



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Simona Lenortavičiūtė

**NANODALELIŲ ĮTAKA MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ
MIGRACIJAI *IN VITRO***

**THE INFLUENCE OF NANOPARTICLES TO MESENCHYMAL STEM
CELLS MIGRATION *IN VITRO***

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2014

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

2014-06-02

(Data)

Simona Lenortavičiūtė

**NANODALELIŲ ĮTAKA MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ
MIGRACIJAI *IN VITRO***

**THE INFLUENCE OF NANOPARTICLES TO MESENCHYMAL STEM
CELLS MIGRATION *IN VITRO***

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas dr. Vytautas Kašėta

(Parašas) 2014-06-02
(Data)

Konsultantas dr. Eglė Strainienė

(Parašas) 2014-06-02
(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas doc. Dr. Angelė Kaulakienė

(Parašas) 2014-05-26
(Data)

Vilnius, 2014

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

2013-10-24

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

2013m. spalio 24 d. Nr. 361fm
Vilnius

Studentui (ei) Simonai Lenortavičiūtei

Baigiamojo darbo tema: Nanodalelių įtaka mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai *in vitro*

patvirtinta 2013 m. spalio 24 d. dekanų potvarkiu Nr. 361fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2014 m. birželio 2 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

1. Išskirti ir identifikuoti pelių kamieninių ląstelių populiaciją.
2. Nustatyti tiriamų nanodalelių įtaką išskirtų ląstelių metaboliniam aktyvumui.
3. Įvertinti nanodalelių (kvantinių taškų) kaupimąsi kamieninėse ląstelėse.
4. Įvertinti nanodalelių įtaką kamieninių ląstelių migracijai „žaizdos“ modelyje *in vitro*.
5. Įvertinti nanodalelių įtaką kamieninių ląstelių migracijai transmigracijos modelyje *in vitro*.

Baigiamojo darbo rengimo konsultantai:

prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis, dr. Eglė Strainienė

Vadovas

(Parašas)

dr. Vytautas Kašėta

Užduotį gavau

(Parašas)

Simonai Lenortavičiūtei

(Vardas, pavardė)

2013-10-24

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk. 2
Data 2014-06-02

Nanobiotechnologijų studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas **Nanodalelių įtaka mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai *in vitro***

Autorius **Simona Lenortavičiūtė**

Vadovas **dr. Vytautas Kašėta**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Pagrindiniai vėžinių susirgimų gydymo būdai, be chirurginės intervencijos, išlieka fotosensibilizuota, cheminė ir spindulinė terapija. Šios terapijos dažnai nesunaikina visų vėžinių ląstelių, neretai vėžys atsinaujina. Taip pat joms stinga selektyvumo, būdingi žymūs šalutiniai poveikiai. Sprendžiant selektyvumo problemą bandoma pasitelkti kamienines ląsteles nanodarinių (vaistų, diagnostinių ir pan.) nugabenimui tiesiai į naviką, nepakenkiant sveikoms ląstelėms. Šio baigiamojo magistro darbo tikslas tirti nanodalelių įtaką pelių kaulų kamieninėms ląstelėms ir jų migracijai *in vitro*.

Tyrimai buvo atlikti su kamieninėmis ląstelėmis, išskirtomis iš pelių kaulų, ir modelinėmis nanodalelėmis (kvantiniais taškais). Tirtas nanodalelių kaupimasis, kinetika ir pasiskirstymas ląstelėse, jų įtaka vitalinėms savybėms, kvantinių taškų įtaka ląstelių migracijai „žaizdos“ modelyje bei transmigracijos modelyje *in vitro*.

Nustatėme, kad kvantiniai taškai kaupiasi pelių kamieninėse ląstelėse ir neturi įtakos metaboliniam jų aktyvumui, išskyrus dideles (0.320 μM) koncentracijas. Taip pat parodėme, kad modelinės nanodalelės neturi įtakos kamieninių ląstelių migraciniam gebėjimui tiek „žaizdos“ modelyje, tiek transmigracijos tyrimuose *in vitro*. Išskirtos pelių kamieninės ląstelės geba migruoti kartu su nanodalelių kroviniu, o tai svarbu bandant panaudoti kamienines ląsteles kaip vektorius priešvėžinių darinių pristatymui į naviką.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 53 p., 9 pav., 63 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: nanodalelės, kvantiniai taškai, mezenchiminės kamieninės ląstelės, migracija

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No. 2
Date 2014-06-02

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Master graduation Thesis 4

Title **The Influence of Nanoparticles to Mesenchymal Stem Cells Migration in vitro**

Author **Simona Lenortavičiūtė**

Academic supervisor **Dr Vytautas Kašėta**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Today main cancer treatment methods in spite of surgery remain photodynamic, chemo- and radio- therapies. These therapies fail to destroy cancer completely, frequently the cancer recurs. Moreover, they lack selectivity and there are unwanted side effects. To solve selectivity problems scientists are trying to use stem cells which have the potential for transportation of nanostructures (drugs, diagnostic tools) directly to the tumor without affecting healthy cells. Therefore the task of this master degree thesis is to research the influence of nanoparticles to murine bone stem cell migration in vitro.

Research was performed with stem cells which were extracted from mouse bones and model nanoparticles (Quantum Dots). We investigated accumulation, kinetics and distribution of nanoparticles in live cells as well as effects to cell vitality. Moreover we researched the influence of Quantum Dots to cell migration in "wound healing" model and Transwell migration assay *in vitro*.

We found out that Quantum Dots accumulates inside murine stem cells and have no influence to their metabolic activity as long as the concentrations are lower than 0.320 μM . Also there was no influence to stem cell migration capabilities in "wound-healing" model as well as in Transwell migration assay tests which could be caused by model nanoparticles. Extracted murine stem cells are able to migrate when loaded with nanoparticles what is crucial using stem cells as vectors for transportation of anticancer agents to tumor.

Structure: introduction, literature review, material and methods, conclusions and suggestions, references.

Thesis consists of: 53 p. text without appendixes, 9 pictures, 63 bibliographical entries.

Keywords: nanoparticles, quantum dots, mesenchymal stem cells, migration

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų,
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo 2011-2012 m. m.
1 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Simona Lenortavičiūtė, 20120533

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-12

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

2014 m. gegužės 30 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Nanodalelių įtaka mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai in vitro“ patvirtintas 2013 m. spalio 24 d. dekanų potvarkiu Nr. 361fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Parenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis, dr. Eglė Strainienė. Mano darbo vadovas dr. Vytautas Kašėta.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (-usi).



(Parašas)

Simona Lenortavičiūtė

(Vardas ir pavardė)

Turinys

PAVEIKSLAI	8
SANTRUMPOS	9
ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. Nanotechnologijos	12
1.2. Nanodalelės	12
1.3. Nanodalelių funkcionalizavimas	15
1.4. Nanodalelės medicinoje	16
1.5. Onkologinių susirgimų terapija	17
1.6. Kamieninės ląstelės	20
1.6.1. Mezenchiminės kamieninės ląstelės arba mezenchiminės stromos ląstelės	22
1.7. Kamieninių ląstelių terapija	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	25
2.1. Tyrimų vieta, aparatūra, medžiagos, terpės	25
2.1.1. Tyrimų vieta	25
2.1.2. Aparatūra	25
2.1.3. Medžiagos (gamintojas), terpės, laboratoriniai gyvūnai	25
2.2. Metodai	25
2.2.1. Kamieninių ląstelių išskyrimas iš pelių kaulų	25
2.2.2. Kamieninių ląstelių kultivavimas	26
2.2.3. Ląstelių populiacijos imunofenotipavimas	26
2.2.4. Skirtingų nanodalelių koncentracijų poveikis metaboliniam ląstelių aktyvumui	27
2.2.5. Vėžinių ląstelių kultivavimas	27
2.2.6. Nanodalelių kaupimasis kamieninėse ląstelėse	28
2.2.7. Kamieninių ląstelių migracija „žaizdos“ modelyje <i>in vitro</i>	28
2.2.8. Kamieninių ląstelių migracija transmigracijos modelyje <i>in vitro</i>	29
2.2.9. Eksperimentinių duomenų analizė	31
3. 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	32
3.1. Pelių kamieninių ląstelių išskyrimas ir identifikavimas	32
3.2. Nanodalelių poveikis kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui	32
3.3. Nanodalelių kaupimasis kamieninėse ląstelėse	35
3.4. Kamieninių ląstelių migracija „žaizdos“ modelyje <i>in vitro</i>	38
3.5. Kamieninių ląstelių migracija transmigracijos modelyje <i>in vitro</i>	40
3.6. Rezultatų apibendrinimas	45
Išvados	47
Literatūra	48

PAVEIKSLAI

1 pav. Kvantinio taško struktūra

2 pav. Kvantinių taškų optinės savybės

3 pav. Kamieninių ląstelių migracijos eksperimento schema

4 pav. Modelinių nanodalelių (kvantinių taškų Qdot 625 carboxy) įtaka kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui po 24 val. inkubacijos

5 pav. Modelinių nanodalelių (kvantinių taškų Qdot 625 carboxy) įtaka kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui po 48 val. inkubacijos

6 pav. Kvantinių taškų Qdot 625 carboxyl kaupimasis išskirtose iš pelių kamieninėse ląstelėse

7 pav. Kamieninių ląstelių migracija *in vitro* žaizdų modelyje

8 pav. Kamieninių ląstelių migracija pro membraną su 8 μm skersmens poromis

9 pav. Kamieninių ląstelės migracija pro membraną su 8 μm skersmens poromis

SANTRUMPOS

CD – (angl. *cluster of differentiation*) – diferenciacijos antigenas

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindolas

DMEM - (angl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) - Dulbecco modifikuota Eagle terpė

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

FDT – fotodinaminė terapija

FL – fotoluminescencija

FWHM – (angl. *full width at half maximum*) – visas plotis pusės didžiausios amplitudės lygyje

HBSS – (angl. *Hank's balanced salt solution*) - Henkso subalansuotas druskų tirpalas

HLA (angl. *human leucocyte antigens*) – žmogaus leukocitų antigenai

KT – kvantiniai taškai

MCH II - (angl. *major histocompatibility complex*) - pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas

MH-22A - (angl. *Mouse Hepatoma*) - pelių hepatomos 22A linijos ląstelės

MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės

MRT - magnetinio rezonanso tomografija

ND – nanodalelės

PBS – (angl. *phosphate buffered saline*) - buferinis fosfato tirpalas

RGB – (angl. *Red; Green; Blue*) – raudona, žalia, mėlyna. Spalvų maišymo Sistema

Sca-1 – (angl. *stem cell antigen 1*) – kamieninių ląstelių antigenas

T/E – tripsinas/EDTA

XTT - 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-karboksianilido natrio druska

IVADAS

Onkologinės ligos, dėl didėjančio sergamumo, šiandien tampa viena aktualiausių sveikatos problemų. Pagrindiniais vėžinių ligų gydymo būdais, be chirurginės intervencijos, kol kas išlieka fotosensibilizuota, cheminė ir spindulinė terapija. Šios terapijos dažnai nepašalina visų vėžinių ląstelių, neretai vėžys atsinaujina. Taip pat joms stinga selektyvumo, būdingi žymūs šalutiniai poveikiai (Huang 2012). Sprendžiant selektyvumo problemą visame pasaulyje kuriami ir bandomi nauji medicinos prietaisai, priešvėžiniai vaistai bei inovatyvios terapijos.

Šiuo metu yra kelios daug dėmesio susilaukiančios sritys vėžio terapijoje. Viena iš jų, liposomų naudojimas onkologinių susirgimų terapijai. Tai yra vaistus gabenančios vezikulės, kurios gali nunešti vaistus tiesiai į vėžines ląsteles. Kadangi liposomos labiau linkusios kauptis būtent vėžiniuose audiniuose, nes dėl didesnių endotelio porų vėžinių audinių kraujagyslės yra pralaidesnės (Utku 2011).

Dar viena sritis – genų terapija. Ji galėtų būti pasitelkiama norint atstatyti ar pakeisti pažeistus genus vėžinėse ląstelėse, kas priverstų jas žūti. Vėžio genų terapija šiuo metu yra dar tik ankstyvoje tyrimų stadijoje. Kita perspektyvi sritis – ląstelinė terapija, kuomet endogeninės ar egzogeninės kilmės ląstelės gali būti naudojamos audinių regeneracijai ir/ar jų inžinerijai, bei onkologinių ir kitų susirgimų gydymui. Pavyzdžiui, autologinės dendritinės ląstelės naudojamos kuriant priešvėžinę vakciną t.y. siekiama suformuoti pilnavertį imuninį atsaką prieš vėžį.

Visi šie gydymo būdai be perspektyvų terapijoje turi neigiamų šalutinių poveikių, stinga efektyvumo, taip pat išlieka neišspręstas saugumo klausimas. Daugelio vėžių priežastys nėra visiškai aiškios, todėl sunku sukurti veiksmingas ir selektyvias gydymo metodikas. Viena perspektyviausių priešvėžinių ląstelių terapijų šiandien apjungia kamieninių ląstelių savybes ir nanotechnologijas.

Žinoma, kad kamieninės ląstelės geba migruoti į besiformuojančios stromos vietas tiek gyjančiame audinyje tiek formuojantis navikui (Nakamizo *et al.* 2005; Menon *et al.* 2007; Dwyer *et al.* 2007), todėl susidomėta galimybe panaudoti šias ląsteles, kaip vektorius ar transporto sistemą selektyviai nugabenti priešvėžinius nanodarinius į naviko lokalizacijos vietą. Šio gydymo metodo privalumas tas, kad yra pasitelkiami organizme egzistuojantys mechanizmai, kamieninės ląstelės, ir nanostruktūros. Taip bandomos spręsti selektyvumo ir šalutinio neigiamo poveikio problemos, kurios pasireiškia gydant onkologines ligas kitais būdais.

Tačiau vis dar išlieka daug neatsakytų klausimų apie nanodalelių įtaką ląstelių funkcinėms savybėms (proliferacijai, diferenciacijai ir kt.), tarp kurių ir kamieninių ląstelių migraciniam

gebėjimui. Praktinis daugiafunkčių nanostruktūrų pritaikymas terapijoje galimas tik po išsamių laboratorinių, ikiklinikinių ir klinikinių tyrimų. Todėl siekiant panaudoti kamienines ląsteles kaip nanodalelių transporto sistemą, tikslinga nustatyti kokią įtaką šie „nešuliai“ turi ląstelių metaboliniam aktyvumui ir pačiai ląstelių migracijai.

Darbo tikslas – tirti modelinių nanodalelių (kvantinių taškų) įtaką pelių kamieninių ląstelių migracijai *in vitro*. Tad keliami tokie uždaviniai:

1. Išskirti ir identifikuoti pelių kamieninių ląstelių populiaciją.
2. Nustatyti tiriamų nanodalelių įtaką išskirtų ląstelių metaboliniam aktyvumui.
3. Įvertinti nanodalelių (kvantinių taškų) kaupimąsi kamieninėse ląstelėse.
4. Įvertinti nanodalelių įtaką kamieninių ląstelių migracijai „žaidos“ modelyje *in vitro*.
5. Įvertinti nanodalelių įtaką kamieninių ląstelių migracijai transmigracijos modelyje *in vitro*.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nanotechnologijos

Nanotechnologijos ir nano mokslai – tai sparčiai augančios ir perspektyvios mokslo šakos, apimančios labai plačią technologijų kūrimo ir mokslinių tyrinėjimų sritį, kurios objektas yra 1-100 nm dydžio (Rotomskis *et al.* 2006; Fakruddin *et al.* 2012). Kadangi nano dydžio dalelės pasižymi specifiskomis ir unikaliomis savybėmis, todėl jos atveria galimybes suprasti naujus reiškinius, sukurti jautresnius ir specifiskesnius daugiafunkčius prietaisus, medžiagas ar sistemas, kurias galima panaudoti mikro ir makro lygiu. Tokie išradimai kaip tunelinis mikroskopas, anglies nanovamzdeliai, fulerenai ir kt. taikomi skirtingose srityse, tarp jų ir inžinerija, technologija, farmacija, maisto ir žemės ūkio pramonė, statybų industrija, taip pat ir medicina (Fakruddin *et al.* 2012; Khan *and* Asmatulu 2013).

Nanotechnologijų panaudojimas medicinoje vadinamas nanomedicina (Freitas 2005). Tai technologijos, kurios medicininei diagnostikai ir gydymui naudoja molekulinis instrumentus (pvz. liposomas, nanodaleles, polimerines mices, anglies nanovamzdelius ir kt.) ir žinias apie žmogaus kūno sandarą (Misra *et al.* 2010). Tikimasi, kad nanomedicinos tyrimai ir jų plėtra turės teigiamos įtakos sveikatos apsaugai visame pasaulyje. Nanomedicina gali spręsti daug svarbių sveikatos problemų, tarp jų ir vėžio terapijos.

Vėžio diagnostika ir terapija šiandien viena aktualiausių nanomedicinos sričių. Onkologinių ligų tikslingas gydymas, kuomet nužudomos tik vėžinės ląstelės, o sveikos yra nepaliečiamos, susilaukia vis daugiau dėmesio. Nanotechnologijų įvedimas į šią sritį atvėrė naujus kelius ir priemones selektyviai vėžio terapijai. Kuriami daugiafunkčiai nanodalelių dariniai, kurių savybės davė pagrindus naujoms, neinvazinės onkologinių susirgimų terapijoms, kurios anksčiau buvo neįmanomos, įskaitant ir nanotechnologijomis paremtas pažangias strategijas, tokias kaip radioterapija ar fotodinaminė terapija (Misra *et al.* 2010).

1.2. Nanodalelės

Nanodalelėms (ND) šiuo metu yra skiriamas didelis dėmesys. Dėl savo dydžio ir turimų unikalų savybių jos laikomos tarpininkėmis tarp makromedžiagų bei molekulinų ir atominių struktūrų. Išskiriamos įvairių tipų nanostruktūros: nanovamzdeliai, kvantiniai taškai, nanokevalai, dendrimerai, liposomos, nanostrypeliai, fulerenai, nanosferos, nanovielos, nanožiedai ar nanokapsulės. Nanodalelės gali būti skirstomos į organines (pvz. liposomos, dendrimerai,

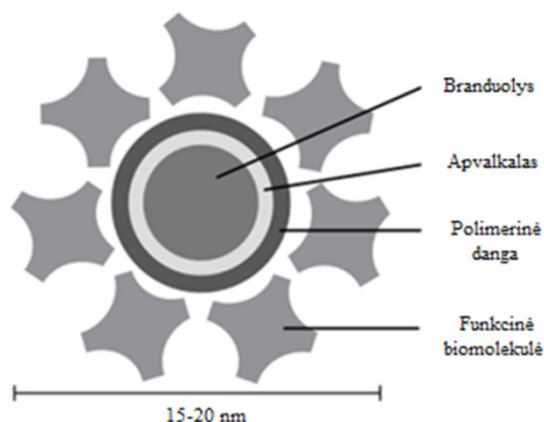
polimerinės ND ir kt.) bei neorganinės (pvz. kvantiniai taškai, aukso, platinos, magnetinės nanodalelės ir kt.) (Mirsasaani *et al.* 2013).

Neorganinės nanodalelės atvėrė plačią nanomedicinos tyrimų sritį. Šios nanodalelės gali turėti optinių, terminių, elektrinių ar magnetinių savybių, kurias galima panaudoti vaizdinimo ar terapiniams tikslams. Vienas iš tokių pavyzdžių, koloidinės aukso nanodalelės, sulaukusios didžiulio susidomėjimo dėl savo žemo toksiškumo lygio, dinaminės paviršiaus chemijos, dydžio ir formos bei tinkamų vaizdinimui savybių. Taip pat, didesnes aukso nanodaleles, turinčias intensyvią plazmoninę sugerties juostą, galima taikyti fototerpinei terapijai.

Magnetinės, pavyzdžiui, geležies oksidu paremtos, nanodalelės yra dar viena plačiai tiriama neorganinė nanodalelių sistema. Magnetinės nanodalelės gali būti panaudotos kaip kontrastinės medžiagos magnetinio rezonanso nuotraukose, o kintamuose magnetiniuose laukuose jas galima pasitelkti, norint sukurti terminę ar mechaninę jėgą, kuri galėtų sunaikinti vėžines ląsteles (Cheng *et al.* 2014).

Viena perspektyviausių ir daugiausiai žadančių nanodalelių rūšių yra kvantiniai taškai. Kuomet šios nanodalelės pirmą kartą buvo panaudotos elektronikai ir optikai, niekas negalėjo net pagalvoti apie galimybę jas pritaikyti biomedicinoje. Tačiau kvantiniai taškai yra būtent vienos pirmųjų nanotechnologijų, pritaikytų biologijos moksluose. Praėjus dešimtmečiui po jų taikymo biologijoje pradžios, jie užtikrintai įsitvirtino kaip žymekliai, skirti aukštos rezoliucijos ląstelės komponentų molekuliniam vaizdinimui ir ląstelės veiklos bei migracijos organizme sekimui (Kim 2007).

Kvantiniai taškai (KT) – tai monodispersinės puslaidininkės nanodalelės, kurių dydis nuo 2 iki 10 nm. Kvantiniai taškai gali būti įvairios formos ir sudaryti nuo kelių dešimčių iki tūkstančių atomų. Biomedicinoje taikomų kvantinių taškų šerdys koloidų chemijos metodu susintetintos iš II ir VI (pvz., ZnSe, CdSe, CdTe ir HgS) bei III ir V (pvz., GaAs, InP ir InAs) grupių elementų. Po to šerdis apdengiama plonu (ZnS arba CdS) apvalkalu, prie kurio galima prijungti funkcines biomolekules (Rotomskis 2007; Sanvicens *and* Marko 2008). Kvantinio taško struktūra pavaizduota 1 paveiksle.

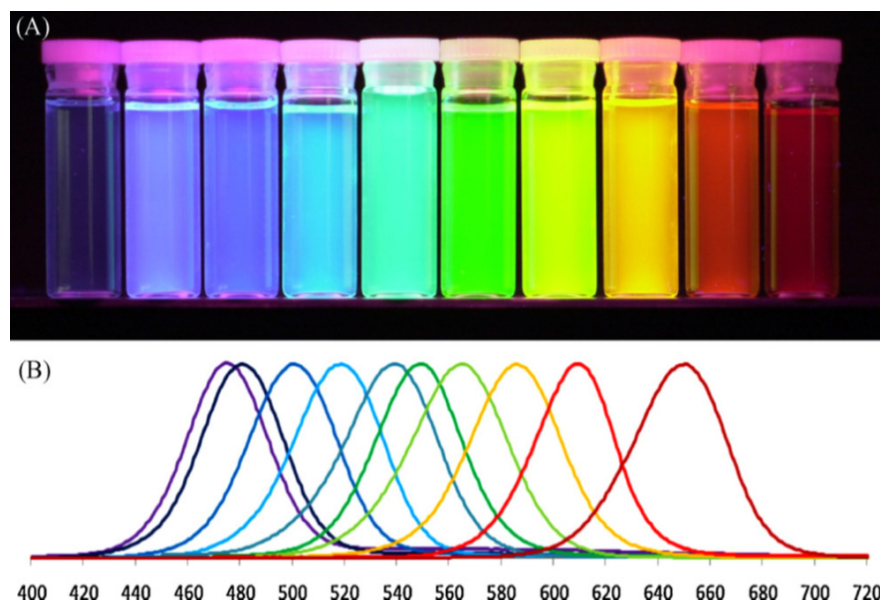


1 pav. Kvantinio taško struktūra (pagal Zrazhevskiy *and* Gao 2009)

Literatūroje dažniausiai aptinkami kadmio selenido (CdSe), apgaubti plonu ZnS arba CdS apvalkalu, kvantiniai taškai. Toks apvalkalas apsaugo nuo nespindulinės rekombinacijos, todėl iki 50 proc. ir daugiau padidėja fluorescencijos kvantinis našumas. Apvalkalas gali pakeisti KT funkcionalumą ir krūvį. Padidinti koloidinės šerdies stabilumą. Paviršiaus modifikavimo procedūra gali stipriai sumažinti kvantinių taškų toksiškumą, sulaikyti Cd^{2+} ir Se^{2+} jonus, taip pat panaikinti paviršiaus defektus, apsaugoti kvantinį tašką nuo išorinio biologinės terpės poveikio bei oksidacijos (Rotomskis 2007; Wang *and* Chen 2011; Barroso 2011).

Pagrindinės savybės, kuriomis pasižymi kvantiniai taškai yra šios:

- Kvantinių taškų matmenys yra labai maži (skersmuo būna nuo 2 iki 10 nm).
- Kvantiniai taškai skiriasi nuo puslaidininkų kristalų tuo, kad nuo cheminės sudėties ir dydžio priklauso fotoluminescencijos spektras. Šios savybės priklausomybė nuo dalelių dydžio pavaizduota 2 pav., didesnės dalelės išspinduliuoja šviesos bangos ilgį, kuris yra raudonoje spektro dalyje, tuo tarpu mažesnės dalelės – mėlynoje spektro dalyje (Kim 2007; Zrazhevskiy *and* Gao 2009).
- Kvantinių taškų dydis gali būti keičiamas sintezės metu.
- Kvantiniai taškai pasižymi plačiu sugerties spektru.
- Jie yra fotostabilūs.
- Kvantiniai taškai pasižymi ilga sužadintos būsenos gyvavimo trukme.
- Taip pat kvantinių taškų paviršius lengvai modifikuojamas hidrofiliniais ligandais (Rosenthal *et al.* 2010; Michalet *et al.* 2012; Cheng *et al.* 2014).



2 pav. Kvantinių taškų optinės savybės. A - nuo dalelių dydžio priklausanti kvantinių taškų FL, B – kvantinių taškų FL spektrai (pagal Zrazhevskiy *and* Gao 2009)

Nanodalelių savybės leidžia atlikti naujos kartos fluorescencijos vaizdinimo eksperimentus bei tirti biologines molekulinės funkcijas nano lygiu (Rosenthal *et al.* 2010). Taip pat nanodalelės sukėlė didelį susidomėjimą ir medicinoje. Tačiau, dėl toksiškų medžiagų, esančių nanodalelių sudėtyje, baiminamasi galimų šalutinių poveikių, todėl būtinas tinkamas jų paviršiaus modifikavimas, bei funkcionalizavimas (Blatchley 2013).

1.3. Nanodalelių funkcionalizavimas

Pasitelkus nanotechnologijas galima pakeisti fundamentaliąsias biologines medžiagų savybes: tirpumą, difuzijos galimybes, vaistų atpalaidavimo galimybes ir imunogeniškumą. Naudojant nanodaleles medicinoje pasiekiami efektyvesni ir patogesni stebėjimo metodai bei užtikrinama mažiau toksiška terapija (Ho *and* Leong 2010). Pasitelkiant nanotechnologijas, kuriami nauji sintetiniai metodai, kuriais būtų galima tiksliai pagaminti norimo dydžio ir formos nanodaleles, prijungti prie paviršiaus vaistų molekules ir taip sukurti daugiafunkčius nanodarinius, kurie vienu metu suteiktų vaizdinimo galimybę ir pasižymėtų terapinėmis savybėmis (Misra *et al.* 2010; Grodzinski *and* Torchilin 2013).

Taigi, siekiant panaudoti nanodaleles biologiniam taikymui bei medicininiams tyrimams, atliekamos paviršiaus modifikacijos (Ho *and* Leong 2010; Wang *and* Chen 2011). Nanodalelių paviršius gali būti modifikuojamas įvairiais ligandais. Taip siekiama juos funkcionalizuoti ir pritaikyti specializuotiems biologiniams ir medicininiams tyrimams.

Nanodalelių, tarp jų ir kvantinių taškų, paviršius modifikuojamas specifinio atpažinimo molekulėmis. Sintetinant tokius biokonjugatus, prie karboksilo liekanų dažniausiai kovalentiniais ryšiais prijungiamos įvairios biomolekulės, pavyzdžiui, antikūnai, oligonukleotidai ar ligandai (Xing *et al.* 2007; Smith *et al.* 2008). Buvo nustatyta, kad daugelio biomolekulių tipų reaktyvumas po konjungacijos prie nanodalelių paviršiaus išlieka, nors jų ryšio jėgos ir susilpnėja. Todėl biomolekulių paviršiaus imobilizacijos optimizavimas šiuo metu yra aktyviai tiriama sritis (Smith *et al.* 2008).

Tarp skirtingų paviršiaus modifikavimo metodų yra ligandų mainai (Smith *et al.* 2008; Wang and Chen 2011), kai hidrofobiniai paviršiaus ligandai pakeičiami bifunkciniais ligandais, tokiais kaip merkaptopactorūgštis, kurioje yra tiolio grupė ir į išorę nukreipta hidrofilinė karboksilo ar kitokia funkcinė grupė. Tai sumažina nespecifinį ląstelinį nanodalelių įsisavinimą (Rotomskis 2007; Smith *et al.* 2008). Kitas modifikavimo būdas (hidrofobinė sąveika) pagrįstas koordinacinio ligando sąveika su amfifiliniu polimeru. Polimeruose yra alkilinių grupių, kurios sąveikauja su hidrofobinėmis trioktilfosfino oksido grupėmis ir hidrofilinėmis karboksilo grupėmis. (Rotomskis 2007; Wang and Chen 2011).

Nanostruktūrų paviršiaus funkcionalumas, reguliuojantis jų sąsają su biologinėmis sistemomis, yra svarbus veiksnys, apibrėžiantis biomedicininį nanodalelių taikymo tiek *in vivo*, tiek *in vitro* elgseną. Pakeičiant jų fiziochemines savybes (pvz. paviršiaus krūvį ar hidrofobiškumą), galima nulemti nanodalelių pusamžį ir lokalizaciją cirkuliacijos metu. Nanonešiklių gamintojai naudoja hidrofilinius polimerus paviršiaus padengimui, pvz. polietileno glikolį (PEG). Toks paviršiaus padengimas prailgina nanodalelių cirkuliacijos pusamžį ir padidina tikimybę, kad nanodalelės sėkmingai pateks į nustatytus taikinius organizme (Cheng *et al.* 2014).

1.4. Nanodalelės medicinoje

Nanotechnologija yra sritis, turinti daug skirtingo pritaikymo galimybių medicinoje. Šiuo metu nanotechnologijos taikomos: fluorescenciniam biologiniam žymėjimui, vaistų ir genų gabenimui, DNR struktūros zondavimui, biomolekulių bei ląstelių išskyrimui ir išgryninimui, MRT kontrasto paryškinimui, taip pat jas bandoma pritaikyti kaulų implantų struktūrinio stiprumo padidinimui, kontroliuojamam vaistų atpalaidavimui, pagerintoms cheminėms sąveikoms bei karkasų, skirtų ląstelių augimui ir audinių pakeitimui, kūrimui (Blatchley 2013). Dar viena medicinos šaka, aktyviai vykdanči tyrimus su nanodalelėmis yra odontologija, kurios tikslas – pasiekti geresnes odontologinių produktų mechanines savybes, jų didesnę atsparumą trinčiams, mažesnę susitraukimą džiūnant bei pagerinti optines ir estetines savybes (Mirsasaani *et al.* 2013)

Nanotechnologijos taip pat suteikia unikalias ir plačias galimybes skirtas ankstyvai vėžio diagnostikai, prevencijai ir asmeninei terapijai. Nanodalelės, kurių paviršius tinkamai modifikuotas, išsaugant unikalias spektrines savybes ir jų aktyvumą, bei yra mažesnės nei 50 nm, patenka į ląsteles endocitozės būdu. Toks patekimas į gyvas ląsteles puiki klinikinės praktikos perspektyva, o ypač onkologinėms ligoms gydyti. Nanodalelių pranašumas diagnostikai ir gydymui gali būti taikomas įvairiais būdais (Rotomskis *et al.* 2006):

- į nanodalelių ertmę galima įterpti žymenis ar vaistus;
- nanodalelių paviršius gali būti įvairiai modifikuojamas arba prijungiamas prie jo specifinių molekulių, kad selektyviai nukreiptų daleles į pasirinktą tikslą ląstelėje;
- nanodalelių porų dydį galima reguliuoti pagal poreikį selektyviai išleisti arba įsiurbti biologines ar terapines medžiagas.

Inovatyvios nanodalelės, tokios kaip magnetinės nanodalelės, aukso nanodalelės ir kvantiniai taškai, gali būti panaudotos tiek vaizdinimo, tiek terapijos funkcijoms vienu metu (Cheng *et al.* 2014). Todėl tikslinga vaistų terapija ir metodai, skirti ankstyvai patologinių susirgimų diagnostikai, šiuo metu yra prioritetinės tyrimų sritys (Misra *et al.* 2010).

1.5. Onkologinių susirgimų terapija

Onkologinės ligos yra viena pagrindinių mirties priežasčių visame pasaulyje. Vėžinių susirgimų skaičius nuolat auga, kasmet daugiau nei 10 mln. žmonių diagnozuojami vėžiniai susirgimai, tuo tarpu fundamentinės jų gydymo strategijos žymių pasikeitimų neturi jau daugiau nei tris dešimtmečius. Chirurginis auglių šalinimas, kurį seka chemoterapija ir radioterapija, vis dar išlieka pagrindiniai trys vėžinių susirgimų gydymo būdai (Misra *et. al* 2010).

Radioterapija vadinamas gydymas didelės energijos jonizuojančiąja spinduliuote. Ji naikina vėžines ląsteles pažeisdama jų DNR molekules. Spindulinė terapija gali pažeisti DNR tiesiogiai, arba sukurti laisvuosius radikalus ląstelių viduje, kurie naikintų DNR tam tikrais etapais. Tuomet vėžinės ląstelės, kurių DNR yra pažeista, nustoja dalintis, žūna ir pasišalina iš organizmo.

Radioterapija būna išorinė, kurios metu radiacija suteikiama išoriniais prietaisais (išorinė spindulinė radioterapija) arba vidinė (dar yra vadinama brachiterapija), kai radioaktyvi medžiaga patalpinama į organizmą šalia vėžinių ląstelių. Sisteminė radioterapija naudoja radioaktyvias substancijas, tokias kaip radioaktyvus jodas, kuris per kraują gali nukeliauti iki vėžinių ląstelių.

Spindulinė terapija pacientams gali būti skiriama tiek viena, tiek kartu su chirurgija, chemoterapija ar abejomis iš karto. Deja, bet radioterapija gali pakenkti ne tik vėžinėms bet ir sveikoms ląstelėms, kas veda link nepageidaujamų šalutinių poveikių, tokių kaip pykinimas,

vėmimas, nuovargis, viduriavimas, padažnėja šlapinimasis, kartais jis būna ir skausmingas. Šie simptomai dažniausiai priklauso nuo spindulinės terapijos intensyvumo bei gydymo trukmės (DeVita *et al.* 2008; Veldeman *et al.* 2008; Verellen *et al.* 2008).

Chemoterapija vadinamas priešvėžinių vaistų, gydančių vėžines ląsteles, vartojimas. Ji jau naudojama kelis dešimtmečius ir yra vienas dažniausių vėžinių susirgimų gydymo būdų. Dauguma atvejų chemoterapija paveikia vėžinių ląstelių sugebėjimą augti ir daugintis. Skirtingos vaistų grupės, skirtingais būdais kovoja su vėžinėmis ląstelėmis. Chemoterapija, kai kuriems vėžio tipams gydyti būna naudojama viena, tuo tarpu kitais atvejais į pagalbą pasitelkiami papildomi gydymo būdai, pavyzdžiui radioterapija ar chirurgija. Taip pat gan dažnai yra naudojama kelių skirtingų chemoterapinių vaistų kombinacija. Tie patys chemoterapiniai vaistai gali būti skiriami skirtinga seka norint išgydyti skirtingus onkologinių susirgimų tipus. Chemoterapiniai vaistai gali būti vartojami kaip ryjamos tabletės, injekcija (į raumenis, riebalinį audinį ar intraveninę), skirti vartoti išoriškai bei skiriami tiesiogiai į pilvo ertmę (DeVita *et al.* 2008).

Nors chemoterapija yra gana efektyvi gydant vėžinius susirgimus, tačiau chemoterapiniai vaistai nukeliauja ne tik į vėžines ląsteles, bet ir pasklinda po visą organizmą. Todėl gydymo metu gali pasireikšti ir daugybė šalutinių poveikių, tokių kaip pykinimas, vėmimas, plaukų slinkimas, viduriavimas, burnos opos ar anemija (DeVita *et al.* 2008).

Be pagrindinių vėžio terapijos būdų egzistuoja ir kiti, rečiau taikomi. Vienas tokių – fotodinaminė terapija (FDT). Fotodinaminės terapijos taikymo būdai susideda iš trijų pagrindinių veiksnių: fotosensibilizuojančios medžiagos, šviesos šaltinio ir deguonies, esančio audiniuose. Sujungus šiuos tris komponentus, galima pasiekti bet kokio audinio cheminį naikinimą.

Pirmiausia į organizmą yra suleidžiama fotosensibilizuojanti medžiaga, tai dažniausiai atliekama intraveniniu būdu, tuomet ji susikaupia greitai besidauginančiose ląstelėse, todėl šalia esančių ląstelių pažeidimo tikimybė yra minimali. Vėliau fotosensibilizuojanti medžiaga yra aktyvuojama tam tikro bangos ilgio šviesa, kuri sužadina molekulinį deguonį ir susidaro singuletinis deguonis ($^1\text{O}_2$) ir kiti radikalai, kurie veikia citotoksiškai, o tai lemia ląstelės nekrozę ir apoptozę. Tokiu būdu fotodinaminės reakcijos metu yra suardomi pakitę audiniai. Kadangi fotosintezuojanti medžiaga kaupiasi greitai besidauginančiuose audiniuose, FDT pirmiausia buvo pradėta naudoti vėžinių susirgimų gydymui (Lukšienė 2003; Chin *et al.* 2007).

Fotosintezuojančias medžiagas galima suskirstyti į porfirinus, chlorofilus ir dažus. Viena ikiklinikiniams tyrimams dažniausiai naudojamų medžiagų fotodinaminei terapijai yra chlorofiliškos substancijos – chlorinai. Jie gali būti panaudojami daugeliui skirtingų gydymo būdų, nes pasižymi

tokiomis savybėmis kaip geras sugerties koeficientas ilgesnėms šviesos bangoms (~700-850 nm), kurios lengviau prasiskverbia pro audinius nei trumpesnės bangos. Kitos svarbios fotosintezuojančių medžiagų savybės yra aukšta reaktyviojo deguonies kvantinė išeiga, atsparumas išblukimui, natūraliai aukštas cheminis stabilumas, fluorescencija bei žemas toksiškumas jų nesužadinus šviesa (Chin *et al.* 2007) .

Nors fotodinaminė terapija yra perspektyvus gydymo būdas dėl aukšto selektyvumo, kurio trūksta tiek chemoterapijai, tiek radioterapijai, tačiau iki šiol ji vis dar yra tik eksperimentinis onkologinių susirgimų gydymo būdas, dėl tokių šalutinių poveikių kaip ilgalaikis odos jautrumas šviesai po terapijos dėl fotosensibilizuotų medžiagų užsilaikymo organizme, o ypač odoje (Bachor *et al.* 1991; Allison *et al.* 2004; Chin *et al.* 2007).

Taigi, šiandien ankstyvas vėžinių susirgimų aptikimas ir gydymas vis dar yra silpnoji technologijų vieta. Nepaisant daugybės tradicinių gydymo būdų, tokių kaip chemoterapija, radioterapija ir fotodinaminė terapija, tobulinimo, vėžio terapija vis dar nėra optimali, kadangi ji turi trūkumų.

Esami terapijos būdai dažnai susiduria su tokiais sunkumais kaip nespecifinis sisteminis priešvėžinių vaistų pasiskirstymas, neadekvačios vaistų koncentracijos, pasiekiančios auglį, netoleruotinas citotoksiškumas, ribota galimybė stebėti terapinius atsakus ir išsivystantis atsparumas vaistams. Reikalinga inovatyvių technologijų plėtra, kuri leistų atpažinti vėžines ląsteles ir mikrometastazes bei visiškai pašalinti onkologinius susirgimus (Misra *et al.* 2010). Todėl šiuo metu bandomos kurti pažangios terapijos.

Vienas iš tokių metodų - liposomų pritaikymas vėžio terapijai. Žinoma, kad liposomos daugiausia kaupiasi vėžiniuose audiniuose. Todėl buvo sukurtos vienam fermentui, kurio daugiausia gaminasi vėžiniuose augliuose, jautrios liposomos. Kai fermentas sunaikina liposomas, išlaisvinamai vaistai ir nesveikos ląstelės žūva. Tyrimai su laboratoriniais gyvūnais parodė, kad taikant šį metodą auglius pasiekia didesnė vaistų dalis nei gydant tradicine chemoterapija. Tačiau toks gydymas liposomomis, kaip ir daugelis kitų, turi šalutinių neigiamų poveikių. Todėl bandoma kurti liposomas, kurios pasižymėtų stabilumu, galėtų apsaugoti vaistus (pvz. biologinius), būti „išjungiamos“ organizme, pernešti platesnį vaistų spektrą ar būti nukreiptos į vėžines ląsteles, taip padidindamos efektyvumą ir saugumą (Utku 2011).

XXI amžius neabejotinai yra „ląstelių terapijos amžius“. Tai viena iš perspektyviausių, šiuo metu tiriamų, pažeistų ląstelių, audinių, organų bei jų funkcijų atstatymo strategijų. Ląstelių terapija

laikoma nauju revoliuciniu traumų ir ligų gydymo būdu, kuris leidžia atstatyti pažeistas ir sergančias kūno dalis, transplantuojant sveikas ir naujas ląsteles.

Šiandien egzistuojančios ląstelinės terapijos pradžia galima laikyti histologinio audinių suderinamumo komplekso atradimą ir pirmąsias kaulų čiulpų transplantacijas. Kaulų čiulpų transplantacija buvo pirmoji ląstelinė terapija pradėta taikyti klinikinėje praktikoje (Binello *and* Germano 2012).

Ląstelinė terapija apima ne vien ląstelių perkėlimą pacientui, tačiau ir specifinių ląstelių aptikimą, išgavimą, paruošimą ir galimas modifikacijas. Nors didžioji dalis ląstelinės terapijos technologijų šiuo metu yra laboratorinių tyrimų stadijoje, tačiau jau netolimoje ateityje planuojama pradėti jas naudoti gydant genetines, degeneracines ir paveldimas ligas. Taip pat kovojant su įvairiais nepakankamumais ar deficitais, gydant audinių pažeidimus ir onkologinius susirgimus (Binello *and* Germano 2012; Brenner 2012).

Ląstelių terapija yra ląstelių panaudojimas norint pakeisti ar atnaujinti pažeistą arba sergantį audinį. Idėja priversti organizmo resursus efektyviai kovoti su ligomis ar regeneruoti pažeistus audinius yra labai daug žadanti. Tai sumažintų šalutinius poveikius, sukeltus neselektyvių, agresyvesnių gydymo būdų, pavyzdžiui chemoterapijos, tačiau tuo pačiu paliktų stiprų gydomąjį poveikį.

Ląstelinė terapija galimai netolimoje ateityje taps standartine terapija ir apims tokių panaudojimo spektrą kaip pažeistų audinių atnaujinimas, ląstelių transplantavimas audiniuose po miokardinio infarkto ar neurodegeneracinių ligų gydymas, taip pat imuninės sistemos suregulavimas, vakcinacija dendritinėmis ląstelėmis ar antigenui specifiskų T-ląstelių perkėlimas vėžio terapijai.

Ląstelinės vėžio terapijos tyrimuose naudojamos šios ląstelių populiacijos: imuninės ląstelės, diferencijuotos ląstelės ir šiuo metu vienos plačiausiai tiriamų ir daugiausiai žadančių – kamieninės ląstelės.

1.6. Kamieninės ląstelės

Kamieninė ląstelė (KL) – tai ląstelė, kuri gali diferencijuotis ir suformuoti skirtingų tipų specializuotas ląsteles bei pasižymi ilgalaikiu savaiminiu atsinaujinimu. Jos pagal gebėjimą diferencijuotis arba plastiškumą, skirstomos į klases: visagalės (totipotentinės) ląstelės, kurios gali diferencijuotis į visų rūšių organizmo ir placentos ląsteles, įvairiagalės (pliuripotentinės) – į visų trijų gemalinių sluoksnių ląsteles, daugiagalės (multipotentinės) – į vieno gemalinio sluoksnio ląsteles ir vienagalės (unipotentinės) – į vienos rūšies ląsteles (Vallone *et al.* 2013).

Visos kamieninės ląstelės pagal savo kilmę skirstomos į prenatalines, dar vadinamas embrioninėmis, ir postnatalines, dar vadinamas somatinėmis (suaugusio organizmo). Embrioninės KL bei embriono gemalo ląstelės atitinkamai yra kilusios iš vidinės blastocistų ląstelių masės ir pirmąpradžių gemalo ląstelių. Šios ląstelės yra daugiagalės, kadangi gali atkurti visą organizmą bei diferencijuoti į beveik bet kurį ląstelių tipą, išskyrus ekstraląstelinius audinius (pvz. placenta). Vis dėlto, tyrimų su šiomis ląstelėmis ateitis nėra aiški, kadangi jie griežtai ribojami dėl etinių sumetimų. Todėl tyrimai vykdomi su suaugusio organizmo kamieninėmis ląstelėmis, dar vadinamomis somatinėmis (Reinecke *et al.* 2000).

Suaugusio organizmo kamieninės ląstelės randamos skirtinguose vietose: hemopoetinės kamieninės ląstelės išgaunamos iš kraujo, virkštelės kraujo kamieninės ląstelės – iš virkštelėje, iškart po gimimo, esančio kraujo ir mezenchiminės kamieninės ląstelės – iš kaulinio, kremzlinio, riebalinio ir jungiamojo audinio (Reinecke *et al.* 2000).

Somatinės kamieninės ląstelės, kurios randamos jau susiformavusiame organizme, yra daugiagalės, kadangi gali diferencijuoti į kelis skirtingus specifinius ląstelių tipus, tačiau negali atkurti viso organizmo. Tai, kas lemia kamieninių ląstelių diferenciaciją, didele dalimi priklauso nuo pačios ląstelės parametrų, pvz. jos genetinės informacijos. Vis dėlto, ar ląstelė diferencijuos ar pasidalins yra nulemiama kamieninių ląstelių mikroaplinkos, kuri dar vadinama kamieninių ląstelių niša. Nišoje esančių kamieninių ląstelių likimas priklauso nuo šalia esančiųjų ir kaimyninių ląstelių kontakto, sąveikos su ekstraląsteliniiais aplinkos komponentais, augimą skatinančiais veiksniais, citokinais, bei deguonies kiekiu. Tokiomis nišomis galima laikyti gemalines ląsteles, taip pat kamieninių ląstelių telkinius aptinkamus plauko maišelyje, plonųjų žarnų gaurelių kriptose, kaulų čiulpuose, smegenų specifinėse srityse. Tačiau kamieninių ląstelių randama ir periferiniame kraujyje, skeleto raumenyse, odoje, kepenyse (Vallone *et al.* 2013). Todėl kyla daug diskusijų, ar visoms kamieninėms ląstelėms yra būtinos nišos.

Tyrimų metu mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo išskirtos iš pelių smegenų, blužnies, inkstų, plaučių, užkrūčio, kasos, sausgyslių, riebalinio ir kitų audinių. Todėl kilo klausimas, kokios galėtų būti įprastinės mezenchiminių kamieninių ląstelių *in vivo* mikroaplinkos sąlygos. Taip pat, ar yra mezenchiminių kamieninių ląstelių nišos, kurios būtų bendros visiems šiems audiniams. Viena iš hipotezių, kad šios ląstelės funkcionuoja autonomiškai ir nepriklausomai nuo jas supančios aplinkos (Kolf *et al.* 2007).

1.6.1. Mezenchiminės kamieninės ląstelės arba mezenchiminės stromos ląstelės

Mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) arba dar vadinamos mezenchiminės stromos ląstelės yra daug tirta suaugusio organizmo kamieninių ląstelių rūšis. Pirmoji mezenchiminių kamieninių ląstelių charakterizacija buvo atlikta Friedenstein ir jo kolegų tyrimų metu, kurie užaugino ir padaugino kaulų čiulpų nehemopoetines ląsteles, kurios galėjo virsti kaulinėmis ir kremzlinėmis ląstelėmis (Fridenstein *et al.* 1970). Taip pat mezenchiminės kamieninės ląstelės gali diferencijuotis į raumenines, riebalines, sausgyslių ir raiščių ląsteles, odos, kaulų čiulpų stromą ir net nervines ląsteles (Dennis *and* Caplan. 2004). Jos yra heterogeninės ir jų savybės priklauso nuo audinio ar organo vietos, iš kurio jos yra išskirtos. Kaulų čiulpuose aptinkami dideli kiekiai mezenchiminių kamieninių ląstelių, tinkamų tiek eksperimentiniam, tiek klinikiams tyrimams. Tačiau MKL kiekis ir jų diferenciacijos galimybės mažėja su amžiumi, todėl suaugusiųjų kaulų čiulpai gali būti ir ne pats geriausias MKL šaltinis (Tuan *et al.* 2002).

MKL nuo kitų kamieninių ląstelių atskiriamos pagal paviršiaus žymenis. Dažniausiai tai būna tam tikrų paviršiaus antigenų raiška ar jų nebuvimas. Todėl Tarptautinė Ląstelinės Terapijos Bendruomenė (angl. *ISCT - International Society for Cellular Therapy*) rekomenduoja naudoti tam tikrus žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių identifikavimo kriterijus. Pirmiausia, ląstelės turi pasižymėti lipimu prie plastiko *in vitro* kultūrose. Antra, bent 95 % ląstelių populiacijos privalo turėti paviršiaus antigenų, tokių kaip CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD146, CD106, CD54 ir CD166 ekspresiją. Taip pat specifiniai žymenys, tokie kaip CD45, CD34, CD10, CD14, CD11b, CD49d, CD79α, CD106, CD31 ir HLA-DR gali būti aptinkami ne daugiau nei 2 % ląstelių. Paviršiaus žymenys yra tiriami pasitelkus tėkmės citometrą. Trečia, ląstelės privalo gebėti diferencijuotis į osteoblastus, adipocitus ir chondroblastus normaliomis *in vitro* diferenciacijos sąlygomis (Dominici *et al.* 2006).

Šie kriterijai taikomi tik žmogaus mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, kadangi kitoms rūšims jie gali skirtis. Pavyzdžiui, literatūroje dažniausiai aptinkami pelių mezenchiminių kamieninių ląstelių turimi paviršiaus žymenys yra CD9, CD24, CD29, CD44, CD47, CD49e, CD50, CD98, CD106, CD138, CD147, Cr1I, Sca-1, tuo tarpu nebūdinga paviršiaus žymenų CD45, ODGFRα, CD117, CD90.1, MHC II raiška. Taip pat pelių mezenchiminės kamieninės ląstelės nepasižymi paviršiaus žymenimis CD3e, CD11b, CD45R, Ter-119, Ly-6G ir Ly-6C, kurie būdingi hemopoetinėms kamieninėms ląstelėms (Dominici *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2010).

Tyrimų metu buvo pasiektas didelis progresas atliekant fenotipinę mezenchiminių kamieninių ląstelių charakterizaciją ir identifikavimą naudojant tėkmės citometrą FACS ir magnetines atskyrimo technikas (Vallone 2013).

Taigi, mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymi tokiais savybės kaip, greitas dauginimasis ląstelių kultūrose, yra daugiagalės, savaime gali diferencijuotis *ex vivo*, reguliuoja apoptozę, taip pat gamina daug reguliacinių baltymų, kurie turi įtakos uždegimui, audinių atkūrimui. Mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis taip pat tinka ląstelių ir imuninei terapijai, jų kiekio, išskiriamų iš suaugusio organizmo, pakanka klinikiniam naudojimui. Dėl šių savybių mezenchiminės kamieninės ląstelės yra daug žadančios kuriant naujas ląstelines terapijas.

1.7. Kamieninių ląstelių terapija

Kamieninės ląstelės gali būti naudojamos ląstelinei terapijai, jų pritaikymas siejamas su audinių inžinerija, regeneracine medicina ar tikslingu priešvėžinių vaistų nugabenimu į naviką.

Šiuo metu vykdoma daugiau nei 10000 tyrimų, kurie apima kai kurias ląstelinės terapijos rūšis. Tačiau nepaisant šių pastangų, ląstelinės terapijos perkėlimas iš ikiklinikinių tyrimų į klinikinę praktiką kol kas yra nesėkmingas procesas. Nors ir pats ląstelių perkėlimas yra sudėtingas, tačiau pagrindine priežastimi, kodėl stringa šis procesas yra metodų trūkumas, kurie leistų stebėti transplantuotas ląsteles neinvaziniu būdu visame žmogaus organizme. Todėl vienas iš didžiausių tikslų ląstelių biologijoje yra sukurti skirtingų ląstelių įvykių molekulinę dinamiką *in vivo*. Tam pagrindus padėjo nanodalelių įvedimas į gyvas ląsteles, kuris gali būti pritaikytas daugelyje sričių, tarp jų ir ląstelių sekimui, kuris yra būtinas kamieninių ląstelių tyrimams ir metastazinių vėžinių ląstelių nustatymui. Taip pat prailgintas nanodalelių cirkuliacijos pusamžis leistų ilgalaikį stebėjimą, tokį kaip vienos molekulės sekimas gyvoje ląstelėje, kas padėtų ištirti daugelį ląstelių ir molekulinį procesų, ko nebuvo įmanoma padaryti anksčiau. (Srivinas *et al.* 2010).

Būtent todėl dar viena sritis, kuri susilaukė didelio mokslininkų susidomėjimo tai kamieninių ląstelių ir nanotechnologijų taikymas vėžio terapijoje. Tyrimų duomenimis, tikslingas priešvėžinių vaistų pristatymas į konkrečius taikinius audiniuose ar ląstelėse gali būti pasiektas patalpinus vaistus į nanostruktūras, o kamieninės ląstelės panaudojus kaip vektorius. Nanodalelės prie kurių prikabinti ar įkapsuliuoti citostatikai turi daug privalumų, nes pasižymi geresne terapinių medžiagų cirkuliacija, tiksliau vaistų nugabenimu, valdomu vaistų atpalaidavimu, didele krovinio talpa, galimybe gabenti vienu metu kelias skirtingas terapines medžiagas bei sukelia mažiau šalutinių

poveikių (Misra *et al.* 2010; Grodzinski and Torchilin 2013; Cheng *et al.* 2014). Taip pat tyrimų metu nustatyta, jog kamieninės ląstelės pasižymi tropizmu link vėžinių ląstelių.

Daug skirtingų tyrimų pateikia duomenis apie kamieninių ląstelių migraciją link pirminių ir metastazinių auglių. Įvairūs signalai gali skatinti migruoti įvairius ląstelių tipus, tarp jų ir mezenchiminės kamieninės ląstelės. Kamieninių ląstelių migracija link auglio buvo įrodyta daugelyje ikiklinikinių tyrimų, naudojant laboratorinių gyvūnų modelius. Taip pat kamieninių ląstelių savybė migruoti į navikus buvo nustatyta beveik su visomis tirtomis žmonių vėžinėmis ląstelėmis, tokiomis kaip plaučių vėžys, piktybinė glioma, krūties vėžys, storosios žarnos vėžys, kasos vėžys, melanoma ir kiaušidžių vėžys (Dai *et al.* 2011).

Taigi remiantis literatūros duomenimis somatinių kamieninių ląstelių panaudojimas onkologinių susirgimų terapijai yra galimas jau netolimoje ateityje. Tai priklauso nuo eksperimentinių ikiklinikinių bei klinikinių tyrimų su laboratoriniais gyvūnais pvz., pelėmis, nes jų mezenchiminės kamieninės ląstelės turi panašias morfologines charakteristikas kaip ir žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės ir gali būti sėkmingai išskirtos iš suaugusiojo individo kaulų čiulpų be išankstinio pačios pelės ar kaulo čiulpo apdorojimo. Todėl pelių kamieninės ląstelės yra svarbus įrankis eksperimentiniuose tyrimuose.

Norint išvystyti efektyvią ir tikslingą vaistų nugabenimo sistemą į vėžines ląsteles pirmiausia būtini išsamūs tyrimai *in vitro*. Atliekant bandymus su kamieninėmis ląstelėmis svarbu jas identifikuoti. Taip pat norint pritaikyti nanostruktūras kaip vaistų nešiklius, būtina ištirti kokį poveikį nanodalelės turi kamieninėms ląstelėms, ar nepakeičia jų morfologinių, vitalinių savybių.

Šiame darbe atliekami tyrimai su pelių somatinėmis mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis ir modelinėmis nanodalelėmis, kvantiniais taškais (Qdot 625 carboxyl). Manome, kad panašaus dydžio ir paviršiaus padengimo nanostruktūros turės tokį patį ar panašų poveikį ląstelių savybėms. Buvo tiriama ar kamieninės ląstelės geba kaupti nanodaleles, kokia įtaką šios modelinės nanodalelės turi ląstelių metaboliniam aktyvumui. Taip pat norint nanostruktūras panaudoti kaip vaistų nešiklius, o kamienines ląsteles kaip vektorius, reikia ištirti ar ląstelės gali migruoti ir kokią įtaką ląstelių migracijai turi tirtos modelinės nanodalelės. Todėl buvo tiriama kvantinių taškų įtaka ląstelių migracijai „žaizdos“ modelyje bei transmigracijos modelyje *in vitro*.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimų vieta, aparatūra, medžiagos, terpės

2.1.1. Tyrimų vieta

Tyrimai atlikti 2012 – 2014 m. Vilniaus universiteto Onkologijos instituto, biomedicininės fizikos laboratorijoje.

2.1.2. Aparatūra

Vertikalaus srauto laminaras, inkubatorius, tėkmės citometras, centrifuga, sterilūs mėgintuvėliai, svarstyklės, kompiuteris, graduoti plastikiniai indai, automatinės pipetės, sterilūs antgaliai, skenuojantis konfokalinis mikroskopas, konfokalinei mikroskopijai skirtos plokštelės, diodinis lazeris (bangos ilgis $650\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$), 6, 24 ir 96 šulinėlių plokštelės, 24 šulinėlių plokštelėms skirti įdėklai (Greiner Bio-one) su $8\text{ }\mu\text{m}$ dydžio poromis.

2.1.3. Medžiagos (gamintojas), terpės, laboratoriniai gyvūnai

Etanolis (Stumbras, Lietuva), fetalinis veršelio serumas ir PBS (Biochrom, Vokietija), HBSS, DMEM mitybinė terpė su L-alanylglutaminu, penicilino streptomicino mišinys ir 0.25 % Trypsin-EDTA (Gibco, JAV), kvantiniai taškai (Qdot 625 ITK carboxyl (Invitrogen, JAV), XTT rinkinys (Biological industries, Israelis), chlorinas e6 (Frontier Scientific, JAV), monokloniniai antikūnai prieš pelių ląstelių paviršiaus antigenus: CD29, CD44 (Miltenyi Biotec, Vokietija), CD90.1(Thy-1.1), Sca-1 (Santa Cruz Biotechnology, JAV), hemopoetiniai linijiniai žymenys CD3e; CD11b; CD45R/B220; Ly-6G ir Ly-6C (Gr-1); TER-119/erythroid cells (Ly-76), atitinkamos izotipinės kontrolės (BD Biosciences, JAV).

Laboratoriniai gyvūnai - hibridinės B6D2F1(BDF1) pelės (C57BL/6 pelių linijos patelių ir DBA/2 patinėlių pirmos kartos palikuonys (F1)), įsigyti iš Inovatyvios Medicinos Centro (Vilnius, Lietuva).

MH-22A – pelių kepenų karcinomos ląstelių linija kultivuojama Vilniaus Universiteto Onkologijos instituto, biofizikos laboratorijoje (Vilnius, Lietuva).

2.2. Metodai

2.2.1. Kamieninių ląstelių išskyrimas iš pelių kaulų

Pelių kamieninių ląstelių populiacijos išskyrimas buvo atliktas pagal Zhu protokolą (Zhu *et al.* 2010), taikant tam tikras modifikacijas. Tyrimuose naudoti 6-8 savaičių, 20-25 g laboratoriniai

gyvūnai, hibridinės B6D2F1(BDF1) pelės (C57BL/6 pelių linijos patelių ir DBA/2 patinėlių pirmos kartos palikuonys (F1)). Leidimas Nr. 0190 atlikti eksperimentus su gyvūnais, išduotas Valstybinės maisto ir veterinarinės tarnybos.

Kamieninių ląstelių populiacija išskirta iš pelių kaulų. Gyvūnams buvo atlikta stuburo slankstelių dislokacija. Pelės dezinfekuojamos 70 % etanolio tirpalu. Steriliais įrankiais išpreparuojami ilgieji galūnių kaulai (blauzdikaulis, šlaunikaulis).

Skalpeliu išpreparuoti kaulai susmulkinami 1-3 mm³ gabaliukais, plaunami HBSS x 3 ir ~2 h inkubuojami 37° C su 1 mg/ml kolagenaze II purtančiame inkubatoriuje, purtymo greitis 200 aps./min. Po inkubacijos kaulai išsėjami DMEM mitybinėje terpėje su L-alanylglutaminu, praturtinta 10 % fetaliniu veršelio serumu ir 1 % penicilino streptomicino mišiniu ir paliekami 3 d. inkubatoriuje 37° C temperatūroje, esant 5 % CO₂.

Praėjus atitinkamam laiko tarpui, pakeičiama terpė, pašalinant neprikibusias ląsteles. Prikibusios ląstelės po dar 5 d. atkabinamos pašalinant terpę ir pridedant 3 ml 0,25 % tripsino/EDTA tirpalo. Tuomet kaulų gabalėliai kartu su ląstelėmis persėjami į flakonus taip leidžiant mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms toliau migruoti iš kaulų. Vėliau terpė keičiama kas 3 d., kol pasišalina neprikibusios ląstelės ir kaulų nuolaužos. Kai ląstelių monosluoksnis pasiekia 80-90%, tuomet ląstelės persėjamos. Tyrimams naudotos 4-8 pasažo ląstelės.

2.2.2. Kamieninių ląstelių kultivavimas

Kamieninės ląstelės, kurios buvo išskirtos iš pelių ilgųjų galūnių kaulų inkubuojamos 37° C esant 5 % CO₂, pilnoje augimo terpėje: DMEM + 1 % L-glutamino, 10 % fetalinio veršelio serumo ir 1 % penicilino streptomicino mišiniu. Terpė keičiama kas 3 d. Kai ląstelių monosluoksnis pasiekia ~90 % padengimą, jos yra persėjamos.

Ląstelių persėjimas atliekamas vertikalaus srauto laminare. Ląstelės praplaunamos fosfatinio buferiu (PBS) tris kartus. Tuomet ląstelės užpilamos 1 ml 0,25 % tripsino/EDTA tirpalu ir inkubuojamos 37° C, kol ląstelės atsikabina nuo flakono dugno. Po to inaktyvuojamas T/E su tokiu pačiu kiekiu pilnos augimo terpės ir 10 min centrifuguojama 400 g. Supernatantas pašalinamas, ląstelės suspenduojamos pilnoje augimo terpėje ir persėjamos į auginimo 25 cm² darbinio ploto flakonus arba naudojamos eksperimentuose.

2.2.3. Ląstelių populiacijos imunofenotipavimas

Iš pelių kaulų išskirtų kamieninių ląstelių paviršiaus struktūrų identifikavimas atliktas tėkmės citometrijos metodu pagal Suzuki (Suzuki *et al.* 2002).

Tyrimui buvo paimtos 4-5 pasažo išskirtos pelių kaulų kamieninės ląstelės, jos plaunamos PBS kelis kartus. Tada ląstelės, kurių koncentracija 3×10^5 ląst/ml, resuspenduojamos šaltame PBS su 10 % fetaliniu veršelio serumu. Tuomet pridedami žymėti monokloniniai antikūnai. Analizės metu buvo naudoti žymėti monokloniniai antikūnai prieš pelių ląstelių paviršiaus antigenus: CD29, CD44, CD90.1(Thy-1.1), Sca-1, hemopoetinius linijinius žymenis (CD3e; CD11b; CD45R/B220; Ly-6G ir Ly-6C (Gr-1); TER-119/erythroid cells (Ly-76)). Taip pat atitinkamos izotipinės kontrolės. Inkubuojama 30 min 4°C temperatūroje.

Praėjus inkubacijos laikui, ląstelės plaunamos tris kartus PBS tirpalu. Tada 10^4 ląstelių atliekamas tyrimas naudojant tėkmės citometrą FACSCalibur™ (Becton Dickinson, JAV), duomenys apdoroti FlowJo v10.0 programine įranga.

2.2.4. Skirtingų nanodalelių koncentracijų poveikis metaboliniam ląstelių aktyvumui

Eksperimentui naudojamos kamieninės ląstelės, kurios buvo išskirtos iš pelių ilgųjų kaulų. Į 96 šulinėlių plokštelę ląsteles išsėjamos koncentracija 5×10^3 /cm² t.y. $1,7 \times 10^3$ į vieną šulinėlį.

Ląstelės 24 val. paliekamos prikibti. Po to užnešami kvantiniai taškai skirtingomis koncentracijomis ir skirtingais laiko momentais, t.y. 24 val. ir 48 val. iki matavimo. Eksperimento metu naudoti 8 μ M Qdot® 625 ITK™ Carboxyl kvantiniai taškai. Buvo pasirinktos 320 nM, 160 nM, 107 nM, 80 nM, 40 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM ir 1 nM kvantinių taškų koncentracijos.

Praėjus atitinkamam laikui atliekamas ląstelių metabolinio aktyvumo tyrimas XTT metodu, naudojant gamintojo instrukciją.

Paruošiamas tirpalas: į 5 ml XTT reagento įpilama 0,1 ml aktyvavimo tirpalo. Tuomet į kiekvieną šulinėlį įpilama po 50 μ l paruošto tirpalo, plokštelė perkeliama į inkubatorių 24 valandoms. Po 24 val. plokštelė išimama ir išmatuojamas optinis tankis esant 490 nm. Gauti rezultatai apdorojami MS Office Excel programa.

2.2.5. Vėžinių ląstelių kultivavimas

Eksperimentų metu buvo naudojamos vėžinės pelių ląstelės. MH-22A (*angl. Mouse Hepatoma*, 22-as pirminis navikas, A - subkultūra) – tai pelių kepenų karcinomos ląstelių linija, kurios gautos iš pelių standžiosios hepatomos 22A linijos.

Ląstelės auginamos 25 cm² darbinio ploto steriliame flakone DMEM mitybinėje terpėje su L-alanylglutaminu, praturtintu 10 % fetaliniu veršelio serumu ir 1 % penicilino streptomicino mišiniu bei laikomos inkubatoriuje 37°C temperatūroje, esant 5 % CO₂ ir palaikomam drėgnumui.

Terpė keičiama kas 3 dienas. Kai ląstelių monosluoksnis pasiekia 90 %, tuomet jos persėjamos, šaldomos arba naudojamos eksperimentuose.

2.2.6. Nanodalelių kaupimasis kamieninėse ląstelėse

Norint atlikti bandymus su nanodalelėmis reikia ištirti jų patekimo laiką į ląsteles.

Bandymo metu naudotos iš pelių kaulų išskirtos kamieninės ląstelės. Ląstelės išsėjamos į konfokalinei mikroskopijai skirtas plokšteles (LabTek, JK), koncentracija $5-10 \times 10^3$ ląst/cm² ir paliekamos prikibti 24 val. 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂.

Praėjus atitinkamam laiko tarpui į šulinėlius su prikibusiomis ląstelėmis skirtingais laiko intervalais likus 15 min, 30 min, 1, 3, 6 ir 24 valandoms iki matavimo įnešamos modelinės nanodalelės, komerciniai kvantiniai taškai (Qdot® 625 ITK™ Carboxyl Quantum Dots) koncentracija 8 nM. Praėjus inkubavimo laikui kvantiniai taškai buvo nuplauti (nuplaunami terpėje esantys kvantiniai taškai) ir užpilama nauja terpė. Tokiu būdu ląstelės paruošiamos tolimesniems stebėjimams.

Nanodalelių patekimo tyrimui buvo naudojamas temperatūrą, pastovią drėgmę ir CO₂ koncentraciją palaikantis blokas ir skenuojantis konfokalinis mikroskopas Eclipse TE2000-S, C1 plus (Nikon, Japan). Kvantinių taškų žaditimui buvo naudojamas Argono lazeris, kuris skleidžia 488 nm bangos ilgio šviesą. Standartiniai vaizdai gauti naudojant trijų kanalų RGB detektorius su juostiniu filtrų pralaidumu (raudonas kanalas – 621-755 nm).

2.2.7. Kamieninių ląstelių migracija „žaizdos“ modelyje *in vitro*

Kamieninių ląstelių migracijos *in vitro* žaizdų modelyje tyrimas atliktas pagal Liang protokolą (Liang *et al.* 2007). Kai išskirtos iš pelių kaulų kamieninės ląstelės pasiekia 90 % padengimą, jos yra persėjamos, o dalis ląstelių išsėjamos į dvi 33 mm konfokalinei mikroskopijai skirtas plokšteles, tankiu 2×10^4 ląst./cm². Tuomet ląstelės paliekamos prikibti 24 val.

Praėjus atitinkamam laikui į vieną plokštelę įnešamos modelinės nanodalelės (kvantiniai taškai (KT)) ir paliekama 24 val. inkubuotis. Po to ląstelių monosluoksnis, tiek su kvatiniais taškais, tiek be jų, įbrėžiamas tiesia linija su 200 μl pipetės galiuku taip sukuriant „žaizdą“. Tada praplaunama su PBS tris kartus, kad būtų pašalintos atkibusios ląstelės ir užpilama 2,5 ml terpės. Mėginiai patalpinami į mikroskopo temperatūrinį bloką su palaikoma 37°C temperatūra, pastovia drėgme ir 5 % CO₂. Ląstelių migracija kas 15 min, 24 val. laikotarpyje, vertinta skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu Eclipse TE2000-S C1 plus. Nanodalelių žaditimui buvo naudojamas

Argano lazeris. Vaizdai gauti naudojant trijų kanalų RGB detektorius su juostiniu filtrų pralaidumu (raudonas kanalas – 621-755 nm).

Gauti vaizdai apdoroti su ImageJ ir Nikon EZ-C1 FreeViewer programomis.

2.2.8. Kamieninių ląstelių migracija transmigracijos modelyje *in vitro*

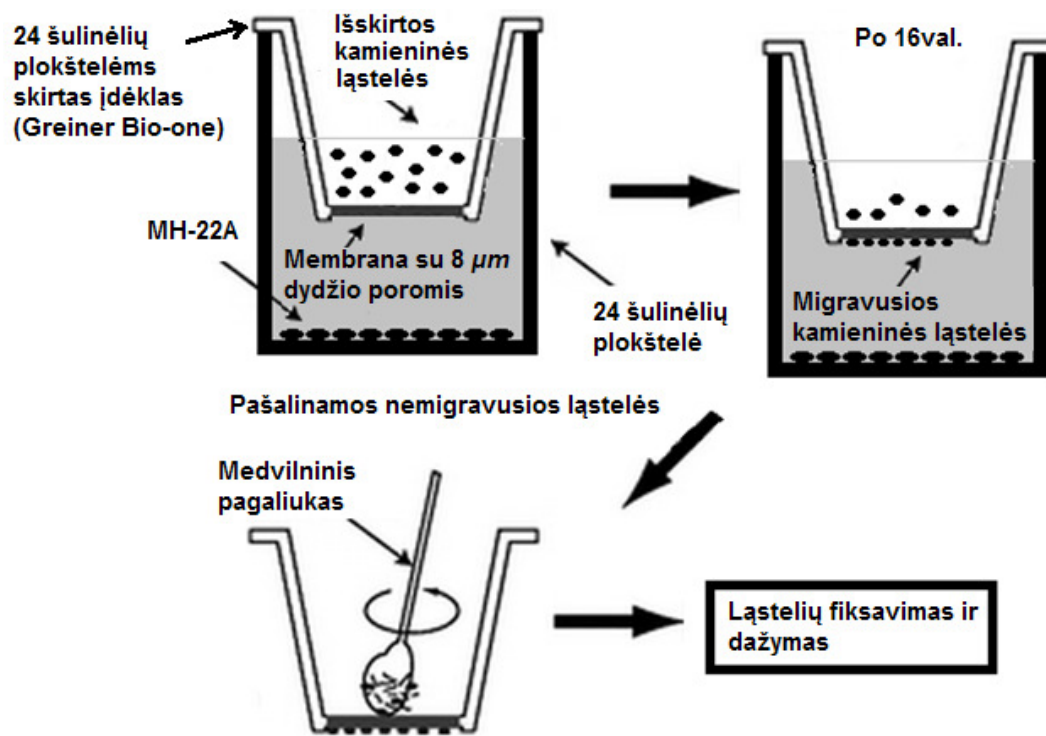
Atliekat kamieninių ląstelių migracijos tyrimą su nanodalelėmis ir be jų, buvo naudojami įdėklai (Greiner Bio-one) su 8 μm dydžio poromis, kurie pritaikyti 24 šulinėlių plokštelėms.

Pirmiausia į dvi 24 šulinėlių plokšteles (po 8 šulinėlius) išsėjamos MH-22A vėžinės ląstelės, koncentracija 2×10^4 ląst/cm² ir paliekamos inkubatoriuje prikibti 24 val.

Taip pat į 6 šulinėlių plokštelę išsėjamos išskirtos iš pelių kaulų kamieninės ląstelės koncentracija 4×10^4 ląst/cm² ir paliekamos prikibti 24 val. 37° C temperatūroje, esant pastoviai drėgmei ir 5 % CO₂.

Po 24 val. kai kamieninės ląstelės jau prikibusios, į tiriamuosius bandinius su nanodalelėmis įnešami kvantiniai taškai (Qdot 625 ITK carboxyl) ir paliekama inkubuotis 24 val.

Praėjus inkubacijos laikui kamieninės ląstelės praplaunamos fosfatinio buferiu (PBS), atkabinamos nuo plokštelės dugno, centrifuguojamos. Po to supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos mitybinėje terpėje be serumo.



3 pav. Kamieninių ląstelių migracijos eksperimento schema (pagal Palmisano 2010).

Dalis MH-22A ląstelių paveikiamos fotodinamine terapija. Ląstelės inkubuojamos valandą su chlorinu e6, koncentracija 10^{-6} M. Chlorinas – tai fotosensibilizatorius, kuris gerai kaupiasi navikiniuose audiniuose. Taip pat jis turi ilgą tripletinės būsenos gyvavimo trukmę bei gerą singuletinio deguonies generavimo kvantinį našumą. Praėjus inkubacijos laikui chlorinas e6 sužadinas diodiniu lazeriu, kurio bangos ilgis $650\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$, spinduliuotės spektro plotis $\leq 8\text{ nm}$ (FWHM). Ląstelės su fotosensibilizuojančia medžiaga švitinamos 40s, 2 J/cm^2 doze.

Kai ląstelės paruošiamos į 24 šulinėlių plokštes patalpinami įdėklai, į kuriuos įnešama paruoštos kamieninės ląstelės, 10×10^3 ląstelių.

Ląstelės inkubuojamos 16 val. po to įdėklai ištraukiami, jų vidus švelniai, medvilniniais pagaliukais, sukamaisiais judesiais išvalomi, kaip pavaizduota 3 paveiksle, taip pašalinant ląsteles kurios nemigravo. Pramigravusios per įdėklų membranų poras ląstelės fiksuojamos, dažomos kristaliniu violetu ir DAPI.

Ląstelių fiksavimas

Ląstelės fiksuojamos 4 % formaldehido tirpale fosfatiniame buferyje (pH 7,4 – 7,6). Užpylus fiksavimo tirpalo, ląstelės inkubuojamos 5 min. kambario temperatūroje. Po to ląstelės plaunamos PBS tirpalu tris kartus. Kai formaldehido tirpalas pašalinamas, užpilama 100 % metanolio ir inkubuojama ~5 min, kambario temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės plaunamos PBS tirpalu. Fiksuotos ląstelės 4 C temperatūroje užpilamos PBS gali būti laikomos keletą dienų.

Ląstelių dažymas kristaliniu violetu

Kristalinis violetinis, dar vadinamas genciano violetas, N-[4-[bis[4-(dimetilamino)-fenil]metilen]-2,5-cikloheksadien-1-ilidin]-N-metilmetanamino chloridas. Ląstelių dažymo metodas pagrįstas kristalinio violetinio dažo prisijungimu prie baltymo. Pirmiausia paruošiamas pradinis 0,05 % tirpalas 20 % etanolyje ir laikomas kambario temperatūroje. Kai bandiniai užfiksuojami ant ląstelių užpilami dažai ir inkubuojama 30 – 45 min kambario temperatūroje. Tada kristalinis violetas nuplaunamas kelis kartus PBS tirpalu.

Ląstelių branduolių dažymas DAPI

Kad ląsteles, kurios buvo užfiksuotos ant įdėklų membranų, būtų lengviau atskiriamos ir tiksliau suskaičiuojamos, dažomi jų branduoliai. DAPI (4'-6-diamidino-2- fenilindolas) gali būti naudojamas dažant tiek gyvų, tiek fiksuotų ląstelių branduolius.

Fiksuotos kamieninės ląstelės inkubuojamos kambario temperatūroje 10 – 20 min. su DAPI (Molecular probes) tirpalu PBS ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$). Po inkubacijos ląstelės plaunamos tris kartus fosfato buferiniu tirpalu.

Kamieninės ląstelės, kurios migravo per membranos poras vertinamos kiekiu. Naudojant mikroskopo X10 didinimo objektyvą, suskaičiuoti kiekvieno bandinio 10 atsitiktinių matymo laukų ir išvesti vidurkiai su standartine paklaida.

2.2.9. Eksperimentinių duomenų analizė

Eksperimentų duomenims apdoroti buvo naudojama FlowJo programinė įranga, ImageJ ir Nikon EZ-C1 FreeViewer grafinės programos bei Microsoft Excel skaičiuoklė. Grafinis duomenų pateikimas atliktas taip pat su Microsoft Excel. Kiekybiniai bandymų rezultatai pateikiami kaip aritmetiniai vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. Dviejų imčių vidurkių lyginimui buvo taikomas t testas. Statistiškai patikimais laikomi rezultatai, kai $p < 0,05$.

3. 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Pelių kamieninių ląstelių išskyrimas ir identifikavimas

Šiuo metu tyrimams somatinės mezenchiminės kamieninės ląstelės dažniausiai išskiriamos iš suaugusio organizmo kaulų čiulpų, riebalinių audinių ar kaulų (Zhu *et al.* 2010). Šiame darbe kamieninės ląstelės buvo išskirtos iš pelių ilgujų kaulų (šlaunikaulio ir blauzdikaulio).

Išskirta ląstelių populiacija pasižymėjo mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis: augimo pobūdžiu, morfologinėmis savybėmis (įprastinėmis sąlygomis auga kaip adhezinių ląstelių kultūra, būdinga fibroblastinėms ląstelėms charakteringa morfologija).

Buvo atliktas specifinių paviršiaus antigenų identifikavimas tėkmės citometrijos metodu. Gauti rezultatai parodė, kad ląstelėms būdingi pelių mezenchiminių kamieninių ląstelių paviršiaus žymenys: Sca-1, CD29 ir CD44 (97, 99, 63 % atitinkamai). Taip pat išskirtoms iš pelių ląstelėms nebūdinga (mažiau nei 5%) paviršiaus žymenų raiška: CD117(c-kit), CD90.1(Thy-1.1), MHC II. Ląstelės buvo Lin neigiamo fenotipo, joms nebūdinga hemopoetinių linijinių žymenų (CD3e; CD11b; CD45R/B220; Ly-6G ir Ly-6C(Gr-1); Ter-119(Ly-76)) raiška.

Atsižvelgiant į gautus duomenis ir lyginant su literatūroje pateiktais duomenimis (Sung *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2010; Cuiffo *and* Karnoub 2012), galime teigti, kad mūsų išskirta iš pelių kaulų ląstelių populiacija yra mezenchiminės kamieninės ląstelės.

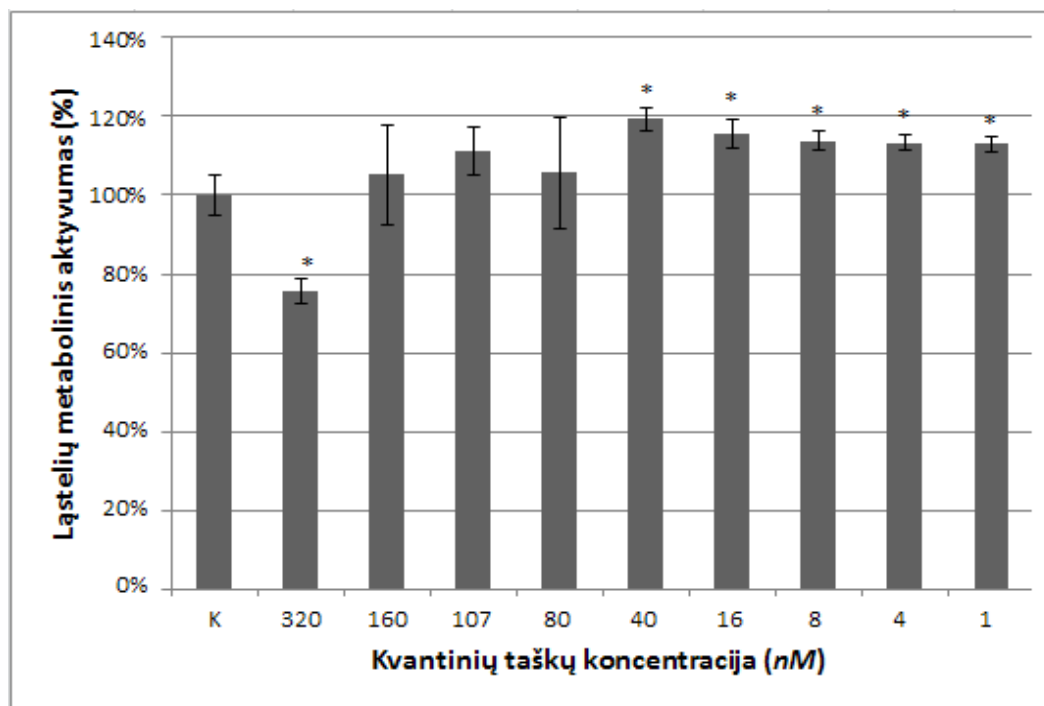
3.2. Nanodalelių poveikis kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui

Ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai įvertinti plačiai naudojamas XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-tetrazolio-2-karboksianilido natrio druska) testas. Gyvybingumo ir proliferacijos vertinimas yra pagrįstas mitochondrinės dehidrogenazės fermentų aktyvumu, kuris būdingas gyvoms ląstelėms. Šis fermentas skaido XTT iki vandenyje tirpaus oranžinio formazano produkto. Susidariusio formazano produkto kiekis matuojamas naudojant spektrofotometrą, taip įvertinamas sąlyginis ląstelių gyvybingumas, kuris tiesiogiai proporcingas dėl metabolinio aktyvumo susidariusių spalvotų formazano junginių kiekiui. Yra įrodyta, kad šis virsmas vyksta tik gyvose ląstelėse (Bensaid *et al.* 2000).

Tiriant skirtingų modelių nanodalelių (Qdot 625 carboxyl) koncentracijų įtaką iš pelių išskirtų kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui naudojome tetrazolio druskomis paremtus testus (XTT).

Šio tyrimo metu pasirinkti 24 ir 48 h inkubacijos su nanodalelėmis laiko intervalai. Kadangi olimesniuose bandymuose buvo tiriama nanodalelių kaupimasis ląstelėse ir susikaupusių nanodalelių įtaka migracijai šiame laiko intervale. Mezenchiminių kamieninių ląstelių migracija organizme yra gana greitas procesas (Gao *et al.* 2001), todėl svarbu žinoti ar per tokį laiko tarpą nepasireiškia kvantinių taškų įtaka ląstelių gyvybingumui.

Mūsų gauti rezultatai parodė, jog po 24 val. kamieninių ląstelių inkubacijos su modelinėmis nanodalelėmis, didžiausia kvantinių taškų (Qdot 625 carboxyl) 320 nM koncentracija neigiamai veikia ląstelių metabolinį aktyvumą (4 pav.). Tuo tarpu, nanodalelių koncentracijoms esant 160 nM, 107 nM ir 80 nM, lyginant su kontrole, nebuvo jokio poveikio ląstelių gyvybingumui, duomenys nuo kontrolės nesiskyrė statistiškai patikimai. Taip pat buvo nustatyta, jog esant mažesnei kvantinių taškų koncentracijai t.y. nuo 1 nM iki 40 nM, ląstelių metabolinis aktyvumas buvo didesnis, duomenys skyrėsi statistiškai patikimai, lyginant su kontrole.



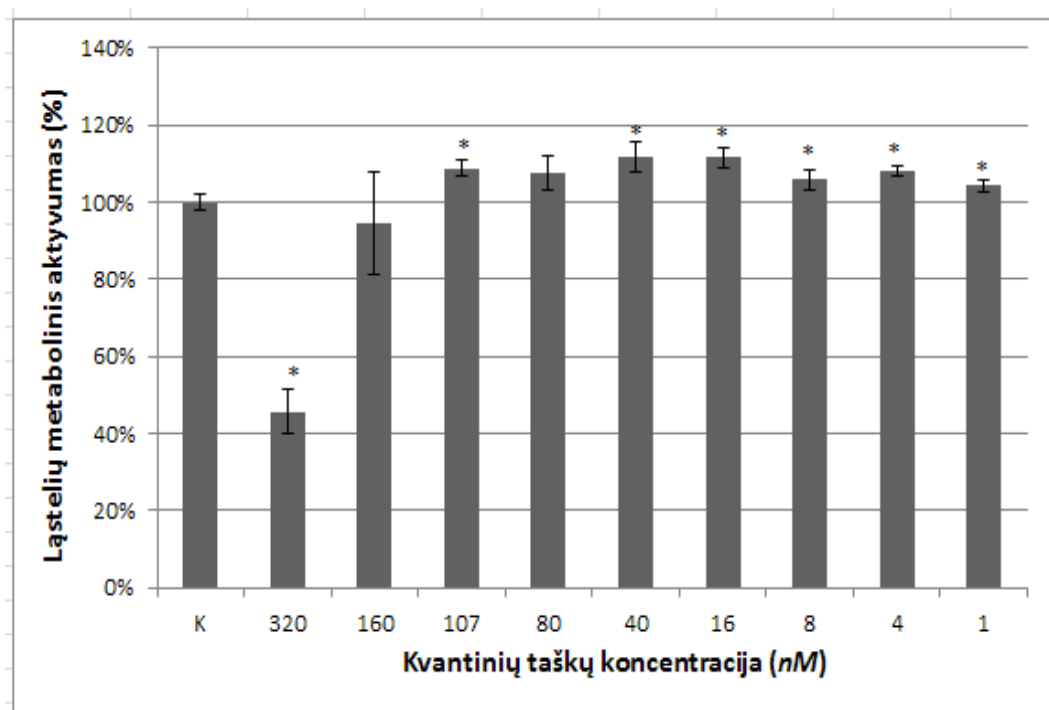
4 pav. Modelinių nanodalelių (kvantinių taškų Qdot 625 carboxy) įtaka kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui. Santykinis metabolinis aktyvumas procentais lyginant su kontrole po 24 val. inkubacijos su skirtingomis kvantinių taškų koncentracijomis (1-320 nM). Statistiškai patikimus skirtumus lyginant su kontrole (K) žymi * ($p < 0.05$).

Nanodalelių poveikis kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui buvo tirtas ir po 48 val. ląstelių inkubacijos su skirtingomis kvantinių taškų koncentracijomis. Iš gautų duomenų matome, jog esant didžiausiai 320 nM nanodalelių koncentracijai buvo nustatytas neigiamas poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui (5 pav.). Tačiau esant mažesnėms koncentracijoms 160 nM ir 80 nM

neigiamo poveikio ląstelėms nebuvo, lyginant su kontrole (duomenys nesiskyrė statistiškai patikimai).

Taip pat šio tyrimo metu, praėjus 48 val. ląstelių inkubacijai esant 107 nM, 40 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM ir 1 nM kvantinių taškų koncentracijoms, buvo nustatytas teigiamas poveikis ląstelių gyvybingumui. Lyginant su kontrole, ląstelių metabolinis aktyvumas buvo didesnis, duomenys skyrėsi statistiškai patikimai.

Atsižvelgiant į tyrimo metu gautus rezultatus (4 ir 5 paveikslai) matome, kad tiek po 24 val., tiek po 48 val. ląstelių inkubacijos su kvantiniais taškais buvo gauti panašūs rezultatai, ląstelių metabolinį aktyvumą neigiamai veikia didžiausia 320 nM kvantinių taškų koncentracija.



5 pav. Modelinių nanodalelių (kvantinių taškų Qdot 625 carboxy) įtaka kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui. Santykinis metabolinis aktyvumas procentais lyginant su kontrole po 48 val. inkubacijos su skirtingomis kvantinių taškų koncentracijomis (1-320 nM). Statistiškai patikimus skirtumus lyginant su kontrole (K) žymi * ($p < 0.05$).

Esant mažoms kvantinių taškų koncentracijoms, ląstelių metabolinis aktyvumas buvo didesnis lyginant su kontroliniais bandiniais tiek po 24 val. tiek po 48 val. ląstelių inkubacijos su nanodalelėmis. Abiem atvejais (po 24 val. ir 48 val.), teigiama įtaka kamieninių ląstelių gyvybingumui, buvo kvantinių taškų koncentracijoms esant 1-40 nM, duomenys statistiškai patikimi.

Panašūs rezultatai aptinkami ir literatūroje. Kiti autoriai parodė, kad esant mažesnėms TiO_2 nanodalelių koncentracijoms stebimas teigiamas poveikis kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelių (CHO-

K1) gyvybingumui. Tačiau nanodalelių koncentraciją padidinus iki $200 \mu M$ teigiamas poveikis mažėja (Wang *et al.* 2011), panašius rezultatus gavo ir kiti autoriai, kurie atliko bandymus su silicio nanodalelėmis, kurių koncentracijoms esant $1-10 \mu g/ml$ nebuvo pastebima neigiama įtaka ląstelių metaboliniam aktyvumui, tačiau koncentracijas padidinus $50-100 \mu g/ml$ ląstelių gyvybingumas sumažėjo (Drescher *et al.* 2011).

Vis dėlto literatūroje randama duomenų ir apie neigiamą nanodalelių įtaką ląstelių gyvybingumui. Tiriant sidabro nanodaleles (koncentracijoms esant nuo $1,56$ iki $400 \mu g/ml$), pasireiškė neigiamas poveikis tirtų ląstelių metaboliniam aktyvumui (Arora *et al.* 2008; Jain *et al.* 2009). Panašius rezultatus aprašo ir kiti autoriai, kurie atliko bandymus su aukso nanodalelėmis, kai koncentracijos buvo $1 nM$ ir $5 nM$. Tokios koncentracijos turėjo neigiamos įtakos ląstelių gyvybingumui (Vetten *et al.* 2013).

Toks skirtingas nanodalelių poveikis ląstelių gyvybingumui gali būti paaiškinamas nanostruktūrų sudėtimi, dydžiu, krūviu, padengimu, koncentracija, taip pat skirtingu inkubacijos laiku, ląstelių tipu. Šie poveikio ląstelėms dėsningumai ir mechanizmai reikalauja išsamesnių tyrimų.

Šis eksperimentas, kurio tikslas buvo nustatyti modelinių nanodalelių (kvantinių taškų) įtaką kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui, rodo, kad tirtos modelinės nanodalelės tinkamos tolimesniems eksperimentams su ląstelėmis parinkus tinkamas koncentracijas, kurios neturi neigiamos įtakos jų gyvybingumui. Tai svarbu norint panaudoti kamienines ląsteles kaip transporto sistemas nanodalelių gabenimui. Taigi tolimesniuose bandymuose atsižvelgiant į eksperimento metu gautus duomenis buvo naudotos žemesnės ($4 - 16 nM$) kvantinių taškų koncentracijos, kurios nepasižymėjo neigiama įtaka pelių kamieninėms ląstelėms.

3.3. Nanodalelių kaupimasis kamieninėse ląstelėse

Siekiant nustatyti modelinių nanodalelių „krovinio“ įtaką kamieninių ląstelių migracijai būtina ištirti, ar tiriamos nanodalelės patenka į ląsteles ir koks yra optimalus tų dalelių kaupimosi ląstelėse laikas. Literatūroje randama duomenų, jog nanodalelių kaupimasis vienose ląstelėse fiksuojamas po 15 min, kitose - po 24 val. ar net ilgesnio laikotarpio (Dalamakienė *et al.* 2013, Vatten *et al.* 2013, Zang and Monteiro-Riviere 2009).

Šio tyrimo metu, norint nustatyti optimalų nanodalelių kaupimosi išskirtose iš pelių kamieninėse ląstelėse laiką, buvo pasirinkti skirtingi laiko intervalai: 15 min, 30 min, 1 , 3 , 6 ir 24 val.

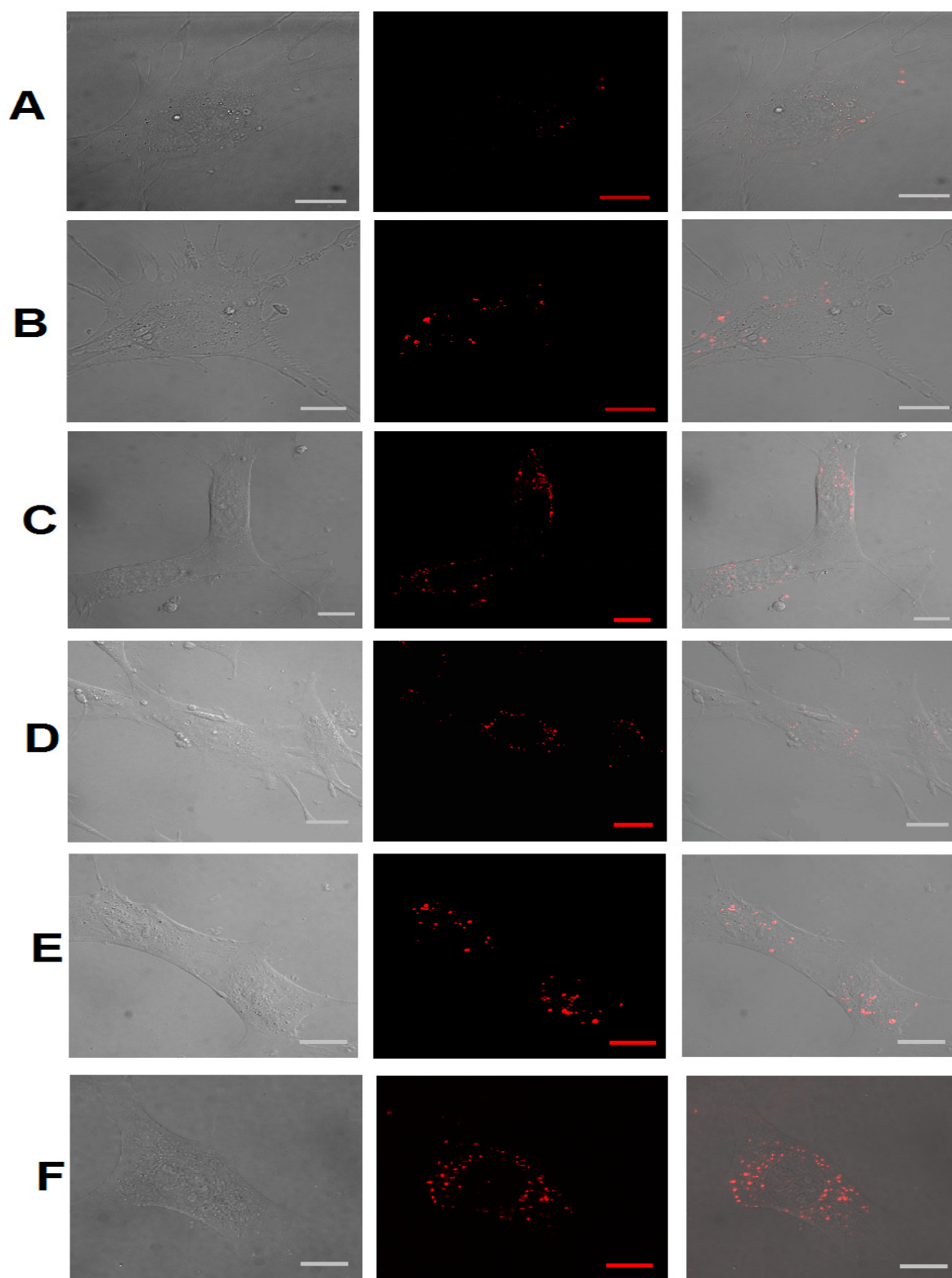
Atlikus tyrimą nustatėme, jog modelinės nanodalelės (kvantiniai taškai) jau po 15 ir 30 min inkubacijos nedideliais kiekiais, smulkiose vezikulėse, aptinkamos ląstelės citoplazmoje, lokallizuotos membraninėje dalyje (6 pav. A, B). Literatūroje aptinkama duomenų, kuriuose buvo tiriamos skirtingos ląstelių linijos ir kvantinių taškų (Qdot 625 carboxyl) kaupimasis jose. Kitų autorių pateikti rezultatai rodo, jog nanodalelės ląstelėse kaupiasi keliomis stadijomis. Pirmiausia kvantiniai taškai kaupiasi ant kai kurių ląstelių membranos paviršiaus, po to patenka į ląstelių vidų (Dalamakienė *et al.* 2013), tačiau mūsų tiriamoms kamieninėms ląstelėms nebūdingas toks nanodalelių kaupimasis ties membrana, kvantiniai taškai iškart aptinkami ląstelių citoplazminėje dalyje.

Praėjus inkubacijos 1 val. vezikulėse esančių kvantinių taškų kiekiai padidėja, jie pasklindę plačiau po ląstelių citoplazmą (6 pav. C). Po 3 val. kamieninių ląstelių citoplazmoje vis dar stebimas kvantinių taškų kiekio didėjimas (6 pav. D). Susidaro smulkios vezikulės, kurios lokalizuojasi prie branduolio.

Praėjus 6 ir 24 val. nuo eksperimento pradžios kamieninėse ląstelėse stebimos nanodalelių sankaupos stambesnėse vezikulėse, kurios išsidėsto aplink branduolį, tačiau į jį nepatenka (6 pav. E, F). Literatūroje taip pat yra duomenų jog nanodalelės nepatenka į ląstelių branduolius (Greulich *et al.* 2011; Cui *et al.* 2013; Dalamakienė *et al.* 2013)

Visais tirtais laiko momentais, kvantiniai taškai Qdot 625 carboxyl išskirtose iš pelių kaulų kamieninėse ląstelėse kaupėsi pastebimai. Tačiau literatūroje randama duomenų, kuriuose pateikti rezultatai rodo, jog vienos ląstelėse kvantiniai taškai geriausiai matomi po 3 val. inkubacijos periodo, kitose jie į ląsteles patenka praėjus 10 val. inkubacijos laikui (Dalamakienė *et al.* 2013).

Taip pat buvo atlikti kitų autorių tyrimai su sidabro nanodalelėmis. Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės 24 val. buvo inkubuotos su skirtingomis sidabro nanodalelių koncentracijomis. Buvo gauti rezultatai, jog šių nanodalelių kaupimasis žmogaus mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse priklausė nuo koncentracijos, jų kaupimosi lokalizacija buvo panaši kaip ir mūsų tyrimuose, jos sudarė sankaupas aplink branduolį (Greulich *et al.* 2011).



6 pav. Kvantinių taškų Qdot 625 carboxyl kaupimasis išskirtose iš pelių kamieninėse ląstelėse. Inkubacijos laikas su modelinėmis nanodalelėmis: A – 15 min, B – 30 min, C – 1 val., D – 3 val., E – 6 val., ir F- 24 val. Kairėje šviesinės mikroskopijos nuotraukos, viduryje - fluorescencinės mikroskopijos ir dešinėje - kombinuotos. Mastelio juosta – 10 μm .

Literatūroje taip pat randama duomenų apie tyrimus, kurių metu buvo tirtas aukso nanodalelių kaupimasis skirtingose ląstelių linijose. Buvo nustatyta, kad optimalus kaupimosi laikas visose tirtose ląstelėse buvo ~8 val. Taip pat gauti rezultatai, kad aukso nanodalelės labiausiai kaupiasi aplink ląstelės branduolį, citoplazmoje susidaro didelės vezikulės, be to aukso nanodalelės nesikaupia organelėse, tokiose kaip branduolys ar mitochondrijos (Cui *et al.* 2013). Mūsų atlikto tyrimo metu, pastebėta panaši tendencija, kai tirtos modelinės nanodalelės patenka į ląstelių citoplazmą ir kaupiasi didelėmis sankaupomis aplink kamieninių ląstelių branduolius, tačiau optimalus nanodalelių kaupimasis buvo stebimas praėjus 24 val.

Manome, kad skirtinga ląstelių kaupimosi kinetika priklauso nuo nanodalelių dydžio, paviršiaus padengimo bei tiriamų ląstelių ir, kad vienodo dydžio ir paviršiaus padengimo nanodalelės ląstelėse kaupsis panašiai.

Šio eksperimento tikslas buvo nustatyti nanodalelių kaupimąsi kamieninėse ląstelėse jis parodė, kad tirtos nanodalelės, kvantiniai taškai, gali kauptis ląstelių citoplazmoje ir jų kiekis ląstelėje priklauso nuo inkubacijos laiko. Tai svarbu, atliekant tolimesnius tyrimus, kurių metu bus tirama, ar patekę į kamieninių ląstelių vidų kvantiniai taškai neturės poveikio jų migracijai.

Atsižvelgiant į bandymų metu gautus rezultatus tolimesniuose eksperimentuose pasirinktas 24 val. ląstelių inkubacijos laikas su tiriamais kvantiniais taškais.

3.4. Kamieninių ląstelių migracija „žaizdos“ modelyje *in vitro*

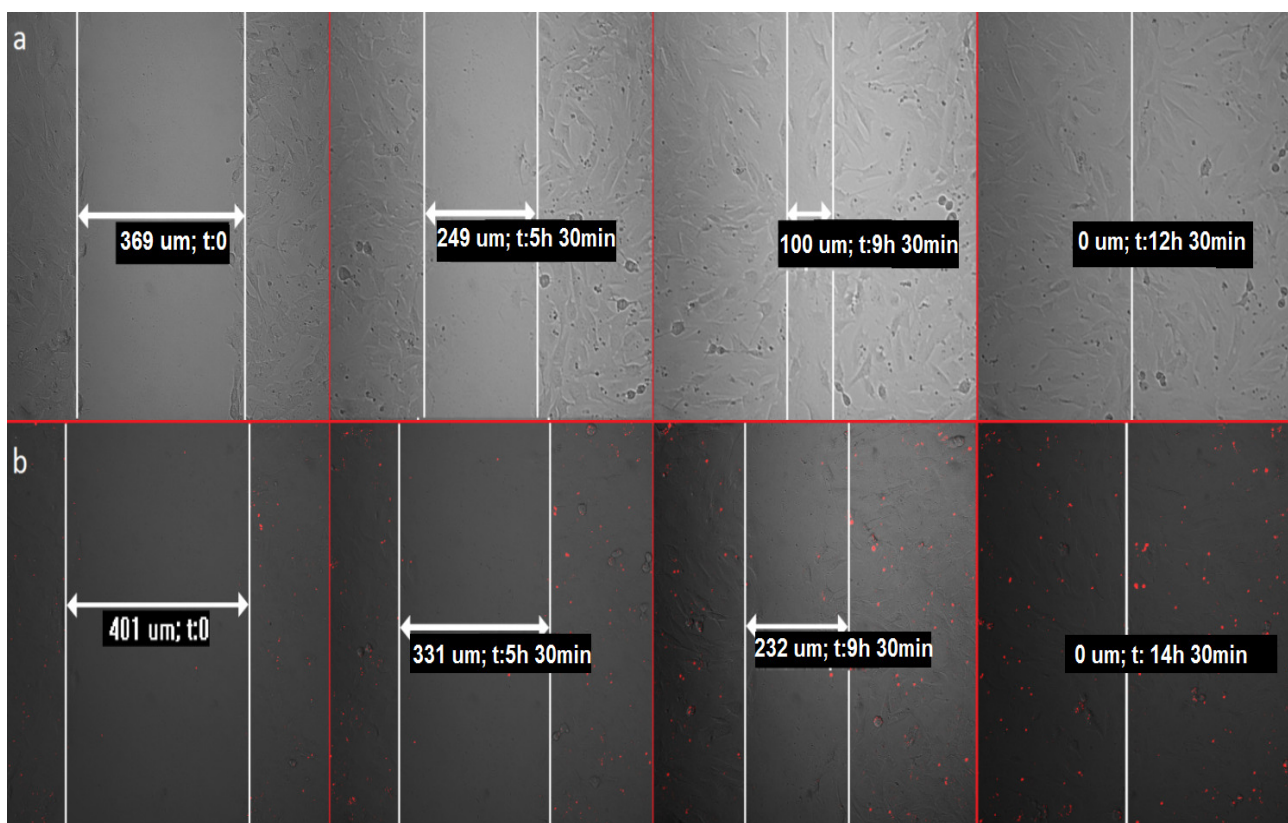
Mezenchiminės kamieninės ląstelės, dėl plačių taikymo galimybių yra aktyviai tiriamos daugelyje ląstelinės terapijos sričių. Viena iš jų – mezenchiminių kamieninių ląstelių migracija, kuri gali būti pritaikyta vėžinių susirgimų gydymui, pasitelkiant ląsteles kaip transporto sistemas, skirtas nanodarinių, prie kurių būtų galima prikabinti kelis skirtingus vaistus vienu metu, tikslingam nugabenimui į naviką. Todėl buvo atliktas tyrimas, kurio tikslas nustatyti ar modelinės nanodalelės turi įtakos pelių mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai *in vitro*.

Atlikus kamieninių ląstelių migracijos tyrimą žaizdų modelyje *in vitro* nustatyta, kad esant pradinei 369 μm pločio „žaizdai“ ląstelių monosluoksnyje (1 pav. (a)) išskirtų kamieninių ląstelių be kvantinių taškų migracija truko 12,5 val., kol žaizdos užaugimas pasiekė 100 %. Tuo tarpu bandinyje su kvantiniais taškais (1 pav. (b)) kamieninių ląstelių migracija, kol žaizdos užaugimas pasiekė 100 % truko 14,5 val., tačiau ląstelių monosluoksniu pradinis „žaizdos“ plotis čia buvo didesnis - 401 μm . Paskaičiuota, kad kamieninių ląstelių be nanodalelių migracijos greitis žaizdos modelyje *in vitro* buvo 0,49 $\mu\text{m}/\text{min}$, o su nanodalelėmis - 0,46 $\mu\text{m}/\text{min}$. Migracijos greitis skyrėsi ~5 %. Manome, kad šis skirtumas nėra pakankamas, kad galėtumėme teigti, jog kvantiniai taškai turi

poveikį ląstelių migracijai. Todėl galime tvirtinti, kad mūsų tirti kvantiniai taškai (Qdot 625 carboxyl) neturi įtakos pelių kamieninių ląstelių migracijai žaizdų modelyje *in vitro*.

Literatūroje aptinkama tyrimų, kurių metu buvo tiriamos aukso nanodalelės. Šių tyrimų metu buvo tirama ar šios nanodalelės turi įtakos RG2 (žiurkės gliomos) ir BAEC (galvijų aortos endotelio) ląstelių linijų migracijai „žaizdos“ modelyje *in vitro*. Buvo nustatyta, kad ląstelės, kurios buvo inkubuotos su aukso nanodalelėmis migruoja greičiau, lyginant su kontrole. Autoriai parodė, kad šios nanodalelės turi teigiama poveikį ląstelių migracijai (Rahman 2010).

Taip pat literatūroje yra darbų, kurių metu buvo tiriamos TiO₂ nanodalelės ir jų poveikis ląstelių migracijai. Buvo nustatyta, kad šios nanodalelės „žaizdų“ modelyje *in vitro* turi neigiamos įtakos ląstelių migraciją. Tiriamų ląstelių migracija priklausė nuo TiO₂ dydžio. Kuo didesnė nanodalelė buvo, tuo ilgiau truko „žaizdos gijimas“ lyginant su kontrole. O inkubavus ląsteles su 196 nm skersmens dalelėmis, jų migracija buvo išvis sustabdyta (Hou *et al.* 2013). Manome, jog tai priklauso nuo nanodarinių sandaros, dydžio, aplinkos sąlygų, bei tirtų ląstelių.



7 pav. Kamieninių ląstelių migracija *in vitro* žaizdų modelyje. Be nanodalelių viršuje (a), su nanodalelėmis apačioje (b). Baltomis linijomis pažymėti žaizdos pakraščiai, rodyklė rodo žaizdos plotį mikrometrais (um). Migracijos laikas nurodytas valandomis ir minutėmis.

Šio eksperimento tikslas buvo įvertinti modelinių nanodalelių įtaką pelių kamieninių ląstelių migracijai „žaizdos“ modelyje *in vitro*. Jis parodė, kad ląstelės geba migruoti su nanodalelių

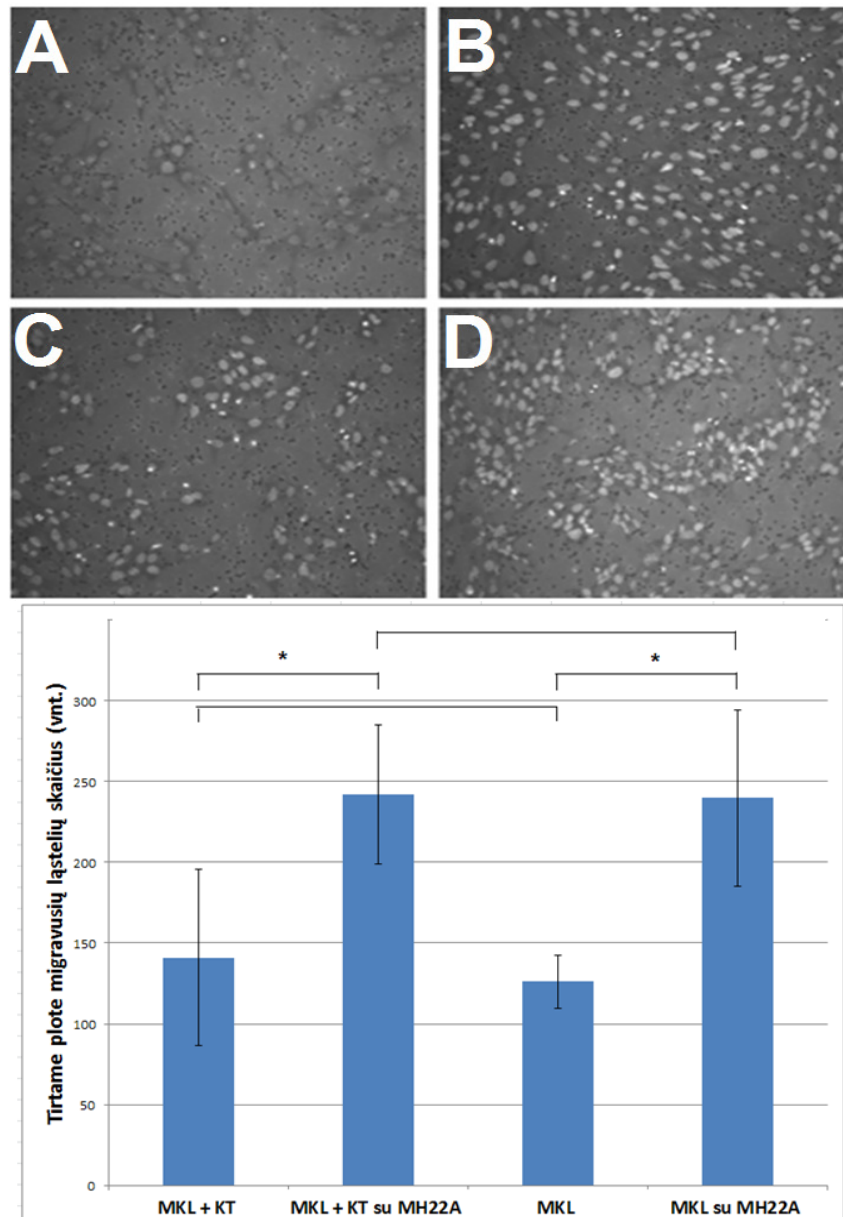
„kroviniu“ ir kvantinių taškų įtaka jų migracijai nepasireiškė. Tai svarbu planuojant ir atliekant tolimesnius bandymus, bei vertinant kamienines ląsteles kaip galimą nanodarinių gabenimo sistemą. Šios modelinės nanodalelės naudojome ir tolimesniuose kamieninių ląstelių migracijos eksperimentiniuose tyrimuose.

3.5. Kamieninių ląstelių migracija transmigracijos modelyje *in vitro*

Atlikus tyrimą „žaizdos“ modelyje *in vitro* buvo nustatyta, kad kvantiniai taškai neturi įtakos kamieninių ląstelių migracijai 2D. Tačiau, norint panaudoti mezenchimines kamienines ląsteles kaip transporto sistemą, yra svarbu nustatyti, kokią įtaką ląstelių migracijai gali turėti įvairūs aplinkos faktoriai, pavyzdžiui, vėžinės ląstelės (žinoma, jog mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymi tropizmu link vėžinės mikroaplinkos (Menon *et al.* 2007; Hoshino *et al.* 2013)) ar kitos terapijos (fotodinaminė, radioterapija). Taip pat svarbu ištirti kaip kamieninių ląstelių migraciją paveiks aplinkos sąlygos ir kvantiniai taškai ląstelėms migruojant 3D aplinkoje.

Šio darbo metu buvo atliktas tyrimas, kurio metu naudojant įdėklus su 8 μm skersmens poromis buvo vertinama ląstelių migracija pro šias poras keliais aspektais. Pirmiausia, ar modelinės nanodalelės turi įtakos kamieninių ląstelių migracijai pro poras transmigracijos modelyje. Taip pat, ar vėžinės ląstelės skatina mezenchimines kamienines ląsteles migruoti, bei ar fotodinamine terapija paveiktos vėžinės ląstelės turi įtakos ląstelių migracinėms savybėms.

Tyrėme ar nanodalelės turi įtakos pelių kamieninių ląstelių migracijai pro 8 μm skersmens poras. Migracija buvo vertinama kaip pramigravusias ląstelių kiekio vidurkis kiekvieno bandinio dešimtyje atsitiktinai parinktų matymo laukų. Nustatėme, kad iš pelių išskirtos kamieninės ląstelės geba migruoti per įdėklo membranos poras (8 pav. (A ir C, B ir D)). Kamieninės ląstelės, kurios prieš bandymą buvo inkubuotos su kvantiniais taškais (Qdot 625 carboxyl), ir tos, kurios buvo be nanodalelių migravo tokiomis pačiomis sąlygomis, duomenys buvo panašūs. Migravusių ląstelių kiekis nesiskyrė statistiškai patikimai. Taigi iš migracijos *in vitro* tyrimo metu gautų rezultatų, galime teigti, jog mūsų tiriamos modelinės nanodalelės neturi įtakos kamieninių ląstelių migracijai transmigracijos modelyje.



8 pav. 8 pav. Kamieninių ląstelių migracija pro membraną su 8 μm skersmens poromis. Viršuje užfiksuotos migravusios ląstelės viename matymo lauke: A – mezenchiminės kamieninės ląstelės su kvantiniais taškais; B – mezenchiminės kamieninės ląstelės su kvantiniais taškais ir MH-22A ląstelėmis; C – mezenchiminės kamieninės ląstelės kvantinių taškų; D – mezenchiminės kamieninės ląstelės su MH-22A ląstelėmis. Apačioje tiriamame plote migravusių ląstelių skaičius vnt. * - žymi statistiškai patikimus skirtumus ($p < 0.05$) lyginant su atitinkama kontrole.

Tačiau literatūroje randama duomenų, kurie aprašo tyrimus su TiO_2 nanodalelėmis ir jų poveikį mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai *in vitro*, naudojant įdėklus su 8 μm skersmens poromis. Šių bandymų metu gauti rezultatai buvo priešingi mūsų gautiems rezultatams. Bandymo autoriai nustatė, jog jų tyrimo atveju kamieninių ląstelių migraciją neigiamai veikia TiO_2 nanodalelės lyginant su kontrole, kurioje ląstelės nebuvo inkubuotos su nanodalelėmis. Duomenys

skyrėsi statistiškai patikimai. Taip pat šio tyrimo metu buvo nustatyta, jog mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai įtakos turi ir tirtų nanodalelių dydis. Buvo pasirinktos skirtingo dydžio TiO_2 (14 nm, 108 nm, 196 nm) ir gauti duomenys parodė, kad kuo didesnė nanodalelė, tuo ji turi daugiau neigiamos įtakos ląstelių migracijai. (Hou 2013) Taigi skirtingi tyrimu rezultatai skirtingų bandymu metu gaunami dėl nevienodų aplinkos sąlygų (pvz. terpės, fetalinio veršelio serumo koncentracijos), taip pat skirtingus rezultatus gali lemti pačių nanodalelių sudėtis, paviršiaus modifikacijos ar ypač dydis, kaip rodo tyrimai su titano nanodalelėmis.

Atsižvelgiant į mūsų tyrimo gautus rezultatus galime teigti, kad išskirtos iš pelių kamieninės ląstelės gali migruoti *in vitro* ir tam neturi įtakos modelinės nanodalelės, kvantiniai taškai. Taigi manome, jog vienodo dydžio ir tokio pat paviršiaus padengimo nanodalelės neturėtų daryti įtakos mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai.

Taip pat šio tyrimo metu buvo tirta, ar vėžinės ląstelės turi įtakos ląstelių migracijai. Iš gautų duomenų (8 pav.(B ir D)), matome, kad didžiausias skaičius kamieninių ląstelių, (vidutinis ląstelių skaičius viename matymo lauke 242 vnt. ir 240 vnt.) pramigravo tuose bandiniuose, kurių šulinėlių apačioje, prieš įdedant įdėklus su 8 μm skersmens poromis, buvo užsėtos vėžinės ląstelės MH-22A. Buvo paskaičiuota, kad toks migravusių ląstelių kiekis yra artimas 100% ląstelių, kurios buvo įneštos į įdėklus eksperimento pradžioje.

Iš gautų duomenų matome, jog migravusių kamieninių ląstelių skaičius viename matymo plote, buvo mažesnis (141 vnt. ir 126 vnt.) tuose bandiniuose, kurių šulinėliuose prieš įdedant transmigracijos tyrimui skirtus įdėklus, nebuvo išsėtos vėžinės ląstelės. Paskaičiuota kad šiuose bandiniuose migravusių ląstelių skaičius nuo pradinio, kuris buvo įpiltas į įdėklus, yra artimas 55%. Palyginus duomenis tarp tų ląstelių, kurios migravo plokštelių šulinėliuose, kuriuose buvo MH-22A, ir tų, kurios migravo į šulinėlius, kuriuose prieš bandymą nebuvo vėžinių ląstelių, gavome, jog link vėžinių ląstelių migravusių kamieninių ląstelių skaičius iki 90 proc. didesnis ir duomenys skiriasi statistiškai patikimai.

Taigi galima teigti, kad mūsų išskirtos iš pelių kamieninės ląstelės yra linkusios migruoti link vėžinių ląstelių. MH-22A ląstelės turi teigiamos įtakos ląstelių migracijai.

Literatūroje taip pat randama tyrimų, kurių metu autoriai naudojo įdėklus su 8 μm skersmens poromis *in vitro* tyrimuose, norėdami nustatyti, ar žmogaus kamieninės ląstelės migruoja link vėžinių ląstelių. Rezultatai buvo panašūs į mūsų eksperimento metu gautus rezultatus. Nustatyta, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės migruoja link krūties vėžio ląstelių (Dwyer *et al.* 2007).

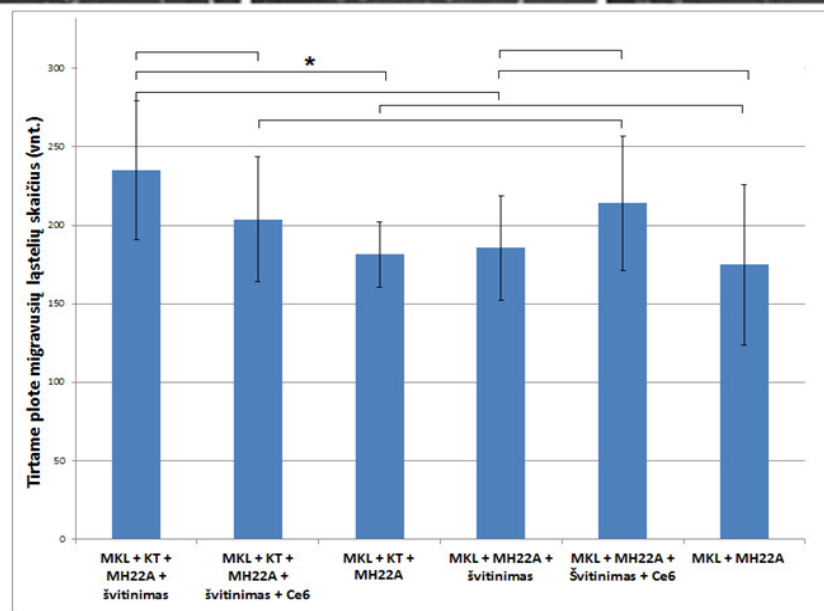
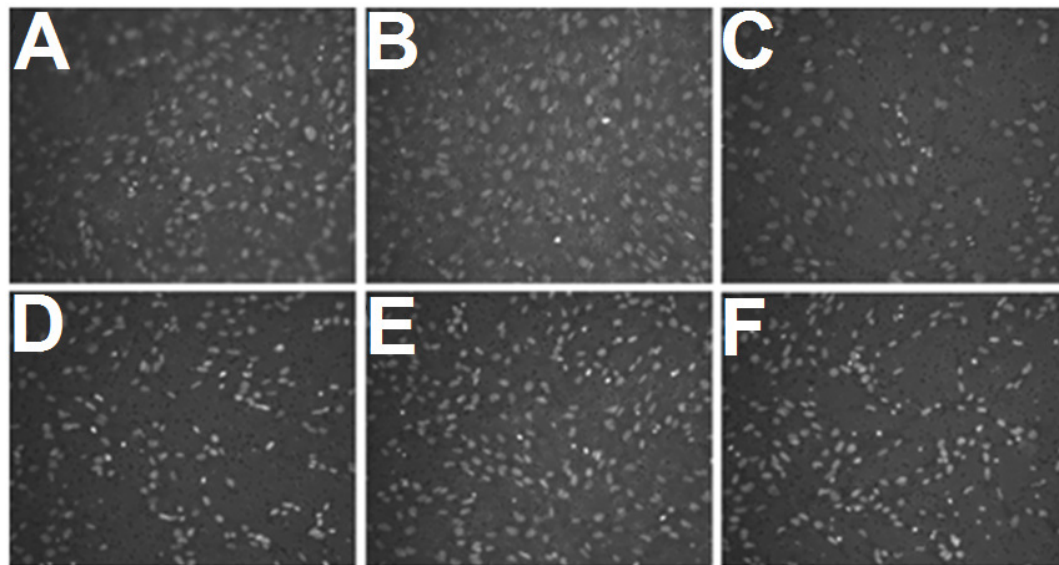
Literatūros šaltiniuose toks kamieninių ląstelių tropizmas link vėžinių ląstelių yra grindžiamas tuo, jog augliai pagamina didelį rinkinį chemokinių ir citokinių, kurie yra ligandai mezenchiminių kamieninių ląstelių receptoriams. Didelis kiekis citokinių/receptorių porų (pvz. SDF-1/CXCR4 ar SCF/c-Kit), adhezinės molekulės, $\beta 1$ -, ir $\beta 2$ -integrinai ir L-selektinas taip pat yra siejami su kamieninių ląstelių tropizmu. Kiti angiogeniniai ir uždegiminiai citokinai bei augimo faktoriai, tokie kaip IL-8, neurotrofinas-3, TGF- β , IL-1 β , TNF- α , PDGF ir EGF, taip pat paspartina mezenchiminių kamieninių ląstelių migraciją link vėžinių ląstelių (Gao *et al.* 2013; Hoshino *et al.* 2013). Tačiau molekuliniai mechanizmai užtikrinantys link auglio nukreiptą migraciją dar nėra visiškai išaiškinti. Ypač daug klausimų kyla dėl transplantuotų kamieninių ląstelių elgesio ir funkcijų. Todėl norint pritaikyti kamienines ląsteles kaip vektorius, skirtus nugabenti nanodaleles į auglius, reikia atlikti išsamesnius ikiklinikinius tyrimus. Tam pasitelkiamos modelinės sistemos, kurios parodytų, kaip ląstelės migruoja link vėžinių ląstelių ir ar jų migraciniam gebėjimui turi įtakos nanodalelės.

Atlikus bandymus ir nustačius, kad modelinės nanodalelės neturi įtakos kamieninių ląstelių migracijai, o vėžinės ląstelės skatina jas migruoti, buvo susidomėta literatūroje pateiktais bandymais, kurie teigia, jog galima pagerinti tropizmą ir mezenchiminių kamieninių ląstelių įsitvirtinimą vėžinėje mikroaplinkoje mažomis švitinimo dozėmis (Menon *et al.* 2007).

Kamieninių ląstelių migracijos tyrimo metu buvo atliekamas eksperimentas, kurio tikslas nustatyti, ar iš pelių išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės *in vitro* migruoja efektyviau link vėžinių ląstelių, jei aplinkoje esančios vėžinės ląstelės yra paveikiamos fotodinamine terapija, t.y. inkubuojamos su fotosensibilizuojančia medžiaga, chlorinu e6, ir švitinamos diodiniu lazeriu 40 s, dozė 2 J/cm².

Šio eksperimento metu vienos vėžinės ląstelės, prieš kamieninių ląstelių migracijos tyrimą, buvo paveiktos fotodinamine terapija, kitos – nepaveiktos fotodinaminės terapijos ir trečios - tik švitintos, be fotosensibilizuojančios medžiagos (Ce6).

Iš gautų duomenų, kurie pateikti 9 pav. matome, kad visuose bandiniuose kamieninės ląstelės migravo. Daugiausia 235 vnt. (vidutinis ląstelių skaičius viename matymo lauke) kamieninių ląstelių migravo bandinyje, kuriame vėžinės ląstelės (MH-22A) buvo tik švitintos, bet nepaveiktos fotosensibilizuojančia medžiaga (Ce6) (9pav. A). Tai beveik 99% visų ląstelių, kurios buvo įpiltos į įdeklus su 8 μ m skersmens poromis.



9 pav. Kamieninių ląstelės migracija pro membraną su $8\ \mu\text{m}$ skersmens poromis. Viršuje užfiksuotos migravusios ląstelės viename matymo lauke: A – mezenchiminės kamieninės ląstelės su KT ir švitintos MH-22A ; B - mezenchiminės kamieninės ląstelės su kvantiniais taškais, MH-22A paveiktos fotodinamine terapija; C – mezenchiminės kamieninės ląstelės su kvantiniais taškais ir MH-22A; D – mezenchiminės kamieninės ląstelės be kvantinių taškų ir švitintos MH-22A; E – mezenchiminės kamieninės ląstelės, MH-22A paveiktos fotodinamine terapija; F – mezenchiminės kamieninės ląstelės be kvantinių taškų ir MH-22A. tiriamame plote migravusių ląstelių skaičius vnt. * - žymi statistškai patikimus skirtumus ($p < 0.05$) lyginant su atitinkama kontrole

Rezultatai rodo, kad nebuvo patikimo skirtumo tarp kamieninių ląstelių, kurios migravo bandiniuose, kuriuose vėžinės ląstelės buvo paveiktos fotodinamine terapija, ir tarp tų, kurios migravo tiriamoje grupėje, kurioje MH-22A nebuvo paveiktos Ce6 ir švitintos.

Taip pat nenustatytas statistiškai patikimas skirtumas ir tarp kamieninių ląstelių, kurios migravo bandinyje, kuriame vėžinės ląstelės buvo tik švitintos, bet be Ce6 ir tarp bandinio, kuriame MH-22A buvo paveiktos fotodinamine terapija.

Pelių kamieninių ląstelių, migravo daugiau tuose bandiniuose, kuriuose vėžinės ląstelės buvo tik švitintomis diodiniu lazeriu 40 s, dozė 2 J/cm^2 nei tos, kurios migravo mėginiuose, kuriuose MH-22A nebuvo paveiktos švitinimu ir fotosensibilizuojančia medžiaga (migravusių ląstelių kiekis nuo pradinio kiekio atitinkamai buvo 99 % ir 76 %). Duomenys skyrėsi statistiškai patikimai. Tačiau patikimo skirtumo nebuvo analogiškuose bandiniuose, kuriuose ląstelės buvo be kvantinių taškų, todėl norint patvirtinti teigiamą švitinimo įtaką reikalingi išsamesni tyrimai.

Tuo tarpu literatūroje aptinkama duomenų, kad vietinis švitinimas paspartina mezenchiminių kamieninių ląstelių migraciją ir audinių gijimą. Autoriai šią tendenciją paaiškina bendru kamieninių ląstelių tropizmu link pažeistų audinių ir tai, kad fotodinaminė terapija galėjo sustiprinti galimą sinergiją tarp spindulinio gydymo ir augliui specifiško nanodalelių-mezenchiminių kamieninių ląstelių nukreipimo (Gao *et al.* 20013).

Šio tyrimo metu taip pat buvo tiriama, ar modelinės nanodalelės turi įtakos iš pelių kaulų išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijai. Lyginant gautus duomenis, pateiktus 9 pav., kuriuose ląstelės su kvantiniais taškais ir be jų migravo tokiose pačiose aplinkos sąlygose, statistiškai patikimo skirtumo nebuvo. Tai įrodo, kad mūsų tirtos modelinės nanodalelės nedaro poveikio kamieninių ląstelių migracijai šiomis sąlygomis.

Remiantis kamieninių ląstelių migracijos įvertinimo *in vitro* tyrimo metu gautais duomenimis galime teigti, kad nanodalelės neturi įtakos pelių kamieninių ląstelių migracijai, bet jos pasižymi tropizmu link vėžinių ląstelių. Fotodinaminė terapija, kuria buvo paveiktos vėžinės ląstelės bandiniuose *in vitro* sąlygomis, neturėjo poveikio ląstelių migracijai. Taip pat iš atlikto bandymo gautų duomenų galima teigti, kad kamieninės ląstelės migruoja link vėžinių (MH-22A) ląstelių, nepriklausomai ar jos su kvantiniais taškais, ar be jų. Tai gali būti dėl vėžinių ląstelių sekretuojamų faktorių ar išskiriamų metabolinių produktų, taip pat dėl atitinkamų receptorių raiškos mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse. Kad būtų tiksliai nustatyta kokios medžiagos ir kokie mechanizmai veikia kamieninių ląstelių migraciją reikalingi išsamesni tyrimai.

3.6. Rezultatų apibendrinimas

Darbo metu iš hibridinių B6D2F1(BDF1) pelių kaulų išskyrėme ląstelės. Ląstelės pasižymėjo mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis: augimo pobūdžiu,

morfologija, taip pat paviršiaus žymenų Sca-1, CD29 ir CD44 raiška. Taip pat neaptikome ir hemopoetinių linijinių žymenų.

Tyrėme modelinių nanodalelių įtaką ląstelių metaboliniam aktyvumui. Nustatėme jog mūsų naudotoms kamieninėms ląstelėms kvantinių taškų koncentracija (išskyrus didžiausią (320 *nM*)) neturėjo neigiamos įtakos. Šie rezultatai reikalingi siekiant panaudoti kamienines ląsteles kaip transporto sistemas nanodalelių gabenimui.

Nanodalelių kaupimosi kamieninėse ląstelėse tyrimo metu nustatėme, jog kvantiniai taškai, gali kauptis pelių kamieninių ląstelių citoplazmoje, bet ne organelėse (pvz., branduolyje), o jų kiekis ląstelėje priklauso nuo inkubacijos laiko.

Kamieninių ląstelių migracijos „žaizdos“ modelyje *in vitro* tyrimo metu, nustatėme, jog ląstelės geba migruoti su nanodalelių „kroviniu“ ir kvantinių taškų įtaka jų migracijai nepasireiškė.

Taip pat atlikome kamieninių ląstelių migracijos tyrimus, kurių metu naudojant įdėklus su 8 μm skersmens poromis vertinome ląstelių migraciją keliais kriterijais: ar modelinės nanodalelės turi įtakos kamieninių ląstelių migracijai. Taip pat, ar vėžinės ląstelės skatina mezenchimines kamienines ląsteles migruoti, bei ar fotodinamine terapija paveiktos vėžinės ląstelės, turi įtakos ląstelių migracinėms savybėms.

Įvertinus rezultatus, galime teigti, kad naudoti kvantiniai taškai neturi įtakos kamieninių ląstelių migracijai *in vitro*. Tačiau nustatėme jog kamieninės ląstelės linkusios migruoti link vėžinių ląstelių.

Tiriant ar kamieninių ląstelių migracijai turės įtakos neigiamas poveikis į vėžines ląsteles, jas paveikėme fotodinamine terapija. Nustatėme, jog fotodinaminė terapija neturėjo poveikio kamieninių ląstelių migracijai transmigracijos modelyje *in vitro*. Taip pat kvantiniai taškai neturėjo įtakos migracijai taikant fotodinaminę terapiją.

Visi šie gauti rezultatai svarbūs siekiant panaudoti mezenchimines kamienines ląsteles kaip vektorius priešvėžinių vaistų pristatymui į naviką.

Išvados

1. Iš pelių išskirtą ląstelių populiaciją sudarė mezenchiminės kamieninės ląstelės. Populiacija pasižymėjo kamieninėms ląstelėms būdingomis morfologinėmis savybėmis, augimo pobūdžiu bei paviršiaus žymenų raiška.
2. Kvantiniai taškai kaip modelinės nanodalelės gali būti naudojami su kamieninėmis ląstelėmis. Parinkus tinkamas koncentracijas kvantiniai taškai 48 val. laikotarpyje neturėjo neigiamos įtakos kamieninių ląstelių metaboliniam aktyvumui.
3. Pelių kamienines ląsteles galima efektyviai „pakrauti“ kvantiniais taškais. Jie žymiais kiekiais aptinkami stambiose vezikulėse ląstelių citoplazmoje praėjus 24 val.
4. Kvantiniai taškai neturi įtakos pelių kamieninių ląstelių migracijai *in vitro* žaizdų modelyje. Ląstelių su nanodalelėmis migracijos greitis nesiskyrė nuo kontrolinių.
5. Kiekybiniais transmigracijos *in vitro* tyrimais nustatyta:
 - a. Kvantinių taškų „kroviny“ neturi įtakos kamieninių ląstelių migraciniam gebėjimui transmigracijos modelyje *in vitro*. Migravusių ląstelių kiekiai nesiskyrė.
 - b. Vėžinės MH-22A ląstelės skatina kamieninių ląstelių migraciją link jų ir kvantiniai taškai šiam procesui įtakos neturi. Migravusių ląstelių kiekis, esant vėžinėms ląstelėms, buvo iki 90 proc. didesnis.
 - c. Fotodinaminės terapijos neigiamas poveikis vėžinėms ląstelėms neturi įtakos kamieninių ląstelių migracijai ir kvantiniai taškai taip pat neveikia. Migravusių ląstelių kiekiai nesiskyrė.

Simona Lenortavičiūtė

Literatūra

1. Allison, R.R.; Downie, G.H.; Cuenca, R.; Hu X.H.; Childs, C.J.H.; Allison C.H.S. 2004. Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1: 27-42.
2. Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies, *Toxicology Letters* 179: 93–100.
3. Bachor, R.; Scholz, M.; Shea, C.R.; Hasan, T. 1991. Mechanism of photosensitization by microsphere-bound chlorin e6 in human bladder carcinoma cells, *Cancer Res.* 51:4410-4414.
4. Barroso, M.M. 2011. Quantum dots in cell biology, *J. Histochemistry & Cytochemistry* 59(3): 237–251.
5. Bensaid, A.; Thierie, J.; Penninckx, M. 2000. The use of the tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes, *J. of Microbiological Methods* 40: 255–263.
6. Binello, E.; Germano, I.M. 2012. Stem cells as therapeutic vehicles for the treatment of high-grade gliomas, *Neuro Oncol.* 14(3):256-65.
7. Blatchley, C.C. 2013. Nanotechnology Safety: *Nanotechnology Safety in the Biomedical Industry*, Elsevier 73-83p. ISBN: 978-0-444-59438-9.
8. Brenner, M.K. Cellular therapy for cancer: Let there be light, *Tissue Antigens* 79(1):1-3. [žiūrėta 2014-03- 15]. Prieiga per internetą: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0039.2011.01798.x/pdf>>.
9. Cheng, Y.; Morshed, R.A.; Auffinger B.; Tobias, A.L.; Lesniak M.S. 2014. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews* 66: 42–57.
10. Chin, W.W.; Heng, P.W.; Olivo, M. 2007. Chlorin e6 - polyvinylpyrrolidone mediated photosensitization is effective against human non-small cell lung carcinoma compared to small cell lung carcinoma xenografts, *BMC Pharmacol* 1(7): 2-15.
11. Cui, L.; Zahedi, P.; Saraceno, J.; Bristow, R.; Jaffray, D.; Allen, C. 2013. Neoplastic cell response to tiopronin-coated gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9 (2): 264–273.
12. Cuiffo, B.G.; Karnoub, A. E. 2012. Mesenchymal stem cells in tumor development. Emerging roles and concepts, *Cell Adhesion & Migration* 6 (3): 220–230.

13. Dai, L.J.; Moniria, M.R.; Zeng, Z.R.; Zhou, J.X.; Rayat, J.; Warnocka, G.L. 2011. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy, *Cancer Letters* 305(1): 8-20.
14. Damalakienė, L.; Karabanovas, V.; Bagdonas, S.; Valius, M.; Rotomskis, R. 2013. Intracellular distribution of nontargeted quantum dots after natural uptake and microinjection, *Int J. Nanomedicine* 8: 555-68.
15. Dennis, J. E., Caplan, A.I. 2004. Stem cells handbook: *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. Humana Press. 107-117p. ISBN 978-1-61737-367-1.
16. DeVita, V.T.; Lawrence, T.S.; Rosenberg, S. 2008. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 609-635p. ISBN-13: 978-0781772075
17. Dominici, M.; Blanc, K.L.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (4): 315-317.
18. Drescher, D.; Orts-Gil, G.; Laube, G.; Natte, K.; Veh, R.W.; Österle, W.; Kneipp, J. 2011. Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects, *Anal Bioanal Chem*. 400(5):1367-1373.
19. Dwyer, R.M.; Potter-Beirne, S.M.; Harrington, K.A.; Lowery, A.J.; Hennessy, E.; Murphy, J.M.; Barry, F.P.; O'Brien, T.; Kerin, M.J. 2007. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells, *Clin Cancer Res* 13(17): 5020- 5027.
20. Fakruddin, M.; Hossain, Z.; Afroz, H. 2012. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective, *J. Nanobiotechnology* 10: 2-8. [žiūrėta 2014-03-20]. Prieiga per internetą: <<http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/31>>.
21. Freitas, R.A. 2005. Current status of nanomedicine and medical nanorobotics, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* 2(1): 1-25.
22. Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea- pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet*. 3(4): 393–403.

23. Gao, J.; Dennis, J. E.; Muzic, R. F.; Lundberg, M.; Caplan, A. I. 2001. The Dynamic *in vivo* Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion, *Cells Tissues Organs* 169:12–20.
24. Gao, Z.; Zhang, L.; Hu, J.; Sun, Y. 2013. Mesenchymal stem cells: a potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug loaded nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9(2): 174–184.
25. Greulich, C.; Diendorf, J.; Simon, T.; Eggeler, G.; Epple, M.; Köller, M. 2011. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells, *Acta Biomaterialia* 7: 347-354.
26. Grodzinski, P.; Torchilin, V. 2013. Cancer nanotechnology, *Advanced Drug Delivery Reviews* 66: 1p. [žiūrėta 2014-03- 05]. Prieiga per internetą: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.011>>.
27. Ho, Y.P.; Leong, K.W. 2010. Quantum dot-based theranostics, *Nanoscale* 2(1): 60–68.
28. Hoshino, G.; Yagi, H.; Hasegawa, H.; Ishii, Y.; Okabayashi, K.; Kikuchi, H.; Yasuda, A.; Mabuchi, Y.; Nakamura, M.; Matsuzaki, Y.; Okano, H.; Kitagawa, Y. 2013. Human mesenchymal stem cells migrate toward colon cancer partially regulated by HMGB1, *J. Cell Sci Ther* 4(3): 145 – 154.
29. Hou, Y., Cai, K., Li, J., Chen, X., Lai, M., Hu, Y., Luo, Z., Ding, X., Xu, D. 2013. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells, *International Journal of Nanomedicine* 8(1): 3619 – 3630.
30. Huang, Y.; He, S., Cao, W.; Cai, K.; Liang, X.J. 2012. Biomedical nanomaterials for imaging-guided cancer therapy, *Nanoscale* 4: 6135–6149.
31. Jain, J.; Arora, S.; Rajwade, J.M.; Omray, P.; Khandelwal, S.; Paknikar, M.K. 2009. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use, *Molecular pharmaceutics* 6(5): 1388–1401.
32. Khan, W.S.; Asmatulu, R. 2013. Nanotechnology Safety: *Nanotechnology emerging trends, markets, and concerns*, Elsevier 256p. ISBN: 978-0-444-59438-9.
33. Kim, K.Y. 2007. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3(2): 103–110.
34. Kolf, C.M.; Cho, E.; Tuan, R.S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation, *Arthritis Res Ther.* 9(1): 204.

35. Liang, C.C.; Park, A.Y.; Guan, J. L. 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*, *Nat. Protoc.* 2 (2): 329-333.
36. Lukšienė, Ž. 2003. Fotodinaminė terapija: veikimo mechanizmas ir būdai gydymo efektyvumui padidinti, *Medicina*: 39(12): 1137-1150.
37. Menon, L.G.; Picinich, S.; Koneru, R.; Gao, H.; Lin, S.Y.; Koneru, M.; Mayer-Kuckuk, P.; Glod, J.; Banerjee, D. 2007. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells, *Stem Cells* 25(2):520–528.
38. Michalet, X.; Pinaud, F.F.; Bentolila, L.A.; Tsay, J.M.; Doos,e S.; Li, J.J.; Sundaresan, G.; Wu, A.M.; Gambhir, S.S.; Weiss, S. 2012. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics, *Science* 307: 538-544.
39. Mirsasaani, S.S.; Hemati, M.; Tavasoli, T.; Dehkord, E.S.; Yazdi, G.T.; Poshtiri, D.A. 2013. Nanobiomaterials in clinical dentistry: *Nanotechnology and Nanobiomaterials in Dentistry*, Oxford OX5, UK. 17-30p. ISBN: 978-1-4557-3127-5.
40. Misra, R.; Acharya S.; Sahoo S.K. 2010. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy, *Drug Discovery Today* 15(19-20): 842–850.
41. Nakamizo, A.; Marini, F.; Amano, T.; Khan, A.; Studeny, M.; Gumin, J.; Chen, J.; Hentschel, S.; Vecil, G.; Dembinski, J.; Andreeff, M.; Lang, F.F. 2005. Human bone marrow–derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas, *Cancer Res.* 65(8): 3307- 3318.
42. Rahman, W. A. 2010. Gold Nanoparticles: Novel Radiobiological Dose Enhancement Studies for Radiation Therapy, Synchrotron based Microbeam and Stereotactic Radiotherapy, RMIT University, 140-180p. [žiūrėta 2014-03- 16]. Prieiga per internetą: <http://researchbank.rmit.edu.au/eserv/rmit:11218/W_Abd_Rahman.pdf>.
43. Reinecke, H.; MacDonald, G.H; Hauschka, D.; Murry, C.E. 2000. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair, *J. Cell Biol* 149(3): 731–740.
44. Rosenthal, S.J.; Jerry, C. Chang, J.C.; Kovtun, O.; McBride, J.R.; Tomlinson, I.D. 2010. Biocompatible quantum dots for biological applications, *Chemistry & Biology* 18: 10-24.
45. Rotomskis, R. 2007. Biofotonika. Vilnius : Vilniaus universiteto leidykla. ISBN 978-9955-33-072-1.

46. Rotomskis, R.; Streckytė, G.; Karabanovas, V. 2006. Nanodariniai diagnostikai ir gydymui: nanomedicinos link, *Medicina* 42(7): 542-558.
47. Sanvicens, N.; Marco, M. P. 2008. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine, *Trends Biotechnol.* 26(8):425-33.
48. Smith, A.M.; Duan, H.; Mohs, A.M.; Nie, S. 2008. Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1226–1240.
49. Srinivas, M.; Aarntzen, E.H.J.G.; Bulte, J.W.M.; Oyen, W.J.; Heerschap, A.; de Vries, I.J.M.; Figdor, C.G. 2010. Imaging of cellular therapies, *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(11): 1080–1093.
50. Sung, J.H.; Yang, H.M.; Park, J.B.; Choi, G.S.; Joh, J.W.; Kwon, C.H.; Chun, J.M.; Lee, S.K.; Kim, S.J. 2008. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells, *Transplantation Proceedings* 40(8): 2649–2654.
51. Suzuki, A.; Zheng, Y.; Kaneko, S.; Onodera, M.; Fukao, K.; Nakauchi, H.; Taniguchi, H. 2002. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver, *J. Cell Biology* 156 (1): 173–184.
52. Tuan, R.S.; Boland, G.; Tuli, R. 2002. Adult mesenchymal stem cells based tissue engineering, *Arthritis Research and Therapy* 5(1):32-45. ISSN 1478-6354.
53. Utku, N. 2011. New approaches to treat cancer – what they can and cannot Do, *Biotechnology healthcare* 8(4): 25-27.
54. Vallone, V.B.F.; Romaniuk, M.A.; Choi, H.; Labovsky, V.; Otaegui, J.; Chasseing, N.A. 2013. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation* 85(1-2): 1–10.
55. Veldeman, L.; Madani, I.; Hulstaert, F.; Meerleer, G.; Mareel, M.; De Neve, W. 2008. Evidence behind use of intensity-modulated radiotherapy: a systematic review of comparative clinical studies, *The Lancet Oncology* 9(6): 367–375.
56. Verellen, D.; De Ridder, M.; Storme, G. 2008. A (short) history of image-guided radiotherapy, *Radiotherapy and Oncology* 86(1): 4-13.
57. Vetten, M.; Tlotleng, N.; Rascher, D.T.; Skepu, A.; Keter, F. K.; Boodhia, K.; Koekemoer, L.A.; Andraos, C.; Tshikhudo, R.; Gulumian, M. 2013. Label-free *in vitro* toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines, *Particle and Fibre Toxicology* 10:50. [žiūrėta 2014-02- 20]. Prieiga per internetą: <<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/10/1/50>>.

58. Wang, S.; Yu, H.; Wickliffe, J.K. 2011. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂, *Toxicology in vitro* 25(8): 2147–2151.
59. Wang, Y.; Chen, L. 2011. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7(4): 385–402.
60. Xing, Y.; Chaudry, Q.; Shen, C.; Kong, K.Y.; Zhau, H.E.; Chung, L.W.; Petros, J.A.; O'Regan, R.M.; Yezhelyev, M.V.; Simons, J.W.; Wang, M.D.; Nie, S.M. 2007. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry, *Nat. Protoc.* 2(5): 1152–1165.
61. Zhang, L.W.; Monteiro-Riviere, N.A. 2009. Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake, *Toxicological sciences* 110(1): 138–155.
62. Zhu, H.; Guo, Z.K.; Jiang, X.X.; Li, H.; Wang, X.Y.; Yao, H.Y.; Zhang, Y.; Mao, N. 2010. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone, *Nat Protoc.* 5(3): 550-560.
63. Zrazhevskiy, P.; Gao, X. 2009. Multifunctional quantum dots for personalized medicine, *Nano Today* 4(5): 414—428.