

VILNIAUS UNIVERSITETAS

VYTAUTAS KULVIETIS

KVANTINIŲ TAŠKŲ MIGRACIJOS ORGANIZME TYRIMAI OPTINIAIS
METODAIS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biofizika (02B)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2009 – 2013 metais Vilniaus universitete

Eksperimentiniai darbai atlikti Vilniaus universiteto Onkologijos institute

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B)

Sutartiniai žymėjimai

CdSe/ZnS-mPEG – CdSe šerdies, ZnS apvalkalo ir metoksi-polietilenglikolio dangalo kvantiniai taškai

CdTe-MPR – CdTe šerdies ir merkaptopriono rūgšties dangalo kvantiniai taškai

FL – fotoluminescencija

HE – hematoksilino ir eozino histocheminio dažymo metodas

HR – hialurono rūgštis

HS – hidrodinaminis skersmuo

KT – kvantiniai taškai

Lf – laktoferinas

LM – limfmazgis

mPEG – metoksi-polietilenglikolis

MPR – merkapropropioninė rūgštis

ND – nanodalelė

obj. – objektyvas

PAMAM – poli-amido aminos

PPS – padidinto pralaidumo ir sulaikymo efektas (angl. *enhanced permeability and retention, EPR*)

PRŠ – perjodinės rūgšties – Šifo histocheminio dažymo metodas

RES – retikuloendotelinė sistema

RGB – 3 kanalų (raudonos, žalios, mėlynos spalvų) detektorius

rRNR – ribosominė ribonukleino rūgštis

UV – ultravioletinė spinduliuotė

UVB – ultravioletinė B tipo spinduliuotė (280-320 nm sritis)

TURINYS

Sutartiniai žymėjimai	3
1. ĮVADAS	6
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai	9
1.2. Mokslinis naujumas ir aktualumas	10
1.3. Ginamieji teiginiai	11
1.4. Publikacijų sąrašas	12
1.5. Autoriaus indėlis	17
1.6. Padėka	18
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	19
2.1. Fizikocheminės kvantinių taškų (KT) savybės.....	19
2.1.1. Optinės KT savybės ir jų pritaikomumas	19
2.1.2. Tioliais dengtų KT stabilumas.....	23
2.2. Nanodalelių (ND) pasiskirstymas organizme.....	26
2.3. ND sąveika su kraujagyslių sienelėmis	33
2.3.1. Pasyvi ND pernaša per kraujagyslių sienelę.....	33
2.3.2. ND sąveika su endotelium ir aktyvi pernaša	35
2.3.3. ND taikymai pagrįsti kraujagyslės sienelės barjeru	39
2.4. ND šalinimas iš organizmo.....	43
2.5. ND prasiskverbimas per apsauginį odos barjerą	48
2.6. ND prasiskverbimas per placentos barjerą	53
2.6.1. Motinos – vaisiaus barjero fiziologinės savybės	53
2.6.2. ND prasiskverbimo per placentos barjerą tyrimai	58
3. MEDŽIAGOS IR METODAI	62
3.1. Medžiagos	62
3.2. Prietaisai.....	63
3.3. Eksperimentiniai gyvūnai	64
3.4. KT lokalizacijos kraujagyslėse tyrimai	64
3.5. Fluorescencinė spektroskopija.....	65
3.6. KT ir Rodamino B pasiskirstymo odoje tyrimai	65
3.7. Fluorescencinis gyvūnų vaizdinimas.....	66

3.8. KT ir Rodamino B prasiskverbimo per odą tyrimai	66
3.9. KT prasiskverbimo per placentos barjerą tyrimai	67
3.10. Audinių preparatų rengimas	67
3.11. Mikroskopija.....	68
3.12. KT stabilumo tyrimas	68
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	70
4.1. KT pasiskirstymas organizme po intraveninės injekcijos	70
4.2. KT prasiskverbimas per placentos barjerą.....	87
4.3. KT lokalizacija odoje ir migracija organizme	94
4.3.1. Po oda suleistų KT lokalizacija audiniuose	94
4.3.2. Po oda suleistų KT migracija organizme.....	101
4.4. KT ir rodamino B prasiskverbimas per odą.....	110
4.5. Ilgalaikis KT susikaupimas ir stabilumas audiniuose.....	116
4.5.1. CdTe-MPR KT susikaupimas ir stabilumas <i>in vivo</i>	116
4.5.2. CdSe/ZnS-mPEG susikaupimas ir stabilumas <i>in vivo</i>	117
5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS.....	124
6. IŠVADOS.....	128
7. Literatūros sąrašas.....	129

1. ĮVADAS

Nanotechnologijos vis plačiau taikomos maisto pramonėje, optoelektronikoje, buitinėje chemijoje, kosmetologijoje ir kitose žmogaus veiklos srityse. Nanodalelės (ND) diegiamos į naujai kuriamus medicinos diagnostikos ir gydymo metodus kaip kontrastinės medžiagos optiniame, magnetinio rezonanso, rentgeno ar daugiamodaliniame vaizdiniame. Taip pat naudojamos kaip biosensoriai, vaistų ar DNR nešikliai. ND pasižymi naujomis savybėmis, kurios nebūdingos tos pačios cheminės sudėties medžiagoms, kai jos yra mikrometrų eilės ar didesnių matmenų, pvz., pasireiškia superparamagnetizmas, superlaidumas, fotoluminescencija (FL) ir kt. Nanoskalėje ženkliai išauga dalelių paviršiaus ir tūrio santykis. Tai vienas esminių veiksnių nulemiančių išskirtinį ND dėmesį biomedicinos tyrimuose, nes jų susikaupimas audiniuose ir sukeliama biologinis poveikis visų pirma priklauso nuo jų paviršiaus sąveikos su organizmo molekulėmis – ląstelių receptoriais, fermentais, genetinė medžiaga ir kt.

Kvantiniai taškai (KT) yra puslaidininkinės ND, pasižyminčios išskirtinėmis fizikocheminėmis savybėmis, tokiomis kaip aukštas FL kvantinis našumas, fotostabilumas, nuo cheminės sudėties ir dydžio priklausomas FL spektras, plati sugerties juosta ir kt. KT paviršius gali būti modifikuojamas įvairiais ligandais, siekiant juos funkcionalizuoti ir pritaikyti specializuotiems biologiniams taikymams. Šios savybės sudaro sąlygas panaudoti KT neinvaziniam fluorescenciniam biologinių objektų vaizdinimui, pvz., piktybinių auglių diagnostikoje, angiogenezės ar kraujotakos sutrikimų tyrimuose. Prie KT paviršiaus prijungus vaisto molekules, galima sukurti daugiafunkčius nanodarinius, kurie vienu metu suteiktų vaizdinimo galimybę ir pasižymėtų terapinėmis savybėmis. KT gali būti panaudojami kaip neorganinės ND modelis tiriant kitų ND lokalizaciją organizme, nes jų pasiskirstymas labiausiai priklauso nuo jų geometrinių ir paviršinių savybių, o vidinės sandaros įtaka dažniausiai nereikšminga.

Yra parodyta, kad KT gali būti pritaikomi sveikų audinių ir navikų kraujotakos sistemos vaizdinimui (1, 2). Visgi KT lokalizacija kraujagyslių sienelėse, poveikis endotelio ląstelių gyvybingumui ir su tuo susijęs pašalinis KT poveikis nėra plačiai ištirtas. KT pernaša per kraujagyslių sienelę itin aktuali siekiant KT susikaupimo specifinėse organizmo vietose, pvz., galvos smegenyse ar navikuose, siekiant selektyviai vaizdinti šiuos audinius diagnostikos tikslais ar paveikti jų ląsteles ligų gydymui. Daugelio vaistų vartojimas nėštumo metu yra ribotas dėl galimo šalutinio poveikio embriogenezei. Todėl domimasi KT ir kitų ND medicininiu panaudojimu nėštumo metu tikintis, kad jos kaupsis motinos audiniuose, nepateks į embrioną ir nesutrikdys jo vystymosi. Tačiau kol kas KT prasiskverbimas per placentos barjerą ir jų patekimo į embrioną būdai nėra ištirti. Eksperimentinių gyvūnų tyrimuose yra parodyta, kad KT gali būti embriotoksiški, tačiau šio proceso mechanizmas nėra išaiškintas (3).

Kitas svarbus klausimas susijęs su saugiu KT taikymu biomedicinoje yra jų prasiskverbimas per apsauginius biologinius barjerus, pvz., odos, kvėpavimo takų, virškinamojo trakto ir kt. Yra parodyta, kad ant sveikos odos užtepti KT yra sulaikomi raginio epidermio sluoksnio ir į gilesnius audinius nepatenka (4). Visgi pažeidus paviršinius odos sluoksnius pastebėta, kad KT aptinkami ir dermoje. Konkretūs KT pernašos mechanizmai per epidermį nėra ištirti. Kol kas nėra išaiškinta, kokiuose audiniuose lokalizuojasi į odą patekę KT, kokiose ląstelėse jie kaupiasi, ar jie yra išnešiojami po visą organizmą ir kaip jie gali paveikti audinių funkcijas. Šie klausimai aktualūs tiek vertinant potencialiai žalingą KT poveikį, tiek ir optimizuojant biomedicininis taikymus, kurie susiję su KT įvedimu per odą ar į poodį.

Svarbu paminėti, kad ND kaupimosi, pasišalinimo ir poveikio organizmui tyrimai itin svarbūs toksikologiniu požiūriu. Šiuo metu didžiausi nanotaršos šaltiniai yra pramonė ir autotransportas. Tačiau nanoinžinerijos kuriamų komercinių produktų gamybos apimtys sparčiai auga. Todėl ND pagrįsti produktai tampa potencialiu taršos šaltiniu, kurio rizika žmogaus sveikatai bei aplinkosaugai nėra įvertinta.

Optimaliam KT taikymui biomedicinoje būtinos žinios apie jų pasišalinimą iš organizmo ir ilgalaikį stabilumą audiniuose. Yra parodyta, kad žiurkėms suleidus CdSeTe/ZnS KT, dengtų PEG, praėjus 4 mėnesiams >99% suleistos kadmio dozės išliko organizme (5). Tai rodo, kad KT per šį laikotarpį praktiškai nebuvo pašalinti iš organizmo. Kepenyse ir inkstuose buvo aptikta toksiškų kadmio junginių. Vadinasi, dalis KT suiro ir apnuodijo organizmą. Manoma, kad KT šalinimui iš kūno didžiausią įtaką turi jų paviršiaus padengimas bei dydis. Tačiau tikslios priežastys, lemiančios ilgalaikį KT susikaupimą ir lokalizaciją organuose, kol kas nėra nustatytos.

Aptartos problemos, susijusios su KT taikymu biomedicinoje, sukelia fundamentinių tyrimų poreikį, kurie suteiktų išsamių žinių apie KT prasiskverbimą per biologinius barjerus, jų farmakokinetiką, lokalizaciją audiniuose, ląstelėse bei jų kompartmentuose, KT stabilumą bei poveikį organizmo funkcijoms, ilgalaikį susikaupimą ir pasišalinimą iš organizmo.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Ištirti CdSe/ZnS-mPEG kvantinių taškų migracijos kelius eksperimentinių gyvūnų audiniuose naudojant fluorescencinės mikroskopijos ir spektroskopijos metodus.

Darbo uždaviniai:

- 1) Ištirti kvantinių taškų (KT) prasiskverbimą per kraujagyslių sienelės ir įvertinti jų kaupimąsi vidaus organuose.
- 2) Ištirti KT prasiskverbimą per žiurkės placentos barjerą ir įvertinti jų kaupimąsi embrionuose.
- 3) Ištirti po oda suleistų KT pasiskirstymą audiniuose.
- 4) Nustatyti pagrindinius KT migracijos kelius organizme įvedant juos skirtingais būdais.
- 5) Palyginti CdSe/ZnS-mPEG ir CdTe-MPR KT stabilumą žiurkės audiniuose ir įvertinti jų pritaikomumą fluorescenciniame vaizdinime *in vivo*.

1.2. Mokslinis naujumas ir aktualumas

Pirmą kartą iširtos odos barjerinės savybės KT prasiskverbimui bazaline – apikaline kryptimi ir įvertinta bazinės membranos reikšmė KT migracijai per epidermį ir kitas odos dalis: riebalų bei prakaito liaukas, plaukų folikulus. Šie rezultatai gali būti panaudoti aiškinant KT prasiskverbimo per odos barjero veikimo principus. Duomenys taip pat svarbūs, kuriant KT ir kitomis ND pagrįstus vaistų pernašos metodus, kurių optimalus taikymas reikalauja išsamių žinių apie jų pasiskirstymą audiniuose, gebėjimą pasiekti bei paveikti tikslinius taikinius odoje.

Pirmą kartą parodyta, kad KT difuzija jungiamuosiuose audiniuose priklauso nuo ekstraląstelinių darinių struktūros: KT laisvai migruoja puriuosiuose jungiamuosiuose audiniuose (dermoje, epineuriume, epimyziame, adventicijoje ir kt.), tačiau neprasiskverbia per audinių struktūras, sudarytas iš tankių skaidulinių sluoksnių (bazinę membraną, perineuriumą).

Pirmą kartą parodyta, kad CdSe/ZnS-mPEG KT neįsiskverbia į sveikų kraujagyslių raumeninį kraujagyslių sluoksnį (*tunica media*) tiek iš kraujagyslės vidaus, tiek iš jos išorės. Šie rezultatai naudingi aiškinantis KT pernašos per kraujagyslių sienelės mechanizmus. Tai sudaro sąlygas taikyti KT ir kitas ND selektyviam kraujagyslių pažeidimų, kurioms būdingas sienelių struktūrinio vientisumo pažeidimas (pvz., aterosklerozės židinių), vaizdinimui, diagnostikai ir gydymui.

Pirmą kartą parodyta, kad CdSe/ZnS-mPEG KT yra sulaikomi placentos barjero ir nepatenka į embrionus. Šis faktas svarbus nagrinėjant KT embriotoksiškumo ir teratogeniškumo mechanizmus. Rezultatai taip pat naudingi vertinant KT bei kitų ND patekimo į organizmą riziką nėštumo metu. KT neprasiskverbimas per placentos barjerą aktualus jų taikymams tikslinėje vaistų pernašoje siekiant sukurti tokius junginius, kurie veiktų tik motinos organizmą, bet nepatektų į embrioną ir nepaveiktų jo vystymosi.

Pirmą kartą palygintas nefunkcionalizuotų CdSe/ZnS-mPEG KT kaupimasis skirtingose ląstelėse *in vivo* sąlygomis. Šie rezultatai aktualūs aiškinantis KT kaupimosi audiniuose ir jų biologinio poveikio mechanizmus.

1.3. Ginamieji teiginiai

- 1) Kraujagyslės viduje lokalizuoti KT sąveikauja su endotelium (tunica intima), tačiau pro jį neprasiskverbia ir nepatenka į vidurinę kraujagyslės sienelės sluoksnį (tunica media).
- 2) Kraujagyslių išorėje esantys KT kaupiasi išoriniame sienelės sluoksnyje (tunica adventitia), tačiau nepatenka giliau į vidurinę kraujagyslės sienelės sluoksnį (tunica media).
- 3) KT lokalizuojasi daugumos organų kraujagyslėse, tačiau į jų tarpląstelinę terpę nepatenka. KT ekstravazacija į tarpląstelinę terpę gali vykti per sinusinius kapiliarus.
- 4) KT kaupiasi nėščių žiurkių placentoje, tačiau yra sulaikomi placentos barjero ir nepatenka į embrionų audinius.
- 5) KT difuziją jungiamuosiuose audiniuose apsprendžia ekstraląstelių skaidulų organizacija: KT laisvai migruoja puriuosiuose jungiamuosiuose audiniuose (dermoje, epineuriume, epimyziame, adventicijoje ir kt.), tačiau neprasiskverbia per tankius skaidulinius sluoksnius (bazinės membranas, perineuriumą) ir nepatenka į epidermį, plaukų folikulus, odos liaukas, nervų vidų ir raumenų skaidulas.
- 6) Į jungiamuosius audinius patekę CdSe/ZnS-mPEG KT rezorbuojasi į limfos kapiliarus, migruoja limfine sistema ir su limfa įsilieja į kraujotaką.
- 7) Ant odos užtepti CdSe/ZnS-mPEG KT neprasiskverbia per sveiką ir UVB spinduliuotės pažeistą epidermio barjerą.
- 8) CdSe/ZnS-mPEG KT pasižymi stabilesnėmis optinėmis savybėmis efektyvesne migracija audiniuose ir mažesniu toksiškumu negu CdTe-MPR KT.

1.4. Publikacijų sąrašas

1. Publikacijos, įrašytos į *Thomson Reuters Web of Science* duomenų bazę:

1. Kulvietis V, Zurauskas E, Rotomskis R. Distribution of polyethylene glycol coated quantum dots in mice skin. *Experimental Dermatology* 2013, 22(2):157-159.
2. Žalgevičienė V, Kulvietis V, Bulotienė D, Didžiapetrienė J, Rotomskis R. The effects of nanoparticles during critical periods of pregnancy in rats. *Medicina (Kaunas)* 2012, 48(5): 256-264.
3. Kulvietis V, Zalgevičienė V, Didžiapetrienė J, Rotomskis R. Transport of Nanoparticles through the Placental Barrier. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2011;225(4): 225-234.
4. Kulvietis V, Streckytė G, Rotomskis R. Spectroscopic investigations of CdTe quantum dot stability in different aqueous media. *Lithuanian Journal of Physics* 2011, 51(2): 163–171.
5. Jazdauskaitė E, Kulvietis V, Rotomskis R. Combined risk effects of quantum dot nanoparticles exposure and ultraviolet radiation to skin. *Proceedings of the 10th international conference on medical physics „Medical Physics in the Baltic States“*; 2012 lapkričio 8-10; Kaunas, Lietuva. *Technologija*, 2012, p. 67-71.
6. Kulvietis V, Rotomskis R. Accumulation of quantum dots in Ehrlich ascites tumour in mice. *Proceedings of the 8th international conference on medical physics „Medical Physics in the Baltic States“*; 2010 spalio 14-16; Kaunas, Lietuva. *Technologija*, 2010, p. 50-53.
7. Kišonas J, Kulvietis V. Spectroscopic study of quantum dots distribution *in vivo*. *Proceedings of the 8th international conference on medical physics „Medical Physics in the Baltic States“*; 2010 spalio 14-16; Kaunas, Lietuva. *Technologija*, 2010, p. 54-58.

2. Publikacijos kituose recenzuojamuose leidiniuose:

1. Kulvietis V, Žalgevičienė V, Didžiapetrienė J, Bulotienė D, Rotomskis R. Distribution of nanoparticles in the pregnant rat: the morphologic and spectroscopic study. *Papers on Anthropology* 2011, 20: 218-228.
2. Kulvietis V, Žurauskas E, Ričardas R. Investigation of quantum dots distribution pathways in mice. *Proceedings of the 4th European conference for clinical nanomedicine*; 2011 gegužės 23-25; Bazelis, Šveicarija, 2011, p. 125.
3. Karabanovas V, Kulvietis V, Rotomskis R, Valius M. The pathway of carboxyl-coated quantum dots accumulation in the embryonic fibroblast NIH3T3 cells. *Proceedings of the 4th European conference for clinical nanomedicine*; 2011 gegužės 23-25; Bazelis, Šveicarija, 2011, p. 119.
4. Kulvietis V, Karabanovas V, Rotomskis R, Valius M. Investigation of quantum dots cellular uptake and distribution *in vitro* and *in vivo*. *3rd European conference for clinical nanomedicine. Conference proceedings*; 2010 gegužės 10-12; Bazelis, Šveicarija, 2010, p. 85-86.

3. Dalyvavimas tarptautinėse ir šalies konferencijose:

1. Kulvietis V, Zalgevičienė V, Bulotienė D, Rotomskis R. Penetration through the placental barrier and embryotoxicity of semiconductor nanoparticles. *European society for photobiology 2013 congress*; 2-6 September; Liege, Belgium. *Abstract Book*, p.111-2
2. Jazdauskaitė E, Kulvietis V, Rotomskis R. Photostability of quantum dots and its implication in biosafety of nanomaterials. *Open Readings 2013 March 20-23, Vilnius. Abstract book* p. 45.
3. Jazdauskaitė E, Kulvietis V, Rotomskis R. Nanodalelių prasiskverbimo per apsauginį odos barjerą spektroskopiniai tyrimai. 40-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija; 2013 birželio 10-12; Vilnius Lietuva. *Vilniaus universitetas*, p.119.
4. Niciūtė I, Kulvietis V, Rotomskis R. Kvantinių taškų ir infraraudonojo dažo pasiskirstymo eksperimentiniuose gyvūnuose tyrimas

- fluorescenciniais metodais. 40-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija; 2013 birželio 10-12; Vilnius Lietuva. Vilniaus universitetas, p.136.
5. Jazdauskaitė E, Kulvietis V, Rotomskis R. Combined risk effects of quantum dot nanoparticles exposure and ultraviolet radiation to skin. Medical Physics in the Baltic States: Proceedings of the 10th international conference on medical physics; 2012 lapkričio 8-10; Kaunas, Lietuva. Technologija, 2012, p. 67-71.
 6. Kulvietis V, Karabanovas V, Jagminas A, Rotomskis R. Application of magnetic nanoparticles in cancer imaging and therapy. Modern radiation oncology: economical aspects and innovations in the treatment. 2012 September 14-15, Palanga.
 7. Kulvietis V, Kišonas J, Rotomskis R. Quantum dot migration in the lymphatic system of mouse after subcutaneous injection. Nanomedicine: Visions, risks, potential. 2012 balandžio 19-20; Berlynas, Vokietija, p. 27.
 8. Bajerčius H, Kulvietis V. Kvantinių taškų stabilumo vandens ir kraujo tirpaluose tyrimai. VU MF Studentų mokslinės draugijos LXIV konferencija. P. 222-3.
 9. Kulvietis V, Rotomskis R. Fluorescencinis odos vaizdinimas naudojant kvantinius taškus. 39-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija; 2011 spalio 6-8; Vilnius Lietuva. Vilniaus universitetas, p. 161.
 10. Kulvietis V, Žalgevičienė V, Didžiapetrienė J, Bulotienė D, Rotomskis R. Distribution of nanoparticles in the pregnant rat: the morphologic and spectroscopic study. Baltic Morphology VI. Abstracts of presentations; 2011 rugsėjo 22-23; Tartu, Estija, p. 36.
 11. Kulvietis V, Žurauskas E, Ričardas R. Investigation of quantum dots distribution pathways in mice. 4th European conference for clinical nanomedicine. Conference proceedings; 2011 gegužės 23-25; Bazelis, Šveicarija, 2011, p. 125.

12. Karabanovas V, Kulvietis V, Rotomskis R, Valius M. The pathway of carboxyl-coated quantum dots accumulation in the embryonic fibroblast NIH3T3 cells. 4th European conference for clinical nanomedicine. Conference proceedings; 2011 gegužės 23-25; Bazelis, Šveicarija, 2011, p. 119.
13. Kulvietis V, Rotomskis R. Accumulation of quantum dots in Ehrlich ascites tumour in mice. Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 8th international conference on medical physics; 2010 spalio 14-16; Kaunas, Lietuva. Technologija, 2010, p. 50-53.
14. Kišonas J, Kulvietis V. Spectroscopic study of quantum dots distribution *in vivo*. Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 8th international conference on medical physics; 2010 spalio 14-16; Kaunas, Lietuva. Technologija, 2010, p. 54-58.
15. Kulvietis V, Rotomskis R. Distribution of quantum dots in Ehrlich ascites tumour. 5th Baltic congress of oncology; 2010 gegužės 14-15; Ryga, Latvija, p. 74-75.
16. Kišonas J, Kulvietis V, Žalgevičienė V, Rotomskis R. Spectroscopic investigations of quantum dots biodistribution after subcutaneous injection in mouse model. 5th Baltic sea region conference in medical sciences; 2010 gegužės 14-16; Vilnius, Lietuva, p. 214-215.
17. Kulvietis V, Karabanovas V, Rotomskis R, Valius M. Investigation of quantum dots cellular uptake and distribution *in vitro* and *in vivo*. 3rd European conference for clinical nanomedicine. Conference proceedings; 2010 gegužės 10-12; Bazelis, Šveicarija, 2010, p. 85-86.
18. Kišonas J, Kulvietis V, Žalgevičienė V, Rotomskis R. Po oda suleistų kvantinių taškų pasiskirstymo pelės organizme tyrimas panaudojant spektroskopinės analizės metodą. 62-oji Vilniaus universiteto medicinos fakulteto studentų mokslinės draugijos konferencija; 2010 balandžio 26 – gegužės 3; Vilnius, Lietuva.
19. Kulvietis V, Janutytė I, Streckytė G, Bagdonas S, Rotomskis R. Vandenyje tirpių CdTe kvantinių taškų stabilumo spektroskopiniai

tyrimai. 38-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija; 2009 birželio 8-10; Vilnius Lietuva. Vilniaus universitetas, 2009, p.152

4. Publikacijos, nesusijusios su doktorantūros veikla:

1. Kulvietis V, Janutytė I, Bagdonas S, Karabanovas V, Rotomskis R. Effect of medium pH on stability of quantum dots: spectroscopic study and biological implications. Proceedings of the 6th international conference on medical physics „Medical Physics in the Baltic States“; 2008 spalio 10-11; Kaunas, Lietuva. Technologija, 2008, p.15-18
2. Kulvietis V, Zakarevičius E, Lapienis J, Gražalienė G, Žalgevičienė V, Rotomskis R. Accumulation of exogenous sensitizers in rat brain. Acta Medica Lituanica 2007; 14(3): 219-24.
3. Kulvietis V, Zakarevicius E, Rotomskis R Lapienis J, Graželiene G. Comparison of Photogem and AlPcS₄ accumulation in healthy rat brain. Proceedings of the 5th international conference on medical physics „Medical Physics in the Baltic States“; 2007 spalio 5-6; Kaunas, Lietuva. Technologija, 2007, p.19-23.

1.5. Autoriaus indėlis

Eksperimentai atlikti Vilniaus universiteto onkologijos institute, Biomedicininės fizikos laboratorijoje vadovaujant prof. habil. dr. Ričardui Rotomskiui. Darbo vadovas planavo tyrimus, suformulavo darbo užduotis, konsultavo metodiniais bei rezultatų interpretavimo klausimais, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir medžiagą pristatymui konferencijose.

Pagrindiniai publikacijų bendra autoriai yra prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis, prof. dr. Giedrė Streckytė, doc. dr. Violeta Žalgevičienė, dr. Edvardas Žurauskas, prof. dr. Janina Didžiapetrienė ir Danutė Bulotienė.

Vyresnioji specialistė Danutė Bulotienė vykdė visas procedūras su gyvais eksperimentiniais gyvūnais ir konsultavo metodiniais klausimais.

Doc. dr. Violeta Žalgevičienė konsultavo atliekant KT prasiskverbimo per placentą tyrimus ir padėjo interpretuojant nėščių žiurkių histologinių preparatų mikroskopijos vaizdus. Gydytojas-patologas dr. Edvardas Žurauskas konsultavo interpretuojant kitų histologinių preparatų mikroskopijos vaizdus.

Valstybinio patologijos centro laboratorijos personalas atliko fiksuotų bandinių preparavimą ir dažymą.

Studentė Edita Jazdauskaitė dalyvavo atliekant fluoroforų prasiskverbimo per odos barjerą eksperimentus. Studentas Juras Kišonas dalyvavo atliekant po oda suleistų KT migracijos organizme tyrimus. Studentai pristatė rezultatus studentų ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Autorius planavo tyrimus, atliko fluorescencinės spektroskopijos, mikroskopijos ir fluorescencinio gyvūnų vaizdinimo eksperimentus, apdorojo ir interpretavo gautus rezultatus, juos pristatė mokslinėse konferencijose ir rengė publikacijas.

1.6. Padėka

Pirmiausiai noriu padėkoti savo mokslinio darbo vadovui prof. habil. dr. Ričardui Rotomskiui už vertingas diskusijas, įgytas žinias, mokslinį entuziazmą bei galimybę dirbti su šiuolaikine įranga profesionalų komandoje.

Dėkoju straipsnių bendraautoriams prof. dr. Giedrei Streckytei, doc. dr. Violetai Žalgevičienei, dr. Edvardui Žurauskui, prof. dr. Janinai Didžiapetrienei už jų profesionalumą, turingas diskusijas ir įgytą patirtį. Taip pat esu dėkingas doc. dr. Sauliui Bagdonui už tikslias pastabas ir išvalgas.

Ypatingą ačiū tariau Danutei Bulotienei už visapusišką pagalbą atliekant eksperimentus su gyvūnais ir sprendžiant kitas darbo problemas.

Dėkoju visiems studentams už pagalbą atliekant eksperimentus ir pedagoginę patirtį.

Dėkoju VU Fizikos fakulteto Kvantinės elektronikos katedros ir VU Gamtos mokslų fakulteto Neurobiologijos ir biofizikos katedros kolektyvams už vertingas pastabas ir geranorišką bendradarbiavimą organizaciniais klausimais. Taip pat dėkoju Vilniaus universiteto onkologijos institutui už palankias darbo sąlygas ir Lietuvos mokslo tarybai už papildomą doktorantūros studijų finansavimą.

Dėkoju visam VUOI Biomedicininės fizikos laboratorijos kolektyvui už tarpusavio supratimą, geranoriškumą, įdomias diskusijas, nuotaikingą ir šiltą atmosferą. Džiaugiuosi, kad dirbu šioje laboratorijoje.

Dėkoju visiems už progą Jus pažinti ir patirti bendravimo malonumą.

Tariau nuoširdų ačiū savo Šeimai, visiems artimiesiems bei draugams už nuolatinį palaikymą, supratingumą ir kantrybę.

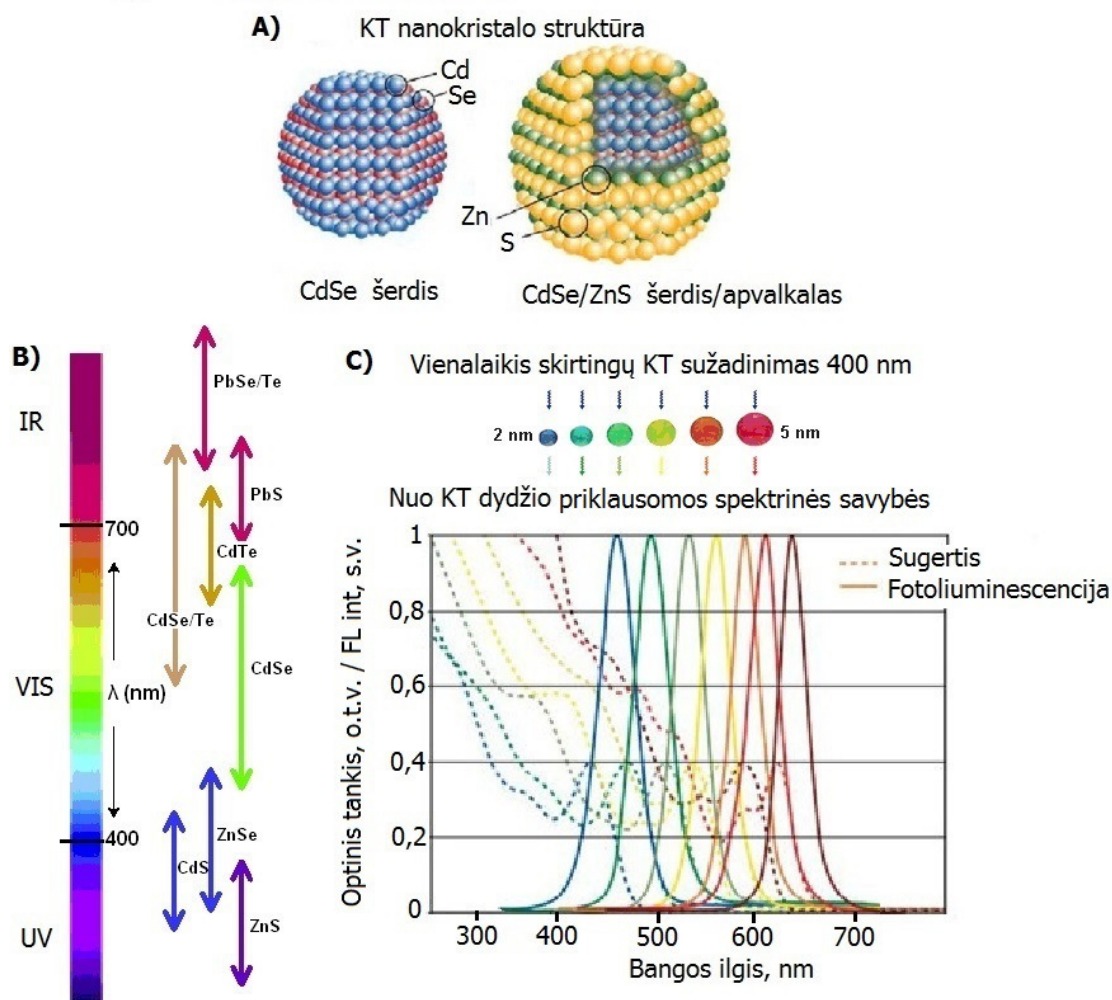
2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Fizikocheminės kvantinių taškų (KT) savybės

2.1.1. Optinės KT savybės ir jų pritaikomumas

Kvantiniai taškai (KT) yra nanometrų (10^{-9} m) eilės matmenų puslaidininkiniai kristalai, dėl savo mažo dydžio (1-10 nm) pasižymintys išskirtinėmis fizikocheminėmis savybėmis. Jų šerdį dažniausiai sudaro II-VI (pvz., CdSe), III-V (pvz., InGaP) ar IV-VI (pvz., PbS) periodinės elementų lentelės grupių atomai. Šerdis dažniausiai yra padengta plonu kitos cheminės sudėties sluoksniu, kuris stabilizuoja šerdies struktūrą, apsaugo ją nuo oksidacijos ir nuodingų elementų (pvz., Cd^{2+}) išsiliejimo į aplinką (pav. 2.1 A). Apvalkalas (pvz., ZnS) taip pat padidina KT fotoluminescencijos (FL) kvantinį našumą dešimtimis kartų (6).

Dėl savo mažo dydžio KT įgija specifinių optinių ir elektrinių savybių, kurios nebūdingos tos pačios cheminės sudėties makrokristalams. Viena svarbiausių KT savybių yra siauras FL spektras (pusplotis 25-45 nm) ir pagrindinės smailės padėties jautrumas cheminei šerdies sudėčiai, paviršiaus geometrijai bei KT dydžiui (pav. 2.1 B, C) (7, 8).



Pav. 2.1. KT dalelės struktūra (A) ir fotoluminescencijos juostos priklausomybė nuo KT šerdies cheminės sudėties (B) bei skersmens (C). Adaptuota pagal (9, 10).

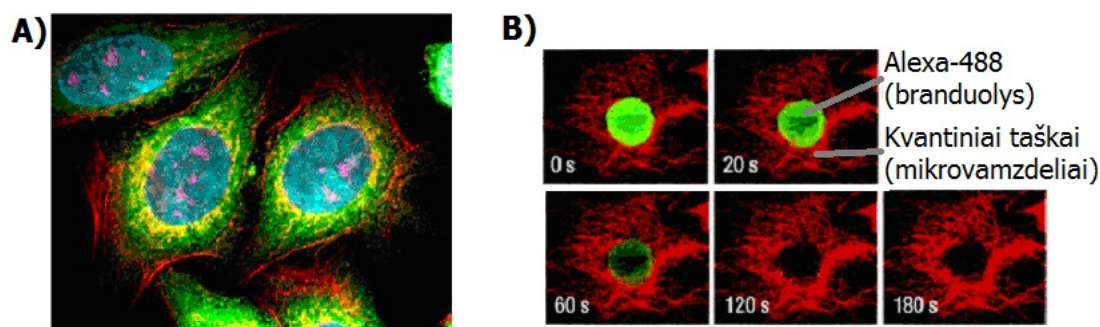
Mikroskalės ar didesnių puslaidininkinių kristalų elektronų energinių lygmenų spektras yra labai platus ir energiniai skirtumai tarp jų yra pakankamai maži, todėl jų energiniai lygmenys laikomi ištisiniais. Puslaidininkio elektronai yra sužadinami į laidumo juostą, jiems sugėrus šviesos kvantą, kurio energija yra didesnė už elektrono lygmenų energijos skirtumą valentinėje ir laidumo juostose. Elektronui peršokus į laidumo juostą, jo vietoje lieka skylė ir tokiu būdu susiformuoja elektrono – skylės pora, dar vadinama eksitonu, o atstumas tarp jų vadinamas eksitono Boro spinduliu - R_B . Jis yra specifinis kiekvienai medžiagai. Kai kristalo matmenys yra daug didesni už R_B , eksitonai gali laisvai judėti puslaidininkyje. Tačiau kai KT

matmenys yra mažesni už eksitono Boro spindulį $R_{KT} \leq R_B$, eksitonas yra apribotas ir negali laisvai judėti kristale. Tai vadinama kvantiniu apribojimu ir KT energetiniai lygmenys tampa diskretūs (8, 11). Elektronui grįžtant į valentinę juostą, prarandama energija yra per didelė, kad būtų relaksuota bespinduliniu būdu, todėl ji išspinduliuojama fotono pavidalu. Mažėjant KT skersmeniui, didėja skirtumas tarp energinių lygmenų, pvz., CdSe šis skirtumas padidėja nuo 1,7 eV ($d=20$ nm) iki 2,4 eV ($d=2$ nm). Todėl tos pačios cheminės sudėties mažesni KT fotoluminescuoja trumpesnio bangos ilgio šviesą ir stebimas FL juostos poslinkis (pav. 2.1 C). Mažinant puslaidininkio kristalą didėja ir FL gyvavimo trukmė (6-8).

Kristalo paviršiaus defektai, atsirandantys KT sintezės metu, gali laikinai „įkalinti“ krūvininkus ir trukdyti sugertos energijos spinduliavimui. Periodinis krūvininkų „įkalinimas“ ir „išlaisvinimas“ pasireiškia pavienių KT FL pertraukimais, vadinamais mirksėjimais (angl. *quantum dot blinking*). Šis reiškinys mažina FL kvantinį našumą. Siekiant sumažinti paviršinių defektų kiekį bei apsaugoti KT paviršių nuo oksidacijos ir kitų cheminių reakcijų, jie yra padengiami kito kristalo kelių atomų storio apvalkalu. Nustatyta, kad toks padengimas padidina KT FL kvantinį našumą net iki 90%, o tokios struktūros fotostabilumas yra keliomis eilėmis aukštesnis nei įprastinių organinių fluoroforų (6).

Viena patraukliausių KT savybių yra siaura, simetriška FL juosta, kurios smailės padėtis gali būti nesudėtingai moduluojama keičiant dydį ($\lambda_{fl}=400\div 1350$ nm) (7). Sąlyginai nebrangi ir greita KT sintezė leidžia pagaminti daleles, kurių FL spektrų juostos yra arti viena kitos, tačiau nepersidengia. KT būdingas platus žadinimo spektras ir didelis Stokso poslinkis: jų žadinimo ir FL spektrų smailės gali būti nutolę iki 300 nm (12). Tokiu būdu naudojant vieną žadinimo šaltinį, galima stebėti kelių tipų KT FL (skirtingų spalvų) ir tai galima sėkmingai panaudoti daugiaspalviui biologinių objektų vaizdinimui (pav. 2.2 A). Šia savybe nepasižymi įprastiniai organiniai fluoroforai, sugeriantys siauros srities spinduliuotę. Be to jų FL spektrai yra išplitę ir dažnai persidengia su kitais dažikliais ar su biologinių objektų savitąja

fluorescencija, kurią eliminuoti dažnai būna sudėtinga (12). KT yra dešimtis ar net šimtus kartų fotostabilesni už daugumą naudojamų organinių fluoroforų (pav. 2.2 B). Ši savybė yra labai svarbi ilgalaikiam vaizdinimui, pvz., dinaminuose tyrimuose ar konfokalinės mikroskopijos trimačių vaizdų rekonstrukcijoje (13).



Pav. 2.2. A) Daugiaspalvis fiksuotų žmogaus epitelio ląstelių vaizdinimas naudojant KT, kurie modifikuoti atitinkamais antikūnais, kad selektyviai sąveikautų su ląstelės komponentais. Žydra spalva pažymėtas branduolys, rožine - rRNR sintezės baltymas Ki67, oranžine - mitochondrijos, žalia - mikrovamzdeliai, raudona – aktinas (14). B) KT fotostabilumas fluorescencinės mikroskopijos vaizdinimo metu: pelės fibroblasto 3T3 mikrovamzdeliai nudažyti KT (raudonai), o branduolys *Alexa 488* (žaliai), žadinimui naudota 100W gyvsidabrio lempa, $\lambda_{\text{žad}}=485\pm 20$ nm (13).

KT patrauklūs mikroskopijos taikymuose dėl didelio sugerties molinės ekstinkcijos koeficiento $\epsilon= 0,5\text{-}2\cdot 10^6$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ir aukšto FL kvantinio našumo $\Phi_{\text{fl}}=30\text{-}90\%$ (12, 15, 16). Dar viena KT optinė savybė, išskirianti šias ND iš gausios fluoroforų įvairovės yra ilga FL gyvavimo trukmė, kuri siekia 20-50 ns ar dar daugiau. Tuo tarpu daugumos egzogeninių fluoroforų bei savitąją biologinių objektų fluorescenciją sukeliančių junginių fluorescencija trunka 2-5 ns. Šia KT savybe remiasi fluorescencijos gyvavimo trukmės mikroskopija (angl. *time-gated fluorescence lifetime imaging microscopy*): sužadinus mėginį, FL registruojama ne tuo pat metu, o po tam tikro užlaikymo, kai foninis mėginio švytėjimas jau yra užgesęs ir į detektorius patenka tik KT FL. Tokie vaizdai pasižymi aukštesne skiriamąja geba bei kontrastingumu.

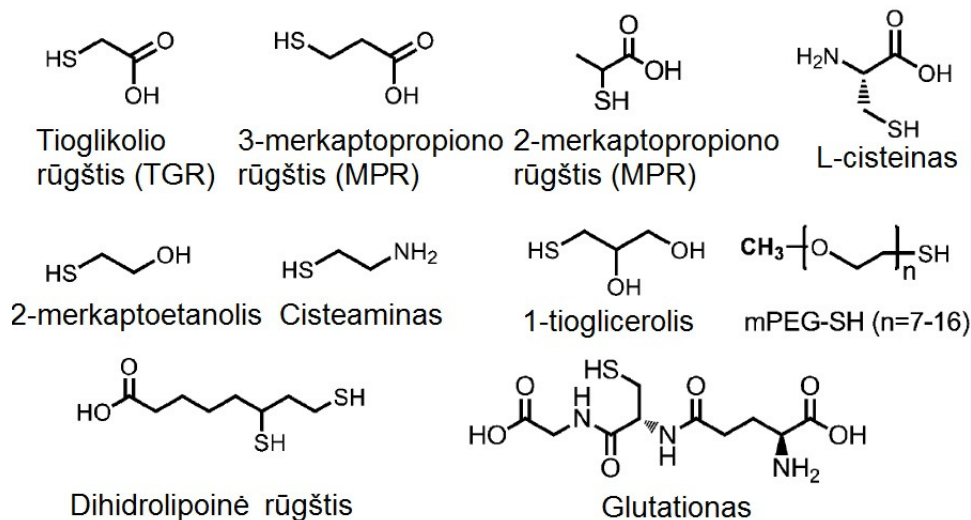
Dėl stiprios KT sugerties ir moduluojamos FL smailės padėties domimasi jų panaudojimu fluorescencijos rezonansinėje energijos pernašoje - FRET (angl. *fluorescence resonance emission transfer*). KT taikymą riboja tai, kad jų sintezė yra daugiapakopė ir pagamintų KT dydis bei paviršiaus geometrija varijuoja. Šiuos pokyčius atspindi fotofizikinės KT savybės, kurių variacijoms labai jautrus FRET metodas (7). Pavienių molekulių spektroskopijoje pasireiškia KT mirksėjimo efektas, trukdantis pavienių molekulių dinamikos tyrimams. Šiuo efektu kartais pasinaudojama KT padengimo procese, kai norima įsitikinti, jog dalelės yra pavienės, o ne sankaupose (16).

KT FL detekcijai ląstelėse bei kitose biosistemose naudojama įprastinė bei konfokalinė fluorescencinė mikroskopija, dvifotonio žadinimo mikroskopija, elektroninė mikroskopija, fluorescencijos gyvavimo trukmės mikroskopija, vidinio atspindžio, fluorescencinė ar masės spektroskopija. Prijungus radioaktyvų žymeklį (pvz., ^{64}Cu), KT migraciją galima sekti ir pozitronų emisijos ar kompiuterinės tomografijos metodais (7).

2.1.2. Tioliais dengtų KT stabilumas

Dažniausiai KT yra sudaryti iš neorganinio kristalo ir organinio ligando sluoksnio. Šio komplekso stabilumas visų pirma priklauso nuo jungčių tarp ligando ir nanokristalo paviršiaus atomų stiprumo. Vieni iš dažniausiai naudojamų organinių junginių KT padengimui biomedicininiais tikslais yra tioliai, nes jie gerai tirpūs vandenyje, formuoja stiprų ryšį su metalais, keičiant šonines grupes galima gauti norimų savybių dangalą ir jie yra sąlyginai pigūs (17). Šiems junginiams būdinga tiolio (-SH) grupė, alifatinė anglies grandinė ir išorinė funkcinė grupė, kuri eksponuojama į KT išorę. Pav. 2.3 pateiktos dažniausiai naudojamų tiolių struktūrinės formulės. Yra parodyta, kad tiolio grupė jungiasi su nanokristalo metalo atomais kovalentiniu ryšiu, tuo tarpu išorinė polinė grupė (dažniausiai karboksilo, amino, hidroksilo ar kt.) suteikia tirpumą vandenyje (17, 18). Išorinės grupės sąveika su nanokristalu yra ženkliai silpnesnė ir gali veikti kaip antrinis koordinatorius su nanokristalo

paviršiumi. Šios grupės suteikia galimybę prijungti biologiškai aktyvias molekules prie KT, t.y. juos funkcionalizuoti ir kurti specializuotas ND.



Pav 2.3. Dažniausiai KT padengimui naudojami tioliai ir jų struktūrinės formulės (18).

Padengus nanokristalą organiniu sluoksniu laikoma, kad jis formuoja ištisinį apvaskalą ir izoliuoja kristalą nuo aplinkos poveikio. Tokia prielaida leidžia tikėtis, kad KT optinės savybės turėtų išlikti stabilios pakitus tirpalo cheminiai sudėčiai. Visgi yra parodyta, kad tioliais dengtų KT spektroskopinės savybės yra jautrios pH, druskų jonų koncentracijai, temperatūrai bei kitiems veiksniams (19, 20). Tai rodo, kad tam tikromis sąlygomis tokia ND gali būti nestabili ir paviršinio dangalo, o vėliau ir nanokristalo, suirimas sąlygoti toksiškų junginių susidarymą ir išsiskyrimą į biologinę terpę. Yra parodyta, kad CdSe/ZnS KT patekę į žiurkės skrandį degradooja ir susidaro toksiški Cd²⁺ jonai, kurie apnuodija organizmą (21). KT stabilumas yra itin svarbus biologiniams taikymams dėl jų prasto šalinimo iš organizmo ir ilgalaikio susikaupimo. Pavyzdžiui, KT buvo aptikti eksperimentinėse pelėse praėjus 2 metams po injekcijos ir jų FL spektrui buvo būdingas trumpabangis poslinkis, kuris siejamas su nanokristalo šerdies suirimu (22). Todėl KT cheminis stabilumas yra viena svarbiausių sąlygų norint juos pritaikyti gyvų organizmų tyrimuose bei medicininėje praktikoje.

KT FL savybės itin jautrios rūgštinei terpei. Esant žemam pH KT FL intensyvumas gali sumažėti 80% ir šis kritimas vyksta ženkliai greičiau nei stipriai šarminėje terpėje (20). KT FL intensyvumo kritimas siejamas su ligandų desorbcija ir KT paviršiaus oksidacija (19, 23). Rūgštinėje terpėje taip pat gali pasireikšti ilgabangis KT FL juostos poslinkis. Pavyzdžiui, cisteinu dengtų CdTe šerdies KT FL juosta pasislenka nuo 551 nm esant pH=7,6 iki 571 nm, kai pH=6,6 (24). Šie pokyčiai siejami su paviršinių ligandų struktūriniu persitvarkymu arba su jų desorbcija ir dalelių agregacija (17, 19). Tai rodo, kad KT spektroskopinės savybės priklauso ne tik nuo nanokristalo savybių bet ir nuo jo sąveikos su stabilizuojančiu ligandu. KT FL savybių priklausomybė nuo terpės rūgštingumo gali būti panaudota kuriant pH sensorius, kurie leistų tirti ląstelių viduje vykstančius procesus (24, 25).

Tiriant CdTe KT, dengtų merkaptosukcinato rūgštimi, FL gesinimo savybes (veikiant benzokvinonu), nustatyta, kad tirpalo rūgštingumas veikia ne tik KT FL intensyvumą, bet keičia ir FL gesinimo mechanizmą. Neutraliomis sąlygomis pasireiškia dinaminis gesinimas, rūgštinėje terpėje pasireiškia statinis bei dinaminis FL gesinimas, o šarminėje terpėje pasireiškia statinis gesinimas, kuris priklauso nuo gesiklio prisijungimo prie KT vietų skaičiaus. Šie skirtumai grindžiami tuo, jog šiose aplinkose keičiasi paviršinių ligandų protonizacija ir tuo pačiu KT paviršiaus savybės. Esant žemam pH, tiolio grupės protonizuojamos ir atsikabina nuo nanokristalo. Todėl padaugėja paviršinių defektų, mažėja FL intensyvumas, KT labiau sąveikauja su gesiklio molekulėms, t.y. tampa jautresni jų koncentracijai (25).

Taip pat parodyta, kad merkaptopropionine rūgštimi (MPR) stabilizuotus CdSe/ZnO KT veikiant šviesa, dengiamieji ligandai gali hidrolizuotis, o tiolio grupės sieros atomai sąveikaudami su nanokristalu suformuoti papildomą heterogeninį kiautą, kuris sąlygoja ilgabangį KT FL juostos poslinkį (26). MPR ligandų destrukcija mažina KT tirpumą ir sąlygoja jų sedimentaciją, tuo tarpu sieros kiautas šį procesą lėtina ir padidina ND stabilumą. Visgi kitų autorių duomenimis, fotooksidacija ir paviršinių ligandų netekimas mažina KT FL intensyvumą ir mažina jų stabilumą (27). Taigi

šviesa yra svarbus veiksnys veikiantis KT stabilumą, tačiau skirtingų autorių rezultatai yra priešaringi ir turėtų būti aptariami kitų aplinkinės terpės, KT sudėties bei apšvietimo parametrų kontekste.

KT dydis taip pat yra svarbus veiksnys, nuo kurio priklauso KT stabilumas. Parodyta, kad didesnės dalelės yra labiau stabilios ir mažiau jautrios pH pokyčiams bei apšvietimui. Tai siejama su tuo, jog mažesni KT pasižymi didesniu paviršiaus ir ploto santykiu, dėl kurio KT labiau reaguoja į paviršiuje vykstančius procesus (27).

Organinio dangalo bei viso KT stabilumas priklauso nuo pasyvuojančių molekulių grandinės ilgio, jos šakotumo bei poliškumo. Ilgesnė alifatinė grandinė didina gretimų molekulių ryšį dėl stipresnės hidrofobinės sąveikos. Tai stabilizuoja organinį dangalą, o tirpiklio molekulėms sunkiau prasiskverbti iki KT šerdies bei paveikti jos energinius lygmenis. Didelę įtaką turi ir ligandų tankis ant nanokristalo ir padengimo kokybė.

Minėtų veiksnių įtaką KT FL savybėms dažniausiai tiriama izoliuotose abiotinėse sistemose, t.y. tirpaluose. Tuo tarpu biologinėje sistemoje KT yra veikiami didelės įvairovės biomolekulių. Jiems judant organizme, jie pereina skirtingus biologinius kompartmentus, kurie skiriasi sudėtimi, pvz., pH, druskingumu, hidrofilišku, fermentų poveikiu ir kt. Todėl prognozuoti, kas vyksta su KT organizme, yra itin problematiška. Tai sąlygoja aukštą KT stabilumo biologinėse terpėse tyrimų poreikį.

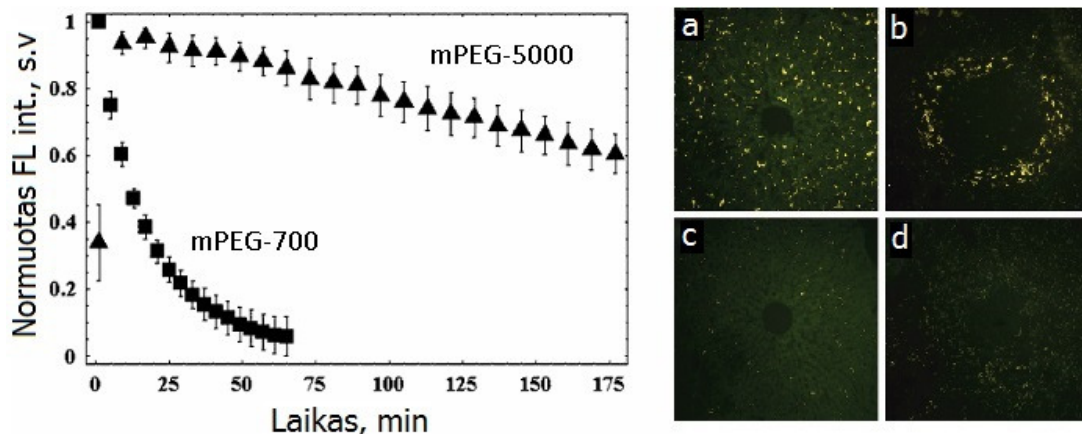
2.2. Nanodalelių (ND) pasiskirstymas organizme.

ND dalelių taikymas biomedicinoje yra labai platus ir apima vis naujas sritis. Visiems ND taikymams gyvame organizme reikalingos žinios apie jų lokalizaciją audiniuose, farmakokinetines savybes, pasiskirstymą skirtinguose audiniuose bei pašalinimą. Ši informacija leidžia optimizuoti ND taikymą: išgauti maksimalią naudą ir tuo pačiu minimizuoti nepageidaujamus reiškinius, pvz., toksiškumą.

Dažniausiai ND į organizmą įvedamos intraveniniu būdu. Kiti ND įvedimo būdai dažniausiai taip pat susiję su jų patekimu į kraują, todėl pirmieji

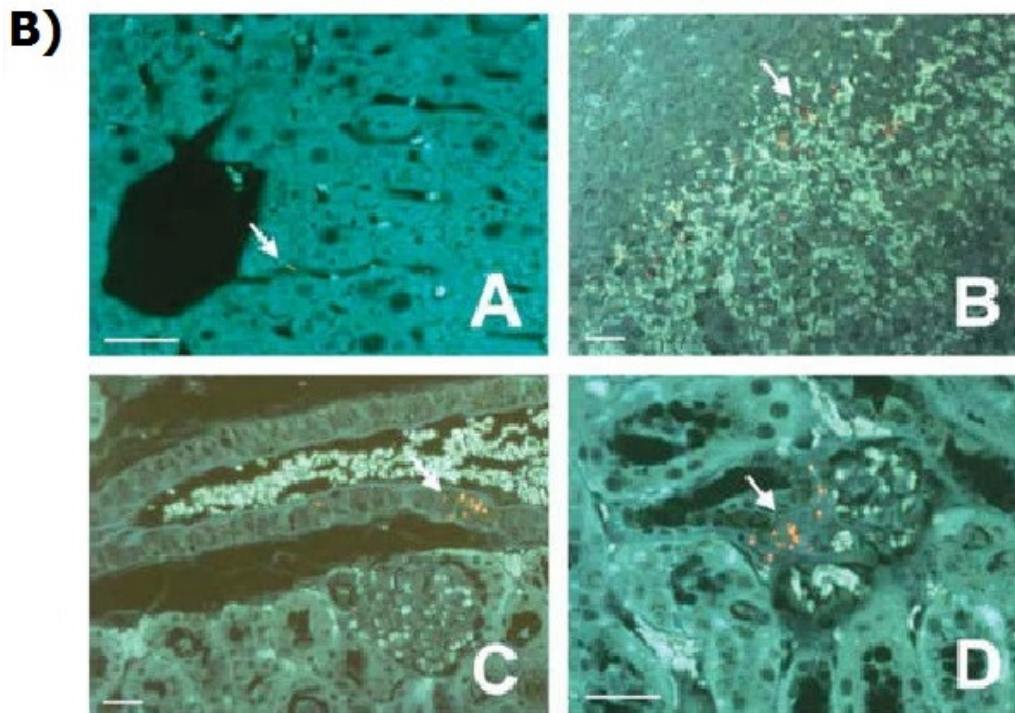
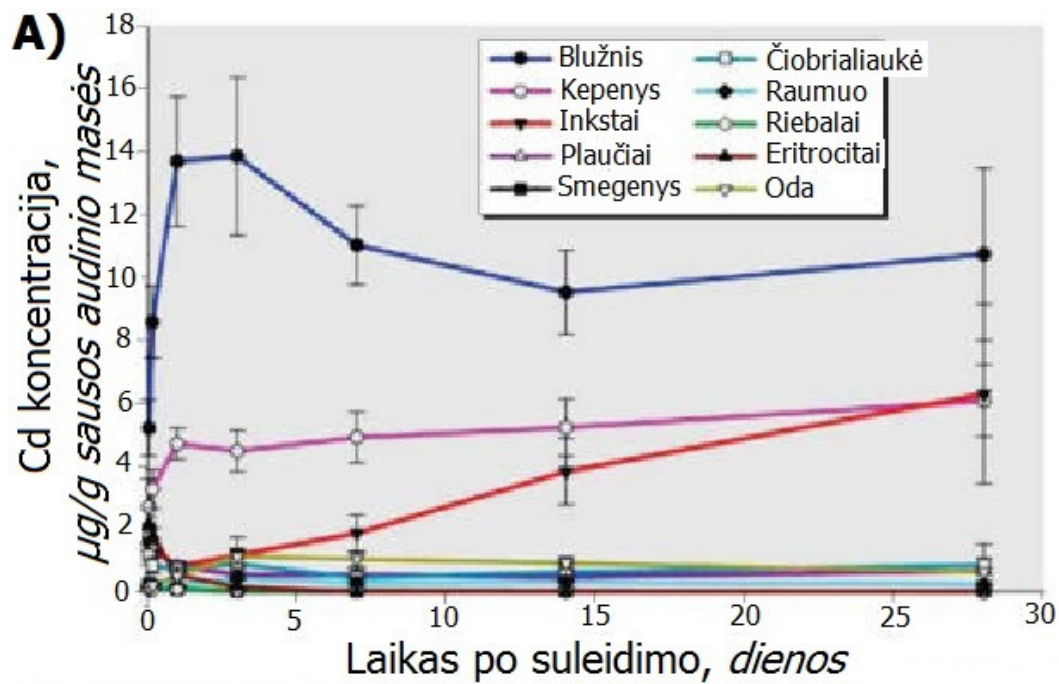
ND sąveikos su biologine sistema procesai yra nulemti organizmo kraujotakos ypatybių. ND pasiskirstymas organizme priklauso nuo įvedimo būdo, jų fizikocheminių savybių (dydžio, formos, krūvio, hidrofiliškumo, padengimo bioaktyviais ligandais), organizmo fiziologinės būsenos ir kitų parametru. Didžiausia įtaką tarp ND savybių turi jų dydis ir paviršiaus cheminė sudėtis, nes nuo jos priklauso pirminė sąveika su organizmo biomolekulėmis. Tuo tarpu vidinė ND sudėtis mažiau įtakoja dalelės lokalizaciją ir yra svarbi sukeliant ilgalaikį poveikį biologicinei sistemai, pvz., veikiant magnetiniu lauku, inicijuojant fotocheminius ar hiperterminius procesus, suyrant dalelei ir išsiliejant jos turiniui. Todėl šiame skyriuje detaliau panagrinėsime ND pasiskirstymo eksperimentinių gyvūnų organizme dėsningumus KT pavyzdžiu.

KT taikymo eksperimentinių gyvūnų organizme tyrimai prasidėjo 1998 metais (11). Pirmieji eksperimentiniai darbai parodė, jog KT gali būti sėkmingai panaudoti fluorescenciniui ląstelių, audinių, gyvūnų kraujotakos, organų bei navikų vaizdinimui. Ballou B. *et al.* tyrė CdSe/ZnS KT, dengtą metoksi-polietilenglikoliu (mPEG), pasiskirstymą pelės organizme ir stebėjo greitą KT eliminavimą iš kraujo plazmos bei didžiausią susikaupimą kepenyse, blužnyje, limfmazgiuose ir kaulų čiulpuose (12). Detalizuojant KT lokalizaciją organuose buvo nustatyta, jog KT susikaupia blužnies perifolikulinėje zonoje, bet ne gemaliniuose centruose. KT buvo aptikti makrofagų endosomose. Jų lokalizacija nepakito praėjus netgi mėnesiui po injekcijos. Autoriai taip pat ištyrė, jog KT cirkuliavimo pusamžis bei susikaupimas retikuloendotelinėje sistemoje (RES) priklauso nuo dalelės paviršiaus padengimo: kuo didesnės molekulinės masės mPEG molekulėmis modifikuoti KT, tuo jie ilgiau cirkuliavo kraujyje (pav. 2.4). Esant $M_{mPEG}=750$ Da nustatytas cirkuliavimo pusamžis 6 min, o esant $M_{mPEG}=5000$ Da jis prailginamas iki 141 min. Didesnės molekulinės masės mPEG sąlygojo ir mažesnę susikaupimą limfmazgiuose bei didesnę susikaupimą blužnyje.



Pav. 2.4. Metoksi-polietilenglikolio (mPEG) įtaka KT farmakokinetikai. Ilgesnės mPEG grandinės sąlygoja ilgesnį KT cirkuliavimą kraujotakoje (kairėje, (12)) ir mažesnę jų susikauptimą retikuloendotelinėje sistemoje (dešinėje, (28)). Nuotraukose geltonai pavaizduoti kepenyse (a, c) ir blužnyje (b, d) susikaupę KT. Padengus KT paviršių mPEG sluoksniu (c, d), jo susikaupimas RES mažėja lyginant su nepadengtais (a, b).

Šiems rezultatams antrina ir Yang R.S.H. *et al* atliktas tyrimas, kurio metu nustatyta, kad CdTe/ZnS-mPEG cirkuliavimo pusamžis pelėse siekia 18,5 val (29). Didžioji dalis KT susikaupia blužnyje bei kepenyse per pirmąsias stebėjimų dienas ir likusį laikotarpį (iki 28 d.) ženkliai nekinta (pav. 2.5). Tuo tarpu Cd koncentracija inkstuose augo visą laiką. KT lokalizavosi kepenų sinusuose, raudonojoje blužnies pulpoje, inkstų glomerulose bei kraujagyslėse. Įdomu, kad per 28 dienas autoriai nestebėjo KT pašalinimo iš organizmo, t.y. 100% suleistos Cd dozės išliko organizme.



Pav. 2.5. A) KT pasiskirstymo organuose kinetika (vertinta pagal Cd koncentraciją); B) KT susikaupimas audiniuose (nuotraukoje raudoni) po 28 d: kepenų sinusuose (A), blužnies raudonojoje pulpoje (B) ir inkstuose (C, D), skalė 50 µm (29).

Yra parodyta, kad PEG dengti KT yra mažiau surišimui RES bei didesniais kiekiais aptinkami kituose audiniuose (širdyje, griaučių raumenyse,

inkstuose) lyginant su tik surfaktanto poli(rac-laktido) molekulėmis dengtais KT. Cirkuliavimo trukmė gali būti prailginta naudojant ne tik ilgesnės grandinės PEG polimerą, bet ir didinant jų tankį ant ND paviršiaus (30).

PEG poveikis ND farmakokinetinėms savybėms grindžiamas jų neutraliu krūviu, kuris sumažina ND paviršiaus poliškumą ir sąveiką su kraujo plazmos baltymais. Tai savo ruožtu mažina opsonizacijos tikimybę ir taip apsaugo ND nuo aktyvių RES fagocituojančių ląstelių. Kita vertus, PEG didina bendrą ND hidrodinaminį skersmenį (HS) nuo kurio priklauso ND gebėjimas prasiskverbti per biologinius barjerus – visų pirma per kraujagyslės sienelę. Todėl PEG modifikavimo strategija aktuali norint prailginti ND cirkuliaciją kraujotakoje, tačiau mažiau tinkama tiems taikymams, kuriems reikalinga efektyvi ND ekstravazacija.

KT susikaupimas ne RES organuose, pvz. širdyje, plaučiuose, kepenyse, raumenyse, smegenyse dažnai siejamas su KT susikaupimu šių organų kraujagyslėse, o jų pernaša į tarpląstelinę terpę bei susikaupimas funkcinėse audinių ląstelėse ir tai sąlygojantys veiksniai yra menkai ištirti. Praetner M. *et al.* pažymi, jog greitą KT eliminaciją iš kraujo plazmos sąlygoja jų prilipimas prie endotelio (31). Jų tirti anijoniniai KT (dengti karboksilo grupes turinčiais ligandais) daugiausiai kaupėsi širdyje, plaučiuose, kepenyse, aortoje, smegenyse. KT stebėti tik venulėse, bet ne arteriolėse. Elektroninės mikroskopijos duomenimis KT buvo stebėti širdies bei blužnies kraujagyslių endotelio vezikulėse. Tuo tarpu katijoniniai KT (dengti amino grupėmis) labiau linkę kauptis RES bei limfmazgiuose, jie nesąveikavo su kraujagyslių sienelėmis. Katijoniniai ir neutralūs KT nebuvo aptikti smegenyse ir raumenyse. Kaip ir anksčiau aptartuose tyrimuose, ilgiausiai kraujotakoje cirkuliavo neutralūs (dengti PEG) KT – per 4 val. jų koncentracija ženkliai nepakito, o teigiamą ar neigiamą krūvį turinčios dalelės buvo greitai pašalintos iš kraujo plazmos, jų pusamžiai atitinkamai – 29 min ir 6 min. Tai rodo, kad ND sąveika su biomolekulėmis ir jų pasiskirstymas organizme labai priklauso nuo jų paviršiaus krūvio: neutralaus krūvio ND yra inertiškiausios biologinei terpei.

Paviršiaus molekulių įtaka ND farmakokinetinėms savybėms buvo parodyta naudojant ir biologiškai aktyvias molekules. Akerman M.E. *et al.* funkcionalizavo KT paviršių peptidais, kurie specifiškai tam tikriems audiniams: GFE peptidu selektyviu plaučių endoteliui, F3 – kraujagyslių endoteliui, Lyp1 – naviko limfagyslėms (28). Tyrėjai fluorescenciniais metodais stebėjo selektyvų šių KT susikaupimą atitinkamuose audiniuose. Vis dėlto nepaisant KT funkcionalizavimo peptidais, buvo stebėtas visų tipų KT kaupimasis kepenyse ir blužnyje. Susikaupimo RES efektas buvo sumažintas KT papildomai padengiant PEG molekulėmis.

Siekiant pritaikyti KT biologiniam taikymui, jie dažnai stabilizuojami amfifiliniu polimeru ir prijungiamos PEG grandinės. Visgi vis labiau populiarėja ir kitos KT paviršiaus modifikavimo strategijos, pvz., inkorporavimas į polimerines, fosfolipidines mices, dengimas silicio polimerais, emulsijomis, polistireno dalelėmis ir kt. (32-34).

KT inkorporavimas į liposomas vis labiau populiarėja dėl paviršiaus biologinio suderinamumo ir nesudėtingo lipidų krūvio, takumo ir kitų savybių moduliavimo. Pavyzdžiui, keičiant liposomų, kurių viduje buvo KT, krūvį skirtinga lipidų sudėtimi, nustatyta, kad kationinės ND buvo labai greitai pašalintos iš kraujo (99% per 10 min) ir didžioji KT dalis po 10 min stebėta plaučiuose (70%) ir kepenyse (25%) (33). Tuo tarpu neutralių ND (zwitterjoninių) cirkuliavimo pusamžis buvo padidintas keletą kartų. Visgi po 24 val. ~90% visų tipų ND lokalizavosi kepenyse, likusi dalis blužnyje ir plaučiuose. Intensyvus pradinis susikaupimas plaučiuose aiškinamas teigiamo ND paviršiaus sąveika su kapiliarų endotelio neigiamai įkrautomis membranomis (33) (nors kiti autoriai pažymi, kad būtent neigiamai įkrautos ND stirpiausiai sąveikauja su endoteliu (31)). Manoma, kad po intraveninės injekcijos KT su kraujo srautu patenka į širdį, o iš jos į mažąjį apytakos ratą, taigi kaip tik į tankų plaučių kapiliarų tinklą, su kurių sienelėmis jie sąveikauja pirmiausiai (33). Tolesnis ND išsiplovimas iš plaučių grindžiamas tuo, kad neigiamo krūvio kraujo plazmos baltymai konkuruoja su plaučių endoteliu, aplimpa teigiamo krūvio liposomas ir tai sąlygoja tolimesnę ND migraciją į

RES. Tuo tarpu neutralių liposomų kraujotakoje buvo aptinkama iki 10 kartų daugiau nei kationinių ir iš kraujo buvo paimamos ne į plaučius, bet iškart surišamos kepenyse (90% po 10 min) (33). Neigiamo krūvio ND nebuvo tirtos. Naudojant mažesnio takumo lipidus (DSPC – distearoilfosfatidilcholiną, vietoj DOPC – dioleoilfosfatidiletanolamino), KT–liposomų darinio cirkuliacija buvo prailginta, tačiau RES surišimo neišvengta. Šis tyrimas parodo, kad paviršiaus krūvis yra viena esminių ND savybių, nulemiančių jų pasiskirstymą organizme, nepaisant lipidinio ND sluoksnio. Liposominė ND struktūra tampa vis dažniau pasirenkama kuriant vaistų pernašos platformas dėl savo universalumo, panašumo į biologines pūsleles bei susiliejiimo su ląstelių membranomis.

Chen Z. *et al.* tyrė SiO kiautu dengtus KT, kurie paviršiuje turi hidroksilo grupes (-OH) (34). Jų cirkuliacijos pusamžis kraujyje siekė 19,8 val. Įvedus į kraujotaką, didžiausia KT koncentracija organuose buvo stebima po 6 val., išskyrus plaučius – po 12 val. Didžiausi kiekiai stebėti inkstuose, blužnyje, kepenyse ir plaučiuose. Po 48 val. KT pasišalino iš daugumos organų ir aptikti tik kepenyse, kuriose jie išliko iki stebėjimo pabaigos (5 parų). Šie rezultatai rodo, kad tokio tipo apvalkalas pasižymi silpna sąveika su kraujo plazmos baltymais. Tai leidžia šiems KT ilgai cirkuliuoti kraujotakoje ir išlaikyti stabilų HS.

KT padengimas žmogaus serumo albuminu taip pat gali ženkliai sumažinti nescifinį surišimą RES ir prailginti cirkuliaciją kraujyje (35). Tai dar viena perspektyvi strategija, kuriant organizmui nematomas ND, nes albuminas yra natūralus kraujo baltymas, kuris nesąveikauja su kitais baltymais.

Apibendrinami aptartus tyrimus galime sakyti, kad ND farmakokinetines savybes nulemia jų paviršiaus padengimas, o ne jų vidinė struktūra. ND susikaupimas RES yra vyraujantis procesas, joms patekus į kraujotaką, todėl siekiant panaudoti ND vaizdinimui, selektyviam vaistų nunešimui ar kitam biomedicininiam pritaikymui reikia prailginti nanodarinių cirkuliacijos trukmę, t.y. išvengti RES apsauginės funkcijos. Ji aiškinama tuo,

jog prie KT polinio paviršiaus elektrostatiškai prisijungusios kraujo plazmos biomolekulės (opsinai, kiti baltymai) suteikia tinkamą paviršių makrofagų fagocitozei, kurių dauguma ir yra lokalizuoti RES. Modifikavus KT paviršių tinkamais polimerais, sumažinamas jų paviršiaus krūvis, kuris lemia silpnesnę sąveiką su biomolekulėmis ir to pasekoje prailgina KT cirkuliavimą kraujyje. Nespecifinė KT sąveika su plazmos baltymais taip pat padidina dalelės HS, kas įtakoja dalelių fagocitozę bei apsunkina jų difuziją per kapiliarų sienelės į audinius bei filtraciją inkstuose. Kita vertus, KT fagocitozė gali būti naudingai panaudojama navikų vizualizacijoje. Yra parodyta, jog pakankamai KT prikaupę makrofagai gali būti stebimi susikaupę gliomoje dėl jų infiltracijos į navikinį audinį (36).

2.3. ND sąveika su kraujagyslių sienelėmis

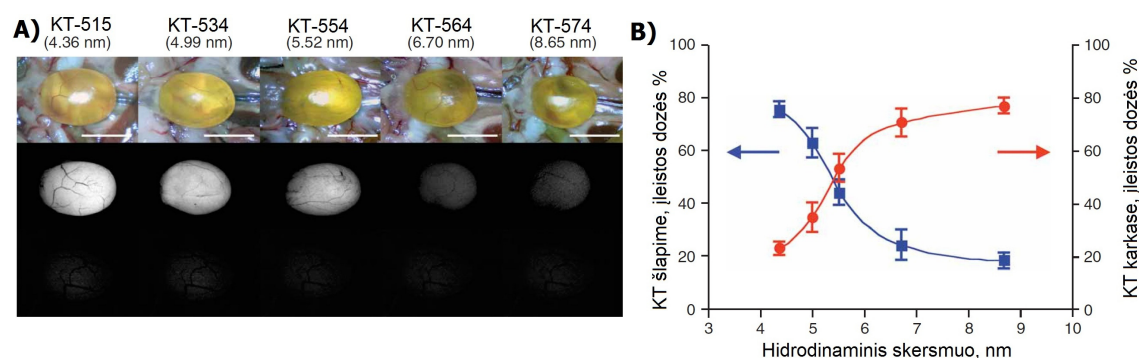
2.3.1. Pasyvi ND pernaša per kraujagyslių sienelę

Kaip jau minėta didžioji dalis ND taikymų *in vivo* susijusi su jų patekimu į kraujotakos sistemą. Todėl ND poveikis organizmui prasideda nuo sąveikos su kraujo elementais bei kraujagyslių sienelėmis. ND gebėjimas įveikti kraujagyslės sienelės barjerą yra būtinas siekiant jų patekimo į audinius ir su tuo susijusio ND fiziologinio poveikio.

Kaip ir kitų medžiagų, KT pernašos per kraujagyslės sienelę būdus galima suskirstyti į dvi grupes: pasyvi difuzija ir aktyvi pernaša per endotelio ląsteles. Teoriškai medžiagų difuzija gali vykti per plyšius tarp ląstelių (interląstelinis kelias) arba difunduoti per ląstelės vidų (transląstelinis kelias). Visgi KT yra per dideli junginiai, kad galėtų difunduoti per fosfolipidinę membraną ar joje esančius baltyminius kanalus. Kol kas nustatyta, kad į gyvas endotelio ląsteles KT patenka endocitozės būdais (37). Taigi KT difuzijai vykti didžiausia tikimybė yra per tarpląstelinius plyšius ir endotelio poras. Šių kraujagyslės sienelės tarpų matmenys įtakoja medžiagų pernašos greitį ir apsprendžia kokio dydžio dalelės gali prasiskverbti per kapiliaro sienelę. Porų dydis priklauso nuo kapiliaro fiziologinės funkcijos ir skiriasi priklausomai nuo audinio tipo: žmogaus nerviniuose audiniuose šie tarpai siekia iki 1 nm,

griaučių skersaruožuose raumenyse iki 5 nm, endokrininėse liaukose iki 12 nm, o inkstų porėtuose kapiliaruose iki 15 nm (38). Retikuloendotelinės sistemos organų sinusiniuose kapiliaruose poros gali siekti ir 60 nm. Svarbu paminėti, kad KT prasiskverbimui per kapiliarus įtakos turi ir endotelio bazinė membrana bei pericitai, todėl porų dydis nebūtinai atitinka didžiausių praleidžiamų KT skersmenį.

KT prasiskverbimas per kraujagyslės sienelę priklauso ir nuo jų pačių fizikocheminių savybių: dydžio, formos, krūvio, paviršiaus padengimo specifinėmis biomolekulėmis. Pav. 2.6 parodyta, kaip KT filtracija iš inkstų kapiliarų į šlapimą priklauso nuo jų skersmens. Pav. 2.6 pav. A dalies vidurinėje nuotraukų eilėje pateiktos šlapimo pūslės fluorescencinės nuotraukos, kuriose stebimas FL intensyvumo (kuris atitinka dalelių koncentraciją šlapime) mažėjimas, didėjant dalelės skersmeniui.



Pav. 2.6. A) Pelių šlapimo pūslės vaizdai praėjus 4 val. po skirtingo hidrodinaminio skersmens KT intraveninio suleidimo. Viršuje - atspindžio vaizdai, viduryje – atitinkami fluorescenciniai vaizdai suleidus KT, apačioje – kontroliniai vaizdai. B) Santykinės KT koncentracijos priklausomybė nuo jų dydžio: mėlyna kreivė – šlapime, raudona – likusiame kūne (adaptuota pagal (39)).

Šio tyrimo autoriai nurodo, kad mažesni nei 6 nm KT laisvai pereina iš inksto glomerulų į šlapimą, nuo 6 iki 15 nm ribotai, o didesnės nei 15 nm visiškai neprasiskverbia per kapiliaro sienelę ir šlapime neaptinkamos (40). Kitų autorių duomenimis, mažesnės nei 6 nm ND taip pat laisvai patenka iš kraujo į šlapimą, didesnės nei 8 nm yra sulaikomos, o tarpinio 6-8 nm dydžio

ND prasiskverbimas priklauso nuo jų krūvio (41). Autorių rezultatai greičiausiai skiriasi dėl skirtingų ND paviršinių ligandų, kurie apsprendžia paviršiaus sąveiką su biomolekulėmis ir dalelės HS *in vivo*, kuris dažniausiai yra kiek didesnis negu išmatuotas *in vitro* sąlygomis. Apibendrintai galime sakyti, kad ND filtracijos iš inkstų kapiliarų slenkstis yra iki 10 nm.

Kituose audiniuose KT difuzija per kraujagyslės sienelę yra mažiau nagrinėta ir yra pavieniai tyrimai, kurie sieja KT pernašos efektyvumą su jų fizikinėmis savybėmis. Išskirtinio dėmesio sulaukia galvos smegenų kraujotakos tyrimai dėl šio organo svarbos ir hematoencefalinio barjero, kuris riboja daugumos farmakologinių preparatų patekimą į audinius. Laikomasi nuomonės, kad pasyvios difuzijos būdais ND į smegenų audinį nepatenka, tačiau jos gali būti pernešamos aktyviais būdais, ypač jei ND paviršius modifikuojamas specialiais ligandais (42, 43).

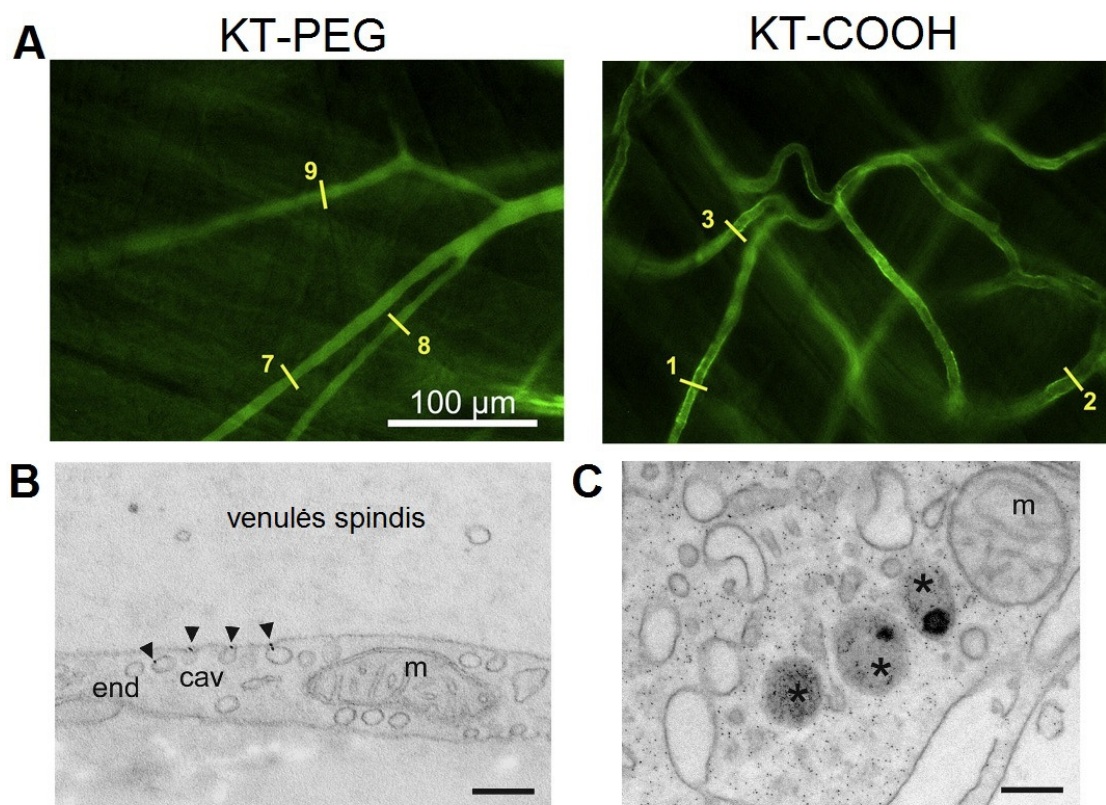
Moksliniuose tyrimuose didelis dėmesys skiriamas ND perėjimui per patologinių audinių kraujagysles siekiant ateityje pritaikyti šias ND ligų diagnostikai ir gydymui. Uždegiminių ligų židiniams (pvz., reumatoidinio artrito ar aterosklerozės pažaidoms, navikams ir kt.) būdingas padidėjęs kapiliarų pralaidumas tiek imuniniame atsake dalyvaujančioms ląstelėms, baltymams ar kitoms biomolekulėms, tiek ir ND. Uždegiminiams audiniams taip pat būdinga intensyvesnė kraujotaka. Tai sudaro sąlygas efektyvesnei ND ekstravazacijai į tarpląstelinę terpę ir didesniam jų susikaupimui uždegimo vietoje negu aplinkiniame sveikame audinyje.

2.3.2. ND sąveika su endotelium ir aktyvi pernaša

Didžioji dalis į kraują patekusių ND sąveikauja su jame esančiomis ląstelėmis, plazmos baltymais bei kitais junginiais. Ši sąveika priklauso nuo erdvinių ND savybių bei paviršinių ligandų. Sukibimas su baltymais ir opsonizacija stiprina imuninės sistemos atpažinimą, ND fagocitozę bei susikaupimą retikuloendotelinėje sistemoje. Tai mažina ND cirkuliacijos trukmę, kuri yra svarbi visiems ND taikymams *in vivo* (44). Sąveika su biomolekulėmis taip pat didina ND HS (lyginant su *in vitro* sąlygomis), nuo

kurio priklauso jų farmakokinetinės savybės ir prasiskverbimas per biologinius barjerus (41). Todėl vienas pagrindinių kiekvieno ND taikymo uždavinių yra tinkamai parinkti jų fizikochemines savybes ir įsitikinti jų stabilumu biologinėje terpėje, visų pirma – kraujyje.

Dažniausiai siekiama sukurti ND, kurių nespecifinė sąveika su kraujo komponentais būtų minimali. Tai pasiekama ND paviršių modifikuojant ilgagrandžiais neutralaus krūvio polimerais, pvz., PEG, kurio molekulinė masė siekia iki 10 kDa (45). ND krūvis yra viena pagrindinių savybių, sąlygojančių jų sąveiką ir su kraujagyslių sienelėmis. Nustatyta, kad neutralaus krūvio KT adhezija prie endotelio yra ženkliai silpnesnė negu polines (pvz., karboksilo ar amino) grupės, turinčių ND (pav. 2.7) (31, 46). Elektroninės mikroskopijos ir fluorescenciniais metodais nustatyta, kad KT patenka į endotelio ląsteles ir šis susikaupimas taip pat priklauso nuo KT krūvio: neigiamo krūvio KT labiau kaupiasi ląstelėse negu neutralaus ar teigiamo paviršiaus krūvio KT (pav. 2.7) (2, 46). Neigiamo krūvio KT stebėtos ir išoriniuose kapiliarų makrofaguose. Tirinat viščiukų embrionų kraujagysles nustatyta, kad per 24 val. į endotelio ląsteles patenka ir teigiamo krūvio KT (amino grupės) (2). Teigiamo krūvio KT stipri sąveika su endoteliumi nustatyta ir kitų autorių. Ji grindžiama elektrostatische trauka dėl neigiamai įkrautų ląstelių membranų. Tuo tarpu neigiamo krūvio KT sąveika su kraujagyslių sienelėmis visų pirma nulemta jų sąveikos su kraujo plazmos komponentais ir gausesniu aplipimu baltymais (31).



Pav. 2.7. A) Fluorescencinės mikroskopijos pelės kraujagyslių nuotraukos, kuriose matosi, kad neutralaus paviršiaus krūvio KT (KT-PEG) pasisikirsto visame kraujagyslės tūryje (FL stebima visoje kraujagyslėse), o neigiamo krūvio KT (KT-COOH) prilimpa prie sienelių ir greit pasišalina iš kraujo plazmos (FL nestebima spindyje) (31). B-C) Venulių sienelių elektroninės mikroskopijos nuotraukos praėjus 1 val. po KT suleidimo. Jose matosi endotelio ląstelės („end“), pavienių KT paėmimas į kaveoles („cav“) (B) ir vėlesnis jų susikaupimas endosomose (C, žvaigždutės); „m“ žymi mitochondriją. B ir C skalė - 200 nm (46).

Minėti tyrimai rodo, kad nefunkcionalizuotų KT kaupiasi endotelio ir imuninės sistemos ląstelėse. KT transląstelinė pernaša per kraujagyslių sienelę nėra aptarta. Jei KT endocitozė vyksta kraujo leukocituose, tuomet jie gali būti pernešami ląstelių viduje, leukocitams migruojant per kraujagyslės sienelę į audinį, pvz., uždegimo atveju (46).

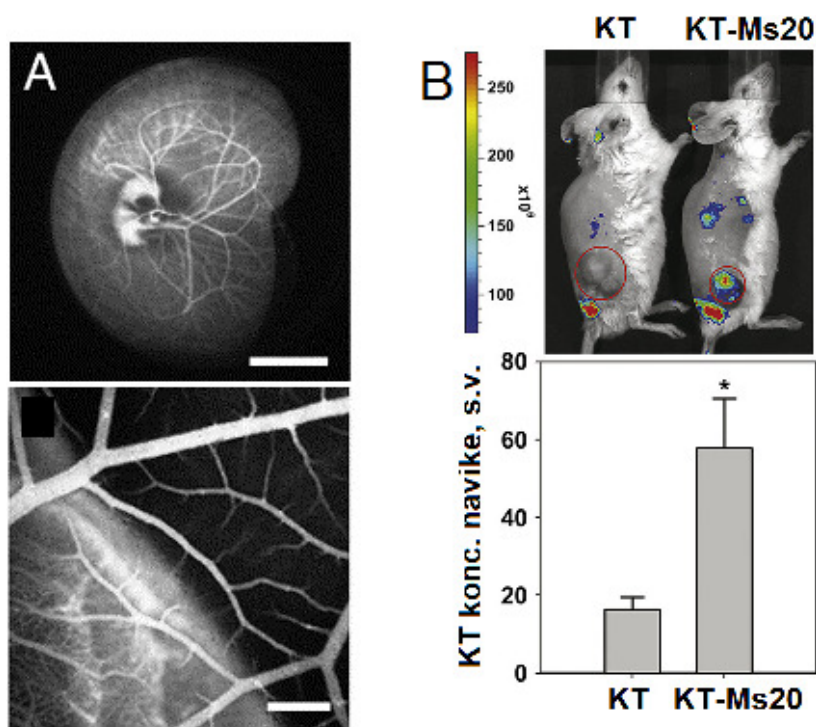
Siekiant sėkmingai pritaikyti KT selektyviame norimo audinio vaizdinime ar terapijoje, būtina pasiekti ženkliai didesnę susikaupimą taikinyje

aplinkinių audinių atžvilgiu. Jei dominančio audinio pasyvus kapiliarų laidumas (sąlygotas didesnių sienelių porų) nėra padidėjęs, tuomet selektyvus susikaupimas turi būti pagrįstas specifine KT sąveika su endotelium. Kiekvienas audinys skiriasi savo funkcija, kuriai atlikti jis turi pasisavinti tik tam tikras medžiagas bei reaguoti į atitinkamas signalines kraujyje esančias molekules. Tam endotelio ląstelės turi įvairių receptorių bei pernašos baltymų, kurių rinkinys yra unikalus kiekvienam audiniui ir netgi jo fiziologinei būklei. Būtent šis endotelio ląstelių paviršiaus „biocheminis pirštų antspaudas“ sudaro sąlygas kurti specializuotas ND, kurios atrankiai sąveikautų su endotelium.

Kuriant ND pagrįstus metodus kraujotakos tyrimams, kyla poreikis išsiaiškinti galimus šalutinius jų poveikius kraujotakos sistemai. Moksliniai tyrimai rodo, kad KT sąveika su kraujo ląstelėmis ir endotelium gali įtakoti jų fiziologines funkcijas. Pavyzdžiui, teigiamo paviršinio krūvio KT (karboksilo grupės) patekimas į kraują padidina leukocitų prilipimą prie endotelio ir jų perėjimo per sienelę į pažeistą audinį greitį. Tuo tarpu teigiamo ar neutralaus krūvio KT (amino ar PEG grupės) tokiu poveikiu nepasižymi (46). Manoma, kad ši leukocitų elgesio moduliacija susijusi su paviršinių adhezijos baltymų ICAM-1 ir E-selektino ekspresijos pokyčiais. Tai rodo, KT paveikia imuninės sistemos elementus ir turi įtakos uždegiminiams procesams. Taip pat parodyta, kad CdTe/CdSe KT, dengti merkaptoundekano rūgštimi gali pakenkti arteriolų vazodilatacijai, nepaveikdami jų vazokonstrikcijos (47). Mažiau apsaugoti CdTe šerdies KT sukelia deguonies laisvųjų radikalų generavimą, citotoksiškumą ir genotoksiškumą endotelio ląstelėse (48). Kitų tipų ND taip pat gali turėti neigiamos įtakos endotelio fiziologijai: magnetinės ND gali aktyvinti NO sintezę ir taip stabdyti endotelio ląstelių proliferaciją (49), anglies nanovamzdeliai sukelia oksidacinį stresą, kuris siejamas su vozomotorine disfunkcija (50). Dauguma autorių nurodo, kad ND poveikis priklauso nuo jų dozės, morfologijos, cheminio stabilumo, paviršinių ligandų ir kitų savybių, todėl potencialiai žalingą ND poveikį kraujotakos sistemai sudėtinga apibendrinti ir kiekvieno ND tipo poveikis turėtų būti vertinamas atskirai.

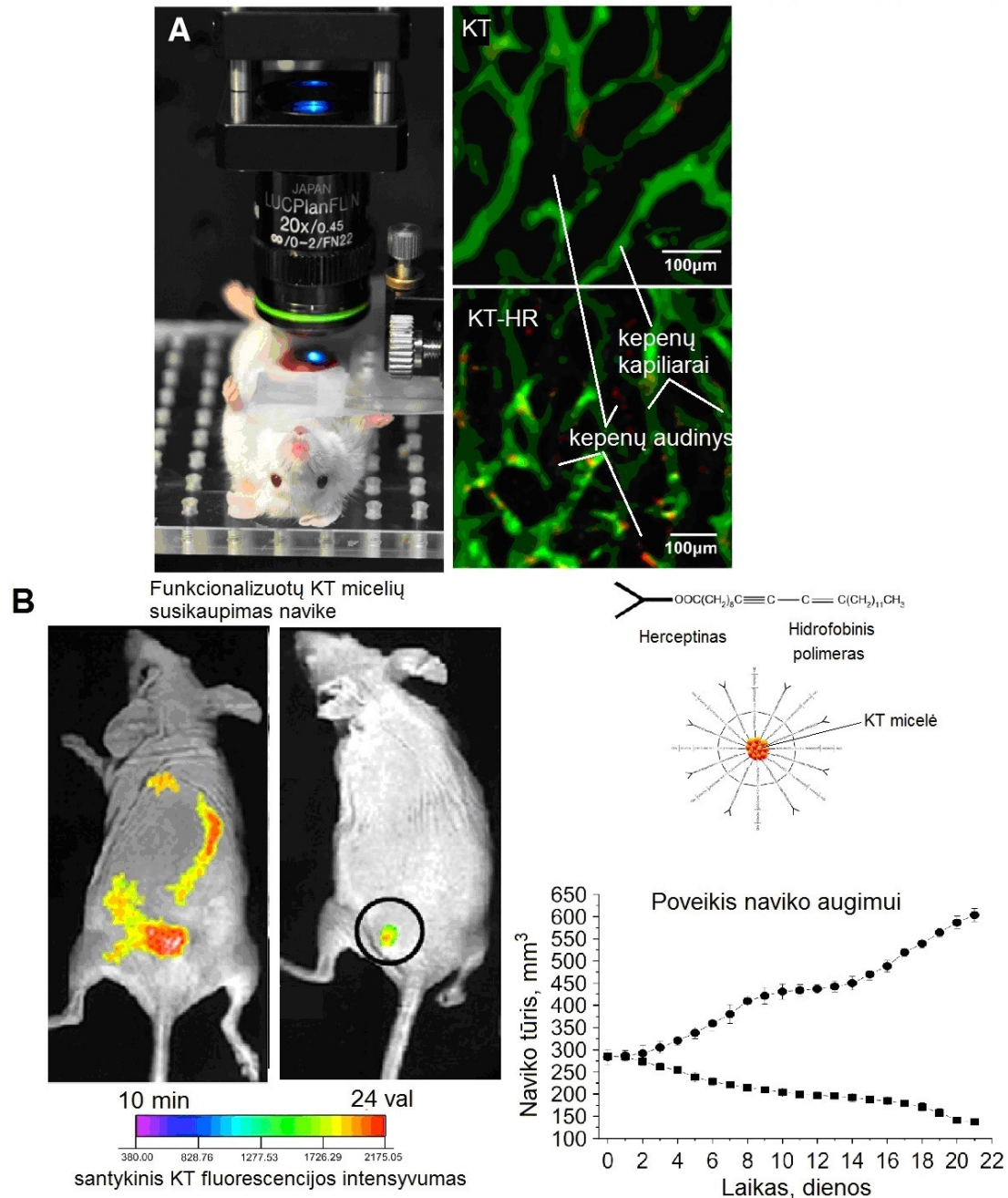
2.3.3. ND taikymai pagrįsti kraujagyslės sienelės barjeru

Pasyvi difuzija per kraujagyslę aktuali tokiuose ND taikymuose kaip angiografija (51, 51), navikų vaizdinimas, tikslinė vaistų pernaša į pažeistą vietą ir kt. Daugumos organų kraujagyslių poros nesiekia 10 nm (išskyrus RES, inkstus), todėl didesnės ND neprasiskverbia per kapiliarų sieneles ir nepatenka į audinius. Pagrindinis KT privalumas lyginant su organinėmis kontrastinėmis medžiagomis, pvz. fluoresceinu žymėtu dekstranu, yra jų sulaukymas kraujagyslėje ir neišsiliejimas į audinius. Tai leidžia vizualizuoti kraujagysles dideliu kontrastu aplinkinių audinių atžvilgiu (pav. 2.8). Cheminės sintezės metodais neorganines ND galima padengti įvairiais organiniais ligandais, pvz. polietilenglikoliu, kurie minimizuoja sąveiką su kraujo baltymais, makrofagais ir prailgina jų cirkuliacijos trukmę. KT pasižymi stabiliomis FL savybėmis, todėl prie jų nebereikia jungti papildomų fluoroforų.



Pav. 2.8. KT taikymai fluorescenciniame vaizdinime. A) Viščiuko embriono kraujagyslių vaizdinimas naudojant PEG ir amino grupėmis dengtus KT: viršuje visas embrionas (skalė 25 mm), apačioje chorioalantojinės membranos kraujagyslės (skalė 1 mm) (2); B) MS20 antikūnu funkcionalizuotų KT (“KT-MS20”) selektyvus susikaupimas įskiepytame navike (raudonas apskritimas).

Susidaręs KT koncentracijų skirtumas su aplinkiniu audiniu sudaro sąlygas vizualizuoti naviką. Nefunkcionalizuotų KT navike kaupiasi ženkliai mažiau (52).



Pav. 2.9. Funkcionalizuotų KT selektyvus susikaupimas audiniuose. A) Kepenų fluorescencinė mikroskopija *in vivo* rodanti, kad KT konjuoguoti su hialurono rūgštimi (KT-HR) pernešami iš kraujagyslių ir susikaupia kepenų audinyje (53). B) KT micelės, funkcionalizuotos herceptinu sąveikauja su įskiepyto naviko ląstelių Her2 receptoriais ir kaupiasi navike (apibrauktas) po

24 val. Ligando – receptoriaus sąveika sutrikdo ląstelių augimo signalo perdavimą ir sukelia naviko nekrozę (54).

Visgi selektyviam vaizdinimui KT dažniausiai yra funkcionalizuojami biomolekulėmis siekiant specifinės sąveikos su ląstelėmis. Pavyzdžiui, prie KT paviršiaus prijungus hialurono rūgštį (HR) stebimas daug intensyvesnis jų susikaupimas kepenų hepatocituose lyginant su nefunkcionalizuotais KT (be HR) (53). Tokie rezultatai buvo gauti *in vivo* fluorescencinės mikroskopijos būdu (pav. 2.9 A). Tyrimas rodo, kad KT patekimas į kepenų audinį ir hepatocitus vyksta nuo HR receptorių priklausomos endocitozės būdu. Šis KT pernašos būdas buvo patvirtintas *in vitro* eksperimentais - HR dengti KT daug geriau (negu KT be HR) kaupiasi B16F1 linijos ląstelėse, kurioms būdinga HR receptorių raiška. Tuo tarpu HEK293 linijos ląstelės, neturinčios šių receptorių, abiejų tipų KT nekaupė (53).

Visgi didžiausia dalis ND funkcionalizavimo tyrimų yra nukreipta kurti onkologinių susirgimų gydymo būdus. Dauguma navikinių ląstelių ir jų kraujagyslių endotelis turi padidėjusią kai kurių paviršinių biomolekulių ekspresiją, pvz., augimo veiksnių (EGF, VEGF, PDGF), Her2, folatų receptorių, mucinų ir kt. (54, 55). Todėl prie ND prijungus atitinkamą ligandą, ją galima nukreipti į naviką ir pasiekti selektyvų ND susikaupimą aplinkinių sveikų audinių atžvilgiu (aktyvus selektyvumas). Vienas iš tokių taikymų yra naudoti KT mices, konjuguotas PEG ir polidiacetileno polimeriniu dangalu, prie kurio išorinio paviršiaus papildomai prijungtos herceptino molekulės (pav. 2.9 B). Herceptinas yra krūties vėžio ląstelių Her2 receptoriaus ligandas ir pasižymi priešvėžinėmis savybėmis. Tokie ND patekus į organizmą, ji, pratekėdama pro vėžines ląsteles, prisijungia prie jų paviršiaus dėl herceptino ir Her2 receptoriaus sąveikos. Šis atrankus KT micelių susikaupimas suteikia galimybę vizualizuoti naviką, jo ribas ir tokiu būdu pagerinti diagnostiką bei naviko vaizdinimą operacijos metu. Kita vertus, herceptinas inhibuoja navikinių ląstelių proliferacijos signalinius kelius ir stabdo jų augimą.

Reikia prisiminti, kad, siekiant ND sąveikos su navikinėmis ląstelėmis, visų pirma ND turi pereiti iš kraujagyslės į tarpląstelinę terpę. Daugumos navikų kraujagyslių sienelės yra ženkliai didesnio laidumo negu sveiko audinio. Taip pat jie pasižymi tankesniu kapiliarų tinklu ir aktyvesne kraujotaka. Navikuose taip pat dažniausiai yra mažiau išvystyta limfinė sistema, kuri atsakinga už audinių skysčio nutekėjimą ir tuo pačiu už jame esančių ND pašalinimą. Šios fiziologinės savybės sukelia taip vadinamą padidinto pralaidumo ir sulaikymo (PPS) efektą (angl. *enhanced permeability and retention, EPR*), kuris apsprendžia didesnę ND perėjimą iš kraujo plazmos į audinį ir sulaikymą jame, t.y. pasyvų selektyvumą (56). Todėl aktyvus selektyvumas dažniausiai yra lydimas pasyvaus selektyvumo.

Naviko kraujagyslių endotelis taip pat skiriasi savo biocheminiais žymenimis nuo sveiko audinio. Tuo remiantis galima atrankiai vaizdinti bei paveikti tik naviko kraujagysles. Aktyviai proliferuojančios endotelio ląstelės pasižymi padidinta integrinų raiška. Šie receptoriai selektyviai sąveikauja su adhezijos peptidais, pvz., ciklinis RGD peptidas jungiasi su $\alpha_V\beta_3$ integrinu. Tai sudaro sąlygas prie KT paviršiaus prijungus RGD peptidą atrankiai vizualizuoti bei paveikti netgi tuos navikus, kurių kraujagyslių laidumas nepakitęs ir KT negali patekti į audinio tarpląstelinę terpę (1).

Daug dėmesio yra skiriama ND pernašai per smegenų hematoencefalinį barjerą, dėl kurio į nervinį audinį patenka tik kai kurie nepoliniai, mažos molekulinės masės junginiai, tačiau didžioji dalis vaistinių preparatų neuronų nepasiekia. Tai riboja neurologinių susirgimų gydymo būdus. ND dėl savo matmenų taip pat negali patekti į nervinį audinį pasyvios pernašos būdais. Tačiau yra parodyta, kad ND konjugavus su ligandais, kurie patys yra pernešami į nervinį audinį, susidaręs kompleksas gali įveikti hematoencefalinį barjerą. Pavyzdžiui, laktoferinas (Lf) yra glikoproteinas, kuris pernešamas per smegenų kraujagysles dalyvaujant endotelio receptoriams transcitozės būdu. Konjugavus Lf su geležies oksido magnetinėmis ND, susidaręs kompleksas buvo efektyviai pernešamas žiurkės galvos smegenyse (57). Taip pat stebėtas selektyvus ND susikaupimas gliomos modelyje dėl padidėjusios naviko Lf

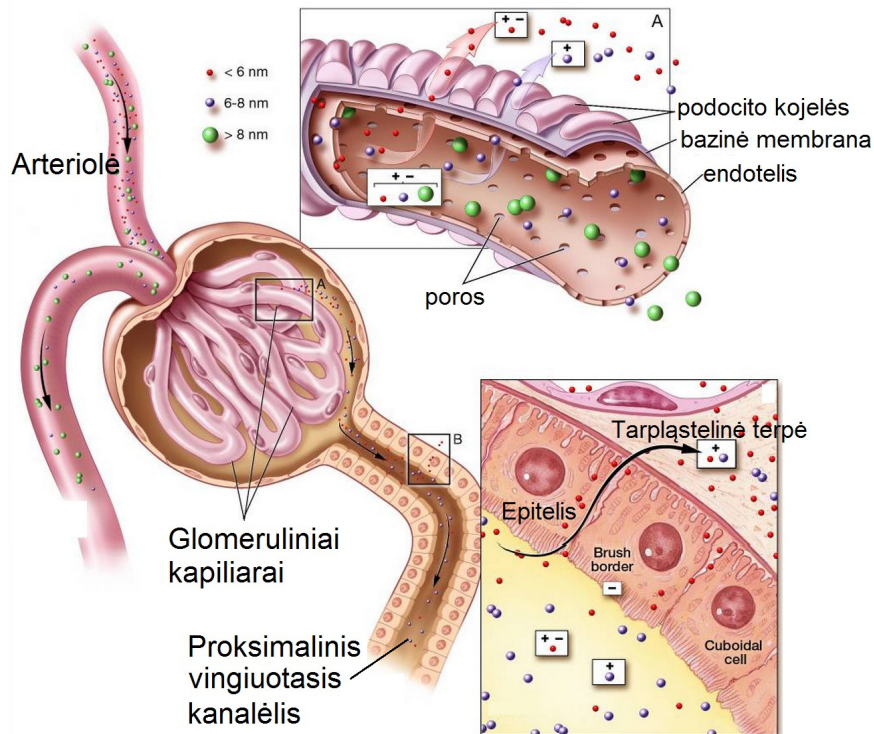
receptorių raiškos. Panašiai yra parodyta, kad ND pernaša į nervinį audinį gali būti pagerinta, prie jų paviršių prijungiant TAT peptidą (43), lektiną (16) ir kitus ligandus. Tikimasi, kad ateityje daugiafunkcinės ND padės vaistų molekulėms pasiekti nervinį audinį ir gydyti neurologinius susirgimus, kurie šiuo metu negali būti paveikti farmakologinėmis priemonėmis.

2.4. ND šalinimas iš organizmo

Teoriškai ND gali pasišalinti iš organizmo trimis būdais: 1) per inkstus su šlapimu; 2) per kepenis su išmatomis; 3) suirti organizme ir virsti lengviau pašalinamais junginiais. Šalinimo per inkstus metu ND mažiau veikiamos fermentinių reakcijų negu šalinant per kepenis. Todėl kuriant netoksiškas ir lengvai pašalinamas ND biologiniams taikymams, siekiama, kad jų savybės leistų joms efektyviai pasišalinti urinariniu keliu. Medžiagų patekimas į šlapimą visų pirma priklauso nuo jų filtracijos iš kraujo inkstų glomerulėse. Čia kapiliaro sienelė sudaryta iš trijų sluoksnių: porėto endotelio, bazinės membranos ir podocitų ataugėlių (pav. 2.10). Veikiant kiekvienam iš šių elementų efektyvi fiziologinė pora yra apie 5 nm skersmens. Todėl medžiagų filtracija labai priklauso nuo jų dydžio. Skirtingų autorių rezultatai liudija, kad mažesnės kaip 6 nm ND laisvai patenka į šlapimą ir tai mažai priklauso nuo kitų jų savybių (40, 41). 6-10 nm skersmens ND filtracija ribota ir priklauso nuo jų paviršinių ligandų krūvio, nes bazinė glomerulų membrana įkrauta neigiamai ir elektrostatinės stūmos jėga papildomai apsunkina to paties krūvio dalelių judėjimą iš kraujo plazmos.

Nuo dydžio priklausomą ND filtracijos modelį iliustruoja Choi H.S. *et al.* tyrimai, kuriuose buvo naudojami KT, dengti cisteinu, kuris turi neigiamą karboksi ir teigiamą amino grupę (40). Tokių KT apvalkalas yra plonas, o bendras paviršiaus krūvis yra neutralus, todėl KT buvo tirpūs ir gebėjo elektrostatiškai atstumti tiek teigiamus, tiek ir neigiamus kraujo plazmos baltymus ir išsaugoti mažą HS. Buvo parodyta, kad tokių KT inkstų filtracija yra labai jautri dydžiui: esant 4,4 nm skermeniui cirkuliacijos pusamžis buvo

48 min, o esant 8,7 nm – 20 val. Nustatyta sigmoidinė filtracijos priklausomybė nuo KT dydžio su senkstine verte – 5,5 nm (pav. 2.6).



Pav. 2.10. Inksto funkcinio vieneto struktūra ir ND filtracijos principas (41). Filtracijos barjerą sudaro porėtas endotelis, neigiamai įkrauta bazinė membrana ir podocitai (A). Dalis išfiltruotų ND teoriškai gali būti reabsorbuotos proksimaliniame inkstų kanalėlyje ir sugrąžintos į kraują (B). Dėl elektrostatinės sąveikos teigiamai įkrautos ND gali lengviau prasiskverbti per neigiamai įkrautas ląstelių membranas (41).

Didesnių kaip 10 nm ND filtracija yra itin neefektyvi ir galima sakyti, kad ji nevyksta. Svarbu paminėti, kad ND hidrodinaminis skersmuo kraujyje dažniausiai padidėja lyginant su *in vitro* sąlygomis dėl plazmos baltymų adhezijos (31). Šis procesas priklauso nuo ND paviršinių ligandų cheminių savybių, krūvio, hidrofobiškumo ir kt. Todėl ND HS matavimai tirpaluose yra nepakankami siekiant prognozuoti jo pokyčius ir tuo pačiu ND išsiplovimo savybes joms patekus į organizmą.

Galutinis šlapimo formavimo procesas yra jo reabsorbcija inkstų kanalėliuose. Dalis ND teoriškai gali būti sugrąžinta į kraujotaką. Kadangi

epitelinių ląstelių membrana įkrauta neigiamu krūviu, tikėtina, kad teigiamo krūvio ND šį barjerą įveiktų sėkmingiau ir didesnė jų dalis būtų sugražinta. Visgi ND reabsorbcija inkstuose mažai iširta ir aiškių jos įrodymų nėra (41).

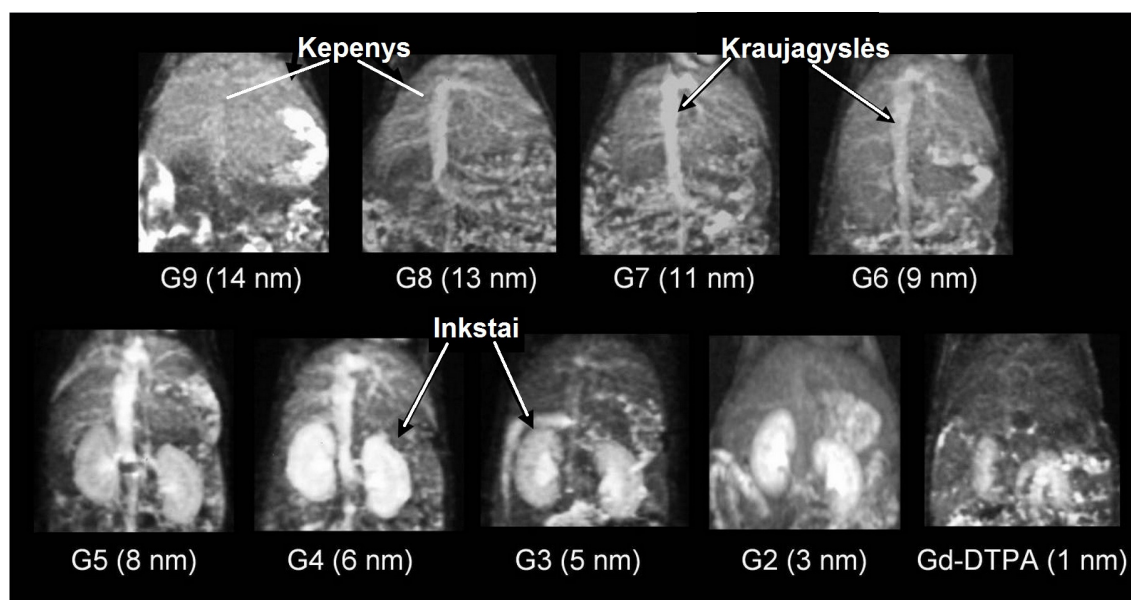
Kepenų šalinimo kelias yra alternatyva ND, kurios negali būti pašalintos per inkstus su šlapimu. Kepenys sudarytos iš dviejų pagrindinių tipų ląstelių: hepatocitų ir Kupferio ląstelių (makrofagų). Prieš pasišalinant visi junginiai patenka į hepatocitus, kuriuose vyksta jų skaidymas ar kitoks biocheminis modifikavimas. Šiame medžiagų šalinimo kelyje junginiai pernešami į/iš ląstelių aktyviai. Hepatocituose ND sąveikauja su įvairiais hepatocitų fermentais, kurie pasižymi kataboliniu aktyvumu. Šios reakcijos yra reguliuojamos per genų raišką. Visa tai daro procesą ženkliai sudėtingesnę negu urinarinio šalinimo atveju ir tuo pačiu sunkiau prognozuojamą. Viduląstelinis ND sukaupimas ir medžiagų skaidymas didina tikimybę susidaryti ir kauptis nuodingiems junginiams. Hepatocitai savo skaidymo produktus išskiria su tulžimi į plonąją žarnyną, kur ND bei jų skaidymo produktai gali būti veikiami virškinimo bei bakterijų fermentų ir gali būti vėl įsiurbiami į kraujotaką (41).

Kupferio ląstelės yra RES dalis, todėl jų pasisavintos medžiagos yra virškinamos endosomose, o suskaidytos medžiagos nėra išskiriamos į tulžį. Jei ND nėra suskaidomos į mažesnius junginius, kurie galėtų patekti į kraujotaką ir vėliau pasišalinti su šlapimu, tuomet tokios ND bus kaupiamos organizme. KT intraląstelinis paėmimas Kupferio ląstelėse ir degradacija buvo parodyta tyrimuose *in vitro* (58).

Yra nustatyta, kad žiurkėms suleidus CdSe/ZnS KT, dengtų PEG, praėjus 16 savaičių >99% į organizmą patekusių Cd atomų liko organizme (5). Didžioji dalis Cd susikaupė kepenyse (~44%), kiek mažiau inkstuose (25%), blužnyje (6%) ir kituose organuose. Tyrimas atskleidė, kad dalis KT suyra, o išsiskyres kadmio yra surišamas chelatuojančiais baltymais kepenyse ir inkstų epitelyje. Kita tyrėjų grupė naudodama tuos pačius KT gavo panašius rezultatus: per 28 dienas jie nestebėjo KT pasišalinimo iš pelės organizmo (29). Naudodami masių spektroskopijos metodiką, jie parodė, jog KT koncentracija

kepenyse ir blužnyje ženkliai nekinta, tačiau visą laiką didėja inkstuose. Visgi šie autoriai nekomentavo, kokios priežastys galėjo lemti tokį pasiskirstymą. Tačiau eksperimentiniai duomenys patvirtina anksčiau aptartą Lin C.H. *et al.* modelį (5). Vadinasi PEG dengti CdSe/ZnS KT ir jų skilimo produktai turintys kadmio nėra pašalinami iš organizmo, o sudaro toksinius junginius, kurie nuodija organizmą.

Kepenys efektyviai surenka 10-20 nm daleles, nes yra prisitaikiusius valyti tokių matmenų virusus, patogenus, kitas smulkias daleles. Todėl tokio dydžio ND yra greit pašalinamos iš kraujotakos (pav. 2.11). Siekiant sulėtinti šį procesą, ND yra modifikuojamos paviršiniais ligandais, kurie mažina opsonizaciją ir jų fagocitozę.



Pav. 2.11. Gd²⁺ jonais prisotintų PAMAM dendrimerų susikaupimas šalinimo organuose priklausomai nuo ND dydžio stebimas magnetinio rezonanso tomografu praėjus 15 min (G6-G9) arba 3 min (kiti junginiai) po suleidimo. Didžiausios dalelės geriausiai kaupiasi kepenyse, mažesnės negu 8 nm dalelės filtruojamos inkstuose ir patenka į šlapimą. Tarpinio dydžio dalelės ilgiausiai cirkuliuoja kraujotakoje, nes nepašalinamos per inkstus ir santykinai lėtai kaupiasi kepenyse (41).

Ilgiausios trukmės KT susikaupimo organizme tyrimo metu KT susikaupimas tirtas iki 2 metų (22). Jo metu nustatyta, kad CdSe/ZnS KT

(dengti PEG) iškart po suleidimo buvo stebėti kraujotakoje bei RES: blužnyje, kepenyse, limfmazgiuose, kaulų čiulpuose. Praėjus 2 metams KT aptikti limfmazgiuose, kepenyse bei blužnyje. KT buvo sutelkti į sankaupas (greičiausiai lokalizuoti ląstelių vezikulėse), užuot tolygiai pasiskirstę audinyje. Įdomu tai, jog buvo stebėti KT FL spektrų pokyčiai audiniuose: trumpabangis juostos poslinkis (iki 70 nm) bei su juo koreliuojantis juostos puspločio padidėjimas (nuo 12-15 nm iki 35-80 nm). FL juostos smailės padėtis varijavo visuose bandiniuose nepriklausomai nuo audinio tipo. Šie spektroskopinių savybių pokyčiai siejami su KT organinio apvalkalo, ZnS sluoksnio bei pačios CdSe šerdies suirimu. KT degradacija gali sąlygoti sunkiųjų metalų išlaisvinimą ir citotoksiškumą. KT FL juostos padėties variacija gali būti siejama su skirtinga jų ląstelėse lokalizacija ir nuo jos priklausančiu biocheminiu KT suirimu. Šis tyrimas rodo, kad KT, susikaupę RES ląstelėse nėra iš jų pašalinami, t.y. jiems nebūdinga ekskrecija, ir tai sąlygoja ilgalaikį KT susikaupimą. Ilgesniame laikotarpyje veikiant ląstelės fermentams KT lėtai degradoja bei sudaro toksinius skilimo junginius.

Galima rasti vos pavienių tyrimų, kurie rodo, kad KT gali būti šalinami per kepenis su tulžimi ir išsiskirti su išmatomis. Praetner M. *et al.* stebėjo trijų tipų (teigiamo, neigiamo ir neutralaus paviršiaus krūvio) CdSe/ZnS KT pelių tulžies, plonosios žarnos bei išmatų turinyje (iki 15% suleistos dozės), taip pat šlapime (31). Chen Z. *et al.* naudojo CdSeS/SiO₂ KT, kurie paviršiuje eksponuoja hidroksilo grupes (34). Po 48 val. KT pašalinomi iš daugumos organų ir aptikti tik kepenyse, kuriose jie išliko iki stebėjimo pabaigos (5 parų). 24 % suleistų KT dozės iš organizmo pašalinti per kepenis su išmatomis ir per inkstus su šlapimu. Autorių duomenimis, KT gali būti pašalinamos tiek per kepenis, tiek per inkstus.

Chen Z. *et al.* savo rezultatus interpretuoja KT metabolinius kelius grupuodami pagal 3 KT būsenas: 1) laisvi (neagragavę) KT laisvai pašalinami per inkstus, 2) dalis baltymais aplipusių KT translokuojami kepenyse ir pašalinami su tulžimi, 3) didelius agregatus formuojančios dalelės ilgam laikui sulaikomos kepenyse (34). Toks skirstymas iš dalies paaiškina, kodėl kitų

autorių tyrimų duomenimis KT nepasišalina iš organizmo ir stebimi ilgą laiką susikaupę RES. Tai greičiausiai sąlygoja stipri KT sąveika su organizmo baltymais, jų tarpusavio sulipimas, agregacija, kuri sąlygoja KT fagocitozę ir sulaikymą kepenyse bei kituose RES organuose. Yra parodyta, kad ND stabilumas ir baltymų adhezija yra jautri ND kokybei, jų sintezės sąlygoms. Kadangi dažniausiai mokslinės laboratorijos tiria savo pačių susintetintus KT, jų fizikocheminės savybės yra unikalios ir tai sąlygoja skirtingą formaliai panašios struktūros ND pasišalinimą iš organizmo.

Auganti ND įvairovė didina jų grupavimo ir klasifikavimo poreikį. Siekiant efektyviai taikyti ND biomedicinoje, svarbu suprasti, kurios jų savybės labiausiai įtakoja jų stabilumą, pasiskirstymą, susikaupimą organizme ir pasišalinimą iš jo. Šiuo metu Europoje ir visame pasaulyje kuriami bendri skirtingų mokslo centrų projektai, duomenų bazės bei bendradarbiavimo tinklai, kurie siekia susisteminti sparčiai generuojamus duomenis ir iš jų gauti patikimas žinias apie ND sąveika su biologinėmis sistemomis bei poveikį joms, pvz. 7-osios bendrosios programos (FP7) projektas „Nanosafety cluster“, COST veikla „Modelling nanomaterial toxicity“, kurios dalyvė yra ir Lietuva. Šios žinios svarbios ne tik mokslinė prasmė, tačiau jos būtinos ir ND gamintojams, visuomeninėms organizacijoms bei valdančioms institucijoms, kurios siekia, kad ND produktų gamyba ir naudojimas būtų saugus. Europos komisijos prognozėmis pasaulinė ND rinka augs nuo $0,2 \cdot 10^{12}$ eurų 2009 m. iki $2 \cdot 10^{12}$ eurų 2015 m (59).

2.5. ND prasiskverbimas per apsauginį odos barjerą

Oda yra didžiausias žmogaus organas, kurio pagrindinė funkcija yra išorinio pasaulio jutimas ir apsauga nuo jo žalingų poveikių. Dėl savo didelio ploto oda domina mokslininkus kaip potencialus vaistų patekimo į organizmą kelias. Iš kitos pusės, įvairių medžiagų prasiskverbimas per odą svarbus kontroliuojant pavojingų junginių patekimą į organizmą. ND gebėjimas įveikti odos apsauginį barjerą susijęs su jų taikymu vaistų pernašoje (60, 61), vakcinacijoje (62), kosmetologijoje (63, 64), siekiant antibakterinio poveikio

(65) ir spartesnio žazdų gijimo (66). Manoma, kad ND produkcija išaugs nuo 10^3 tonų per metus 2010 m. iki 10^5 tonų per metus 2020 m. (67). Taigi ND prasiskverbimas per odą ir susikaupimas organizme yra svarbus nanotoksikologijos klausimas, kurio aktualumas vis auga. Šiuo metu didžiausi nanotaršos šaltiniai yra kelių transporto (60%) ir pramoninių degimo procesų (23%) išmetamosios dujos, tačiau ateityje vis didesnę dalį sudarys biomedicinoje ir buities produktuose naudojamos sintetinės ND.

Odos raginio epidermio barjerą sudaro suplokštėję negyvi korneocitai ir tarpląstelinis užpildas, kurio didžiąją dalį sudaro lipidai. Tarpląstelinės molekulės suriša korneocitus bei jų liekanas į ištisinį tinklą ir taip formuoja raginio epidermio barjerą. Fosfolipidų molekulės gali formuoti įvairias erdvines struktūras, priklausomai nuo orientacijos: jos gali sąveikauti hidrofilišiomis galvutėmis bei hidrofobišiomis riebiųjų rūgščių grandinėmis ir tokiu būdu sudaryti tam tikras erdvines ertmes ar poras, pro kurias gali prasiskverbti iš išorės patekę junginiai. Teoriniais apskaičiavimais esant sausai odai fosfolipidų galvutės gali suformuoti ~3 nm skersmens hidrofilišias ertmes, pro kurias galėtų prasiskverbti vanduo bei hidrofilišiai junginiai, įskaitant ir kai kurias ND (68). Gilesnius epidermio sluoksnius sudaro gyvos ląstelės tarpusavyje sąveikaujančios glaudžiosiomis, adhezinėmis jungtimis ir dezmosomomis. Reginį sluoksnį įveikusios medžiagos gali patekti į dermą tarpląstelinės difuzijos būdu arba migruodamos per ląstelių vidų. Pastarasis kelias yra sunkiau įveikiamas dėl daugkartinės hidrofobinės ir hidrofilišios terpės permainų bei viduląstelinio metabolizmo, kurio metu išorinės medžiagos gali būti surišamos, suskaidomos ar užlaikomos ląstelių viduje. Papildomas trukdis polinių KT prasiskverbimui gali būti rūgštinis odos pH, kuris yra tarp 4,7 ir 5,5 (69).

Nors pastaruoju metu daugėja ND prasiskverbimo per odą tyrimų, jų gebėjimas patekti į gilesnius audinius nėra susistemintas ir apibendrintas. Manoma, kad normali sveika oda yra atspari gamtinėms (virusams, dulkėms, alergenams) ir dirbtinėms ND, kurių dydis viršija 20 nm (62). Yra parodyta, kad ZnO and TiO₂ ND, kurios naudojamos apsauginiuose kremuose, užstringa

paviršiniuose raginio epidermio sluoksniuose ir nepasiekia gilesnių gyvų ląstelių sluoksnių (70).

Išsamus Baroli B. *et al.* tyrimas atskleidė, kad, ant žmogaus odos *in vitro* užtepus mažesnio nei 10 nm dydžio Fe₃O₄ ND (kurių paviršius stabilizuotas sulfosukcinatu), histologijos ir pralaidumo elektroninės mikroskopijos metodais jų susikaupimas stebėtas paviršiniuose raginio epidermio sluoksniuose (69). Autoriai pažymi, kad elektroninė mikroskopija yra aukštos skiriamosios gebos metodas, tačiau atskirti pavienes ND gilesniuose odos yra sudėtinga dėl nepakankamo kontrasto su epidermio dariniais, pvz., tarpląstelinėmis jungtimis. ND šerdį sudaranti geležis gali būti aptikta elektroninę mikroskopiją derinant su Rentgeno spindulių energijos dispersijos spektroskopija (EDS), kuri suteikia galimybę atlikti elementinę bandinio analizę. Šiuo metodu ND buvo aptiktos ne tik raginiame epidermio sluoksnyje, bet ir ties jo riba su gyvų ląstelių sluoksniu. ND susikaupimas šioje srityje aiškinamas tarpląstelinėmis jungtimis tarp gyvų keratinocitų (blizgiajame ir grūdėtame epidermyje), kurios sudaro papildomą užtvarą ND prasiskverbimui. Kaip ir dauguma kitų autorių, tyrėjai stebėjo ND susikaupimą plauko folikulo viršutinėje dalyje, odos įlinkiuose bei raukšlėse.

Vis dėlto yra parodyta, kad kai kurios mikroemulsijos, kietų lipidų ND, metalų oksidai bei kvantiniai taškai atitinkamomis sąlygomis gali patekti ir į gilesnius eksperimentinių gyvūnų epidermio sluoksnius bei dermą (71, 72). Nustatyta, kad KT prasiskverbimas priklauso nuo jų dydžio ir paviršiaus padengimo (73). Ant pelės odos *in vivo* užtepus 5 nm skersmens KT tirpalą, jie buvo aptikti ne tik raginiame epidermyje, bet ir gilesniuose jo sluoksniuose bei dermoje po 8 val. Po 24 val KT šiuose audiniuose nebebuvo aptinkami. Tuo tarpu kovalentiškai prie KT prijungus augalinį prolaminų klasės baltymą (angl. *zein*), susidariusios nanostruktūros dydis išaugo iki 24 nm ir tokie KT aptikti tik raginiame epidermyje ir į gyvų ląstelių sluoksnius neprasiskverbė per visą tyrimo laikotarpį (73). Taigi KT dydis yra viena svarbiausių savybių įtakojančių jų gebėjimą prasiskverbti per apsauginį odos barjerą.

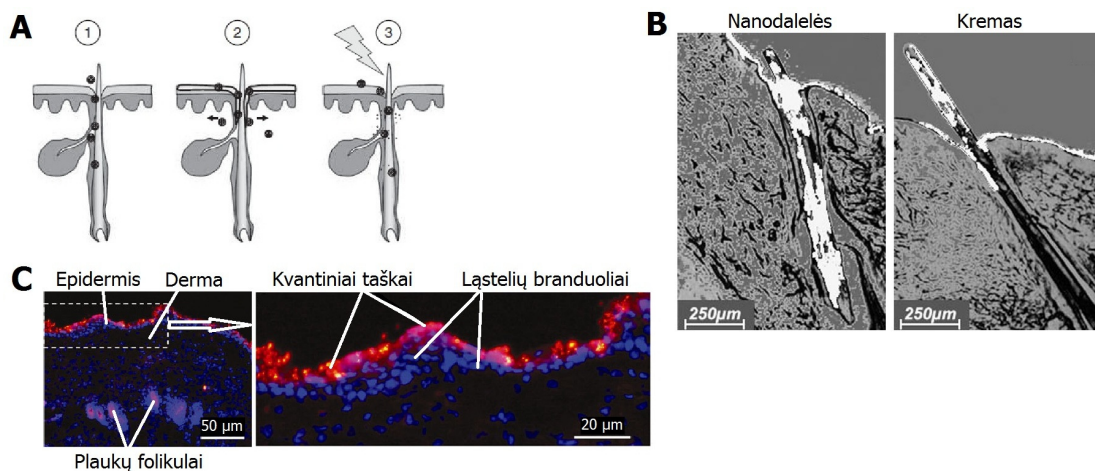
Kito tyrimo duomenys atskleidžia krūvio įtaką CdSe/ZnS KT prasiskverbimui per kiaulės odą *ex vivo*. Paviršiuje turintys PEG polimerą (neutralaus krūvio, HS=35 nm) bei karboksilo grupes (neigiamo krūvio, HS=15 nm) KT buvo aptikti tik epidermyje, tuo tarpu amino grupėmis dengti (teigiamo krūvio, HS=14 nm) KT aptikti ir dermoje (74). Šie rezultatai rodo, kad KT prasiskverbimui didelę reikšmę turi jų paviršiaus krūvis. Tikėtina, kad KT paviršiaus krūvis sąlygoja skirtingą sąveiką su organizmo biomolekulėmis, o svarbiausia baltymais, kurių adhezija paprastai padidina KT HS, įtakoja opsonizaciją, ląstelių endocitozę bei kitus procesus susijusius su KT prasiskverbimu per biologinius barjerus. Taigi nepaisant pradinio vienodo HS išmatuoto tirpale, patekus į biologinę aplinką teigiamų ir neigiamo paviršinio krūvio KT matmenys gali skirtis ir tai nulemia kitokį jų susikaupimą audiniuose.

Pastarieji tyrimai rodo, kad KT funkcionalizavimas biomolekulėmis ženkliai keičia jų erdvinis matmenis bei kitas fizikochemines savybes ir tai reikšmingai įtakoja jų biologinį pasiskirstymą. Didelę įtaką ND prasiskverbimui per odą turi ne tik fizikocheminės ND savybės kaip dydis, hidrofobiškumas, poliškumas ir pan., bet ir odos fiziologinė būklė. Yra parodyta, kad ant pelės odos užtepęs glicerolio ir vandens emulsijoje suspenduotus KT, jie aptinkami tik raginiame epidermyje, tačiau odą papildomai paveikus UV spinduliuote, jie aptinkami ir gilesniuose sluoksniuose (75). Panašūs rezultatai gauti veikiant odą ultragarsu, nuo kurio intensyvumo priklauso aukso ND įsiskverbimas į odą (76). Šie efektai gali būti grindžiami tuo, kad raginio epidermio barjerą sudaro negyvų korneocitų sancaupos, t.y. tankus, daugiasluoksnis įvairių hidrofobinių junginių tinklas, kuris veikiant UV spinduliuote ar ultragarsu yra dalinai pažeidžiamas ir daugėja porų, pro kurias lengviau patenka ND, kiekis. Mediciniais tikslais apsauginį raginio epidermio sluoksnį galima apeiti naudojant ir mikroadatėles, kurių pagalba ND išvirkščiamos į gilius epidermio sluoksnius.

Yra parodyta, jog pažeidus raginį sluoksnį, pavyzdžiui, atlikus odos dermabraziją, 14-18 nm dydžio KT gali prasiskverbti į gilesnius epidermio

sluoksnius ar netgi pasiekti dermą (74). Rizika, jog ND gali prasiskverbti pro raginį sluoksnį taip pat padidėja, jei oda yra kitaip mechaniškai pažeista, pavyzdžiui, atlikus odos priežiūros procedūras, kaip mezoterapija adatinu voleliu.

Ypatingas dėmesys yra teikiamas ND transfolikulinei pernašai (per plauko folikulą) dėl kelių priežasčių. Pirma, plauko kanale yra ženkliai plonesnis epidermio sluoksnis, kuris mažiau riboja ND difuziją į dermą. Pagrindinį barjerą sudarantis raginis epidermis dengia tik viršutinę kanalo dalį. Antra, viršutinė plauko folikulo dalis (*infundibulum*) formuoja įdubą, kuri padidina bendrą odos paviršiaus plotą ir jame gali susidaryti ND rezervuaras, iš kurio junginiai gali ilgą laiką skverbti gilyn (pav. 2.12). Tai naudinga siekiant pastovaus ir ilgalaikio junginių išsiskyrimo į odą, pvz., kremuose, farmokologijoje. Trečia, plauko folikulas yra tankiai apraizgytas kapiliarais ir jie pasižymi aktyvia kraujotaka – tai padidina junginių patekimo į kraujotaką tikimybę. Plauko folikule gausu kamieninių ir imuninės sistemos ląstelių, kurios yra dažni farmokologinio poveikio taikiniai. ND susikaupimas paviršiniuose odos sluoksniuose leidžia kurti išoriniu dirgikliu valdomas nanostruktūras, kurias paveikus šviesa, ultragarsu, magnetiniu lauku ar kita išorine jėga, jų sudėtyje esanti veiklioji medžiaga išsiskirtų į išorę ir patektų į gilesnius odos sluoksnius (pav. 2.12 A) (60, 72).



Pav. 2.12. ND prasiskverbimas per odą. A) Transfolikulinės ND pernašos taikymo strategijos: 1) ND susikaupia folikule ir veikia jame esančius taikinius

arba sąlygoja ilgalaikį susikaupimą odoje, bet į dermą nepatenka; 2) Atitinkamo dydžio ir paviršiaus ND prasiskverbia į dermą, iš kur gali rezorbuotis į kraują ir pasklisti po organizmą; 3) Folikule susikaupusias ND paveikus atitinkamu dirgikliu, jos pradeda išskirti savo sudėtyje esančias veikliąsias medžiagas (adaptuota pagal (72)). B) Polimerinių ND ir kremo sudėtyje esančio fluorescuojančio dažo (ryškiai baltas) susikaupimas kiaulės plauko folikule, rodantis, kad ND įsiskverbia giliau į folikulą ir jame ilgiau užsilaiko (adaptuota pagal (61)). C) Ant beplaukių pelių odos užteptų KT (raudoni) susikaupimas raginiame epidermio sluoksnyje, tačiau jų nėra gilesniuose gyvų ląstelių sluoksniuose (mėlynas - branduolių dažas DAPI) (adaptuota pagal (77)).

Nors dauguma ND taikymų susiję su jų patekimu į organizmą, jų sulaikymas paviršiniuose odos sluoksniuose ir neprasiskverbimas į gyvų ląstelių audinius taip pat gali būti panaudotas medicinoje bei kosmetologijoje. Pvz., metalų oksidų ND taikomos apsauginiuose kremuose nuo saulės (70). Ilgalaikis ND susikaupimas odoje naudingas siekiant pastovaus ir lėto prie ND prijungto vaisto išsiskyrimo (76). Taip pat ND gali pasitarnauti kaip kontroliuojamo vaistų pristatymo platforma („Trojos arklio“ strategija) – ND susikaupus raginiame epidermyje ar folikule, paveikus atitinkamu dirgikliu galima išlaisvinti jų viduje esančias veikliąsias medžiagas, pvz. ultragarsu ar temperatūra galima suardyti liposomines ND (76).

2.6. ND prasiskverbimas per placentos barjerą

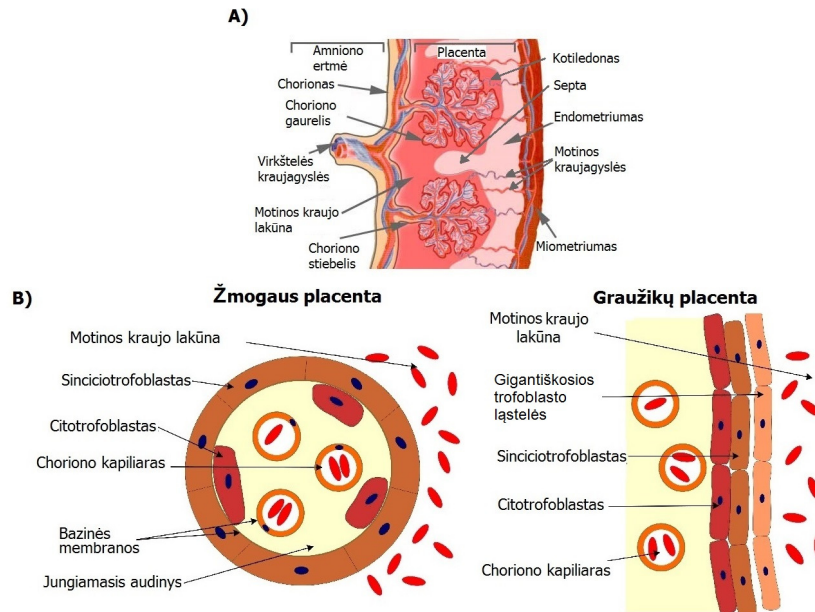
2.6.1. Motinos – vaisiaus barjero fiziologinės savybės

Pastaruju metu, sparčiai besivystant nanotechnologijoms, daugėja komercinių produktų savo sudėtyje turinčių nanodalelių (ND). Jomis pasaulyje taip pat itin domimasi dėl taikymų veterinarijoje bei medicinoje, tame tarpe ir kuriant farmokologines priemones nėštumo metu. Siekiant kontroliuoti ir optimizuoti teigiamą ar pašalinį ND poveikį, būtina išmanyti ND elgesį organizme. Visgi jų kaupimosi motinos bei vaisiaus audiniuose dėsniumai ir

galimi fiziologiniai efektai nėra pakankamai gerai ištirti. Vaisiaus stadijoje organizmas yra itin jautrus aplinkai ir kai kurie motinos aplinkoje (ore, vandenyje, maiste) esantys junginiai, kurių poveikis suaugusiam organizmui nežymus, gali sukelti nėštumo komplikacijų ar būti embriotoksiški (78). Galimas ND žalingas poveikis visų pirma priklauso nuo jų gebėjimo įveikti placentos barjerą ir kauptis vaisiaus audiniuose. Todėl nanotoksikologiniai tyrimai nėštumo metu dažniausiai susiję su ND prasiskverbimu per placentą ir patekimu į vaisiaus kraujotaką. Kita vertus, tikimasi, kad į vaisiaus kraujotaką nepatenkančios ND ateiptyje galėtų būti saugiai panaudotos nėščių moterų diagnostikoje bei gydyme (79). Šiame skyriuje apžvelgiama motinos – vaisiaus barjero fiziologija ir supažindinama su ND pernašos per placentos barjerą atliekamais tyrimais.

Placenta yra struktūrinis ir funkcinis tiltas tarp motinos ir vaisiaus, todėl ji patenkina visus besivystančio organizmo fiziologinius poreikius. Vaisius maisto medžiagas gali gauti per placentos diską (toliau vaidinsime tiesiog placenta), kuris yra esminis maisto medžiagų pernašos organas, ir per trynio maišo placentą. Placentos struktūra ženkliai skiriasi tarp rūšių, todėl trumpai aptarsime žmogaus ir graužikų (žiurkės, pelės) pavyzdžius, nes šios rūšys dažniausiai naudojamos moksliniuose tyrimuose.

Žmogaus placenta yra suskirstyta septomis į funkcinis vienetus vadinamus kotiledonais (pav. 2.13 A). Kiekviename jų yra vienas besišakojantis stiebinis choriono gaurelis, kuriame gausu vaisiaus kraujagyslių. Choriono gaureliuose vaisiaus kraują nuo motinos riboja kraujagyslių endotelis, jungiamojo audinio sluoksnis (chorioalantojaus mezoderma) ir trofoblastas (pav. 2.13 B). Pastarasis sudarytas iš vientiso susilieusių ląstelių sluoksnio – sinciotrofoblasto ir citotrofoblasto. Citotrofoblastas nesudaro vientiso sluoksnio ir turi bendrą bazinę membraną su sinciotrofoblastu. Motinos pusėje endometriumo kapiliarai, besiformuojant placentai, suyra ir kraujas išsilieja į lakūnas (sinusus), todėl motinos kraujas skalauja choriono gaurelius. Taigi pirminis ir pagrindinis medžiagų transporto barjeras iš motinos kūno yra sinciotrofoblasto ląstelių sluoksnis (80).



Pav. 2.13. A) Žmogaus placentos struktūra (adaptuota pagal (81)). B) Placentos barjerą formuojančių ląstelių sluoksnių palyginimas žmogaus ir graužikų organizme.

Graužikų placenta yra sudaryta iš trijų sluoksnių: decidualinės zonos, jungties zonos ir labirinto. Pastarąjį sudaro motinos kraujo sinusai, kurie skalauja plačiai išsišakojusius choriono gaurelius. Jų išsidėstymas primena labirintą (iš čia ir šios dalies pavadinimas). Skirtingai nuo žmogaus, pas graužikus yra du sinciotrofoblasto ląstelių sluoksniai ir jį nuo motinos kraujo papildomai skiria gigantiškųjų trofoblasto ląstelių sluoksnis (pav. 2.13 B). Todėl toks placentos tipas vadinamas hemotrichorioniniu, t.y. jis sudarytas iš trijų sluoksnių.

Abiem atvejais placentos barjerines savybes didžiąja dalimi apsprendžia trofoblasto ląstelių sluoksniai, tarpusavyje sujungti plyšinėmis, glaudžiosiomis jungtimis bei desmosomomis. Tarpląstelinės jungtis riboja interląstelinę medžiagų difuziją, ypač stambių makromolekulių (82). Todėl dauguma molekulių į vaisių patenka transląstelinio kelio ir jų pernaša priklauso nuo viduląstelinio proceso. Junginiai gali patekti į trofoblasto ląsteles pasyviai (difuzija, palengvinta pernaša) ir aktyviai (pinocitozė, transcitozė, nešiklių sąlygota pernaša ir kt.). ND į ląsteles patenka endocitotiniaisiais keliais, kurių

tipas ir efektyvumas priklauso nuo paviršinių ND savybių ir ląstelių tipo (83-85). Todėl tikėtina, kad ND patekimas į vaisių taip pat turėtų vykti endocitotiniiais procesais. Trofoblasto ląstelės biocheminiu požiūriu yra asimetrinės, t.y. apikalinėje ir bazalinėje membranoje skiriasi receptorių bei pernašos baltymų raiška. Tai sudaro sąlygas organizmui kontroliuoti junginių pernašos kryptį (į ar iš vaisiaus) ir greitį. Tuo pačiu tai gali lemti nevienodą ND pasisavinimą ir šalinimą į/iš vaisiaus kraujotakos.

Kai kurie autoriai nurodo, kad egzistuoja transtrofoblastiniai kanalai, t.y. iš fosfolipidinių membranų sudarytos vamzdinės sistemos, kurios formuojasi įlinkstant trofoblasto ląstelių membranoms. Manoma, kad sinciciotrofoblasto membrana pradeda įlinkti bazaliniame paviršiuje, įduba gilėja į ląstelę, ją perveria ir atsiveria apikalinėje membranoje (86). Teoriškai jie galėtų funkcionuoti kaip nuo slėgio priklausomi vožtuvai ir reguliuoti skysčių bei maisto medžiagų transportą keičiantis kanalo skersmeniui 2-25 nm ribose. Toks skersmuo būtų pakankamas kai kurių ND difuzijai. Visgi šių kanalų fiziologinė prasmė nėra plačiai iširta ir dėl jų buvimo ginčijamasi tarp skirtingų mokslinių grupių (79, 87).

Perneštos per trofoblastą medžiagos gali būti paveikiamos choriono gaurelių jungiamojo audinio. Jame yra Hofbauerio ląstelių, kurios pasižymi pinocitotiniu ir fagocitotiniu aktyvumu (88). Papildomą pernešamų junginių atranką vykdo ir choriono kapiliarų endotelis, kurį taip pat sudaro tankiomis tarpląstelinėms jungtimis susietas ląstelių sluoksnis, verčiantis molekules migruoti transląsteliniais keliais.

Visceralinė trynio maišo placenta yra alternatyvus medžiagų pernašos graužikuose kelias. Jos reikšmė didžiausia ankstyvose embriogenezės stadijose, kol placentos diskas nėra visiškai susiformavęs. Ji susidaro trynio maišo dangalo sąlyčio su trofoblastu plote. Šioje dalyje endometriumo kapiliarai yra išlaikę savo struktūrą, todėl motinos kraujas neišsilieja ir motinos endotelis sudaro papildomą barjerinį ląstelių sluoksnį (89). Tarp trofoblasto ir parietalinės trynio maišo endodermos yra stora bazinė membrana, vadinama Reicherto membrana. Bendrai trynio maišo placentos barjerą sudaro: motinos

kapiliarų endotelis, gigantiškos trofoblasto ląstelės, Reicherto membrana, endoderma ir vaisiaus kapiliarų endotelis. Pažymima, kad šiuo keliu į vaisių gali patekti kai kurios makromolekulės, kurios sulaikomos placentos diske (90). Manoma, kad sudėtingos baltyminės struktūros Reicherto membrana veikia kaip pasyvus filtras didelėms molekulėms (γ -globulinams, feritinui) ir būtent ji riboja pernešamų junginių dydį. Todėl tikėtina, kad kai kurios placentos disko sulaikomos ND galėtų patekti į vaisių per trynio maišo placentą.

Junginių patekimas į vaisių ir jų sukeltas poveikis priklauso nuo embriogenezės stadijos. Išskiriami pagrindiniai kritiniai raidos etapai, kuomet vaisius yra jautriausias: implantacija, placentos formavimasis ir organogenezė. Šių procesų metu žalingi poveikiai gali sukelti įgimus apsigimimus ar žūtį. Iki implantacijos embrionas yra veikiamas motinos endometriumo liaukų sekretu, kuriame gausu maisto ir signalinių medžiagų, pvz., fermentų, augimo veiksnių, gliukozės, hormonų ir kt. (91, 92). Todėl šiame raidos etape tam, kad ND paveiktų embrioną, jos turėtų patekti į endometriumo liauką ir išsiskirti su jų sekretu. Po implantacijos embrionas yra apsuptas motinos audinių ir tampa vis labiau priklausomas nuo motinos organizmo. Taigi šiame etape vyksta aktyvesnis motinos kraujyje esančių junginių, tarp jų ir ND, įsissavinimas. Pagrindinis barjero vaidmuo suteikiamas placentai. Visgi ji visiškai susiformuoja tik pirmojo nėštumo trimestro pabaigoje, o iki to laiko embrionas nėra pakankamai apsaugotas nuo motinos audiniuose esančių ksenobiotikų. Šiuo laikotarpiu vyksta trofoblasto invazija į gimdą, endometriumo ląstelių virškinimas ir audinių persitvarkymas. Tai padidina įvairių junginių patekimo į embrioną tikimybę (93). Susiformavus placentai, ji tampa natūraliu barjeru didelei junginių įvairovei. Jų pernaša yra efektyviai reguliuojama keičiant trofoblasto ir endotelio ląstelių paviršinių pernašos baltymų raišką, ląstelių metabolinį aktyvumą, hemodinamiką bei kitais būdais (94). Placentoje yra fagocituojančių ląstelių, kurios šalina egzogeninius antikūnus, ji sekretuoja citokinus bei prostaglandinus, atlieka osmoreguliaciją (95). Taigi šioje stadijoje placenta yra itin aktyvi ir efektyviausiai atlieka savo apsauginę funkciją. Embriogenezės pabaigoje

placenta persitvarko prieš gimdymą. Placentoje keičiasi tarpląstelinio užpildo sudėtis, daugėja jungiamojo audinio, silpnėja kai kurios tarpląstelinės jungtys, suyra kai kurios kraujagyslės, plonėja trofoblastas – visi šie struktūriniai pakitimai silpnina berjerinę placentos funkciją ir didina jos pralaidumą, pvz., kai kuriems infekcijų sukelėjams (96, 97). Taigi nėštumo pabaigoje besikeičiant apsauginei placentos funkcijai didėja ir ND patekimo į vaisių tikimybė.

2.6.2. ND prasiskverbimo per placentos barjerą tyrimai

Kol kas yra atlikti pavieniai ND prasiskverbimo per placentą tyrimai *in vivo*. Chu M.Q. *et al.* tyrė CdTe šerdies KT susikaupimą pelės embrionuose (3). KT buvo suleisti į uodegos veną likus 1-5 d. iki gimdymo, t.y. kai placenta yra visiškai susiformavusi. Cd susikaupimas embrionuose priklausė nuo KT dydžio ir dangalo ir daugiausiai siekė iki 0,6% suleistos dozės (arba 20 µg Cd). Nustatyta, kad KT pernaša per placentą priklauso nuo KT dydžio ir paviršinio dangalo. 1,7 nm šerdies skersmens KT susikaupė reikšmingai daugiau negu 2,6 nm skersmens. KT paviršių modifikavus merkaptopropionine rūgštimi (MPR), Cd susikaupimas buvo didesnis negu naudojant KT, kurių šerdis padengta SiO₂ arba PEG sluoksniu. KT HS nenustatytas. KT susikaupimas buvo tiriamas indukuotos plazmos atomo emisijos spektrometrijos metodu, kuris suteikia informacijos apie Cd kiekį, tačiau nepasako, ar jis yra KT nanokristalo sudėtyje, ar motinos organizme KT suiro ir į embrioną pateko laisvi Cd²⁺ jonai ir (arba) juos chelatuojantys baltymai. KT degradacija į šiuos junginius buvo stebėta kitų autorių (5, 98). Fluorescencinės mikroskopijos metodu, kuris yra jautrus tik KT FL (bet ne Cd²⁺), KT embrionuose nebuvo aptikta. Cd²⁺ patekimas į embrionus priklauso nuo placentos išsivystymo, tačiau įmanomas visose embriogenezės stadijose (99). Taigi Cd prigimtis embrionuose lieka dviprasmiška ir KT apvalkalo įtaka Cd susikaupimui gali būti aiškinama dvejopai: a) padidėjęs bendras dalelės skersmuo sąlygoja prastesnę KT pernašą per placentą; b) papildomas dangalas stabilizuoja KT šerdį ir mažina kitų Cd

junginių susidarymą organizme. Autoriai taip pat nustatė embriotoksinį šių KT poveikį, kuris teigiamai koreliavo su Cd kiekiu embrionuose.

Įdomūs rezultatai buvo gauti ištyrus TiO_2 ND, kurios naudojamos ir apsauginiuose saulės kremuose, susikaupimą nėščią pelių organizme. Suleidus į veną 70 nm ar 143 nm skermens fluorescenciškai žymėtų ND, didžiausias jų suikaupimas buvo stebėtas motinos kepenyse (78). Elektroninės mikroskopijos duomenimis ND buvo aptiktos placentoje, trofoblasto ląstelėse, taip pat vaisiaus kepenyse bei smegenyse. Tuo tarpu didesnės – 300 nm ir 1000 nm – dalelės aptiktos tik motinos audiniuose ir į embrionus nepateko. Toks ND pasiskirstymas aiškinamas tuo, kad mažesnės dalelės pateko į embrionus aktyvios pernašos būdu arba tiesiogiai pažeidė trofoblastą ir tai sąlygojo jų difuziją į vaisiaus audinius. ND taip pat sukėlė embrionų augimo sulėtėjimą, rezorbcijas, placentos disfunkciją ir kitus funkcinis bei struktūrinius pakitimus. ND patekimas į vaisiaus smegenis aiškinamas nevisišku hematoencefalinio barjero išsivystymu tirtoje embriogenezės stadijoje.

ND prasiskverbimo per placentą priklausomybė nuo dydžio buvo parodyta ir tiriant aukso ND lokalizaciją žiurkių modelyje (100). Parodyta, kad į veną suleidus 1,4 nm skersmens aukso ND, jų susikaupimas embrionuose siekė 0,06% suleistos dozės, o tokios pat sudėties 18 nm ND tik 0,005%. Panašiu satykiu ND kaupėsi ir placentoje. Šie skirtumai grindžiami tuo, kad mažesnės ND lengviau prasiskverbia per placentą ir tuo, kad jos ilgiau cirkuliuoja kraujotakoje. Didesnės ND yra geriau atpažįstamos RES makrofagų, todėl greičiau pašalinamos iš kraujo plazmos ir mažiau susikaupiamos kituose audiniuose. Autoriai taip pat nustatė, kad 1,4 nm ND geriau prasiskverbia per oro-plaučių ir inkstų biologinius barjerus bei šalinamos su šlapimu (100). ND dydis turėjo didelės reikšmės citotoksiniams efektams: 1,4 nm dydžio ND yra toksiškiausios – jų koncentracija, siekiant sukelti pusės kultivuojamų HeLa ląstelių žūtį (IC_{50}), buvo 46 μM , 0,8 nm ND IC_{50} siekė 250 μM , o 15 nm ND IC_{50} buvo net 6300 μM (100). Taigi 15 nm ir didesnės ND yra saugiausios embrionams dėl jų greito pašalinimo iš kraujotakos, sulaikymo placentoje bei mažiausio citotoksiškumo.

Dauguma *in vivo* tyrimų yra atliekama su eksperimentiniais gyvūnais, kurių placentos bei kitų organų fiziologinės ypatybės ženkliai skiriasi nuo žmogaus. Todėl gyvūniniai modeliai gali neatspindėti žmogaus organizme vykstančių procesų. Tokius tyrimus papildoma tyrimai su žmogaus audiniais *ex vivo* bei *in vitro*, duodantys vertingos informacijos apie žmogaus audinių sąveiką su ND. Po gimdymo placenta dažniausiai būna nepažeista ir funkcionali, todėl ji naudojama ND pernašos tyrimuose. Tam tikslui taikoma placentos perfuzija maitinimo terpe tiek iš motinos pusės, tiek iš vaisiaus. ND perėjimas į vaisių kiekybiškai vertinamas įlašinant ND į motinos perfuzatą ir matuojant ND koncentraciją vaisiaus perfuzate. Tokie tyrimai patogūs dėl tiksliai kontroliuojamų eksperimentinių sąlygų. Ištyrus PEG dengtų 10-30 nm dydžio aukso ND pernašą perfuzijos modelyje nustatyta, kad jų vaisiaus perfuzate neatsirado nepaisant to, kad motinos kompartmente jų koncentracija per 6 val sumažėjo 36% (101). Atlikus placentos preparatų elektroninę mikroskopiją paaiškėjo, kad ND susikaupė placentos audiniuose, daugiausiai sinciotrofoblasto ir citotrofoblasto ląstelėse. Aukso ND vaisiaus jungiamajame audinyje ir endotelyje nebuvo aptiktos. Tai rodo, kad tokio tipo ND efektyviai sulaikomos placentos barjero ir vaisiaus audinių nepasiekia. Reikia paminėti, kad žmogaus placentos perfuzijos modelis yra artimas realiems nėštumo pabaigoje vykstantiems procesams, tačiau ankstesnėmis embriogenezės stadijomis placentos gebėjimas sulaikyti ND gali skirtis.

Panašiu metodu buvo tirta fluorescenciškai žymėtų 50-500 nm neigiamai įkraudų polistireno ND pernaša per placenta. Pagrindiniai rezultatai rodo, kad ND pernaša priklauso nuo jų dydžio: iki 240 nm skersmens susikaupė placentoje ir pateko į vaisiaus audinius, o 500 nm skersmens ND per 6 val į vaisių nepateko (102). Šios ND (iki 25 µg/ml perfuzate) neturėjo įtakos audinių gyvybingumui ir barjerinei placentos funkcijai. Autoriai mano, kad ND galėjo prasiskverbti keliais būdais: veikiant difuzijai, transląstelinei vezikulinei pernašai ar per transtrofoblastinius kanalus. Visgi labiausiai tikėtina, kad ND iki 120 nm pernešamos nuo kalveolino ar klatrino priklausomos endocitozės mechanizmais. Difuzija yra mažai tikėtina, nes ND koncentracija vaisiaus

kompartimente nepriklausė nuo jų koncentracijos motinos perfuzate. Tuo tarpu 240 nm dydžio ND pernašos mechanizmas išlieka neaiškus, nes minėtų tipų endocitotinės pūslelės paprastai nesiekia tokių matmenų, kad galėtų talpinti šio dydžio ND.

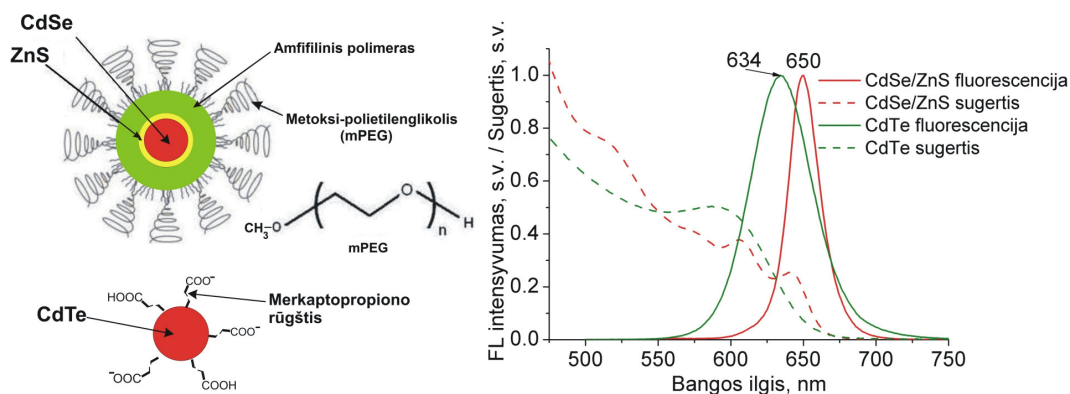
Kitas perfuzijos metodu pagrįstas tyrimas parodė, kad ženkliai mažesni 5-6 nm PAMAM dendrimerai vaisiaus perfuzate aptinkami jau po 15 min, jų koncentracija augo viso tyrimo metu ir jo pabaigoje (po 5,5 val) siekė iki 3% koncentracijos motininiam perfuzate (79). Placentos audinių mikroskopinė analizė atskleidė, kad ND daugiausiai buvo aptinkamos aplink vaisiaus kapiliarus jungiamajame audinyje. Tik pavienėse trofoblasto ląstelėse galima buvo aptikti dendrimerų. Tai rodo, kitokį ND pasiskirstymą negu anksčiau aptartame polisterino ND tyrime (102). Manoma, kad dendrimerai įveikė trofoblasto barjerą interląstelinės difuzijos būdu, o transląstelinis transportas yra antraeilės svarbos šioms ND.

Aptarti tyrimai rodo, kad ND lokalizacija placentoje ir jų pernašos į vaisių efektyvumas priklauso nuo fizikocheminių ND savybių, iš kurių svarbiausios yra geometriniai matmenys ir paviršinės savybės. Tuo tarpu ND šerdies sudėtis svarbi vertinant ND stabilumą ir ilgalaikį poveikį audiniams. Mažos ND gali įveikti trofoblasto sluoksnį interląstelinės difuzijos dėka, tačiau didesnių ND migraciją riboja tarpląstelinė porų dydis, todėl jos gali būti pernešamos tik per ląstelių vidų. Yra parodyta, kad ND endocitozė ir jų viduląstelinis transportas labai priklauso nuo ND paviršiaus krūvio, lipofiliškumo, funkcionalizavimo biomolekulėmis ir kitų savybių (40, 85, 103). Be to ND savybės, joms patekus į kraują gali ženkliai pakisti dėl sąveikos su biomolekulėmis, opsonizacijos. Todėl praktiškai kiekvieno tipo ND gebėjimą įveikti placentos barjerą reiktų vertinti atskirai, nes net ir maži ND savybių skirtumai gali ženkliai paveikti jų lokalizaciją organizme.

3. MEDŽIAGOS IR METODAI

3.1. Medžiagos

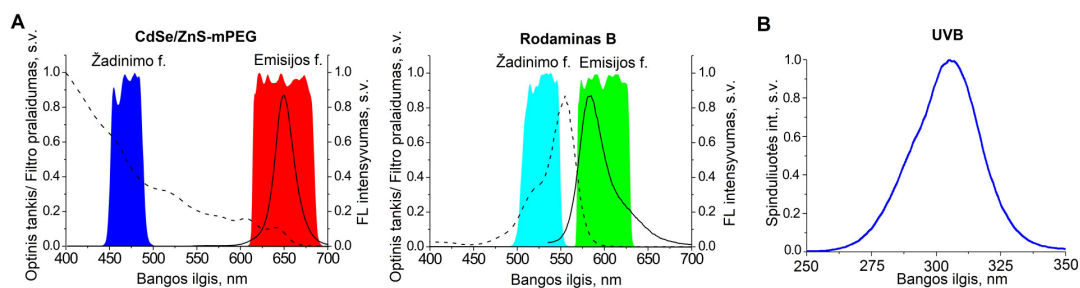
- 1) CdSe šerdies ir ZnS apvalkalo KT (CdSe/ZnS), kurių paviršius modifikuotas amfifiliniu polimeru ir metoksi-polietilenglikolio (mPEG), kurio $M_{mPEG}=5000$ g/mol, sluoksniu ($\lambda_{fl}=655\pm 5$ nm, "QTracker-655", Invitrogen Inc., JAV). Toliau tekste – CdSe/ZnS-mPEG. Struktūra ir spektroskopinės savybės pateiktos (pav. 3.1);
- 2) CdTe šerdies KT, dengti merkaptopropiono rūgštimi (MPR) ($\lambda_{fl}=630\pm 5$ nm, gamintojas PlasmaChem GmbH, Vokietija). Toliau tekste – CdTe-MPR. $M_{CdTe-MPR}\approx 9\cdot 10^5$ g/mol;
- 3) NaCl (grynumas >99,5%, gamintojas Sigma-Aldrich, Vokietija);
- 4) Rodaminas B, $M=479$ g/mol (gamintojas Sigma-Aldrich, Vokietija);
- 5) Ketamino hidrochloridas, 50 mg/ml, $M=274$ g/mol (gamintojas Rotexmedica, Prancūzija);
- 6) Formaldehido tirpalas 37%, $M=30$ g/mol (gamintojas Sigma-Aldrich, Vokietija);
- 7) Glicerolis, $M=92$ g/mol (gamintojas Sigma-Aldrich, Vokietija).



Pav. 3.1. Tyrime naudotų CdSe/ZnS-mPEG ir CdTe-MPR KT struktūrų modeliai ir jų spektroskopinės savybės distiliuotame vandenyje.

3.2. Prietaisai

- 1) Fluorescencinis spektrometras Cary Eclipse (Agilent Technologies, JAV). Gyvūnų audinių spektrų matavimui naudojamas bifurkacinio šviesolaidžio modulis ($d_{\text{antgalio}} = 5 \text{ mm}$, $S_{\text{matuojamo ploto}} \approx 19,6 \text{ mm}^2$);
- 2) Sugerties spektrometras Cary 50 (Agilent Technologies, JAV);
- 3) Fluorescencinis mikroskopas TE-2000U su konfokalinio skanavimo sistema C1si (Nikon, Japonija). RGB detektoriaus filtrų pralaidumo sritys: 433-467 nm (mėlynas kanalas), 500-590 nm (žalias kanalas), 620-755 nm (raudonas kanalas). Spektrinis detektorius jautrus 400-750 nm srityje. Naudota 5 nm spektrinė skiriamoji geba. Abu detektoriai skiria 2^{12} šviesos intensyvumo lygių;
- 4) Eksperimentinių gyvūnų fluorescencinio vaizdinimo sistema Ibox Scientia-800 (UVP, Didžioji Britanija). $8 \cdot 10^6$ pikselių CCD kamera jautri 400-1000 nm srityje, skiria 2^{16} šviesos intensyvumo lygių. Naudoti žadinimo ir emisijos filtrai, kurių pralaidumo charakteristikos pateiktos pav. 3.2 A;
- 5) Xe dujų lempa Max-302 (Asahi Spectra, Japonija) ir sugerties filtrai UFS-1 ir ZS-20, kurių bendrai sąlygotas spinduliuotės spektras pateiktas pav. 3.2 B;
- 6) Centrifūga Mini Spin Plus (Eppendorf, Vokietija);
- 7) Svarstyklės GR-202 (A&D Instruments, Japonija).



Pav. 3.2. A) Fluorescencinio vaizdinimo sistemos žadinimo ir emisijos filtrų charakteristikos CdSe/ZnS-mPEG ir rodaminio B FL detekcijai (spalvotos sritys) ir šių fluoroforų sugerties bei FL spektrai. B) Pelių odos švitinimo metu naudotos UVB spinduliuotės spektras.

3.3. Eksperimentiniai gyvūnai

Gyvūnai - *Balb/c* linijos pelės (m=20–25 g) ir *Wistar* žiurkės (m=280–320 g) – gauti iš Laboratorinių gyvūnų veisimo, auginimo ir tyrimo centro (Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras). Eksperimentams buvo gautas Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas Nr. 0190 (išduotas 2009-03-23) atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais. Visi veiksmai su gyvūnais buvo atliekami laikantis Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES. Gyvūnai buvo laikomi pastovios temperatūros, drėgnumo ir apšvietimo ciklo (12 val. šviesos/12 val. tamsos) sąlygomis. Maisto ir švaraus vandens buvo teikiama neribojamai. Prieš atliekant eksperimentus gyvūnai buvo aklimatizuojami ne mažiau kaip 7 dienas. Su gyvais gyvūnais dirbo FELASA C kategoriją turinti specialistė.

Siekiant ištirti KT susikaupimą nėščių žiurkių organizme, patelės nakčiai buvo paliekamos su patiniais. Praėjus 12 valandų iš žiurkės makšties buvo paimamas tepinėlis ir mikroskopu nustatoma estralinio ciklo estruso stadija bei ieškoma spermatozoidų. Diena, kai patelės makšties tepinėlyje rasta spermatozoidų, laikoma nuline embriogenezės para. KT buvo suleidžiami į pilvo ertmę 13 nėštumo parą.

Po eksperimentų gyvūnai buvo žudomi pelėms atliekant cerebrospinalinę dislokaciją, o žiurkėms suleidžiant letalią 50 mg ketamino dozę.

3.4. KT lokalizacijos kraujagsylėse tyrimai

Siekiant ištirti KT pasiskirstymą organizme ir įvertinti jų kaupimąsi kraujagylių sienelėse, pelėms į uodegos veną buvo suleidžiama 200 μ l $4 \cdot 10^{-7}$ M CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo (n=6 gyvūnai). 3 gyvūnai buvo žudomi praėjus 1 val. ir 3 praėjus 24 val. po injekcijos. Kontrolinės grupės pelėms buvo suleidžiama fiziologinio tirpalo (n=3 gyvūnai). Buvo preparuojama oda (iš suleidimo vietos), kepenys, inkstai, čiobrialiaukė, galvos smegenys, šlaunies raumuo, širdis, plaučiai, blužnis bei kraujas (imta 50 μ l iš širdies). Organai buvo supjaustomi. Dalis medžiagos naudota fluorescencinei spektroskopijai

(kraujo plazmos tirpalas parengtas kaip ir žiurkės atveju – žr. 3.8. sk.), kita dalis buvo šaldoma 253 K temperatūroje, o trečia dalis fiksuojami 4% formaldehido tirpale ne trumpiau negu 24 val. siekiant parengti jų parafininius preparatus (3.9. sk.).

Užšaldyti organai buvo pjaustomi skalpeliu ir ~0,5 mm storio pjūviai dedami ant objektinio stiklelio, dedamas dengiamasis stiklelis ir atliekama jų konfokalinė fluorescencinė mikroskopija.

3.5. Fluorescencinė spektroskopija

KT ir kraujo plazmos tirpalų FL matuota Varian Cary Eclipse spektrometru 1 cm optinio kelio plastikinėse kiuvetėse. Žadinančios spinduliuotės bangos ilgis $\lambda_{\text{žad}}=450$ nm.

Išpreparuotų organų FL spektroskopija *ex vivo* atlikta šviesolaidiniu prietaiso moduliu ($S_{\text{matuojamo ploto}} \approx 20$ mm²). Prieš matavimus organai buvo praplauti 0,9% NaCl tirpalu bei nusausinti. Visi matavimai atlikti kambario temperatūroje, bandinius laikant tamsoje. Pateikiami organų spektrai, gauti iš ne mažiau kaip 3 gyvūnų, kiekvieną matuojant po 3 kartus. Spektrai buvo vidurkinami, atimamas foninio signalo lygis (ties 750 nm) ir normuojami ties bangos ilgiu, kur KT FL yra nežymi ir nepasireiškia kraujo sugertis, t.y. ties 610 nm. Kai kuriems organams normavimo sritis buvo keičiama 570-620 nm srityje atsižvelgiant į KT FL intensyvumą ir kraujo reabsorbiciją. Duomenys apdoroti OriginPro 8 programine įranga.

3.6. KT ir Rodamino B pasiskirstymo odoje tyrimai

CdSe/ZnS-mPEG KT buvo suleidžiami pelėms po oda siekiant ištirti jų lokalizaciją odos audiniuose. Visi injekciniai tirpalai buvo rengiami naudojant 0,9 % NaCl tirpalą kaip tirpiklį. Suleidžiama 50 µl $4 \cdot 10^{-7}$ M CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo į šlaunies (n=4 gyvūnai) ir pado (n=1 gyvūnas) poodį. Siekiant palyginti KT lokalizaciją audiniuose su mažos molekulinės masės organiniais dažikliais buvo pasirinktas dažas rodaminas B (n=1 gyvūnas). Jo suleista 50 µl $5 \cdot 10^{-4}$ M po oda į šlaunį. Norint įvertinti KT patekimą į prakaito liaukas po 1

val., vienai pelei KT buvo suleisti į letenos pado poodį. Praėjus 1 val. (n=4 gyvūnai) ir 24 val. (n=1 gyvūnas) pelės buvo žudomos, preparuojami organai, kuriuose spektroskopiškai aptikta KT FL: oda, raumuo, limfmazgiai. Organai buvo fiksuojami 4% formaldehido tirpale ne mažiau 24 val.

3.7. Fluorescencinis gyvūnų vaizdinimas

Atlikus poodinę fluoroforų injekciją (žr. 3.6. sk.), jų pasiskirstymas organizme buvo stebimas UVP Ibox Scientia-800 fluorescencinio vaizdinimo sistema. Eksperimentų metu gyvūnai buvo migdomi 1,5% sevoflurano dujomis ir laikomi ant šildomo stalelio palaikant 31⁰C temperatūrą. KT ir rodamino B FL žadinimui ir detekcijai naudoti filtrai, kurių pralaidumo sritys yra šios: KT_{žadinimo} 450-490 nm, KT_{emisijos} 615-685 nm, Rodamino B_{žadinimo} 504-550 nm, Rodamino B_{emisijos} 570-630 nm (3.2 pav. A). Papildomai buvo atliekamas gyvūnų vaizdinimas, apšvietus kūną UV lempa ir registruojant vaizdus fotoaparatu Panasonic DMC-FS10.

3.8. KT ir Rodamino B prasiskverbimo per odą tyrimai

KT ir rodamino B tirpalai rengiami distiliuoto vandens ir glicerolio (santykiu 1:4) mišinyje siekiant minimizuoti tirpalo džiuvimą ir padidinti klampumą. CdSe/ZnS-mPEG KT koncentracija $2,5 \cdot 10^{-6}$ M, o rodamino B $5 \cdot 10^{-4}$ M. Pelė migdoma 2,5 mg ketamino narkoze, nugaroje nuskutamas kailis 3x3 cm plote. Ant skustos odos dedamas juoda plėvelė su kvadratinėmis skylėmis, kurios padalina odą į keturias 1 cm² ploto dalis. Jos paveikiamos skirtingai: 1) užtepama KT tirpalo pertekliumi; 2) užtepama KT tirpalo ir švitinama UVB spinduliuote (3.2 pav. B) 30 min, 16,8 mW galia (bendra spinduliuotės dozė $E = 30,2 \text{ J/cm}^2$); 3) užtepama tirpiklio be fluoroforų, ir švitinama tokia pačia UVB spinduliuotės dozė; 4) tik užtepama tirpiklio (n=3 gyvūnai). Rodamino B atveju oda nebuvo švitinama, t.y. plotas padalinamas į dvi dalis (n=2 gyvūnai). Odos FL spektrai ($\lambda_{\text{žad}}=450 \text{ nm}$) buvo matuojami prieš užtepant KT, užtepus KT, pašvitinus ir praėjus 1 val po švitinimo siekiant įvertinti KT spektroskopinių savybių pokyčius veikiant UVB spinduliuotei.

3.9. KT prasiskverbimo per placentos barjerą tyrimai

Žiurkėms 13-tą nėštumo parą suleidžiama 500 µl $8 \cdot 10^{-7}$ µM CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo.

KT farmakokinetiniai matavimai buvo atliekami imant 50 µl kraujo mėginius iš žiurkių uodegos venos praėjus 0–24 val po KT injekcijos į pilvo ertmę. Kraujas buvo iškart sumaišomas su 50 µl heparino tirpalo siekiant išvengti krešėjimo. Vėliau tirpalai buvo skiedžiami iki 1,5 ml tūrio 0,9% NaCl tirpalu ir centrifūguojami 10 min 1500xg pagreičiu. Fluorescencinei spektroskopijai buvo naudojamas supernatantas. Iš viso naudoti 4 gyvūnų kraujo mėginiai. KT koncentracija buvo vertinama iš kraujo plazmos tirpalo FL spektro atėmus kontrolinius spektrus (gyvūnų, kuriems nesuleista KT, kraujo plazma) ir vertinant KT FL juostos smailės intensyvumą. 4 skirtingų eksperimentų duomenys buvo suvidurkinti ir aproksimuoti dvi eksponentiniu skirstiniu:

$$y(x) = A_1 / (1 + 10^{((b_1 - x) * h_1)}) + A_2 / (1 + 10^{((b_2 - x) * h_2)}), \quad (1)$$

x - laikas, $A_{1,2}$, $b_{1,2}$, $h_{1,2}$ – aproksimacijos parametrai, kurie parenkami mažiausių kvadratų metodu (OriginPro 8 programinė įranga).

Praėjus 3 val. po KT injekcijos žiurkės buvo žudomos siekiant įvertinti KT pasiskirstymą organizme. Naudotos 3 nėščios žiurkės. Vidaus organai, tarp jų ir gimda su embrionais, buvo išpjunami, nuplaunami ir nusausinami. Atliekama organų fluorescencinė spektroskopija. Vėliau organai fiksuojami 4% formaldehido tirpale ne mažiau 24 val. Audinių preparatai taip pat rengti kriomikrotomijos būdu.

3.10. Audinių preparatų rengimas

Išpreparuoti organai buvo fiksuojami 4% formaldehido tirpale 24 val. Fluoroforų prasiskverbimo per odą tyrime papildomai buvo rengiami preparatai kriomikrotomijos būdu. Tolesnis audinių apdorojimas atliktas Valstybiniame patologijos centre (VPC) taikant standartines histologinio parengimo procedūras: fiksuoti organai buvo dehidratuojami laipsniškai

didinant etanolio koncentraciją iki 96%, vėliau įliejami į skystą parafiną ir stingdomi. Parafino blokai buvo pjaustomi 4 μm storio pjūviais Leica RM2145 mikrotomu.

Kriomikrotomijos būdu preparatai rengti praėjus ne daugiau kaip 30 min. nuo organų išpreparavimo. Jie buvo šaldomi kriostatu iki ~240 K ir atliekami 20 μm storio pjūviai.

Abiem metodais gauti pjūviai buvo dedami ant objektinių stiklų ir paliekami nedažyti siekiant aptikti KT ir Rodaminą B konfokaliniu fluorescenciniu mikroskopu. Norint gauti tos pačios vietos histologinį vaizdą, po fluorescencinės mikroskopijos analizės, bandiniai buvo deparafinizuojami organiniais tirpikliais (ksilenu, izopropilenu) ir dažomi hematoksilinu - eozinu (HE) arba perjodinės rūgšties-Šifo reagentu (PŠR). Vertinant HE ir PŠR metodais dažytų preparatų mikroskopijos vaizdus buvo konsultuojamasi su VPC gydytoju-patalogu.

3.11. Mikroskopija

Pralaidumo mikroskopija buvo atliekama Nikon Eclipse TE2000 mikroskopu su x10/0,25, x20/0,5 Plan Fluor ir x60/1,4 Plan Apo VC oil objektyvais. Lazerinė konfokalinė fluorescencinė mikroskopija atlikta Nikon C1si sistema. Fluorescencijos žadinimui naudotas argono dujų lazeris, $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm. Detekcijai naudoti standartinis trijų spalvų RGB (filtrų pralaidumo sritys: 433-467 nm; 500-590 nm; 620-755 nm) ir 32 kanalų spektrinis detektoriai (naudota 5 nm skiriamoji geba). Pralaidumo mikroskopijos vaizdai registruoti Leica DFC-290 RGB CCD kamera. Vaizdai apdoroti “Nikon EZ-C1 Bronze version 3.80” ir “ImageJ 1.43” programine įranga.

3.12. KT stabilumo tyrimas

CdSe/ZnS-mPEG ir CdTe-MPR KT tirpalai parengiami fiziologiniame tirpale (V=0,5 ml) ir suleidžiami žiurkėms į pilvo etmę (po 3 gyvūnus) ir į šlaunies raumenį (po 1 gyvūną). CdTe-MPR KT miltelių atsveriamą po 1,5 mg

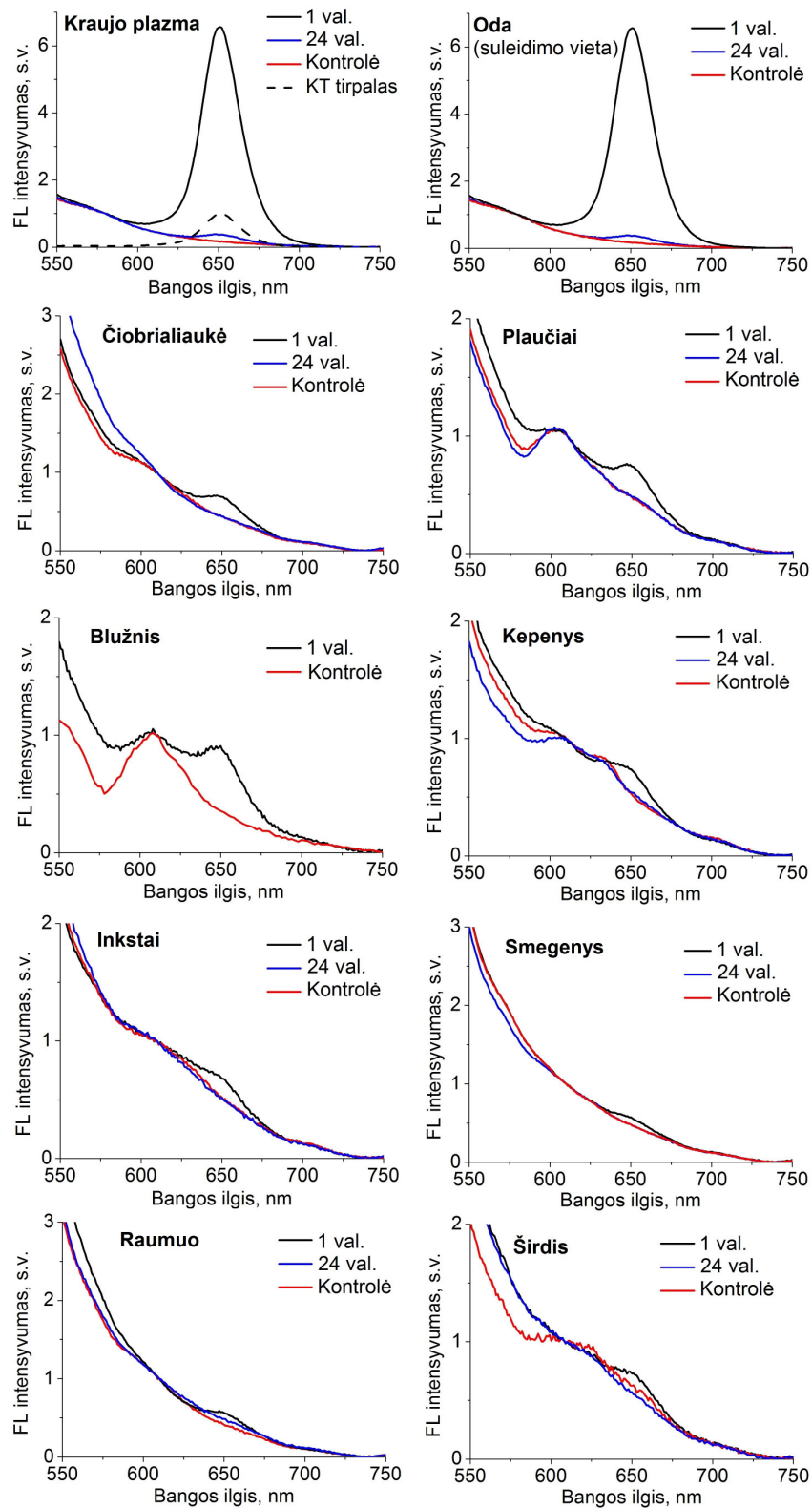
($c_{\text{CdTe-MPR}} \approx 3 \cdot 10^{-6}$ M). CdSe/ZnS-mPEG KT naudotas $c_{\text{CdSe/ZnS-mPEG}} = 8 \cdot 10^{-7}$ M tirpalas.

Praėjus 7 dienoms po KT injekcijos, gyvūnai buvo žudomi, preparuojami jų audiniai (taukinė, raumuo) iš suleidimo vietos ir kitų lokalizacijų (priešingos injekcijai kūno pusės raumuo bei taukinė, kepenys, inkstai, gimda ir kt.). Buvo matuojami šių audinių FL spektrai, o vėliau jie fiksuojami 4% formaldehido tirpale preparatų parengimui ir mikroskopinei analizei.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. KT pasiskirstymas organizme po intraveninės injekcijos

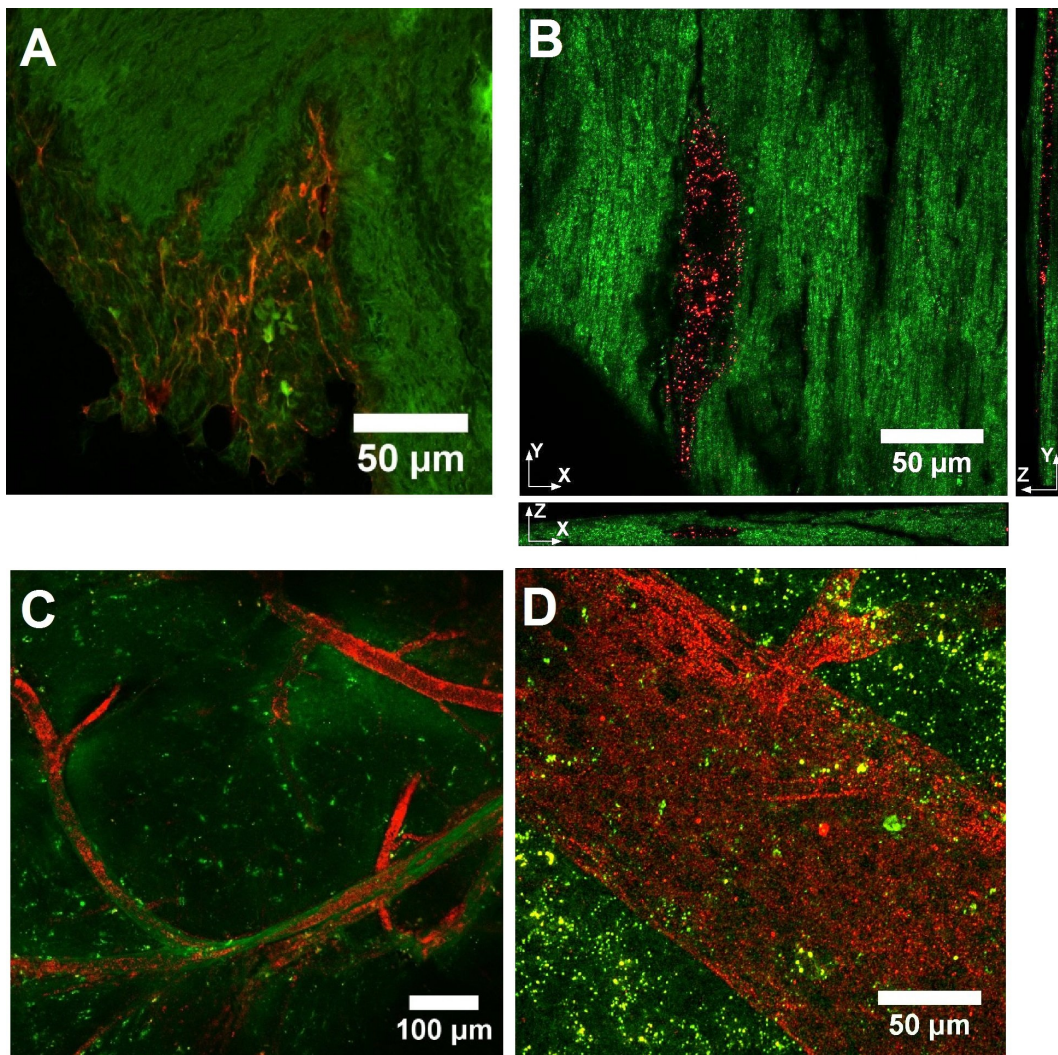
Suleidus CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo pelėms į uodegos veną, jų susikaupimas organuose buvo vertinamas fluorescencinės spektroskopijos ir konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos metodais. Praėjus 1 val. po KT injekcijos KT charakteringa FL juosta su smaile ties 650 nm buvo aptikta visuose tirtuose organuose (pav. 4.1). Daugiausiai KT buvo aptinkama suleidimo vietoje dėl dūrio metu padaryto pažeidimo ir dalies KT tirpalo išsiliejimo aplinkinę terpę. KT FL buvo aptikta kraujyje bei vidaus organuose: inkstuose, čiobriauliaukėje, kepenyse, plaučiuose, šlaunies raumenyje, blužnyje ir širdyje. Praėjus 24 val. po suleidimo KT FL buvo ženkliai mažesnio intensyvumo ir išskiriama iš savitosios fluorescencijos fono tik kraujo plazmos ir suleidimo vietos spektruose. Tuo tarpu kituose organuose KT FL nestebėta ir šių audinių spektrai nesiskyrė nuo kontrolinių (gyvūnų, kuriems nesuleista KT) spektrų.



Pav. 4.1. Pelės audinių fluorescencijos spektrai praėjus 1 ir 24 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT injekcijos į uodegos venos baseiną. Kontroliniai spektrai gauti iš gyvūnų, kuriems suleista tik fiziologinio tirpalo. Pateikti vidutiniai normuoti spektrai ($\lambda_{\text{žad}}=450$ nm, $n_{\text{gyvūnų/grupėje}}=3$, $n_{\text{matavimų/org.}}=3$).

Spektroskopinė analizė atspindi bendrą KT kiekį organe, tačiau nenusako jų pasiskirstymo organo audiniuose. Siekiant detaliau nustatyti KT lokalizaciją, buvo atliekama fluorescencinė audinių mikroskopija. Iš pradžių tirti išpreparuoti pelės audiniai, kurie užšaldomi -20°C temperatūroje ir atriekami $\sim 0,5$ mm storio pjūviai skalpeliu.

Šių audinių konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizduose KT FL (raudona spalva) buvo lokalizuota kraujagyslių viduje (pav. 4.2). Kraujagyslių tinklas buvo aiškiai matomas aplinkinio audinio savitosios fluorescencijos (žalia spalva) fone galvos smegenų didžiųjų pusrutulių žievėje, griaučių skersaruožuose ir širdies raumenyse, odoje, gimdoje, širdyje ir kt. organuose. KT ekstravazacija į tarpląstelinę terpę nebuvo stebima.



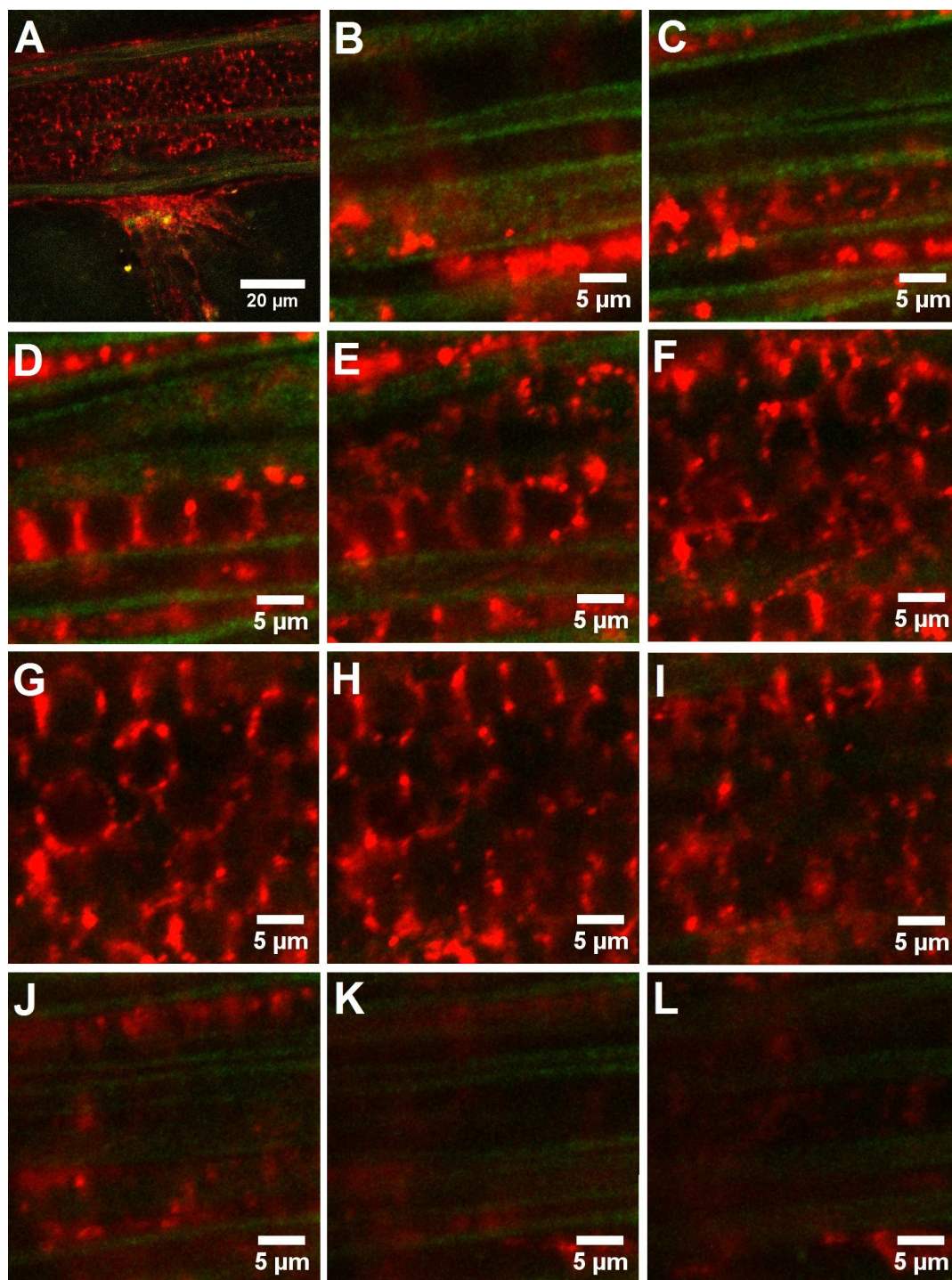
Pav. 4.2. Konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos šaldytų audinių vaizdai, kuriuose matomas CdSe/ZnS-mPEG KT (raudoni) susikaupimas pelės gimdos (A), širdies raumens (B) ir galvos smegenų žievės (C, D) kraujagyslėse, praėjus 1 val. po KT injekcijos į uodegos venos baseiną (A, B, D: x60/1,4 obj., C: x20/0,5 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm). Žalia spalva – savitoji audinių fluorescencija. A–C) pateikti vieno optinio pjūvio vaizdai; B) papildomai pateiktos optinių pjūvių (gylis $z=23$ μm) projekcijos statmenose plokštumose; D) 30 optinių pjūvių ($z=6$ μm) suminė projekcija.

Atliekant galvos smegenų žievės preparato optinį sekcionavimą didesnio optinio didinimo objektyvu buvo gauti kraujagyslės vaizdai skirtingo gylio pjūviuose (pav. 4.3). Nuotraukose matoma, kad kraujagyslės paviršiuje

yra intensyvi savitoji fluorescencija (žalia), o KT FL yra nežymi (pav. 4.3 B-D). Kraujagyslės sienelės savitoji fluorescencija pasiskirsčiusi ne tolygiai, o išsidėsčiusi lygiagrečiomis skirtingo pločio juostomis. Ją greičiausiai sąlygoja elastinas bei kolagenas, sudarantys elastinę membraną. Dėl kraujagyslės subliušimo ir sienelės susiraukšlėjimo, elastinė membrana kerta optinę plokštumą kelis kartus, dėl ko ir stebimos lygiagrečios juostos. Tai patvirtina parafinine technika parengto skersinio kraujagyslės pjūvio fluorescencinis vaizdas (pav. 4.4 A), kuriame matoma, kad intensyviausia savitąja fluorescencija sienelėje pasižymi ploni ištisiniai sluoksniai, kurie pagal kraujagyslių morfologiją atitinka vidinę arba išorinę elastinę membraną. Venose ir mažesnėse arterijose stebimas tik vienas – vidinės elastinės membranos – sluoksnis (pav. 4.4 C).

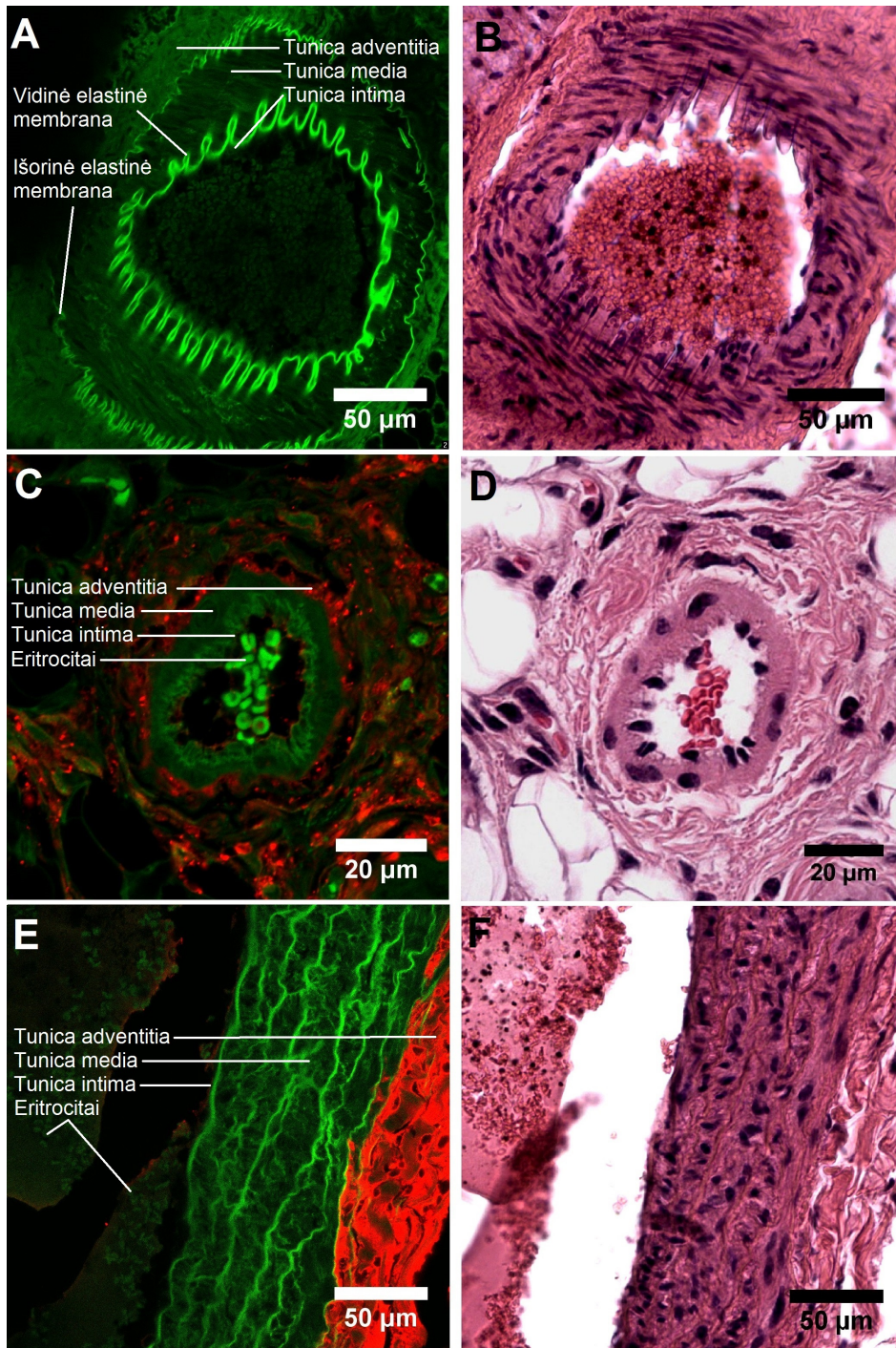
Tęsiant šaldytų galvos smegenų preparatų nagrinėjimą, matome, kad gilesniuose kraujagyslės optiniuose pjūviuose (pav. 4.3 E, F), kurie atitinka arčiau kraujagyslės centro esančias dalis, savitoji fluorescencija mažėja, kol spindyje tampa nebestebima (pav. 4.3 G, H). Kraujagyslės spindyje stebima intensyvi KT FL. Ji pasiskirsčiusi ne tolygiai – KT FL fone stebimi tankiai išsidėstę tamsūs skrituliai, kurių skersmuo apie 5 μm . Manoma, kad tai yra eritrocitai, kurių viduje nėra KT ir tai sąlygoja tamsių plotų atsiradimą mikroskopijos nuotraukose. Tuo tarpu foninę KT FL sąlygoja jų susikaupimas kraujo plazmoje.

Skenuojant kraujagyslę dar giliau (pav. 4.3 I-L) KT FL intensyvumas mažėja ir vėl pasirodo lygiagrečios savitosios FL juostos, kurios atitinka tolimesniąją kraujagyslės sienelę. Taigi optinis sekcionavimas rodo, jog KT yra lokalizuoti kraujagyslės spindyje, kraujo plazmoje, tačiau eritrocituose bei kraujagyslės sienelėje jų FL nežymi.



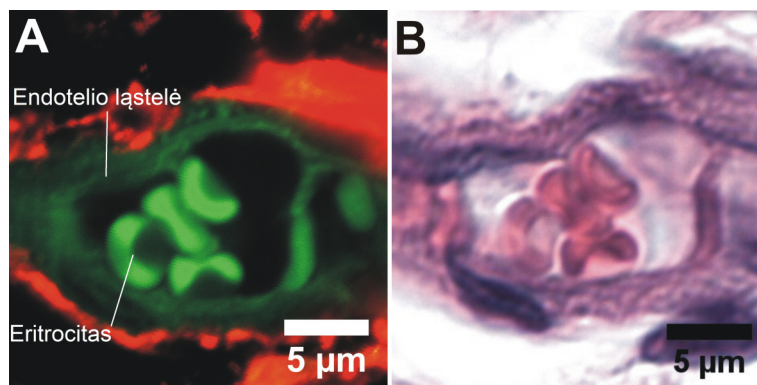
Pav. 4.3. Šaldytų galvos smegenų žievės vienos kraujagyslės optinis sekcionavimas praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT (raudoni) injekcijos į uodegos venos baseiną. A – bendras kraujagyslės vaizdas, B–L išdidinto fragmento vaizdas skirtingose optinėse plokšumose. Nuotraukų serija gauta skenuojant bandinį į gylį kas $\Delta z=0,5 \mu\text{m}$ ($\times 60/1,4$ obj., $\lambda_{\text{žad}}=488 \text{ nm}$, $z=5 \mu\text{m}$).

Suleidimo vietoje dalis KT tirpalo dėl pažeidimo išsiliejo į tarpląstelinę terpę, todėl poodžio audinių kraujagyslių preparatuose (parengtuose parafinine technika), KT galėjo būti stebimi ne tik kraujagyslių spindyje, bet ir kraujagyslių išorėje dėl KT pasklidimo poodžio jungiamajame audinyje (pav. 4.4 C, E). Konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose matoma, kad į kraujotaką patekę KT stebimi kraujagyslės spindyje – kraujo plazmoje ir palei endotelį. KT FL eritrocituose nestebima. Tuo tarpu į tarpląstelinę terpę išsilieję KT pasiskirsto aplinkiniuose audiniuose ir susikaupia išoriniame kraujagyslės sienelės sluoksnyje (*tunica adventitia*). Tačiau KT FL nestebima viduriniajame sienelės sluoksnyje (*tunica media*). Tai rodo, kad KT neįsiskverbia į kraujagyslės sienelės vidurinį sluoksnį.



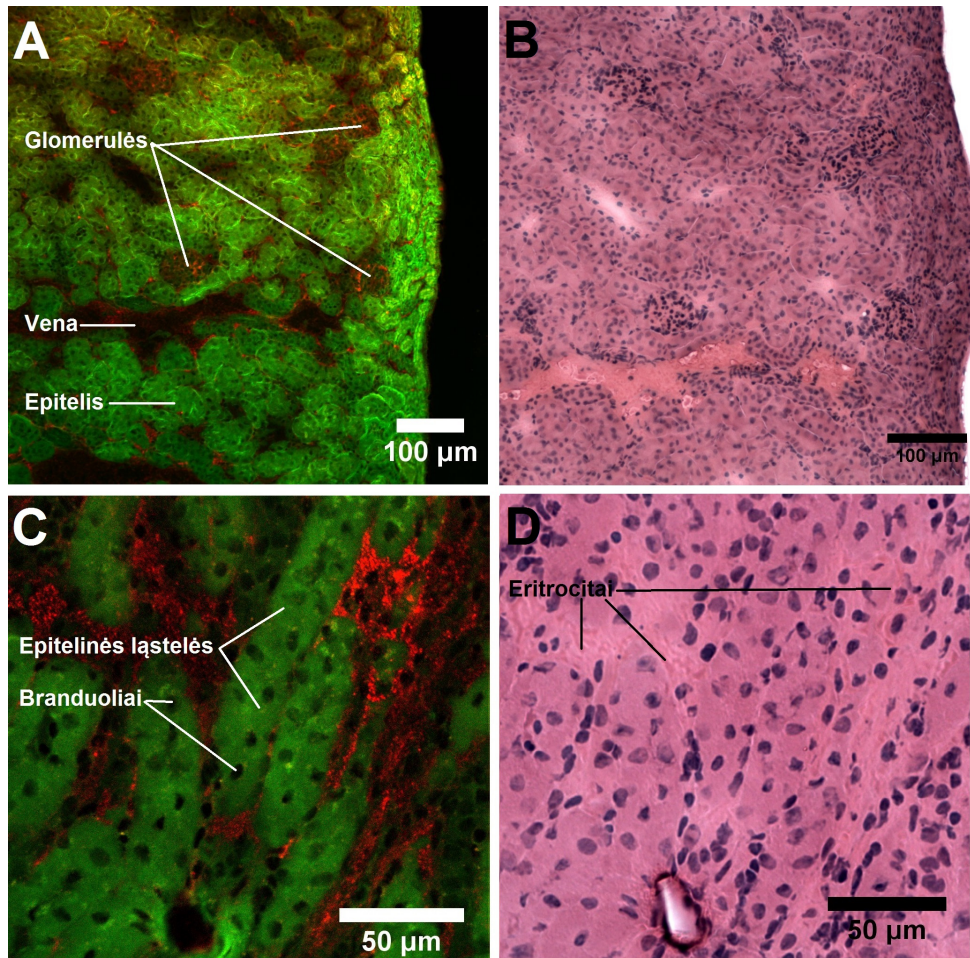
Pav. 4.4. Parafinine technika parengtų pelės odos preparatų konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdai (dūrio vietos poodis). A – Kontrolinio gyvūno, kuriam nesuleista KT, arterijos skersinis pjūvis; C – arterijos ir E – stambios venos - skersiniai pjūviai, praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT injekcijos į uodegos venos baseiną. Šalia pateikti atitinkami HE dažytų preparatų pralaidumo mikroskopijos vaizdai (B, D, F). ($\times 60/1,4$ obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm).

KT susitelkimas aplink kraujagyslių sieneles, tačiau nepatekimas į jų sieneles nustatytas netgi smulkiose kraujagyslėse: arteriolėse, venulėse ar kapiliaruose (pav. 4.5). Tai rodo, kad raumeninio sluoksnio storis nėra esminis veiksnys, apsprendžiantis KT difuzijos ribojimą per sienelę. Kapiliarų sienelę sudaro vienas ištisinis endotelio ląstelių sluoksnis ir neištisinis pericitų sluoksnis, kurie yra apjuosti bazine membrana. Todėl KT susitelkimas aplink kapiliarą ir nepatekimas į endotelį bazaline-apikaline kryptimi visų pirma sąlygotas jų neprasisakverbimo per bazinę membraną.



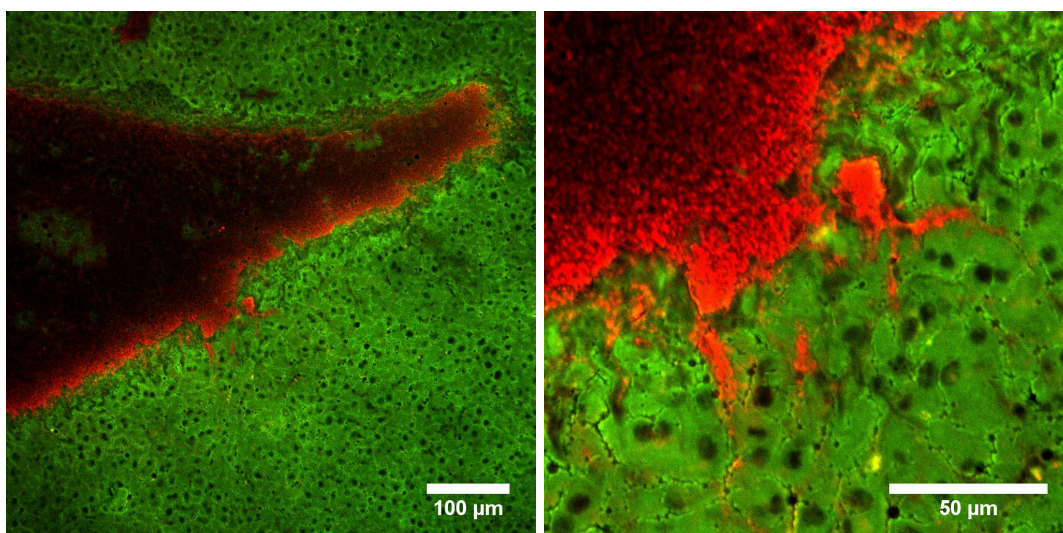
Pav. 4.5. Parafinine technika parengto pelės preparato (dūrio vietos poodis) konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos nuotrauka (A), kurioje matomas skersinis kapiliaro pjūvis. Šalia pateiktas to paties preparato, dažyto HE, pralaidumo mikroskopijos vaizdas (B). Audinys preparuotas praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT injekcijos į uodegos venos baseiną ($x60/1,4$ obj., $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm).

Atliekant kitų vidaus organų preparatų mikroskopinę analizę, nustatyta, kad inkstuose CdSeZnS-mPEG KT FL intensyviausia yra kraujagyslėse: venose, glomerulose, inkstų kanalėlius apraizgiusiuose kapiliaruose (pav. 4.6). Tuo tarpų inkstų kanalėlių spindyje bei jų sienelę sudarančiose epitelio ląstelėse KT FL nebuvo stebima. Tai rodo, kad nors KT atiteka į inkstą su intensyvia šio organo kraujotaka, tačiau į epitelinį audinį bei šlapimą tirti KT nepatenka.



Pav. 4.6. Parafinine technika parengtų pelės inksto preparatų konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos (A, C), kuriose matomas CdSe/ZnS-mPEG KT susikaupimas glomerulėse ir kitose kraujagyslėse praėjus 1 val. po KT injekcijos į uodegos venos baseiną. KT FL nestebima inkstų epitelinėse ląstelėse ir inkstų kanalėlių spindyje ($\times 20/0,5$ obj., $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm).

Kepenų preparatuose ryškiausia KT FL buvo aptikta kraujagyslėse: centrinėse ir vartų venose, arterijose bei sinusiniuose kapiliaruose (pav. 4.7). Mažesnio intensyvumo KT FL buvo stebima ir kepenų ląstelėse. Pagal jų morfologiją šios ląstelės greičiausiai yra Kupferio ląstelės arba hepatocitai. Tai rodo, kad KT pateko iš sinusinių kapiliarų į kepenų ląstelių vidų. Ląstelėse KT FL buvo pasiskirčiusi ne tolygiai, o telkėsi į 1-2 μm dydžio saleles, kurias galėtų atitikti endosomas ar jų grupės. Ląstelių branduoliuose KT FL neaptikta.



Pav. 4.7. Parafinine technika parengtų pelės kepenų preparatų konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos, kuriose matomas KT susikaupimas centrinėje venoje, sinusiniuose kapiliaruose bei kepenų ląstelėse praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT injekcijos į uodegos venos baseiną. ($\times 20/0,5$ obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm).

KT pasiskirstymo organizme po intraveninės injekcijos tyrimų aptarimas

Fluorescencinės audinių spektroskopijos rezultatai rodo, kad į kraujotaką patekę KT per 1 val. sistemiškai pasiskirsto organizme ir aptinkami visuose tirtuose vidaus organuose. Visgi praėjus 24 val. KT FL organų spektruose nebeaptinkama. Tai reiškia, kad į organą patekę KT vėliau yra iš jo pašalinami arba KT netenka savo FL savybių.

Laikinius KT kaupimosi pokyčius galima detaliau paaiškinti nagrinėjant fluorescencinės mikroskopijos rezultatus. Audinių vaizduose matoma, kad praėjus 1 val. po injekcijos, KT lokalizuoti kraujagyslių viduje, o jų FL aplinkiniuose audiniuose nestebima. Tai rodo, kad KT pernaša iš kraujagyslių į audinius ne RES organuose praktiškai nevyksta. Todėl KT kaupimasis organuose po 1 val. yra sąlygotas KT buvimo tų organų kraujotakoje, o ne tarpląstelinėje audinio medžiagoje ar ląstelėse.

Tuo tarpu praėjus 24 val. KT FL vidaus organų spektruose nebuvo stebima. Tai galėjo būti salygotas to, kad KT neprasiskverbė per kraujagyslių sienelės, todėl negalėjo patekti į tirtų organų tarpląstelinę terpę bei ląsteles ir ten kauptis. Po 24 val. KT FL intensyvumas kraujyje sumažėjo (~30 kartų) lyginant su 1 val. Šių pokyčių teoriškai galėjo sukelti du procesai: KT šalinimas iš kraujotakos ir (arba) KT FL kvantinio našumo sumažėjimas. Remiantis šiame darbe nepristatytais duomenimis CdSe/ZnS-mPEG KT FL intensyvumas distiliuotame vandenyje sumažėja per parą vos ~10%, o fiziologiniame tirpale sumažėja ~3 kartus, tačiau vien tuo remiantis prognozuoti FL intensyvumo pokyčių *in vivo* sąlygomis negalima, nes serumo albuminai bei kitos biomolekulės gali stabilizuoti KT optines savybes (104). Tikėtina, kad KT stabilumas taip pat gali priklausyti nuo jų lokalizacijos audiniuose ar net ląstelės kompartmentuose dėl skirtingo terpės rūgštingumo bei fermentų poveikio (24). Todėl siekiant įvertinti KT FL kvantinio našumo pokyčius audiniuose *in vivo* sąlygomis nepakanka remtis jų KT optinių savybių matavimais vandeniniuose druskų tirpaluose ir reiktų atlikti atskirą išsamų tyrimą.

Bet kokių atveju, po 24 val. KT vis dar aptinkami kraujyje. Tai rodo, kad jie nėra visiškai pašalinami iš kraujotakos. Vadinasi dalis KT turėtų būti aptikti ir organų kraujagyslėse. Visgi fluorescencinės spektroskopijos ir mikroskopijos metodais KT aptikti audiniuose nepavyko, nes jų FL intensyvumas greičiausiai buvo per mažas. Didelę įtaką tam turėjo faktas, kad KT neprasiskverbia per daugumos organų kraujagyslių sienelę ir po 1 val. aptinkami tik kraujagyslių viduje. Vadinasi KT negali patekti į audinius ir kauptis jų ląstelėse, kas galėtų sąlygoti jų sulaikymą organuose.

KT lokalizacija kraujagyslėse

Dalis organinių junginių yra pernešami per endotelį aktyvios transląstelinės pernašos (transcitozės) būdu, kuomet molekulės per apikalinę membraną patenka į endotelio ląstelių vidų, o vėliau yra pernešamos per bazinę membraną į kapiliaro išorę (stambesnių kraujagyslių atveju į gilesnius sienelės

sluoksnius). Pralaidumo elektroninės mikroskopijos tyrimais yra parodyta, kad KT gali kauptis endotelio ląstelėse ir lokalizuotis jų endosomose (2, 31). Toks viduląstelinis patekimas priklauso nuo KT paviršinio krūvio: neigiamo krūvio KT (paviršiuje turintys karboksilo grupes) kaupiasi geriausiai, teigiamo krūvio (turintys amino grupes) kaupiasi mažesniais kiekiais, o neutralaus krūvio (turintys PEG) KT endotelio ląstelėse neaptikti. Visgi KT pernaša iš endotelio ląstelių (103) į kapiliaro išorę nėra aptarta ar pademonstruota eksperimentais, nors tai svarbus klausimas KT taikymams *in vivo*. Šio darbo rezultatai papildoma aptartus tyrimus ir rodo, kad KT nėra pernašami iš kraujagyslės spindžio per endotelį į kapiliarų išorę ar į gilesnius sluoksnius (stambesnių kraujagyslių atveju).

In vitro tyrimais yra parodyta, kad KT patekus į ląstelių vidų, jie gali pakeisti įprastą endocitotinių procesų eigą ir telktis į stambesnes pūsleles ar multivezikulinius kūnelius užuot vykstant jų egzocitozei (103, 105-107). KT šalinimas yra netiesiogiai pademonstruotas embrioninėse kamieninėse pelių ląstelėse *in vitro* (84), tačiau apie jų pašalinimą iš diferencijuotų ląstelių pranešimų nėra. Tai galėtų paaiškinti, kodėl KT patekę į endotelio ląsteles gali būti užlaikomi jų viduje, o ne sekretuojami kitapus kraujagyslės sienelės. Šiame darbe KT FL buvo stebima vidiniame kraujagyslės paviršiuje palei endotelį greičiausiai dėl jų adhezijos prie ląstelės membranos. Detalesnei KT lokalizacijai įvardinti (ar jie yra endotelio citoplazmoje) reikalingi išsamesni tyrimai aukštesnės skiriamosios gebos metodais, pvz., elektroninės pralaidumo mikroskopijos.

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad KT patenka iš kraujagyslės išorės į išorinį sienelės sluoksnį (*tunica adventitia*) ir jame pasklinda. Tačiau KT nepatenka į vidurinį kraujagyslės sienelės sluoksnį (*tunica media*). Tai rodo, kad raumeninio sluoksnio skaidulų tarpląstelinė medžiaga yra pakankamai tanki, kad KT neprasiskverbtų tarp ląstelių. KT nepatenka į pačių skaidulų vidų greičiausiai dėl jų storo ekstraląstelinio matrikso (bazinės membranos) sluoksnio, kuris mechaniškai sulauko KT. Tikėtina, kad raumeninių skaidulų bazinės membranos formuoja bendrą ištinę membraną, kuri juosia *tunica*

media ir riboja KT difuziją. Iki šiol KT kaupimasis raumeninėse ląstelėse menkai aprašytas literatūroje. *Ex vivo* magnetinio rezonanso vaizdinimo metodu yra parodyta, kad aneksinu A5 funkcionalizuoti ir Gd³⁺ jonų turintys KT gali kauptis arterijų sienelės aterosklerozės židiniuose (108). Šie KT aptikti pažeistų arterijų endotelyje ir raumeniniame sluoksnyje (*tunica media*). KT kaupimasis sienelėje grindžiamas atrankia aneksino A5 ir fosfatidilserino (apoptotinėms ląstelėms būdingo fosfolipido) sąveika. KT neaptikti pirmuosiuose raumeninio sluoksnio ląstelių sluoksniuose, tačiau kaupėsi gilesniuose sluoksniuose. Šio reiškinio autoriai negalėjo paaiškinti ir plačiau KT prasiskverbimas per kraujagyslės sienelės sluoksnius neaptartas. Sveikose sienelėse KT neaptikti. Šis straipsnis rodo, kad KT gebėjimas migruoti per skirtingus audinius yra prastai suprastas ir tokie tyrimai yra itin aktualūs perspektyviems medicininiams taikymams. Mūsų rezultatai rodo, kad KT migraciją sienelėje riboja audinių ekstraląstelinė struktūra, todėl aptartame straipsnyje KT galėjo kauptis pažeistoje sienelėje dėl sienelės struktūrinių pažeidimų ir barjerinių savybių pokyčių, o ne vien dėl KT paviršiaus giminingumo fosfatidilserinui. Juk tam, kad įvyktų atranki biocheminė sąveika, KT iš pradžių turi patekti į raumeninį sienelės sluoksnį ir pasiekti fosfatidilserino sankaupas. Šiam vyksmui visų pirma turi būti pažeistas kraujagyslės sienelės struktūrinis vientisumas. Tikėtina, kad KT kauptųsi aterosklerotiniuose židiniuose ir nefunkcionalizuojant jų paviršiaus specialiais ligandais. Juolab, kad yra žinoma, jog aterosklerozės židiniuose kaupiasi nanometrų eilės matmenų biologiniai dariniai, pvz., žemo tankio lipoproteinai. Tačiau tokių tyrimų su KT nėra atlikta. Taigi mūsų rezultatai papildo literatūros duomenis ir gali būti naudingi kuriant ateities pažeistų kraujagyslių vaizdinimo bei diagnostikos priemones.

Literatūroje plačiausiai aprašytas KT prasiskverbimas per navikų kraujagysles, kurios pasižymi struktūriniais pakitimais ir padidėjusiu pralaidumu (1, 35, 56, 109). Navikams būdingas ND ir kitų junginių padidinto pralaidumo ir sulaikymo (PPS) efektas (angl. *enhanced permeability and retention, EPR*) lyginant su sveikais audiniais. Jis grindžiamas aktyvia navikų

kraujotaka, padidėjusiu kraujagyslių pralaidumu, aktyviu navikinių ląstelių metabolizmu ir menkai išvystytu limfiniu drenažu (56). Visgi dauguma tyrimų akcentuoja KT selektyvų susikaupimą navike, o KT pernaša per sveikas kraujagysles lieka antrame plane ir nėra plačiai aprašoma. Šio darbo rezultatai suteikia papildomų duomenų apie KT prasiskverbimą per sveikas kraujagysles ir gali būti naudingi PPS efekto mechanizmo tyrimuose.

Pavienių kraujagyslių optinis sekcionavimas atskleidė, kad KT daugiausiai lokalizuoti kraujo plazmoje, tačiau nepatenka į eritrocitų vidų. KT gali sąveikauti su eritrocitų membrana ir būti pernešami ant jų paviršiaus, tačiau apie jų viduląstelinį kaupimąsi nepranešama (110, 111). KT nepatekimas į eritrocitus gali būti paaiškinamas tuo, kad KT difuzija per ląstelių membraną nevyksta, o eritrocitų aktyvi pernaša (endocitozė) nevyksta dėl šių ląstelių specializacijos (112). Yra parodyta, kad kraujyje esantys KT gali kauptis cirkuliuojančiuose leukocituose ir kad KT prikaupę leukocitai turi gebėjimą migruoti per kraujagyslių sieneles (pasižymi transmigracija) (36, 46). Tokiu būdu KT gali patekti į audinius kaip šių ląstelių vidinis turinys. Visgi KT prikaupusių leukocitų transmigracija negalėtų sąlygoti reikšmingo KT kaupimosi organuose, nes leukocitai sudaro mažą dalį visų kraujo ląstelių ir jie dažniausiai migruoja į pažeistus audinius ar uždegiminių procesų židinius. Tuo tarpu sveikuose audiniuose leukocitų transmigracija yra nežymi.

KT šalinimas iš kraujotakos

KT koncentracijos pokyčius kraujotakoje sąlygojo du pagrindiniai priešingo poveikio procesai: jų šalinimas iš kraujotakos ir lėta KT rezorbcija iš suleidimo vietos bei jų patekimas į kraują (plačiau aptarta 4.3. sk.). Pagrindiniai medžiagų šalinimo iš kraujotakos keliai yra jų filtracija inkstuose ir paėmimas į kepenis. Inkstų preparatų fluorescencinė mikroskopija atskleidė, kad KT lokalizuojasi šio organo kraujotakoje, tame tarpe ir glomerulėse, tačiau inkstų epitelyje ir šlapimo kanalėlių spindyje KT FL nestebėta. Tai liudija, kad KT nepatenka iš porėtų inkstų kapiliarų į Baumano kapsulės ertmę, t.y. nevyksta KT filtracija iš kraujo, ir jie nėra pašalinami su šlapimu. Yra

parodyta, kad KT patekimas į šlapimą priklauso nuo KT hidrodinaminio skersmens (HS) ir vyksta, jei jis yra mažesnis negu 8 nm (40). Teoriškai KT sulaikymas inkstuose gali būti aiškinamas dvejopai: 1) KT filtraciją iš kraujo nevyksta; 2) vyksta KT filtracija į pirminį šlapimą, bet vėliau jie yra reabsorbuojami per inkstų epitelį į kraują (41). Iki šiol KT filtracijos mechanizmai inkstuose nėra išaiškinti. Mūsų tyrime pasirinktas metodas leidžia vizualizuoti KT lokalizaciją inkstuose ir pagrindžia KT nepatekimą į šlapimą tuo, kad KT filtracija inkstuose nevyksta.

CdSe/ZnS-mPEG KT HS yra ~23 nm natrio borato buferiniame tirpale (113). Svarbu paminėti, kad, nepaisant neutralaus tokių KT paviršiaus krūvio, tikėtina, kad kraujyje jie sąveikauja su plazmos baltymais ar kitomis biomolekulėmis, kurios papildomai padidina HS (31, 40, 113). Todėl inkstų glomerulėse stebėtas KT sulaikymas gali būti paaiškinamas tuo, kad jų HS yra per didelis, kad jie prasiskverbtų per inkstų kapiliarų poras.

Pelės kepenų konfokalinės mikroskopijos vaizdų analizė rodo, kad KT daugiausiai aptinkami kepenų kraujotakoje: vartų ir centrinėse venose, arterijose, kepenų sinusuose. KT FL buvo stebima ir pavienėse kepenų ląstelėse. Tai liudija, kad KT prasiskverbė iš sinusinių kapiliarų spindžio ir pateko į kepenų audinį. Šiame organe kapiliarų poros yra vienos didžiausių organizme ir gali siekti iki 60 nm (38). Todėl KT prasiskverbimas į kepenų audinį gali būti aiškinamas jų difuzija per sinusinių kapiliarų sienelių poras. Ląstelių viduje KT buvo pasiskirstę ne tolygiai, o išsidėstę sankaupomis citoplazmoje. Tai rodo, kad KT buvo sutelkti pūslelėse, kurios greičiausiai susidarę endocitozės metu.

Daugumos KT pasiskirstymo tyrimų duomenimis CdSe/ZnS-mPEG KT daugiausiai kaupiasi RES organuose (kepenyse, blužnyje, limfmazgiuose), tuo tarpu kituose organizmo audiniuose jų susikaupimas nežymus (12, 22, 29). KT yra aptikti blužnies raudonojoje pulpoje ir perifolikulinėse zonoje, kepenų portalinėje srityje bei sinusuose, inkstų glomerulėse ir limfmazgiuose (12, 22, 29, 114). Įdomu, kad toks KT pasiskirstymas išlieka ilgą laiką ir stebimas net

iki 2 metų po suleidimo (22). Svarbiausias vaidmuo užlaikant KT RES organuose teikiamas jų viduląsteliniam kaupimuisi makrofaguose.

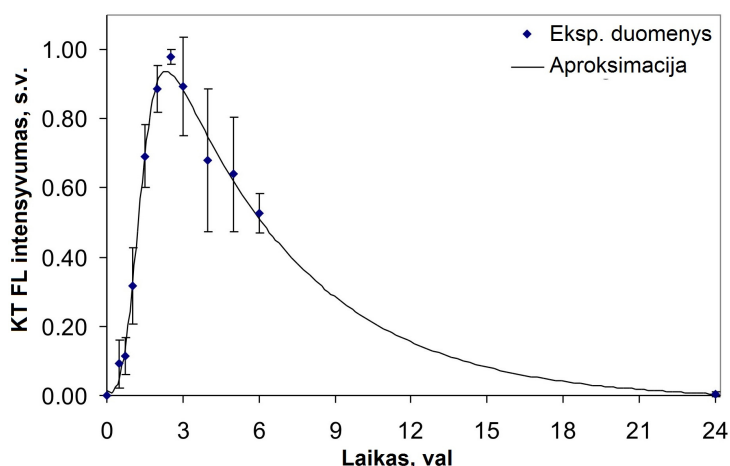
Mosqueira V.C. su bendraautoriais ištyrė, kad KT kaupimasis organuose priklauso nuo jų padengimo PEG ligandais (30). Ilgesnės ir tankiau išdėstytos PEG molekulės sąlygoja mažesnę KT kaupimąsi RES organuose ir didesnę susikaupimą kitose organizmo vietose: širdyje, griaučių raumenyse, inkstuose. Visgi detalesnė KT lokalizacija šių organų audiniuose netirta ir tokio susikaupimo priežastys nėra išaiškintos. Taigi šio darbo rezultatai dalinai paaiškina aptartus literatūros duomenis, pagrįsdami, jog KT nepatenka į daugumos organų (ne RES) tarpląstelinę terpę bei ląsteles, o kaupiasi jų kraujagyslių viduje. Mosqueira V.C. ir bendraautorių tyrimo atveju, ilgesnės PEG grandinės prailgina KT cirkuliaciją kraujotakoje ir tai didina jų bendrą koncentraciją visame organe, tačiau tai vyksta ne dėl KT patekimo iš kapiliarų į audinius, o dėl ilgesnio išlikimo kraujagyslių viduje.

Svarbu paminėti, kad KT lokalizacija konfokalinės fluorescencinės būdu gali būti įvardinta tik esant pakankamai KT koncentracijai ir jų FL savybių stabilumui audinyje. Todėl tikėtina, kad mažomis koncentracijomis susikaupę KT gali būti neužregistruoti naudotu metodu. Literatūroje pateikiami kiekybiniai KT kaupimosi organuose tyrimai dažniausiai paremti elementine analize, pvz., masės spektrometrija ar radioaktyvių izotopų scintigrafija (3, 29, 115). Visgi tokie metodai nesuteikia informacijos, ar KT sudarantys elementai vis dar yra KT sudėtyje, ar nanokristalas suiro ir susidaro Cd turintys skilimo produktai, pasižymintys kitomis farmakokinetinėmis savybėmis. Tuo tarpu fluorescenciniais metodais aptinkami tik KT, kurie išlaiko struktūrinį vientisumą, nes, suirus nanokristalui, jie netenka FL savybių. Taigi išsamesnė analizė apie KT lokalizaciją audiniuose galėtų būti atlikta derinant optinius tyrimus su elektroninės mikroskopijos ar masės spektrometrijos metodais.

4.2. KT prasiskverbimas per placentos barjerą

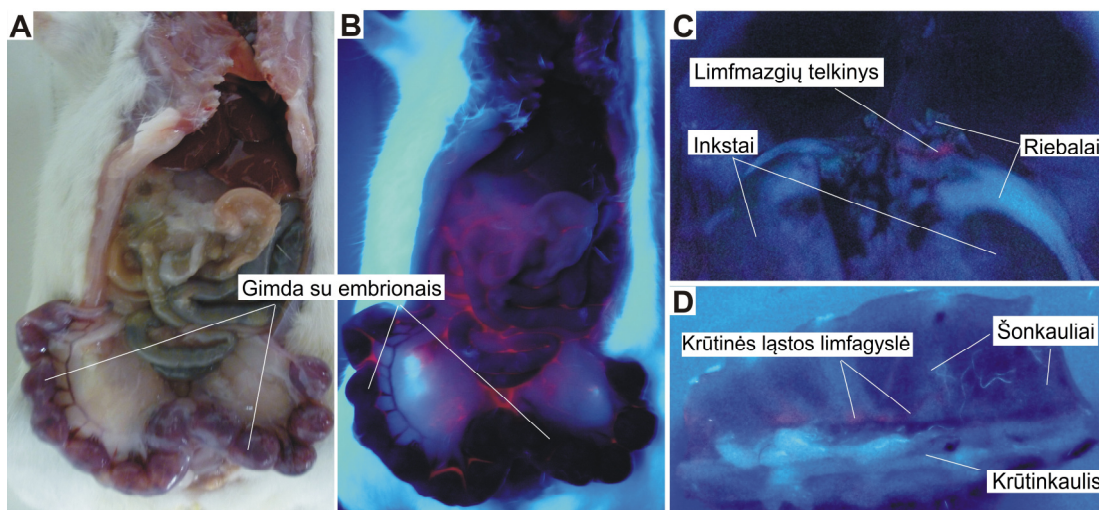
Nėštumo metu ribojamas didelės dalies farmakologinių preparatų naudojimas dėl jų poveikio besivystančiam embrionui ar vaisiui. Todėl siekiama sukurti tokius junginius, kurie veiktų motinos organizmą, tačiau neprasiskverbtų per apsauginį placentos barjerą ir nepatektų į besivystančio organizmo audinius. Viena iš tokių strategijų galėtų būti veikliasis medžiagas chemiškai konjuguoti su KT ar kitomis ND ir pasinaudoti jomis kaip pernašos platforma. Tokių vaistų kūrimui būtinos išsamios žinios apie KT gebėjimą pereiti į embriono audinius, kokios fizikocheminės savybės lemia jų pernašos efektyvumą ir kokį pašalinį poveikį jie gali turėti. Kita vertus, KT prasiskverbimo per apsauginius barjerus tyrimai aktualūs vertinant naujų komercinių produktų (pvz., buitinės chemijos, televizorių, saulės elementų), kurių sudėtyje yra KT, vartojimo saugumą nėštumo metu. Šiame tyrime buvo nagrinėtas CdSe/ZnS-mPEG KT prasiskverbimas per placentos barjerą nėščių žiurkių modelyje. 13-tą nėštumą parą, kuomet placenta yra visiškai susiformavusi, žiurkėms į pilvo ertmę buvo suleista CdSe/ZnS-mPEG KT ir vėliau tiriama jų farmakokinetika, pasiskirstymas organizme bei susikaupimas embrionuose.

KT FL kraujo plazmos spektruose buvo aptinkama praėjus 15 min po injekcijos ir didėjo iki 2,5 val, kol pasiekė didžiausią vertę (pav. 4.8). Vėliau KT FL intensyvumas pradėjo mažėti ir praėjus 24 val jau buvo nebeaptinkamas. KT FL intensyvumo didėjimas siejamas su jų rezorbcija iš pilvo ertmės ir patekimu į kraujotaką. KT FL mažėjimas greičiausiai vyko dėl KT šalinimo iš kraujotakos, kuriam didžiausią indėlį turėjo paėmimas į RES organus.



Pav. 4.8. CdSe/ZnS-mPEG KT farmakokinetika žiurkės kraujyje po suleidimo į pilvo ertmę 13 nėštumo parą (taškai - vidurkis, intervalai – vid. st. nuokrypis, $n_{\text{gyvūnų}}=4$).

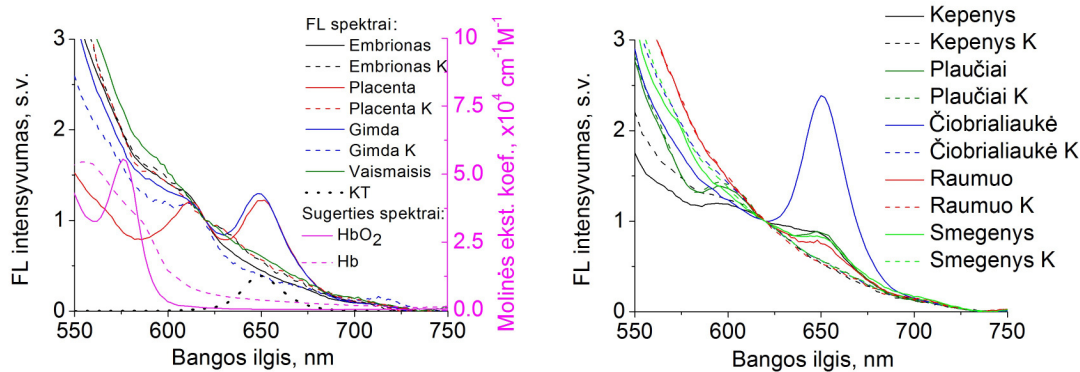
Siekiant nustatyti KT lokalizaciją placentoje bei embrione, gyvūnai buvo žudomi ir preparuojami, kuomet KT koncentracija kraujotakoje buvo artima didžiausiai vertei (pasirinktas momentas praėjus 3 val po injekcijos). Praskrodus gyvūnus, pasirodė, kad KT FL buvo pakankamai intensyvi pilvo ertmėje ir galėjo būti stebima plika akimi apšvietus UV spinduliuote (pav. 4.9). Tai rodo, kad didelė KT dalis liko suleidimo vietoje ir neišsiskirstė po organizmą su krauju. Pašalinus vidaus organus, nugarinėje pilvo sienoje buvo stebima ryški KT FL juosmeniniuose bei inkstų limfmazgiuose (LM), juos jungiančiose limfagyslėse bei krūtininiame limfos latake. Tai rodo, kad KT iš pilvo ertmės patenka į limfinius kapiliarus, prateka pro LM, o vėliau įsilieja į kraujo apykaitą.



Pav. 4.9. CdSe/ZnS-mPEG KT FL (raudona) nėščios žiurkės organizme apšvietus UV spinduliuote, praėjus 3 val po KT injekcijos į pilvo ertmę. A) Pilvo organų atspindžio vaizdas; B-D) fluorescenciniai vaizdai; C) KT susikaupimas inkstų limfmazgiuose; D) krūtinės ąstos vidinė pusė ir KT FL limfagyslėje.

Charakteringa KT FL juosta ties 650 nm buvo stebima visų tirtų motinos audinių spektruose (pav. 4.10). Didžiausias FL intensyvumas užregistruotas čiobrialiaukėje bei placentoje. Placentos spektre stipriausiai pasireiškia FL intensyvumo sumažėjimas ties 580 nm (įduba), kurią sąlygoja hemoglobino sugertis. Kitų organų spektruose šis efektas išreikštas mažiau. Vizualiai placenta atrodė kraujingesnė lyginant su kitais organais. Hemoglobino sugertis (reabsorbcija) sąlygojo ir nežymų KT FL juostos poslinkį, nes jo sugertis stipriai krenta didėjant bangos ilgiui nuo 600 nm (pav. 4.10). To pasekoje trumpabangis KT FL juostos kraštas yra stipriau paveikiamas kraujo reabsorbcijos efekto ir juostos smailė stebima ties didesniu bangos ilgiu nei mažiau kraujo turinčių organų spektruose, pvz. gimdoje.

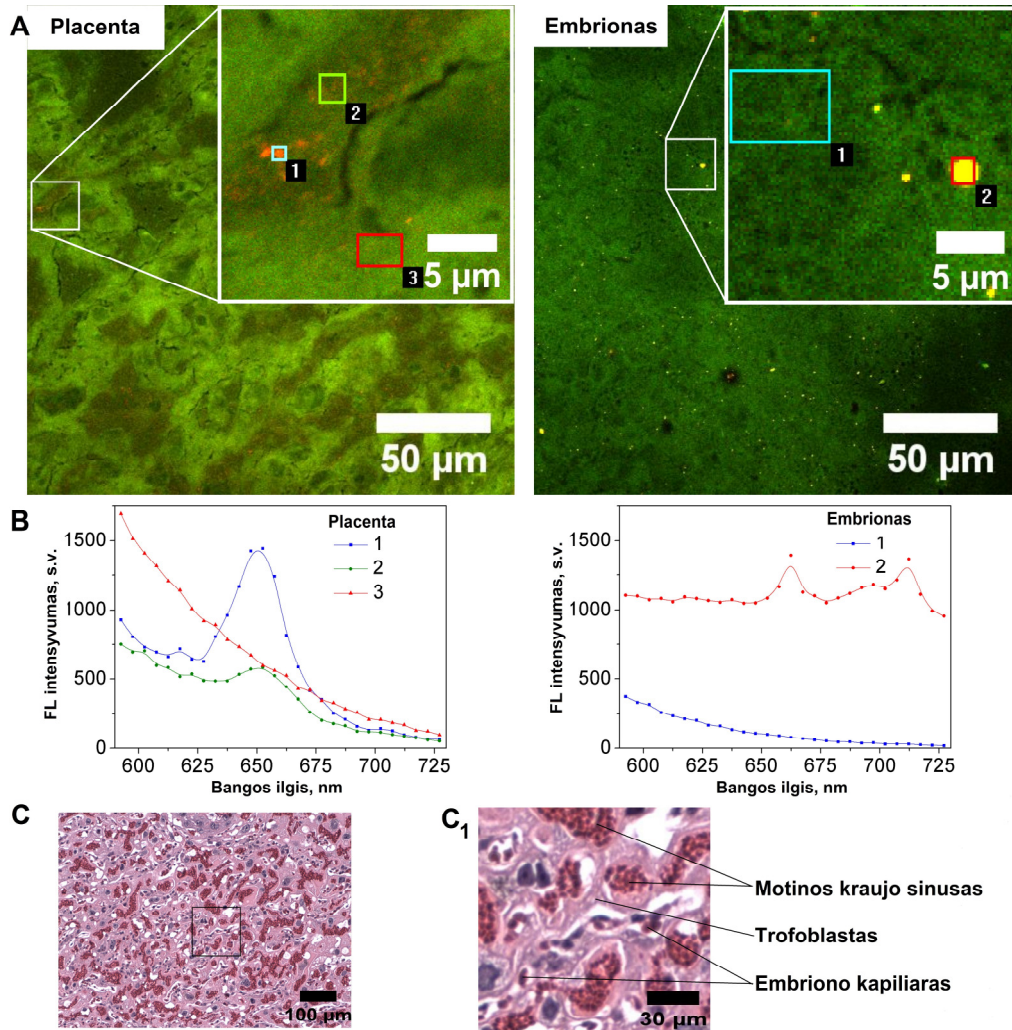
Embriono kūne, vaismaišyje bei virkštelėje KT FL nebuvo aptikta. Tai rodo, kad KT greičiausiai buvo sulaikyti placentoje ir į embriono audinius nepateko.



Pav. 4.10. Normuoti vidutiniai žiurkės organų FL spektrai, praėjus 3 val po CdSe/ZnS-mPEG KT suleidimo į pilvo ertmę 13 nėštumo parą („K“ žymi kontrolinių audinių spektrus). Oksihemoglobino (HbO₂) ir hemoglobino (Hb) sugerties spektrų juostos (116) atitinka FL sumažėjimą audinių spektruose ($\lambda_{\text{žad}}=450$ nm, $n_{\text{gyvūnų}} \geq 3$, $n_{\text{matavimų/org.}}=3$, normuota ties 620 nm).

Detalesnei KT lokalizacijai audiniuose nustatyti buvo atliekama placentos bei embriono preparatų (parengtų parafinine technika) konfokalinė fluorescencinė mikroskopija. KT FL (raudona) buvo aptikta placentoje (pav. 4.11). Ten daugiausiai jų aptikta labirinto zonoje, kurioje gausu motinos kraujo ir vyksta medžiagų pernaša į embriono audinius. KT FL buvo pasiskirsčiusi nevienodai ir sudarė netaisyklingos formos raštą, tarp kurio dalių KT FL nebuvo stebima. Toks KT FL išsidėstymas atitinka motinos kraujo sinusų išsidėstymą tarp choriono gaurelių (pav. 4.11 C). Stipria KT FL pasižymintiems audinio fragmentams buvo būdinga mažesnio intensyvumo savitoji fluorescencija (žalia) lyginant su aplinkiniu audiniu. Tai galėjo būti sąlygota kraujo sugerties, kuri yra intensyvi regimojo spektro srityje iki 600 nm, tame tarpe ir 488 nm žadinančiai spiduliuotei ($\epsilon_{\text{oksihemoglobino, 488nm}}=24670$ cm⁻¹M⁻¹) (116). Kita vertus embriono audiniuose yra didesnė endogeninių fluoroforų (baltymų, kofermentų ir kt.) koncentracija negu kraujyje, kurie sąlygoja stipresnę fluorescenciją. Todėl tikėtina, kad silpna savitąja fluorescencija ir stipria KT FL pasižyminčios dalys priskiriamos motinos kraujui. Tuo tarpu embriono audiniuose KT FL nebuvo aptikta. Juose buvo registruojami pavieniai intensyviai švytintys objektai. Naudojant spektrinį

detektorių buvo gauta papildoma informacija, kuria galima identifikuoti KT FL ir atskirti jų švytėjimą nuo audinio savitosios fluorescencijos. Spektrinė analizė leido įvardinti, kad embriono kūne stebima fluorescencija priskiriama ne KT.



Psv. 4.11. A) Žiurkės placentos ir embriono preparatų konfokalinė fluorescencinė mikroskopija, praėjus 3 val po CdSe/ZnS-mPEG KT suleidimo į pilvo ertmę 13 nėštumo parą (x60/1,4 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm). Nuotraukose pažymėti plotai, iš kurių gauti B dalyje pateikti spektrai. C) Placentos labirinto zonos histologinis vaizdas (dažyta HE, x10/0,1 obj.). Išdidinus (C₁) galima atskirti motinos ir embriono kompartmentus, kurių išsidėstymas atitinka fluorescencinės mikroskopijos vaizde matomą struktūrą (A).

Taigi tiek fluorescencinės spektroskopijos, tiek mikroskopijos rezultatai rodo, kad, nėščiai žiurkei suleidus KT, jie išsiskirsto po visą organizmą,

gausiai kaupiasi placentoje, tačiau į embrioną nepatenka. Tai liudija, jog placentos barjeras efektyviai apsaugo embrioną nuo CdSe/ZnS-mPEG KT pernašos.

KT prasiskverbimo per placentos barjerą tyrimų aptarimas

Į pilvo ertmę suleidus CdSe/ZnS-mPEG KT, jų koncentracija auga iki 2,5 val ir vėliau pradeda mažėti. Remiantis polistireno ND pernašos per placentą tyrimais, ND pusiausvyra žmogaus placentoje *ex vivo* tarp motinos ir embriono kraujotakos nusistovi per 2-3 val (102). Todėl mūsų pasirinktas 3 val inkubacijos laikotarpis turėtų būti pakankamas, kad esant KT pernašai per placentos barjerą, jie jau patektų į embrioną. Juolab, kad žiurkės organizme metaboliniai procesai yra ženkliai greitesni negu žmogaus. Kaip rodo kitų mokslininkų atlikti tyrimai, po intraveninės injekcijos KT koncentracija kraujyje padidėja labai staigiai ir didžiausią vertę pasiekia per kelias minutes, po ko seka jų eksponentiškai lėtėjantis išsiplovimas (12, 29). Šiame tyrime stebėtas lėtas KT koncentracijos kraujyje augimas siejamas su jų lėta rezorbcija iš pilvo ertmės. Raudona KT FL žiurkės limfinėje sistemoje buvo atskiriama nuo aplinkinių audinių savitosios fluorescencijos fono. Tai rodo, kad KT efektyviai migruoja iš suleidimo vietos per limfinę sistemą. Tuo tarpu KT FL kraujagyslėse buvo nežymi ir iš aplinkinių audinių neišsiskyrė. Praėjus 3 val. po suleidimo, pakankamai daug KT buvo likę pilvo ertmėje. Todėl pasirinktas suleidimo būdas sąlygojo KT rezervuaro susidarymą pilvo ertmėje, lėtą bei ilgalaikį jų drenažą per limfinę sistemą ir įtekėjimą į kraujotaką.

Sisteminis KT išnešiojimas sąlygojo jų susikaupimą visuose tirtuose motinos organuose, įskaitant placentą. Šio tyrimo gautais duomenimis, KT nepatenka į nėščios žiurkės embrioną. Tokį KT sulikymą galima aiškinti motinos-embriono barjeru, kurį histologiškai atitinka trys ištiniai trofoblasto sluoksniai ir kurių ląstelės tarpusavyje sujungtos glaudžiosiomis, adhezinėmis ir plyšinėmis jungtimis, ribojančiomis makromolekulių prasiskverbimą tarp ląstelių (82). Alternatyvus KT patekimo kelias galėtų būti transląstelinis būdas. Yra parodyta, kad ND patekimo į embrioną kelias priklauso nuo jų dydžio.

Tiriant 5-6 nm dydžio PAMAM dendrimerų pernašą žmogaus placentos perfuzijos modelyje, paaiškėjo, jog jie prasiskverbia per tarpląstelines jungtis ir daugiausiai kaupiasi choriono jungiamajame audinyje, o trofoblastuose aptinkami tik jų pėdsakai (79). Tuo tarpu 50 – 240 nm dydžio polistireno ND perėjo iš placentos transląstelinio būdu ir gausiai kaupėsi trofoblasto ląstelėse, o didesnės – 500 nm ND barjero neįveikė (102). Taigi skirtingų tipų ir fizikinių charakteristikų ND įveikia biologinius barjerus skirtingai. Mūsų tyrime naudotų KT HS borato buferiniame tirpale yra ~23 nm (113). Remiantis literatūros duomenimis tokio dydžio KT neįveikia inkstų glomerulų barjerų ir nėra filtruojami į šlapimą pelėse (40, 117). Placentos trofoblasto sluoksnis yra fiziologiškai pritaikytas dar labiau sulaikyti medžiagų difuziją, todėl tyrime naudoti KT greičiausiai yra per dideli, kad patektų į embriono audinius per tarpląstelinius plyšius. KT transląstelinė pernaša yra daug sudėtingesnis procesas, kad jo našumą galima būtų paaiškinti vien fizikinėmis KT savybėmis. Galima tik pasakyti, kad jam įvykti, KT turi būti įsisavinami į ląsteles, kryptingai transportuojami jų viduje ir sekretuojami bazinėje ląstelių membranoje. Yra parodyta, kad KT yra endocituojami įvairių ląstelių tipų ir ilgalaikėje perspektyvoje lokalizuojasi jų organelėse, pvz., endosomose, multivezikuliniuose kūneliuose, tačiau jų egzocitozė ar sekrecija *in vitro* nestebima (103, 118). Šie faktai ir mūsų rezultatai formuoja nuomonę, kad KT nėščios žiurkės organizme gali kauptis placentoje, tačiau iš jos į embrioną nėra pernešami.

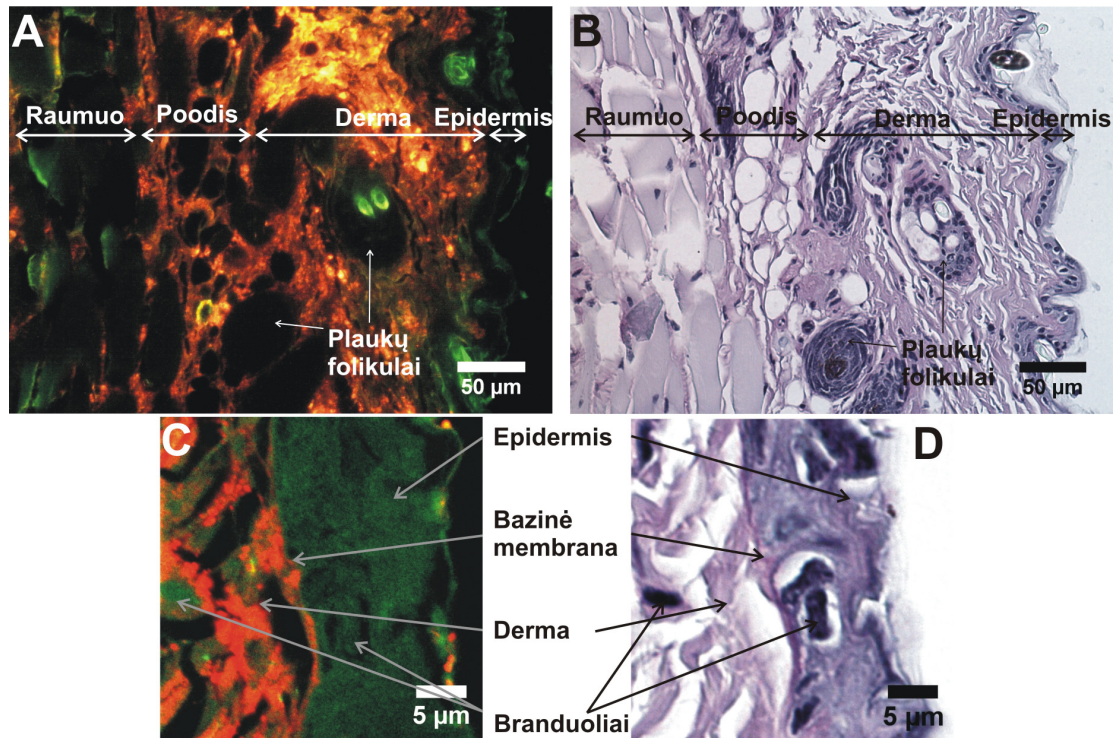
KT pernaša per placentos barjerą nėra plačiai ištirta. Yra parodyta, kad pelėms suleidus CdTe/CdS KT, dengtų skirtingais paviršiniaus ligandais, jų šerdį sudarantis kadmio aptinkamas embrione, tačiau fluorescencinės mikroskopijos analizė nepatvirtino KT kaupimosi jame (3). Kadmio susikaupimas embrione priklausė nuo KT dydžio bei paviršiaus padengimo. Tokie rezultatai aiškinami tuo, jog KT patekus į motinos organizmą, jie gali suirti (5), o jų skilimo produktai, pvz., kadmio junginiai, pasižymi kitais metaboliniais keliais ir placentos barjerą jau gali įveikti (119). Taip pat teigiama, kad stabilizavus CdTe/CdS KT nanokristalą SiO₂ arba PEG

apvalkalu, kadmio koncentracijos embrione buvo ženkliai mažesnės. Tai galėjo sąlygoti geresnę nanokristalo apsaugą nuo sąveikos su organizmo molekulėmis ir didesnę KT stabilumą. Kita vertus, papildomi dangalai įtakoja dalelės skersmenį ir tai gali pabloginti jų praeinamumą per placentos barjerą. Šis neapibrėžtumas rodo, kad KT prasiskverbimas per motinos-embriono apsauginį barjerą yra menkai suprastas ir reikalingi išsamesni tyrimai. Visgi daugiau KT lokalizacijos tyrimų fluorescenciniais metodais placentoje ir embriono audiniuose neatlikta. Šiame darbe pristatyti rezultatai rodo, kad fluorescencinė mikroskopija derinama su klasikinės histologijos metodu ir fluorescencine spektroskopija gali būti sėkmingai pritaikyta tiriant KT patekimą į embrioną.

4.3. KT lokalizacija odoje ir migracija organizme

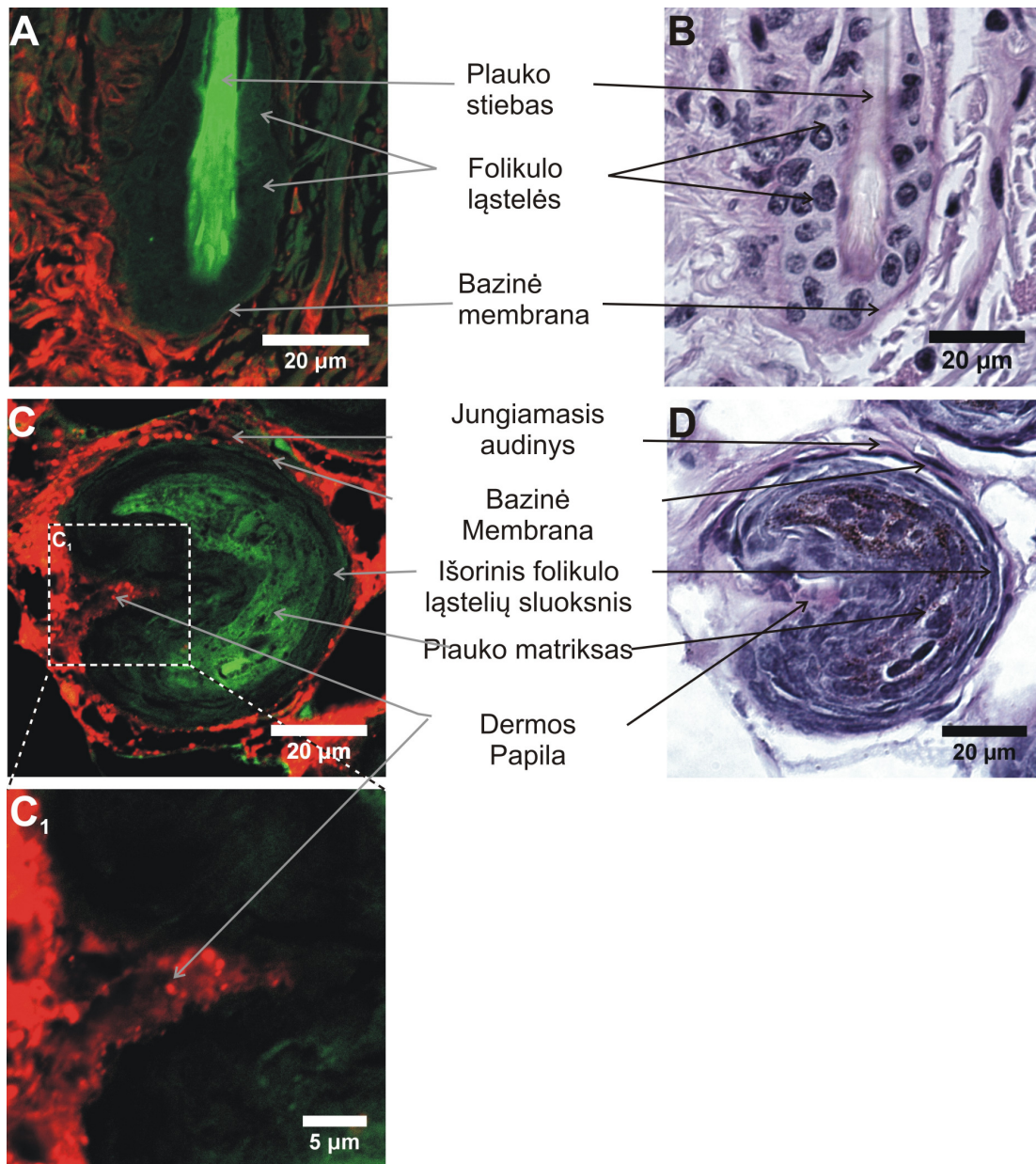
4.3.1. Po oda suleistų KT lokalizacija audiniuose

Siekiant ištirti KT pasiskirstymą odoje ir išnagrinėti jų migracijos audiniuose kelius, pelėms po oda buvo suleidžiama CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo ir praėjus 1 bei 24 val. pelių audiniai buvo preparuojami, parengiami jų parafininiai pjūviai ir atliekama konfokalinė fluorescencinė mikroskopija. Tiriant parengtus odos preparatus, audinio savitoji fluorescencija buvo stebima žaliame RGB detektoriaus kanale. Gautuose vaizduose galima atskirti pagrindinius odos sluoksnius, raumens skaidulas, plauko folikulus, riebalų bei prakaito liaukas ir kitas charakteringas struktūras (pav. 4.12). Po oda suleidus CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo, raudona KT FL odos preparatuose buvo stebima pasiskirsčiusi netolygiai. KT buvo gausiai susikaupę dermoje, poodyje ir giliau esančio raumens jungiamajame audinyje (pav. 4.12). Visgi KT FL nebuvo aptikta epidermyje, plaukų folikuluose, riebalų liaukose ir raumeninėse skaidulose. KT pasiskirstymas po 1 ir 24 val. iš esmės nesiskyrė, tačiau po 24 val. preparatuose buvo stebimas mažesnis FL intensyvumas.



Pav. 4.12. KT pasiskirstymas odoje. Konfokalinės fluorescencinės (A, C) ir pralaidumo (B, D – PAS dažymas) mikroskopijos pelės odos preparatų (parafininė technika) nuotraukos, praėjus 24 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo suleidimo po oda. KT FL (raudona) stebima dermoje, poodyje bei raumenyje (A). KT gausiai kaupiasi palei bazinę membraną, tačiau nepatenka į epidermį (C) (A, B: x20/0,5 obj., C, D: x60/1,4 obj., $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm).

Dermoje ir poodyje KT buvo pasiskirstę tolygiai. Tai rodo, kad dermos audinio struktūra neriboja KT difuzijos. Intensyvesnė KT FL stebima aplink jungiamojo audinio kolageno skaidulas. Tai leidžia įtarti, kad KT sąveikauja su tarpląstelinės medžiagos baltymais ir juos aplimpa. Didesnio didinimo fluorescenciniuose vaizduose aiškiai matoma, kad KT susikaupė palei dermos-epidermio jungtį, tačiau šios ribos neįveikė ir KT į epidermį nepateko (pav. 4.12 C).

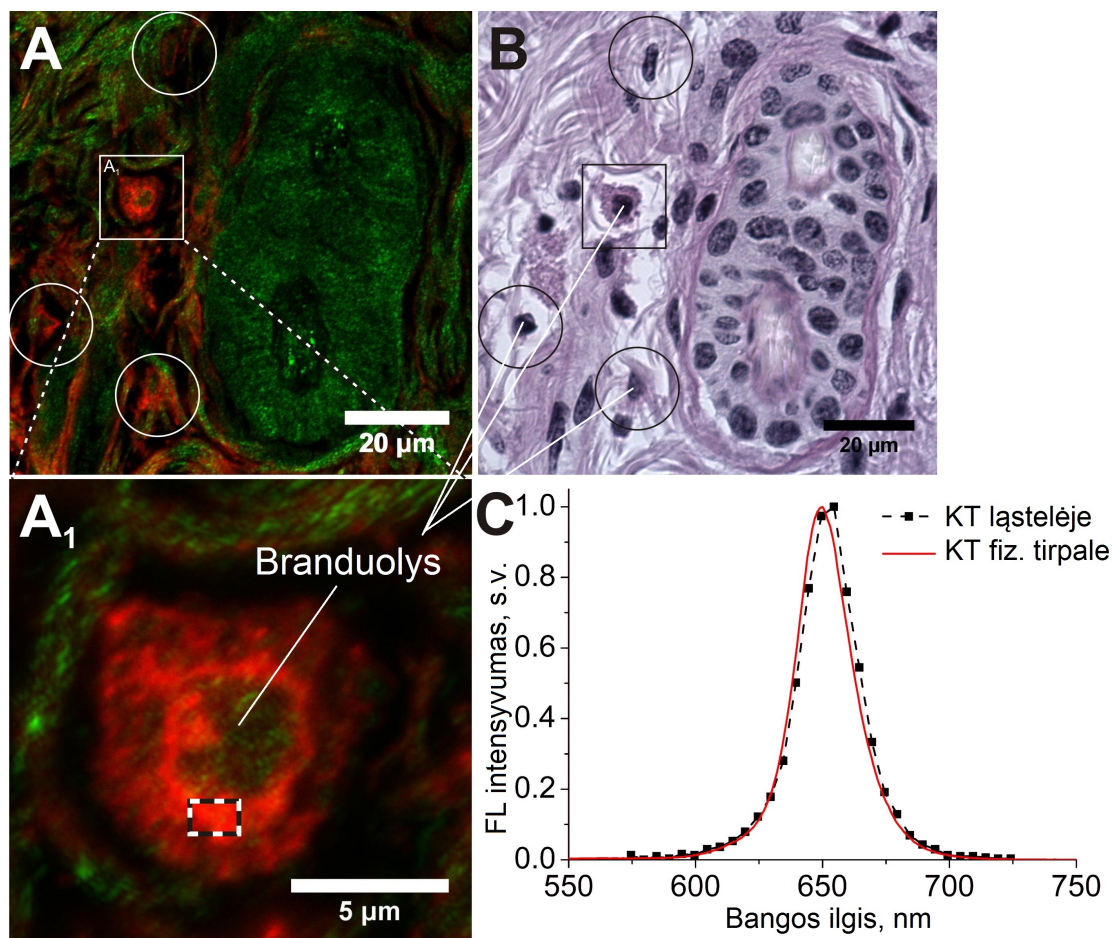


Pav. 4.13. KT susikaupimas aplink plauko folikulą. Fluorescencinės (A, C, C₁) ir pralaidumo (B, D – PRŠ dažymas) mikroskopijos odos preparatų nuotraukos (parafininė technika), praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo suleidimo po oda. KT FL stebima aplink plauko folikulą (A), dermos papiloje (C, C₁), tačiau į folikulą KT nepatenka (x60/1,4 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm).

Didelis KT FL kontrastas buvo stebimas ir aplink plauko folikulus: KT gausiai kaupėsi dermoje, tačiau išorinės plauko makšties ląstelėse ar kitose folikulo dalyse bei riebalinėse liaukose jų susikaupimas nenustatytas (pav. 4.13). Atlikus fluorescencinę analizę ir vėliau bandinius nudažius PRŠ dažu,

kuris išryškina bazinę membraną, galima buvo tiksliau pasakyti, kad KT FL neprasiskverbia per bazinę epidermio membraną. Tai rodo, kad šis ekstraląstelinis darinys yra nepralaidus tyrime naudotoms nanodalelėms. KT aptikti plauko papiloje, tačiau jų nebuvo šalia esančiame plauko matrikse (pav.4.13 C, C₁). Šioje vietoje, barjeras tarp audinių yra ploniausias ir ten vyksta intensyvi medžiagų pernaša, būtina matrikso ląstelių proliferacijai užtikrinti. Tačiau netgi tokiomis sąlygomis KT į plauko folikulą nepatenka.

Nors dauguma dermoje lokalizuotų KT buvo stebimi aplipę aplink skaidulas, jų FL buvo stebima ir dermos ląstelių viduje (pav. 4.14). Jose KT daugiausiai kaupėsi citoplazmoje ir buvo pasiskirstę ne tolygiai citozolyje, o susitelkę į sankaupas (pav.4.14 A₁). KT aptikti perinuklearinėje zonoje, tačiau nepateko į ląstelių branduolius. Toks KT FL pasiskirstymas ląstelėje leidžia teigti, kad jie kaupiasi endosomose irba endoplazminiame tinkle. Spektriniu detektoriumi gauti duomenys rodo, kad KT FL spektras ląstelėje nepakito lyginant su kiuvetėje išmatuotu injekcinio KT tirpalo spektru (pav. 4.14 C). Spektrinių savybių stabilumas *in vivo* rodo, kad CdSe/ZnS-mPEG KT optinės savybės ir cheminė struktūra nepakinta jiems patekus į ląstelių vidų. Taigi ląstelės fermentai bei kitos biologiškai aktyvios molekulės nesukelia ūmios šių KT degradacijos, kuri pasireikštų kaip KT FL spektro formos pokyčiai ar FL išnykimas. Šios ląstelės morfologiškai atrodė sveikos ir gyvybingos.

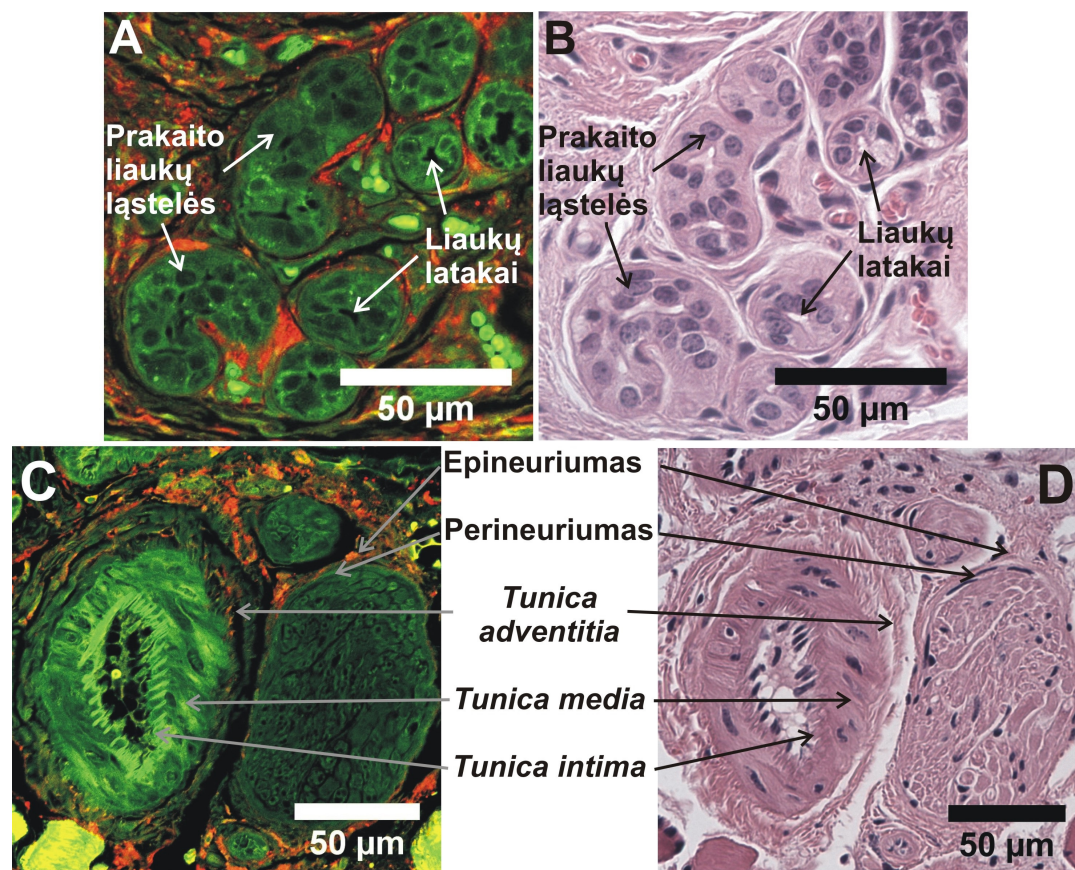


Pav. 4.14. Konfokalinės fluorescencinės (A, A₁) ir pralaidumo (B – PRŠ dažymas) mikroskopijos odos preparatų nuotraukos (parafininė technika). KT susikaupimas dermos ląstelėse (apibrauktos) praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo suleidimo po oda. C – KT FL spektras ląstelėje, gautas iš A₁ dalyje pažymėto plotelio (x60/1,4 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm).

Vertinant dažytų preparatų pralaidumo mikroskopijos vaizdus nustatyta, kad daugiausiai KT sukaupusios ląstelės pasižymi grūdėta citoplazma (pav. 4.14 B). Remiantis odos morfologija šios ląstelės priskiriamos putliosioms ląstelėms arba makrofagams. KT taip pat aptikti eozinofiluose. KT kaupimasis fibroblastuose bei kitose ląstelėse buvo mažiau intensyvus. Raumeninėse skaidulose ir adipocitų vakuolėse KT neaptikta visiškai, nepaisant intensyvios jų FL aplink ląstelės membraną.

Kadangi KT susikaupimas dermoje išliko pakankamai gausus iki 24 val., buvo iškelta hipotezė, kad jie galėtų būti pašalinti iš odos per prakaito

liaukas. Siekiant tai išsiaiškinti, KT buvo suleisti į pelių padų poodį, nes būtent ten aptinkamos graužikų prakaito liaukos (120). Mikroskopijos vaizduose buvo aiškiai matoma, kad KT buvo susitelkę aplink šias liaukas, tačiau jų viduje KT neaptikti. Tai rodo, kad KT nepateko į epitelines liaukų ląsteles, todėl jie negali būti pašalinti su liaukų sekretu į išorę (pav. 4.15 A).



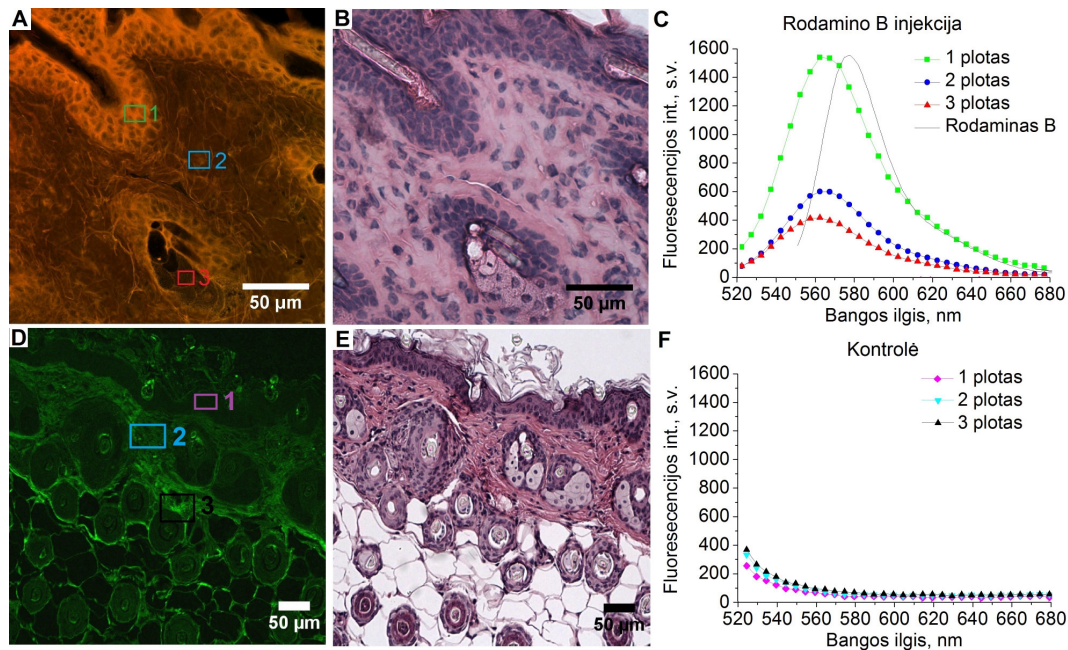
Pav. 4.15. KT susikaupimas giliose odos struktūrose: aplink prakaito liaukas (A), arteriją ir nervą (C). Konfokalinės fluorescencinės (A, C) ir pralaidumo (B, D – HE dažymas) mikroskopijos odos preparatų (parafininė technika) nuotraukos, praėjus 1 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo suleidimo po oda ($\times 20/0,5$ obj., $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm).

KT buvo stebimi periferinio nervo išoriniame apvalkale (epineuriume), tačiau raudona FL juosė patį nervą ir giliau į nervo audinius (perineuriumą, Švano ląsteles ar neuronus) nepateko (pav. 4.15 C). Tai rodo, kad KT laisvai difunduoja puriame jungiamajame audinyje, kuriame baltyminės skaidulos išsidėsčiusios pakankamai dideliais atstumais, kad tarp jų galėtų laisvai judėti

KT. Tuo tarpu perineuriumą sudaro tankiai susiglaudusios kolageno skaidulos ir tokia audinio organizacija riboja KT migraciją bei gilesnį įsiskverbimą į nervo audinius.

Panašiai KT FL stebėta stambių kraujagyslių išoriniame dangale – adventicijoje (*tunica adventitia*), tačiau į vidurinį raumeninį sienelės sluoksnį (*tunica media*) jie neprasiskverbė (pav. 4.15 C). Adventicijos audinio struktūra panaši į epineuriumo ir joje KT gali laisvai difunduoti. Tačiau raumeninį sluoksnį sudaro glaudžiai susietos lygiųjų raumenų skaidulos ir tarpai tarp jų tikriausiai yra nepakankami, kad KT galėtų pro juos patekti. Tikėtina, kad raumeninių skaidulų bazinė membrana formuoja bendrą išsistinę membraną, t.y. tankų baltyminių tinklą, kuris papildomai riboja KT judėjimą (121).

Palyginimui buvo tirtas mažos molekulinės masės organinio dažiklio - rodamino B - pasiskirstymas audiniuose suleidus jo tirpalo po oda (pav. 4.16). Didžiausia šio dažiklio fluorescencijos dalis pateko į „žalią“ (500-590 nm) RGB detektoriaus kanalą, kuriame buvo stebima ir savitoji audinio fluorescencija. Taigi šiuo detektoriumi buvo beveik neįmanoma atskirti rodamino B FL nuo audinio savitosios fluorescencijos fono. Todėl šiuo dažikliu paveiktų bandinių vaizdinimui buvo pasirinktas spektrinis detektorius. Kitaip nei KT, rodamino B FL buvo stebima visuose odos sluoksniuose įskaitant epidermį, plaukų folikulus, riebalų liaukas, kraujagyslių sieneles bei raumens ląsteles. Toks pasiskirstymas atspindi daugumos panašaus dydžio organinių junginių (bei po oda leidžiamų vaistinių preparatų) praktiškai neribojamą difuziją audiniuose ir patekimą į tas odos dalis, kurios nepasiekiamos KT. Rodamino B spektras bandinyje yra paslinktas į trumpabangę pusę ir išplitęs lyginant su vandeninio tirpalo, kuris buvo suleidžiamas pelei, spektru (pav. 4.16 C). Šie spektriniai skirtumai galėjo atsirasti dėl pakitusios molekulės aplinkos, nes preparuojant bandinį, jis buvo dehidratuojamas organiniais tirpikliais ir įliejamas į parafiną.



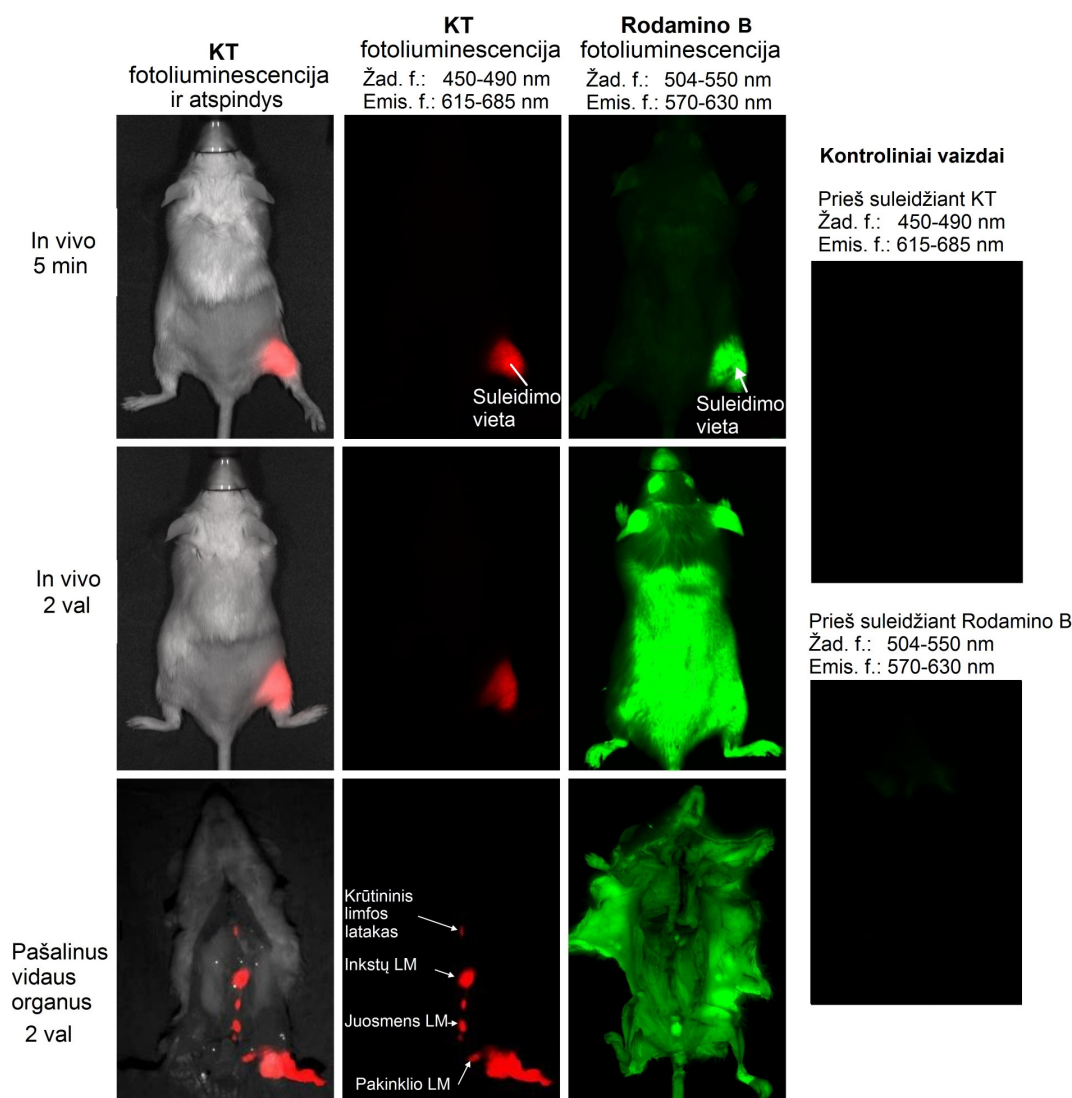
Pav. 4.16. Konfokalinės fluorescencinės (A, D) ir pralaidumo (B, E – HE dažymas) mikroskopijos odos preparatų nuotraukos (parafininė technika), praėjus 1 val. po injekcijos po rodamino B injekcijos po oda (A, B) ir nesuleidus rodamino B (D, E – kontroliniai vaizdai). C ir F dalyse pateikti atitinkamai A ir D nuotraukose pažymėtų plotų spektrai bei rodamino B injekcinio tirpalo spektras ($\times 20/0,5$ obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm).

Aptarti rezultatai rodo, kad po oda suleisti KT pasiskirsto dermyje, poodyje ir dalyje raumens. KT laisvai migruoja puriame jungiamajame audinyje, prasiskverbia tarp raumeninių skaidulų bei adipocitų. Visgi KT difuzija audiniuose yra ribojama tam tikrų užląstelinių struktūrų ir tai sąlygoja KT nepatekimą į epidermį, plaukų folikulus, riebalines bei prakaito liaukas. Minėtos odos dalys nuo dermos yra atskirtos bazine membrana, kuri sudaryta iš tankiai išsidėsčiusių skaidulinių baltymų komplekso. Taigi bazinė membrana užima svarbų vaidmenį ne tik epitelinio audinio ląstelių augime, bet ir funkcionuoja kaip pasyvus filtras junginių pernašai iš dermos į epidermį.

4.3.2. Po oda suleistų KT migracija organizme

Po oda suleidus CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo, jų lokalizacija gyvame organizme buvo vertinama fluorescencinio vaizdinimo ir fluorescencinės

spektroskopijos metodais. Iškart po suleidimo gyva pelė buvo stebima neinvaziškai vaizdinant visą gyvūną. Fluorescenciniuose vaizduose KT FL buvo išplitusi aplink dūrio tašką ir toks pasiskirstymas išliko visą stebėjimo laikotarpį iki 24 val (pav. 4.17).

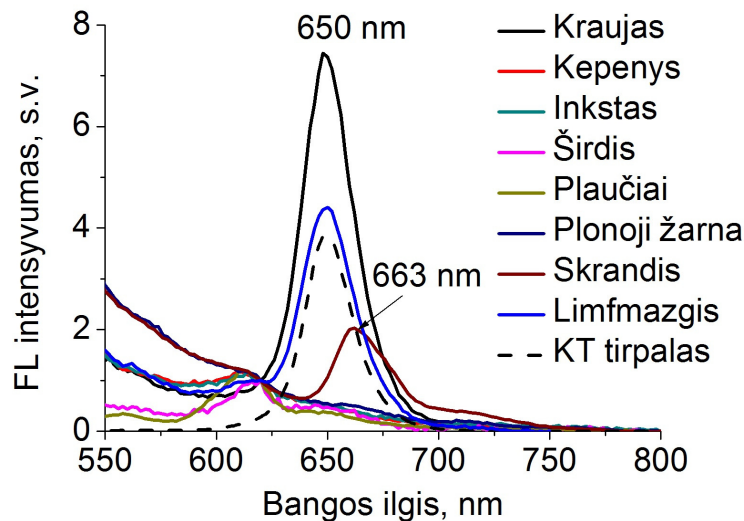


Pav. 4.17. CdSe/ZnS-mPEG KT ir rodamino B FL pasiskirstymas pelės organizme praėjus 5 min ir 2 val po poodinės injekcijos. Atlikus *in vivo* vaizdinimą, buvo pašalinami vidaus organai ir stebimas KT susikaupimas limfinėje sistemoje. „Žad. f.“ ir „Emis. f.“ nurodo naudotų žadinimo ir emisijos filtrų pralaidumo sritis, kurios pavaizduotos ir pav. 3.2.

Po 2 val gyvūnams buvo atliekama cerebrospinalinė dislokacija, skrodimas ir vertinamas fluoroforų susikaupimas vidaus organuose. KT FL

buvo stebima juosmens, klubiniuose bei inksto LM ir stebima krūtininiame limfos latake (pav. 4.17). KT aptikti poodiniuose suleidimo vietos limfmazgiuose ir toliau plintant limfagyslėmis į kirkšnies bei pažasties LM (pav. 4.19).

Fluorescencinė spektroskopija patvirtino šiuos duomenis. KT charakteringa FL juosta ties 650 nm buvo išskiriama LM ir kraujo spektruose, tačiau ji neaptikta kitų vidaus organų spektruose (pav. 4.18). Skrandžio ir žarnyno spektruose buvo stebima fluorescencijos juosta su smaile ties 663 nm, išplitusi į ilgabangę sritį. Ši fluorescencija greičiausiai sąlygota pelių pašare esančių augalinių pigmentų ar mikrofloros.

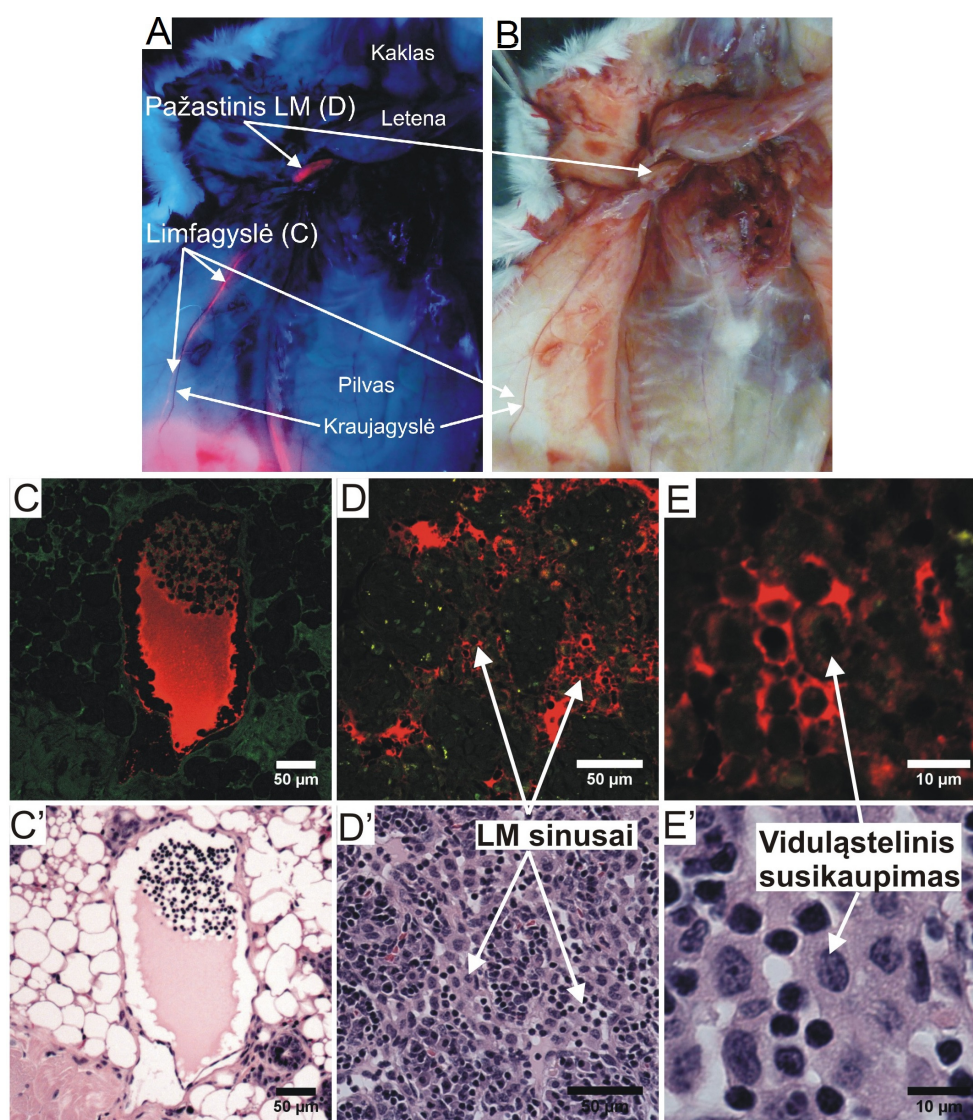


Pav. 4.18. Pelės vidaus organų fluorescencijos spektrai, praėjus 2 val. po CdSe/ZnS-mPEG KT injekcijos po oda ($\lambda_{\text{žad}}=450$ nm). Spektrai normuoti ties 620 nm ($n_{\text{gyvūnų/grupėje}} \geq 2$, $n_{\text{matavimų/org.}}=3$).

Šie rezultatai rodo, kad KT pagrindinis KT pašalinimo iš audinių kelias yra per limfinę sistemą. Nors KT gausiai kaupiasi LM, tačiau tik dalis jų yra užlaikomi, o likę KT prateka per limfinę sistemą, patenka į krūtininį limfos lataką, kuris atsiveria į poraktinę veną. Todėl į limfą patekę KT nėra sulaikomi limfinėje sistemoje ir vėliau gali įsilieti į kraujotakos sistemą. Taigi teoriškai KT gali patekti į kraują dviem keliais: rezorbuotis į kraujo kapiliarus suleidimo vietoje ir įtekėti su limfa į veninę kraujotaką. KT atsiradimas kraujyje iškelia

prielaidą, kad kažkiek KT pasiskirstė po visą organizmą ir pateko į visus organus. Tačiau jų koncentracija greičiausiai buvo per maža, kad jie būtų aptikti naudotu metodu.

Tuo tarpu rodaminio B FL iš pradžių buvo stebima suleidimo vietoje, tačiau dažas sparčiai plito organizme ir jau po 5 minučių FL buvo stebima visame organizme (pav. 4.17). Dažo FL intensyvumas augo viso stebėjimo (2 val) laikotarpyje. Išskrodus gyvūną, ryški rodaminio B FL buvo stebima visuose audiniuose. Dažas pasiskirstė pakankamai tolygiai ir gausnio susikaupimo vietos neišskiriamos.



Pav. 4.19. A) CdSe/ZnS-mPEG KT susikaupimas pelės limfinėje sistemoje, matomas apšvietus UV lempa, praėjus 2 val. po KT suleidimo po oda; B) Tos pačios vietos atspindžio vaizdas; C-E) Pelės audinių preparatų (parafininė

technika) konfokalinės fluorescencinės (C-E) ir pralaidumo (C'-E' – HE dažymas) mikroskopijos vaizdai: C – limfagyslė, D – limfmazgis, E – išdidintas limfmazgio sinuso fragmentas (C: x20/0,5 obj., D,E: x60/1,4 obj., $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm).

KT FL limfinėje sistemoje buvo stebima ir plika akimi, apšvietus audinius UV lempa (pav. 4.19). Tai sudaro sąlygas atlikti fluorescencinį limfinės sistemos vaizdinimą navikų šalinimo operacijos metu, kuomet svarbu vizualizuoti potencialiai patologinius limfmazgius. Atlikus išpreparuotų limfinės sistemos dalių pjūvių mikroskopinę analizę, paaiškėjo, kad KT FL buvo intensyvi limfoje, o limfocituose jų susikaupimas buvo nežymus (pav. 4.19 C). Limfmazgiuose KT daugiausiai aptikta požievinuose ir šerdiniuose sinusuose, tuo tarpu limfiniame audinyje KT FL buvo praktiškai nestebima (pav. 4.19 D). Taip pat nustatyta, kad KT kaupėsi ląstelių citoplazmoje ir joje pasiskirstė ne tolygiai, o grūdėtai (pav. 4.19 E). Tai greičiausiai sąlygojo jų susikaupimas liposominėse pūslelėse dėl endocitotinio patekimo į ląstelę. KT neaptikta ląstelių branduoliuose. KT kaupimasis ląstelėse priklauso nuo jų tipo: limfocituose KT FL buvo nežymi, o makrofaguose KT kaupėsi gausiausiai.

Po oda suleistų KT pasiskirstymo tyrimų aptarimas

Poodinė KT injekcija leido tirti epidermio barjerines savybes iš vidaus, t.y., KT pernašą bazaline-apikaline kryptimi. Anksčiau KT pernaša iš dermos į epidermį nebuvo tirta. Tyrimai taip pat svarbūs siekiant prognozuoti KT lokalizaciją ir poveikį organizme, jei jie prasiskverbtų iš aplinkos per epidermio barjerą jį pažeidus ar įvedant diagnostikos tikslais.

Gauti rezultatai rodo, kad KT prasiskverbimas per epidermio-dermos ribą yra stipriai apribotas ir praktiškai nevyksta. Tai įdomus faktas, nes dažniausiai odos barjerinė funkcija priskiriama raginiam epidermio sluoksniui ir tarpląstelinėms keratinocitų jungtims. Tuo tarpu bazinės membranos įtaka medžiagų patekimui iš išorės į dermą bei iš dermos kraujotakos į epidermį yra

menkai ištirta(69, 70). Literatūroje galima rasti netiesioginių bazinės membranos sąsajų su jos barjerinėmis savybėmis. Nustatyta, kad ant žmogaus odos *in vitro* užtepus geležies oksido ND, jos geba pereiti raginį sluoksnį ir įsiskverbti į epidermio gyvų ląstelių sluoksnius (pvz., grūdėtąjį epidermį), tačiau šių ND perėjimas iš epidermio į dermą nestebėtas (69). Kato S. su bendraautoriais (2009) parodė, jog ant odos užtepus C-60 fullerenu, 7% naudotos dozės susikaupė epidermyje, tačiau per 24 val. jie į dermą nepateko. Šie tyrimai ir išsami Prow T.W. su bendraautoriais apžvalga (62) pažymi, kad daugumos ND perėjimas iš epidermio į dermą yra stipriai apribotas ir daugumoje tyrimų nenustatomas. Tokios ND lokalizacijos priežastys menkai išnagrinėtos. Mūsų gauti rezultatai galėtų iš dalies paaiškinti aptartus literatūros duomenis, kad KT yra sulaikomos ties epidermio-dermos riba. Šioje audinių sandūroje didelę reikšmę vaidina bazinė membrana, kuri galėtų funkcionuoti kaip pasyvus filtras, sudarytas iš fibrilinių baltymų bei proteoglikanų tinklo, ir užkertantis KT ar kitų stambių darinių pernašą tarp epidermio ir dermos.

KT sulaikymas ties bazine membrana gali būti panaudojamas jos vientisumo vertinimui (nefropatijos ar karcinomų atveju), nes jos struktūros pokyčiai ir persitvarkymas yra kai kurių ligų priežastis. KT taikymas bazinės membranos funkcijos tyrimui galėtų būti panaudojamas *in vivo* naudojant neinvazinį fluorescencinio vaizdinimo metodus. Yra parodyta, kad geležies oksido ND sėkmingai pritaikytos inkstų glomerulų bazinės membranos integralumo tyrimui magnetinio rezonanso tomografijos metodu (117). Optiniai metodai gali būti pritaikomi vaizdinti tiek ląstelių lygyje tiriamaisiais tikslais, tiek ir audinių lygyje operacijų metu. Be to jie yra sąlyginai pigūs.

Kadangi pagrindinis odos barjero vaidmuo daugumai junginių priskiriamas raginiam epidermio sluoksniui, manoma, kad plauko folikulas galėtų būti alternatyvus vaistų patekimo į odą būdas (61, 122). Plauko šaknyje epidermis yra itin plonas, o raginio sluoksnio visiškai nėra (123). Plaukų folikulai išsitiesia giliai į odą ir jie apraizgyti tankiu kapiliarų tinklu. Tai sąlygoja efektyvią per folikulą prasiskverbusių vaistinių preparatų rezorbciją į

kraują ir sisteminį pasklidimą organizme. Mūsų rezultatai rodo, kad KT nepatenka iš dermos į plauko folikulą. Nustatytas gausus KT susikaupimas dermos papiloje, kuri charakteringa plaukui esant anageno stadijoje, kuomet yra intensyviausias plauko augimas ir ląstelių metabolizmas (124). Taigi KT nepatenka į plauko šaknį net vykstant aktyviai maisto medžiagų apykaitai plauko matrikse, t.y. kuomet KT pernašos tikimybė didžiausia. Šie rezultatai iš dalies antrina tyrimams, kuriuose parodyta, kad iš išorės užteptus polimerinių ND emulsijos, jos susikaupia folikule, tačiau iš jo negali prasiskverbti į dermą (60, 61). Taigi mūsų rezultatai papildo literatūros duomenis, kad KT negali prasiskverbti per bazinės membranos skiriamus audinius ne tik apikalinė-bazalinė, bet ir bazalinė-apikalinė kryptimi.

Konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos rezultatai rodo, kad KT kaupiasi dermos ląstelėse. Jų netolygus pasiskirstymas citoplazmoje liudija, jog KT susikaupę pūslelėse ir greičiausiai pateko į ląsteles endocitozės būdu. Yra parodyta, kad įvairios odos ląstelės geba įsisavinti aplinkoje esančias ND *in vitro*: kietų lipidų ND kaupėsi keratinocitų citoplazmoje (125); fulerenai aptikti putliųjų ląstelių lizosomose, mitochondrijose bei endoplazminiame tinkle (126); KT susikaupimas pranešamas fibroblastuose (103), dendritinėse ląstelėse (127) bei makrofaguose (106). Visgi KT viduląstelinis kaupimasis *in vivo* yra daug mažiau ištirtas, nors tokie tyrimai itin svarbūs klinikiniam jų taikymams.

KT patekimas į odos ląsteles svarbus panaudojant juos kaip vaistų nešiklius bei fluorescenciniame vaizdinime. Kita vertus kai kurių ND kaupimasis ląstelėse gali sutrikdyti baltymų sintezę, paveikti ląstelių judrumą, sulėtinti jų proliferaciją, sukelti uždegimines, alergines reakcijas bei sukelti toksinį poveikį organizme (127, 128). Todėl KT kaupimasis ląstelėse svarbus vertinant jų toksikologines savybes.

Po oda suleistų KT migracija organizme

CdSe/ZnS-mPEG KT aptikimas odoje po 24 val rodo, kad didelė dalis suleisto tirpalo neišsiskirstė iš suleidimo vietos ir nepasišalino iš organizmo.

KT susitelkė aplink prakaito liaukas, tačiau jų nepatekimas į epitelines ląsteles rodo, kad šios KT negali būti pašalintos su prakaitu, nors dalis organinių toksinų bei vaistinių preparatų yra šalinami šiuo būdu (129). KT patekimas į prakaito liaukas ir šalinimas su jų sekretu iki šiol nebuvo nagrinėtas.

Lėta KT šalinimo kinetika iš dermos visų pirma susijusi su jų ribota difuzija odos audiniuose. Pagrindiniai medžiagų migracijos iš tarpląstelinės terpės keliai yra tiesiogiai patekti į kraują arba limfos kapiliarus. Migracijos greitis visų pirma siejamas su junginių perėjimu per kapiliaro sienelę. Kraujo kapiliarų sienelę sudaro išsivienijęs endotelio ląstelių sluoksnis, kurios tankiai susijungusios glaudžiosiomis ir adhezinėmis jungtimis. Endotelio ląsteles dengia pericitai ir juosia išsivienijęs bazinė membrana. Kaip rodo gauti rezultatai, KT gana gerai sulaikomi bazinės membranos dengiamų audinių (epidermio, riebalų ir prakaito liaukų, plauko folikulų, raumeninių skaidulų). Priešingai nei ląstelių membranos, turinčios įvairių kanalų, nešiklių bei pasižyminčios aktyvia medžiagų pernaša, bazinė membrana yra sudaryta iš tankaus fibrilinių baltymų tinklo (kolagenų, laminino, proteoglikanų ir kt.) (130), kuris mechaniniu požiūriu veikia kaip pasyvus filtras, neleidžiantis prasiskverbti tirtiems KT. Per bazinę membraną praėję junginiai turi įveikti ir endotelio ląstelių užkardą. Tam medžiagos turi prasiskverbti transląstelinio būdu arba difunduoti tarp ląstelių interląstelinio keliu. Pastarojo būdo našumas priklauso nuo endotelio porų dydžio, kuris odoje yra apie 5 nm (38). Šie kapiliaro sienelės ypatumai greičiausiai sąlygojo stipriai apribotą CdSe/ZnS-mPEG KT rezorbciją į kraują kapiliarus.

Tuo tarpu limfos kapiliarai yra fiziologiškai prisitaikę pernešti didesnius darinius: plazmos baltymus, patogenus, imunines ląsteles ir kt. Todėl jų sienelės skiriasi nuo kraują kapiliarų. Limfos kapiliarai yra didesnio skersmens, nereguliaraus dydžio, endotelio ląstelės mažesnės, jų sluoksnio nedengia pericitai. Taip pat svarbu, kad jų bazinė membrana yra ne išsivienijęs, joje mažiau kai kurių struktūrinių baltymų, pvz., lamininų(131). Šie skirtumai lemia didesnę limfagyslių laidumą kai kurioms makromolekulėms. Manoma, kad tai sąlygojo efektyvų KT patekimą į limfos kapiliarus. KT lokalizacija

limfinėje sistemoje sąlygoja aukštą KT FL kontrastą LM su aplinkiniu audiniu ir tai galima panaudoti limfinės sistemos vizualizavimui tiriant limfotakos fiziologiją bei klinikiniuose taikymuose, pvz., limfonodektomijos metu.

Rodamino B pasiskirstymas organizme iliustruoja mažos molekulinės masės junginio elgesį organizme. Dėl savo matmenų dažas lengvai prasiskverbia per poodžio kapiliarų sienelę, patenka į kraują ir yra greitai išnešiojamas po visą organizmą. Taigi KT migracija organizme yra iš esmės kitokia nei mažos molekulinės masės junginių.

Kiti autoriai taip pat stebėjo KT susikaupimą limfmazgiuose suleidus jų po oda (132-134). Straipsniuose pažymima, kad KT leidžia vizualizuoti limfinę sistemą dideliu kontrastu aplinkinių audinių atžvilgiu ir tai suteikia galimybių panaudoti juos fundamentiniuose limfotakos tyrimuose, diagnozuojant mikrometastazes LM arba realaus laiko audinių vaizdinimui operacijos metu. Visgi detali KT ar kitų ND lokalizacija LM nėra išsamiai ištirta. Yra parodyta, kad KT daugiausiai aptinkami požieviniuose ir šerdiniuose LM sinusuose (133, 135), tačiau KT lokalizacija ląsteliniu lygiu nėra aptarta. Mūsų rezultatai papildė literatūros duomenis ir rodo, kad KT gali kauptis LM ląstelėse. Daugiausiai KT kaupiasi LM sinusuose esančiuose makrofaguose, tuo tarpu limfocituose jų susikaupimas nežymus. Tai greičiausiai sąlygojo ląstelių funkcinis prisitaikymas: makrofagų pagrindinė paskirtis yra šalinti limfoje esančius svetimkūnius bei patogenus, tuo tarpu limfocitai formuoja organizmo imunines reakcijas ir reaguoja į specifines biologines molekules. Grūdėtas KT pasiskirstymas ląstelių citoplazmoje ir nepatekimas į branduolius leidžia tarti, kad KT pateko į ląsteles endocitozės būdu. Šis KT patekimo į ląsteles būdas nustatytas ir *in vitro* tyrimais (27, 37, 118). Pažymėtina, kad KT susikaupimas limfiniuose folikuluose (limfocitų susitelkimo zonose) buvo nežymus. Tai greičiausiai sąlygota to, kad retikulocitų ir jungiamojo audinio skaidulų formuojama folikulo sienelė bei tankus limfocitų susitelkimas riboja KT prasiskverbimą į folikulo vidų.

Taigi KT lokalizacijos limfinėje sistemoje tyrimai rodo, kad pagrindinis KT pašalinimo iš audinių kelias yra migracija limfos sudėtyje. KT

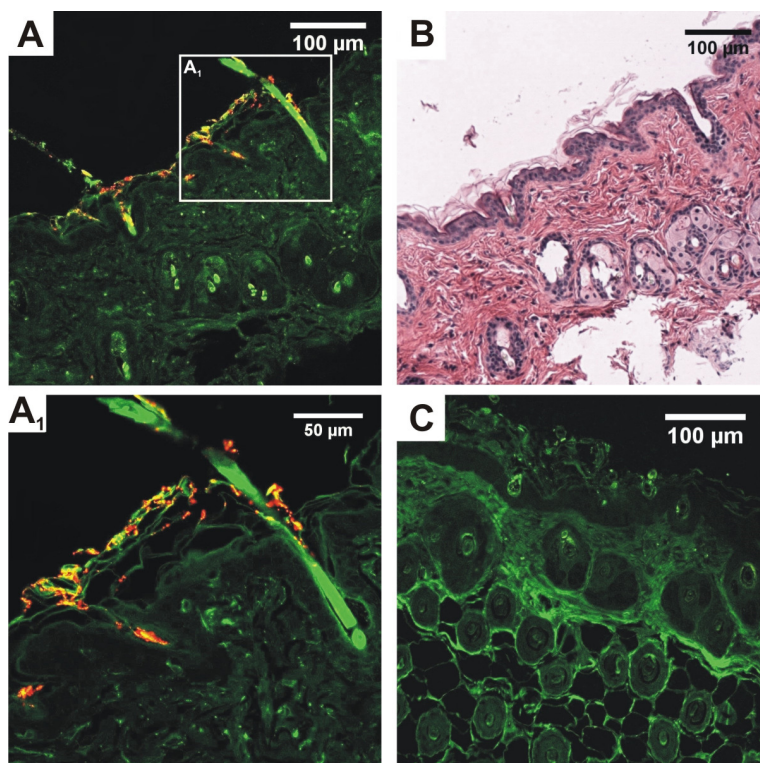
pratekėdami pro limfmazgių sinusus kaupiasi makrofagų viduje, tačiau nėra visiškai sulaikomi. Todėl KT stebimi eferentinėse limfagyslėse, krūtininiame limfos latake ir įsilieja į veninę kraujotaką.

KT teoriškai galėtų pasklisti organizme ir makrofagų, dendritinių ar kitų migruojančių ląstelių viduje, tačiau tai pakankamai lėtas ir mažo našumo procesas, todėl tai nežymiai įtakotų sisteminę KT pasiskirstymą (36, 136).

4.4. KT ir rodamino B prasiskverbimas per odą

Žmogaus odos paviršiaus plotas siekia iki 2m^2 ir tai yra didžiausias organas. Todėl oda yra vienas svarbiausių organizmo apsauginių barjerų. KT vis dažniau taikomos elektronikoje, moksliniuose tyrimuose, diegiami į medicinos metodus. Tai didina žmogaus odos sąlyčio tikimybę su KT. Visgi KT gebėjimas kauptis odoje, prasiskverbimas pro ją į gilesnius audinius ir jų sukeliamas šalutinis poveikis nėra galutinai išaiškintas. Todėl šiuo tyrimu siekėme iširti CdSe/ZnS-mPEG KT lokalizaciją odos sluoksniuose, užtepus jų tirpalo ant skustos pelių odos. Palyginimui buvo tirtas organinio fluoroforo – rodamino B – prasiskverbimas per odą.

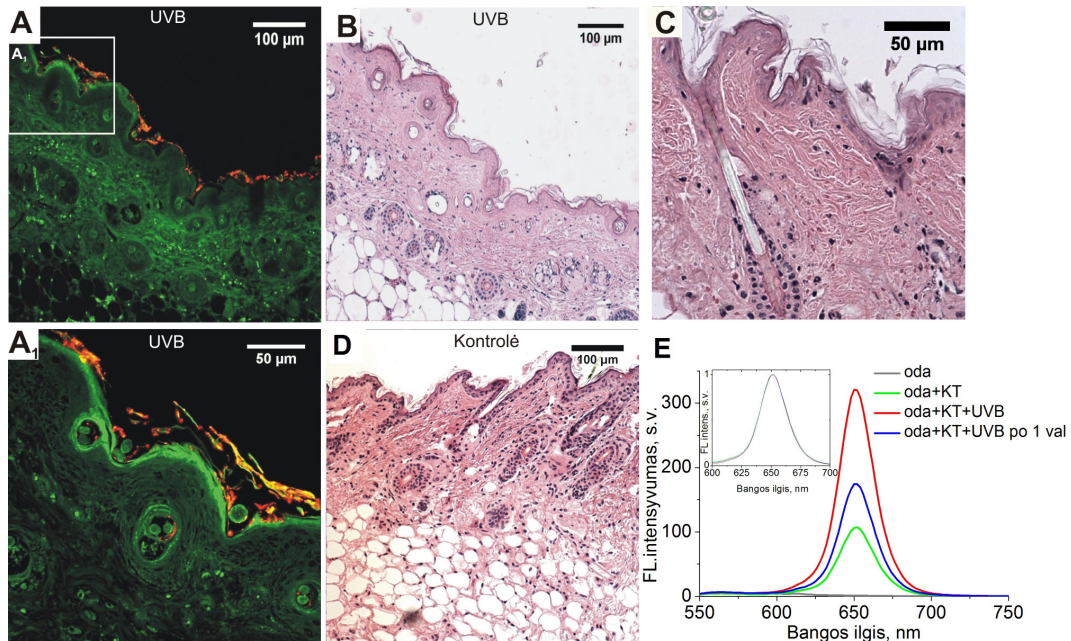
Ant sveikos pelės odos užtepus CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo ir inkubavus 1 val., KT FL buvo stebima tiek parafinine technika, tiek ir kriomikrotomijos būdu parengtuose odos preparatuose. Pastaruoju metodu gautuose bandiniuose buvo stebima daug artefaktų dėl audinių sudarkymo preparavimo metu, todėl siekiant tikslumo KT lokalizacija vertinta tik parafinine technika gautuose pjūviuose (pav. 4.20). KT FL buvo stebima tik ant raginio epidermio sluoksnio. KT kaupėsi odos įlinkiuose, raukšlėse, paviršinėje plaukų kanalų dalyje, bet ne plauko folikulo ląstelėse. Šie rezultatai rodo, kad ant odos patekę KT yra sulaikomi pirminio odos barjero – viršutinio negyvų ląstelių sluoksnio – ir giliau į odą neprasiskverbia.



Pav. 4.20. CdSe/ZnS-mPEG KT lokalizacija odoje užtepus jų tirpalo ant paviršiaus. Konfokalinės fluorescencinės (A, A₁, C) ir pralaidumo (B – HE dažymas) mikroskopijos odos preparatų (parafininė technika) nuotraukos praėjus 1 val. po KT tirpalo užteptimo. A₁– išdidintas A nuotraukos fragmentas. C – kontrolė, KT nepaveikta oda (x20/0,5 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm).

Kadangi raginis epidermio sluoksnis efektyviai apsaugojo odą nuo gilesnio KT įsiskverbimo, buvo nuspręsta pažeisti odos apsaugines savybes veikiant ją UVB spinduliuote ($30,2 \text{ J/cm}^2$ doze) ir ištirti KT lokalizaciją pažeistoje odoje (4.21 pav). Švitintos odos histologiniuose preparatuose buvo matomos charakteringos UV spinduliuotės odos pažaidos: epidermyje atsirado piknotiniai branduoliai, formavosi vakuolės, apoptotinės ląstelės, riebalinių liaukų pažaidos (pav. 4.21 B). Dermoje matėsi daugiau eritrocitų – prasidėjo eritema, kuri būdinga uždegiminėms reakcijoms. UVB spinduliuotė paveikė ir raginį epidermio sluoksnį – švitintoje odoje jis buvo plonesnis. Visgi nepaisant šių odos pažeidimų, KT pasiskirstymas išliko toks pat kaip ir sveikoje odoje, kuri buvo paveikta tik KT tirpalu: jie stebėti ant raginio epidermio sluoksnio,

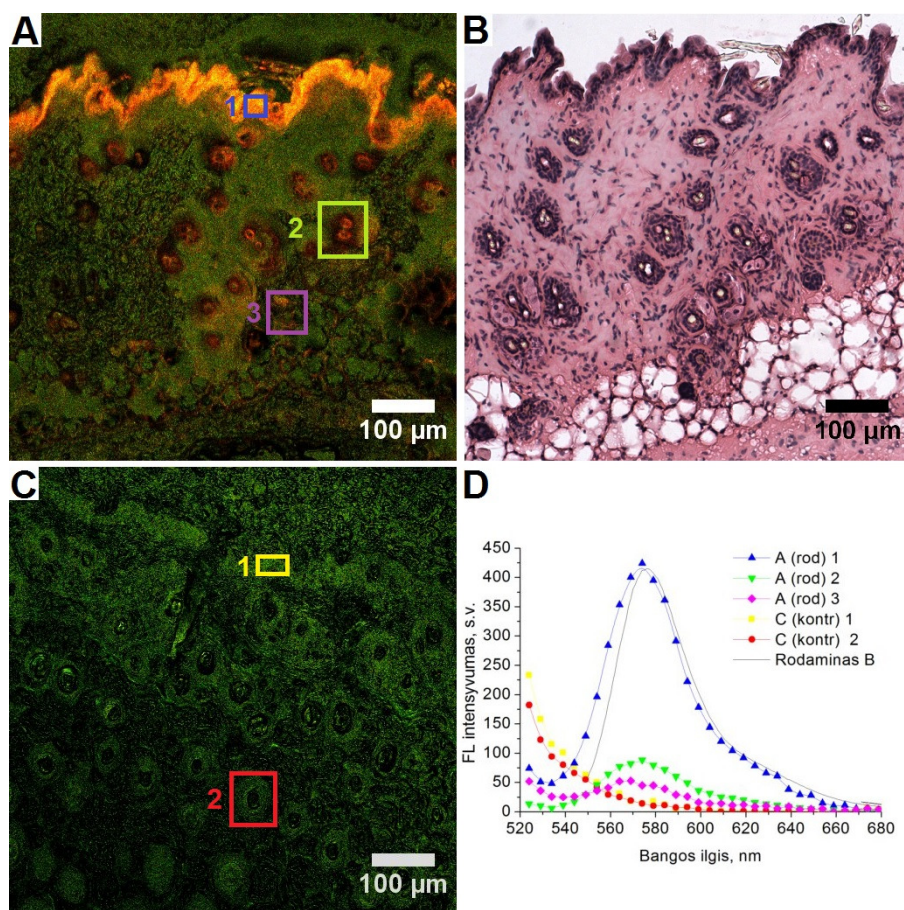
odos įlinkiuose, plaukų kanalų paviršinėje dalyje (pav. 4.21 A, A₁). KT neprasiskverbė į gilesnius pažeistos odos sluoksnius.



Pav. 4.21. $30,2 \text{ J/cm}^2$ dozės UVB spinduliuote ir CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalu paveiktos pelės odos pjūvių nuotraukos. Konfokalinės fluorescencinės (A, A₁) ir pralaidumo (B-D – HE dažymas) mikroskopijos odos preparatų nuotraukos (parafininė technika) praėjus 1 val po KT tirpalo užtepimo ant odos. A₁–išdidintas A nuotraukos fragmentas. B, C – kontrolė, UVB ir KT nepaveikta oda (A, C: x20/0,5 obj., B, D: x10/0,25 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488 \text{ nm}$), E) Ant odos užteptų KT vidutiniai spektrai ($n_{\text{eksperimentų}}=3$, $\lambda_{\text{žad}}=450 \text{ nm}$) prieš ir po švitinimo UVB (dozė $30,2 \text{ J/cm}^2$). Intarpe pateikti normuoti FL spektrai, kurių persidengimas rodo, kad švitiniant spektro forma nepakinta.

Užtepus rodamino B tirpalo ant sveikos odos ir parengus jų preparatus parafinine technika, fluorescenciniuose vaizduose rodaminas B nebuvo aptiktas. Tai greičiausiai įvyko dėl dažo išsiplovimo ar suirimo bandinio parengimo metu. Todėl odos preparatai papildomai buvo parengti kriomikrotomijos metodu ir juose rodamino B FL išliko (pav. 4.22). Rodaminas B pasiskirstė ne tik ant raginio epidermio sluoksnio, bet prasiskverbė pro jį ir į gyvų ląstelių sluoksnius. Ryškiausiai dažiklis fluorescavo epidermyje, o einant gilyn į dermą jo FL intensyvumas tolygiai

mažėjo. Dermoje daugiau rodamino B susikaupė plaukų folikuluose ir aplink juos. Tai siejama su tuo, kad dėl tirpalo sutekėjimo į plauko kanalus dažas gali giliau prasiskverbti ir barjerinis raginio epidermio sluoksnis folikuluose yra ženkliai plonesnis. Tolygus dažo pasiskirstymas epidermyje rodo, kad jis kaupiasi tiek ląstelėse, tiek tarp jų, todėl jo lokalizacija greičiausiai nulemta pasyvios difuzijos. Nuotraukose galima matyti, kad rodamino B FL išryškina epidermį dermos atžvilgiu. Tai galėtų lemti dvi preižastys: 1) rodaminas B linkęs kauptis ląstelėse (epidermyje jų tankis didžiausias); 2) epidermio-dermos sandūra dalinai sulaiko dažą epidermyje ir riboja jo gilesnį prasiskverbimą.



Pav. 4.22. Rodamino B pasiskirstymas pelės odoje užtepus jo tirpalo ant paviršiaus. Konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdai (A – rodaminas B, C – kontrolė), gauti spektriniu detektoriumi. B – pralaidumo mikroskopijos vaizdas (HE dažymas). D – Fluorescenciniuose vaizduose (A,

C) pažymėtų plotų spektrai, rodantys, kad rodaminas B gausiai kaupiasi epidermyje, folikuluose bei dermyje ($x_{20}/0,5$ obj., $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm).

Šie rezultatai rodo, kad mažos molekulinės masės organinio dažiklio molekulės lengvai difunduoja per visus odos sluoksnius, tuo tarpu CdSe/ZnS-mPEG KT užstringa raginiame epidermio sluoksnyje ir giliau nepatenka.

KT ir rodamino B prasiskverbimo per odą tyrimų aptarimas

Gauti rezultatai rodo, kad KT yra sulaikomi raginio epidermio sluoksnio ir nepatenka į giliau esančias ląsteles ar dermą. Siekiant sutrikdyti šią apsauginę funkciją oda buvo paveikta UVB spinduliuote. Nepaisant ženklių epidermio ląstelių pažaidų ir raginio sluoksnio suplonėjimo, KT lokalizacija odoje nepakito. Tai rodo, kad negyvų korneocitų lipidų bei baltymų karkasas, sudarantis raginį epidermio sluoksnį, išliko pakankamai patvarus, kad sulaikytų KT nuo gilesnio įsiskverbimo.

Literatūros duomenimis CdSe/CdS KT, dengti PEG-amino ligandais, (teigiamas paviršiaus krūvis, dydis 37 nm) per sveiką pelių odą neprasiskverbia, tačiau mechaniškai ar chemiškai pažeidus viršutinį jos sluoksnį, KT aptinkami dermoje, o jų sudėtyje esantis kadmio net ir kepenyse (4). Analogiški rezultatai gauti ir tiriant karboksilo grupėmis dengtų KT (neigiamas paviršiaus krūvis, dydis 14 nm) prasiskverbimą: sveikoje odoje jie aptikti tik raginiame sluoksnyje, o dermoabrazija sąlygojo jų patekimą ir į dermą (137). Šie ir kiti tyrimai (60, 61) formuoja nuomonę, kad neorganinės ND neprasiskverbia per sveiką odos barjerą ir tam didžiausią įtaką daro raginis epidermio sluoksnis. Mortensen L.J. ir bendraautorių grupė pirmieji parodė, kad UV spinduliuotės poveikis įtakoja CdSe/ZnS KT, dengtų karboksilo grupėmis, (neigiamas paviršiaus krūvis, dydis glicerolyje ~30 nm) įsiskverbimą ir sąlygoja jų aptikimą giliuose epidermio sluoksniuose ir dermoje (75). Visgi KT prasiskverbimas nebuvo gausus, ir giliau negu raginiame sluoksnyje aptikti tik pavienėmis sankaupomis. Remiantis elektroninės mikroskopijos duomenimis, UV dalinai suardo raginio sluoksnių lipidų sluoksnį ir silpnina

tarpląstelinius epidermio ląstelių ryšius. Tai sudaro sąlygas KT lengviau difunduoti interląsteliniu keliu gilyn į odą. Kiti migracijos keliai (transląstelinis būdas ar migracija dendritinių ląstelių viduje) neaptarti.

Tuo tarpu mūsų tyrime UV spinduliuotės pažaidos KT lokalizacijai odoje įtakos neturėjo. Manoma, kad skirtumą nuo Mortensen L.J. grupės rezultatų galėjo lemti naudotų KT dydis ir paviršiaus krūvis. Mes naudojome neutralaus paviršiaus krūvio CdSe/ZnS-mPEG KT, kurių HD vandeniniame tirpale yra ~23 nm (113), o minėti kolegos tyrė neigiamo paviršiaus krūvio KT, kurių HD vandenyje ~13 nm. Kadangi manoma, jog UV pažeistoje odoje KT migruoja interląsteliniu būdu, tai jų difuzija ir prasiskverbimas didesnėms dalelėms turėtų būti mažiau efektyvus. Kita vertus, polinis paviršius sąlygoja efektyvesnę KT sąveiką su ląstelių paviršiaus baltymais ir jų endocitozę lyginant su neutralaus krūvio KT (105, 106, 138). Todėl neigiamo krūvio KT teoriškai galėjo efektyviau patekti į Langerhanso ląsteles (epidermio dendritines ląsteles), kurios pasižymi migracija iš epidermio į dermą ir tolimesnius audinius. Tokia KT migracijos galimybė neprieštarauja autorių pateiktoms dermos mikroskopijos nuotraukoms, kuriose KT yra sutelkti pavienėse, viena nuo kitos nutolusiose sankaupose. Teoriškai šios sankaupos galėtų atitikti iš epidermio į dermą migravusias Langerhanso ląsteles. Nors autoriai KT lokalizacijos dermoje neaptaria, tačiau tikėtina, kad KT gali būti ir ląstelių viduje. Vėlesniame tos pačios tyrėjų grupės straipsnyje jau rašoma, kad KT gali būti pernešami ir dendritinių ląstelių viduje (139). Aptarti mūsų ir literatūros duomenys rodo, kad KT migracija per epidermį gali priklausyti ne tik nuo KT dydžio bet ir nuo jų krūvio. Visgi šiai pozicijai patvirtinti reiktų atlikti palyginamuosius skirtingo paviršiaus padengimo KT prasiskverbimo per odą tyrimus.

Gauti rezultatai rodo, kad mažesnės molekulės masės junginys – rodaminas B – gali įveikti odos barjerą. Užtepęs rodamino B tirpalo ant odos, jis lengvai prasiskverbė pro raginį epidermio sluoksnį ir pasiskirstė ne tik visame epidermyje, bet buvo aptinkamas ir gilesniuose audiniuose. Dermoje ryškesnė rodamino B lokalizacija stebėta aplink plaukų folikulus. Tai galima

paaiškinti tuo, kad tirpalas lengviau pateko į plauko kanalą ir prasiskverbė pro plonesnį plauko folikulo epidermio sluoksnį lyginant su epidermiu odos paviršiuje. Rodamino B molekulinė masė $M_{RB}=479$ Da. Tuo tarpu KT gamintojų duomenimis $M_{KT}>5\cdot 10^5$ Da (140). Todėl pagrindinį skirtumą tarp KT ir rodamino B lokalizacijos odoje greičiausiai nulėmė skirtingas šių junginių dydis ir su juo sietinas gebėjimas difunduoti audiniuose.

4.5. Ilgalaikis KT susikaupimas ir stabilumas audiniuose

Siekiant pritaikyti KT biologinių sistemų tyrimams ir klinikiams taikymams, svarbu įsitikinti KT optinių savybių stabilumu, jiems patekus į biologinę aplinką, kuris būtinas audinių vaizdinimui. Optinių savybių stabilumas siejamas su jų cheminės struktūros vientisumu, kuris svarbus *in vivo* sąlygomis, nes yra parodyta, kad suirus KT, susidaro toksiniai junginiai, kurie gali pakenkti organizmo gyvybinėms funkcijoms ir sukelti toksiškumą (3, 21, 128).

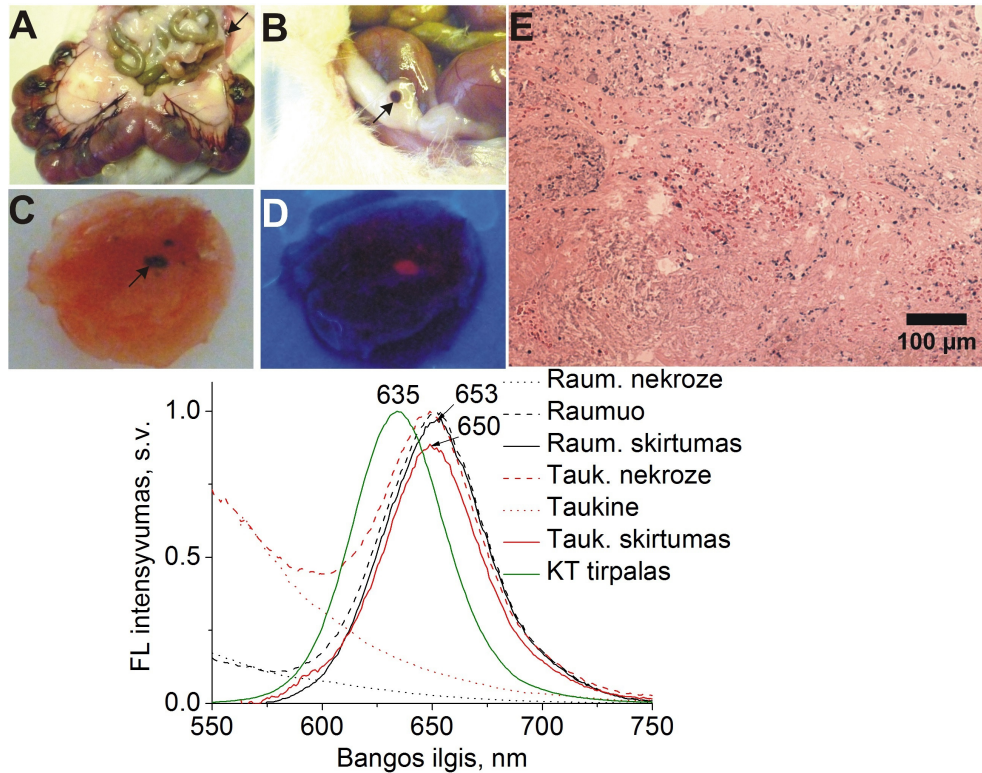
Darbe buvo lyginamas dviejų KT – CdSe/ZnS-mPEG ir CdTe-MPR – stabilumas *in vivo* modelyje. KT tirpalai buvo suleidžiami žiurkėms į pilvo ertmę bei šlaunį. Praėjus 7 dienoms, suleidimo vietos audiniai buvo išpreparuojami, matuojami jų fluorescencijos spektrai bei atliekama histologinė analizė.

4.5.1. CdTe-MPR KT susikaupimas ir stabilumas *in vivo*

Suleidus CdTe-MPR KT tirpalo, pastebėta, jog injekcijos vietoje (taukinėje arba raumenyje) buvo matomos tamsiai rudos dėmės, kurios, atlikus histologinę analizę, buvo atpažintos kaip nekrozės (pav. 4.23). Tai atsikartojo 4 iš 5 tirtų gyvūnuose. Išmatavus šių audinių spektrus, juose aptikta CdTe-MPR KT charakteringa juosta (pav. 4.23). FL juostos smailės padėtis buvo pasislinkusi į ilgabangę pusę lyginant su KT spektru distiliuotame vandenyje. KT FL juostos padėtis varijavo skirtingose to paties bandinio (nekrotinio audinio) vietose nuo 643 iki 653 nm. Šie rezultatai rodo, kad KT spektroskopinės savybės keičiasi jiems patekus į gyvą audinį. Tai sietina su

tu, jog KT nanokristalas yra paveikiamas aplinkos molekulių biologinėje terpėje.

Kituose organizmo audiniuose CdTe-MPR KT FL spektroskopijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais nebuvo aptikta. Vizualios audinių nekrozės ar kitokių KT injekcijos sąlygotų audinių pakitimų ne suleidimo srityje nebuvo aptikta.



Pav. 4.23. A-D) Žiurkės pilvo organų nekrozės (rodyklėmis pažymėtos rudos dėmės) pilvo raumenyje (A, C) ir taukinėje (B) CdTe-MPR KT injekcijos vietoje, praėjus 7 dienoms. Apšvietus UV spinduliuote šios sritys pasižymi raudona FL (D). E) Raumens nekrotinio audinio (C) pralaidumo mikroskopijos nuotrauka (HE dažymas, $\times 10/0,25$ obj.). Žemiau pateikti KT tirpalo distiliuotame vandenyje, sveikų bei nekrotinių audinių spektrai (normuoti ties 570 nm) ir jų skirtuminiai spektrai (pateikta $n_{\text{gyvūnų/grupėje}}=1$, $n_{\text{matavimų/org.}}=3$).

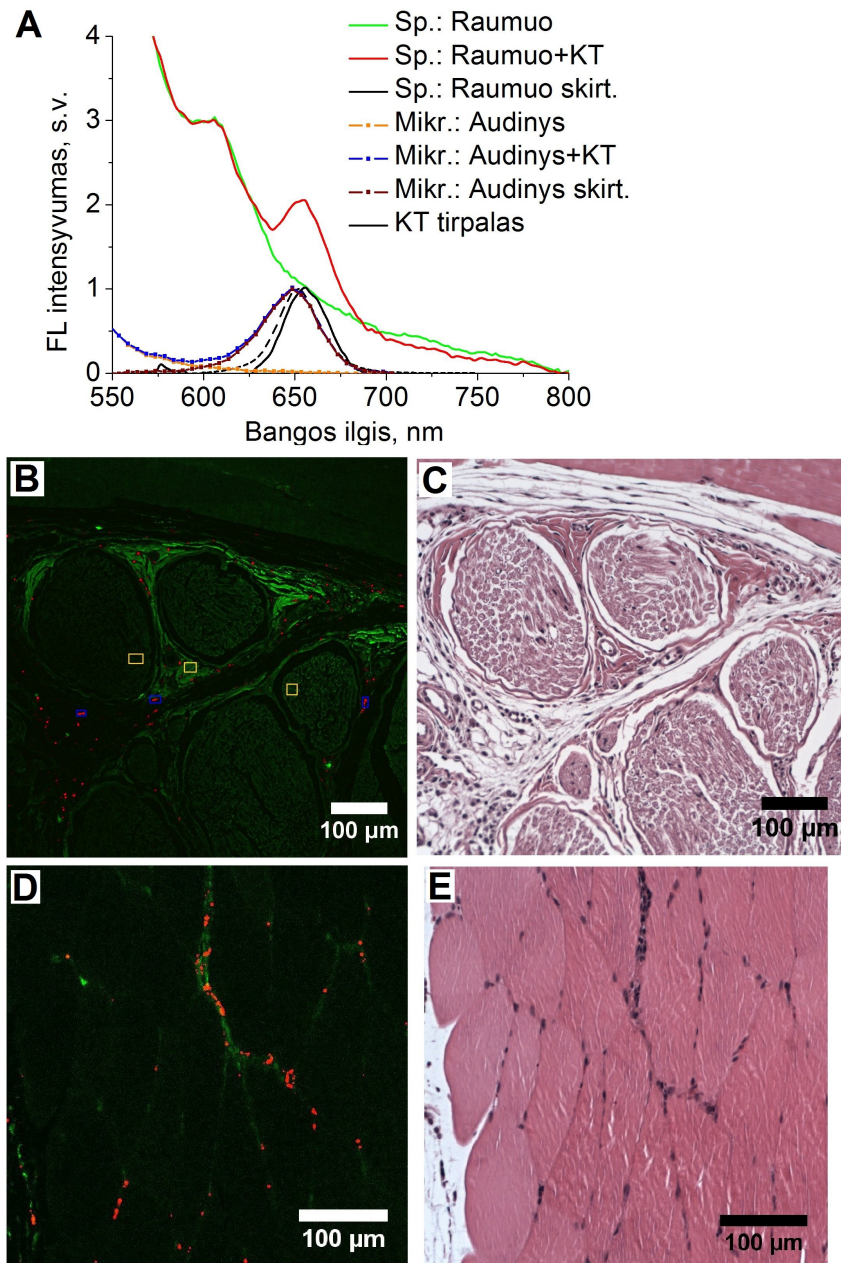
4.5.2. CdSe/ZnS-mPEG susikaupimas ir stabilumas *in vivo*

Suleidus CdSe/ZnS-mPEG KT tirpalo, po 7 dienų žiurkės audiniuose lokalaus KT susikaupimo apšvietus UV spinduliuote makrosopiškai

nestebėta. Tačiau raumens FL spektruose buvo išskiriama charakteringa KT FL juosta su smaile ties 655 nm (pav. 4.24). Ši KT FL spektro forma praktiškai sutapo su KT spektru distiliuotame vandenyje. Tai rodo, kad šio tipo KT spektroskopinės savybės išlieka pakankamai stabilios raumens audinyje *in vivo*.

Konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizduose taip pat buvo aptikta KT FL. Spektriniu mikroskopo detektoriumi matuojant KT spektrą skirtingose bandinio vietose, jis buvo artimas KT spektrui distiliuotame vandenyje. Visgi galima matyti, kad mikroskopo detektoriumi gauto spektro juosta yra išplitusi į trumpabangę pusę, o ilgabangis kraštas sutampa su KT spektro distiliuotame vandenyje kraštu. Tuo pačiu mikroskopu matuojant KT spektrus ta pačia metodika parengtuose pelės audiniuose praėjus 1 val. po KT injekcijos, CdSe/ZnS-mPEG spektras ląstelėse sutapo su KT spektru distiliuotame vandenyje (pav. 4.14 C). Tai rodo, kad per 7 dienas biologiniame audinyje įvyksta tam tikri KT struktūriniai pokyčiai, kurie nestebimi praėjus 1 val. po KT injekcijos.

Paminėtina, kad KT FL parafinine technika parengtuose preparatuose buvo stebima netgi praėjus 2 metams nuo jų paruošimo nors ir FL intensyvumas buvo ženkliai mažesnis. Tai sudaro sąlygas naudoti šiuos KT ilgalaikiuose vaizdinimo tyrimuose.



Pav. 4.24. A) Žiurkės audinių FL spektrai dūrio vietoje, praėjus 7 dienoms po CdSe/ZnS-mPEG KT injekcijos. „Sp.“ žymėjimas nurodo, kad spektrai gauti matuojant spektrometru nuo išpreparuoto organo paviršiaus, o „Mikr.“ – spektrai gauti konfokalinio fluorescencinio mikroskopo spektriniu detektoriumi. Spektrai gauti suvidurkinus B nuotraukoje pažymėtus plotus (mėlyni – KT, geltoni – kontrolė). Konfokalinės fluorescencinės (B, D) ir pralaidumo (C, E – HE dažymas) mikroskopijos nuotraukos (x20/0,5 obj., $\lambda_{\text{žad}}=488$ nm, pateikta $n_{\text{gyvūnų/grupėje}}=1$, $n_{\text{matavimų/org.}}=3$).

Mikroskopijos nuotraukose matoma, kad KT aptikti nervų apvalkale (epineuriume), tačiau jų nestebėta nervo viduje (pav. 4.24 B). KT taip pat pasiskirstę raumens jungiamuosiuose audiniuose (epimyziume, perimyziume): aplink raumenį ir tarp raumeninių ląstelių (pav. 4.24 D). Tačiau KT nestebėta griaučių raumenų skaidulų viduje ir kraujagyslių sienelių raumeniniame sluoksnyje (*tunica media*). Tai rodo, kad per 7 dienas audinyje lokalizuoti KT neprasisverbia per raumeninių skaidulų membraną ir nepatenka į šias ląsteles. Šie rezultatai iš esmės antrina 4.3 skyriuje aprašytiems KT pasiskirstymo rezultatams pelės audiniuose praėjus 1 val. po injekcijos po oda. Tikėtina, kad didžioji dalis tirpalo išsiskirstė iš KT suleidimo vietos, tačiau kitų audinių (kepenų, inkstų, raumenyse, gimdoje ir kt.) fluorescencijos spektruose KT FL neaptikta.

Nepaisant to, kad praėjus 7 dienoms CdSe/ZnS-mPEG KT nėra visiškai pašalinami iš audinio, nekrozės ar kitokių audinio pažeidimų požymių nestebėta. Tai rodo, kad šie KT nesukelia jungiamojo audinio ląstelių žūties.

Ilgalaikio KT susikaupimo ir stabilumo *in vivo* tyrimų aptarimas

CdSe/ZnS-mPEG KT šerdis yra stipriai apsaugota nuo aplinkos poveikio: ją dengia ZnS sluoksniu, amfifilinis polimeras ir ilgagrandis mPEG ligandas ($M_{\text{mPEG}} \approx 5000$ Da). Šių KT paviršius yra neutralaus krūvio, kuris mažina sąveikos su biomolekulėmis tikimybę. Tuo tarpu CdTe-MPR KT atstovauja minimaliai apsaugotų KT grupę, kurių šerdį dengia tik trumpos MPR ligandų grandinės ($M_{\text{MPR}} = 106$ Da).

Atlikti žiurkės audinių spektroskopiniai matavimai rodo, kad CdTe-MPR KT spektroskopinės savybės audiniuose pakinta lyginant su jų spektru distiliuotame vandenyje. Papildomai atlikti tyrimai rodo, kad CdTe-MPR KT spektroskopinės savybės yra jautrios NaCl druskos, H^+ jonų koncentracijai bei ląstelių auginimo terpės komponentams (paskelbti straipsnyje *Kulvietis V, Streckytė G, Rotomskis R. Lith J Phys. 2011,51(2):163–71*). Biologinės terpės elementai gali sukelti KT agregaciją ir šis procesas priklauso nuo biomolekulių

sudėties: RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) ląstelių auginimo terpėje KT FL intensyvumo kritimas buvo lėtas ir juostos poslinkis nežymus, o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) terpėje KT FL intensyvumo kritimas ir ilgabangis juostos poslinkis nuo 635 nm iki 645 nm buvo spartus ir negrįžtamas. Kadangi tai yra papildomi tyrimai ir tiesiogiai su darbo uždaviniais nesusiję, jie rezultatų dalyje nepristatyti.

KT FL spektriniai pokyčiai rodo, kad mūsų tyrime naudotų CdTe-MPR KT optinės savybės yra nestabilios. KT ilgbangį juostos postūmį gali sąlygoti keli procesai. Tai gali vykti dėl jų sąveikos su audinyje esančiomis molekulėmis, kurios paveikia nanokristalo eksitonų energetinius lygmenis. Visgi remiantis literatūros duomenimis ilgabangis juostos poslinkis dažniausiai siejamas su KT paviršinių ligandų persitvarkymu, jų destabilizacija, desorbicija ir KT agregacija (17, 19, 24).

KT organinio dangalo nestabilumas galėjo sąlygoti tolesnius KT struktūros pokyčius. Kadangi šio tipo KT sudaro tik šerdis ir MPR apvalkalas, tai, suirus organiniam sluoksniui, CdTe šerdis gali tiesiogiai sąveikauti su audinio biomolekulėmis, pvz., ląstelių fermentais, deguonimi ar kitais oksidatoriais. Tokiomis sąlygomis gali suirti šerdies kristalinė gardelė ir susidaryti toksiniai Cd ir Te junginiai, kurie sukelia ląstelių žūtį (85). Literatūros duomenimis, yrant pavienių KT šerdžiai, jų skersmuo mažėja ir FL spektruose tai atsispindi kaip trumpabangis juostos poslinkis (21, 22, 107). Visgi jei audinyje vyksta KT agregacija, kurios požymis yra ilgabangis FL juostos poslinkis, ir vėliau vyksta lėtesni degradacijos procesai, kurių požymis yra trumpabangis FL juostos poslinkis, suminis šių vyksmų poveikis FL spektrams tampa sunkiau prognozuojamas. Spektrinių pokyčių numatymui reiktų atsižvelgti į abiejų agregacijos ir degradacijos sąlygojamus kiekybinius FL kvantinio našumo, FL juostos poslinkio bei pločio pokyčių įverčius, t.y. kiekvieno proceso indėlį į bendrus spektrinius pokyčius. Todėl siekiant tiksliau įvertinti, kokie procesai vyksta CdTe-MPR KT patekus į biologinius audinius, reiktų atlikti papildomų tyrimų.

Neatmetama galimybė, jog vykstant KT agregacijai, dalis MPR ligandų atkimba ir gali paveikti ląstelių gyvybingumą. MPR yra toksiškas junginys, kurio poveikis priklauso nuo koncentracijos, terpės rūgštingumo, oksidacijos-redukcijos potencialo bei lokalizacijos audinyje (141). Aptarti procesai galėjo sąlygoti stebėtą raumens bei riebalinio audinio nekrozę. Tikėtina, kad dalis toksinių junginių pasiskirstė ir po kitus organizmo audinius, tačiau jų koncentracija greičiausiai buvo nepakankama, kad sukeltų pastebimus morfologinius ar funkcinius pokyčius.

CdTe-MPR KT buvo aptikti susitelkę suleidimo vietoje 1-2 mm spinduliu. Tai rodo, kad jų išsiskirstymas buvo prastas. Tikėtina, kad tam didelę įtaką turėjo jų tarpusavio agregacija, bei sąveika su baltymais, kuri sąlygojo KT HS padidėjimą ir dėl to susilpnėjusią difuziją iš suleidimo vietos. Tarpląstelinės terpės baltymų adsorbcija galėjo paspartinti ir KT endocitozę bei kaupimąsi ląstelėse, kuris prisidėjo prie KT sulaikymo audinyje.

Tuo tarpu CdSe/ZnS-mPEG KT spektrinės savybės žiurkės audiniuose per 7 dienas ženkliai nepakito. Histologinės analizės metu audinių nekrozės nenustatyta. Tai rodo, kad šio tipo KT išlieka pakankamai stabilūs *in vivo* sąlygomis ir ląstelių toksiškumu nepasižymi. Visgi suleidimo vietos audiniuose (tiek praėjus 7 d., tiek praėjus 1-24 val. po suleidimo) stebėtas padidėjęs limfocitų ir granulocitų susitelkimas, kurie yra uždegiminių procesų indikatoriai. Tai rodo, kad CdSe/ZnS-mPEG tirpalo injekcija sukelia imuninį atsaką, tačiau ląstelių žūtis šie KT nesukelia.

Didesnis šių KT stabilumas lyginant su CdTe-MPR KT siejamas su jų struktūriniais skirtumais, t.y. KT šerdis yra padengta ZnS apvalkalu ir papildomais organinių polimerų sluoksniais. Šie dangalai apsaugo nuo aplinkinių jonų ir biomolekulių, kurios galėtų paveikti KT šerdies kristalinę struktūrą.

Nepaisant ilgalaikio KT susikaupimo raumens jungiamuosiuose audiniuose, jie nepateko į raumeninių skaidulų vidų. Tai rodo, kad sarkolema ir jos ekstraląstelinis matriksas (bazinė membrana) riboja KT patekimą į ląstelę.

Apibendrintai galima sakyti, kad KT pasiskirstymas iš esmės nepakito lyginant su tyrimais po 1 val. pelėse (žr. 4.3. sk.).

Nors CdSe/ZnS-mPEG KT FL kvantinis našumas yra didesnis negu CdTe-MPR KT (142), jų susitelkimas suleidimo vietoje makroskopiškai nestebėtas. Tuo tarpu CdTe-MPR buvo stebimi susitelkę suleidimo vietoje. Šie skirtumai siejami su KT migracinėmis savybėmis. Remiantis literatūros duomenimis mPEG dengti KT yra neutralaus krūvio ir ženkliai silpniau sąveikauja su plazmos bei ląstelių paviršiaus baltymais (30, 113). Todėl šie KT yra inertiškesni sąveikai su biomolekulėmis, kurios galėtų didinti KT sulaikymą audinyje. Kita vertus, remiantis spektroskopijos rezultatais CdSe/ZnS-mPEG KT agregacija *in vivo* nepasireiškia. Pavieniai CdSe/ZnS-mPEG KT lengviau difunduoja audiniuose negu jų agregatai. Tuo tarpu CdTe KT dengiantys MPR ligandai išorėje turi neigiamo krūvio karboksilo grupę, kurios elektrostatinė sąveika su polinėmis baltymų grupėmis yra stipresnė ir tai gali sąlygoti efektyvesnę jų viduląstelinį susikaupimą bei adheziją prie tarpląstelinės terpės skaidulų. KT agregacija papildomai gali sąlygoti jų susitelkimą į stambesnius telkinius, kurių difuzija audiniuose yra lėtesnė. Šios priežastys galėjo sąlygoti intensyvesnę CdTe-MPR KT sulaikymą audiniuose ir prastesnę išsiskirstymą iš suleidimo vietos.

Aptartos dviejų tipų KT savybės rodo, kad CdSe/ZnS-mPEG KT optinių savybių stabilumas, efektyvesnė migracija audiniuose ir mažesnis toksiškumas sąlygoja tai, kad šie KT yra parankesni ilgalaikio fluorescencinio vaizdinimo taikymams biomedicinoje negu CdTe-MPR KT.

5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šiame darbe nagrinėjamas CdSe/ZnS-mPEG KT prasiskverbimas per skirtingus audinius ir pasiskirstymas organizme įvedant juos į organizmą skirtingais būdais. KT lokalizacija audinių ir ląstelių lygmenyse suteikia duomenų aiškinant pagrindinius KT migracijos kelius organizme. KT lokalizacija audiniuose analizuojama konfokalinę fluorescencinę mikroskopiją derinant su klasikinės histologijos metodais. Iki šiol toks būdas buvo pritaikytas tik KT lokalizacijos limfmazgiuose tyrimui (135). Mikroskopijos metodai leidžia įvertinti KT kaupimąsi ląsteliniame lygyje ir tiksliau nusakyti jų lokalizaciją negu plačiai paplitę elementinės analizės (pvz., masės spektrometrija, radioaktyvių izotopų scintigrafija) ar fluorescencinio vaizdinimo metodai. Fluorescencinė spektroskopija suteikia žinių apie bendrą KT susikaupimą organuose. Todėl šis metodas papildo

Eksperimentinių gyvūnų audinių mikroskopijos tyrimai rodo, kad CdSe/ZnS-mPEG KT neprasiskverbia per kraujagyslių sienelės ir nėra pernešami iš tarpląstelinės terpės į kraujagyslių vidų. Tai nulemia, kad KT nėra tiesiogiai rezorbuojami į kraujotakos sistemą ir išnešiojami po visą organizmą. Eksperimentiniai rezultatai rodo, kad į tarpląstelinę audinių terpę suleisti KT migruoja iš suleidimo vietos limfine sistema. Manoma, kad tai apsprendžia dalelių geometriniai matmenys, nes CdSe/ZnS-mPEG KT yra panašaus dydžio (HD ~23 nm (113)) kaip kai kurie tarpląstelinės terpės baltymai ir patogenai, kuriuos pernešti su audinių skysčiu yra prisitaikę limfos kapiliarai. Taigi KT migraciją iš audinių per limfinę sistemą apsprendžia KT dydis ir didesnis limfos kapiliarų sienelių laidumas kraujo kapiliarų atžvilgiu. Tai sudaro palankias sąlygas naudoti KT limfinės sistemos anatominiams ir funkciniais tyrimams bei taikyti KT fluorescenciniame limfmazgių vaizdinime operacijų metu.

KT pernašos ribojimas iš kraujagyslių vidaus į tarpląstelinę terpę sąlygoja tai, kad jie nepatenka į daugumos organų audinius. Tai paaiškina, kodėl mūsų ir daugumos kitų autorių tyrimais nenustatomas KT susikaupimas

ne RES audiniuose net ir ilgalaikėje perspektyvoje. Tuo tarpu KT aptikimas RES organuose dalinai paaiškinamas jų sinusinių kapiliarų sienelės struktūriniais skirtumais, t.y., didesnėmis endotelio poromis, plonesne ir nevientisa bazine membrana, kitų audinių atžvilgiu (12, 38). Kita vertus mikroskopijos rezultatai rodo, kad audiniuose esantys KT patenka į makrofagus endocitozės būdu. Šis procesas gali papildomai prisidėti prie KT kaupimosi RES organuose, kuriuose telkiasi makrofagai ir kitos fagocituojančios ląstelės.

Pažymėtina, kad KT nepatenka į sveikų kraujagyslių vidurinį sluoksnį (*tunica media*) ir tai siejama su KT sulaikymu ties endoteliumu (jiems judant iš kraujagyslės vidaus į išorę) ir ties lygiųjų raumenų skaidulų tarpusavio jungtimis bei bazine membrana (iš išorės į vidų). Tai sudaro sąlygas taikyti KT kraujagyslių pažaidų, kurioms būdingi struktūrinio vientisumo pokyčiai (pvz., aterosklerozės židinių), vaizdinime ir diagnostikoje. Todėl tikimasi, kad gauti rezultatai praplės KT taikymo perspektyvas biomedicinoje ir suteiks pagrindą panaudoti KT aterosklerotinių bei kitų pakitimų tyrimams ir naujų medicinos metodų kūrimui.

Odos audinių mikroskopinė analizė rodo, kad KT neprasiskverbia iš dermos jungiamojo audinio į plaukų folikulus, prakaito bei riebalų liaukas, griaučių skersaruožių raumenų skaidulas ir kitus audinius. Visiems šiems dariniams būdinga bazinė membrana, kuri juos skiria nuo aplinkinės tarpląstelinės medžiagos ir kurioje yra KT. Todėl ji yra pirminis barjeras ribojantis KT difuziją į minėtus audinius. KT taip pat yra sulaikomi tankiai išdėstyto jungiamojo audinių skaidulų, kurios sudaro perineuriumą ir riboja KT patekimą į periferinių nervų vidų. Apibendrinant šiuos faktus galima teigti, jog KT migraciją audiniuose riboja specializuoti tankiai organizuotų ekstraląstelinų skaidulų sluoksniai. Šis apibendrinimas svarbus tuo, jog bazinės membranos juosia visus epitelinius audinius, kurie sudaro pagrindinius organizmo apsauginius barjerus (odos, kvėpavimo ir lytinių takų, virškinamojo trakto ir kt.), tačiau literatūroje KT pernaša per bazines membranas yra faktiškai nenagrinėta ir jos reikšmė KT lokalizacijai audiniuose yra neįvertinta.

KT taip pat yra sulaikomi placentos barjero ir iš motinos į embriono audinius nepatenka. Šį fiziologinį barjerą visų pirma apsprendžia trofoblasto ląstelės, kurios yra glaudžiai susietos tarpląstelinėmis jungtimis. Šie rezultatai papildoma KT prasiskverbimo per kraujagysles tyrimus ir rodo, kad KT yra sulaikomi ne tik endotelio bet ir kitų vientisą sluoksnį formuojančių ląstelių. Tarpląstelinės pernašos ribojamas per šiuos sluoksnius grindžiamas tuo, kad tarpai tarp ląstelių yra per maži, kad per juos vyktų KT prasiskverbimas. Tuo tarpu transląstelinė pernaša yra sudėtingesnis procesas, kuris sąlygotas apikalinės membranos receptorių raiškos, KT endocitozės, viduląstelinės pernašos ir sekrecijos bazalinėje membranoje. Manoma, kad svarbiausias vaidmuo šioje grandinėje yra KT sąveikos su transląstelinę pernašą užtikrinančiais endotelio ir trofoblasto receptoriais nebuvimas. KT pernašos mechanizmai per vidinius organizmo barjerus nėra plačiai ištirti. Todėl tikimasi, kad šie darbo rezultatai bus naudingi tiriant KT ir kitų panašaus dydžio bei paviršinių savybių ND prasiskverbimo per biologinius barjerus mechanizmus. Rezultatai taip pat naudingi kuriant ND pagrįstus farmakologinius preparatus, nes efektyviam jų taikymui būtina žinoti, kur organizme lokalizuojasi šios ND ir kokius audinius jos gali paveikti.

Audinių mikroskopijos tyrimai parodė, kad CdSe/ZnS-mPEG KT kaupiasi kai kurių ląstelių viduje *in vivo* sąlygomis ir į jas patenka endocitozės būdu. Viduląstelinis KT susikaupimas priklauso nuo ląstelių tipo: intensyviausia KT FL aptikta makrofaguose, eozinofiluose, mažesnio intensyvumo – dermos fibroblastuose, tuo tarpu raumeninėse skaidulose, limfocituose bei eritrocituose KT neaptikti. Šie skirtumai grindžiami ląstelių specializacija ir nuo to priklausančiu skirtingu endocitotiniu aktyvumu. Pvz., makrofagai pasižymi aktyvia nespecifine endocitoze, kuri reikalinga neutralizuojant patogenus. Tuo tarpu eritrocitams endocitozė nebūdinga (112), todėl tai greičiausiai sąlygojo KT nepatekimą į jų vidų. Tai taip pat parodo, kad pasyvi KT difuzija per plazminę eritrocitų membraną nevyksta. Limfocitai sudaro didelės įvairovės ląstelių grupę ir jų endocitotinis aktyvumas priklauso nuo diferenciacijos ir paviršinių receptorių raiškos. Šios ląstelės dalyvauja

specifinio imuninio atsako formavime, todėl tikėtina, kad KT patekimui į ląsteles reikalinga specifinė sąveika su atitinkamais ląstelės paviršiaus receptoriais, kurie inicijuoja endocitozę, pvz., DEC-205, CD36, DC-SIGN ar kt. (143). Kadangi tyrime naudoti nefunkcionalizuoti KT, jų sąveika su šiais receptoriais greičiausiai buvo per silpna. KT kaupimasis eozinofiluose bei putliosiose ląstelėse iki šiol nebuvo stebėtas ir tai yra įdomus faktas, nes šios ląstelės dalyvauja alerginėse reakcijose. Pranešama, kad TiO₂ ir fulerenų ND sukelia alerginį atsaką organizme, tačiau šio vyksmo mechanizmai nėra ištirti (144). Taigi ND kaupimasis eozinofiluose gali būti susijęs jų sukeliamomis alerginėmis reakcijomis ir mūsų tyrimo rezultatai gali būti naudingi aiškinantis ND sukeliama biologinio atsako mechanizmą. Pažymėtina, kad dauguma KT kaupimosi ląstelėse tyrimų atliekami *in vitro* sąlygomis, tačiau KT viduląstelinis susikaupimas *in vivo* nėra plačiai ištirtas. Yra atlikta tyrimų, rodančių, kad specifiniais ligandais funkcionalizuoti KT gali būti selektyviai kaupiami atitinkamus receptorių turinčiose ląstelėse (1, 43, 52). Visgi palyginamųjų tyrimų apie nefunkcionalizuotų KT kaupimąsi skirtingose ląstelėse *in vivo* nėra atlikta. KT kaupimasis ląstelėse yra svarbus prognozuojant jų lokalizaciją bei poveikį ląstelėms klinikiniuose taikymuose ir vertinant iš KT sudarytų elektronikos ar kitų produktų vartojimo saugumą.

Efektyviam KT taikymui taip pat svarbus jų optinių savybių stabilumas ir struktūrinis vientisumas *in vivo* sąlygomis. Darbo rezultatai rodo, kad CdTe-MPR KT patekus į žiurkės audinius kinta jų spektroskopinės savybės, rodančios, kad vyksta KT sąveika su organizmo molekulėmis ir (arba) vyksta paviršinių KT ligandų destabilizacija ir KT agregacija. Šie vyksmai galutiniame rezultate sukelia audinių nekrozę, t.y. ląstelių žūtį. Tuo tarpu CdSe/ZnS-mPEG KT FL savybės išlieka pakankamai stabilios, kad šie KT galėtų būti pritaikyti ilgalaikiam audinių vaizdinimui. Šie KT nesukelia audinių nekrozės, todėl jie yra pranašesni fluoroforai tiek optinių savybių, tiek ir biosuderinamumo atžvilgiu.

6. IŠVADOS

- 1) CdSe/ZnS-mPEG KT prasiskverbimo per kraujagyslių sieneles tyrimai parodė, kad kraujagyslių viduje esantys KT sąveikauja su endotelium (tunica intima), o išorinėje kraujagyslių aplinkoje esantys KT patenka į išorinį sienelės sluoksnį (tunica adventitia), tačiau KT neįsiskverbia į vidurinį kraujagyslės sienelės sluoksnį (tunica media).
- 2) Į kraujotaką suleistų KT pasiskirstymo audiniuose tyrimai parodė, kad CdSe/ZnS-mPEG KT lokalizuojasi daugumos organų kraujagyslėse, tačiau į tarpląstelinę terpę ar audinių ląsteles nepatenka. KT prasiskverbia per sinusinius kapiliarus ir kaupiasi kepenų ląstelėse.
- 3) CdSe/ZnS-mPEG KT pasiskirstymo nėščių žiurkių organizme tyrimai atskleidė, kad KT patenka į placentą, tačiau yra sulaikomi placentos barjero ir nepatenka į embriono audinius.
- 4) CdSe/ZnS-mPEG KT lokalizacijos odoje tyrimai parodė, kad KT migraciją jungiamuosiuose audiniuose sąlygoja ekstraląstelinė skaidulų organizacija: KT laisvai migruoja puriuosiuose jungiamuosiuose audiniuose (dermoje, epineuriume, epimyziume, adventicijoje ir kt.), tačiau neprasiskverbia per tankius skaidulinius sluoksnius (bazinės membranas, perineuriumą) ir nepatenka į epidermį, plaukų folikulus, odos liaukas, nervų vidų ir raumenų skaidulas.
- 5) CdSe/ZnS-mPEG KT migracija organizme priklauso nuo jų suleidimo būdo: į jungiamuosius audinius suleisti KT juda puriaisiais jungiamaisiais audiniais, rezorbuojasi į limfinius kapiliarus ir kartu su limfa įsilieja į kraujotaką; į kraują patekę KT pernešami tik jo sudėtyje; ant sveikos odos užtepti KT į kitus audinius nepatenka.
- 6) Didesnis CdSe/ZnS-mPEG KT optinių savybių stabilumas, efektyvesnė migracija audiniuose ir mažesnis toksiškumas negu CdTe-MPR KT sąlygoja tai, kad šie KT yra tinkamesni fluorescenciniui vaizdinimui *in vivo*.

7. Literatūros sąrašas

1. Smith BR, Cheng Z, De A, Rosenberg J, Gambhir SS. Dynamic visualization of RGD-quantum dot binding to tumor neovasculature and extravasation in multiple living mouse models using intravital microscopy. *Small*. 2010 Oct 18;6(20):2222-9.
2. Smith JD, Fisher GW, Waggoner AS, Campbell PG. The use of quantum dots for analysis of chick CAM vasculature. *Microvasc Res*. 2007 Mar;73(2):75-83.
3. Chu M, Wu Q, Yang H, Yuan R, Hou S, Yang Y, et al. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small*. 2010 Mar 8;6(5):670-8.
4. Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Latendresse JR, et al. Quantitative determination of skin penetration of PEG-coated CdSe quantum dots in dermabraded but not intact SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicol Sci*. 2009 Sep;111(1):37-48.
5. Lin CH, Chang LW, Chang H, Yang MH, Yang CS, Lai WH, et al. The chemical fate of the Cd/Se/Te-based quantum dot 705 in the biological system: Toxicity implications. *Nanotechnology*. 2009 May 27;20(21):215101,4484/20/21/215101. Epub 2009 May 5.
6. Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):1679-87.
7. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*. 2005 Jan 28;307(5709):538-44.
8. Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots . *Science*. 1996;271(5251):933-7.
9. Nanomedicine. interneto svetainė. Žiūrėta 2013.10.13. Prieiga: <http://chem3513-2007.pbworks.com/w/page/15648426/Nanomedicine>.

10. Advanced insutrial science and technology. interneto svetainė. Žiūrėta 2013.10.13. Prieiga:
[Http://www.aist.go.jp/aist_e/aist_today/2006_21/hot_line/hot_line_22.html](http://www.aist.go.jp/aist_e/aist_today/2006_21/hot_line/hot_line_22.html).
11. Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*. 1998 Sep 25;281(5385):2016-8.
12. Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem*. 2004 Jan-Feb;15(1):79-86.
13. Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*. 2003 Jan;21(1):41-6.
14. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*. 2005 Jun;4(6):435-46.
15. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*. 2002 Nov;298(5599):1759-62.
16. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*. 2004 Aug;22(8):969-76.
17. Zhang H, Zhou Z, Yang B, Gao M. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. *J Phys Chem B*. 2003 01/01; 2013/07;107(1):8-13.
18. Gaponik N, Rogach AL. Thiol-capped CdTe nanocrystals: Progress and perspectives of the related research fields. *Phys Chem Chem Phys*. 2010 Aug 21;12(31):8685-93.
19. Boldt K, Bruns OT, Gaponik N, Eychmuller A. Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers. *J Phys Chem B*. 2006 Feb 9;110(5):1959-63.

20. Jiang W, Mardyani S, Fischer H, Chan WCW. Design and characterization of lysine cross-linked mercapto-acid biocompatible quantum dots. *Chem Mater*. 2006 02/01; 2013/07;18(4):872-8.
21. Karabanovas V, Zakarevicius E, Sukackaite A, Streckyte G, Rotomskis R. Examination of the stability of hydrophobic (CdSe)ZnS quantum dots in the digestive tract of rats. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2008;7(6):725-9.
22. Fitzpatrick JA, Andreko SK, Ernst LA, Waggoner AS, Ballou B, Bruchez MP. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo. *Nano Lett*. 2009 Jul;9(7):2736-41.
23. Bullen C, Mulvaney P. The effects of chemisorption on the luminescence of CdSe quantum dots. *Langmuir*. 2006 Mar 28;22(7):3007-13.
24. Gui M, Bao L, Xia Y, Wei C, Zhang S, Zhu C. Indication of intracellular physiological pH changes by L-cysteine-coated CdTe quantum dots with an acute alteration in emission color. *Biosens Bioelectron*. 2011 Dec 15;30(1):324-7.
25. Yuan J, Guo W, Wang E. Investigation of some critical parameters of buffer conditions for the development of quantum dots-based optical sensors. *Anal Chim Acta*. 2008 Dec 23;630(2):174-80.
26. Aldeek F, Mustin C, Balan L, Medjahdi G, Roques-Carmes T, Arnoux P, et al. Enhanced photostability from CdSe(S)/ZnO Core/Shell quantum dots and their use in biolabeling. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2011;2011(6):794-801.
27. Wang T, Jiang X. Size-dependent stability of water-solubilized CdTe quantum dots and their uptake mechanism by live HeLa cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Feb;5(4):1190-6.
28. Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):12617-21.
29. Yang RS, Chang LW, Wu JP, Tsai MH, Wang HJ, Kuo YC, et al. Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705,

in mice: ICP-MS quantitative assessment. *Environ Health Perspect.* 2007 Sep;115(9):1339-43.

30. Mosqueira VC, Legrand P, Morgat JL, Vert M, Mysiakine E, Gref R, et al. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density. *Pharm Res.* 2001 Oct;18(10):1411-9.

31. Praetner M, Rehberg M, Bihari P, Lerchenberger M, Uhl B, Holzer M, et al. The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. *Biomaterials.* 2010 Sep;31(26):6692-700.

32. Kikkeri R, Lepenies B, Adibekian A, Laurino P, Seeberger PH. In vitro imaging and in vivo liver targeting with carbohydrate capped quantum dots. *J Am Chem Soc.* 2009 Feb 18;131(6):2110-2.

33. Al-Jamal WT, Al-Jamal KT, Cakebread A, Halket JM, Kostarelos K. Blood circulation and tissue biodistribution of lipid-quantum dot (L-QD) hybrid vesicles intravenously administered in mice. *Bioconjug Chem.* 2009 Sep;20(9):1696-702.

34. Chen Z, Chen H, Meng H, Xing G, Gao X, Sun B, et al. Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Aug 1;230(3):364-71.

35. Gao JH, Chen K, Xie RG, Xie J, Lee S, Cheng Z, et al. Ultrasmall near-infrared non-cadmium quantum dots for in vivo tumor imaging. *Small.* 2010 Jan;6(2):256-61.

36. Jackson H, Muhammad O, Daneshvar H, Nelms J, Popescu A, Vogelbaum MA, et al. Quantum dots are phagocytized by macrophages and colocalize with experimental gliomas. *Neurosurgery.* 2007 Mar;60(3):524,9; discussion 529-30.

37. Mickler FM, Mockl L, Ruthardt N, Ogris M, Wagner E, Brauchle C. Tuning nanoparticle uptake: Live-cell imaging reveals two distinct endocytosis mechanisms mediated by natural and artificial EGFR targeting ligand. *Nano Lett.* 2012 Jul 11;12(7):3417-23.

38. Sarin H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenesis Res.* 2010 Aug 11;2:14,2384-2-14.
39. Choi SH, Moon WK. Contrast-enhanced MR imaging of lymph nodes in cancer patients. *Korean J Radiol.* 2010 Jul-Aug;11(4):383-94.
40. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Iyengar I, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007 Oct;25(10):1165-70.
41. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond).* 2008 Oct;3(5):703-17.
42. Ku S, Yan F, Wang Y, Sun Y, Yang N, Ye L. The blood-brain barrier penetration and distribution of PEGylated fluorescein-doped magnetic silica nanoparticles in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 16;394(4):871-6.
43. Santra S, Yang H, Stanley JT, Holloway PH, Moudgil BM, Walter G, et al. Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS:Mn/ZnS quantum dots. *Chem Commun (Camb).* 2005 Jul 7;(25)(25):3144-6.
44. Chrastina A, Massey KA, Schnitzer JE. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2011 Jul-Aug;3(4):421-37.
45. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2011 Jun;6(4):715-28.
46. Rehberg M, Praetner M, Leite CF, Reichel CA, Bihari P, Mildner K, et al. Quantum dots modulate leukocyte adhesion and transmigration depending on their surface modification. *Nano Lett.* 2010 Sep 8;10(9):3656-64.
47. Shukur A, Rizvi SB, Whitehead D, Seifalian A, Azzawi M. Altered sensitivity to nitric oxide donors, induced by intravascular infusion of quantum dots, in murine mesenteric arteries. *Nanomedicine.* 2012 Oct 29.

48. Wang L, Zhang J, Zheng Y, Yang J, Zhang Q, Zhu X. Bioeffects of CdTe quantum dots on human umbilical vein endothelial cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2010 Dec;10(12):8591-6.
49. Su L, Han L, Ge F, Zhang SL, Zhang Y, Zhao BX, et al. The effect of novel magnetic nanoparticles on vascular endothelial cell function in vitro and in vivo. *J Hazard Mater.* 2012 Oct 15;235-236:316-25.
50. Vesterdal LK, Mikkelsen L, Folkmann JK, Sheykhzade M, Cao Y, Roursgaard M, et al. Carbon black nanoparticles and vascular dysfunction in cultured endothelial cells and artery segments. *Toxicol Lett.* 2012 Oct 2;214(1):19-26.
51. Parthasarathy V, Fery-Forgues S, Campioli E, Recher G, Terenziani F, Blanchard-Desce M. Dipolar versus octupolar triphenylamine-based fluorescent organic nanoparticles as brilliant one- and two-photon emitters for (bio)imaging. *Small.* 2011 Nov 18;7(22):3219-29.
52. Lu RM, Chang YL, Chen MS, Wu HC. Single chain anti-c-met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(12):3265-74.
53. Kim KS, Kim S, Beack S, Yang JA, Yun SH, Hahn SK. In vivo real-time confocal microscopy for target-specific delivery of hyaluronic acid-quantum dot conjugates. *Nanomedicine.* 2012 Oct;8(7):1070-3.
54. Nurunnabi M, Cho KJ, Choi JS, Huh KM, Lee YK. Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging. *Biomaterials.* 2010 Jul;31(20):5436-44.
55. Moret F, Scheglmann D, Reddi E. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC). *Photochem Photobiol Sci.* 2013 Feb 5.
56. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol.* 2010;624:25-37.
57. Shan L. Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): ; 2004.

58. Fischer HC, Hauck TS, Gomez-Aristizabal A, Chan WC. Exploring primary liver macrophages for studying quantum dot interactions with biological systems. *Adv Mater.* 2010 Jun 18;22(23):2520-4.
59. Europos komisijos interneto svetainė. Žiūrėta 2013.10.14. Prieiga: [Http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/nanomaterials/](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/nanomaterials/).
60. Morgen M, Lu GW, Du D, Stehle R, Lembke F, Cervantes J, et al. Targeted delivery of a poorly water-soluble compound to hair follicles using polymeric nanoparticle suspensions. *Int J Pharm.* 2011 Sep;416(1):314-22.
61. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, et al. Nanoparticles - an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2007 May;66(2):159-64.
62. Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 May;63(6):470-91.
63. Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Biological safety of LipoFullerene composed of squalane and fullerene-C60 upon mutagenesis, photocytotoxicity, and permeability into the human skin tissue. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2009 Jun;104(6):483-7.
64. Choksi AN, Poonawalla T, Wilkerson MG. Nanoparticles: A closer look at their dermal effects. *Journal of Drugs in Dermatology.* 2010 May;9(5):475-81.
65. Kwan KHL, Liu XL, To MKT, Yeung KWK, Ho CM, Wong KKY. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine.* 2011 Aug;7(4):497-504.
66. Kuchler S, Wolf NB, Heilmann S, Weindl G, Helfmann J, Yahya MM, et al. 3D-wound healing model: Influence of morphine and solid lipid nanoparticles. *J Biotechnol.* 2010 Jul;148(1):24-30.
67. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology.* 2010;3:11.

68. Tang H, Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Theoretical description of transdermal transport of hydrophilic permeants: Application to low-frequency sonophoresis. *J Pharm Sci*. 2001 May;90(5):545-68.
69. Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, Lopez-Quintela MA. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J Invest Dermatol*. 2007 Jul;127(7):1701-12.
70. Monteiro-Riviere NA, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO, Riviere JE. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: An in vitro and in vivo study. *Toxicological Sciences*. 2011 Sep;123(1):264-80.
71. Chu MQ, Wu Q, Wang JX, Hou SK, Miao Y, Peng JL, et al. In vitro and in vivo transdermal delivery capacity of quantum dots through mouse skin. *Nanotechnology*. 2007 Nov;18(45):6.
72. Patzelt A, Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013 Jun;10(6):787-97.
73. Wang L, Qin G, Geng S, Dai Y, Wang JY. Preparation of zein conjugated quantum dots and their in vivo transdermal delivery capacity through nude mouse skin. *J Biomed Nanotechnol*. 2013 Mar;9(3):367-76.
74. Zhang LW, Monteiro-Riviere NA. Use of confocal microscopy for nanoparticle drug delivery through skin. *J Biomed Opt*. 2013 Jun;18(6):061214.
75. Mortensen LJ, Oberdorster G, Pentland AP, DeLouise LA. In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: The effect of UVR. *Nano Letters*. 2008 Sep;8(9):2779-87.
76. Seto JE, Polat BE, Lopez RFV, Blankschtein D, Langer R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *J Controlled Release*. 2010 Jul;145(1):26-32.
77. Tang L, Zhang C, Song G, Jin X, Xu Z. In vivo skin penetration and metabolic path of quantum dots. *Sci China Life Sci*. 2013 Feb;56(2):181-8.

78. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol.* 2011 May;6(5):321-8.
79. Menjoge AR, Rinderknecht AL, Navath RS, Faridnia M, Kim CJ, Romero R, et al. Transfer of PAMAM dendrimers across human placenta: Prospects of its use as drug carrier during pregnancy. *J Control Release.* 2011 Mar 30;150(3):326-38.
80. Saunders M. Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009 Nov-Dec;1(6):671-84.
81. McGill virtuali fiziologijos laboratorija. Žiūrėta 2013.06.13. Prieiga: [Http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/other_exps/endo/reprod_horm.htm](http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/other_exps/endo/reprod_horm.htm)
82. Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* 2010 Mar;20(3):142-9.
83. Kelf TA, Sreenivasan VK, Sun J, Kim EJ, Goldys EM, Zvyagin AV. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology.* 2010 Jul 16;21(28):285105,4484/21/28/285105. Epub 2010 Jun 28.
84. Pi QM, Zhang WJ, Zhou GD, Liu W, Cao Y. Degradation or excretion of quantum dots in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnol.* 2010 May 6;10:36,6750-10-36.
85. Tan SJ, Jana NR, Gao S, Patra PK, Ying JY. Surface-ligand-dependent cellular interaction, subcellular localization, and cytotoxicity of polymer-coated quantum dots. *Chem Mater.* 2010 04/13; 2013/06;22(7):2239-47.
86. Kertschanska S, Kosanke G, Kaufmann P. Pressure dependence of so-called transtrophoblastic channels during fetal perfusion of human placental villi. *Microsc Res Tech.* 1997 Jul 1-15;38(1-2):52-62.
87. Bonatelli M, Carter AM, Machado MR, De Oliveira MF, de Lima MC, Miglino MA. Placentation in the paca (agouti paca L). *Reprod Biol Endocrinol.* 2005 Feb 28;3:9.

88. Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: Possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta*. 2007 Aug-Sep;28(8-9):841-5.
89. Farese RV, Jr, Cases S, Ruland SL, Kayden HJ, Wong JS, Young SG, et al. A novel function for apolipoprotein B: Lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice. *J Lipid Res*. 1996 Feb;37(2):347-60.
90. Smith KK, Strickland S. Structural components and characteristics of Reichert's membrane, an extra-embryonic basement membrane. *J Biol Chem*. 1981 May 10;256(9):4654-61.
91. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Lentjes EG, Fauser BC, Heijnen CJ, et al. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod*. 2009 Jun;24(6):1427-35.
92. Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, et al. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod*. 2001 Jun;64(6):1608-13.
93. Bevilacqua E, Hoshida MS, Amarante-Paffaro A, Albieri-Borges A, Zago Gomes S. Trophoblast phagocytic program: Roles in different placental systems. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):495-505.
94. Marin JJ, Briz O, Serrano MA. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Curr Drug Deliv*. 2004 Jul;1(3):275-89.
95. Demir R, Erben T. Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)*. 1984;119(1):18-26.
96. Metz J. On the developing rat placenta. I. differentiation and junctional alterations of labyrinthine layers II and III. *Anat Embryol (Berl)*. 1980;159(3):289-305.
97. Prouillac C, Lecoœur S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: Importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos*. 2010 Oct;38(10):1623-35.

98. Liu L, Zhang J, Su X, Mason RP. In vitro and in vivo assessment of CdTe and CdHgTe toxicity and clearance. *J Biomed Nanotechnol.* 2008 Dec 1;4(4):524-8.
99. Ahokas RA, Dilts PV, Jr. Cadmium uptake by the rat embryo as a function of gestational age. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Sep 15;135(2):219-22.
100. Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, et al. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small.* 2008 Dec;4(12):2108-11.
101. Myllynen PK, Loughran MJ, Howard CV, Sormunen R, Walsh AA, Vahakangas KH. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol.* 2008 Oct;26(2):130-7.
102. Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect.* 2010 Mar;118(3):432-6.
103. Damalakiene L, Karabanovas V, Bagdonas S, Valius M, Rotomskis R. Intracellular distribution of nontargeted quantum dots after natural uptake and microinjection. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:555-68.
104. Poderys V, Matulionyte M, Selskis A, Rotomskis R. Interaction of water-soluble CdTe quantum dots with bovine serum albumin. *Nanoscale Research Letters.* 2011;6.
105. Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, et al. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Nov 1;232(3):418-27.
106. Clift MJD, Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Stone V. The uptake and intracellular fate of a series of different surface coated quantum dots in vitro. *Toxicology.* 2011 Aug;286(1-3):58-68.
107. Zhang LW, Baumer W, Monteiro-Riviere NA. Cellular uptake mechanisms and toxicity of quantum dots in dendritic cells. *Nanomedicine (Lond).* 2011 Jul;6(5):777-91.

108. Prinzen L, Miserus RJ, Dirksen A, Hackeng TM, Deckers N, Bitsch NJ, et al. Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using annexin a5-functionalized quantum dots. *Nano Lett.* 2007 Jan;7(1):93-100.
109. Gao JH, Chen K, Xie RG, Xie J, Yan YJ, Cheng Z, et al. In vivo tumor-targeted fluorescence imaging using near-infrared non-cadmium quantum dots. *Bioconjug Chem.* 2010 Apr;21(4):604-9.
110. de Farias PM, Santos BS, de Menezes FD, de Carvalho Ferreira R, Barjas-Castro ML, Castro V, et al. Investigation of red blood cell antigens with highly fluorescent and stable semiconductor quantum dots. *J Biomed Opt.* 2005 Jul-Aug;10(4):44023.
111. Hu CM, Zhang L, Aryal S, Cheung C, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 5;108(27):10980-5.
112. Burns ER, Pollack S. *P. falciparum* infected erythrocytes are capable of endocytosis. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988 May;24(5):481-6.
113. Ballou B, Ernst LA, Andreko S, Harper T, Fitzpatrick JA, Waggoner AS, et al. Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. *Bioconjug Chem.* 2007 Mar-Apr;18(2):389-96.
114. Wang T, Hsieh H, Hsieh Y, Chiang C, Sun Y, Wang C. The in vivo biodistribution and fate of CdSe quantum dots in the murine model: A laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Dec;404(10):3025-36.
115. Schipper ML, Iyer G, Koh AL, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A, et al. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small.* 2009 Jan;5(1):126-34.
116. Oregono sveikatos ir mokslo universitetas. lazerinės medicinos centras. Žiūrėta 2013.10.13.
Prieiga: <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>.

117. Bennett KM, Zhou H, Sumner JP, Dodd SJ, Bouraoud N, Doi K, et al. MRI of the basement membrane using charged nanoparticles as contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2008 Sep;60(3):564-74.
118. Cleal K, He L, Watson PD, Jones AT. Endocytosis, intracellular traffic and fate of cell penetrating peptide based conjugates and nanoparticles. *Curr Pharm Des*. 2013;19(16):2878-94.
119. Eisenmann CJ, Miller RK. The placental transfer and toxicity of selenite relative to cadmium in the human term perfused placenta. *Placenta*. 1994 Dec;15(8):883-95.
120. Kennedy WR, Sakuta M, Quick DC. Rodent eccrine sweat glands: A case of multiple efferent innervation. *Neuroscience*. 1984;11:741-9.
121. Campbell KP, Stull JT. Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):12599-600.
122. Lauer AC, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND. Transfollicular drug-delivery. *Pharm Res*. 1995 Feb;12(2):179-86.
123. Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, et al. Hair follicles - A long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006;19(4):232-6.
124. Driskell RR, Clavel C, Rendl M, Watt FM. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *J Cell Sci*. 2011 Apr 15;124(Pt 8):1179-82.
125. Kuchler S, Radowski M, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, et al. Nanoparticles for skin penetration enhancement - a comparison of dendritic core-multishell nanotransporters and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 Apr;71(2):243-50.
126. Dellinger A, Zhou ZG, Norton SK, Lenk R, Conrad D, Kepley CL. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2010 Aug;6(4):575-82.
127. Sen D, Deerinck TJ, Ellisman MH, Parker I, Cahalan MD. Quantum dots for tracking dendritic cells and priming an immune response in vitro and in vivo. *Plos One*. 2008 Sep;3(9).

128. Romoser AA, Chen PL, Berg JM, Seabury C, Ivanov I, Criscitiello MF, et al. Quantum dots trigger immunomodulation of the NF kappa B pathway in human skin cells. *Mol Immunol*. 2011 Jul;48(12-13):1349-59.
129. Barnes AJ, Brunet BR, Choo RE, Mura P, Johnson RE, Jones HE, et al. Excretion of methadone in sweat of pregnant women throughout gestation after controlled methadone administration. *Ther Drug Monit*. 2010 Aug;32(4):497-503.
130. Kalluri R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):422-33.
131. Vainionpaa N, Butzow R, Hukkanen M, Jackson DG, Pihlajaniemi T, Sakai LY, et al. Basement membrane protein distribution in LYVE-1-immunoreactive lymphatic vessels of normal tissues and ovarian carcinomas. *Cell Tissue Res*. 2007 May;328(2):317-28.
132. Kosaka N, Ogawa M, Sato N, Choyke PL, Kobayashi H. In vivo real-time, multicolor, quantum dot lymphatic imaging. *J Invest Dermatol*. 2009 Dec;129(12):2818-22.
133. Robe A, Pic E, Lassalle HP, Bezdetnaya L, Guillemin F, Marchal F. Quantum dots in axillary lymph node mapping: Biodistribution study in healthy mice. *BMC Cancer*. 2008 Apr 22;8:111.
134. Alam F, Yadav N. Potential applications of quantum dots in mapping sentinel lymph node and detection of micrometastases in breast carcinoma. *J Breast Cancer*. 2013 Mar;16(1):1-11.
135. Kosaka N, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H. In vivo real-time lymphatic draining using quantum-dot optical imaging in mice. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013 Jan-Feb;8(1):96-100.
136. Muhammad O, Popescu A, Toms SA. Macrophage-mediated colocalization of quantum dots in experimental glioma. *Methods Mol Biol*. 2007;374:161-71.
137. Zhang LW, Monteiro-Riviere NA. Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21(3):166-80.

138. Rehberg M, Leite CF, Mildner K, Horstkotte J, Zeuschner D, Krombach F. Surface chemistry of quantum dots determines their behavior in postischemic tissue. *ACS Nano*. 2012 Feb 28;6(2):1370-9.
139. Mortensen LJ, Jatana S, Gelein R, De Benedetto A, De Mesy Bentley KL, Beck LA, et al. Quantification of quantum dot murine skin penetration with UVR barrier impairment. *Nanotoxicology*. 2013 Dec;7:1386-98.
140. *Life technologies* kompanijos interneto svetainė. Žiūrėta 2013.09.01. Prieiga: <http://www.lifetechnologies.com/lt/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/ultrasensitive-detection-technology/qdot-nanocrystal-technology.html>.
141. Pavojingų junginių duomenų bankas (Hazardous Substances Data Bank). nacionalinis sveikatos institutas, JAV (National Institute of Health). Žiūrėta 2013.10.08. Prieiga: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@rn+107-96-0>.
142. Dabbousi BO, Rodriguez-Viejo J, Mikulec FV, Heine JR, Mattoussi H, Ober R, et al. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J Phys Chem B*. 1997 11/01; 2013/11;101(46):9463-75.
143. Garcia-Perez BE, De la Cruz-Lopez JJ, Castaneda-Sanchez JI, Munoz-Duarte AR, Hernandez-Perez AD, Villegas-Castrejon H, et al. Macropinocytosis is responsible for the uptake of pathogenic and non-pathogenic mycobacteria by B lymphocytes (raji cells). *BMC Microbiol*. 2012 Oct 31;12:246,2180-12-246.
144. Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol*. 2010 Nov;30(3):343-52.