity of the ECM and GBM cells being conducive to increased invasiveness of GBM.

## KEYWORDS

AFM, ECM, GBM, glioblastoma, miR-218, tenascin-C

Małgorzata Grabowska and Konrad Kuczyński contributed equally to this work and share the first authorship.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

## 1 | INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most malignant astrocytic brain tumour. Despite treatment with advanced therapies, including aggressive surgical intervention, radiotherapy, and systemic chemotherapy, as well as significant advances in the field of oncology, the average survival time for GBM patients is approximately 15 months, with a 5-year survival rate of only 5%.<sup>1,2</sup> The main factor contributing to this poor prognosis is the ability of GBM cells to infiltrate adjacent tissues, resulting in a high rate of tumour recurrence.<sup>3</sup> These notable migration and invasion abilities could be explained by alterations occurring in the structure of cancer cells and their surroundings, defined by mechanobiology.<sup>4</sup>

To promote the invasiveness, cancer cells modify not only themselves but also their environment, namely the extracellular matrix (ECM). It consists of over 300 different proteins, including proteoglycans and glycoproteins.<sup>5</sup> Neoplastic tissues are characterized by the phenomenon of desmoplasia, manifested by the intense formation of a dense ECM consisting of increased levels of total fibrillar collagen, fibronectin, proteoglycans and tenascin-C (TN-C).<sup>6</sup> The capability to synthesize specific and cancer-related ECM components has been shown to be relevant for the high invasiveness of tumour cells. The changed protein profile within ECM increases the stiffness of cancerous tissue,<sup>7,8</sup> which may lead to enhanced cell–ECM adhesion through the involvement of local adhesion proteins. The general trend observed for many types of cells indicates that cell spread and adhesion are improved on harder matrices.<sup>9,10</sup> The effect of the environment on the cells is explained by the mechanotransduction mechanism, in which mechanical and cell-specific signals are actively detected by cells and converted into intracellular biochemical signals. In this manner, the ECM can affect cancer cell behaviour, including invasion and metastasis.<sup>11,12</sup> Therefore, cancer should be considered as a disease with alterations in both cells and their micro-environment, including also the biochemical and biophysical properties of the ECM. Not only proteins suspended in the ECM have an impact on the invasiveness of the tumour, but also transmembrane proteins. The syndecans are a four-member family of evolutionarily conserved small type I transmembrane proteoglycans implicated in the formation of specialized membrane domains, cell adhesion, cytoskeletal organization, migration and wound healing. They have been also related to the pathological conditions, including inflammation and cancer.<sup>13–15</sup> For instance, elevated expression of syndecan-2 (SDC-2) has been correlated with increased invasiveness in various types of cancers, including fibrosarcoma,<sup>16</sup> melanoma,<sup>17</sup> colon,<sup>18</sup> pancreatic<sup>19</sup> and colorectal<sup>20</sup> cancers, while TN-C is overexpressed in brain tumours,<sup>21</sup> breast,<sup>22</sup> lung<sup>23</sup> and colorectal<sup>24</sup> cancers.

In the recent 20 years, microRNAs (miRNAs) have emerged as key regulators of gene expression at the post-transcriptional level. miRNAs are a large family of endogenous, evolutionarily conserved, non-coding RNAs that are ~22 nucleotides long, and they have been implicated in the regulation of nearly every biological process.<sup>25</sup> Deregulated miRNA expression has been shown to play a role in

the pathogenesis of a growing list of human diseases, including cancer and cardiovascular, neurodegenerative and autoimmune disorders.<sup>26–29</sup> For example, in GBM, it has been already demonstrated that the downregulation of miR-218 affects cell proliferation, epithelial-to-mesenchymal transition,<sup>30</sup> metabolism of cancer cells<sup>31</sup> and cancer stem cell properties.<sup>32</sup> How miRNAs are involved in the regulation of ECM composition and the mechanobiology of cancer cells in GBM tumours is largely unknown. In principle, miRNAs can exert their control over the ECM either directly by targeting mRNAs encoding ECM proteins or indirectly by modulating the expression of genes involved in the synthesis or degradation of ECM molecules. Here, we have evidenced that miR-218, one of the highly down-regulated miRNAs in GBM cells, is involved in the direct regulation of TN-C and SDC-2, two highly overrepresented proteins in GBM and ECM components. Both SDC-2 and TN-C have been previously demonstrated to increase tumour cell migration and invasiveness. In the course of the study, we attempted to validate how miR-218 interaction with its ECM targets affects globally a microenvironment and biomechanical properties of GBM cells; we introduced miR-218 mimic into GBM cells and measured the consequences on the migration, adhesion and stiffness properties of individual cancer cells. As demonstrated by real-time migration analysis and single-cell force spectroscopy (SCFS) measurements using contact-mode atomic force microscopy (AFM), overexpression of miR-218 had a pronounced effect on the mechanical properties of GBM cells, influencing their migration potential, adhesion and overall stiffness. Collectively, our results indicate that miR-218 is a potent tumour suppressor in glioma with a substantial impact on the ECM composition and biomechanical properties of GBM.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patient sample collection

The GBM samples ( $n = 19$ ) were obtained from the Clinic of Neurosurgery and Neurotraumatology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in Poznan, Poland, during 2016–2017 based on the approval from the Ethical Committee (Nr. 46/13), and individuals signed an informed consent form.

### 2.2 | Cell culture

Human glioblastoma cell lines U-118 MG, U-138 MG, U-251 MG and T98-G purchased from American Type Culture Collection (ATCC) were used in the study. Cells were maintained in recommended medium, Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, Corning) or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ATCC) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) and 1% penicillin–streptomycin antibiotic (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere in an incubator.

## 2.3 | Transfection

The cells were transfected with *mirVana*<sup>™</sup> hsa-miR-218-5p mimic (Invitrogen) in a final concentration of 10 nM and 50 nM at 70%–80% confluency. Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 (Invitrogen) was used as a transfection agent according to the manufacturer's protocols. A non-specific scrambled siRNA (Sigma-Aldrich) was used as a control in all transfection experiments. The cells were processed after 24 h for the quantification of transcript levels using qPCR, Western blot, cellular assays or AFM analysis.

## 2.4 | Luciferase reporter assay

The TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) analysis predicted the 3'UTR segments of TN-C and SDC-2 interacting with hsa-miR-218-5p. Based on them, 22-nucleotides-long fragments were designed, along with corresponding mutants, characterized by one point mutation and one codon change. As a control was used a perfect match sequence, fully complementary to the miR-218. Oligonucleotides were synthesized by Sigma-Aldrich. Fragments were then ligated with the pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega), transformed by heat shock into TOP10 *Escherichia coli* cells and multiplied. Verified by sequencing, plasmids were transfected together with *mirVana*<sup>™</sup> hsa-miR-218-5p mimic to the U-118 glioblastoma cell line. Luciferase activity was analysed with Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System (Promega) by the manufacturer's instructions using the Synergy<sup>™</sup> HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek).

## 2.5 | Western blots

U-118 MG cells were lysed by sonication for protein isolation in 10 nM Tris-HCl, pH = 7.5 with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein expression glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) level was used as an endogenous control. For TN-C, SDC-2 and GAPDH detection, 25 µg of isolated material was used. Protein was denatured, separated by SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) on 7.5% for TN-C and 15% gels for SDC-2 and GAPDH detection, with electric current 30 mA and wet transferred to the polyvinylidene fluoride membrane using electric current 130 mA, and blocked with 5% skimmed milk. After incubation with primary and secondary antibodies, proteins of interest were detected with Western Bright Sirius Chemiluminescent Detection Kit (Advansta). The following antibodies were used: polyclonal TN-C H-300 (dilution 1:500; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal SDC-2-267088-1-Ig (dilution 1:500; Proteintech), monoclonal GAPDH 0411 (dilution 1:500; Santa Cruz Biotechnology) and anti-mouse A9044/rabbit A6154 peroxidase (dilution 1:10,000; Sigma-Aldrich). TN-C and GAPDH antibodies were diluted in 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich), and others, in skimmed milk.

The intensity of individual bands was analysed quantitatively by Multi Gauge ver. 2.0 (Fujifilm). The relative ratio of protein-level expression was determined based on the densitometric measurements of band intensities in relation to the control sample.

## 2.6 | qRT-PCR

Total RNA was isolated using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Afterwards, RNA was purified with the DNA-free<sup>™</sup> DNA Removal Kit (Ambion). The reverse transcription reaction was carried out with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) according to the manufacturer's protocol, using in each case 500 ng of RNA material. The reverse transcription for miRNA was performed by two-step miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies). cDNA was used in real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), with the use of LightCycler<sup>®</sup>480 (Roche), in three technical replicates. Primers with corresponding probes were designed in the Universal Probe Library Assay Design Center (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>). Relative expression was analysed in the LightCycler<sup>®</sup>480 Software release 1.5.1.62 (Roche). The level of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as an endogenous control for analysis of extracellular matrix proteins. In case of miR-218, the level of 18S ribosomal RNA was used for normalization. Sequences of primers 5'-3' and list of probes were as follows: TN-C forward: GGGATTAATGTCGGAAATGGT; TN-C reverse: CCGGACCAAAACCATCAGT; TN-C probe: 76; SDC-2 forward: TTATCAGATGTCAGCTCTGCTCTC; SDC-2 reverse: GTGGATCCTGCTCACCTTG; SDC-2 probe: 49; HPRT forward: CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT; HPRT reverse: TGACCTTGATTTATTTTGCATACC; HPRT probe: 73; miR-218: TTGTGCTTGATCTAACCATGT; R18 forward: CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG; and R18 reverse: CGCCGCTAGAGGTGAAATTC. As a control, RNA from normal, healthy brains (Ambion, First Choice<sup>®</sup> Human Brain Reference RNA, Cat # 6050, whole brain pooled from 10 females and 13 men, Caucasian, age: 23–86) was used.

## 2.7 | PCR array of human cell motility, extracellular matrix and adhesion molecules

U-118 MG cells treated with miR218 mimic were collected for total RNA isolation with ExtractME Total RNA Kit (Blirt) according to the manufacturer's protocol. 900 ng of RNA was used in the reverse transcription procedure with RT<sup>2</sup> Easy First Strand Kit (Qiagen). cDNA mixed with the RT<sup>2</sup> SYBR Green was then evenly aliquoted onto the RT<sup>2</sup> profiler plates: Human Cell Motility, and Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules (Qiagen). qRT-PCRs were conducted in LightCycler<sup>®</sup>480 (Roche), and subsequently analysed by software provided online by Qiagen.

## 2.8 | Real-time migration

Real-time cell migration monitoring was performed in the xCELLigence® system using the RTCA DP apparatus (ACEA Biosciences). The experiment was carried out on 16-well CIM-Plates, in which culture medium enriched with FBS, served as a chemoattractant, was applied into lower part of the CIM-Plate. To the upper chamber was applied an unsupplemented medium. The first stage of the experiment served to measure the background of electrical impedance. Then, 10,000 U-118 MG cells treated with miR-218 mimic were seeded on the upper chamber of the plate. The CIM-Plate was installed in the RTCA apparatus; from that moment, for further 48 h, the system registered the level of electrical impedance every 15 min. The results of the experiment were presented in the cell index unit of the xCELLigence® system, which corresponded to the measured impedance minus the impedance of the background. The experimental curves were adjusted to the sigmoidal equation and the half-time effective migration values (effective time 50, ET 50) were calculated.

## 2.9 | Wound healing assay

U-118 MG cells were grown to achieve 90% of confluency on 12-well plates and then transfected with miR-218 mimic. After the medium is changed, scratches were created by scraping cells in a straight line using a 200- $\mu$ l tip. From that moment on, for 72 h at 12-h intervals, pictures of the culture were taken by a Leica DMI4000 B inverted microscope with 5x magnification objective. The analysis of the degree of the individual scratch area was carried out by the Tscratch software version 1.0 (CSElab). That software is based on novel algorithm for measuring the open image area that utilizes discrete curvelet transform for separating the low-intensity open area and the high-intensity cell-covered area. Then, a grey visible mask is created for cell-free areas. The wound surface area and its change in time are calculated automatically by software.

## 2.10 | Real-time proliferation

The use of the xCELLigence® system enabled the observation of real-time cell proliferation. In that experiment were used the E-Plates (ACEA Biosciences), whose well bottoms are covered with gold microelectrodes. The test was started by measuring the background impedance of supplemented medium by placing them in the RTCA DP apparatus (ACEA Biosciences) and making the first measurement. Then, 10000 U-118 MG cells were seeded on the same plate and incubated for 24 h under optimal growth conditions. From that moment on, until the end of the experiment, the system performed impedance measurements at 15-min intervals. After 24 h, the cells were transfected with miR-218 mimic, and measurements were continued for the next 48 h. The results are presented by the cell index unit. The normalization time point corresponds to the moment of transfection.

## 2.11 | Thymidine incorporation assay

The cell culture was transfected and resumed for 20 h. Subsequently, a tritiated thymidine ([methyl-3 H]-thymidine)-labelled solution with final radioactivity of 1  $\mu$ Ci per well was added for another four hours. To detach the cells, they were placed for 30 min at  $-80^{\circ}\text{C}$  and then thawed at  $37^{\circ}\text{C}$ . The plate was placed in the MicroBeta FilterMate-96 harvester, where the cells were transferred to the fibreglass filter paper Filtermat A (PerkinElmer) by three washes. Dried Filtermat A was placed in the plastic sample bags, and flooded with Betaplate Scint for Betaplete (PerkinElmer), then moved into the MicroBeta<sup>2</sup> radiometric detector (PerkinElmer), which recorded the number of radioactive pulses per minute (counts per minute, cpm). As a positive control, cells treated with camptothecin (CPT) at a final concentration of 3  $\mu\text{M}$  were used.

## 2.12 | Real-time adhesion

The xCELLigence® system together with the E-Plates PET (ACEA Biosciences) was used. In each well of them, four rows of microelectrode sensors are removed, creating a window for cell visualization. Plates were covered with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich), incubated for one hour in  $37^{\circ}\text{C}$  and rinsed with phosphate-buffered saline (PBS, VWR Life Science). Additionally, some wells were overlaid with 1% BSA for 20 min and acted as a negative control. An unsupplemented medium was analysed as a background. Then, 24 h earlier transfected cells were seeded 10,000 cells per well in serum-free medium. Measurements took place every three minutes for four hours.

## 2.13 | Single-cell force spectroscopy (SCFS)

Cell deformability and adhesiveness were determined from the AFM measurements carried out in single-cell force spectroscopy (SCFS) mode using CellHesion head (JPK Instruments). In SCFS, adhesion was quantified as a work of adhesion determined as an area under the part of the force curve corresponded to force/work needed to detach a single cell from surface. To prepare a cell force probe, the standard tipless cantilevers (Arrow-TL, NanoWorld) characterized by nominal spring constant of 0.06 N/m were used. The average spring constant was  $0.067 \pm 0.016$  N/m, as verified by the Sader method.<sup>33</sup> First, bare cantilevers were cleaned and activated with an oxygen plasma for 2 min at the maximum power of 100 W (Diener Electronic GmbH, Zepto 1 device). Afterwards, cantilevers were immersed in 2 mg/ml concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich) solution in PBS buffer (Sigma-Aldrich) for 1 h and washed three times in PBS buffer. To use an individual cell as a force probe, the trypsinized solution of transfected cells was added to Petri dish (diameter 3.5 cm, Sarstedt) filled with DMEM with FBS, in which SCFS measurements were performed. Then, Con A-functionalized cantilever was placed above a single cell and moved closer to its surface, followed by pressing it for

about 5 s with the force of 5 nN. Afterwards, a slow cantilever with-drawing was applied until the cell fully detached from the surface. After 15–20 min of a pause time, the cell was usually attached to the cantilever surface. From this moment, the cell was used as a probe to collect force curves. For a single force probe, on average 5 force maps (scan size of 20  $\mu\text{m}$   $\times$  20  $\mu\text{m}$ , on which a grid 6 pixels  $\times$  6 pixels was set) were recorded in randomly chosen locations on Petri dish surface. For a given sample type, 8–9 living cell force probes were used. For each sample type, on average 1800 individual force curves were recorded and analysed. The approach and retract speeds were kept at 8  $\mu\text{m/s}$ . The measurement depth was 200 nm. As tipless cantilevers were used and the cell diameter was lower than the width of the cantilever, we treated our system like a single cell in between two fixed and compressive plates. Thus, from the approach part of the force curve, cell stiffness (N/m) was determined from a slope of the approach curve after contact with a cell surface (a linear regression was applied). Cell stiffness is calculated as a slope taking into account the range from the contact point to the maximum load force (maximum cantilever deflection). In parallel, from the retract part of the force curve, work of adhesion was calculated as an area under this part of force curves corresponding to adhesion using the methodology described elsewhere.<sup>34,35</sup>

## 2.14 | Cytoskeleton imaging

For structural cytoskeleton analysis, U-118 MG cells were cultured on microscope coverslips and transfected under standard conditions as described previously. 24 h post-transfection, cells were fixed with the use of Image-iT™ Fixation/Permeabilization Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. F-actin fibres were visualized by phalloidin conjugated to tetramethylrhodamine (Invitrogen) with simultaneous use of DAPI (Sigma-Aldrich) to visualize cell nuclei. Staining was performed according to the manufacturer's protocol. Pictures were obtained with the use of Leica TCS SP5 confocal microscope and software LAS X SP8 (Leica).

## 2.15 | Gene expression analysis based on the Gliovis database

TN-C and SDC-2 gene expression analysis for large groups of patients was performed using the Gliovis online tool ([gliovis.bioinfo.cnio.es](http://gliovis.bioinfo.cnio.es)). In order to comprehensively present the expression of these genes in large group of tissues, databases from two independent projects (TCGA and Rembrandt) were used. Data set HG-U133A contained information from 10 non-tumour samples and 528 samples described as GBM. The Agilent-4502A data set contained the same number of healthy samples and 489 samples of glioblastoma. The Rembrandt database, on the contrary, has a set of 28 healthy samples, 225 described as non-tumour glioma and 219 GBM samples. Only the “non-tumour” and “GBM” data sets were used from the Rembrandt database.

## 2.16 | Statistical analysis

The results are presented as a mean value  $\pm$  standard deviation (SD). They were averaged depending on the applied methods. For AFM measurements, averaging was performed for 8–9 cell force probes. For other experiments, 3 biological replicates were applied. The statistical significance of the obtained results was evaluated using the Open Office Calc ver. 4.1.1 (Apache) and GraphPad Prism ver. 5.1 (GraphPad Software). Differences between the mean values of the test and the control samples were evaluated using ANOVA variance extended by the Tukey or the Bonferroni post hoc tests. Statistically significant results were assigned as: \* for  $p < .05$ ; \*\* for  $p < .01$ ; and \*\*\* for  $p < .001$ ; no statistical significance was found for  $p \geq .05$ .

## 3 | RESULTS

### 3.1 | In glioblastoma, the expression level of miR-218 correlates inversely with the expression levels of the ECM components TN-C and SDC-2

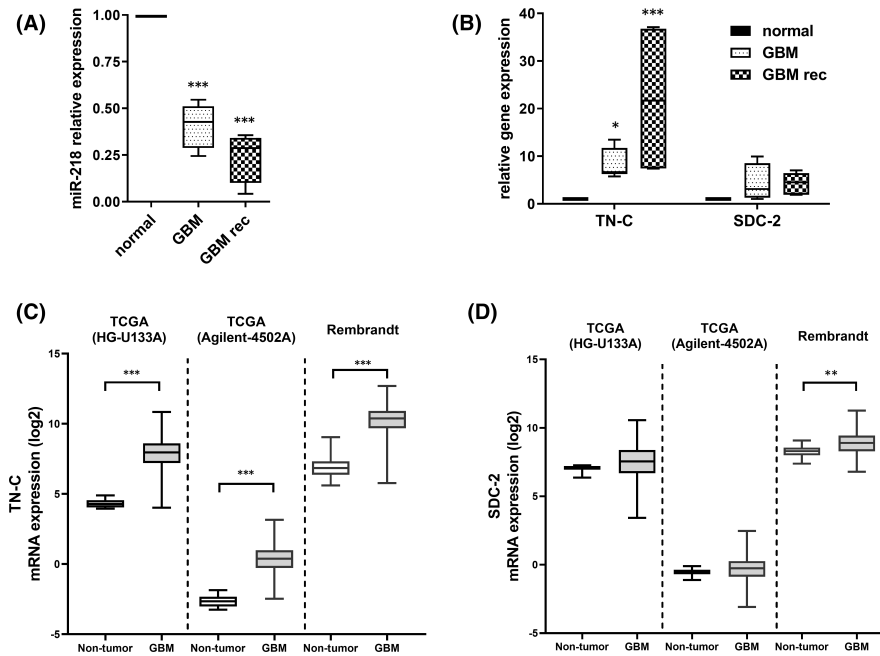
Our previous study revealed that there were 97 miRNAs differentially expressed in glioblastoma compared with those in the healthy brain.<sup>36</sup> Forty-one of these miRNAs showed a reduced expression level in malignant gliomas. Among these miRNAs, we found miR-218 to be significantly downregulated in brain tumour tissues. We further confirmed the expression level of miR-218 in primary and recurrent GBM via qRT-PCR analysis (Figure 1A). The levels of miR-218 expression in primary tumour tissue and recurrent GBM tissue were 56% and 69% lower, respectively, than those in healthy brain tissue.

Given the profound downregulation of miR-218 in GBM, we sought to investigate its putative targets. To identify the binding sites in the 3'UTRs of genes that can be potentially regulated by selected miRNAs, we used prediction software such as ENCORI, miRDB, PicTar and TargetScan. Interestingly, among the predicted targets, we found several genes encoding ECM proteins, such as tenascin-C (TN-C), syndecan-2 (SDC-2), attractin (ATRN), cadherin-2 (CDH-2), cadherin-8 (CDH-8), extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 2 (ELFN2), fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2 (FLRT2), hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1), 5-hydroxytryptamine receptor 7 (HTR7), neurocan (NCAN), proteoglycan (PRG4), reelin (RELN) and sarcoglycan zeta (SGCZ) (Supplementary information 1).

### 3.2 | TN-C and SDC-2 are direct targets of miR-218

Highly ranked binding targets of miR-218 were subjected to further analysis. We focused specifically on TN-C and SDC-2 and investigated their gene expression levels via qRT-PCR. The tenascin-C level was significantly increased in all examined tumour samples—that is eightfold higher in primary tumour tissue and 21-fold higher in recurrent tumour tissue than in healthy





**FIGURE 1** miR-218 expression in primary (GBM) and recurrent glioblastoma (GBM rec) tissues and its putative target mRNAs. (A) qRT-PCR analysis of GBM ( $n = 10$ ) and GBM rec samples ( $n = 9$ ) in comparison with a healthy brain RNA sample ( $n = 1$ ). Healthy brain sample consists of RNA pooled from 23 donors. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. One-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test,  $***p < .001$ . (B) qRT-PCR analysis of the tenascin-C and syndecan-2 mRNA expression levels in GBM and GBM rec tissues in comparison with RNA from healthy brain RNA sample ( $n = 1$ ). Healthy brain sample consists of RNA pooled from 23 people. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. Mixed-model analysis and the post hoc Bonferroni test;  $*p < .05$  and  $***p < .001$ . (C,D) Expression of TN-C and SDC-2 in GBM tumour from TCGA and Rembrandt databases examined using the Gliovis database. Tukey's test,  $***p < .001$  and  $**p < .01$

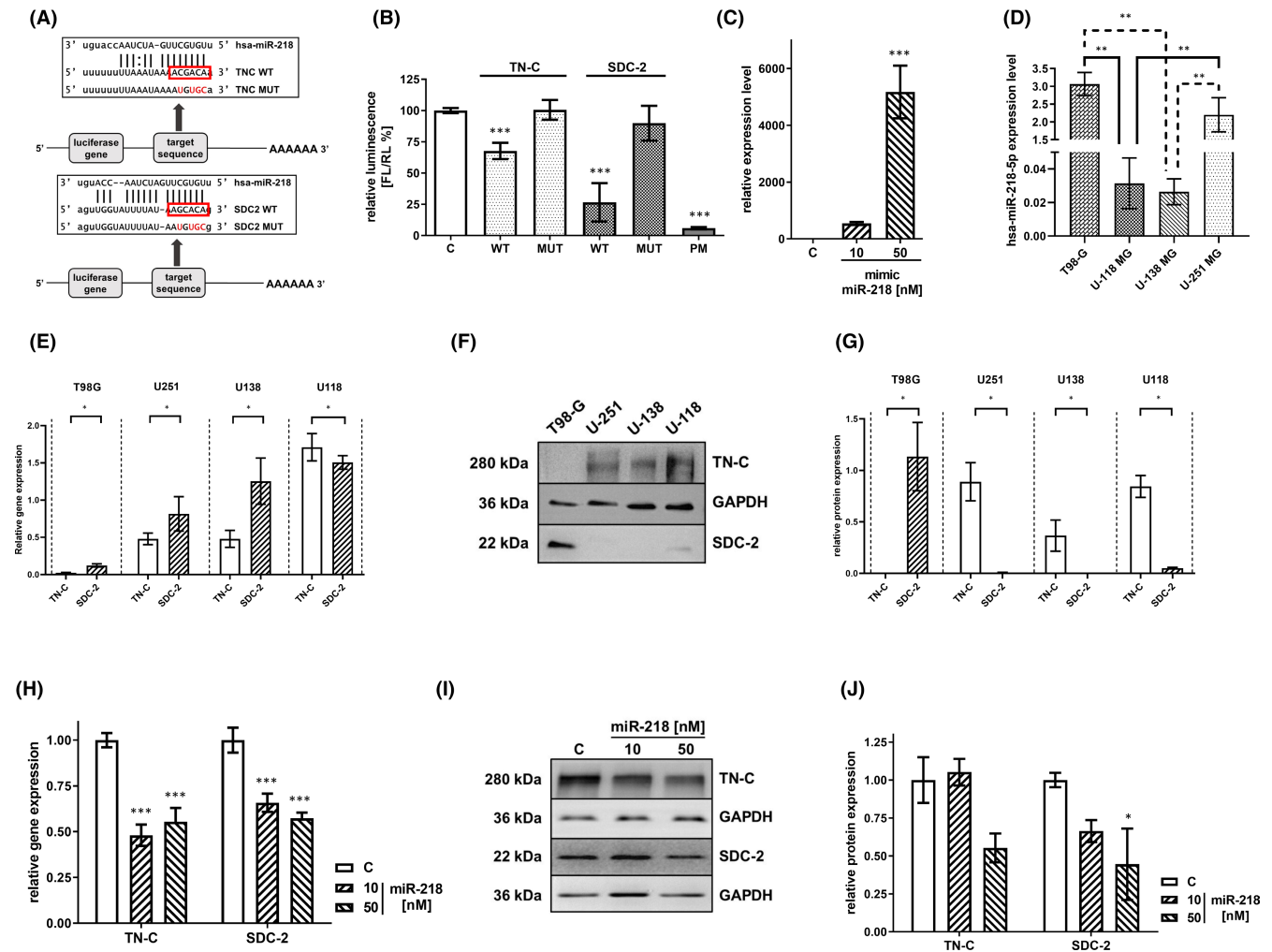
brain tissue. In the case of SDC-2, our analysis indicated an increase of approximately fourfold in GBM (Figure 1B). Our qPCR analysis is additionally supported by the data from large data sets coming from the sequencing of glioblastoma multiforme deposited in TCGA and Rembrandt databases. The expression profile of TN-C and SDC-2 in our experiment is comparable to the expression profile of aforementioned genes in databases (Figure 1C,D). There is a definite difference in TN-C expression levels between normal and tumorous tissue based on the database analysis, what is fully in line with our research and databases. Analogously, the results of our research and the values obtained from databases indicate a statistically significant distinction in the level of TN-C expression between normal tissue and GBM. In the case of SDC-2, differences with a statistical value were observed only in the Rembrandt database.

All algorithms used for miR-218 target prediction showed one binding site within the 3'UTR of both the TN-C and SDC-2 mRNAs. We employed a set of reporter constructs in a luciferase assay to experimentally verify the predicted binding of miR-218 to its target sites within the 3'UTRs of TN-C and SDC-2. The following constructs were tested in parallel: wild-type reporters (WT) containing a single native binding site for either miR-218, constructs with mutations (MUT) disrupting the 5' seed site (negative controls) and constructs with perfect complementarity (PM) to the miR-218 binding site (positive controls) (Figure 2A). Considering our previous analysis revealing the inverse correlation between miR-218, TN-C and SDC-2

expression, we validated the predicted miRNA-mRNA interactions using a miRNA overexpression system. Specifically, U-118 MG cells were co-transfected with reporter constructs and miRNA-encoding plasmids. Co-transfection experiments showed that cells transfected with miR-218 had significantly inhibited luciferase activity compared to cells transfected with negative control (MUT) miRNA (Figure 2B). The reduction in luciferase activity was reproducible and statistically significant for both WT constructs, with suppression of 33% and 74% for TN-C and SDC-2, respectively. miR-218 did not inhibit the luciferase activity of reporter vectors containing the TN-C and SDC-2 3'UTRs with mutations in the putative miR-218 binding site. This study provides evidence of the direct binding of miR-218 to the TN-C and SDC-2 3'UTRs and positively validates this miRNA as a negative regulator of these ECM molecules.

### 3.3 | miR-218 regulates TN-C and SDC-2 protein levels

We sought to determine the role of miR-218 in the regulation of TN-C and SDC-2 at the protein level in GBM cells by a gain-of-function approach. We transfected U-118 MG cells with synthetic miRNA (miRNA mimic) at concentrations of 10 and 50 nM. The final miR-218 mimic concentration of 10 nM boosted the expression of miR-218 by almost 500-fold compared with the control level, while 50 nM increased the expression by more than 5000-fold (Figure 2C).



**FIGURE 2** Regulation of TN-C and SDC-2 by miR-218. (A) Schematic representation of the interaction between miR-218 and 3'UTRs of its targets. The seed region is enclosed in a red box. The putative conserved sequences in the SDC-2 and TN-C targets are denoted as the wild type (WT). The non-conserved nucleotides within the seed region of the mutant 3'UTRs are marked in red in the construct named "mutant" (MUT). (B) Relative repression of luciferase expression. Reporter constructs carrying a single binding site were tested. miR-218 activity in 5 constructs was measured in parallel (Control U-118 MG cells—C, WT, MUT and perfect match—PT as a positive control in the experiment). Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. \*\*\* $p < .001$ . (C) Overexpression of miR-218 as a result of miR-218 mimic transfection, as evaluated by qRT-PCR. The measured expression level of TN-C and SDC-2 in different glioma cell lines with the use of qRT-PCR. (D) Expression level of miR-218 in T98-G, U-118 MG, U-138 MG and U-251 MG cell lines. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. \*\* $p < .01$  (E) and Western blot (F,G). All cell lines were cultured in corresponding cell culture media in the same period of time, and materials for analysis were isolated in the same batch to avoid unnecessary variability. (H) The quantified effects of transfection of U-118 MG cells with the miR-218 mimic at 10 nM and 50 nM concentrations on mRNA levels, as measured by qRT-PCR, and on protein levels, as established by Western blot analysis (I,J). Cells transfected with scrambled siRNA were used as the control—(C). Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. Two-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test, \* $p < .05$  and \*\*\* $p < .001$

In order to obtain an appropriate research model, we evaluated expression levels of miR-218, TN-C and SDC-2 in four glioblastoma cell lines: T98-G, U-118 MG, U-138 MG and U-251 MG. The U-118 MG and U-138 MG lines represented the lowest miR-218 expression level, with no statistical differences between them (Figure 2D). TN-C was the most expressed on both mRNA and protein levels in U-118 MG cell line, while in T98-G, it was undetectable (Figure 2E). SDC-2 in Western blot analysis was under detection level for U-138 MG and U-251 MG cell lines. qRT-PCR revealed the highest expression of SDC-2 in U-118 MG in relation to other cell lines. We found contradictory results between the levels of SDC-2 mRNA and protein

in T98-G (Figure 2F,G). Summarizing our analyses, we selected the U-118 MG line for further research, taking into account its low expression level of miR-218, high level of TN-C and possible detection of SDC-2.

To further verify the function of miR-218 and its impact on TN-C and SDC-2 expression levels, we performed analyses at both the mRNA and protein levels by qRT-PCR and Western blot, respectively. At the mRNA level, transfection with the miR-218 mimic in two concentrations, 10 nM and 50 nM, resulted in a reduction in the tenascin-C expression level of 45%–52% in comparison with the control level. In the case of syndecan-2, we observed a decrease of

34% for 10 nM and 43% for 50nM of mimic miR-218 (Figure 2H). Western blot analysis revealed downregulation of SDC2-2 expression by 34–55%. For TN-C, protein level after miR-218 mimic 10 nM supplementation increased by 5% and decreased by 45% after miR-218 mimic 50nM transfection (Figure 2I,J).

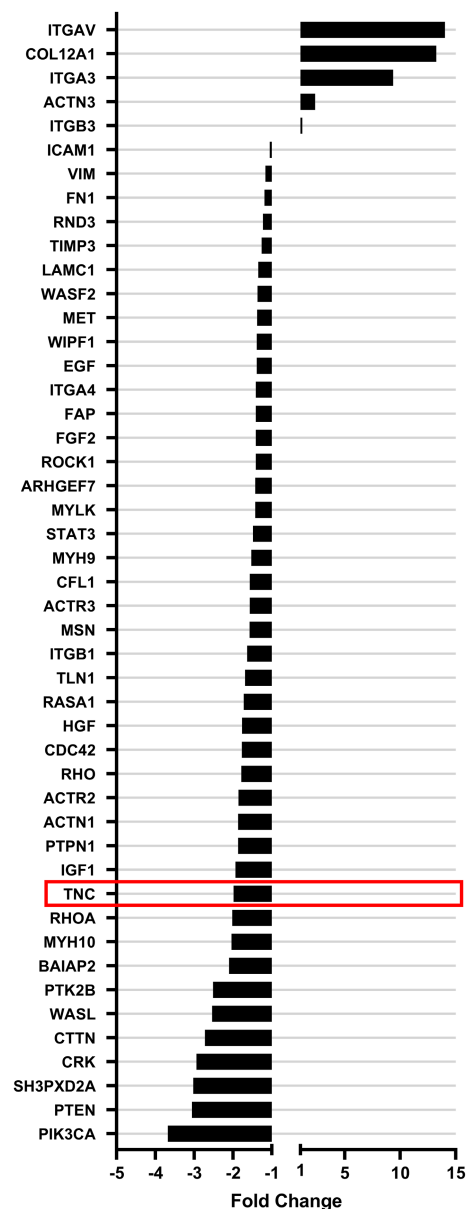
### 3.4 | miR-218 affects the ECM composition

Given the above results, we have evaluated the miR-218 overexpression on the ECM composition. To test this hypothesis, we used a Human Cell Motility and Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array and profiled the expression of  $n = 160$  genes related to the motility and adhesion pathways (Figure 3). More than 95% of the transcripts were detected, but the expression of CDH1, ANOS1, CNTN1 and MMP8 was not detected by this technique in our analysis (data not shown). Quality control parameters (positive PCR controls and reverse transcription controls) showed good reproducibility and efficiency with the web-based RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis program. In this paper, we include results where  $p$ -value is lower than .05 and fold change value is in the range  $(-\infty, -1) \cup (1, \infty)$ . A full set of data obtained from RT<sup>2</sup> profiler plates is included in supplementary materials (Supplementary information 2). Thus, we identified 47 genes displaying significantly different expression as a result of miR-218 overexpression (Supplementary information 3). It became evident that miR-218 overexpression led mostly to decrease in the expression of genes, among which were tenascin-C, as its direct ECM target, as well as the other genes involved in cytoskeletal reorganization. We observed the 1,96-fold reduction in the TN-C expression level. This result is in line with our real-time PCR analyses described above, in which we obtain also almost twofold reduction in TN-C expression level after miR-218 mimic 50nM transfection. We further hypothesized that changes in the ECM composition due to miR-218 overexpression also affect the mechanobiological properties of cancer cells.

### 3.5 | Impaired cell migration after miR-218 treatment

To explore the impact of miR-218 on cell migration, we compared the migration rate of miR-218-transfected U-118 MG cells with that of non-treated (negative control) cells (Figure 4A). The mathematical interpretation of the impedance (CI value) for each experimental condition was recorded over time and fitted to a four-parameter logistic non-linear regression model (Figure 4B). Transfection of 10 and 50nM miR-218 increased the  $ET_{50}$  by an average of 4 and 4.7 h, respectively.

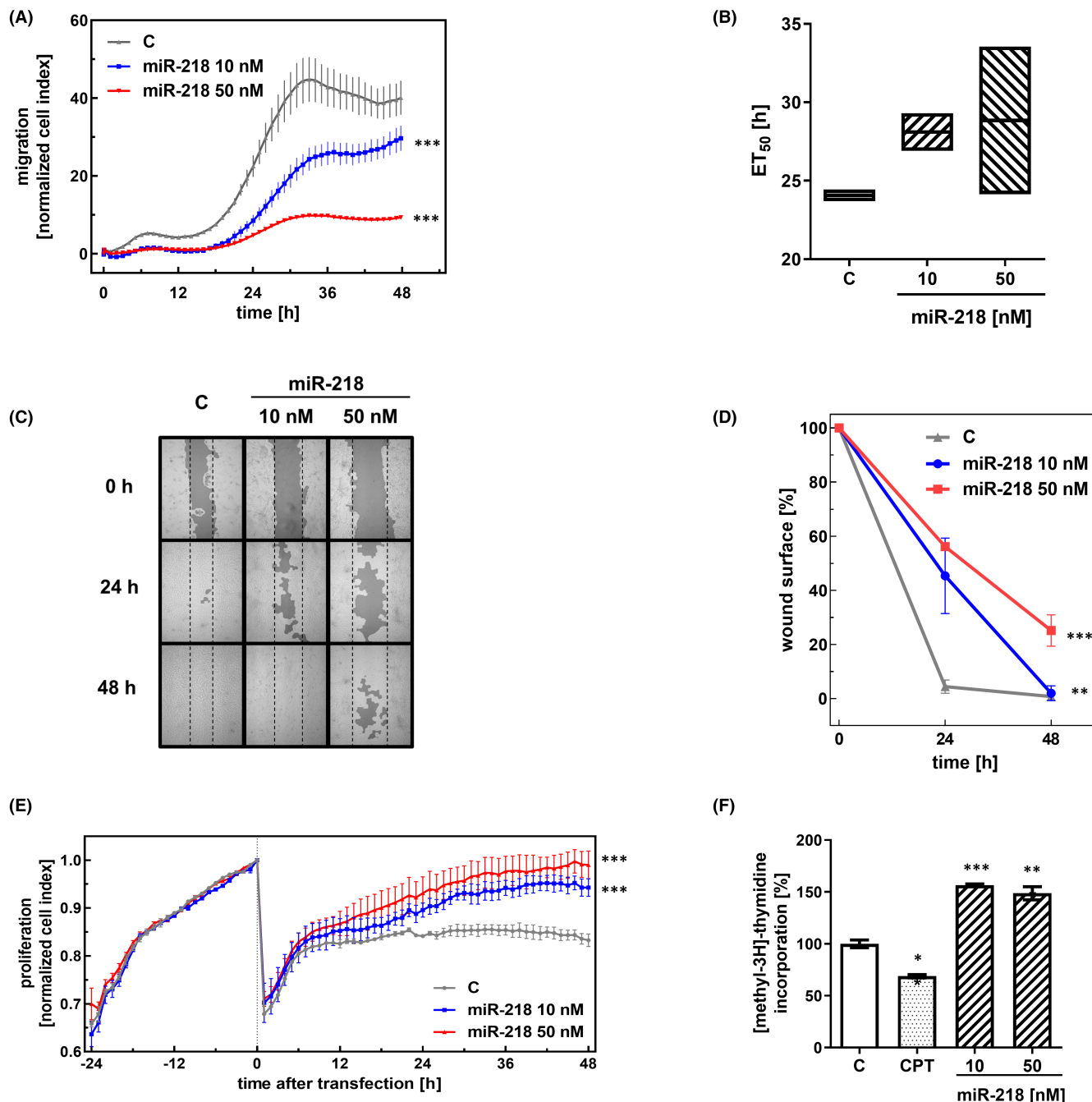
As the second independent experiment, we carried out a wound healing assay. 48h after transfection, the largest unhealed area was observed in the miR-218 50nM sample and accounted for 25.2% of the original wound area, while in the control sample, it was 0.8% (Figure 4C,D). At a concentration of 10 nM, the unhealed area was



**FIGURE 3** Cluster analysis of mRNAs encoding ECM components that were differentially regulated in the GBM cell line after miR-218 transfection. The quantified effects of transfection of U-118 MG cells with the miR-218 mimic at a 50nM concentration on the expression levels of genes, as determined by qRT-PCR of a Human Cell Motility and Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array. Cells transfected with scrambled siRNA were used as the control

2% of the original wound area. The most pronounced difference in the function of miR-218 was revealed at the 24-h time point, when the wound areas in the control and mimic 10 nM and mimic 50nM samples were 4.4%, 45.3% and 56.2%, respectively. Both experiments indicated a delay in GBM cell migration rate upon miR-218 treatment.

We analysed further the real-time cell proliferation with the xCELLigence system. The graph shows the raw experimental data presented as the dependence of the cell index unit used in the xCELLigence



**FIGURE 4** Effect of miR-218 on the migration and proliferation of glioblastoma cells. (A) The migration of U-118 MG cancer cells was studied using an xCELLigence system. Cells in serum-depleted medium were transfected with the miR-218 mimic (10 and 50 nM). Control (C)—cells treated with scrambled siRNA. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. One-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test, \*\*\* $p$  < .001. (B) The half-maximal effective time (ET<sub>50</sub>) was calculated for each miR-218 concentration to generate dose–response curves. The ET<sub>50</sub> values were normalized to control (C) cells treated with scrambled siRNA and plotted as the normalized ET<sub>50</sub> of cell migration against the miR-218 concentration. (C) The wound healing assay after miR-218 mimic transfection. The dark grey areas indicate the surface area of the wound. (D) The calculation of the wound area (%) 24 and 48 h post-transfection. Control U-118 MG cells (C) were treated with scrambled siRNA. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. One-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test, \*\* $p$  < .01 and \*\*\* $p$  < .001. (E) Proliferation of U-118 MG cancer cells analysed with the xCELLigence system. Cells were transfected with the miR-218 mimic (10 and 50 nM). Control (C)—cells treated with scrambled siRNA. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. One-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test, \* $p$  < .05 and \*\* $p$  < .01. (F) The thymidine incorporation assay on miR-218 mimic-transfected cells. As the positive control, cells treated with camptothecin were used. One-way ANOVA and post hoc Bonferroni test, \* $p$  < .05, \*\* $p$  < .01 and \*\*\* $p$  < .001

system on the time (Figure 4E). In this way, the time course of proliferation changes with overexpression of miR-218 is illustrated. At the point on the timeline corresponding to 24 h, the curve inflection

indicates the time of transfection. The stimulating effects on proliferation are seen at the final points of the curves, 48 h post-transfection. We observed an increase in the cell index by 14% at a miR-218 mimic

concentration of 10 nM and by as much as 19% at 50 nM. This demonstrates the directly proportional relationship between the increase in the proliferation rate and the expression of miR-218.

A [methyl-3H]-thymidine incorporation assay was performed to complement the proliferation analysis with the xCELLigence system. In this study, the degree of incorporation of radioactively labelled thymidine was evaluated and translated into the replication potential of cells. In addition to the standard trials used, we analysed the effect of 3  $\mu$ M camptothecin, which has a confirmed pro-apoptotic effect,<sup>37</sup> as a positive control in the experiment. The incorporation rate in CPT-treated cells was 69% compared with that in control cells. miR-218 mimic transfection increased the incorporation of tritiated thymidine by 57% at 10 nM and 49% at 50 nM compared with that in control cells (Figure 4F).

### 3.6 | miR-218 enhances glioma cell adhesion

To explore the impact of miR-218 on U118-MG cells, the cell surface properties were quantified using AFM in SCFS mode (Figure 5D). These properties are quantified by calculating the work of adhesion, which is defined as the work required to detach a single cell from the surface. In this scenario, each single cell was used as a force probe. For control cells, the work of adhesion ranged from 0.00064 pJ to 0.00315 pJ, with a mean  $\pm$  standard deviation of  $0.00186 \pm 0.00081$  pJ (Figure 5A). The analogous variability in cell adhesion after miR-218 treatment ranged from 0.00191 pJ to 0.00512 pJ (mean  $\pm$  standard deviation =  $0.0033 \pm 0.00113$  pJ) and from 0.00194 pJ to 0.00406 pJ (mean  $\pm$  standard deviation =  $0.00297 \pm 0.0007$  pJ) for concentrations of 10 nM and 50 nM, respectively (Figure 5B,C). Real-time adhesion measurements performed with the xCELLigence system showed changes in the attachment of cells to the plate surface during the observation period (Figure 5E). The cell index of adhesion for cells treated with 10 nM miR-218 mimic was 2.5-fold greater than that of control cells. In the case of 50 nM miR-218 treatment, the observed index was 3 times higher than that measured in the control cells. From the beginning of the experiment to its end, the trends in the particular samples did not change. We assumed that the observed changes were miR-218-dependent, since the negative control cells did not bind to the plate covered with BSA. The untreated cells also showed low adherence compared with the miR-218-treated cells.

Thus, regardless of the technique used for the adhesion study, these two independent experiments demonstrated an increase in the adhesion of GBM cells treated with the miR-218 mimic.

### 3.7 | Overexpression of miR-218 impacts cell stiffness

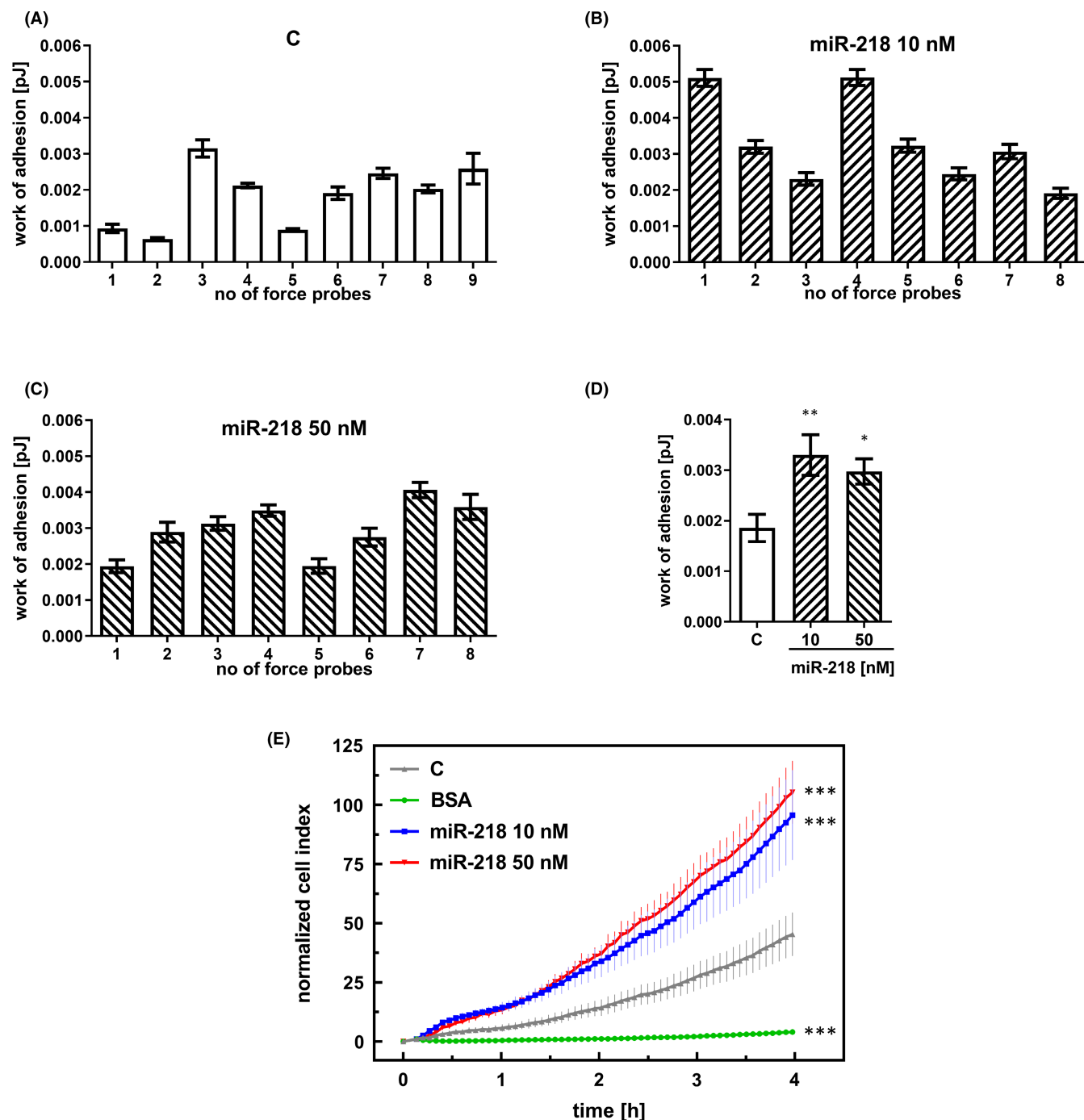
Most surface receptors are linked not only to ECM proteins but also to actin filaments forming the actin cortex.<sup>38</sup> Thus, in our next step, we verified whether changes in GBM cell adhesive properties contribute to the overall mechanical properties of these cells. Cell

stiffness was measured for cells compressed between the surface and a tipless cantilever; therefore, it was calculated as the slope of the approach part of the recorded force curves and expressed in N/m (Figure 6D).

For all sample types, that is control cells or cells treated either with 10 nM or with 50 nM miR-218, the stiffness of compressed cells remained mildly changed. Here, a smaller variability in mechanical force was observed for a given cellular force probe, as indicated by the standard deviation values. For control cells, the stiffness varied from 0.00425 N/m to 0.00763 N/m with a mean  $\pm$  standard deviation of  $0.00568 \pm 0.00106$  N/m (Figure 6A). Cells treated with miR-218 were characterized by a stiffness ranging from 0.00451 N/m to 0.00927 N/m (mean  $\pm$  standard deviation =  $0.00741 \pm 0.00155$  N/m) and from 0.00535 N/m to 0.00938 N/m (mean  $\pm$  standard deviation =  $0.00746 \pm 0.00130$  N/m) for concentrations of 10 nM and 50 nM, respectively (Figure 6B,C). Regardless of the final values of cell stiffness, an increasing trend was seen. For cells treated with 10 nM miR-218 mimic, the stiffness was increased by 30%, and for cells treated with 50 nM miR-218 mimic, the increase was 31% (Figure 6D). As the cell stiffness measured using AFM is related to the organization of the actin cytoskeleton, it was further visualized using fluorescently labelled F-actin to verify the effect (Figure 6E). Fluorescence images of the actin cortex show differences between control and miR-218-treated cells. Cells treated with miR-218 showed a higher level of actin filament organization. In these cells, the actin filaments became organized more horizontally along the long axis of the cell compared with those in control cells, where they were more dispersed. After treatment with 50 nM miR-218, also small changes in actin structures appeared at the cell surface. The F-actin dynamics and changes in filament organization directly support the increased stiffness of cells treated with the miR-218 mimic. The observed changes confirm then the hypothesis that cell stiffness is related to the cytoskeleton.

## 4 | DISCUSSION

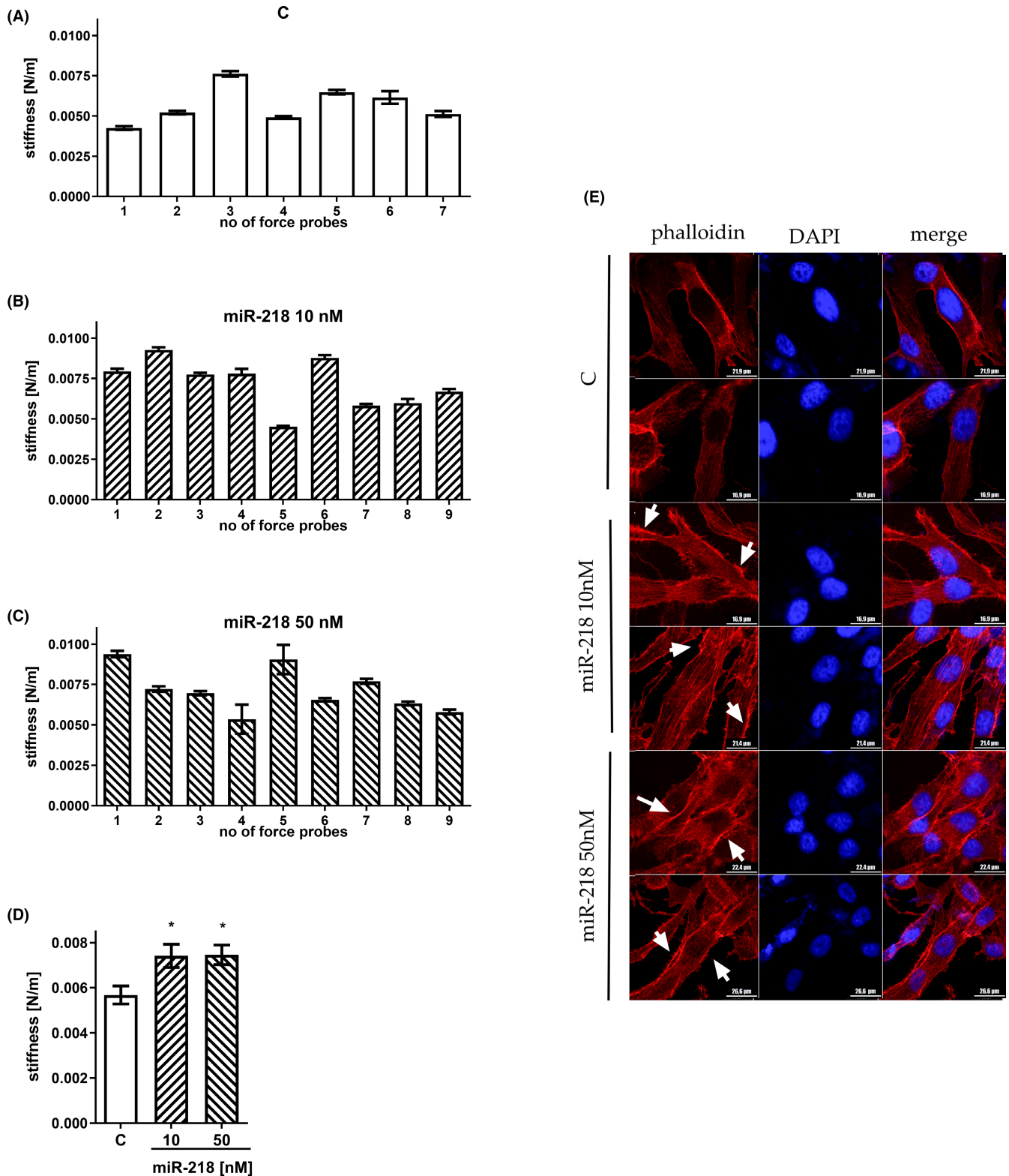
The malignancy of glioblastoma depends on its ability to infiltrate adjacent tissues and to create secondary lesions.<sup>39</sup> The aggressive growth of glioma tumours and difficulties in developing an effective treatment scheme have led to intense integration of medical and molecular biological research. Remodelling of the ECM and miRNA deregulation are known processes contributing to GBM cell invasion and brain infiltration.<sup>40-42</sup> In this study, we show that miR-218 can play a role in regulation of ECM remodelling in glioblastoma cell line and could be investigated further as a possible important regulator of GBM. We found that TN-C and SDC-2 are directly regulated by miR-218, resulting in alterations in the ECM composition and changes in the mechanical properties of the cells. Although our previous finding identified miR-218 as a potential tumour suppressor in GBM,<sup>36</sup> the mechanism of miR-218 action in GBM is still poorly understood. The sequence of miR-218 is located within intron 15 of the SLIT2 gene, in which promoter region CpG island is hypermethylated in GBM.<sup>43,44</sup>



**FIGURE 5** Adhesion of GBM cells increases after miR-218 treatment. The adhesive properties of U-118 MG cells were quantified by SCFS using single cells as force probes. Data for control, treated with scrambled siRNA cells (A), cells transfected with the miR-218 mimic at concentrations of 10 nM (B) and 50 nM (C), and the average result over all measurements (D). (E) Real-time adhesion measured with the xCELLigence system. The graph shows the final impedance values minus the initial values for the corresponding samples. Control (C)—cells treated with scrambled siRNA. Cells suspended in bovine serum albumin (BSA) were used as the positive control. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. One-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test, \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  and \*\*\* $p < .001$

The positive correlation between SLIT2 and miR-218 expression has been shown, what indicates that these two molecules are transcribed together.<sup>45</sup> The SLIT2 downregulation in GBM in consequence leads to the further decreased expression of miR-218.<sup>46</sup> Moreover, the expression level of miR-218 in GBM might be invoked by the feedback mechanism. The decreased expression of miR-218

can directly increase the expression of effector molecules such as RSK2, 6SK1 and PDGFR $\alpha$ , maintaining then the activity of the RTK pathway at a high level. RTK-conducted signals stimulate the expression of the STAT3 gene, whose product together with BCLAF1 binds directly to the miR-218 locus, thereby suppressing its expression.<sup>47</sup> Our previous finding confirmed then the decreased expression



**FIGURE 6** Mechanical properties of GBM cells after miR-218 treatment. Stiffness of U-118 MG cells quantified based on AFM elasticity measurements and expressed in N/m. Data for control, treated with scrambled siRNA cells (A), cells transfected with the miR-218 mimic at a 10 nM concentration (B) and a 50 nM concentration (C), and the average result over all measurements (D). (E) Confocal imaging of the actin cortex. Phalloidin (red) staining and DAPI (blue) staining were performed to visualize actin fibres and cell nuclei, respectively. Z-stack images were acquired. White arrows point to visible changes in actin structures. Data are shown as the mean  $\pm$  SD values. One-way ANOVA and the post hoc Bonferroni test, \* $p < .05$

of miR-218 both in primary and in recurrent tumours by 50% and 70%, respectively. Decreased miR-218-5p expression levels have also been reported in other types of human cancer, such as medulloblastoma, thyroid cancer and cervical cancer.<sup>48-50</sup> We confirmed that the predicted miR-218 targets, the ECM components TN-C and SDC-2, are directly regulated by miR-218. We used a dual-luciferase assay and miR-218 mimic to verify these functional interactions. The effects were detectable at both the mRNA and protein levels for both TN-C and SDC-2. Proteins derived from these transcripts are potentially key factors in the ECM of cancer cells.<sup>15,21</sup> The presence of TN-C in cancer tissues was initially considered as a characteristic feature of only gliomas,<sup>51</sup> with its expression increasing in proportion to the degree of brain tumour malignancy.<sup>52</sup> Its presence was found to increase the proliferation and invasiveness of cancer cells and to take part in the process of angiogenesis.<sup>53</sup> The role of TN-C in the neoplastic process is to reduce the adherence of cells, leading to the spread of the tumour. On the surface of healthy fibroblasts, fibronectin (FN) interacts with transmembrane proteins—integrins and syndecan-4 (SDC-4). The Rho protein is activated, and the properties of actin filaments are changed, resulting in cell adhesion. In pathological conditions, tenascin-C blocks the interaction between FN and SDC-4. The Rho protein is not activated, resulting in a lack of cell adhesion signals.<sup>54</sup> Considering the impact of TN-C on cancer cells and its apparent overexpression in glioblastoma tissues, it could be considered as a promising therapeutic target. We have already shown that the treatment with a double-stranded RNA targeting TN-C increased the average survival rate of patients.<sup>55</sup>

An increased level of syndecan-2 is a characteristic of actively migrating cells.<sup>56</sup> Overexpression of this protein in melanoma cells indirectly contributes to an increase in the level of FAK kinase phosphorylation, which has a positive impact on the migration capability of these cells.<sup>17</sup> In lung cancer, SDC-2 deficiency prevents cells from adhering to FN, which blocks their migration.<sup>57</sup>

ECM has become one of the most important focuses of cancer research, as it was shown to play a major role in the development of metastasis.<sup>58</sup> Pronounced ECM remodelling affects the invasion and migration of cancer cells.<sup>59,60</sup> The mechanical properties of the ECM have an impact on fibronectin fibril assembly, cytoskeletal stiffness and the strength of integrin–cytoskeleton linkages, the factors found to be important for cell motility, and thus also on adhesive properties.<sup>61</sup> As demonstrated in previous reports, a more rigid ECM promotes glioma cell migration.<sup>62</sup> On highly rigid ECMs, tumour cells spread extensively, form prominent stress fibres and mature focal adhesions, and migrate rapidly.<sup>62</sup> Our results are in line with these observations, as we showed a decreased cell migration rate after miR-218 overexpression, with subsequent downregulation of TN-C expression. These direct effects were enhanced by the indirect effect of miR-218 on a number of proteins, for example fibronectin, collagens or laminins. Thus, with miR-218 overexpression, we observed changes in the ECM leading to slowed cell migration, most likely induced by changes in overall ECM rigidity.

The obtained data revealed the decrease in the rate of cell migration upon the overexpression of miR-218, but at the same time

also an increase in their proliferation potential (Figure 4). Our observations seem to be consistent with the “go-or-grow” hypothesis, according to which the division of neoplastic cells and their movement are two temporally exclusive events.<sup>63</sup> The “go-or-grow” decision is strictly regulated and modulated by changes in the tumour microenvironment, which allows cells to “go” towards more favourable conditions to proliferate at the distant site or to “grow” and to stay at the site of origin, if their current environment provides the proper conditions for tumour growth. Changes in miRNA expression, followed by the ECM remodelling, can modulate the “go-or-grow” decision. As it has already been shown previously, the considerable overexpression of miR-9 in glioma cells inhibits proliferation but concurrently promotes migration.<sup>64</sup> Evidence indicates that mechanical properties and deformability can also be used as biomarkers to distinguish between healthy and cancer cells. The deformability of a whole cell, which depends on the properties of the cytoplasm, the cytoskeleton and the nucleus, can be defined in terms of the response of the cell to an applied stress. One of the techniques that enables the measurement of biophysical properties of cells, such as adhesion and stiffness, is AFM.<sup>65</sup> We evaluated the mechanobiological properties of GBM cells, including adhesion and stiffness, upon miR-218 mimic treatment. We obtained real-time measurements in cell culture (xCELLigence system) and measured physical forces and the work of adhesion<sup>66</sup> by application of AFM in SCFS mode. This approach allowed us to quantify the adhesion of single cells. SCFS analysis revealed strengthened adhesion of GBM cells upon miR-218 overexpression, hence indicating the direct connection between miR-218 and ECM component regulation.

GBM cells, similar to other solid cancers, can remodel the surrounding microenvironment from a normal brain to a stiffer tumour microenvironment through the combination of proteolytic degradation of some ECM components and secretion of other novel ECM components.<sup>67</sup> In our analysis, the stiffness of miR-218-transfected cells as measured by AFM was 30% higher than that of the control cells. Despite the variability observed in the experiment, a clear difference was observed, as the overall stiffness was measured to increase in cells treated with miR-218. The differences observed in the experimental cell group might have stemmed from the distributed contribution of surface receptors on an individual single cell, which can thus impact the adhesion of that cell.<sup>68,69</sup> It has already been shown that tumours can become stiffer than normal tissues due to increased Rho-dependent cytoskeletal pressure, generating excessive growth, focal adhesions, adjacent joint division and tissue disruption.<sup>70</sup> Stiffness also directly depends on the malignancy of the tumour. It is known that invasive GBM tumours produce stiffness-promoting factors such as collagen, fibronectin and laminins, which may suggest that the production of these proteins is disrupted after miR-218 overexpression.<sup>71</sup>

An increase in stiffness has also been observed in many different types of cancer cells, such as breast cancer, melanoma, prostate cancer and cervical cancer cells. An important aspect of cell stiffness is the ratio of cancer to normal cells. While cancer cells are less stiff than normal cells,<sup>72</sup> the same pattern of stiffness is also observed in



malignant versus non-malignant tissues in breast cancer,<sup>73</sup> bladder cancer<sup>74</sup> and prostate cancer.<sup>75</sup> In our research, glioblastoma cells with miR-218 overexpression were approximately 30% stiffer than non-treated cells. Increased stiffness in brain tissues can be correlated with diseases such as brain abscess or with cytoskeletal maturation in brain cells.<sup>76</sup> The correlation of cytoskeletal maturation with an increase in cell stiffness has been observed for astrocytes, in which the AFM-measured stiffness may increase sevenfold in a 5-week observation period during development.<sup>77</sup> In miR-218-treated GBM cells, the actin cytoskeleton was slightly rearranged, which could explain the increase in cell stiffness.

The minor discrepancy in the relation between cell surface adhesive properties and cell stiffness measured in our study can be explained by the different scales of measurements. For cell adhesion, SCFS measurements are limited to local changes occurring on the cell surface, while the stiffness reflects the overall mechanical properties of cells. Thus, we analysed stiffness assuming an indentation depth of 200 nm. This value assures the sensing of a superficial layer of actin filaments. Additionally, brain tissue is much softer than other tissues. The value of Young's modulus ranges from 1 to 1.9 kPa for white matter and from 0.8 to 1.4 kPa for grey matter, depending on the measurement technique.<sup>78,79</sup> Independent methods, that is SCFS and the xCELLigence system, showed similar increases in the adhesive properties of U-118 MG cells upon miR-218 treatment. Collectively, these results demonstrated that miRNA-218 strongly affects the expression of genes encoding cell surface receptors responsible for the adhesive properties of cells.

We also found that miR-218-treated cells are more rigid than non-treated cells, which presumably might prevent them from undergoing extravasation and intravasation during migration and invasion events. We thus hypothesized that miR-218 overexpression can support the maintenance of the non-invasive cell phenotype, which is correlated with differences in mechanical properties. The observation is more important when one realizes the importance of ECM rigidity in the perivascular space. It has already been shown that this part of the brain tissue is more rigid in GBM, thus promoting glioma cell migration.<sup>62</sup>

As we have shown, miR-218-5p deregulation is involved in GBM growth and migration potential. In addition to the direct influence that miR-218 has on transcripts such as TN-C or SDC-2, as shown in this study, it can influence the ECM composition by targeting other molecules, for example the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway transcription factors *LEF1* or *MMP-9*.<sup>80</sup> There are data showing that miR-218 suppresses cell invasion and spheroid formation,<sup>81</sup> arrests GBM cells in G1 phase<sup>31</sup> and can reduce the expression of cancer stem cell markers such as *CD133*, *SOX2* and *Nestin*.<sup>82</sup> The complex influence that miR-218 has on GBM cells cannot be underestimated and studied only by evaluating direct targets of this miRNA; therefore in search of indirect targets of miR-218 in glioblastoma, we performed an extended-expression analysis and found 47 genes connected to focal adhesion and cell motility. After miR-218 overexpression in glioblastoma cells, we observed a decrease in the expression levels of GBM oncogenes such as *PIK3CA*, *ROCK1*, *LAMC1* and *ICAM1*.

The expression of these genes is increased in GBM compared with healthy tissues.<sup>83-86</sup> Enhanced miR-218 levels also reduced the expression levels of the *CRK*, *RHOA* and *PTPN1* genes involved in GBM progression.<sup>87-89</sup> Our results are supported by data in the literature indicating a decrease in the expression levels of *PIK3CA*,<sup>90</sup> *RHOA*<sup>91</sup> and *STAT3*<sup>50,92</sup> as a consequence of miR-218 overexpression.

Due to the nature of our research, the changes in the expression levels of *CDC42*, *STAT3*, *EGF* and *CTTN* might be particularly important. Previous reports have indicated that *CDC42* is a critical determinant of the migratory and invasive phenotype of malignant gliomas.<sup>93,94</sup> The *STAT3* level is correlated with GBM malignancy, indicating its participation in increasing the migration potential of cancer cells.<sup>95</sup> Additionally, regarding *EGF*, its impact on the migratory nature of GBM cells is known.<sup>96</sup> *CTNN* and the Arp2/3 complex are known for regulating lamellipodia formation, and a decrease in *CTNN* expression can suppress GBM migration mechanisms.<sup>97,98</sup> Because we showed a decrease in the migration capacity of glioblastoma cells under treatment with miR-218 in our studies, we could conclude then that these changes might be the result of the impact of miR-218 on *CDC42*, *STAT3*, *EGF* and *CTTN*.

The observed increase in GBM cell adhesion may also be associated with a decrease in *ACTN1* expression. It has been shown that after downregulation of *ACTN1*, GBM cells show poor spread but increased focal adhesion.<sup>99</sup> The changes in the cytoskeleton that we observed may be the result of a reduced *HGF* level, which has been demonstrated to affect the distribution of the actin cytoskeleton in glioblastoma cell lines.<sup>100</sup> Both the cancer migration pathway and deregulation of the actin cytoskeleton can be related to downregulation of *SH3PXD2A* after miR-218 overexpression. *SH3PXD2A* is a crucial element in the formation of actin-based invadopodia—protrusions of the plasma membrane that are associated with mechanisms of invasiveness.<sup>101,102</sup>

## 5 | CONCLUSIONS

In this study, we showed that miRNA, as post-transcriptional gene regulator, has a direct impact on the ECM composition and, as a consequence, the mechanobiological properties of glioma cells. We demonstrated that miR-218 can be considered as a potent tumour suppressor that directly participates in post-transcriptional regulation of the expression of the extracellular matrix proteins tenascin-C and syndecan-2. The most intriguing observations in this study are the impact of miR-218 on the mechanical properties of the cells, that is migration and adhesion, followed by the direct changes of cell stiffness as measured with AFM technology. Additionally, our global gene expression analysis revealed changes in a number of genes directly or indirectly involved in cell motility and thus adhesion or cytoskeletal rearrangement. Taken together, our results showed the direct impact of miR-218 on the qualitative ECM content, leading to changes in the rigidity of the ECM and GBM cells. These features impacted by miR-218 overexpression collectively reduce the motility of cancer cells and increase their adhesiveness, thus most

probably conferring a phenotype more closely related to that of normal cells. Collectively, our results indicate that miR-218 is a potent tumour suppressor in glioma with a large impact on the ECM and biomechanical properties of the cells. Additionally, we believe that cell mechanical properties can constitute a broad drug target space, allowing possible corrective modulation of tumour cell behaviour.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Małgorzata Grabowska:** Conceptualization (equal); investigation (lead); visualization (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Konrad Kuczyński:** Investigation (lead); methodology (equal); software (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Monika Piwecka:** Investigation (supporting); methodology (equal); writing – review and editing (equal). **Alicja Rabiasz:** Investigation (supporting). **Joanna Zemła:** Data curation (equal); investigation (supporting); methodology (equal); software (equal). **Paweł Głodowicz:** Investigation (supporting). **Dariusz Wawrzyniak:** Investigation (supporting). **Małgorzata Lekka:** Data curation (equal); methodology (equal); software (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (supporting). **Katarzyna Rolle:** Funding acquisition (lead); project administration (lead); supervision (lead); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Laboratory of Subcellular Structures Analysis of the Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences in Poznan, for facilitating the cell culture and maintaining the microscopic analysis.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors.

#### INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT

Tissue samples used in this study were collected based on the approval from the Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in Poznan Ethical Committee (Consent nr. 46/13).

#### ORCID

Konrad Kuczyński  <https://orcid.org/0000-0002-7664-1045>

Katarzyna Rolle  <https://orcid.org/0000-0002-4175-2490>

#### REFERENCES

- Sasmitha AO, Wong YP, Ling APK. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018;14:40-51. doi:10.1111/ajco.12756
- Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*. 2015;3:95. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.57
- Kim J, Lee IH, Cho HJ, et al. Spatiotemporal evolution of the primary glioblastoma genome. *Cancer Cell*. 2015;28:318-328. doi:10.1016/j.ccell.2015.07.013
- Wei SC, Yang J. Forcing through tumor metastasis: the interplay between tissue rigidity and epithelial-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol*. 2016;26:111-120. doi:10.1016/j.tcb.2015.09.009
- Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11:M111 014647. doi:10.1074/mcp.M111.014647
- Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell adhesion and matrix stiffness: coordinating cancer cell invasion and metastasis. *Front Oncol*. 2018;8:145. doi:10.3389/fonc.2018.00145
- Acerbi I, Cassereau L, Dean I, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb)*. 2015;7:1120-1134. doi:10.1039/c5ib00040h
- Naba A, Clauser KR, Lamar JM, Carr SA, Hynes RO. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *Elife*. 2014;3:e01308. doi:10.7554/eLife.01308
- Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*. 2016;539:560-564. doi:10.1038/nature20168
- Rianna C, Kumar P, Radmacher M. The role of the microenvironment in the biophysics of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:107-114. doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.022
- Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I, et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell*. 2011;146:148-163. doi:10.1016/j.cell.2011.05.040
- Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139:891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027
- Mansouri R, Hay E, Marie PJ, Modrowski D. Role of syndecan-2 in osteoblast biology and pathology. *Bonekey Rep*. 2015;4:666. doi:10.1038/bonekey.2015.33
- Mytilinaiou M, Nikitovic D, Berdiaki A, et al. Emerging roles of syndecan 2 in epithelial and mesenchymal cancer progression. *IUBMB Life*. 2017;69:824-833. doi:10.1002/iub.1678
- Vicente CM, Ricci R, Nader HB, Toma L. Syndecan-2 is upregulated in colorectal cancer cells through interactions with extracellular matrix produced by stromal fibroblasts. *BMC Cell Biol*. 2013;14:25. doi:10.1186/1471-2121-14-25
- Park H, Han I, Kwon HJ, Oh ES. Focal adhesion kinase regulates syndecan-2-mediated tumorigenic activity of HT1080 fibrosarcoma cells. *Cancer Res*. 2005;65:9899-9905. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1386
- Lee JH, Park H, Chung H, et al. Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells. *J Biol Chem*. 2009;284:27167-27175. doi:10.1074/jbc.M109.034678
- Choi S, Choi Y, Jun E, et al. Shed syndecan-2 enhances tumorigenic activities of colon cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6:3874-3886. doi:10.18632/oncotarget.2885
- De Oliveira T, Abiatari I, Raulefs S, et al. Syndecan-2 promotes perineural invasion and cooperates with K-ras to induce an invasive pancreatic cancer cell phenotype. *Mol Cancer*. 2012;11:19. doi:10.1186/1476-4598-11-19
- Hua R, Yu J, Yan X, et al. Syndecan-2 in colorectal cancer plays oncogenic role via epithelial-mesenchymal transition and MAPK pathway. *Biomed Pharmacother*. 2020;121:109630. doi:10.1016/j.biopha.2019.109630
- Brosicke N, van Landeghem FK, Scheffler B, Faissner A. Tenascin-C is expressed by human glioma in vivo and shows

- a strong association with tumor blood vessels. *Cell Tissue Res.* 2013;354:409-430. doi:10.1007/s00441-013-1704-9
22. Naik A, Al-Yahyaee A, Abdullah N, et al. Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin beta3 pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2018;18:533. doi:10.1186/s12885-018-4446-y
  23. Gocheva V, Naba A, Bhutkar A, et al. Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E5625-E5634. doi:10.1073/pnas.1707054114
  24. Yang Z, Zhang C, Qi W, Cui C, Cui Y, Xuan Y. Tenascin-C as a prognostic determinant of colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation. *Exp Mol Pathol.* 2018;105:216-222. doi:10.1016/j.yexmp.2018.08.009
  25. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350-355. doi:10.1038/nature02871
  26. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:857-866. doi:10.1038/nrc1997
  27. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18255-18260. doi:10.1073/pnas.0608791103
  28. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:111-122. doi:10.1038/nri2708
  29. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1351-1358. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.030
  30. Li Z, Qian R, Zhang J, Shi X. MiR-218-5p targets LHFPL3 to regulate proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transitions of human glioma cells. *Biosci Rep.* 2019;39(3):BSR20180879. doi:10.1042/BSR20180879
  31. Zhang Y, Han D, Wei W, et al. MiR-218 inhibited growth and metabolism of human glioblastoma cells by directly targeting E2F2. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;35:1165-1173. doi:10.1007/s10571-015-0210-x
  32. Wu Z, Han Y, Li Y, et al. MiR-218-5p inhibits the stem cell properties and invasive ability of the A2B5(+)/CD133(-) subgroup of human glioma stem cells. *Oncol Rep.* 2016;35:869-877. doi:10.3892/or.2015.4418
  33. Sader JE, Larson I, Mulvaney P, White LR. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum.* 1995;66:3789-3798. doi:10.1063/1.1145439
  34. Omidvar R, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Rostami M. Atomic force microscope-based single cell force spectroscopy of breast cancer cell lines: an approach for evaluating cellular invasion. *J Biomech.* 2014;47:3373-3379. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.08.002
  35. Szymon P-B, Joanna R, Jakub R, et al. Adaptability of single melanoma cells to surfaces with distinct hydrophobicity and roughness. *Appl Surf Sci.* 2018;457:881-890. doi:10.1016/j.apsusc.2018.06.251
  36. Piwecka M, Rolle K, Belter A, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues. *Mol Oncol.* 2015;9:1324-1340. doi:10.1016/j.molonc.2015.03.007
  37. Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camp-tohecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol.* 1996;134:757-770. doi:10.1083/jcb.134.3.757
  38. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:75-82. doi:10.1038/nrm2594
  39. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011
  40. Xu TJ, Qiu P, Zhang YB, Yu SY, Xu GM, Yang W. MiR-148a inhibits the proliferation and migration of glioblastoma by targeting ITGA9. *Hum Cell.* 2019;32:548-556. doi:10.1007/s13577-019-00279-9
  41. Lei D, Zhang F, Yao D, Xiong N, Jiang X, Zhao H. MiR-338-5p suppresses proliferation, migration, invasion, and promote apoptosis of glioblastoma cells by directly targeting EFEMP1. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:957-965. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.137
  42. Li Y, Wang Y, Yu L, et al. miR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16. *Cancer Lett.* 2013;339:260-269. doi:10.1016/j.canlet.2013.06.018
  43. Dickinson RE, Dallol A, Bieche I, et al. Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. *Br J Cancer.* 2004;91:2071-2078. doi:10.1038/sj.bjc.6602222
  44. Dallol A, Krex D, Hesson L, Eng C, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in gliomas. *Oncogene.* 2003;22:4611-4616. doi:10.1038/sj.onc.1206687
  45. Tang W, Tang J, He J, et al. SLIT2/ROBO1-miR-218-1-RET/PLAG1: a new disease pathway involved in Hirschsprung's disease. *J Cell Mol Med.* 2015;19:1197-1207. doi:10.1111/jcmm.12454
  46. Mertsch S, Schmitz N, Jeibmann A, Geng JG, Paulus W, Senner V. Slit2 involvement in glioma cell migration is mediated by Robo1 receptor. *J Neurooncol.* 2008;87:1-7. doi:10.1007/s11060-007-9484-2
  47. Mathew LK, Huangyang P, Mucaj V, et al. Feedback circuitry between miR-218 repression and RTK activation in glioblastoma. *Sci Signal.* 2015;8:ra42. doi:10.1126/scisignal.2005978
  48. Shi J, Yang L, Wang T, et al. miR-218 is downregulated and directly targets SH3GL1 in childhood medulloblastoma. *Mol Med Rep.* 2013;8:1111-1117. doi:10.3892/mmr.2013.1639
  49. Guan H, Wei G, Wu J, et al. Down-regulation of miR-218-2 and its host gene SLIT3 cooperate to promote invasion and progression of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1334-E1344. doi:10.1210/jc.2013-1053
  50. Zhu L, Tu H, Liang Y, Tang D. MiR-218 produces anti-tumor effects on cervical cancer cells in vitro. *World J Surg Oncol.* 2018;16:204. doi:10.1186/s12957-018-1506-3
  51. Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1983;43:2796-2805.
  52. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer.* 2002;98:362-369. doi:10.1002/ijc.10233
  53. Mustafa DA, Dekker LJ, Stingl C, et al. A proteome comparison between physiological angiogenesis and angiogenesis in glioblastoma. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11:M111 008466. doi:10.1074/mcp.M111.008466
  54. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 2003;200:488-499. doi:10.1002/path.1415
  55. Rolle K, Nowak S, Wyszko E, et al. Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer Biol Ther.* 2010;9:396-406. doi:10.4161/cbt.9.5.10958
  56. Chung H, Lee JH, Jeong D, Han IO, Oh ES. Melanocortin 1 receptor regulates melanoma cell migration by controlling syndecan-2 expression. *J Biol Chem.* 2012;287:19326-19335. doi:10.1074/jbc.M111.334730
  57. Munesue S, Kusano Y, Oguri K, et al. The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones. *Biochem J.* 2002;363:201-209. doi:10.1042/0264-6021:3630201
  58. He X, Lee B, Jiang Y. Cell-ECM interactions in tumor invasion. *Adv Exp Med Biol.* 2016;936:73-91. doi:10.1007/978-3-319-42023-3\_4

59. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012;196:395-406. doi:10.1083/jcb.201102147
60. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014;15:1243-1253. doi:10.15252/embr.201439246
61. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 2000;79:144-152. doi:10.1016/S0006-3495(00)76279-5
62. Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* 2009;69:4167-4174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4859
63. Hatzikirou H, Basanta D, Simon M, Schaller K, Deutsch A. "Go or grow": the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Math Med Biol.* 2012;29:49-65. doi:10.1093/imammb/dqq011
64. Tan X, Wang S, Yang B, et al. The CREB-miR-9 negative feedback microcircuit coordinates the migration and proliferation of glioma cells. *PLoS One.* 2012;7:e49570. doi:10.1371/journal.pone.0049570
65. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.* 1986;56:930-933. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930
66. Zemla J, Danilkiewicz J, Orzechowska B, Pabijan J, Seweryn S, Lekka M. Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;73:115-124. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.029
67. Nakada M, Yamada A, Takino T, et al. Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res.* 2001;61:8896-8902.
68. Li IT, Ha T, Chemla YR. Mapping cell surface adhesion by rotation tracking and adhesion footprinting. *Sci Rep.* 2017;7:44502. doi:10.1038/srep44502
69. Lomakina EB, Marsh G, Waugh RE. Cell surface topography is a regulator of molecular interactions during chemokine-induced neutrophil spreading. *Biophys J.* 2014;107:1302-1312. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.062
70. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell.* 2005;8:241-254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010
71. Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol.* 2003;105:49-57. doi:10.1007/s00401-002-0610-0
72. Hayashi K, Iwata M. Stiffness of cancer cells measured with an AFM indentation method. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;49:105-111. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.04.030
73. Li QS, Lee GY, Ong CN, Lim CT. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374:609-613. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.078
74. Ramos JR, Pabijan J, Garcia R, Lekka M. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Beilstein J Nanotechnol.* 2014;5:447-457. doi:10.3762/bjnano.5.52
75. Lekka M, Gil D, Pogoda K, et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch Biochem Biophys.* 2012;518:151-156. doi:10.1016/j.abb.2011.12.013
76. Minelli E, Sasson TE, Papi M, et al. Nanoscale mechanics of brain abscess: An atomic force microscopy study. *Micron.* 2018;113:34-40. doi:10.1016/j.micron.2018.06.012
77. Lee SM, Nguyen TH, Na K, et al. Nanomechanical measurement of astrocyte stiffness correlated with cytoskeletal maturation. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103:365-370. doi:10.1002/jbm.a.35174
78. van Dommelen JA, van der Sande TP, Hrapko M, Peters GW. Mechanical properties of brain tissue by indentation: interregional variation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2010;3:158-166. doi:10.1016/j.jmbbm.2009.09.001
79. Budday S, Nay R, de Rooij R, et al. Mechanical properties of gray and white matter brain tissue by indentation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;46:318-330. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.02.024
80. Liu Y, Yan W, Zhang W, et al. MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1. *Oncol Rep.* 2012;28:1013-1021. doi:10.3892/or.2012.1902
81. Song L, Huang Q, Chen K, et al. miR-218 inhibits the invasive ability of glioma cells by direct downregulation of IKK-beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402:135-140. doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.003
82. Tu Y, Gao X, Li G, et al. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1. *Cancer Res.* 2013;73:6046-6055. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0358
83. Liang H, Wang R, Jin Y, Li J, Zhang S. MiR-422a acts as a tumor suppressor in glioblastoma by targeting PIK3CA. *Am J Cancer Res.* 2016;6:1695-1707.
84. Zhou F, Li Y, Hao Z, et al. MicroRNA-300 inhibited glioblastoma progression through ROCK1. *Oncotarget.* 2016;7:36529-36538. doi:10.18632/oncotarget.9068
85. Liu J, Liu D, Yang Z, Yang Z. High LAMC1 expression in glioma is associated with poor prognosis. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4253-4260. doi:10.2147/OTT.S205333
86. Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol.* 1995;57:143-153. doi:10.1016/0165-5728(94)00178-q
87. Kumar S, Lu B, Dixit U, et al. Reciprocal regulation of Abl kinase by Crk Y251 and Abi1 controls invasive phenotypes in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015;6:37792-37807. doi:10.18632/oncotarget.6096
88. Liu G, Yan T, Li X, et al. Daam1 activates RhoA to regulate Wnt5a-induced glioblastoma cell invasion. *Oncol Rep.* 2018;39:465-472. doi:10.3892/or.2017.6124
89. Li Z, Hu C, Zhen Y, Pang B, Yi H, Chen X. Pristimerin inhibits glioma progression by targeting AGO2 and PTPN1 expression via miR-542-5p. *Biosci Rep.* 2019;39:10.1042/BSR20182389.
90. Mathew LK, Skuli N, Mucaj V, et al. miR-218 opposes a critical RTK-HIF pathway in mesenchymal glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:291-296. doi:10.1073/pnas.1314341111
91. Meseguer S, Panadero J, Navarro-Gonzalez C, et al. The MELAS mutation m.3243A>G promotes reactivation of fetal cardiac genes and an epithelial-mesenchymal transition-like program via dysregulation of miRNAs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864:3022-3037. doi:10.1016/j.bbdis.2018.06.014
92. Yang Y, Ding L, Hu Q, et al. MicroRNA-218 functions as a tumor suppressor in lung cancer by targeting IL-6/STAT3 and negatively correlates with poor prognosis. *Mol Cancer.* 2017;16:141. doi:10.1186/s12943-017-0710-z
93. Okura H, Golbourn BJ, Shahzad U, et al. A role for activated Cdc42 in glioblastoma multiforme invasion. *Oncotarget.* 2016;7:56958-56975. doi:10.18632/oncotarget.10925
94. Cheng WY, Chiao MT, Liang YJ, Yang YC, Shen CC, Yang CY. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. *Mol Biol Rep.* 2013;40:5315-5326. doi:10.1007/s11033-013-2632-1
95. Han D, Yu T, Dong N, Wang B, Sun F, Jiang D. Napabucasin, a novel STAT3 inhibitor suppresses proliferation, invasion and stemness of glioblastoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38:289. doi:10.1186/s13046-019-1289-6
96. Chen XC, Wei XT, Guan JH, Shu H, Chen D. EGF stimulates glioblastoma metastasis by induction of matrix metalloproteinase-9 in an EGFR-dependent mechanism. *Oncotarget.* 2017;8:65969-65982. doi:10.18632/oncotarget.19622

97. Zhang S, Qi Q. MTSS1 suppresses cell migration and invasion by targeting CTTN in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2015;121:425-431. doi:10.1007/s11060-014-1656-2
98. Wang L, Zhao K, Ren B, et al. Expression of cortactin in human gliomas and its effect on migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep*. 2015;34:1815-1824. doi:10.3892/or.2015.4156
99. Sen S, Dong M, Kumar S. Isoform-specific contributions of alpha-actinin to glioma cell mechanobiology. *PLoS One*. 2009;4:e8427. doi:10.1371/journal.pone.0008427
100. Yu G, Wang Z, Zeng S, et al. Paeoniflorin inhibits hepatocyte growth factor- (HGF-) induced migration and invasion and actin rearrangement via suppression of c-met-mediated RhoA/ROCK signaling in glioblastoma. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9053295. doi:10.1155/2019/9053295
101. Stylli SS, Stacey TT, Kaye AH, Lock P. Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. *J Clin Neurosci*. 2012;19:436-442. doi:10.1016/j.jocn.2011.11.013
102. Chen YC, Baik M, Byers JT, Chen KT, French SW, Diaz B. TKS5-positive invadopodia-like structures in human tumor surgical specimens. *Exp Mol Pathol*. 2019;106:17-26. doi:10.1016/j.yexmp.2018.11.005

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Grabowska M, Kuczyński K, Piwecka M, et al.. miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells. *J Cell Mol Med*. 2022;26:3913-3930. doi: [10.1111/jcmm.17428](https://doi.org/10.1111/jcmm.17428)