

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

TÄPPIS- JA NANOMEDITSIINI LABORATOORIUM

**Endomeetriumi organoidide tekitamine ning peptiid-suunatud
nanopartiklite sisenemine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Sylvia Paet

Juhendajad: PhD Kristina Kiisholts

Prof Tambet Teesalu

Prof Andres Salumets

Tartu 2023

INFOLEHT

Endomeetriumi organoidide tekitamine ning peptiid-suunatud nanopartiklite sisenemine

Endomeetriumi uurimiseks kasutatakse sageli 2D rakukultuure, mis ei ole aga hormonaalselt mõjutatavad ning seega võivad olla ebapiisavad. Lahendusena on võimalik kasutada 3D kultuure, näiteks organoide, mis on oma loomult eluskoele sarnasemad. Organoididel põhinev lähenemine võimaldab uurida endomeetriumi ja arendada günekoloogiliste patoloogiate ennetus- ja ravistrateegiaid. Lisaks on välja pakutud nanomeditiini valdkonnast võimalik lahendus klassikaliste ravi- ja diagnostikameetodite ebaspetsiifilisusele, kasutades kullerpeptiididega suunatud sihtmärk-spetsiifilisi nanoosakesi. Sellest tulenevalt oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks luua 3D *in vivo* sarnane epiteelimudel ja testida peptiididega suunatud hõbe-nanoosakeste spetsiifilisust. Saadud tulemused näitasid edukalt loodud 3D epiteliaalseid organoide ning mitmete peptiidide spetsiifilist sisenemist.

Märksõnad: nanomeditiin, hõbe-nanoosakesed, kullerpeptiidid, endomeetrium, organoidid

CERCS: B726 Kliiniline bioloogia, B570 Sünnitusabi, günekoloogia, androloogia, paljunemine, seksuaalsus, B210 Histoloogia, tsütokeemia histokeemia, koekultuurid, T490 Biotehnoloogia

Endometrial organoid induction and internalization of peptide-targeted nanoparticles

2D cell cultures are commonly used for the investigating endometrium; however, they are not hormonally responsive and may therefore be inadequate. As a solution, 3D cultures such as organoids can be utilized, as they resemble living tissue more closely. The organoid-based approach enables the study of the endometrium and the development of prevention and treatment strategies for gynaecological pathologies. Additionally, a potential solution has been proposed from the field of nanomedicine to address the non-specificity of conventional therapeutic and diagnostic methods by involving the use of target-specific nanoparticles conjugated with homing peptides. Thus, the objective of this bachelor's thesis was to create a 3D *in vivo*-like epithelial model and evaluate the specificity of silver nanoparticles targeted by peptides. The obtained results successfully demonstrated the generation of 3D epithelial organoids and the specific internalization of several peptides.

Keywords: nanomedicine, silver nanoparticles, homing peptides, endometrium, organoids

CERCS code: B726 Clinical biology, B570 Obstetrics, gynecology, andrology, reproduction, sexuality, B210 Histology, cytochemistry, tissue cultures, T490 Biotechnology.

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Endomeetrium	7
1.1.1. Endomeetriumi histoloogia.....	7
1.1.2. Menstruaaltsükkel.....	7
1.1.3. Endomeetriumi funktsioon	9
1.1.4. Endomeetriumi modelleerimine	9
1.2. Kullerpeptiidid.....	12
1.2.1. Faagidisplei.....	12
1.2.2. Kullerpeptiidide eelised.....	14
1.2.3. Kullerpeptiidide kasutusvõimalused.....	15
1.3. Nanopartiklid	15
1.3.1. Nanopartiklite omadused.....	15
1.3.2. Hõbe-nanoosakesed	16
1.3.3. Nanoosakeste kasutamine meditsiinis	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1. Töö eesmärgid	18
2.2. Materjalid ja meetodika.....	18
2.2.1. Endomeetriumi organoidide loomine	18
2.2.2. Endomeetriumi organoidide kasvatamine	20
2.2.3. Immunohistokeemia	20
2.2.4. Hõbe-nanoosakeste süntees ja funktsionaliseerimine.....	21
2.2.5. Hõbe-nanoosakeste transfektsioon	22
2.2.6. Konfokaalmikroskoopia	23

2.3.	Tulemused	23
2.3.1.	Organoidide moodustumine	23
2.3.2.	Organoidide epiteeliaalne päritolu	24
2.3.3.	Hõbe-nanoosakeste sisenemine	26
2.4.	Arutelu	29
KOKKUVÕTE.....		32
SUMMARY		33
TÄNUSÕNAD.....		34
KIRJANDUSE LOETELU		35
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		39
LISA.....		40
LIHTLITSENTS.....		Error! Bookmark not defined.

KASUTATUD LÜHENDID

AgNP	(<i>silver nanoparticles</i>) hõbe-nanoosakesed
CPP	(<i>cell-penetrating peptide</i>) rakku sisenev peptiid
DBB	(<i>diluted blocking buffer</i>) lahjendatud blokeerimispuhver
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) rakukultuuri sööde
DMSO	dimetüülsulfoksiid
ECM	(<i>extracellular matrix</i>) rakuväline maatriks
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon
IHC	(<i>immunohistochemistry</i>) immuunohistokeemia
NHS	N-hüdrosü-suktsinimiid
PBS	(<i>phosphate buffered saline</i>) fosfaadi puhverlahus
PBST	(PBS-Tween) detergenti sisaldav pesulahus
PEG	polüetüleenglükool
RPL	(<i>recurrent pregnancy loss</i>) korduv raseduse katkemine
UT	(<i>untreated</i>) töötlemata

SISSEJUHATUS

Endomeetrium on dünaamiline ja kompleksne limaskestakude, mis vooderdab emakaõõnt ja mängib peamist rolli raseduse tekkel ja arenemisel. Inimese endomeetriumi uurimiseks on kasutatud 2D rakukultuure, kuid erinevalt 3D kultuurisüsteemidest ei ole nad hormonaalselt mõjutatavad. Lisaks on 3D kultuuride puhul võimalik uurida rakkudevahelisi interaktsioone, kudede omadusi ja ainevahetust. Üheks 3D endomeetriumi modelleerimise võimaluseks on iseorganiseeruvate, geneetiliselt stabiilsete endomeetriumi näärmete epiteelirakkudest koosnevate organoidide loomine. Organoididel on endomeetriumi mudelitest ainukesena *in vivo* endomeetriumi sarnane näärmeline struktuur, mistõttu valiti see mudel käesoleva bakalaureusetöö teostamiseks.

Viimaste aastakümnete jooksul on hõbe-nanoosakesed kujunenud nanotehnoloogia uurimisvaldkonnas populaarseks uurimisobjektiks. Nanomõõtmes hõbeosakestel on biotsiidne aktiivsus mikroobide vastu ning neid kasutatakse mitmetes valdkondades ravimite efektiivsuse suurendamise eesmärgil, näiteks farmaatsias ja kliinilistes uuringutes. Bioloogia valdkonnas on nanomaterjalide integreerimine viinud diagnostika- ja analüütiliste seadmete ning kontrastainete ja ravimite kohaletoimetamise arendamiseni. Hõbe-nanoosakesi saab kergesti sünteesida ja modifitseerida, see võimaldab neid siduda erinevate molekulidega, sealhulgas ravimitega, DNA-ga, valkude ja (kuller)peptiididega. Kullerpeptiididega funktsionaliseeritud hõbe-nanoosakesed võimaldavad ravi- või diagnostika eesmärgil sihtida spetsiifilist kohta organismis, näiteks kude, kuhu nende nanomõõtmelikus võimaldab tõhusalt tungida. Selliseid ravi- ja diagnostikameetodeid saab uurida ja katsetada sihtmärk-organist või koest loodud organoidide peal, mis jäljendavad päritolukude.

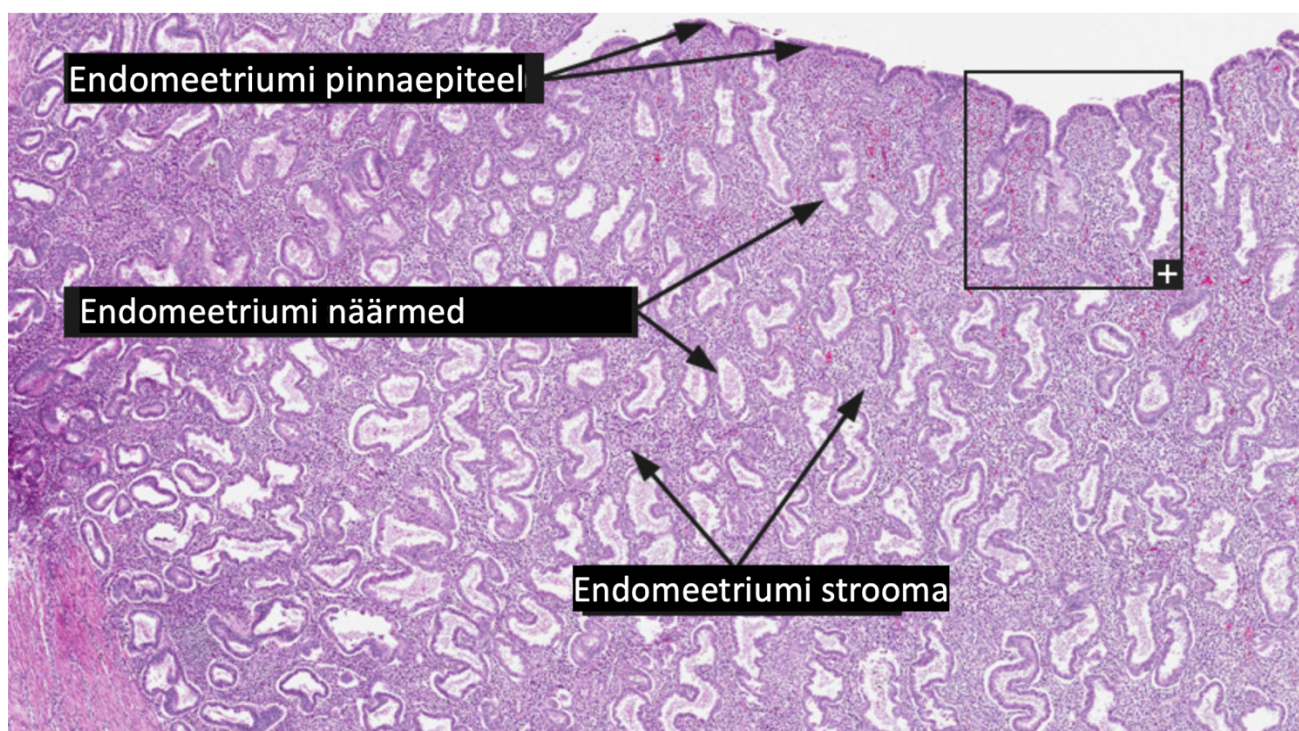
Antud töö eesmärgiks on luua endomeetriumi organoidide biopank, mida pikas perspektiivis järgnevateks detailsemateks uuringuteks kasutada. Lisaks testida eelnevalt kirjeldatud peptiididega funktsionaliseeritud hõbe-nanoosakeste võimet siseneda endomeetriumi organoididesse. Töö teostati Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditiini instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Endomeetrium

1.1.1. Endomeetriumi histoloogia

Endomeetrium on dünaamiline ja kompleksne limaskestakude, mis vooderdab emakaõõnt. See on naiste reproduktiivsüsteemi osa, mis mängib peamist rolli embrüo vastuvõtmisel ja toetamisel ning raseduse tekkel (Cha *et al.*, 2012). Endomeetrium koosneb pealmisest epiteelirakkude kihist, epiteliaalsetest näärmetest ja neid toetavatest stroomarakkudest, mis on omakorda läbipõimunud veresoonte võrgustikuga, et tagada kiiresti muutuva koe hapniku ja toitainetega varustus (joonis 1) (Tempest *et al.*, 2022). Endomeetrium jaguneb kaheks osaks – funktsionaal- ja basaalkihiks. Suguküpse naise endomeetriumis toimuvad menstruaaltsükli jooksul erinevad morfoloogilised ja füsioloogilised muutused, mida iseloomustavad kasv, sekretoorne diferentseerumine ning raseduse puudumisel ka koe taandareng ja taasteke. Proliferatsioon, sekretsioon ja taandareng toimuvad endomeetriumi ülemises funktsionaalses kihis ja basaalkihis leiab aset taasteke. (Ferenczy & Bergeron, 1991)



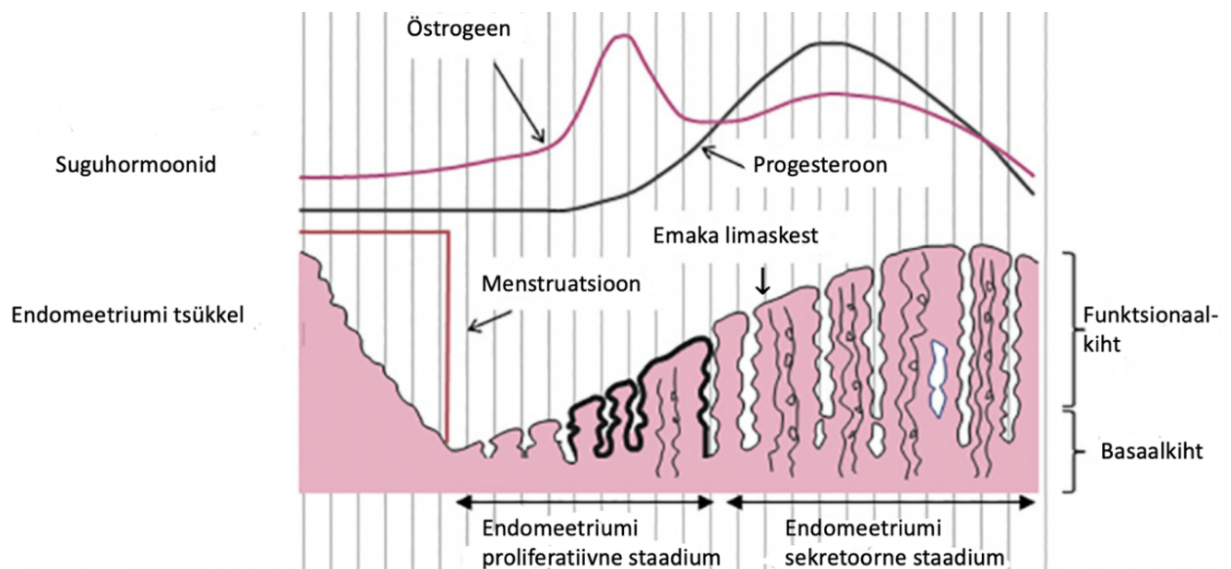
Joonis 1. Endomeetriumi histoloogia. Kohandatud Inimese Proteoomi Atlase veebilehe järgi.

1.1.2. Menstruaaltsükkel

Menstruaaltsükkel (joonis 2) on suguküpsete naiste igakuine protsess, mis valmistab keha ette potentsiaalseks raseduseks. Menstruaaltsükli üks tunnustest on perioodiline tupeverejooks, mis tekib endomeetriumi irdumise tagajärjel. Menstruaaltsükkel kestab keskmiselt 28 päeva,

arvestades esimesest menstruaalverejooksu päevast ja lõpetades järgmise tsükli esimese menstruatsiooni päevaga. (Thiyagarajan *et al.*, 2022) Naistel on elueaga võrreldes pikk reproduktiivne periood, keskmiselt umbes 36 aastat, alates menarhest (esimene menstruatsioon) vanuses 8,5–13 aastat (keskmiselt 12 aastat) kuni menopausini umbes 50-aastaselt (Mihm *et al.*, 2011). Naiste menstruaaltsükkel on kontrollitud parakriinsete ja sisenõrenäärmete eritatud hormoonide poolt, mida reguleerivad hüpotalamus, hüpofüüs, munasarjad ja endomeetrium (Hawkins & Matzuk, 2008). Inimese menstruaaltsüklile on iseloomulik hormonaalsete muutuste perioodiline muster, mida reguleerivad negatiivse ja positiivse tagasiside mehhanismid (Messinis *et al.*, 2014).

Menstruaaltsükli võib jagada kolmeks faasiks: menstruaalne, proliferatiivne ja sekretoorne. Menstruaaltsükli esimene faas on menstruatsioon, mille käigus toimub emaka limaskesta eraldumine ja tupeverejooks. Hormoonide östrogeeni ja progesterooni tasemed on selles faasis kõige madalamad. Peale menstruatsiooni algab proliferatiivne faas, mis kestab kuni ovulatsioonini ehk munaraku eraldumiseni munasarjast. Selles faasis hakkab östrogeeni tase tõusma ja endomeetriumi vooder pakseneb. Järgnev sekretoorne faas kestab ovulatsioonist kuni järgmise menstruaalfaasini. Selle alguses, ovulatsiooni järel, hakkab progesterooni tase tõusma ning endomeetrium lõpetab paksenemise ja valmistub vastu võtma viljastatud munarakku, hakates tootma glükogeeni ja lima. Raseduse puudumisel langevad progesterooni ja östrogeeni tasemed, emaka limaskest hakkab eralduma ja algab uus tsükkel. (Hawkins & Matzuk, 2008)



Joonis 2. Hormonaalsed ja morfoloogilised muutused menstruaaltsükli. Kohandatud (Mizutani *et al.*, 2020) järgi.

1.1.3. Endomeetriumi funktsioon

Endomeetrium on liigi säilitamise seisukohast anatoomiliselt ja funktsionaalselt üks olulisemaid kudesid. Harvade eranditega on endomeetrium ainus koht, kus embrüo saab edukalt implanteeruda ehk pesastuda, loode kasvada ja elada kuni sünnini. (Vilella *et al.*, 2021) Endomeetriumi näärmete sekreedid toetavad embrüo arengut ja algatavad varajase suhtluse, mis jätkub raseduse ajal (Lessey, 2000). Implantatsiooniks algatab blastotsüst ehk viljastatud munarakk füüsilise ja füsioloogilise suhtluse ema endomeetriumi suhtlusega. Suhtlus on väga oluline normaalse implantatsiooni ja raseduse kulgemiseks. Kõrvalekalded blastotsüsti ja endomeetriumi interaktsioonide vahel võivad viia järgnevate arenguetappide häireteni, sealhulgas platsenta moodustumise osas, mis võib potentsiaalselt kaasa tuua raseduse katkemise. Implanteeruva embrüo vastuvõtmiseks teeb endomeetriumi strooma läbi rakulise transformatsiooni – detsidualiseerumise. (Wang *et al.*, 2013) Embrüo edukaks implanteerumiseks on vajalik elujõulise blastotsüsti õigesti ajastatud jõudmine retseptiivsesse ehk vastuvõtlikkusse endomeetriumisse. Endomeetrium läbib menstruaaltsükli jooksul mitmeid ümberkujundamisi ning on vaid lühikesel perioodil võimeline embrüot omaks võtma (implantatsiooni aken, umbes 80 tundi pärast ovulatsiooni). (Croxatto *et al.*, 1978) Emaka limaskest muutub implanteerumisele vastuvõtlikuks umbes neljaks päevaks, 6–8 päeva pärast ovulatsiooni (Diedrich *et al.*, 2007). Endomeetriumi keskkonna olulisuse rolli kinnitab uurimus, mille kohaselt kvaliteetsed embrüod, mis on siirdatud surrogaatemadele, on suurema tõenäosusega implanteerumises edukad, võrreldes juhtudega kui neid siirdatakse tagasi rasedumisprobleemidega doonornaistele (Check *et al.*, 1992).

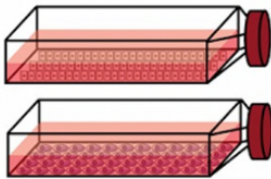
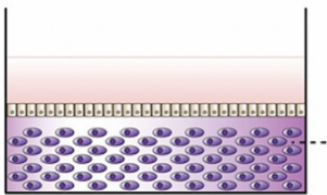
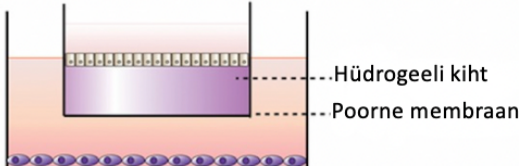
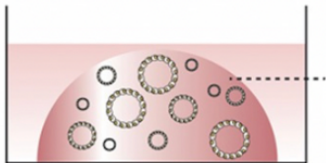
Kaasasündinud ja omandatud endomeetriumi anomaaliad on seotud korduva raseduse katkemisega (RPL, *recurrent pregnancy loss*). Korduvat raseduse katkemist määratletakse kolme või enama raseduse katkemisega (järjestikku või mitte) enne 20. rasedusnädalat. RPL esineb 1%–3% paaridest, kes üritavad rasedust saavutada. (Carbonnel *et al.*, 2021) Tihti on RPL põhjustatud krooniliste endomeetriumi seotud põletikuliste protsessidega, mis mõjutavad endomeetriumi vastuvõtlikkust nagu näiteks endometriooos, adenomüoos ja krooniline endometriit (Pirtea *et al.*, 2021).

1.1.4. Endomeetriumi modelleerimine

Viimastel aastakümnetel on inimese endomeetriumi *in vitro* uuringutes kasutatud kahemõõtmelisi (2D) rakukultuuri meetodeid, mis hõlmavad üksikute rakutüüpide kasvatamist ja analüüsimist. Endomeetriumi epiteeli 2D kultuurid võivad aga olla ebapiisavad mudelid osade uurimissuundade jaoks, sest nad ei ole sageli hormonaalselt mõjutatavad. Lahendusena on võimalik kasutada 3D kultuure, näiteks organoide, mis on oma loomult eluskoele

sarnasemad. Enamik 2D süsteeme ei sisalda rakuvälise maatriksi (ECM, *extracellular matrix*) komponente, mistõttu on vähenenud mehhaanilised ja biokeemilised signaalid, mille kaudu rakud saaksid omavahel suhelda, polariseeruda ja diferentseeruda. (Fitzgerald *et al.*, 2021)

3D rakukultuuri eeliseks 2D kultuuride ees on see, et nende põhjal saab täpsemalt uurida rakkudevaheliste interaktsioonide, kudede omaduste, ainevahetuse, tüvirakuliste omaduste ja ka haiguslike seisundite kohta. Kasutakse karkassipõhiseid (*scaffold*) meetodeid nagu näiteks hüdrogeelil põhinev toetus, polümeersel kõval materjalil põhinev toetus ja hüdrofiilne klaaskiud. Samuti kasutatakse ka karkassivabasid tehnikaid nagu näiteks rippuva tilga meetodid ja rakkude külvamine kinnitumist takistavale rakukultuuri plaadile 3D sferoidide kasvatamiseks. 3D rakukultuuridel on organoide kasutades suur potentsiaal pakkuda alternatiivseid viise kudede uurimiseks *in vitro*. (Jensen & Teng, 2020) Endomeetriumi organoidid on iseorganiseeruvad, geneetiliselt stabiilsed 3D kultuurisüsteemid, mis meenutavad päritolukude ja koosnevad endomeetriumist eraldatud epiteliaalsete näärmete rakkudest. (Turco *et al.*, 2017) Joonisel 3 on toodud mitmeid näiteid erinevatest eelnevalt väljatöötatud endomeetriumi kultuuridest koos nende eeliste ja puudustega. Organoididel on ainukesena *in vivo* endomeetriumi sarnane näärmeline struktuur, mistõttu valiti see mudel käesoleva bakalaureusetöö teostamiseks.

Ühekihiline rakukultuur  + Lihtne luua + Embrüole reageeriv + Saab uurida embrüo kinnitumist - Puudub 3D mõõtmelisus - Puuduvad endomeetriumi rakutüüpide interaktsioonid - Keeruline pikaajaseks paljundada	Mitmekihiline kaaskultuur  + Lihtne luua + Embrüole reageeriv + Otsesed interaktsioonid rakutüüpide vahel + Saab uurida embrüo kinnitumist ja invasiooni - Puuduvad näarmelised struktuurid
Transwell® kaaskultuur  + Embrüole reageeriv + Mitu erinevat endomeetriumi rakutüüpi + Saab uurida embrüo kinnitumist ja invasiooni + Kaudsed rakkudevahelised interaktsioonid (sekreteerivate molekulide kaudu) - Puuduvad näarmelised struktuurid - Puuduvad otsesed interaktsioonid rakutüüpide vahel - Puudub 3D mõõtmelisus	Organoidi kultuur  + Sisaldavad näärme struktuure + Võimalik pikaajaseks paljundada + Bio-panga loomise võimalus - Puuduvad esmased embrüo interaktsioonikohad - Puuduvad endomeetriumi rakutüüpide vahelised interaktsioonid

 Ühekihiline epiteel

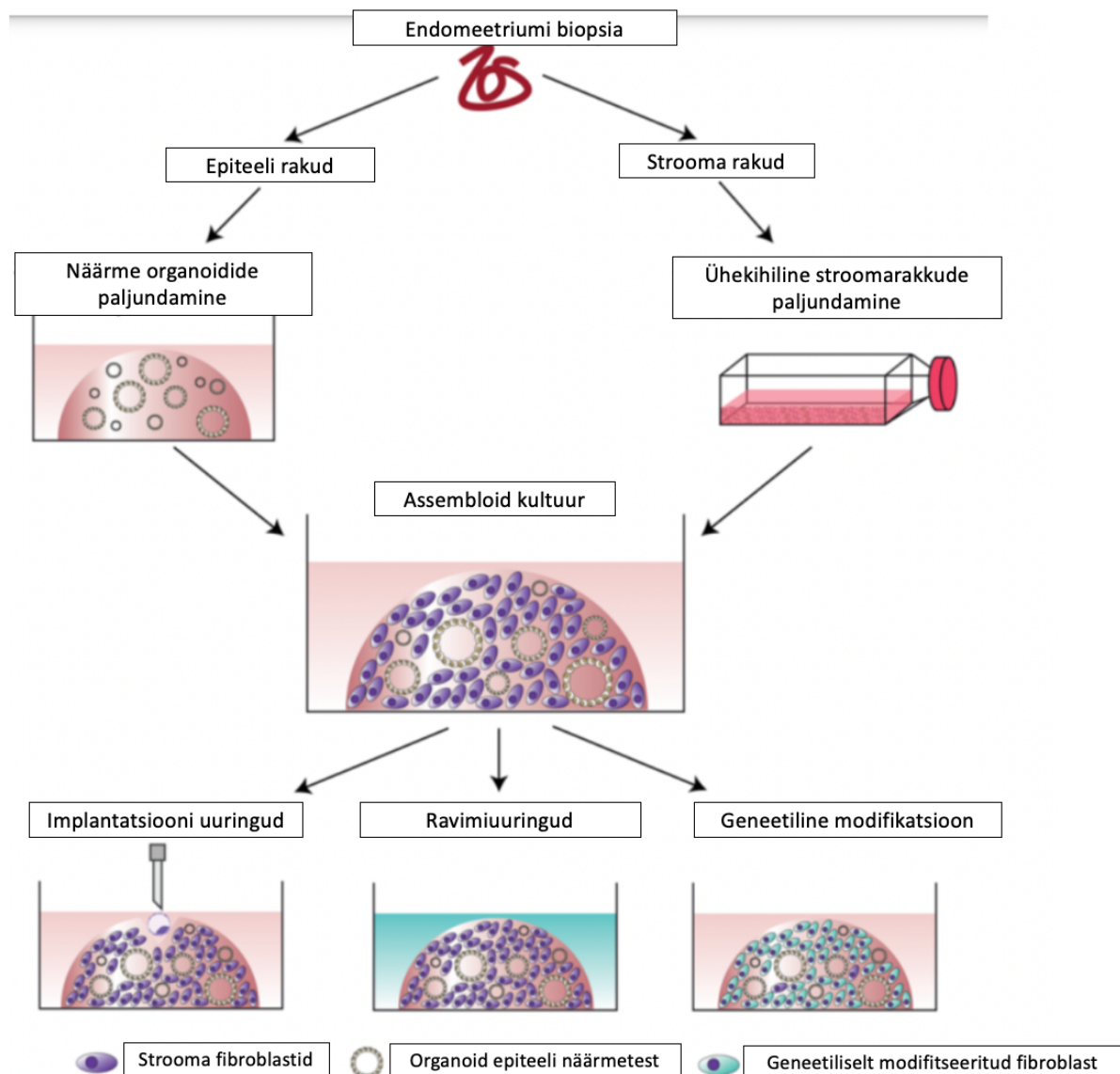
 Strooma fibroblast

 Epiteliaalsetest näärmetest organoid

Joonis 3. *In vitro* endomeetriumi mudelid. Märgitud on iga süsteemi peamised eelised (+) ja puudused (-). Kohandatud (Rawlings *et al.*, 2021) järgi.

Kolmemõõtmeliste inimese organoidide kasutamine on strateegia mitmete kudede fenotüüpiliste ja füsioloogiliste aspektide jäljendamiseks ja uurimiseks. Uuringud on tõestanud, et 3D organoide saab tekitada inimese endomeetriumi epiteelist, mis loob võimaluse uurida selle koe rakulisi ja molekulaarseid omadusi *in vitro* tingimustes. Organoide on võimalik kasvatada pikaajaliselt ning nad on geneetiliselt stabiilsed, mis võimaldab biopanga loomist edasisteks uuringuteks, näiteks embrüo interaktsioonide uurimiseks (Turco *et al.*, 2017). Varasemalt on katsetatud ka stroomarakkude hüdrogeeli lisamist ehk assembloidide tekitamist, et paremini jäljendada endomeetriumi eluskude. See loob edaspidi võimaluse implantatsiooni

testimiseks ja erinevate geneetiliste modifikatsioonide toime uurimiseks. Samuti saab endomeetriumi organoide kasutada lisaks endomeetriumi uurimisele ka günekoloogiliste patoloogiate ennetus- ja/või ravistrateegiate väljatöötamiseks (joonis 4). (Luddi *et al.*, 2020)



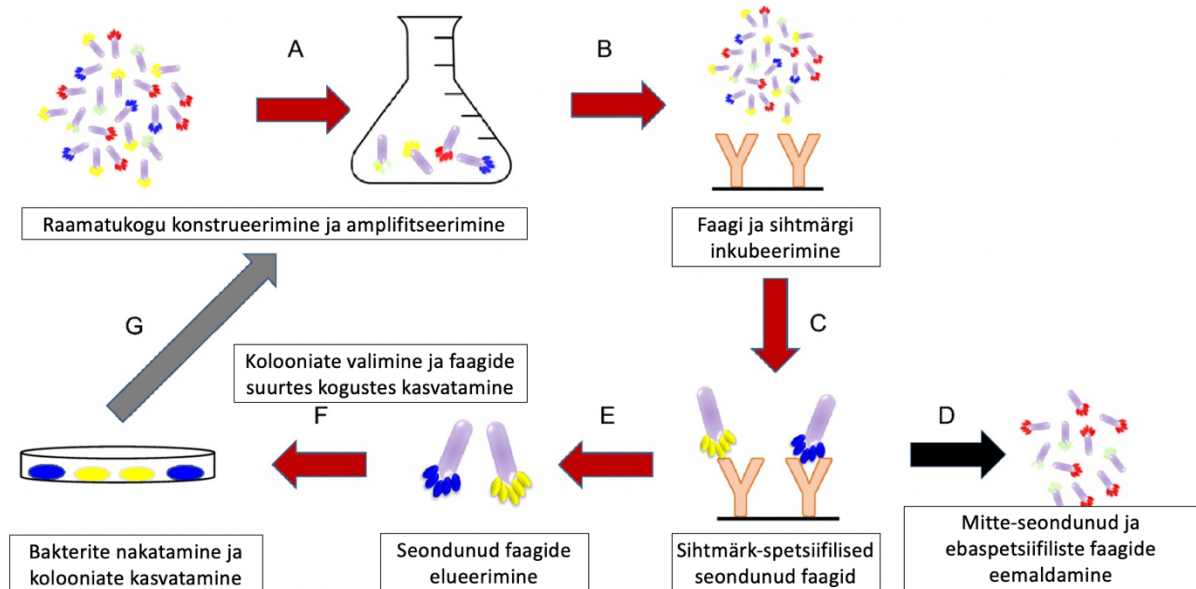
Joonis 4. Endomeetriumi mudeli loomise skeem koos rakenduse võimalustega. Kohandatud (Rawlings *et al.*, 2021) järgi.

1.2. Kullerpeptiidid

1.2.1. Faagidisplei

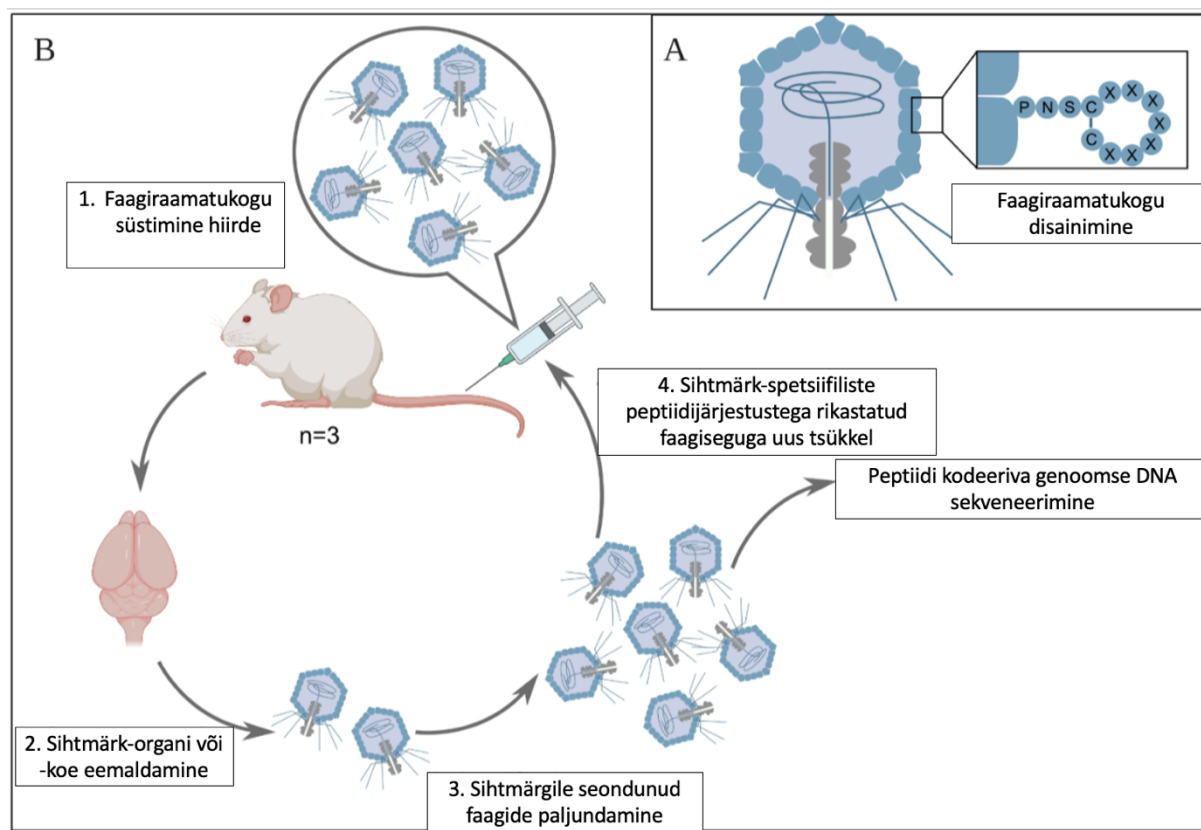
Bakteriofaagid ehk faagid on bakteriviirused, mis tungivad bakterirakkudesse ning nakatavad ja/või lüüsiavad neid. Lüütilised faagid häirivad bakterite ainevahetust ja põhjustavad nende surma. (Sulakvelidze *et al.*, 2001) Faagidisplei on tehnoloogia sihtmärk-spetsiifiliste peptiidide skriinimiseks ja isoleerimiseks (joonis 5). Selle meetodi puhul kasutatakse bakteriofaage, et

kuvada nende pinnal võõrpeptiide. Esmalt luuakse geneetiliselt erinevate faagide raamatukogu, seejärel inkubeeritakse seda sihtmärkmolekuli, -raku või -koega. Bakteriofaagid, mis ei seondunud, pestakse välja ja seondunud bakteriofaagid eraldatakse. Neid seondunud faage paljundatakse bakterirakkudes, et luua uus ja rikastatud selektiivsusega faagiraamatukogu ning alustatakse uuesti sama sihtmärgiga inkubeerimist. Neid etappe korratakse spetsiifiliste ja kõrge afiinsusega seonduvate peptiidide eraldamiseks kolm kuni viis korda. (Saw & Song, 2019)



Joonis 5. *In vitro* faagidisplei tehnika üldine skeem ja kõrge afiinsusega peptiidi väljasorteerimine. Kohandatud (Saw & Song, 2019) järgi.

In vivo faagidisplei toimub samal põhimõttel. *In vivo* faagidisplei korral faagi raamatukogu paljundatakse, puhastatakse ja manustatakse elusatele hiirtele, millele järgneb veresoonte läbivoolutamine seondumata faagide eemaldamiseks verest, sihtmärk-organite eemaldamine, faagide paljundamine ja katse kordamine eelnevalt edukalt seondunud faagidega (joonis 6). (Põšnograjeva *et al.*, 2022) Nii *in vitro* kui ka *in vivo* faagidisplei puhul tehakse faagi DNA sekveneerimisega kindlaks seondunud peptiide kodeerivad järjestused (Laakkonen *et al.*, 2002).



Joonis 6. *In vivo* faagidisplei skeem. Kohandatud (Põšnograjeva *et al.*, 2022) järgi.

1.2.2. Kullerpeptiidide eelised

Kullerpeptiidid on peptiidid, mis on võimelised kandma (ravimi)molekule spetsiifilistesse kohtadesse organismis läbi retseptor-spetsiifilise seondumise (Ruoslahti, 2001). Süsteemse ravi peamiseks probleemiks on see, et ainult väike osa manustatud ravimist jõuab sihtpunkti. Ravimi selektiivne transport sihtkoesse kullerpeptiidide abil on üks võimalikest probleemide lahendustest. Afiinsuspõhine füüsiline sihtimine kasutab süsteemselt manustatavate ravimite valikuliseks transpordiks molekulaarseid markereid, mis ekspresseeruvad spetsiifiliselt sihtmärk-koes, aga mitte mujal kehas. Selle meetodi tulemuseks on suurem ravimi lokaalne akumulatsioon ja madal üldine manustamise kontsentratsioon. (Teesalu *et al.*, 2013)

Kullerpeptiididel on klassikaliste ravimite kasutamise ees palju eeliseid. Väikesed mõõtmed (5–30 aminohapet) võimaldavad neil tungida tõhusamalt kudedesse kui näiteks antikehadel või valkudel. Lisaks on madalamad ka tootmiskulud, sest peptiidide keemiline süntees on alternatiividega võrreldes suhteliselt odav. Kuna peptiidid ei ole tõenäoliselt immunogeensed, võib neid samale isikule korduvalt manustada. Ka lühike poolväärtusaeg ja kiire kehast väljutamine takistavad peptiidide kuhjumist kudedesse, vähendades nende poolt põhjustatud immunogeensuse või tüsistuste tekkimise võimalust. (Laakkonen & Vuorinen, 2010)

1.2.3. Kullerpeptiidide kasutusvõimalused

Kullerpeptiidide üks peamisi kasutusvõimalusi on vähiravi valdkond, mis vajab kiireid lahendusi. Vähk on maailmas üks peamine surmapõhjus, põhjustades 2020. aasta seisuga ligi 10 miljonit surmajuhtumit (Maailma Terviseorganisatsiooni veebileht). Tavapärase keemiaravi peamiseks puudusteks on spetsiifilisuse puudumine kasvajakudede suhtes, sellest tingitud rasked kõrvaltoimed tervetele kudedele ja madal kasvavastane toime (Mäe *et al.*, 2009). Selles kontekstis on kasvajat sihtivad kullerpeptiidid (*tumor homing peptides*) pälvinud palju tähelepanu. Need peptiidid mängivad tähtsat rolli kõrge spetsiifilisusega ravimite kohaletoimetamisel kasvaja kudedesse. (Kapoor *et al.*, 2012) Vähiraviga seotud kullerpeptiididest on kliiniliste uuringutesse teise etappi jõudnud näiteks peptiid iRGD (Kang *et al.*, 2020).

Lisaks vähile on kullerpeptiide katsetatud ka endometrioosi puhul. Endometrioos on krooniline põletikuline haigus, mida iseloomustab endomeetriumi koe kasv väljaspool emakaõõnt. Endometrioos mõjutab maailmas hinnanguliselt ühte kümnest reproduktiivses eas naistest. Endometrioosi sümptomiteks on näiteks krooniline valu vaagna piirkonnas ja viljatus. Vaatamata aastakümnete pikkusele uurimistööle on endometrioosi mitteinvasiivsed diagnoosimise ja ravi võimalused väga piiratud. (Symons *et al.*, 2018) Kuigi endometrioos on healoomuline seisund, on mõned selle tunnused sarnased vähile, näiteks suurenenud rakkude invasioon, migratsioon, ümbritsevate kudede põletik ja uute veresoonte moodustumine ehk angiogenees. Kullerpeptiididest on osutunud potentsiaalseks võimaluseks endometrioosi diagnoosimiseks ja raviks näiteks peptiid PL1, mis arendati esmalt vähispetsiifilise peptiidina. (Simón-Gracia *et al.*, 2021) Need on vaid mõned näited paljudest kullerpeptiidide kasutusvõimalustest. Tegelikult saab neid kasutada sihtmärk-spetsiifiliste kandjatena paljudes erinevates nii patoloogilistes kui ka normaalsetes organites ja kudedes (Hyvönen & Laakkonen, 2015).

1.3. Nanopartiklid

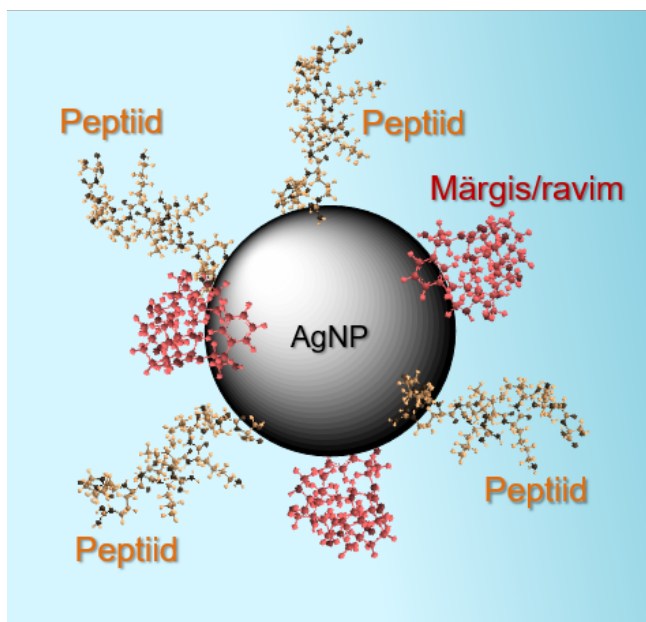
1.3.1. Nanopartiklite omadused

Nanotehnoloogia on teadusharu, mis tegeleb väga väikeste, nanomeetri suurusjärgus mõõtetega materjalide uurimise ja loomisega. Eesliide *nano-* pärineb vanakreeka sõnast *nanos*, mis tähendab kääbust ehk üldisemalt midagi väikest (Eesti Keele Instituudi „Võõrsõnade leksikoni“ veebileht). Rahvusvahelise mõõtühikute süsteemi (SI) kohaselt kasutatakse seda mõistet 10^{-9} tähistamiseks. Nanosuuruseid mõõdetakse nanomeetrites (1 nm vastab 10^{-9} m). Sellise mastaabi tingimustes töötavad aatomid ja molekulid teisiti, võimaldades erinevaid kasutusviise. Nanotehnoloogia ja -teadus pakuvad eeliseid tavapäraste ravimite

kohaletoimetamise ees põhinedes kõrgel stabiilsusel, spetsiifilisuse tekitamise võimalusel, ravimi suurel kandevõimel, kontrollitud vabanemisvõimel, võimalusel kasutada erinevaid manustamisviise ja võimel kohale toimetada nii hüdrofiilseid kui ka hüdrofoobseid molekule. (Lal *et al.*, 2011) Farmaatsias ja kliinilistes uuringutes kasutatakse nanoosakesi, et suurendada ravimite efektiivsust. Ravimite transportimiseks ja haiguskoldesse toimetamiseks kasutatakse erinevat tüüpi osakesi nagu näiteks liposoomi, polümeeri, mitselli, metalseid nanoosakesi, süsiniku nanotorusid, tahkeid lipiide, niosoomi ja dendrimeeri. Nanoosakesed aitavad lahendada ravimitega seotud probleeme, nagu näiteks madal lahustuvus vees, halb biosaadavus või ebaspetsiifiline kohaletoimetamine. (Abdellatif & Alsowinea, 2021)

1.3.2. Hõbe-nanoosakesed

Hõbe-nanoosakesed (AgNP) on viimaste aastakümnete jooksul kujunenud nanotehnoloogia populaarseks uurimisobjektiks. AgNP-d on hõbedast koosnevad osakesed, läbimõõduga 1–100 nm, neil on suur eripind ja pindaktiivsus. (Nie *et al.*, 2023) Hõbe-nanoosakestel on tugev mikroobide vastane toime. Nad on efektiivsed laia spektri gram-negatiivsete ja gram-positiivsete bakterite ning mõnede antibiootikumiresistentsete tüvede vastu. (Pulit-Prociak & Banach, 2016) Võrreldes hõbede makroskoopilise vormiga on hõbe-nanoosakestel suurema eripinna tõttu parem kontakt mikroorganismidega ja efektiivsem biotsiidne aktiivsus. Hõbe-nanoosakesi saab kergesti sünteesida ja modifitseerida, mis annab võimaluse nende erinevate molekulidega sidumiseks, sealhulgas ravimitega, DNA-ga, valkude ja peptiididega (joonis 7). (Abdellatif & Alsowinea, 2021)



Joonis 7. Kasutatud hõbe-nanoosakese skeem. Kohandatud (Simón-Gracia *et al.*, 2021) järgi.

Fluorestsentsmikroskoobiga visualiseerimine, mida kasutatakse tihti nanoosakeste seondumise uurimiseks, ei võimalda vahet teha raku pinnale seondunud ja rakkudesse sisenenud osakeste vahel. Üks põhilisi eeliseid hõbe-nanoosakeste kasutamisel on see, et eelkliinilistes katsetes on võimalik söövitushäire abil rakuväliste osakeste elimineerimine, et eristada seondunud ja rakkudesse sisenenud osakesi. (Braun *et al.*, 2014) Käesolevas töös kasutati söövitushäire tegemiseks kaaliumferritsüaniidi ja naatriumtiosulfaati. Kaaliumferritsüaniid oksüdeerib hõbeda, mis moodustab ioone. Naatriumtiosulfaat tekitab ionidest kompleksid, mis lahustuvad täielikult. (Braun *et al.*, 2014)

1.3.3. Nanoosakeste kasutamine meditsiinis

Nanomaterjalide integreerimine bioloogiasse on viinud kontrastainete ja ravimite kohaletoimetamise ning diagnostika- ja analüütiliste seadmete arendamiseni (Singh *et al.*, 2008). Hõbe-nanoosakesed on väga efektiivsete ja laia spektriga antimikroobsete ja antikanserogeensete omadustega. AgNP-d omavad suurt rolli mitmesuguste vähivormide vastu nii *in vitro* kui ka *in vivo*, sealhulgas emakakaelavähi, rinnavähi, kopsuvähi ja mitmete kartsinoomide vastu. Lisaks kõige uuritumatele antimikroobsetele ja vähivastastele toimetele on leitud hõbe-nanoosakestele rakendus ka mitmetes muudes meditsiini valdkondades, nagu näiteks haavade ja luude paranemine, hammaste täitematerjalid, vaktsiinide adjuvandid, diabeedivastased ained ja molekulaarne pildistamine. (Xu *et al.*, 2020) 2022. aasta 14. detsembri seisuga oli Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviameti poolt heaks kiidetud umbes 64 eri tüüpi nanoosakest (Namiot *et al.*, 2023).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Eksperimentaalse osa eesmärgid olid:

- patsiendi endomeetriumi biopsiatest epiteliaalsete 3D organoidide tekitamine ning biopanga loomine
- kullerpeptiididega kaetud hõbe-nanoosakeste spetsiifilise seondumise ja organoididesse sisenemise hindamine

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Endomeetriumi organoidide loomine

Endomeetriumi koetükid koguti doonoritelt biopsia käigus. Tartu Ülikooli Eetikakomitee kiitis heaks proovide kogumise ja informeeritud nõusoleku vormid, mis olid allkirjastatud kõikide patsientide poolt.

Organoidide tekitamiseks ja kultiveerimiseks kasutati veidi kohandatud varasemalt kirjeldatud protokoll (Turco *et al.*, 2017). Lühidalt: koeproove pesti RPMI-1640 söötmega (Gibco/Life Technologies), millele oli lisatud penitsilliini-streptomütsiini (10 mL/L, Sigma) ning kude hakiti 0,5–1 mm³ suurusteks tükkideks. Organoidide tekitamiseks vajalike epiteliaalsete näärmete eraldamiseks inkubeeriti koetükke pöörleval alusel (Thermo Scientific) kollagenaasi-dispaasi lahuses: 0,4 mg/ml kollagenaas V, 1,25 U/ml dispaas II, RPMI-1640 sööde, 10% vasika loote seerum (Gibco/Life Technologies), 37°C. Hetkel, mil koelüsaadi visuaalsel hinnangul oli näha vaid väikeseid koetükke (näärmeid), sõeluti see läbi 100 µm rakuõela (Corning) ning sõelale jäänud näärmed pesti RPMI-1640 söötmega, uhuti tagurpidi Petri tassile, koguti kokku ja tsentrifuugiti 500 x g, 5 min. Näärmed suspendeeriti u 50 korda baassöötmes (Advanced DMEM F12, Life Technologies), et neid osaliselt dissotsieerida ning tsentrifuugiti uuesti. Seejärel eemaldati supernatant, lisati jääkülma Matrigeli (Corning, vähendatud kasvufaktoritega) ja suspendeeriti õrnalt. Organoide Matrigeli segus hoiti jää peal, sest toatemperatuuril hakkab Matrigel kiiresti polümeriseeruma. Koekultuuri 48-kaevulise rakuplaadi kaevude keskele pipeteeriti 20–25 µl Matrigeli-rakususpensiooni, tõsteti inkubaatorisse 37°C juurde ning 15–30 min möödumisel kaeti iga tilk 250 µl kasvusöötmega (Tabel 1).

Katsetes kasutati patsientide endomeetriumi kudetest moodustunud organoide: HUT 50, HUT 57, HUT 60, HUT 64, HUT 71, millest esimesed kolm on tekitatud proliferatiivse faasi ja viimased kaks sekretoorse faasi koest. Kuigi kirjeldatud kudede puhul pole tegu

immortaliseeritud materjaliga, kasutatakse edaspidi arusaadavuse lihtsustamiseks töös läbivalt terminit “organoidiliin”.

Tabel 1. Kasvusöötme komponendid.

Komponendid	Lõppkontsentratsioon lahuses	Roll	Tootja
Advanced DMEM/F12	1X	Rakkude kasvu soodustava koostisega baassööde	Life Technologies
N2 lisand	1X	Seerumivaba lisand, toetab primaarrakkude kasvu	Life Technologies
B27 lisand ilma A vitamiinita	1X	Seerumivaba lisand primaarrakkudele, ei kutsu esile diferentseerumist	Life Technologies
Primocin	100 µg/ml	Laia spektriga antibiootikum ja fungitsiid, ei kahjusta rakke, surmab mikroobid (bakterid, mükoplasma, seened)	Invivogen
N-atsetüül-L-tsüsteiin	1,25 mM	Antioksidant, kaitseb vabade hapniku radikaalide eest	Sigma Aldrich
L-glutamiin	2mM	Aminohape, valkude komponent	Gibco/Life Technologies
Rekombinantne inimese EGF	50 ng/ml	Kasvufaktor, stimuleerib epiteelirakkude proliferatsiooni	Peprtech
Rekombinantne inimese Noggin	100 ng/ml	Difundeeruv valk, reguleerib TGF-β perekonna aktiivsust	Peprtech
Rekombinantne inimese R-spondin-1	75 ng/ml	Valk, mis indutseerib rakkude proliferatsiooni	Peprtech
Rekombinantne inimese FGF-10	100 ng/ml	Valk, mis soodustab rakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist	Peprtech
Rekombinantne inimese HGF	50 ng/ml	Valk, mis toimib kasvufaktorina. Toetab rakkude proliferatsiooni, morfogeneesi	Peprtech
Y-27632	10 µM	Inhibiitor, parandab rakkude ellujäämist, takistades apoptoosi	Merck
A83-01	500 nM	Inhibiitor, mis takistab epiteelirakkude üleminekut mesenhüümiks	System Biosciences
Nikotiinamiid	10mM	Toetab rakkude diferentseerumist	Sigma Aldrich

2.2.2. Endomeetriumi organoidide kasvatamine

Organoidid kasvasid veeauruga küllastatud koekultuuri CO₂-inkubaatoris temperatuuril 37°C. Peale endomeetriumi organoidide loomist vahetati kasvusöödet iga 2–3 päeva tagant. Organoidide kasvu jälgimiseks ja pildistamiseks kasutati kaameraga varustatud inverteeritud valgusmikroskoopi (Zeiss Primovert). Organoide külvati ümber vastavalt vajadusele iga 5–14 päeva tagant. Organoidide ümber külvamiseks lõhustati esmalt Matrigeli tilk pipetiotsikuga kraapides söötmesse ning tõsteti neljakaupa 1,5 ml katsutitesse. Seejärel tsentrifuugiti katsuteid 600 x g, 6 min, eemaldati supernatant ja asendati baassöötmega. Organoidide lõhkumiseks pipeteeriti elektroonilise pipetiga (Picus Nxt) segu 180 korda, keskmise jõuga. Lisati 1 ml baassöödet ja tsentrifuugiti. Seejärel eemaldati supernatant, pipeteeriti 50 korda ja tsentrifuugiti uuesti. Eemaldati supernatant, lisati iga kaevu kohta 20–25 µl Matrigeli ja plaaditi koekultuuri 48-kaevulisele rakuplaadile. Matrigeli-organoidide tilka inkubeeriti temperatuuril 37°C, 15 min. Seejärel lisati igasse kaevu 250 µl kasvusöödet.

Organoidide külmutamiseks asendati sööde rakkude taastamise lahusega (*Cell Recovery Solution*, Corning) ja hoiti 60 min jääl. Rakkude taastamise lahus depolümeriseerib mitte-ensümaatilisel Matrigeli. Segu pesti baassöötmega, suspendeeriti õrnalt umbes 50 korda, et organoidide struktuuri veidi lõhkuda. Baassööde asendati 0,5 ml külmutamissöötmega (*Recovery cell culture freezing medium*, Gibco/Life Technologies) ning hoiti aeglaselt jahtuvas karbis (Coolcell, Corning) -80°C juures üle öö, seejärel hoiustati vedelas lämmastikus.

2.2.3. Immunohistokeemia

Immunohistokeemia (*Immunohistochemistry*, IHC) on laboratoorne meetod, milles kasutatakse antikeha ja antigeeni vahelist spetsiifilist seondumist, et tuvastada ja lokaliseerida rakkudes ja kudedes esinevaid konkreetseid antigeene. Immunohistokeemiat kasutatakse muuhulgas patoloogiate kliiniliseks diagnostikaks. (Magaki *et al.*, 2019)

Käesolevas töös kasutati organoide moodustanud rakkude päritolu kindlakstegemiseks primaarset ja sekundaarset antikeha, et täpsemalt tuvastada epiteliaalse markeri olemasolu. IHC tehti täppis- ja nanomeditiini instituudis kasutatava standardprotokolli põhjal. Primaarne antikeha seondub organoidide tsütokeratiiniga ja sekundaarne antikeha seondub primaarse antikehaga. Immunohistokeemia jaoks teostati endomeetriumi organoidide immuunvärvimine tsütokeratiin 8 vastase primaarse antikehaga (*Anti-Cytokeratin 8* [EP1628Y] (ab53280), Abcam). Katse alustamiseks külvati organoidid 7 µl tilgana 8-kaevulise klaaspõhjaga rakuplaadile. Kui organoidid olid piisavalt kasvanud ja oma tavapärase morfoloogia saavutanud, tsentrifuugiti rakuplaati 10°C juures 3000 rpm, 10 min, et viia organoidid ärauhutamise vältimiseks plaadi põhja lähedale. Seejärel pesti organoide fosfaatpuhverdatud

soolalahuses PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Thermo Scientific) ja inkubeeriti 4% paraformaldehüüdis (PFA, Sigma-Aldrich) toatemperatuuril 45 min, et rakke fikseerida. Järgmiseks pesti 3 korda PBS-iga ja inkubeeriti permeabilisatsiooni puhvris (0,2% Triton-X PBS-is) toatemperatuuril 10 min, et muuta rakumembraanid läbilaskvaks. Peale inkubatsiooni pesti organoide 3 korda PBS-iga. Mitte-spetsiifilise antikeha seondumise vältimiseks inkubeeriti organoide blokeerimispuhvris (5% veise seerumi albumiin, 5% veise loote seerum, 5% kitse seerum 0,05% PBS-Tweeni lahuses) toatemperatuuril, 30 min. Seejärel inkubeeriti pooli ühe patsiendi organoide tsütokeratiin 8 vastases antikeha lahjenduses (lõppkontsentratsiooniga 0,165 µg/ml) lahjendatud blokeerimispuhvris DBB (*diluted blocking buffer*, blokeerimispuhver 1/5 lahjendatud PBS-Tween'is), liikaval alusel temperatuuril 4°C üleöö. Teine pool organoididest oli vajalik negatiivse kontrollina kasutamiseks ning neid organoide hoiti samadel tingimustel, kuid puhta DBB-ga inkubeerides. Organoide pesti 3x3 min 500 µl PBST-ga (PBS-Tween; PBS + 0,005% Tween 20®). Seejärel inkubeeriti kõiki organoide (kaasaarvatud negatiivseid kontrolle) fluorestsentsmärgisega sekundaarse antikehaga (*goat anti-rabbit* Alexa 647, [A21245], Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (lahjendatud DBB-s, lõppkontsentratsiooniga 4 µg/ml) 30 min toatemperatuuril. Alates sekundaarse antikeha lisamisest hoiustati rakuplaati pimedas, et vältida fluorestsentsmolekulide lagunemist, mis põhjustaks fluorestsentsi signaali vähenemist ja mõjutaks tulemuste usaldusväärsust. Peale inkubatsiooni pesti organoide 3x3 min PBST-s. DNA värvimiseks inkubeeriti organoide DAPI (4',6-diamino-2-fenüülindool) lahjenduses PBS-is (lõppkontsentratsiooniga 2 µg/ml) toatemperatuuril, 10 min. Järgmise etapina pesti organoide 3x3 min PBS-is ja hoiustati rakuplaati pimedas, jahedas (4°C) kuni konfokaalmikroskoobiga vaatamiseni.

2.2.4. Hõbe-nanoosakeste süntees ja funktsionaliseerimine

Hõbe-nanoosakesed sünteesitakse täppis- ja nanomeditiini laboris, kasutades Lee ja Meiseli poolt kirjeldatud tsitraadimeetodit (Lee & Meisel, 1982) ning funktsionaliseeritakse eelnevalt optimeeritud viisil (Braun *et al.*, 2014) (Tobi *et al.*, 2021) (Simón-Gracia *et al.*, 2021). Hõbe-nanoosakeste märgistamiseks lisati 500 µl 40 nM AgNP lahusele PBST-s 5 µl 2 mM N-hüdrosü-suktsiinimiid-funktsionaliseeritud fluorofoori CF555 (NHS-CF555; Sigma-Aldrich) dimetüülsulfoksiidis (DMSO; Sigma-Aldrich); NHS-rühmad reageerivad vabade aminorühmadega funktsionaliseeritud AgNP-de pinnal.

Saadud segu inkubeeriti pimedas temperatuuril 4 °C üle öö. Järgmisel päeval pesti osakesi 3 korda 500 µl PBST-ga, tsentrifuugides temperatuuril 4 °C kiirusega 3500 × g 10 minutit. AgNP-de sademele lisati 500 µl PBST-d ja lahust sonikeeriti ultrahelivannis RK 52 (Bandelin

Electronics). Seejärel lisati 500 µl AgNP-lahusele 10 µl 2 mM biotinüleeritud peptiidi deioniseeritud vees; biotinüleeritud peptiid reageerib NeutrAvidini molekulidega AgNP-de pinnal. Segu inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril, misjärel pesti AgNP-sid ühe korra 500 µl PBST-ga, tsentrifuugides temperatuuril 4 °C kiirusega $3500 \times g$ 10 minutit. AgNP-d filtreeriti läbi 0,2 µm PVDF-membraaniga süstlafiltrite (Millipore) ja hoiustati pimedas temperatuuril 4 °C. Enne kasutamist sonikeeriti AgNP-lahust 2 minutit ultrahelivannis.

2.2.5. Hõbe-nanoosakeste transfektsioon

Hõbe-nanoosakeste internaliseerimise uurimiseks endomeetriumi organoididesse kasutati umbes 6. päeva organoide (ümberplaatimisest). Esmalt asendati 48-kaevulisel rakuplaadil kasvusööde rakkude taastamise lahusega (Cell Recovery Solution, Corning) ning kraabiti pipeti otsikuga Matrigeli tilk lahusesse. Seejärel tõsteti kogu materjal ümber 1,5 ml katsutitesse (Nerbe Plus). Kõiki proove inkubeeriti 1 h jääl, mille jooksul keerati Eppendorfe paar korda aeglaselt üle kaane. Peale 1 h möödumist tsentrifuugiti 3 min, 300g, siis pesti organoide baassöötmega ja lisati kasvusöödet. Iga organoidiliin jagati viieks grupiks, kuhu lisati: 1) AgNP VAG1 peptiidiga 2) AgNP PL1 peptiidiga 3) AgNP iRGD peptiidiga 4) AgNP ainult biotiiniga, ilma peptiidita (negatiivne kontroll) 5) negatiivne töötlemata kontroll (UT; *untreated*).

Kõiki hõbe-nanoosakesi sonikeeriti 1 min, et lõhustada potentsiaalsed seismisel tekkinud agregaadid. Alates sellest katsepunktist hoiti kõiki proove stabiilselt pimedas. Kõiki AgNP lisati lõppkontsentratsioonini 0,6 nM. Seejärel inkubeeriti proove rotaatoril 0,2 ml PCR katsutites temperatuuril 37°C, 3h. Järgmiseks tsentrifuugiti organoidid hetkeks minitsentrifuugiga põhja, sööde eemaldati koos mitte-seondunud hõbe-nanoosakestega ja organoide pesti baassöötmega ja DPBS-iga (Dulbecco's phosphate buffered saline; Thermo Scientific), peale igat pesu säilis 25 µl lahust, et organoidide morfoloogiat mitte kahjustada ja neid pipetiotsikusse mitte tõmmata. Mittesisenenud nanoosakeste eemaldamiseks inkubeeriti organoide söövituslahuse (*Etching solution*) 0,2 x lahjenduses DPBS-is, mis koosnes 200 mM naatriumtiosulfaadist (Sigma-Aldrich) ja 200 mM kaaliumferritsüaniidist (Sigma-Aldrich) PBS-is, suhtena 1:1, toatemperatuuril, 10 min. Seejärel tsentrifuugiti organoidid katsutite põhja ja pesti 3 x DPBS-iga. Raku tuumade visualiseerimiseks inkubeeriti organoide Hoechst 33342 tuumavärviga, lõppkontsentratsiooniga 10 µM (Thermo Scientific) toatemperatuuril 15 min. Seejärel pesti 3 x DPBS-iga.

2.2.6. Konfokaalmikroskoopia

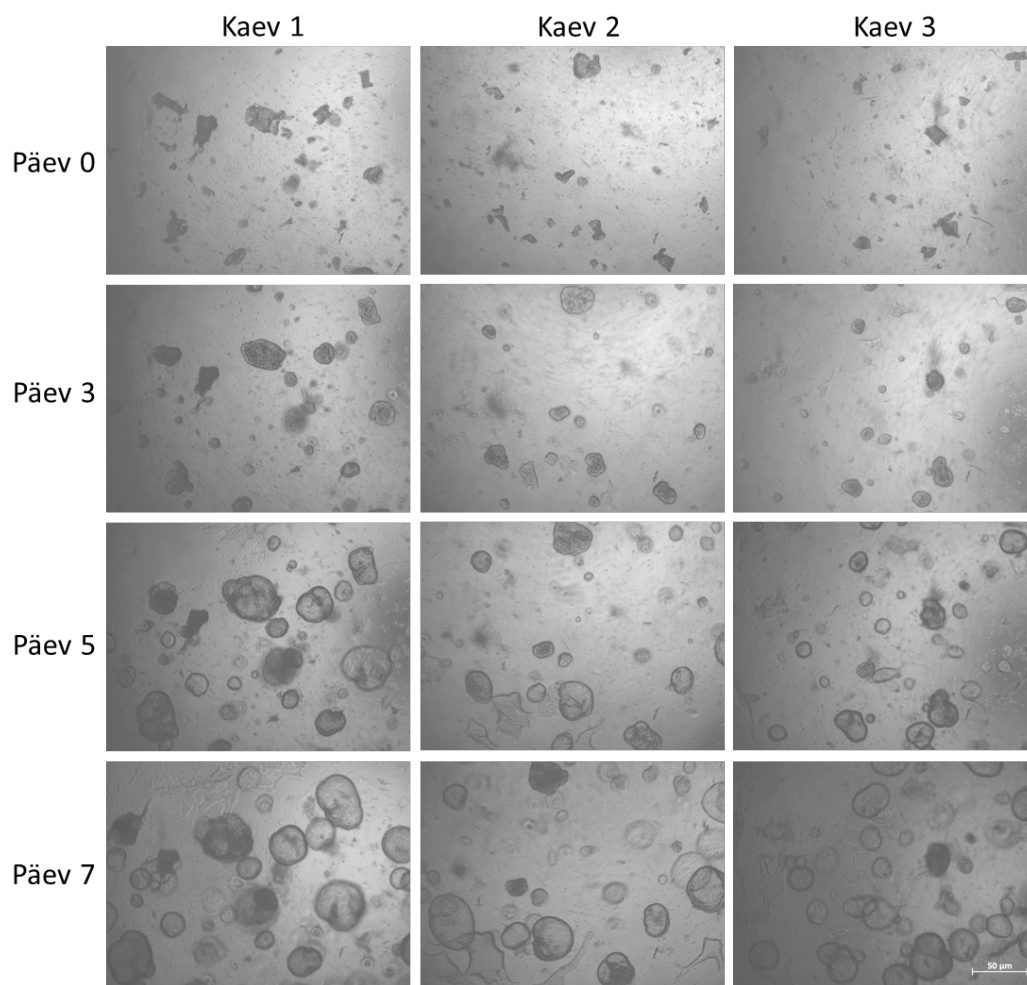
Peale hõbe-nanoosakeste transfektsiooni tõsteti organoidid ümber 8-kaevulisse klaaspõhjaga pildistamiskambritesse (Thermo Scientific), igasse kaevu lisati DPBS-i. Tulemused visualiseeriti ja pildistati konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM710 ning analüüsiti kasutades ZEN tarkvara.

Organoide hoiti stabiilselt pimedas ja nende visualiseerimiseks kasutati laseriga ergastamist: AgNP CF555 märgise puhul 561 nm, tuumavärvide Hoechst ja DAPI puhul 405 nm ja sekundaarset antikeha (goat anti-rabbit Alexa 647) visualiseeriti lainepikkusel 633 nm.

2.3. Tulemused

2.3.1. Organoidide moodustumine

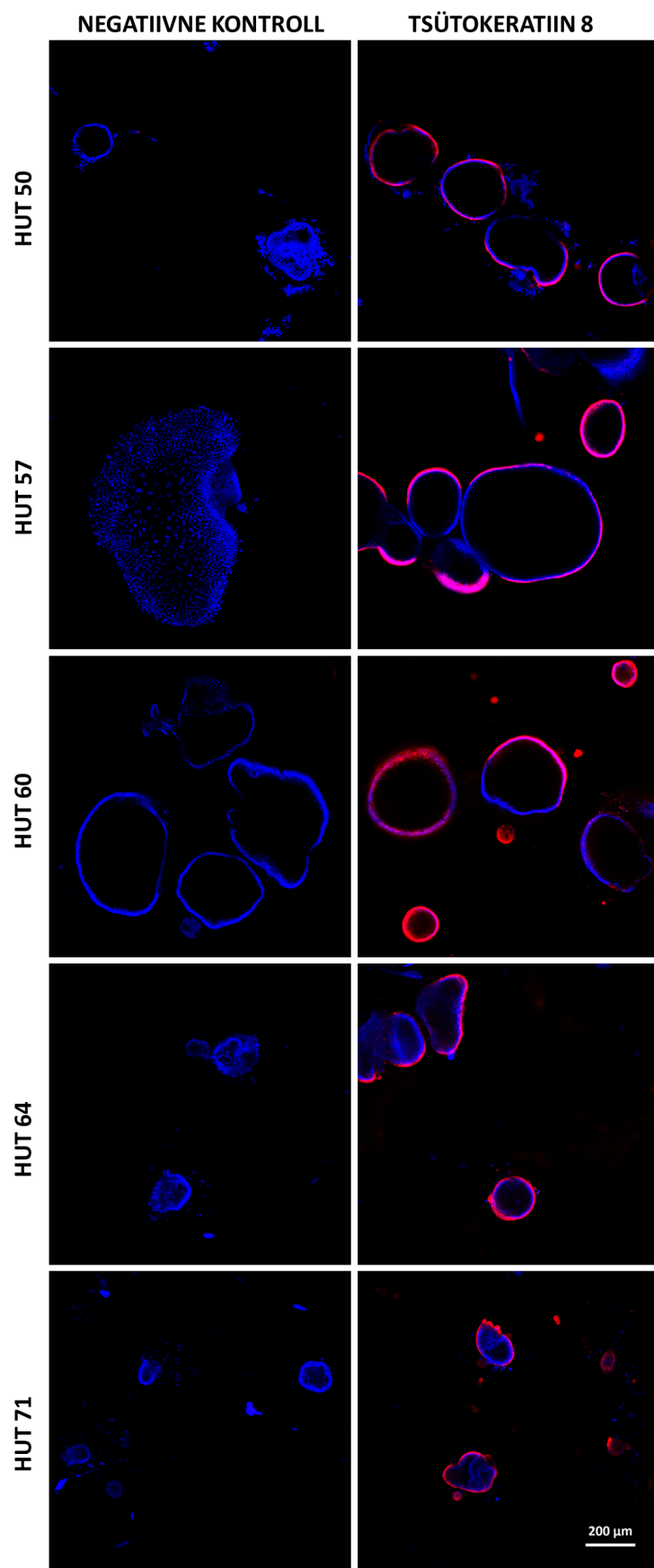
Endomeetriumi patsiendiproovist (HUT 67) tekitatud organoidide moodustumist ja 3D kultuuride muutumist jälgiti ajas valgusmikroskoobi abil. Fotod tehti erinevatel ajapunktidel kolmest erinevast organoide sisaldavast Matrigeli tilgast, püüdes jäädvustada iga rakuplaadi kaevu sama positsiooni, et lihtsustada kultuuri muutumise hilisemat visuaalset hindamist. Organoide pildistati külvamise päeval (päev 0) ning kolmandal, viiendal ja seitsmendal päeval peale külvamist. Valgusmikroskoopia piltidelt (joonis 8) on näha materjali hulga ning organoidide diameetri ajast sõltuvat suurenemist. Mida rohkem materjali algselt külvati, seda rohkem organoide tekkis. Endomeetriumi organoidide seest õõnes morfoloogia vastab varasemalt kirjanduses kirjeldatule (Turco *et al.*, 2017).



Joonis 8. Valgusmikroskoobi pildid suureneva diameetriga endomeetriumi organoididest (HUT 67) erinevatel ajapunktidel. Vasakult paremale on näidatud n=3 erinevad Matrigeli tilgad erinevates rakukultuuri plaadi kaevudes. Ülevalt alla on lisatud sama kaevu samast positsioonist tehtud fotod, tuues välja möödunud päevade arv alates külvamise hetkest. Mõõtkava - 50 µm

2.3.2. Organoidide epiteliaalne päritolu

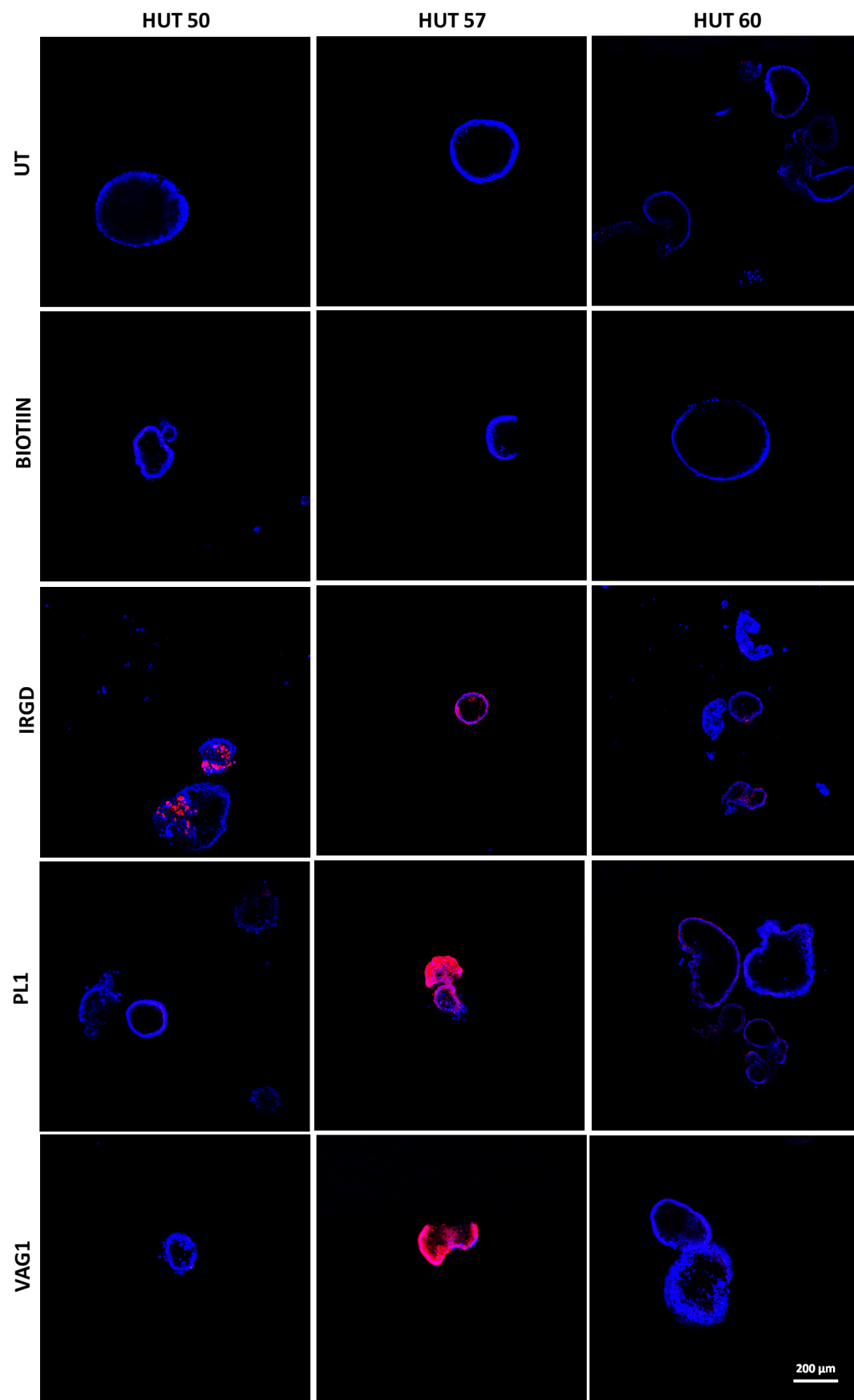
Organoidide epiteliaalset päritolu kontrolliti immuunohistokeemiliste meetoditega, kasutades tsütokeratiin 8 vastast primaarset antikeha ja sellega seonduvat fluorestsentsmärgisega sekundaarset antikeha. Tsütokeratiin 8 on epiteeli rakkudes leiduv tsütoskeleti valk. Konfokaalmikroskoobi piltidel (joonis 9) on kuvatud tsütokeratiin 8 värvinguga organoidid erinevatest organoidiliinidest ning vastavad negatiivsed kontrollid. Kõigis organoidiliinides nähtav punane signaal pärineb primaarsele tsütokeratiin 8 antikehale seondunud sekundaarselt antikehast ning kinnitab organoidide epiteliaalset päritolu ja sinine signaal esindab tuumavärv DAPI-t. Selle katse tulemus koos eelmises peatükis kirjeldatud organoidide eeldatava morfoloogia ja eduka materjali hulga suurenemise kinnitamisega oli kontrollitud tehniline eksperimentide korratavus. Sellega loeti endomeetriumi organoidide tekitamise tehnoloogia edukalt täppis- ja nanomeditsiini laboris üles seatuks ning jätkati biopanga loomisega ka teiste patsientide endomeetriumi koeproovidest.



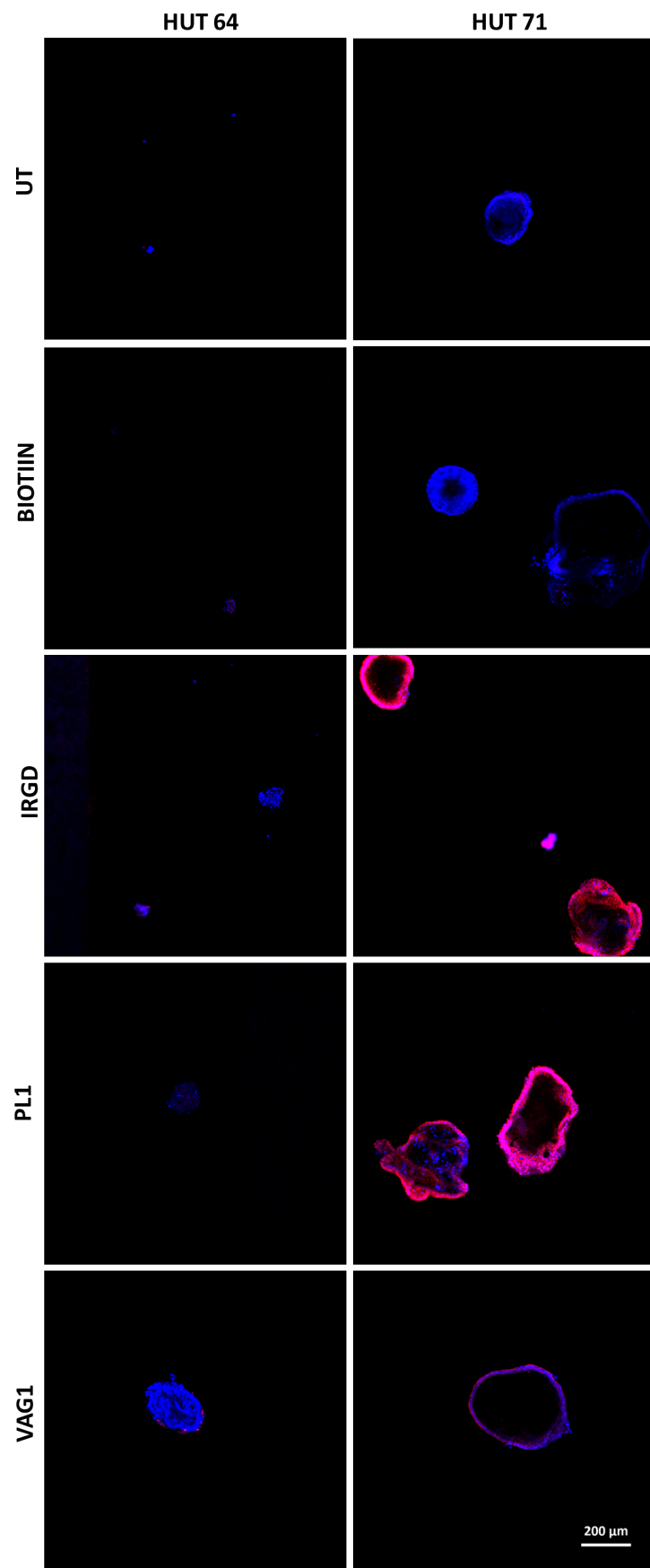
Joonis 9. Konfokaalmikroskoobi pildid endomeetriumi organoididest n=5 (HUT 50, HUT 57, HUT 60, HUT 64, HUT 71) kinnitavad epiteeliaalset päritolu. Parempoolne veerg on tsütokeratiin 8 vastase primaarse antikehaga töödeldud ja selle signaal on normaliseeritud vasakpoolse ilma primaarse antikehata negatiivse kontrolliga. Mõõtkava – 200 μm

2.3.3. Hõbe-nanoosakeste sisenemine

Hõbe-nanoosakese sisenemise uurimiseks viidi läbi katse VAG1, PL1, iRGD peptiididega. Negatiivseteks kontrollideks kasutati peptiidita AgNP, mille küljes oli vaid biotiini molekul ja töötlemata kontrolli (UT), kuhu ei lisatud hõbe-nanoosakesi. Punane signaal tähistab sisenenud hõbe-nanoosakesi (fluorestsentsmärgis CF555) ja sinine signaal rakutuumasid (tuumavärv DAPI). AgNP sisenemist proliferatiivse faasi endomeetriumi organoididesse on näha (joonis 9) kõigi organoidiliinide põhjal: iRGD sisenes HUT 50 ja HUT 57 liinidesse, PL1 sisenes HUT 57 ja HUT 60 liinidesse ja VAG1 sisenes HUT 50 ja HUT 57 liinidesse. Sekretoorse faasi organoididesse sisenesid AgNP-d vastavalt: iRGD sisenes HUT 64 ja HUT 71, PL1 sisenes HUT 71 ja VAG1 sisenes HUT 64 ja HUT 71 (joonis 10).



Joonis 9. AgNP sisenemine n=3 proliferatiivse faasi endomeetriumi organoididesse (HUT 50, HUT 57, HUT 60). Joonisel on kujutatud ülevalt alla vastavate organoidiliinide katseid töötlemata prooviga, AgNP biotiiniga, AgNP iRGD peptiidiga, AgNP PL1 peptiidiga, AgNP VAG1 peptiidiga. Sinine värv – DAPI; punane värv – AgNP signaal; mõõtkava – 200 µm



Joonis 10. AgNP sisenemine n=2 sekretoorse faasi endomeetriumi organoididesse (HUT 64, HUT 71). Joonisel on kujutatud ülevalt alla vastavate organoidiliinide katseid töötlemata prooviga, AgNP biotiiniga, AgNP iRGD peptiidiga, AgNP PL1 peptiidiga, AgNP VAG1 peptiidiga. Sinine värv – DAPI; punane värv – AgNP signaal; mõõtkava – 200 µm

2.4. Arutelu

Inimese endomeetriumi uurimiseks on kasutatud 2D rakukultuure, kuid erinevalt 3D kultuurisüsteemidest ei ole nad hormonaalselt mõjutatavad. Lisaks on primaarsed epiteeliaalsed endomeetriumi rakud tõrksad ühekihilise rakukultuurina kasvama. Selle asemel pakuvad 3D kultuurisüsteemid täpsemat ja tõetruumat mudelit endomeetriumi uurimiseks. 3D kultuuride puhul on võimalik uurida rakkudevahelisi interaktsioone, kudede omadusi ja haiguslikke seisundeid. Üheks 3D endomeetriumi modelleerimise võimaluseks on iseorganiseeruvate, geneetiliselt stabiilsete endomeetriumi näärmete epiteelirakkudest koosnevate organoidide loomine. Organoididel on endomeetriumi mudelitest ainukesena *in vivo* endomeetriumi sarnane näärmeline struktuur, mistõttu valiti see mudel käesoleva bakalaureusetöö teostamiseks.

Organoidid tekitati patsientide endomeetriumi biopsiatest, neid kasvatati, külvati ümber ja tulemusena loodi organoidide biopank, mis on vajalik, et teha erinevaid uuringuid ja eksperimente edaspidi ilma et peaks iga katse puhul uue patsiendi koe hankima ja sellest organoide kasvatama. Lisaks biopanga loomisele testiti organoidide peal erinevate kullerpeptiididega funktsionaliseeritud hõbe-nanoosakeste spetsiifilist sisenemist.

Tavapäraste ravimite, eriti näiteks keemiaravi ja kiiritusravi puhul on probleemiks nende selektiivsuse puudumine süsteemsel manustamisel, mistõttu kahjustatakse lisaks haigetele rakkudele ka normaalseid terveid rakke. Seepärast on kujunenud uueks uurimissuunaks sihtmärkrakkudele spetsiifiliste ravimite ja nende transportvektorite väljatöötamine. Üheks potentsiaalseks lahenduseks on faagidisplei abil leitud kullerpeptiidid, mis on spetsiifilised sihtmärk-koele ja seetõttu võrreldes tavaliste süsteemsete ravimite manustamisega toovad kaasa endaga vähem kõrvalmõjusid. (Kapoor *et al.*, 2012) Funktsionaliseeritud hõbe-nanoosakesi on uuritud ravimite kohaletoimetamise, haiguste diagnostika ja kuvamise valdkondades. Hõbedapõhistel nanosüsteemidel on mitmeid eeliseid tavapäraste meetodite ees: parem biosobivus, biolagunevus, spetsiifiline sihtimine ning selektiivsus, madal toksilisus ja kõrge lokaalse kontsentratsiooniga kontrollitud ravimi vabanemine. (Rabiee *et al.*, 2022) Hõbe-nanoosakesi saab võrdlemisi kergesti sünteesida ja modifitseerida, mis võimaldab nende märkimist kullerpeptiididega. Kullerpeptiidide abil on võimalik (ravi)molekule viia kindlatesse kohtadesse organismis. Nende nanomõõtmetes suurus võimaldab tungida tõhusalt kudedesse ning selle tulemusel akumuleerub ravim lokaalselt ja on võimalik hoida madalat üldist kontsentratsiooni ülejäänud organismis.

Viimaste aastate jooksul on avaldatud mitmeid artikleid (Prasad *et al.*, 2021 ; Mahapatra *et al.*, 2022), mis käsitlevad nanoosakeste ja organoidide ühendamise olulisust ja perspektiivi. Nanoosakeste sisenemist organoididesse on varasemalt kirjeldatud näiteks kolorektaalvähi

põhjal, kus organoidid loodi kasvaja koest (McCarthy *et al.*, 2021). Lisaks on varasemalt tehtud hõbe-nanoosakeste tsütotoksilisuse uuringuidaju organoidide põhjal (Huang *et al.*, 2022).

Siinses töös uuriti varasemalt kirjeldatud peptiidide iRGD ja PL1 ja täppis- ja nanomeditasiini laboratooriumi poolt leitud veel publitseerimata peptiidi VAG1 kasutusvõimalusi endomeetriumi-spetsiifilise kullerina, negatiivseteks kontrollideks kasutati peptiidita AgNP, mille küljes oli vaid biotiini molekul ja töötlemata kontrolli (UT), kuhu ei lisatud hõbe-nanoosakesi. Biotiini kasutatakse AgNP-de puhul seetõttu, et biotiini (peptiidi küljes) ja avidiini (AgNP küljes) interaktsioon on osutunud üheks tugevamaks ja täpsemaks selektiivseks mittekovalentseks sidemeks (Bage & Kar, 2022). iRGD valiti üheks katsetatavaks peptiidiks, sest selle puhul on kindlaks tehtud võime spetsiifiliselt sihtida sihtmärgiks olevaid vähirakke (iRGD on vähiravi faas 2 kliinilistes katsetes) (Kang *et al.*, 2020). PL1 peptiidi katsetati, sest selle sisenemine on tõestatud nii *in vitro* endometrioosi rakukultuuridesse kui ka näidatud *ex vivo* seondumist endometrioosi kolletele (Simón-Gracia *et al.*, 2021). Peptiid VAG1 on uurimisjärgus ja veel publitseerimata kullerpeptiid, mis on täppis- ja nanomeditasiini laboratooriumi poolt *ex vivo* faagidisplei meetodil tuvastatud, kasutades endomeetriumi ja endometrioosi kudesid.

Sellest tulenevalt uuriti antud töös, kas ja millised peptiidid on võimeliselt spetsiifiliselt endomeetriumi epiteelirakkudega seonduma ja organoididesse sisenema. Organoididesse sisenevate peptiidide kindlakstegemine ja uurimine on oluline, et edaspidi saada veelgi täpsemalt teada, kuidas organoidid reageerivad erinevatele stiimulitele, sealhulgas hormoonidele, ravimitele või toimeainetele ning võrrelda neid tulemusi eluskoega ja traditsiooniliste ravimeetoditega. See aitab kaasa bioloogiliste mehhanismide paremale mõistmisele ning võimaldab arendada tõhusamaid ravimeid ja diagnostikameetodeid.

Tehtud katsest selgus, et AgNP-d, mis olid funktsionaliseeritud peptiid iRGD-ga, sisenesid kõikidesse organoidiliinidesse (nii proliferatiivses kui ka sekretoorses faasis), peptiid PL1-ga nanoosakesed sisenesid HUT 51, HUT 60 ja HUT 71 organoididesse ja VAG1 peptiidiga osakesed sisenesid organoidiliinidesse HUT 50, HUT 57, HUT 64 ja HUT 71. Seost menstruaalfaasi ja hõbe-nanoosakeste sisenemise vahel ei leitud.

Kuna kõik katsetatud peptiidid näitasid efektiivset spetsiifilist sisenemist organoididesse, võib antud töö edasiarendamiseks uurida organoide päris koele veel sarnasemalt, lisades teisi endomeetriumi rakutüüpe, näiteks stroomarakke. Organoidide ja stroomarakkude koos kasvatamine ehk assembloidid kirjeldavad päritolukude füsioloogilisemalt ja on seetõttu usaldusväärsemad mudelid ravimite testimiseks ja haiguste fenotüüpide jälgendamiseks (Rawlings *et al.*, 2021). Järgmisteks etappideks võib teha töös kasutatud peptiididega

funktsionaliseeritud hõbe-nanoosakestega sisenemise katseid patoloogilistesse kudedesse nagu näiteks endometrioos, mis on krooniline põletikuline haigus, mida iseloomustab endomeetriumi koe kasv väljaspool emakaõõnt. Samuti võib töö edasiarendamiseks uurida efekti loomudelites.

KOKKUVÕTE

Kullerpeptiidid ja hõbe-nanoosakesed on perspektiivsed alternatiivid tavapärastele diagnoosimis- ja ravimeetoditele, võimaldades spetsiifilisemalt läheneda haiguskoldele. Hõbe-nanoosakeste omadustest tingituna on neil biotsiidne aktiivsus mikroobide vastu ja suur eelis eelkliinilistes katsetes on see, et söövitushusega on võimalik eristada rakkudesse seondunud ja sisenenud osakesi.

Käesolevas töös on uuritud eelnevalt kirjeldatud efektiivsete kullerpeptiide iRGD, PL1 ning täppis- ja nanomediitsiini laboratooriumi poolt avastatud seni veel publikatsioonides kirjeldamata kullerpeptiidi VAG1 sisenemist endomeetriumi organoididesse, mis on iseorganiseeruvad, geneetiliselt stabiilsed 3D kultuurisüsteemid ning meenutavad päritolukoe morfoloogiat. Tulemused näitavad, et kõik katsetatud peptiididega funktsionaliseeritud hõbe-nanoosakesed on võimelised teatud endomeetriumi epiteelirakkudega seonduma ja organoididesse sisenema. Katsest ei selgunud, et nanoosakeste sisenemisel oleks seos menstruaalfaasiga ega see, miks mõne organoidiliini puhul sisenemist ei toimunud. Kokkuvõttes tuleb kasutatud funktsionaliseeritud AgNP-dega katseid korrata töö käigus loodud biopangas olevate organoididega, lisades sinna stroomarakke, mis loob füsioloogiliselt täpsemad ja seetõttu usaldusväärsemad mudelid.

SUMMARY

Homing peptides and silver nanoparticles are prospective alternatives to conventional diagnostic and therapeutic methods, allowing for a more specific approach towards disease foci. Due to the properties inherent in silver nanoparticles, they possess biocidal activity against microbes. A significant advantage in preclinical experiments is the ability to differentiate between silver nanoparticles bound to cells and those that have internalized, using an etching solution.

In this study, the internalization of previously described effective homing peptides, iRGD, PL1, and the homing peptide VAG1, discovered by the Laboratory of Precision and Nanomedicine and not yet described in publications, into endometrial organoids was investigated. These organoids are self-organizing, genetically stable 3D culture systems that resemble the morphology of the original tissue. The results demonstrate that all tested silver nanoparticles functionalized with peptides are capable of binding to endometrial epithelial cells and entering the organoids. The experiment did not reveal any association between nanoparticle entry and the menstrual phase, nor did it explain why entry did not occur in certain organoid lines.

In conclusion, it is necessary to replicate the experiments using the functionalized AgNPs with the organoids stored in the created biobank, while introducing stromal cells. This will create more physiologically accurate and, therefore, reliable models.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajat Kristina Kiisholtsi abivalmiduse, pühendumise, õpetamise ja eelkõige kannatlikkuse eest.

Samuti olen ma tänulik oma kaasjuhendajatele professor Tambet Teesalule ja professor Andres Salumetsale juhiste ja suunitluste eest.

Täna kogu meie uurimisgruppi meeldiva töökeskkonna loomise ja abivalmiduse eest.

Lisaks soovin tänada oma kursusekaaslast Triin Veinbergi, kelle toetus ja nõuanded aitasid palju kaasa siinse bakalaureusetöö valmimisele. Samuti olen tänulik täppis- ja nanomediitsiini laboratooriumist Allan Tobile, kes aitas mind hõbe-nanoosakestega.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abdellatif, A. A. H., & Alsowinea, A. F. (2021). Approved and marketed nanoparticles for disease targeting and applications in COVID-19. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 1941–1977. https://doi.org/10.1515/NTREV-2021-0115/ASSET/GRAPHIC/J_NTREV-2021-0115_FIG_001.JPG
- Bage, N., & Kar, P. (2022). Electrochemical sensing of biotin-avidin interaction on gold electrode modified by silver nanoparticles through covalent co-assembling. *Sensors International*, 3, 100159. <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2022.100159>
- Braun, G. B., Friman, T., Pang, H. B., Pallaoro, A., De Mendoza, T. H., Willmore, A. M. A., Kotamraju, V. R., Mann, A. P., She, Z. G., Sugahara, K. N., Reich, N. O., Teesalu, T., & Ruoslahti, E. (2014). Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nature Materials* 2014 13:9, 13(9), 904–911. <https://doi.org/10.1038/nmat3982>
- Carbonnel, M., Pirtea, P., de Ziegler, D., & Ayoubi, J. M. (2021). Uterine factors in recurrent pregnancy losses. *Fertility and Sterility*, 115(3), 538–545. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2020.12.003>
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine* 2012 18:12, 18(12), 1754–1767. <https://doi.org/10.1038/nm.3012>
- Check, J. H., Nowroozi, K., Chase, J., Nazari, A., & Braithwaite, C. (1992). Comparison of pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer between the donors and the recipients in a donor oocyte program. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9(3), 248–250. <https://doi.org/10.1007/BF01203822/METRICS>
- Croxatto, H. B., Ortiz, M. E., Díaz, S., Hess, R., Balmaceda, J., & Croxatto, H. D. (1978). Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 132(6), 629–634. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(78\)90854-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(78)90854-2)
- Diedrich, K., Fauser, B. C. J. M., Devroey, P., & Griesinger, G. (2007). The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human Reproduction Update*, 13(4), 365–377. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMM011>
- Ferenczy, A., & Bergeron, C. (1991). Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 622(1), 6–27. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1991.TB37847.X>
- Fitzgerald, H. C., Schust, D. J., & Spencer, T. E. (2021). In vitro models of the human endometrium: evolution and application for women’s health. *Biology of Reproduction*, 104(2), 282–293. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAA183>
- Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). Menstrual Cycle: Basic Biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1429.018>
- Huang, Y., Guo, L., Cao, C., Ma, R., Huang, Y., Zhong, K., Gao, H., Huang, Y., & Bu, Q. (2022). Silver nanoparticles exposure induces developmental neurotoxicity in hiPSC-derived cerebral organoids. *Science of The Total Environment*, 845, 157047. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.157047>
- Hyvönen, M., & Laakkonen, P. (2015). Identification and characterization of homing peptides using in vivo peptide phage display. *Methods in Molecular Biology*, 1324, 205–222. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_14

- Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 33. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.00033/BIBTEX>
- Kang, S., Lee, S., & Park, S. (2020). iRGD Peptide as a Tumor-Penetrating Enhancer for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 1906, 12(9), 1906. <https://doi.org/10.3390/POLYM12091906>
- Kapoor, P., Singh, H., Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2012). TumorHoPe: A Database of Tumor Homing Peptides. *PLOS ONE*, 7(4), e35187. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035187>
- Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J. A., & Ruoslahti, E. (2002). A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature Medicine* 2002 8:7, 8(7), 751–755. <https://doi.org/10.1038/nm720>
- Laakkonen, P., & Vuorinen, K. (2010). Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative Biology*, 2(7–8), 326–337. <https://doi.org/10.1039/C0IB00013B>
- Lal, S., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., Manavalan, R., & Pal, S. L. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011(06), 228–234.
- Lee, P. C., & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391–3395. https://doi.org/10.1021/J100214A025/ASSET/J100214A025.FP.PNG_V03
- Lessey, B. A. (2000). The role of the endometrium during embryo implantation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15 Suppl 6(SUPPL. 6), 39–50. <https://europepmc.org/article/med/11261482>
- Luddi, A., Pavone, V., Semplici, B., Governini, L., Criscuoli, M., Paccagnini, E., Gentile, M., Morgante, G., Leo, V. De, Belmonte, G., Zarovni, N., & Piomboni, P. (2020). Organoids of Human Endometrium: A Powerful In Vitro Model for the Endometrium-Embryo Cross-Talk at the Implantation Site. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 1121, 9(5), 1121. <https://doi.org/10.3390/CELLS9051121>
- Mäe, M., Myrberg, H., El-Andaloussi, S., & Langel, Ü. (2009). Design of a tumor homing cell-penetrating peptide for drug delivery. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 15(1), 11–15. <https://doi.org/10.1007/S10989-008-9156-X/FIGURES/3>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 289. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Mahapatra, C., Lee, R., & Paul, M. K. (2022). Emerging role and promise of nanomaterials in organoid research. *Drug Discovery Today*, 27(3), 890–899. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2021.11.007>
- McCarthy, B., Cudykier, A., Singh, R., Levi-Polyachenko, N., & Soker, S. (2021). Semiconducting polymer nanoparticles for photothermal ablation of colorectal cancer organoids. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81122-w>
- Messinis, I. E., Messini, C. I., & Dafopoulos, K. (2014). Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(6), 714–722. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2014.02.003>

- Mihm, M., Gangooly, S., & Muttukrishna, S. (2011). The normal menstrual cycle in women. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 229–236. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2010.08.030>
- Mizutani, S., Matsumoto, K., Kato, Y., Mizutani, E., Mizutani, H., Iwase, A., & Shibata, K. (2020). New insights into human endometrial aminopeptidases in both implantation and menstruation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(2), 140332. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2019.140332>
- Namiot, E. D., Sokolov, A. V., Chubarev, V. N., Tarasov, V. V., & Schiöth, H. B. (2023). Nanoparticles in Clinical Trials: Analysis of Clinical Trials, FDA Approvals and Use for COVID-19 Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 787, 24(1), 787. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010787>
- Nie, P., Zhao, Y., & Xu, H. (2023). Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114636. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2023.114636>
- Pirtea, P., Cicinelli, E., De Nola, R., de Ziegler, D., & Ayoubi, J. M. (2021). Endometrial causes of recurrent pregnancy losses: endometriosis, adenomyosis, and chronic endometritis. *Fertility and Sterility*, 115(3), 546–560. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2020.12.010>
- Põšnograjeva, K., Pleiko, K., Haugas, M., & Teesalu, T. (2022). New Tools for Streamlined In Vivo Homing Peptide Identification. *Methods in Molecular Biology*, 2383, 385–412. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_25/COVER
- Prasad, M., Kumar, R., Buragohain, L., Kumari, A., & Ghosh, M. (2021). Organoid Technology: A Reliable Developmental Biology Tool for Organ-Specific Nanotoxicity Evaluation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.696668>
- Pulit-Prociak, J., & Banach, M. (2016). Silver nanoparticles - A material of the future...? *Open Chemistry*, 14(1), 76–91. https://doi.org/10.1515/CHEM-2016-0005/ASSET/GRAPHIC/J_CHEM-2016-0005_FIG_004.JPG
- Rabiee, N., Ahmadi, S., Iravani, S., & Varma, R. S. (2022). Functionalized Silver and Gold Nanomaterials with Diagnostic and Therapeutic Applications. *Pharmaceutics* 2022, Vol. 14, Page 2182, 14(10), 2182. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14102182>
- Rawlings, T. M., Makwana, K., Tryfonos, M., & Lucas, E. S. (2021a). Organoids to model the endometrium: implantation and beyond. *Reproduction and Fertility*, 2(3), R85–R101. <https://doi.org/10.1530/RAF-21-0023>
- Ruoslahti, E. (2001). Homing Peptides. *Encyclopedic Reference of Cancer*, 417–418. https://doi.org/10.1007/3-540-30683-8_785
- Saw, P. E., & Song, E. W. (2019). Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein & Cell*, 10(11), 787–807. <https://doi.org/10.1007/S13238-019-0639-7>
- Simón-Gracia, L., Kiisholts, K., Petrikaitė, V., Tobi, A., Saare, M., Lingasamy, P., Peters, M., Salumets, A., & Teesalu, T. (2021). Homing peptide-based targeting of tenascin-C and fibronectin in endometriosis. *Nanomaterials*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/NANO11123257/S1>
- Singh, M., Singh, S., Prasad, S., & Gambhir, I. S. (2008). NANOTECHNOLOGY IN MEDICINE AND ANTIBACTERIAL EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115–122.

- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001/ASSET/DD723BC1-FC00-4957-9A19-CFCBDCB27D84/ASSETS/GRAPHIC/AC0310583003.JPEG>
- Symons, L. K., Miller, J. E., Kay, V. R., Marks, R. M., Liblik, K., Koti, M., & Tayade, C. (2018). The Immunopathophysiology of Endometriosis. *Trends in Molecular Medicine*, 24(9), 748–762. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2018.07.004>
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2013). Tumor-penetrating peptides. *Frontiers in Oncology*, 3 AUG, 216. <https://doi.org/10.3389/FONC.2013.00216/BIBTEX>
- Tempest, N., Hill, C. J., Maclean, A., Marston, K., Powell, S. G., Al-Lamee, H., & Hapangama, D. K. (2022). Novel microarchitecture of human endometrial glands: implications in endometrial regeneration and pathologies. *Human Reproduction Update*, 28(2), 153–171. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMAB039>
- Thiyagarajan, D. K., Basit, H., & Jeanmonod, R. (2022). Physiology, Menstrual Cycle. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500020/>
- Tobi, A., Willmore, A. M. A., Kilk, K., Sidorenko, V., Braun, G. B., Soomets, U., Sugahara, K. N., Ruoslahti, E., & Teesalu, T. (2021). Silver Nanocarriers Targeted with a CendR Peptide Potentiate the Cytotoxic Activity of an Anticancer Drug. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000097. <https://doi.org/10.1002/ADTP.202000097>
- Turco, M. Y., Gardner, L., Hughes, J., Cindrova-Davies, T., Gomez, M. J., Farrell, L., Hollinshead, M., Marsh, S. G. E., Brosens, J. J., Critchley, H. O., Simons, B. D., Hemberger, M., Koo, B. K., Moffett, A., & Burton, G. J. (2017). Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nature Cell Biology* 2017 19:5, 19(5), 568–577. <https://doi.org/10.1038/ncb3516>
- Vilella, F., Wang, W., Moreno, I., Quake, S. R., & Simon, C. (2021). Understanding the human endometrium in the 21st century. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 225(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2021.04.224>
- Wang, H., Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(5), 939–980. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.12.011>
- Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20), 8996–9031. <https://doi.org/10.7150/THNO.45413>

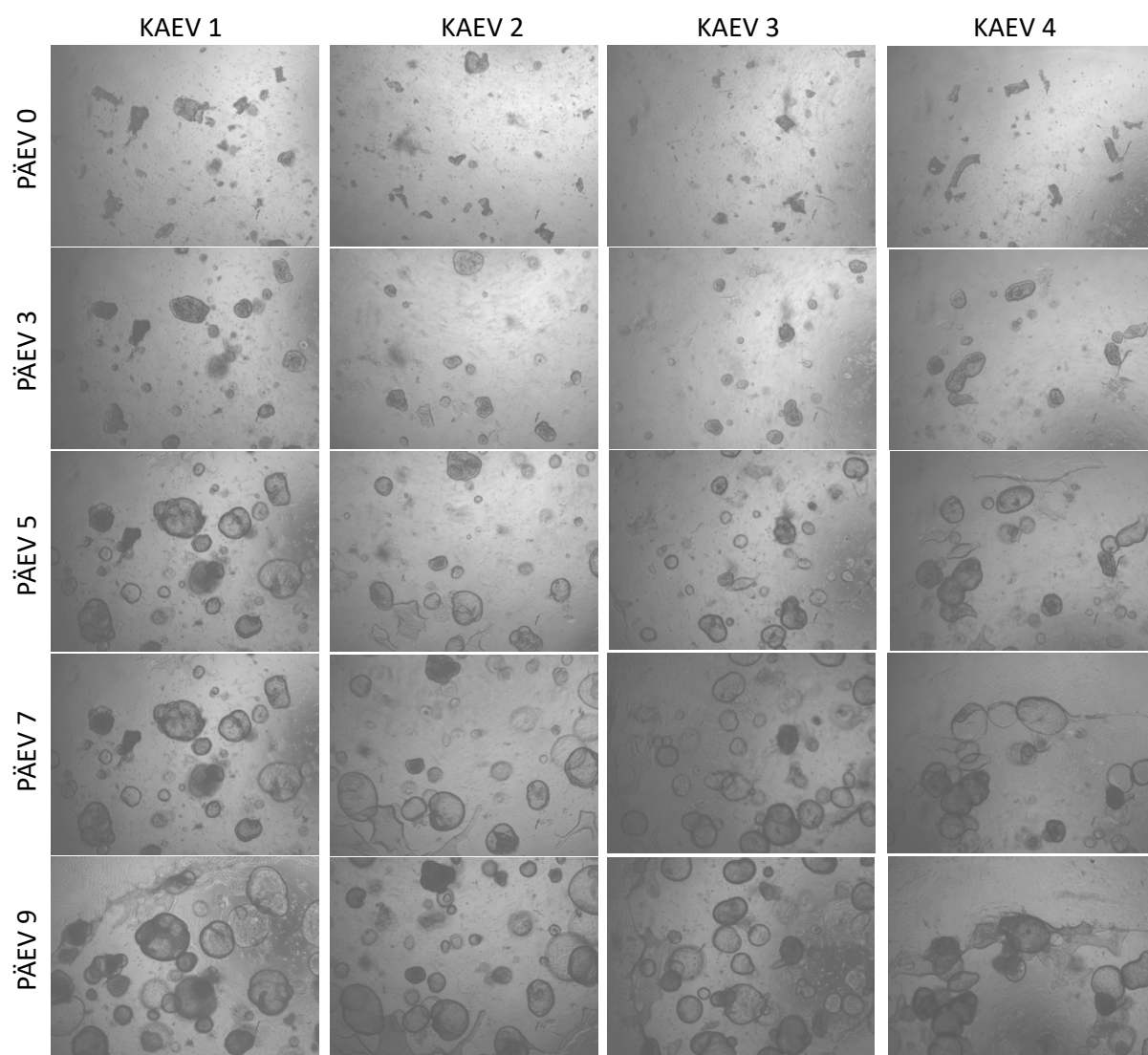
KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Maailma Terviseorganisatsioon – https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
(vaadatud 15.05.2023)

Inimese Proteoomi Atlas – <https://v16.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/endometrium>
(vaadatud 29.05.2023)

„Võõrsõnade leksikoni“ veebileht – <https://www.eki.ee/dict/vsl/> (vaadatud 29.05.2023)

LISA



Lisa 1. Valgusmikroskoobi pildid endomeetriumi organoididest (HUT 67) erinevatel ajapunktidel.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sylvia Paet,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
Endomeetriumi organoidide tekitamine ning peptiid-suunatud nanopartiklite sisenemine,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Kristina Kiisholts, Tambet Teesalu, Andres Salumets

(juhendaja nimi)

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **30.05.2026** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Sylvia Paet

30.05.2023