

VILNIAUS UNIVERSITETAS

LEONA DAMALAKIENĖ (BANDZAITYTĖ)

KOLOIDINIŲ KVANTINIŲ TAŠKŲ KAUPIMOSI IR  
VIDULĄSTELINIO PASISKIRSTYMO POVEIKIO ENDOCITOZĖS  
MECHANIZMAMS FLUORESCENCINIAI TYRIMAI

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, fizika (02 P)

Vilnius, 2014 metai

Disertacija rengta 2006 – 2013 metais Vilniaus universitete.

**Mokslinis vadovas:**

doc. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02 P).

## Turinys

Padėka .....	5
1 Naudojami terminai ir santrumpos .....	6
1.1 Naudojamų terminų žodynas.....	6
1.2 Naudojamos santrumpos .....	6
2 Įvadas.....	8
2.1 Aktualumas.....	8
2.2 Tyrimų tikslas ir uždaviniai .....	15
2.3 Ginamieji teiginiai.....	15
2.4 Autorės indėlis.....	16
2.5 Naujumas.....	16
3 Tyrimų apžvalga.....	18
3.1 Kvantinių taškų optinės savybės .....	18
3.2 Nanodalelių patekimo į ląsteles keliai.....	20
3.3 Nanodalelių fizikocheminių savybių įtaka jų kaupimuisi ląstelėse ....	23
3.4 Kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse tyrimų apžvalga .....	29
4 Medžiagos ir metodai .....	37
4.1 Ląstelių linijos .....	37
4.2 Ląstelių paruošimo ir inkubacijos su kvantiniais taškais protokolas ..	37
4.3 Naudotos medžiagos .....	38
4.4 Naudoti tyrimų metodai .....	40
5 Rezultatai ir jų aptarimas.....	52
5.1 Kvantinių taškų kaupimasis ir pasiskirstymas ląstelėse.....	52

5.2	Kvantinių taškų patekimo mechanizmas.....	77
5.3	Kvantinių taškų taikymo nanomedicinoje galimybių vertinimas .....	100
6	Išvados.....	106
7	Publikacijos .....	108
8	Literatūros sąrašas .....	110

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui doc. dr. Sauliui Bagdonui už vertingas diskusijas ir pastabas, skirtą laiką mano darbui bei už palaikymą ir padrąsinimą vis primenant, kad „ne šventieji puodus lipdo“.

Labai dėkoju straipsnių bendraautoriams prof. habil. dr. Ričardui Rotomskiui už turingas diskusijas ir praktines straipsnių rašymo pamokas bei dr. Vitalijui Karabanovui už pagalbą su eksperimentais ir eksperimentų metodikomis.

Dėkoju savo tėvams prof. habil. dr. Antanui Rimvidui Bandzaičiui ir habil. dr. Zitai Bandzaitienei už tai, kad savo pavyzdžiu įkvėpė norą nenustoti mokytis ir skatino siekti užsibrėžtų tikslų iki galo.

Dėkoju savo vyrui Ryčiui Damalakui už besąlyginį palaikymą ir dukrai Dominykai už nuoširdų domėjimąsi tyrimų rezultatų paveikslais.

Dėkoju kitiems savo artimiesiems bei draugams už jų paramą.

Esu be galo dėkinga Dievui, kad viską taip nuostabiai sukūrė ir apdovanojo gebėjimais bei galimybėmis savo kūrybą pažinti.

## 1 Naudojami terminai ir santrumpos

### 1.1 Naudojamų terminų žodynas

Pagrindiniai naudojami terminai, jų paaiškinimai ir atitikmenys anglų kalboje yra pateikiami 1 lentelėje:

1 lentelė. Naudojamų terminų paaiškinimas ir anglų kalbos atitikmenys

<i>Lietuviškas terminas</i>	<i>Angliškas terminas</i>
įsisavinimas (į ląsteles)	uptake
kaupimasis (ląstelėse)	accumulation
pateikimas į (ląstelės) vidų	internalisation
tikslinis	targeted
ne tikslinis	non-targeted
dangalas	coating
kvantinis taškas (puslaidininkinis kristalas, sudarytas iš šerdies ir apvalkalo)	quantum dot
nanodalelė (dydis: 1–100 nm), taip pat ir kvantinis taškas su dangalu	nanoparticle
nanodalelėmis pagrįsta vaistų perneša	nanoparticle-based drug delivery
lemtis	fate
baltymų vainikas	protein corona
endocitozės kelias	endocytosis pathway
lipidinis plaustelis	lipid raft
pasiskirstymas	localisation

### 1.2 Naudojamos santrumpos

Žemiau yra pateikiamos pagrindinės naudojamos santrumpos:

- AE – ankstyvoji endosoma
- CdSe – kadmio selenidas
- Ce<sub>6</sub> – chlorinas e6
- COOH – karboksilo grupė
- DexB – dekstranas
- DME – Dulbecco modifikuota Eagle terpė
- DSPE-PEG – fosfolipidinis polietilenglikolis

EGFP	–	žaliai fluorescuojantis baltymas
FL	–	fluorescencija
FLIM	–	fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopija
FtL	–	fotoluminescencija
HepG2	–	žmogaus kepenų vėžio linijos ląstelės
KT	–	kvantinis taškas
KT545	–	KT, kurio didžiausias fotoluminescencijos intensyvumas yra ties 545 nm
KT625	–	KT, kurio didžiausias fotoluminescencijos intensyvumas yra ties 625 nm
LacCer	–	laktozilceramidas
LDL	–	mažo tankio lipoproteinas
LYS	–	lizosoma
MCF-7	–	žmogaus krūties vėžio linijos ląstelės
MVB	–	multivezikuliniai kūneliai
NIH3T3	–	imortalizuotų fibroblastų, išskirtų iš pelių embriono, linijos ląstelės
NVP	–	nanodalelėmis pagrįsta vaistų perneša
PEG	–	polietilenglikolis
PHL	–	pirminių žmogaus kepenų linijos ląstelėse
PBS	–	fosfatinis buferinis druskos tirpalas
ROS	–	reaktyvios deguonies atmainos
SRA	–	receptorius-gaudyklė
Trf	–	transferinas
VDL	–	vidutinis dalinimosi laikas
ZnS	–	cinko sulfidas
XTT	–	tetrazolio dažas

## 2 Įvadas

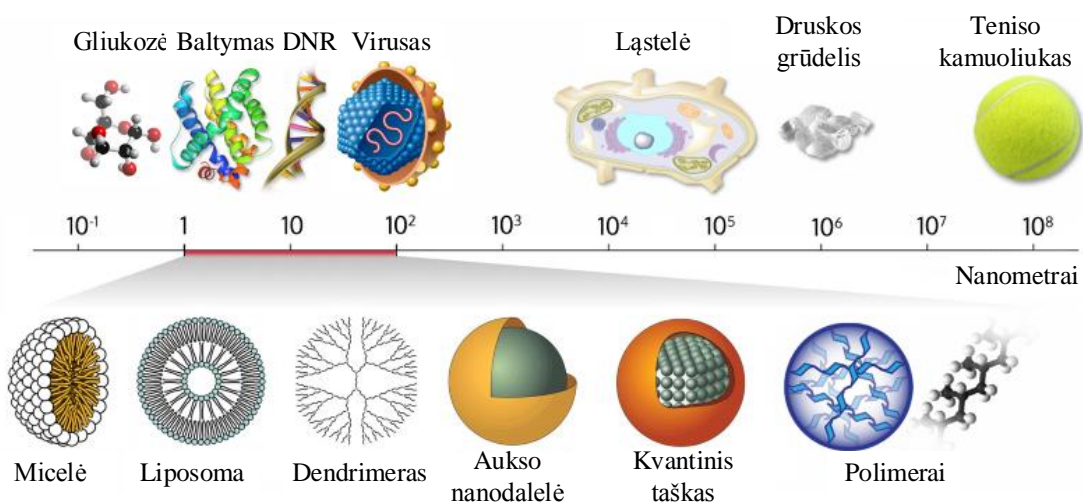
### 2.1 Aktualumas

Per pastarąjį dešimtmetį nanotechnologijų taikymas medicinoje ir nanomedžiagų naudojimas vystant naujas vaistų formas (vienu žodžiu apibūdinamas kaip nanomedicina<sup>1</sup>) tapo pagrindiniu inovacijų įkvėpimo šaltiniu kuriant naujus vaistų pernašos būdus,<sup>[1]</sup> skirtus pagerinti veiksmingumo ir toksiškumo santykį bei įgalinti suasmenintą mediciną (*angl. personalized (nano-) medicine*).<sup>[2]</sup> Pagrindinis pernašai skirtų nanodalelių privalumas yra galimybė realizuoti kelias funkcijas, vienoje nanodalelėje apjungiant diagnostikai ir terapijai (*angl. theranostics*) skirtus preparatus, t.y., vaistus, atpažinimo ligandus ir vaizdinimo žymenis, taip įgalinant tikslinį vaistų pristatymą bei šio proceso stebėseną ir kontrolę. Nanonešikliai gali būti bet koks koloidinis objektas (organinės ir neorganinės nanodalelės, liposomos, micelės ir tirpios atitinkamo dydžio makromolekulės), kurio dydis yra nuo kelių nanometrų iki kelių mikrometrų (1 pav.). Ypatingai daug tyrimų yra atliekama kuriant nanonešiklius, kuriuos sudaro lipidų, polimerų molekulės, anglies, neorganiniai nanokristalai ir įvairios kompozitinės medžiagos,<sup>[3]</sup> – ne tik tam, kad ženkliai pagerinti dabartinių vaistų farmakokinetines savybes,<sup>[4]</sup> bet ir tam, kad pernešti organizme naujo tipo veiksmingus priešvėžinius vaistus, naudojamus genų ir imuno- terapijoje.<sup>[5]</sup>

---

<sup>1</sup> Nanomedicinos pagrindinis tikslas yra siekti medicininės naudos visapusiškai užtikrinant kontrolę, stebėseną, atkūrimą, apsaugą ir pagerinimą visų biologinių žmogaus sistemų, naudojantis nanodydžio įrengimais bei nanostruktūromis, kurie veikia molekulinio lygmeniu.





1 pav. Nanonešiklių įvairovė ir jų dydžių palyginimas. Adaptuota pagal Kohannes Gutenberg universiteto Farmacijos ir biochemijos instituto WichLab laboratorijos tinklapyje pateikiamą informaciją, 2013 m.

Nanodalelėmis pagrįsta vaistų pernaša (NVP) – tai būdas, kuriuo siekiama pagerinti esamų vaistų veiksmingumą bei sudaryti galimybes naujoms terapijos rūšims atsirasti. Daugelis atliktų mokslinių tyrimų parodė, kad NVP sinergiškai apjungia ir pagerina tokias skirtingas vaistų veiksmingumą lemiančias savybes, kaip pvz., mažesnis šalutinis poveikis, pailginta cirkuliacijos trukmė, kontroliuojamas dozavimas organizmo viduje bei tikslinis (*angl. targeted*) pristatymas. Tačiau tam, kad NVP būtų galima panaudoti klinikiniam taikymams, pvz., vėžinių susirgimų gydymui, reikalingos fundamentalios žinios ir įvairiapusis supratimas, kokį poveikį fizikocheminės nanodalelių savybės daro vaistų aktyvumui ir lemčiai biologinėse sistemose, *in vitro* ir *in vivo*.

Sisteminiam nanodalelėmis pagrįstos vaistų pernašos tyrimams reikalingos didelio jautrio, įgalinančios didelę skiriamąją gebą, kuo paprasčiau modifikuojamos bei nebrangios modelinės priemonės. Teoriškai, tokios priemonės turi išlaikyti originalių NVP nešiklių savybes ir elgseną biologinėje aplinkoje, tačiau įgalinti stebėti sisteminių ir viduląstelinį nanonešiklio patekimą į organizmą, pasiskirstymą jame, degradaciją, veikliųjų medžiagų atpalaidavimą bei šalinimą. Puslaidininkiniai nanokristalai – kvantiniai taškai

(KT) dėl savo unikalių fizikinių, cheminių ir optinių savybių (2 lentelė) yra labai tinkamas modelis ir eksperimentinė platforma NVP procesų tyrimams,<sup>[6]</sup> siekiant išmokti kontroliuoti savybes, kuriomis turi pasižymėti nanonešikliai. KT vis daugiau dėmesio susilaukia dėl perspektyvų juos pritaikyti nanomedicinoje kaip diagnostikai ir gydymui skirtas priemones,<sup>[7]</sup> pavyzdžiui, atliekant tikslinį lokalių transformuotų ląstelių žymėjimą vėžio terapijoje.<sup>[8]</sup>

2 lentelė. Kvantinių taškų savybės, svarbios nanonešiklių elgsenos biologinėse sistemose tyrimams<sup>[9]</sup>

<i>KT savybės</i>	<i>Aprašymas</i>	<i>Taikymas</i>
Keičiamas, mažas dydis	2 –10 nm KT kristalo dydis įgalina skirtingas KT fotoluminescencijos spalvas	Galimybė naudoti atskirų ląstelių ir jų organelių vaizdinimui bei pažymėti atskiras nanodaleles ir didesnius sudėtinius nešikius siekiant nustatyti jų vietą, judėjimą bei degradaciją
Universali, nesudėtingai chemiškai funkcionalizuojama paviršiaus danga, reikšmingai nepaveikiant KT fotofizikinių savybių	Suderinamumas su labai įvairiais paviršiaus padengimo metodais leidžia funkcionalizuoti KT paviršių įvairiais dangalais ir konjuguoti su biologinėmis molekulėmis bei integruoti KT į skirtingas nanodalelėmis pagrįstų nešiklių sistemas	KT kaip vaizdinamų analogų panaudojimas vietoj kitų nanonešiklių, kuriuos siekiama tirti, nepakeičiant pirminės formos, dydžio ir paviršiaus savybių
Siauras Gauso pavidalo fotoluminescencijos (FtL) spektras	Intensyvios ir siauros KT FtL juostos ties daug skirtingų bangos ilgių įgalina atskirti ir identifikuoti įvairių KT sankaupas	Galimybė tuo pačiu metu stebėti daug skirtingų nanonešiklių toje pačioje modelinėje sistemoje
Intensyvi FtL	Išsiskiriantis FtL signalo ryškumas įgalina aptikti ir užregistruoti bandinyje atskirus KT ir jų junginius	Atskirų nanonešiklių elgsenos ląstelėse, jų patekimo ir viduląstelinės pernašos tyrimai bei nanonešiklių sekimas <i>in vivo</i>
Fotostabilumas	Atsparumas fotodegradacijai ilgalaikės apšvietos metu įgalina ilgalaikius KT stebėjimus	Nanonešiklių patekimo į ląsteles ir viduląstelinio transporto stebėseną realaus laiko režimu

<i>KT savybės</i>	<i>Aprašymas</i>	<i>Taikymas</i>
Didelis Stokso poslinkis, t.y., atstumas tarp sugerties ir liuminescencijos spektrų smailių	Didelis spektrinis intervalas tarp žadinimo bangos ilgio ir liuminescencijos smailės sumažina autofluorescencijos įtaką gaunamiems rezultatams	Nanodalelių biopasiskirstymo ir farmakokinetikos tyrimai <i>in vivo</i>
Jautris mikroaplinkai	KT FtL priklausomybė nuo pH, paviršiaus pasyvacija ir gesiklių ar vaistų suteikiama geba justti mikroaplinkos pokyčius	Pokyčių lokaloje mikroaplinkoje stebėjimas skirtinguose nanonešiklio patekimo į ląsteles, transporto ląstelėse bei veikliųjų medžiagų atpalaidavimo etapuose
Didelį elektronų tankį turinti šerdis	Ryškus KT kontrastas po peršviečiančiu elektroniniu mikroskopu (TEM) įgalina labai tikslią KT lokalizaciją ląstelėse su viduląsteline skiriamąja geba	Nanonešiklių transporto ir pasiskirstymo skirtingose fiksuotos ląstelės struktūrinėse dalyse tyrimai

Be pagrindinių privalumų, pvz., didelės skiriamosios gebos įgalinimas, jautris aplinkos pokyčiams, plati spektrinio registravimo sritis, kurie atsiskleidžia panaudojant KT optiniam vaizdinimui, KT pasižymi mažu dydžiu, universaliomis paviršiaus cheminėmis bei išskirtinėmis optinėmis savybėmis – intensyvia FtL ir fotostabilumu, kurių dėka galima realaus laiko režimu stebėti ir registruoti jų elgseną biologinėse sistemose. Nepaisant to, kad KT dažniausiai yra sudaryti iš toksinių medžiagų, pvz., kadmio, tinkama danga pasyvuoti KT nesukelia ūmaus toksinio poveikio *in vitro* ir *in vivo*.<sup>[10,11]</sup> KT savybės įgalino juos panaudoti modeliuojant įvairių nanodalelių tiksline nutaikymo, patekimo į ląsteles ir transporto ląstelėse mechanizmus, bei šių tyrimų pagrindu siūlyti sprendimus, kaip reikėtų optimizuoti fizikochemines nanodalelių savybes ir paviršiaus junginių funkcionalumą specifiniams taikymams, ilgainiui kvantinį tašką pakeičiant kita, dominančia nanodalele (pvz., aukso nanodalele fototerminei terapijai), bet nedarant poveikio jau nustatytoms nanonešiklio fizinėms savybėms ir lemčiai biologinėse sistemose.<sup>[12]</sup>

Technologinė pažanga sintetinant vandeninėse terpėse suspenduojamus puslaidininkinius nanokristalus įgalino gaminti besiskiriančius dydžiu, paviršiaus aktyvumu, prijungiamomis prie paviršiaus biologinėmis molekulėmis ir tiksliai paskirtimi biosuderinamus kvantinius taškus. Nanodalelių dydis, krūvis ir cheminis aktyvumas (dangalo ir paviršiaus aktyvios grupės) yra laikomos ypatingai svarbiomis savybėmis, sąlygojančiomis nanodalelių sąveiką su biomolekulėmis ir biologinį atsaką, nes šių savybių pokyčiai ženkliai pakeičia nanodalelių patekimą į ląsteles, viduląstelinę lokalizaciją ir lemčių.<sup>[12,13]</sup> Išsiaiškinus patekimo į ląsteles mechanizmus, kiekybiškai įvertinus nanodalelių patekimo į ląsteles spartą bei nustatčius jų lemčių ląstelės viduje, taptų įmanoma kontroliuoti pagrindinius veiksnius, apsprendžiančius klinikinius NVP naudojimo rezultatus.<sup>[14]</sup> Yra atlikta daug ne vienoje apžvalgoje aprašytų tyrimų *in vitro* ir *in vivo*, kuriais siekiama atrasti sąsajas tarp šių KT savybių ir ląstelėse stebimų biomolekulinių

signalų, viduląstelinio transporto ir toksinio poveikio.<sup>[7,15-18]</sup> Tačiau, remiantis dabartine mokslinėje literatūroje pateikiama informacija, yra sudėtinga padaryti apibendrinančias išvadas apie optimalias biomedicininio atžvilgiu nanodalelių savybes, nes tyrimų rezultatai aprėpia labai įvairias nanodaleles, gauti tiriant jas skirtingose ląstelių linijose ir taikant skirtingus metodus. Taip pat, dauguma skelbtų pradinių išvadų turi būti tikslinamos, remiantis naujomis žiniomis apie nanodalelių patekimo į ląsteles mechanizmus ir nuo to priklausančią jų lemtį.<sup>[19]</sup> Todėl nanodalelių patekimo į ląsteles, viduląstelinio transporto ir pasiskirstymo dėsningumą ištyrimas leistų tiksliau interpretuoti duomenis gaunamus *in vitro* tyrimais ir pasitarnautų nanodalelių panaudojimo *in vivo* plėtrai. Taigi, dideliu nanomedžiagų mokslo iššūkiu tebėra paieška, kaip sukurti tokias nanodaleles, kad *in vivo* jos galėtų būti tikslingai nukreipiamos į numatyto poveikio vietą. Reikia dar daug sužinoti apie nanodalelių patekimą į ląsteles ir viduląstelinį transportą, kad galima būtų vienareikšmiškai interpretuoti *in vitro* tyrimų rezultatus, pagerinti jų pritaikomumą eksperimentams *in vivo* ir paskatinti kryptingą tiksliniu poveikiu pasižyminčių nanodalelių kūrimą.<sup>[20]</sup>

Nanodalelių naudojimas biomedicininėje srityje sukėlė daug vilčių, kad bus sukurti nauji, nanotechnologijų taikymu pagrįsti diagnostikos ir terapijos problemų sprendimai. Tačiau tolimesnis progresas ir spartus technologinių sprendimų perkėlimas iš laboratorijos į klinikas labai priklausys nuo to, ar pavyks sukurti nanonešiklius su norimomis savybėmis, taip pat nuo supratimo, kaip šios sistemos sąveikauja su gyvu organizmu, ne tik makroskopiniu, bet ir molekulinio lygmeniu.<sup>[21]</sup> Šiuo metu, regis, tik pradėdame suprasti nanodalelių sąveikas sudėtingose biologinėse sistemose ir tai, kaip šios sąveikos gali būti kontroliuojamos, keičiant nanodalelių savybes, o ypač – jų paviršių. Šios žinios neabejotinai pasitarnaus vis platesniam nanodalelių pritaikymui medicinoje.

## 2.2 Tyrimų tikslas ir uždaviniai

Tyrimų tikslas – naudojant kvantinius taškus, kaip tinkamų vaistų pernašai biosuderinamų nanodalelių modelį, *in vitro* nustatyti bendrus tikslingai nemodifikuotų nanodalelių patekimo į ląsteles ir lokalizacijos jose dėsningumus.

Tikslui pasiekti buvo suformuluoti šie tyrimų uždaviniai:

1. Fluorescencinės spektroskopijos metodu išmatuoti kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse laikinę dinamiką vėžinių ir nevėžinių ląstelių kultūrose.
2. Ištirti viduląstelinį kvantinių taškų pasiskirstymą konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos ir fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopijos metodais.
3. Nustatyti kvantinių taškų patekimo į ląsteles būdus ir juos sąlygojančius veiksnius.
4. Įvertinti kvantinių taškų, kaip diagnostinių priemonių, poveikį ląstelėms kombinuoto gydymo modelio atveju.

## 2.3 Ginamieji teiginiai

1. Tikslingai nemodifikuotų neigiamo apvalkalo krūvio kvantinių taškų (KT) patekimas į visų tirtųjų linijų ląsteles yra netiesinis procesas, vykstantis trimis, nors ir skirtingos trukmės, etapais: I – lėtuoju, II – augimo ir III – soties, o KT kaupimąsi, atsižvelgiant į pasiskirstymą ląstelėse, galima suskirstyti į keturias fazes: 1-oji – KT prikibimas prie membranos; 2-oji – vezikulinių struktūrų su KT formavimas ir pasklidimas citoplazmoje; 3-oji – vezikulių su KT susiliejimas ir lokalizacija aplink branduolį; 4-oji – multivezikulinių kūnelių su KT formavimas ir pasiskirstymas citoplazmoje.
2. Kvantinius taškus sukaupusios endosomos patiria brandos pokyčius, formuojantis heterogeninėms vidinėms struktūroms, kuriose KT fotoluminescencijos gyvavimo trukmė trumpėja.

3. Kvantiniai taškai per ląstelės išorinę ar vidines membranas difuzijos būdu neprasisiskverbia.
4. Kvantiniai taškai aplinkoje be serumo baltymų į fibroblastų ląsteles (NIH3T3) patenka tik vienu, su kaveolinu susijusios endocitozės būdu, kurį patys slopina, tačiau stebimas nuslopinimas yra laikinas.
5. Kvantinių taškų susikaupimas ląstelėse gali paveikti tiek vaistinių preparatų patekimą į ląsteles, tiek ir ląstelių atsparumą jiems.

## **2.4 Autorės indėlis**

Šioje disertacijoje aprašyti eksperimentiniai tyrimai buvo atlikti Nacionalinio vėžio instituto Mokslinių tyrimų centro Biomedicininės fizikos laboratorijoje bei Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Proteomikos centre. Prof. habil. Dr. Ričardas Rotomskis konsultavo pasirenkant tyrimų kryptis. Dr. Mindaugas Valius ir dr. Vitalijus Karabanovas konsultavo eksperimentų metodiniais klausimais ir jų metu gautų rezultatų interpretacijos klausimais. Zigmantas Žitkus atliko laikinąją transfekciją su žaliai fluorescuojančio baltymo plazmidėmis. Linas Pupelis atliko kvantinių taškų citotoksiškumo eksperimentus.

Autorė dalyvavo atliekant kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse ir ląstelių mikroinjekcijos eksperimentuose, taip pat kartu su bendraautoriais atliko gautų eksperimentinių rezultatų analizę ir interpretaciją.

## **2.5 Naujumas**

Šio mokslinio darbo metu buvo pirmą kartą atlikti ir nuosekliai aprašyti išsamūs tikslingai nemodifikuotų neigiamą paviršiaus krūvį turinčių kvantinių taškų (KT) kaupimosi ląstelėse tyrimai, apimantys KT kaupimosi etapus, paskirstymą ląstelėse, susiformavusių endosomų struktūros analizę bei KT patekimo į ląsteles mechanizmo nustatymą.

Pirmą kartą ilgame laiko intervale buvo ištirti ir nustatyti laikiniai netikslių KT kaupimosi etapai (I – lėtasis ( $t_{ink} < 0,5$  val.), II – augimo ( $t_{ink}$



0,5-6 val.) ir III – soties ( $t_{ink} > 6$  val.)) bei KT pasiskirstymo ląstelėse fazės (1-oji fazė – prikibimas prie membranos ( $t_{ink}$  0,5-1 val.), 2-oji fazė – vezikulinių struktūrų formavimas ir pasklidimas citoplazmoje ( $t_{ink}$  0,5-6 val.), 3-oji fazė – vezikulių susilieėjimas ir lokalizacija aplink branduolį ( $t_{ink}$  6-24 val.) ir 4-oji fazė – multivezikulinių kūnelių formavimas ir pasiskirstymas citoplazmoje ( $t_{ink} > 24$  val.)). Pirmą kartą parodyta, kad naudojant fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopijos (FLIM) metodiką, galima identifikuoti KT sukaupusias vezikules pagal jų brandą bei vizualizuoti vidines vezikulių struktūras.

Pirmą kartą buvo atlikta KT suspensijos mikroinjekcija į ląsteles, siekiant imituoti galimą nanodalelių difuziją per išorinę ląstelės membraną. Atlikus palyginamuosius KT kaupimosi tyrimus ląstelėse po laikinosios transfekcijos su žaliai fluorescuojančio baltymo (EGFP) plazmide, buvo parodyta, kad KT difuziškai neprasiskverbia nei per išorinę, nei per vidines ląstelės membranas.

Buvo nustatyta, kad tikslingai nemonifikuoti neigiamo paviršiaus krūvio KT į NIH3T3 ląsteles patenka nuo kaveolino priklausančiu endocitozės būdu, bei pirmą kartą parodyta, kad įsisotinantis KT kaupimasis sąlygojo viduląstelinį kaveolino-1, kuris yra pagrindinė molekulė, reikalinga membranos įlenkimui ir kaveolino struktūrų formavimui, persiskirstymą ir susikaupimą KT pripildytose vezikulėse.

Taip pat buvo užregistruotas padidėjęs tirtų ląstelių atsparumas cisplatinos poveikiui dėl KT įsisotinamo kaupimosi, o tai yra labai svarbu siekiant toliau plėtoti KT pritaikomumą diagnostikos ir kombinuotos terapijos poreikiams.

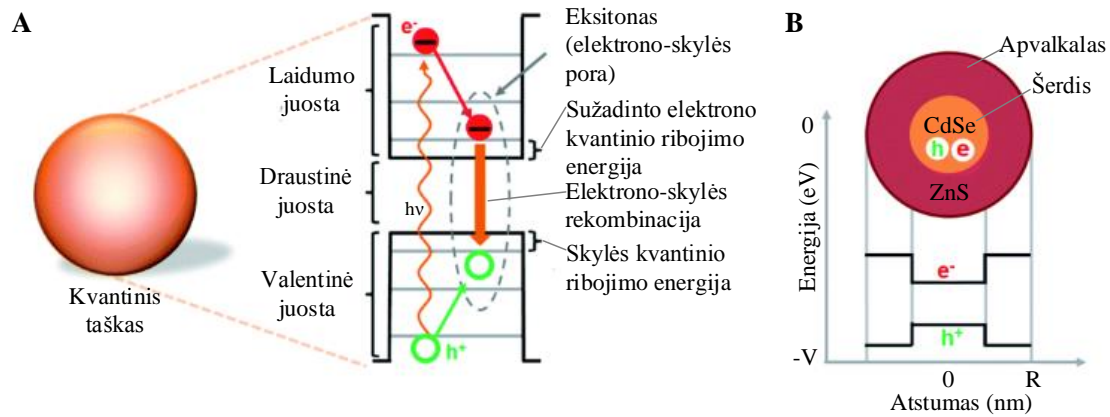
### 3 Tyrimų apžvalga

#### 3.1 Kvantinių taškų optinės savybės

Puslaidininkinėse medžiagose sugėrus fotoną, kurio energija yra didesnė nei puslaidininkio draustinės juostos energija (energinis tarpas), susiformuoja elektrono-skylės pora (eksitonas). Jeigu puslaidininkio nanokristalo skersmuo yra mažesnis (įprastai tai yra keli nanometrai), nei jo eksitono Boro spindulys, tai pasireiškia kvantinis elektronų ir skylių energijų ribojimo efektas, kai energijos tampa kvantuotos, o jų vertės tiesiogiai priklauso nuo nanokristalo dydžio.<sup>[22]</sup> Kvantiniai taškai dažnai yra apibūdinami kaip „dirbtiniai atomai“, nes jų krūvininkai (elektronai ir skylės) užima diskrečias energijos būsenas, kaip elektronai viename atome. Tai yra tiesioginė krūvininkų kvantinių savybių apribojimo fiziniai nanokristalo matmenimis pasekmė.<sup>[23]</sup> Kai KT dydis mažinamas (įprastai iki mažesnio nei 10 nm), kvantinis apribojimo efektas ima dominuoti. KT fotoluminescencija (FtL) atsiranda, kai sužadintas elektronas relaksuoja į pagrindinę būseną ir rekombinuoja su skyle, išspinduliuodamas elektromagnetinę energiją (kaip parodyta 2 pav. A) siaura ir simetrine dažnių juosta, kurios spektras gali būti iš srities nuo ultravioletinės iki artimosios infraraudonosios spinduliuotės.<sup>[24]</sup> Dėl plataus, apimančio ultravioletinę sritį, sugerties spektro bei siauro ir simetrinio luminescencijos spektro KT luminescencijos juostai būdingas didelis Stokso poslinkis.<sup>[25]</sup> Įvairūs KT yra sintetinami iš keleto skirtingų medžiagų, kontroliuojant nanodalelių dydžius ir taip sukuriant KT su skirtingomis FtL juostomis. FtL bangos ilgis priklauso nuo KT dydžio (kadmio selenido ir cinko sulfido (CdSe/ZnS) KT skersmuo būna 2-5 nm),<sup>[26]</sup> t.y., kuo didesnis KT, tuo arčiau raudonosios spektro ribos bus jo FtL spalva.

Kai nėra kvantinio ribojimo, medžiagoje fotonas gali sužadinti tik vieną elektroną ir permesti jį per draustinę juostą, taip sukurdamas tik vieną eksitoną, o energijos perteklius virsta šiluma. Kvantiniuose taškuose gali būti sukurta daug eksitonų vienu metu (*angl. multiple exciton generation*), todėl CdSe/ZnS

nanokristalų atveju pasiekiamas didelis (65-85 proc.)<sup>[27,28]</sup> fotoluminescencijos kvantinis našumas.<sup>[29]</sup>



2 pav. Kvantinių taškų elektronų būsenos: A – elektrono-skylės rekombinacijos iliustracija; B – energijos lygmenų diagrama. Adaptuota pagal T.R. Pisanic et al.<sup>[30]</sup>

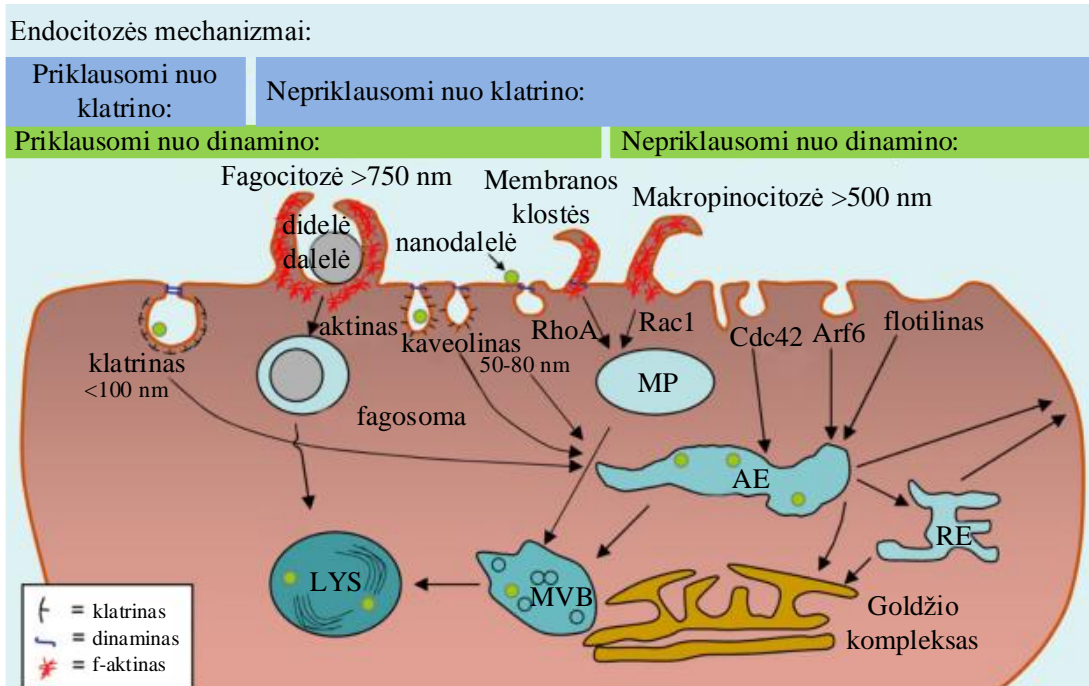
KT šerdies-apvaskalo struktūros sukuria kvantinio apribojimo sąlygas, priklausančias nuo šerdies ir apvaskalo medžiagų. Pavyzdžiui, kai apvaskalo medžiagos energinis tarpas yra didesnis negu šerdies medžiagos (tokie KT dar vadinami I tipo), tuomet elektrono-skylės poros lokalizacija yra apribota šerdies (kaip parodyta 2 pav. B), o tokių KT FtL našumas yra didesnis negu KT, kurių apvaskalo energijos tarpas yra mažesnis negu šerdies (II tipo KT). Tokių KT elektronai yra apriboti apvaskale, o skylės – šerdyje, todėl, kad vyktų FtL, krūviai turi pereiti šerdies-apvaskalo sandūrą.<sup>[31]</sup> Papildomi krūviai (elektronai ar skylės) tiek ant KT paviršiaus, tiek ir juos supančioje aplinkoje daro stiprų poveikį nanokristalo sugerčiai ir FtL.<sup>[32]</sup> Jie gali sąlygoti KT FtL gesimą dėl Ožė rekombinacijos (bepindulinės energijos pernašos trečiam krūvininkui).<sup>[33]</sup> Pilnas gesinimas gali būti stebimas, kai papildomi krūviai yra pačioje KT šerdyje, ir yra didelis erdvinis krūvio ir eksitono būsenų persidengimas. Dalinis gesinimas vyksta dėl krūvių, esančių KT paviršiuje, nes tuomet krūvio ir eksitono erdvinis persidengimas mažesnis.<sup>[33]</sup> Priartėjus aktyviems oksidacijos-redukcijos kompleksams prie KT, jie gali gesinti KT FtL dėl išorinių elektronų (ir skylių) perdavimo, užpildant arba KT šerdies,

arba KT paviršinius lygmenis.<sup>[34]</sup> KT pasižymi sąlyginai ilga fotoluminescencijos gyvavimo trukme (įprastai nuo <5 iki 100 ns, CdSe/ZnS KT vidutinė fotoluminescencijos gyvavimo trukmė  $\tau_{1/e}$  yra ~10 ns).<sup>[25]</sup> Dėl to KT fotoluminescencijos gesimo signalus, naudojant pasirinktus laiko intervalus (*angl. time gate*) nėra sudėtinga atskirti nuo ląstelių autofluorescencijos ir išsklaidytos žadinančios spinduliuotės.<sup>[35]</sup> Tačiau sudėtingas nuo dydžio, paviršiaus sąveikų, bangos ilgio priklausantis multieksponentinis KT fotoluminescencijos gesimas<sup>[36,37]</sup> apsunkina fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo rezultatų interpretavimą.

### 3.2 Nanodalelių patekimo į ląsteles keliai

Ląstelės vidinė terpė nuo išorinės aplinkos yra atskirta plazmine membrana – elastingu lipidiniu dvisluoksniu, sudarytu iš fosfolipidų, glikolipidų su angliavandenių grandinėmis išorinėje membranos pusėje, cholesterolio ir membraninių baltymų. Tam, kad nanodalelės patektų į ląstelę ir pasiektų ląstelių viduje esančias tikslias organelas, pirmiausia jos turi įveikti plazminės membranos barjerą. Nanodalelės gali patekti į ląstelę tiesiogiai sąveikaudamos su membraniniais receptoriais (jeigu nanodalelės yra padengtos ligandais, kurie yra specifiški ląstelės receptoriams), susisiejant su lipidiniu dvisluoksniu hidrofobinių ar elektrostatiinių sąveikų dėka bei kartu su kitomis ląstelės išorėje esančiomis medžiagomis. Šios sąveikos su plazmine membrana pobūdis apsprendžia tolesnius patekimo į ląstelę mechanizmus.<sup>[38]</sup> Jau yra žinoma nemažai skirtingais mechanizmais veikiančių ir molekulinio lygmeniu griežtai valdomų endocitozės kelių (3 pav.), kuriuos ląstelės išnaudoja įvairių krovinių transportui iš aplinkos į skirtingas viduląstelines vietas.<sup>[39]</sup> Endocitozė – aktyvaus, energijos reikalaujančio transporto forma,<sup>[40]</sup> kuri, atsižvelgiant į įsisavinamo objekto fizinį būvį, yra skirstoma į dvi pagrindines rūšis: (i) fagocitozę, kuri skirta didelių (< 0,5  $\mu\text{m}$ ), kietų ar panašių į kietus kūnų, kaip bakterijos ar kolageno pluoštas, pernašai į ląstelės vidų, ir (ii) pinocitozę, – skysčių, dažnai turinčių išsimaišiusių dalelių, pernašai. Detaliau pinocitozės procesai yra skirstomi pagal mechanizmus, skirtus įsisavinti didelius tūrius

(pvz., makropinocitozė ir plazminės membranos klostės) ir mažus tūrius. Pastarieji toliau skirstomi pagal tai, kokie baltymai dalyvauja formuojantis endocitotinėms įduboms ir vezikulėms bei jas „nukerpant“ nuo plazminės membranos.<sup>[41]</sup>



3 pav. Endocitotinių mechanizmų ir viduląstelinio transporto modelis. Nanodalelės (žali skrituliai) ir kitos medžiagos yra endocituojamos ir uždaromos ankstyvosiose endosomose (AE), fagosomose arba makropinosomose (MP). Pūslelės su nanodalelėmis bręsta degradacijos kelyje ir tampa vėlyvosiomis endosomomis / multivezikuliniais kūneliais (MVB), kurie ilgainiui susilieja su lizosomomis (LYS). Nanodalelės iš AE per rūšiavimo-perdirbimo endosomas (RE) gali būti sugrąžinamos į ląstelės paviršių. Terpės pH palaipsniui mažėja, pradedant nuo AE (pH 5.9-6.0), MVB (pH 5.5-6.0) iki lizosomų (pH 4.0-5.5), kuriose yra proteazių ir kitų fermentų, galinčių suardyti daugelį biologinių medžiagų.

Adaptuota pagal T.G. Iversen et al.<sup>[19]</sup> ir F. Zhao et al.<sup>[42]</sup>

Nuo klatrino priklausanti endocitozė yra iki šiol geriausiai iširtas mechanizmas, ir ilgai buvo manoma, kad tai yra vienintelis endocitozės mechanizmas greta fagocitozės ir makropinocitozės. Tačiau per du pastaruosius dešimtmečius buvo atrasti papildomi, nuo klatrino nepriklausantys

mechanizmai.<sup>[43]</sup> Jie apima nuo dinamino priklausančius ir nepriklausančius endocitozės mechanizmus. Prie pirmųjų priskiriami nuo RhoA – ląstelės citoskeleto dinamikos reguliavimo dalyvaujančios GTF-azės, ir nuo kaveolino/lipidinių plaustelių priklausantys keliai.<sup>[44]</sup> Prie antrųjų – nuo Cdc42 – ląstelių dalinimosi ciklo reguliavimo dalyvaujančios GTF-azės, ir nuo Arf6 – plazminės membranos endocitozės ir transmembraninių baltymų pernašos metu ADF prijungime prie baltymų dalyvaujančio faktoriaus, priklausantys keliai. Drauge jie buvo pavadinti CLIC/GEEC<sup>2</sup> keliu.<sup>[45]</sup> Tyrimai atlikti naudojant įvairius žymeklius parodė, kad patekusios į ląsteles nanodalelės dažniausiai randamos endosomose ir/ar lizosomose (3 pav.), t.y., endocituoti KT lokalizuojasi kartu su endosomų ir lizosomų žymekliais, pvz., EAA1 (ankstyvųjų endosomų), *Lysotracker* (rūgštinių organelių/vėlyvųjų endosomų) ir CD63 (lizosomų).<sup>[46]</sup> Ankstyvoji endosoma (AE) yra viduląstelinė struktūra susiformavusi kaip „rūšiavimo stotis“, kuri yra bendra visoms patekusioms į vidų medžiagoms (kai kuriose publikacijose<sup>[39,47]</sup> teigiama, kad ir makropinocitozės keliu patekusios medžiagos yra nukreipiamos į AE). Joje, priklausomai nuo patekimo kelio, yra apsprendžiama tolesnė per plazminę membraną pernešto krovinio lemtis, nukreipiant jį degradavimui, pernašai į kitus citoplazmos skyrius arba perdirbimui ir grąžinimui už ląstelės ribų.<sup>[48]</sup> Krovinio lemtis yra labai svarbi siekiant sėkmingai pristatyti veikliąsias medžiagas iki jų viduląstelinio taikinio. Ankstyvosios endosomos dažniausiai bręsta virsdamos vis labiau rūgštėjančiomis vezikulėmis, kurioms susiliejus su lizosomomis, fermentinės reakcijos gali lemti visišką endocituotos medžiagos suardymą.<sup>[49]</sup>

Kadangi skirtingo dydžio, sudėties ar paviršiaus dangalo nanodalelės patenka į ląsteles skirtingais keliais (plačiau žr. 3.3 skyriuje), nanodalelių patekimo į ląstelę kelio kontrolė yra labai svarbi, siekiant paveikti nanodalelių

---

<sup>2</sup> CLIC – nuo kladrino nepriklausomas nešiklis (angl. clathrin-independent carrier); GEEC – transmembraniniu glikozilfosfatidilinozitolio baltymu praturtintos endocitotinės vezikulės (angl. glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein-enriched early endocytic compartment)

viduląstelinių pasiskirstymą, lemtį ir biologinį atsaką, t.y., procesus, kurių tarpusavio sąsajos iki šiol nėra išsamiai ištirtos. Naujausi tyrimai rodo, kad endocitozės procesai ne tik atlieka maistinių medžiagų ir su membrana susisėjusių molekulių pernašos į ląstelę funkcijas, bet ir per endocitozėje dalyvaujančius baltymus reguliuoja medžiagų rūšiavimo ir apykaitos, ląstelės ciklo, dalinimosi ir kitų signalų inicijavimą bei perdavimą nuo membranos per endosomas iki kitų viduląstelinių organelių.<sup>[50]</sup> Svarbu suprasti, kaip nanodalelių patekimo į ląstelę mechanizmas moduliuoja signalų perdavimą ir tolesnę ląstelės molekulinį atsaką.<sup>[51]</sup> Ši informacija pasitarnautų kuriant tokius nanonešiklius, kurių dėka vaistai ne tik patektų į reikiamas ląsteles, bet ir reikiamu keliu pasiektų norimas viduląstelines organeles.

### **3.3 Nanodalelių fizikocheminių savybių įtaka jų kaupimuisi ląstelėse**

Nanodalelių savybės – dydis, krūvis ir paviršiaus dangalas, yra labai svarbios, nes apsprendžia biologines nanodalelių sąveikas.<sup>[42,52,53]</sup> Šių savybių pokyčiai keičia nanodalelių kaupimąsi, pasiskirstymą ir tolesnę lemtį ląstelėse.<sup>[12,13]</sup> Nanodalelių ir ląstelių sąveikos supratimas yra labai vertingas nanomedicinos raidai, bei nanosaugos požiūriu.<sup>[52]</sup> Todėl labai svarbu nustatyti svarbiausias tokios sąveikos pokyčių priežastis bei įvertinti nanodalelių kaupimosi spartą ir pasiskirstymą ląstelėse, nes tai yra pagrindiniai veiksniai, apsprendžiantys nanodalelių naudojimo galimybes ateities nanomedicininuose klinikiniuose taikymuose.<sup>[12]</sup>

#### **3.3.1 *Nanodalelių dydis ir forma***

Kaupimasis ląstelėse labai priklauso nuo nanodalelių dydžio, kuris sąlygoja ir patekimo spartą, viduląstelinių pasiskirstymą, ir kelią, kuriuo nanodalelės patenka į ląsteles.<sup>[54]</sup> Nanodalelės, kurių skersmuo yra apie 50 nm, į ląstelių vidų patenka sparčiau,<sup>[55]</sup> negu mažesnės ir didesnės nanodalelės, nes manoma, jog ir mažesnės, ir didesnės nei ~ 50 nm skersmens nanodalelės apgaubti išorine ląstelės membrana yra sudėtingiau.<sup>[56]</sup> Buvo parodyta, kad ląstelėms kaupiant mažesnes nei 200 nm skersmens nanodaleles formuojasi klitrino

įdubos, o nanodalelių dydžiui didėjant pradeda reikštis nuo kaveolino priklausantis patekimo į ląsteles mechanizmas, kuris ima dominuoti, kai nanodalelių dydis pasiekia 500 nm.<sup>[57]</sup> Nanodalelių hidrodinaminis spindulys, t.y., dydis, kuris apima nanokristalą su dangalu ir adsorbuotų skysčio, kuriame yra nanodalelė, molekulių sluoksnį, taip pat veikia ir viduląstelinį jų pasiskirstymą.<sup>[58]</sup> Po patekimo į citozolį (padengus KT paviršių atitinkamais peptidais, ar suardžius sukaupusias KT vezikules) didesni KT (skersmuo ~ 5 nm) pasiskirsto ir išlieka citoplazmoje, o mažesni (skersmuo ~ 2 nm) gali kauptis branduolyje.<sup>[59-61]</sup>

Nanodalelių geometrija taip pat veikia patekimo į ląsteles procesą bei mechanizmą. Kai kurie tyrimai atskleidžia, kad nanodalelių kaupimosi sparta priklauso nuo dalelių matmenų proporcijos: patekimas į ląsteles lėtėja, kai didėja ilgio ir skersmens santykis, o kai šis santykis yra mažas, nanodalelės sparčiau patenka į ląsteles.<sup>[62]</sup> Tačiau yra ir tokių tyrimų, kuriais pademonstruota, kad pailgos nanodalelės yra įsisavinamos greičiau negu tokios pačios sudėties sferinės dalelės,<sup>[63,64]</sup> pvz., silicio nanodalelės, kurių ilgio ir skersmens santykis yra 3, patenka į ląsteles apie keturis kartus sparčiau nei tokio pat tūrio sferinės dalelės.<sup>[65]</sup> Šie prieštaringi rezultatai netiesiogiai patvirtina tyrimų rezultatus, kad nanodalelių forma nėra svarbiausias iš veiksnių, reguliuojančių jų kaupimąsi ląstelėse.<sup>[66]</sup>

### **3.3.2 Nanodalelių paviršiaus krūvis**

Daugelyje *in vitro* ir *in vivo* tyrimų yra akcentuojama, kad nanodalelių krūvis yra labai svarbus jų kaupimosi ląstelėse veiksnys.<sup>[67,68]</sup> Ir teigiamo, ir neigiamo krūvio nanodalelės patenka į ląsteles nuo dinamino priklausančiais keliais bei makropinocitozės būdu,<sup>[69]</sup> tačiau teigiamo krūvio nanodalelės patenka su klatrinu susijusių mechanizmų dėka, o neigiamo krūvio – per nuo klatrino nepriklausančius mechanizmus.<sup>[70]</sup> Teigiamo krūvio nanodalelės, pvz., KT,<sup>[68]</sup> silicio nanovamzdeliai,<sup>[71]</sup> aukso<sup>[72]</sup> ar geležies oksido nanodalelės<sup>[73]</sup> patenka į ląsteles sparčiau, lyginant su neutralaus ar neigiamo paviršiaus krūvio dalelėmis.<sup>[74,75]</sup> Pastaraisiais metais buvo pademonstruota, kad



nanodalelių patekimas į ląsteles vyksta dėl elektrostatinės sąveikos, kuri paskatina nanodalelių adheziją prie neigiamą krūvį turinčio ląstelės išorinės membranos paviršiaus.<sup>[76,77]</sup> Sąveikos su membrana metu nanodalelės veikia ir pačios membranos struktūrą, pvz., nedidelių nanodalelių (~2 nm) teigiamas paviršiaus krūvis gali sutrikdyti membranos potencialą ir sąlygoti  $\text{Ca}^{2+}$  įtekėjimą į ląsteles bei slopinti ląstelių dauginimąsi,<sup>[78]</sup> o didesnės (4–20 nm) nanodalelės sukelia lipidinio dvisluoksnio persitvarkymą: neigiamo paviršiaus krūvio nanodalelių prilipimas prie lipidinio dvisluoksnio sukelia vietinį membranos virsmą į gelio fazę (sukietėjimą), o teigiamo paviršiaus krūvio nanodalelės sukelia membranos suskystėjimą.<sup>[79]</sup> Viduląstelinio nanodalelių transporto tyrimai parodė, kad teigiamo paviršiaus krūvio nanodalelės gali ištrūkti iš lizosomų ir kauptis aplink branduolį, o neigiamos ir neutralios dalelės pasilieka lizosomose.<sup>[80]</sup> Galimas šio reiškinio paaiškinimas yra tas, kad susikaupusios endosomoje teigiamo paviršiaus krūvio nanodalelės iššaukia chloro anijonų įtekėjimą, kuris sąlygoja osmosinį brinkimą (apie 20 proc.) ir fizinį endosomos pratrūkimą, vadinamą „protonų kempinės“ (*angl. proton-sponge*) efektu.<sup>[67]</sup> Tačiau vien teigiamo krūvio sukeltas endosomų brinkimas dažnai nėra pakankamas, kad nanodalelės būtų išleistos į citozolį. Dėl to kuriamos skirtingos priemonės, padidinančios endosomų brinkimą ir/ar porų jų membranoje susidarymą, pvz., nuo pH, fermentų ar temperatūros priklausomi polimeriniai nanodalelių dangalai bei fotoindukuotas fizinis endosomų membranų suardymas, kurios įgalina veikliosiomis medžiagomis pripildytų endosomų suardymą ląstelių viduje.<sup>[80]</sup>

Pateikiama ir priešingų tyrimų rezultatų, skelbiančių, kad neigiamo paviršiaus krūvio nanodalelės irgi gali veikti elektrostatinės sąveikos su ląstelės plazmine membrana, t.y., jos gali prilipti prie katijoninių membranos sričių ir dėl aplinkinio neigiamo krūvio membranos domenų stūmos suformuoti klasterius membranos paviršiuje. Šie klasteriai skatina spartesnę anijoninių nanodalelių patekimą į ląsteles nei stebimas teigiamų nanodalelių atveju.<sup>[81-83]</sup> Šie skirtumai tarp įvairių tyrimų rezultatų ir išvadų, tikėtina, yra sąlygoti skirtingų tirtų nanodalelių parametrų ir kitų paviršiaus savybių, bei tiriamų

ląstelių ir jų membranų sudėties įvairovės. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad turinti paviršinį krūvį nanodalelė aplinkoje, kurioje yra biologinių molekulių, yra padengiama baltymų vainiku, sudarytu iš daug skirtingų baltymų. Nanodalelės paviršiaus krūvis turi įtakos susidarančio baltymų vainiko sudėčiai, todėl tyrimai, kuriais siekta nustatyti teigiamų arba neigiamų nanodalelių kaupimąsi, neretai iš tiesų aprašo susidariusio baltymų vainiko įtaką nanodalelių patekimui į ląsteles ir jau patekusių nanodalelių lemčiai.<sup>[53]</sup>

Nanodalelių citotoksiškumą gali paveikti ir krūvio tankis, ir pats krūvis.<sup>[84]</sup> Įkrautos nanodalelės, pvz., aukso, yra žymiai citotoksiškesnės negu jų neutralios formos,<sup>[85]</sup> o teigiamo krūvio ZnO, silicio, silicio-titano ar aukso nanodalelių citotoksinis poveikis nefagocituojančioms ląstelėms yra didesnis, nei panašaus dydžio neigiamo krūvio nanodalelių.<sup>[86-90]</sup> Kitų tyrimų rezultatai parodė, kad ir teigiamos, ir neigiamos nanodalelės yra genotoksiškos. Vienodos šerdies ir dangalo sudėties 3 nm dydžio neigiamo krūvio KT (padengti merkaptopropionine rūgštimi, MPA) yra mažiau toksiški lyginant su tokio pat dydžio ir sudėties teigiamo krūvio KT (padengtais cisteaminu, CYST).<sup>[91]</sup> CYST-KT atveju buvo nustatyta, kad jie sukelia citotoksiškumą ir sąlygoja DNR grandinės trūkius. Tačiau MPA-KT, netgi nestebint akivaizdaus citotoksiškumo požymių ir nesužadinus reaktyvaus deguonies formų, taip pat sukėlė DNR pažaidas.

Nanodalelių pasiskirstymo *in vivo* tyrimai parodė, kad nepageidaujamas nanodalelių kaupimasis kepenyse buvo ženkliai intensyvesnis, jei jų paviršiaus krūvis, teigiamas ar neigiamas, buvo didesnis. To priežastimi yra makrofagų (Kupferio ląstelių) aktyviai vykdoma fagocitozė kepenyse.<sup>[92]</sup> Tačiau santykinai nedidelis kaupimasis kepenyse ir ženklus kaupimasis vėžinėse ląstelėse buvo stebimas tų nanodalelių atveju, kurių paviršius turėjo santykinai nedidelį neigiamą krūvį. Šie pastebėjimai leido postuliuoti, kad neigiamo krūvio nanodalelės dėl mažesnio pašalinimo per retikuloendotelinę sistemą aktyvumo yra labiau tinkamos vaistų pernašai į navikinius darinius.<sup>[93,94]</sup> Taip pat nemažai tyrimų parodė, kad įvairios nanodalelės, pvz., sidabro, aukso,

silicio, kvantiniai taškai, kurių paviršius padengtas cviterjoniniu polimeru, išvengia retikuloendotelinės sistemos ir ilgiau cirkuliuoja kraujyje.<sup>[95]</sup>

### **3.3.3 Nanodalelių paviršius ir baltymų vainikas**

Kadangi nanodalelių paviršius tiesiogiai sąveikauja su ląstelės biomolekulėmis, jo cheminė sudėtis taip pat veikia nanodalelių kaupimosi spartą, viduląstelinį kiekį ir netgi tai, koku keliu nanodalelės patenka į ląsteles.<sup>[52,96]</sup> Paviršiaus savybės sąlygoja biomolekulių (pvz., baltymų), kurios bus adsorbuotos ant nanodalelės dėl elektrostatiinių, hidrofobinių/hidrofilinių sąveikų, kiekį ir tipą. Adsorbuoto bio-sluoksnio cheminė sudėtis ir storis toliau skatins arba stabdys nanodalelių adheziją prie ląstelių membranų, taip paveikdami jų kaupimąsi ląstelėse.<sup>[97]</sup> Daugelis nanodalelių, pvz., aukso nanovamzdeliai<sup>[98]</sup> ir dalelės,<sup>[99]</sup> kvantiniai taškai,<sup>[100]</sup> magnetinės geležies oksido nanodalelės,<sup>[101]</sup> ar polimerinės nanodalelės,<sup>[102]</sup> yra padengiamos polietilenglikoliu (PEG) ar jo analogais, kad nanodalelės taptų inertiškesnės biologinėje terpėje, ir taip būtų prailgintas jų cirkuliacijos pusamžis. PEG polimerinės grandinės nanodalelių paviršiuje suformuoja hidrofilinio sterinio barjero „debesį“, kurio lankstumas, elektrinis neutralumas ir neaktyvios paviršiaus grupės padeda išvengti sąveikos su terpės baltymais ir makrofagais.<sup>[103]</sup> Baltymus atstumianti (t.y., krūvį ekranuojanti ir hidrofilinį paviršių formuojanti) PEG dangalo savybė priklauso ne tik nuo PEG polimero ilgio ir tankio, bet ir nuo konfigūracijos aplinkoje. Tačiau nėra vieningos nuomonės, koks turėtų būti PEG ilgis ir tankis, siekiant optimalaus ekranavimo efekto. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad nanodalelių padengimas PEG labai sumažina jų sąveiką su ląstelių membrana ir nespecifinį kaupimąsi ląstelėse.<sup>[69]</sup>

Tyrimai parodė, kad vienas pagrindinių veiksnių, keičiančių nanodalelių elgseną biologinėje aplinkoje ir nanodalelių kaupimąsi ląstelėse, yra ilgalaikis jų paviršiuje susiformavęs baltymų vainikas.<sup>[104]</sup> Sudėtingi, kintantys laike ir kiekvienai nanodalelei saviti baltymų vainikai, kuriuos gali sudaryti beveik 300 skirtingų baltymų, susiformuoja nanodalelės paviršiuje labai greitai (<30 s).<sup>[105]</sup>

Galimi keli šio vainiko tipai. „Kietas“ baltymų vainikas yra apibūdinamas kaip patvarus stabilizuojantis baltymų dangalas, tiesiogiai sąveikaujantis su nanodalele. „Minkštas“ nepastovus vainikas formuojasi iš baltymų, kurie yra giminingi „kietame“ vainike esantiems baltymams.<sup>[106]</sup> Baltymų vainiko sudėtis priklauso ir nuo nanodalelės paviršiaus krūvio ir dydžio,<sup>[52]</sup> bei nuo aplinkoje esančių baltymų koncentracijos.<sup>[104]</sup> Baltymų vainikas kinta laike, ilgainiui tik ant nanodalelės paviršiaus adsorbuoti baltymai suformuoja negrįžtamai prisijungusį baltymų vainiką.<sup>[107]</sup> Tačiau buvo nustatyta, kad nekintant aplinkai, nekinta ir vainiko sudėtis, bet laike keičiasi tų pačių baltymų bendras kiekis ir baltymų kiekių tarpusavio santykis.<sup>[105]</sup> Baltymų vainiko sudėtis ženkliai nekinta ir pereinant iš vienos aplinkos į kitą (pavyzdžiui, iš kraujo plazmos į ląstelės citozolį) – išlieka „kietas“ baltymų vainikas, bet prisijungia ir naujų molekulių.<sup>[106,108]</sup> Nemažai tyrimų parodė, kad susiformavęs baltymų vainikas daro įtaką nanodalelių patekimo į ląsteles kelio pokyčiams,<sup>[109]</sup> viduląsteliniam pasiskirstymui<sup>[110]</sup> bei patekimo į ląsteles inicijuojamiems signalams.<sup>[111]</sup>

### **3.3.4 Nanodalelių savybių ir jų sąveikos su ląstelėmis apibendrinimas**

Nors yra atlikta daug tyrimų ląstelių kultūrose ir su eksperimentiniais gyvūnais, siekiant nustatyti sąryšį tarp nanodalelių savybių ir jų patekimo į ląsteles, viduląstelinės pernašos, ląstelių signalų inicijavimo bei nanodalelių toksiškumo,<sup>[12,15-17]</sup> tačiau, dėl tyrimuose naudojamos didelės nanodalelių, ląstelių linijų ir tyrimo metodų įvairovės, gana sudėtinga lyginti įvairių tyrimų rezultatus ir gauti vienareikšmiškas išvadas. Pagrindinius per paskutiniuosius metus atliktų įvairių mokslinių grupių tyrimų rezultatus trumpai apibendrina toliau pateikiamos žinios.

Nanodalelės įprastai patenka į ląsteles receptoriais reguliuojamos endocitozės būdu, patekusios į endosomas, yra pernešamos endosomų brandos keliu ir galiausiai lizosomose degraduojamos. Tačiau aktyvuojamas endocitozės kelias ir nanodalelių lemtis ląstelėje labai priklauso nuo jų paviršiaus savybių,<sup>[52]</sup> o ypač nuo paviršinio krūvio.<sup>[112]</sup> Ant krūvį turinčios

nanodalelės paviršiaus serume ar kitoje biologinėje aplinkoje labai sparčiai susiformuoja įvairių baltymų vainikas.<sup>[52]</sup> Paviršinis krūvis sąlygoja šio susiformavusio baltymų vainiko sudėtį, kuri kinta laike ir skirtingose aplinkose. Kaupimasis ir viduląstelinis nanodalelių pasiskirstymas priklauso ir nuo jų dydžio: bet kokios 2-100 nm skersmens nanodalelės paveikia ląstelės signalų perdavimo procesus, svarbius pagrindinėms ląstelių funkcijoms (įskaitant ir ląstelių žūtį), o 40-50 nm dydžio nanodalelių poveikis didžiausias.<sup>[61]</sup> Trumpuoju laikotarpiu kaupimasis priklauso nuo ląstelių tipo ir jų ciklo fazės.<sup>[113]</sup> Nanodalelių toksiškumas priklauso nuo naudojamos koncentracijos ir nuo atsiskyrusių jonų koncentracijos, taip pat nuo sukkelto oksidacinio streso ir jo aktyvuotų tolimesnių signalų kaskadų tipų.<sup>[111,114]</sup>

### **3.4 Kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse tyrimų apžvalga**

Per pastaruosius dvidešimt metų KT biomedicininiam taikymams buvo naudojami kaip išskirtiniu fotostabilumu pasižymintys įvairių spalvų fluorescenciniai žymekliai. Susidomėjimas KT išaugo dėl galimo dvejo jų pritaikymo diagnostikos ir gydymo tikslams nanomedicinoje,<sup>[7]</sup> panaudojant selektyviam vaizdinimui ir vaistų pernašai<sup>[8]</sup> bei paverčiant eksperimentine platforma NVP procesų tyrimams. Didelė pažanga pasiekta naudojant KT *in vitro* tyrimuose, fiksuotų ląstelių ir audinių žymėjimui arba selektyviam plazminių membranų baltymų vaizdinimui.<sup>[115,116]</sup> Tačiau nepasiekta pakankama pažanga kuriant KT žymeklius, kuriais būtų galima atlikti vaizdinimą gyvoje ląstelėse.<sup>[117,118]</sup> Metodai, šiuo metu taikomi KT ir kitų nanodalelių patekimui į gyvas ląsteles užtikrinti, gali būti suskirstyti į tris strategijas:<sup>[119]</sup> (i) pasyvus pateikimas, kuris priklauso nuo fizikocheminių pačių KT savybių (dangalo, paviršiaus struktūros ir krūvio); (ii) paskatintas pateikimas, kuris dažniausiai atliekamas modifikuojant KT paviršių tam tikromis molekulėmis; (iii) tiesioginis pateikimas, kuris užtikrinamas fizikiniais metodais, pvz., mikroinjekcija ar elektroporacija. KT ir kitų nanodalelių kaupimasis (pasyvus ar paskatintas) ląstelėse gali vykti įvairių endocitotinių mechanizmų,<sup>[18]</sup> pasyvios pernašos ar adsorbcinės endocitozės dėka.<sup>[120]</sup>

Literatūroje pateikiamų rezultatų analizė parodė, kad KT pateikimas į ląsteles, ypač patekimo kelias, trukmė ir viduląstelinis pasiskirstymas, yra apibūdinamas labai skirtingai. CdSe/ZnS kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse tyrimų, kuriuose buvo analizuojama kaupimosi dinamika ir viduląstelinis pasiskirstymas, rezultatų apibendrinimas yra pateikiamas 3 lentelėje.

3 lentelė. CdSe/ZnS kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse, 37°C temperatūroje, tyrimų rezultatų apibendrinimas

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>
0.2	27 nm / 655 nm	[-]	Žmogaus prostatos vėžio ląstelės (PC3) ir iš jų klonuotos ląstelės	f	5 val.	24 val.	-/+	Užregistruotas vezikulinių struktūrų pasiskirstymas ląstelės citoplazmoje ir didesnė jų koncentracija aplink branduolį. KT sukaupusios vezikulės, inkubuojant terpėje su baltymais priskirtos lizosomoms.	Neidentifikuotas, postuluojama, kad nuo priklausantis nuo kladrino	[121]
20	15-25 nm / 605 nm	PEG- COOH [-]  PEG-NH2 [+]	Žmogaus hipofizės (GH4C1 bei AtT20) ir kasos (AtT20) vėžinės ląstelės	f	10 min.	1 val.	+	Užregistruotos granulinės fotoluminescuojančios struktūros pasiskirsčiusios citoplazmoje. Teigiamo paviršiaus krūvio KT į ląstelės pateko ženkliai greičiau nei neigiamo. AtT20 ląstelėse pastebėtas ženkliai mažesnis susikaupimas nei kitose tirtose ląstelių linijose.	Netirtas	[68]

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>
10	Šerdis dydis: 3-5 nm / 542- 592 nm	DL- cisteinas [-]	Žmogaus monocitai (THP-1) ir epitelio ląstelės (HEp- 2)	f	10 min.	1 val.	+	Pasiskirstymas ląstelėse priklauso nuo ląstelių linijos ir KT dydžio. 3 nm dydžio KT buvo užregistruoti THP-1 citoplazmoje ir branduolyje; HEp-2 – tik citoplazmoje. Didėjant KT, jų patekimas į ląsteles silpnėjo, o didžiausi (5 nm) buvo užregistruoti tik ant THP-1 ląstelių membranų, HEp-2 ląstelėse visai nebuvo užregistruoti.	Netirtas	[59]
10	Dydis nepateikta s / 520 nm	Konju- guoti su avies serumo albumino V frakcija [neįvar- dintas]	Pelės T limfomos ląstelės (EL-4)	f	30 min.	24 val.	+	Užregistruotas prilipimas prie membranos (per 15 min) ir po to pasiskirstymas citoplazmoje.	Netirtas	[122]



<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>
40	525- 30 nm / 545 nm	PEG- COOH [-] PEG-NH <sub>2</sub> [+]	Pelės makrofagų ląstelės (J774.A1)	g	30 min.	2 val.	+	Po 1 val. inkubacijos užregistruota abiejų tirtų KT ir ankstyvųjų endosomų, pasiskirsčiusių citoplazmoje, kolokalizacija, po 2 val. kolokalizacija su lizosomomis ir mitochondrijomis.	Netirtas	[123]
1-3- 10	~4 nm / 591 nm	Tiolo ligandas D-penicil- aminas [+-]	Žmogaus gimdos kalelio vėžinės ląstelės (HeLa)	g	3 min. (kai KT koncen- tracija 10 nM)	1 val.	-	Užregistruoti KT buvo ant membranos, o ląstelės viduje buvo susitelkę aplink branduolį. Susikaupimas taip pat priklauso nuo KT koncentracijos, kuriai mažėjant vis mažiau KT yra užregistruojama ląstelės viduje.	Priklausantis nuo klatrino	[124]
20	45 nm (PEG), 20 nm (NH <sub>2</sub> ), ir 18 nm (COOH)./ 655 nm	PEG [0] PEG- COOH [-] PEG-NH <sub>2</sub> [+]	Žmogaus epidermio keranocitai (HEK)	g	24 val.	24 val.	+	Visi tirti KT buvo užregistruoti ląstelių viduje susitelkę prie branduolio. Neigiamo paviršiaus krūvio KT (kiti nebuvo tirti) tarp 6 ir 24 val. lokalizavosi kartu su vėlyvosiomis endosomomis ir lizosomomis.	Priklauso nuo lipidinių plaustelių ir galimai yra atpažįstamas mažo tankio lipoproteinų receptorius	[125]

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>
0.8	20-30 nm / 655 nm	PEG [0]  PEG-COOH [-]	Žmogaus krūties epitelio vėžinės (MCF-7) ir nevēžinės (MCF-10) ląstelės	f	1 val.	40 val.	+	Užregistruotos neigiamo paviršiaus krūvio KT sankaupos prie branduolio bei KT sukaupusių vezikulių lokalizacija kartu su lizosomomis. Neutralaus paviršiaus krūvio KT ląstelėse nebuvo užregistruoti.	Neidentifikuotas, postuluojuama, kad priklausantis nuo klitrino	[126]
10	20-30 nm / 655 nm	KT konjuguoti su G8 molekulinis nešiklis [neįvardintas]	Žmogaus gimdos kaklelio vėžinės ląstelės (HeLa)	g	15 min.	24 val.	+	Visi tirti KT po 24 val. inkubavimo buvo užregistruoti ląstelių viduje susitelkę prie branduolio.	Makropinocitozė	[127]

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
10–80	20-30 nm / 529 nm (COOH) / 630 nm (NH <sub>2</sub> )	PEG-COOH [-] PEG-NH <sub>2</sub> [+]	Žmogaus kepenų vėžio ląstelės (HepG2)	g	Įsisotina po 15 val. (40 nM)	24 val.	+	Kuo didesnė visų tirtų KT koncentracija, tuo spartesnis KT kaupimasis ląstelėse, tačiau neigiamo paviršiaus krūvio KT pateko į ląsteles greičiau, esant mažesnei jų koncentracijai.  Po 24 val. užregistruota KT lokalizacija kartu su lizosomomis.	Netirtas	[114]
0.2	27 nm / 655 nm	[-]	Žmogaus prostatos vėžio ląstelės (PC3) ir iš jų klonuotos ląstelės	f	5 val.	24 val.	-/+	Užregistruotas vezikulinių struktūrų pasiskirstymas ląstelės citoplazmoje ir didesnė jų koncentracija aplink branduolį. KT sukaupusios vezikulės, inkubuojant terpėje su baltymais priskirtos lizosomoms.	Neidentifikuotas, postuluojuama, kad nuo priklausantis nuo klatrino	[121]

A – naudota KT koncentracija (nM); B – KT hidrodinaminis spindulys / FtL bangos ilgis ( $\lambda$ ); C – KT paviršiaus krūvis fiziologinėje aplinkoje „[+]“ – teigiamas, „[-]“ – neigiamas, „[0]“ – neutralus; „[+-]“ – cviterjoninis; D – ląstelių linija; E – ląstelių būseną registravimo metu „f“ – fiksuotos, „g“ – gyvos; F – inkubavimo trukmė, po kurios KT užregistruoti ląstelės viduje; G – KT kaupimosi registravimo bendra trukmė; H – inkubavimo terpės sudėtis (su baltymais „+“, be baltymų „-“); I – stebėtas viduląstelinis KT pasiskirstymas; J – patekimo kelias; K – literatūros šaltinis

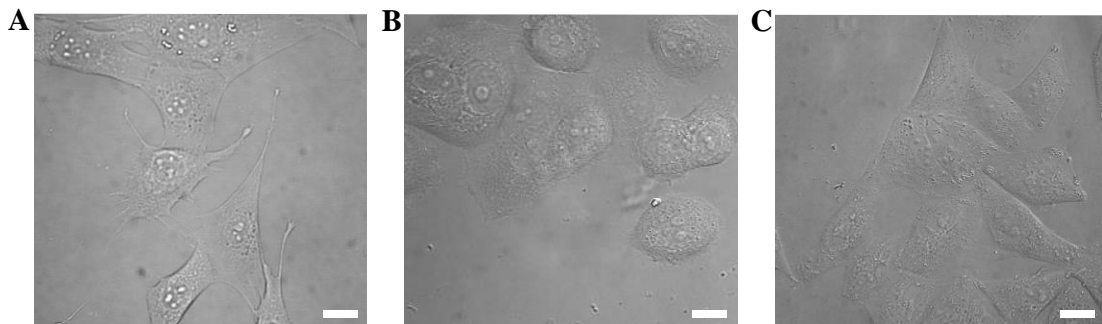
Pirmosios publikacijos apie KT kaupimąsi ląstelėse paskelbtos daugiau nei prieš dešimt metų,<sup>[128,129]</sup> tačiau klausimas, kaip KT patenka į skirtingas ląsteles, dar nėra atsakytas. Rezultatų interpretacija dar sudėtingesnė *in vivo* tyrimuose, kai KT vienu metu kaupiasi skirtinguose ląstelių tipuose.<sup>[121]</sup>

Taip pat akivaizdu, kad iš esamų nanodalelių patekimo į ląsteles tyrimų negalima gauti vienareikšmiškų išvadų, nes nuo vieno konkretaus fizikocheminio nanodalelės parametro (pvz. krūvio) priklausantys kaupimosi ląstelėse dėsniumai, gali būti tiriami tik, kai kiti parametrai yra išlaikomi pastovūs. Todėl šiame darbe aprašomi tyrimai buvo skirti nustatyti KT kaupimosi ląstelėse dėsniumus, pasirenkant vieno tipo tikslingai nemodifikuotus KT, analizuojant jų natūralų kaupimąsi ilgais laiko intervalais ir lyginant kaupimosi skirtumus tarp kelių ląstelių linijų. Daug dėmesio buvo skiriama viduląsteliniam KT pasiskirstymui ir transportavimui skirtingomis inkubacijos sąlygomis (5.1 skyrius) bei pasirinktų KT patekimo į ląsteles molekulinį mechanizmų tyrimams (5.2 skyrius). Taip pat buvo įvertintos kvantinių taškų taikymo nanomedicinoje prielaidos bei suformuluotos rekomendacijos, atkreipiančios dėmesį į svarbius nanodalelių taikymo *in vivo* aspektus (5.3 skyrius).

## 4 Medžiagos ir metodai

### 4.1 Ląstelių linijos

NIH3T3 – imortalizuota fibroblastų ląstelių linija, išskirta iš pelių embriono (vidutinis dalinimosi laikas (VDL) 22 val.,<sup>[130]</sup> 4 pav., A) MCF-7 – žmogaus krūties vėžio linijos ląstelės (VDL 29 val., 4 pav., B)<sup>[130]</sup> ir HepG2 – žmogaus kepenų vėžio ląstelių linija (VDL 34 val., 4 pav., C)<sup>[130]</sup> buvo auginamos monosluoksniais iki ~60 proc. ląstelių tankio Dulbecco modifikuotoje Eagle (DME) terpėje (DMEM, Gibco, JAV) su jaučio embriono serumu (10 proc. v/v) ir 0,1 proc. antibiotikų (1000 U/ml penicilino, 1000 µg/ml streptomicino), inkubatoriuje tiekiant CO<sub>2</sub> (5 proc. v/v) ir palaikant 37 °C temperatūrą.



4 pav. A) NIH3T3, (B) MCF-7 ir (C) HepG2 ląstelių fazinio kontrasto vaizdai; mastelis 10 µm

### 4.2 Ląstelių paruošimo ir inkubacijos su kvantiniais taškais protokolai

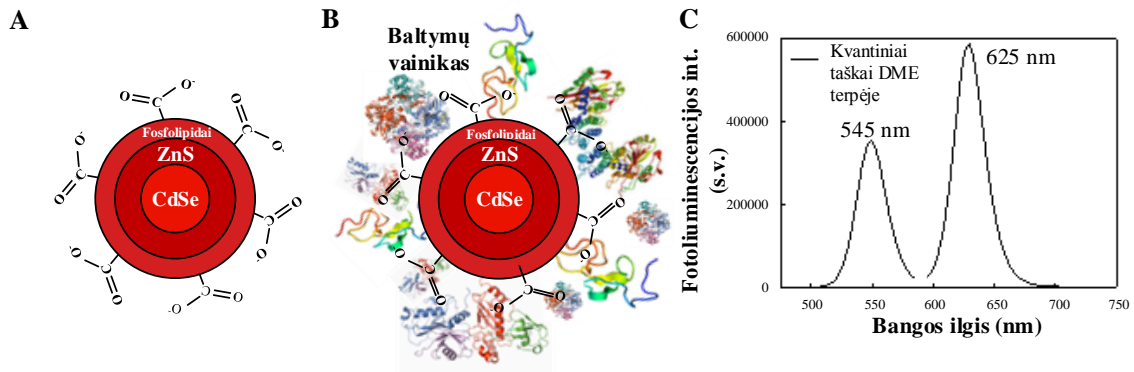
Visiems kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse eksperimentams ląstelės buvo paruošiamos vienodai. Ląstelės iš visų naudotų ląstelių linijų buvo persėjamos į 30 mm Petri lėkšteles ~40 proc. tankiu ir 1 parą laikomos inkubatoriuje (37°C, 5 proc. CO<sub>2</sub>), terpėje be baltymų. Prieš visus eksperimentus ląstelės buvo tris kartus plaunamos fosfatiniu buferiniu druskos tirpalu (PBS), kurio pH 7.4, ir paliekamos dar 2 val. šviežioje augimo terpėje be baltymų, inkubatoriuje. Atliekant eksperimentus, kuriems naudota įprastinė DME terpė su baltymu, šias dvi valandas ląstelės buvo laikomos terpėje su baltymais.

Tuomet pradedama ląstelių inkubacija su kvantiniais taškais, konkrečiam eksperimentui numatytais laiko intervalais ir atitinkamomis sąlygomis. Visuose eksperimentuose inkubacijos terpėje buvo naudojama 10 nM KT koncentracija. Kiekvieno inkubacijos intervalo pabaigoje, prieš pradedant signalų registravimą ar tolimesnes procedūras, ląstelės visada buvo tris kartus plaunamos augimo terpe be baltymų, siekiant išvengti tolimesnio tik prie ląstelės paviršiaus prilipusių kvantinių taškų patekimo į vidų, bei KT maišymosi ir bendro patekimo su kitomis, vėlesniuose eksperimento etapuose naudojamomis medžiagomis ar kitais kvantiniais taškais.

### **4.3 Naudotos medžiagos**

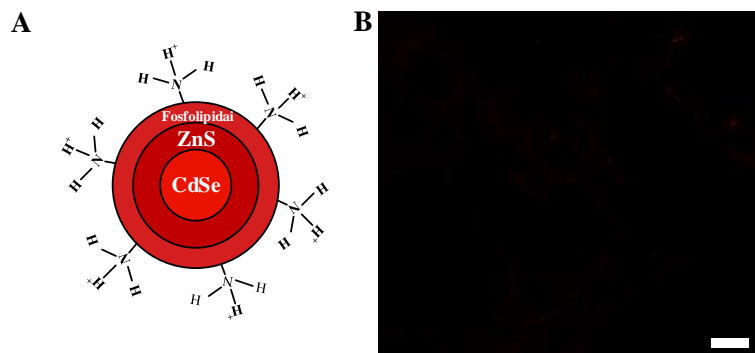
#### **4.3.1 Kvantiniai taškai**

Tyrimuose buvo naudojami kvantiniai taškai (KT) eFluor™ 625NC ir 545NC (pradinė vandeninio tirpalo koncentracija 10 μM) įsigyti iš eBioscience™, JAV. KT yra sudaryti iš CdSe šerdies ir ZnS apvalkalo, padengto patentuotu polietilenglikolio amfifiliniu lipidiniu sluoksniu DSPE-PEG2000 (*angl.* 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[carboxy(poly-(ethylene glycol))-2000]) ir karboksilo grupėmis ( $pK_a = 1,8 - 2,5$ ). Todėl fiziologiniame pH KT paviršius tampa deprotonuotas susiformuojant  $COO^-$  rūgščių liekanoms, kurios suteikia KT neigiamą krūvį (5 pav., A). Biologinėje aplinkoje KT padengia biologinės makromolekulės ir KT paviršiuje susiformuoja baltymų vainikas<sup>[52]</sup> (5 pav., B). Dėl skirtingo puslaidininkinio kristalo dydžio (625NC skersmuo 5,2 nm-7.1 nm<sup>[131]</sup> ir 545NC – 4,3-4,8 nm<sup>[132]</sup>) tirti KT pasižymi skirtingais fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrais (5 pav., C). Tačiau dėl paviršinių sluoksnių indėlio skirtingų spalvų KT matmenys nelabai skiriasi, jų hidrodinaminis spindulys yra ne mažesnis negu ~20 nm.<sup>[133]</sup>



5 pav. A – schematinis neigiamo paviršinio krūvio KT vaizdas, B – KT su adsorbuotais baltymais. C – 625NC ir 545NC KT fotoluminescencijos spektrai DME terpėje

Eksperimentai atlikti ir su KT eFluor™ 605NC (pradinė vandeninio tirpalo koncentracija 10  $\mu\text{M}$ ) išsigytais iš eBioscience™, JAV, kurių paviršiuje yra amino grupės ( $\text{pK}_a = 8-10,5$ ). Fiziologiniame pH šių KT paviršiuje susiformuoja  $\text{NH}_3^+$  protonuotos grupės, suteikiančios jiems teigiamą krūvį (6 pav., A).



6 pav. A – schematinis teigiamo paviršinio krūvio KT vaizdas; B – NIH3T3 ląstelių konfokalinės fluorescencijos vaizdas po 24 val. inkubacijos su teigiamais KT605; mastelis 10  $\mu\text{m}$

Tačiau teigiamo paviršinio krūvio KT patekimas į tirtas ląsteles vyko lėtai, net po 24 val. NIH3T3 ląstelių inkubacijos su kvantiniais taškais, jų fotoluminescencija (FtL) ląstelių viduje nebuvo užregistruota (6 pav., B). Dėl

to tolimesniuose eksperimentuose buvo nuspręsta naudoti tik neigiamo paviršinio krūvio KT, o teigiamo paviršinio krūvio KT nebenaudoti.

#### **4.3.2 Kiti reagentai**

Transferinas (Trf) konjuguotas su fluoroforu Alexa-Fluor 488, BODIPY-C5-lactosil-ceramidas/BSA (LacCer), Dextran-Cascade Blue (DexB) buvo įsigyti iš Invitrogen, JAV. Fotosensibilizatorius chlorinas e6 (Ce<sub>6</sub>) buvo įsigytas iš Frontier Scientific Inc., JAV. Cisplatina buvo įsigyta iš Teva Pharma B. V., Olandija.

### **4.4 Naudoti tyrimų metodai**

#### **4.4.1 Nuostovioji fluorescencinė spektroskopija**

##### *4.4.1.1 Nuostovioji fluorescencinė spektroskopija kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse kinetikos nustatymui*

NIH3T3, HpG2 ir MCF-7 ląstelės buvo inkubuojamos su KT iki 48 val. Po atitinkamo laiko intervalo (po 0,5 val., 1 val., 6 val., 24 val. bei 48 val.), įprastai nuplovus terpę, ląstelės buvo suspenduotos naudojant tripsinizacijos tirpalą (Trypsin-EDTA (0.5 proc.), Thermo Fisher Scientific, JAV). Po tripsinizacijos ląstelės buvo nucentrifuguotos (500g, 2 min) ir vėl suspenduotos galutiniame 1,5 ml PBS tūryje. Ląstelių koncentracija buvo nustatyta hematocitometru, skaičiuojant ląstelių skaičių mililitre. Kiekybinė KT patekimo į gyvas ląsteles analizė buvo atlikta naudojant nuostoviosios fluorescencijos ir fluorescencijos trukmių registravimo spektrometrą FLS920 (Edinburgh Instruments, Jungtinė Karalystė). Spektroskopinių matavimų metu reguliuojamos temperatūros kiuvečių kameroje buvo palaikoma 37°C temperatūra. Ląstelių suspensija buvo patalpinta į 1 cm storio kiuvetę (Hellma Optics, Jena, Vokietija). Suspensija buvo pastoviai maišoma su mikromaišytuvu, kad užtikrinti kuo tolygesnę ląstelių suspensijos koncentraciją ir išvengti jų sedimentacijos. Fotoluminescencija (FtL) buvo žadinama 405 nm bangos ilgio šviesa, žadinimo ir spinduliavimo spektriniai plyšiai buvo nustatyti vienodi – 5 nm. Suspenduotų ląstelių autofluorescencija buvo



išmatuota kontrolinėse ląstelėse, ir į ją buvo atsižvelgta analizuojant gautus rezultatus.

#### *4.4.1.2 Fluorescencinė spektroskopija temperatūros įtakai kvantinių taškų patekimui į ląsteles įvertinti*

NIH3T3 ląstelės buvo inkubuojamos su KT iki 6 val., t.y., kol pasieks kaupimosi soties etapo pradžią, ir laikomos įprastomis sąlygomis (37°C) arba ant ledo (4°C), taip siekiant nustatyti temperatūros įtaką KT patekimui į ląsteles. Po atitinkamo laiko intervalo (0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min ir 360 min), ląstelės pagal aukščiau aprašytą procedūrą buvo paruošiamos spektroskopiniams matavimams.

#### *4.4.1.3 Fluorescencinė spektroskopija ilgalaikės ląstelių inkubacijos su kvantiniais taškais įtakai kitų medžiagų patekimui į ląsteles nustatyti*

Siekiant nustatyti, kiek trunka KT patekimo į NIH3T3 ląsteles slopinimas joms pasiekus KT kaupimosi sotį, ląstelės iš pradžių buvo 24 val., t.y. iki soties etapo, inkubuojamos su KT625, kaip įprastai, tris kartus plautos, ir po to laikomos terpėje be baltymų ir be KT 2 val., 5 val. ir 7 val. Po kiekvieno nurodyto laiko intervalo į terpę buvo įpilama nauja KT dozė, ir ląstelės laikomos terpėje dar 1 val. Tuomet ląstelės buvo paruošiamos fluorescencijos spektroskopijos eksperimentui pagal anksčiau nurodytas procedūras. Du FL eksperimentai, po tris mėginius kiekvienoje grupėje, buvo vykdomi lygiagrečiai: vienos 24 val. su KT625 inkubuotos ląstelės buvo laikomos terpėje be KT, o kitos buvo laikomos augimo terpėje, nurodytais laiko momentais į ją įpilant tų pačių KT625.

KT kaupimosi ląstelėse slopinimo reiškiniu bei skirtingais endocitozės reporteriais buvo pasinaudota siekiant nustatyti molekulinį KT patekimo į ląsteles mechanizmą. NIH3T3 ląstelės 24 val., iki KT kaupimosi soties fazės, buvo inkubuojamos su KT625 tam, kad tirti Trf, DexB ir LacCer patekimą ir viduląstelinį pasiskirstymą skirtingais laiko intervalais, nuo 1 val. iki 24 val.

KT įtaka kitų, klinikinėje terapijoje taikomų medžiagų, kaupimuisi buvo nustatyta NIH3T3 ląstelėse, kurios buvo inkubuojamos su KT545 tam, kad tirti  $Ce_6$ , ir su KT625 tam, kad tirti cisplatinos patekimą į ląsteles skirtingais laiko intervalais, nuo 1 val. iki 24 val.

#### **4.4.2 Konfokalinė fluorescencinė mikroskopija**

##### **4.4.2.1 Konfokalinės mikroskopijos principai**

Konfokalinis skenuojantis lazerinis mikroskopas pasižymi išskirtine savybe – optiniu sluoksniavimu – t.y., gebėjimu užregistruoti gerai sufokusuotus, ryškius vaizdus iš skirtingo to paties bandinio gylio. Konfokaliniame mikroskope bandinys yra žadinamas sufokusuotu lazerio spinduliu, kuris skleidžia koherentinę spinduliuotę, tokiu būdu lazerio spinduliai pasiekia objektą viename taške. Bandinio žadinimo pasekmė yra fluorescencija, tačiau reikėtų išskirti šviesą, kurią išspinduliuoja molekulės, esančios objektyvo židinio plokštumoje, bei šviesą, kurią skleidžia molekulės nepatenkančios į šią plokštumą. Abiem atvejais molekulių išspinduliuota šviesa praeis pro objektyvą bei skenavimo sistemą. Tačiau konfokaliniame mikroskope nesufokusuoti fluorescencijos spinduliai yra eliminuojami prieš detektorių patalpinant konfokalinę diafragmą, kuri apsaugo nuo nesufokusuotos šviesos, sklindančios iš plokštumų, esančių virš ar po židinio plokštuma, o taip pat ir nuo išsklaidytos šviesos galinčios patekti į detektorių. Taigi fiksuojama bus tik fluorescencija, kurią skleis molekulės esančios objektyvo židinio plokštumoje. Taip konfokalinis skenuojantis lazerinis mikroskopas tuo pat metu įgalina ir bandinio apšvietą pataškiui, ir išspinduliuotos iš atskiro tūrio segmento šviesos detekciją. Dichroiniu veidrodžiu žadinanti lazerio spinduliuotė nukreipiama į objektyvą, kuris ją fokusuoja bandinyje. Šis veidrodis žadinančią šviesą atspindi, o išspinduliuotą (fluorescenciją) praleidžia. Veidrodžių dėka žadinanti lazerio spinduliuotė nuosekliai slenka židinio plokštumoje (arba gali būti judinamas pats bandinys), vyksta skenavimas  $x$  ir  $y$  ašimis. Tokiu būdu gali būti sužadinama didesnė objekto dalis, o ne vienas konkretus taškas. Su nustatytu židinio nuotoliu  $z$  ašyje skenuojant bandinį  $x$  ir  $y$  ašimis, konfokalinis

tūrio elementas slenka reikiamu bandinio plotu, vienoje plokštumoje. Taip, keičiant židinio nuotolį, galima užregistruoti atskirus bandinio optinius sluoksnius ir po to rekonstruoti bandinio 3D-vaizdą bei struktūrą.<sup>[134]</sup>

#### *4.4.2.2 Gyvų ląstelių vaizdinimas naudojant konfokalinę fluorescencinę mikroskopiją*

Kvantinių taškų ir kitų vaizdinimui naudotų medžiagų fluorescencijos gyvose ląstelėse vaizdai buvo gauti naudojantis konfokaliniu mikroskopu (Nikon Eclipse TE2000-S, C1 plus) pataškiui skenuojant ląsteles argono jonų lazerio (488 nm) spinduliu, bendram 600X didinimui naudojant 60X NA1,4 objektyvą (Plan Apo VC, Nikon, Japonija). Įprastiems vaizdams registruoti buvo pasirinktas trijų kanalų RGB detektorius (juostiniai filtrai su pralaidos juostomis 515/30 ir 605/75 žaliai ir raudonam kanalams, atitinkamai). Skenavimas lazeriu buvo valdomas naudojantis Nikon EZ-C1 programa. Kvantinių taškų vaizdinimas buvo atliekamas išlaikant tuos pačius parametrus visiems registruojamiems fluorescencijos vaizdams. Vaizdų apdorojimas buvo atliekamas naudojantis Nikon EZ-C1 Bronze versija 3.80 ir ImageJ 1.41 programomis.

#### **4.4.3 Fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopija**

##### *4.4.3.1 Fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopijos principai*

Biologiniai fluorescenciniai dažai dažnai skirstomi pagal jų sugertos ir išspinduliuotos šviesos bangos ilgį, kuris priklauso nuo energijos skirtumo tarp pirmos elektroninės sužadintos būsenos žemiausio virpesinio lygmens ir pagrindinės būsenos. Nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodu yra registruojama sužadintų molekulių virsmo į pagrindinę būseną metu išspinduliuota šviesa. Fluorescencijos spektras išmatuojamas registruojant jos intensyvumą pasirinktoje spektrinėje srityje, o bandinį žadinant šviesa, atitinkančia siaurą molekulių sugerties spektro sritį. Nuostoviosios fluorescencijos matavimui yra naudojamas nuolatinės ar impulsinės šviesos

šaltinis, ir stebimas nuolatinis, suvidurkinto intensyvumo fluorescencijos signalas. Fluorescencinis konfokalinis mikroskopas skenavimo metu registruoja fluorescencijos intensyvumą tik iš vieno objekto tūrio elemento, kitaip tariant, vyksta fluorescencijos intensyvumo integravimas laike. Tačiau tokiu būdu neįmanoma nustatyti, kaip ir kada užgęsta sužadintos molekulės būseną (pvz., molekulės gali fluorescuoti vienodu intensyvumu, bet jų švytėjimo trukmės gali ženkliai skirtis). Fluorescencijos gesimo trukmė ( $\tau$ ) yra charakteringa fluoroforų fotofizikinė savybė. Monoeksponentinio fluorescencijos gesimo atveju fluorescencijos intensyvumo kitimas:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

čia  $I_0$  – pradinis fluorescencijos intensyvumas,  $t$  – registravimo trukmė, o  $\tau = t$ , kai  $I = I_0/e$ , t.y., gyvavimo trukmė  $\tau$  yra laikas, per kurį fluorescencijos intensyvumas nuo maksimalios vertės sumažėja dydžiu  $e$ . Įprastų, mikroskopijoje naudojamų fluoroforų  $\tau$  yra kelios ns, tačiau ši gyvavimo trukmė yra veikiama mikroaplinkos, kurioje yra fluoroforai. Tad fluorescenciją galima aprašyti ne tik kaip intensyvumo laikinį integralą, bet ir registruoti jos papildomus parametrus (trukmę ir bangos ilgį) bei gauti informaciją apie procesus, vykstančius su molekule, kol ji yra sužadinta. Vaizdinant gyvas ląsteles, jose esantys fluoroforai yra biologinėje aplinkoje, apsupti įvairių kitų molekulių (baltymų bei lipidų), kurios vienaip ar kitaip gali paveikti sužadintos molekulės būsenos trukmę. Sužadintos būsenos gyvavimo trukmę keičiantys procesai, pvz., energijos pernaša iš vienos molekulės į kitą (Fiorsterio rezonansinė energijos pernaša (FRET), fotoindukuota reakcija (elektrono arba protono pernaša į tirpiklį)) ar solvatacija (ištirpusios medžiagos molekulių sąveika su tirpikliu) yra stebimi panaudojant kinetinės spektroskopijos metodus.<sup>[134]</sup> Vienas iš jų – fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopija (*angl. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM*). FLIM metodas gali būti pritaikytas vaizdinimui pasitelkiant kelis skirtingus fluorescencijos gesimo registravimo būdus. Laiko srities, dažnio srities, fotonų skaičiavimo, analoginiai skenavimo ir plataus lauko vaizdinimo būdai yra

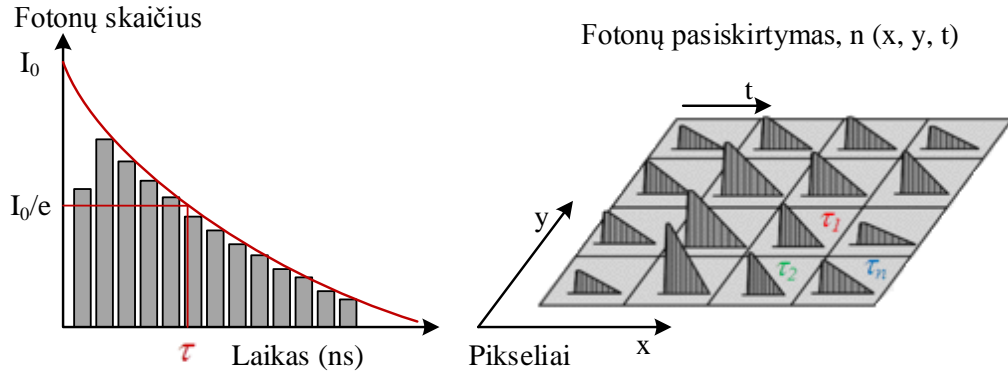
realizuojami naudojant skirtingą įrangą.<sup>[135]</sup> Toliau bus aptartas pirmasis, laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimu grįstas fluorescencijos gyvavimo trukmės (*angl. Time correlated single photon counting, TCSPC FLIM*) vaizdinimo būdas, kuris buvo taikomas tiriant gyvas ląsteles.

Bandinys yra sužadinas trumpu lazerio impulsu, kurio trukmė turi būti ženkliai mažesnė negu bandinyje sužadintų molekulių fluorescencijos gyvavimo trukmė.<sup>[135]</sup> Po sužadavimo molekulė kažkuriuo laiko momentu gali išspinduliuoti fotoną. Kadangi žadinimas vyksta spinduliuotės impulsais, pasikartojančiais tam tikru dažniu, tai daugelį kartų yra registruojami išspinduliuoti fotonai, ir taip gaunama fluorescencijos gesimo histograma, vaizduojanti fotonų kiekių, užregistruotų skirtingais laiko intervalais po sužadinančio impulso, skirstinį (7 pav.). Kiekvienai histogramai yra pritaikoma eksponentinio mažėjimo funkcija (pvz., gęstančių eksponenčių suma, jei procesas nėra monoeksponentinis):

$$\frac{I}{I_0} = \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

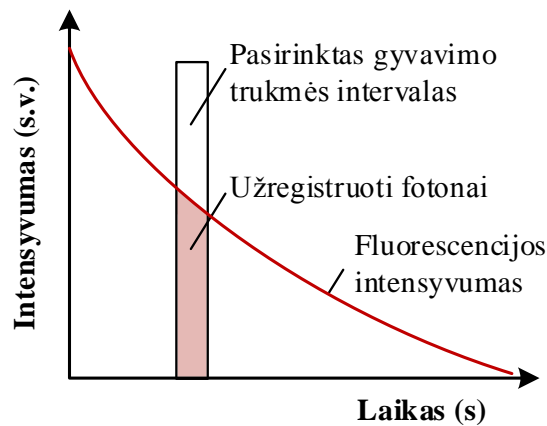
čia  $a_i$  yra santykinės gęstančių fluorescencijos komponentių amplitudės, o  $\tau_i$  – jų fluorescencijos gyvavimo trukmės.

Taikant TCSPC FLIM vaizdinimo būdą, konfokaliniu mikroskopu bandinys yra skenuojamas pikselis po pikselio, ir gaunamas FL intensyvumo pasiskirstymas erdvinėse koordinatėse  $x$ ,  $y$ , kiekviename pikselyje užregistruojant fluorescencijos gesimo charakteristiką (fotonų skaičių ir jų detektavimo laiką žadinančio lazerio impulso atžvilgiu), 7 pav.



7 pav. Laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopijos vaizdų registravimo principas naudojant skenuojantį konfokalinį mikroskopą. Adaptuota pagal W. Becker et al.<sup>[135]</sup>

Po to iš užregistruotų fluorescencijos gesimo charakteristikų apskaičiuojama fluorescencijos gyvavimo trukmė ir atvaizduojama tam tikra spalva. Išmatuotame FLIM vaizde atvaizduojama vidutinė  $\tau$  vertė, kuri apibendrina visų tame bandinio taške esančių sužadintų fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės. Jei fluorescencijos sužadintos būsenos gyvavimo trukmės pikseliuose yra skirtingos, tada joms priskyrimas atitinkamas skirtingas spalvas galima sudaryti fluorescencijos gyvavimo trukmėmis paremtą vaizdą. Matuojant fluorescencijos signalą skirtingais gyvavimo trukmių intervalais (*angl. gate*) (8 pav.), pvz., heterogeniško bandinio atveju, kai fluoroforai yra skirtingose aplinkose, galima gauti skirtingus fluorescencijos vaizdus, atspindinčius bandinio savybes ir sandaros ypatumus.



8 pav. Laiko intervalai fluorescencijos gesimo kinetikoje. Adaptuota pagal W. Becker et al.<sup>[135]</sup>

TCSPC FLIM yra suderinamas su konfokaliniu lazeriniu skenuojančiu mikroskopu, tad fluorescencijos duomenys yra gaunami iš nustatyto konfokalinio tūrio elemento be išsklaidytos, ne židinio plokštumoje sužadintos fluorescencijos.

#### 4.4.3.2 Gyvų ląstelių vaizdinimas naudojant fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopiją

NIH3T3 ląstelės FLIM eksperimentui buvo inkubuojamos 0,5 val., 1 val., 3 val., 6 val. ir 24 val. pagal jau aprašytą ląstelių paruošimo inkubacijos su KT eksperimentams metodiką. KT fotoluminescencijos gyvavimo trukmės vaizdai buvo gauti panaudojant fluorescencijos gyvavimo trukmių registravimo priedėlį (PicoQuant GmbH, Vokietija) prie Nikon C1si konfokalinio mikroskopo. Sistemą sudarė pikosekundinis (*impulso pusplotis 39 ps*) 405 nm diodinis lazeris (*PDL 800-B*) bei jo valdiklis, kuriuo buvo nustatytas 10 MHz impulsų pasikartojimo dažnis, įgalinęs naudoti 100 ns matavimų intervalą. Vaizdo registravimo pradžia, skenavimas ir užregistravimas buvo valdomi per Nikon C1si mikroskopo sistemą. KT fotoluminescencijos gyvavimo trukmės signalas gyvoje ląstelėje buvo užregistruotas naudojant pavienių fotonų griūtinį diodinį detektorių (*Single Channel SPAD Detection Unit*) su juostinio pralaidumo filtru (*578/105 nm*) ir TCSPC modulį (*PicoHarp 300, Picosecond Histogram Accumulating Real-time Processor*, PicoQuant GmbH, Vokietija). Kiekvienas gyvavimo trukmės vaizdas buvo gautas užregistruojant 1000 įvykių ties didžiausia intensyvumo verte, o vaizdo skiriamoji geba buvo 512x512 pikselių. FLIM vaizdai buvo rekonstruoti naudojant trijų eksponenčių artinį, apdorojant juos SymPhoTime 5.2 versijos programine įranga (*Confocal TCSPC Data Acquisition and Analysis Software*, PicoQuant GmbH, Vokietija), kur vidutinė KT FtL gyvavimo trukmė apskaičiuojama pagal formulę:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i a_i \tau_{ni}}{\sum_i a_i}$$

čia  $a_i$  yra amplitudės, o  $\tau_i$  – fluorescencijos gyvavimo trukmės, ir yra atvaizduojama kiekvienam pikseliui. Visų KT vidutinių FtL gyvavimo trukmių

(visiems pikseliams) histogramos buvo nubrėžtos naudojantis ta pačia programa.

#### **4.4.4 Mikroinjekcija**

Tirpalas injekcijai buvo paruoštas praskiedžiant 0,5 µl pirminės KT koncentracijos su 9,5 µl PBS. Mikroinjektorius (Eppendorf FemtoJet ir CellTram Air; Vokietija) buvo naudojamas KT injekcijai tiesiai į ląstelės citoplazmą (injekcijos slėgis – 200 hPa; greitis – 500 µm/s). Ląstelių konfokaliniai fluorescencijos vaizdai buvo užregistruoti iš karto po injekcijos ir po 24 val., kurias ląstelės buvo laikomos inkubatoriuje (37°C, 5 proc. CO<sub>2</sub>).

#### **4.4.5 Laikinoji transfekcija su žaliai fluorescuojančio baltymo plazmide**

Laikinoji NIH3T3 ląstelių transfekcija su žaliai fluorescuojančio baltymo (EGFP) plazmide (susintetinta Dr. Brian J. Knoll, Farmacijos ir vaistų mokslų fakultete, Hiūstono universitete, Hiūstonas, JAV) buvo atliekama pagal standartinę metodiką, skirtą ant padėklo augančioms ląstelėms. Du skirtingi tirpalai buvo ruošiami atskirai. *Tirpalas A*: 0,5 µg EGFP plazmidžių 50 µl DME inkubavimo terpėje; *Tirpalas B*: 1,5 µg MetafectenePRO (Biontex) 50 µl DME inkubavimo terpėje be antibiotikų. Mišinys padarytas iš A ir B tirpalų 20 min buvo laikomas kambario temperatūroje. Susiformavę plazmidės-MerafectenePRO junginiai buvo užpilami ant NIH3T3 ląstelių. Po 6 val. CO<sub>2</sub> inkubatoriuje transfekcijos mišinys nusiurbiamas nuo ląstelių ir užpilama šviežia DME inkubavimo terpė su jaučio serumo albuminu (10 proc. v/v) ir 0,1 proc. antibiotikų (1000 U/ml penicilino, 1000 µg/ml streptomicino), o lėkštelės 48 val. gražinamos į CO<sub>2</sub> inkubatorių. Toliau transfekuotos ląstelės buvo inkubuojamos su KT pagal įprastą protokolą.

Laikinoji NIH3T3 ląstelių transfekcija su EGFP plazmide ir Rab5 genų mutantais buvo atliekama pagal metodiką aprašytą ankstesniame skyriuje. Visa transfekcijos eiga yra tokia pati, išskyrus naudojamą *Tirpalą A*: šiame eksperimente jį sudarė trys atskiri 0,5 µg plazmidžių EGFP-C1-Rab5-WT,



EGFP-C1-Rab5-Q79L – dominantinis teigiamas ir EGFP-C1-Rab5-S34N – dominantinis neigiamas (susintetinti Dr. Brian J. Knoll, Farmacijos ir vaistų mokslų fakultete, Hiūstono universitete, Hiūstonas, JAV) tirpalai, kurie buvo paruošti 50 µg DME inkubavimo terpėje.

Laikinoji NIH3T3 ląstelių transfekcija su pEGFP-C1-kaveolinas-1 plazmide (susintetinta Dr. Lisette Leyton, FONDAP ląstelių molekulinų tyrimų centre, Medicinos fakultete, Čilės universitete, Santjago, Čilė) buvo atliekama naudojant TurboFect transfekcijos reagentus, remiantis gamintojo rekomendacijomis (Thermo Fisher Scientific Inc., Lietuva).

#### **4.4.6 *KT pasiskirstymo ląstelėse tyrimai su Lysotracker®***

NIH3T3 ląstelės buvo inkubuojamos 24 val. su 10 nM KT625 inkubavimo terpėje, su baltymais ir be baltymų, CO<sub>2</sub> inkubatoriuje 37°C temperatūroje. Tuomet tris kartus plautos ir 2 val. dažomos su 50 nM lizosomų žymekliu žaliai fluorescuojančiu *Lysotracker* (*angl. Lysotracker-green*) (Invitrogen, JAV). Konfokaliniai fluorescencijos vaizdai buvo registruojami atskirai kiekviename fluorescencijos kanale, o po to apjungiami.

#### **4.4.7 *Citotoksiškumo tyrimai***

KT citotoksiškumui ir įtakos ląstelių metaboliniam aktyvumui įvertinti buvo naudotas XTT metodas ir specialios XTT druskos ir aktyvacijos reagentai (Biological Industries, Izraelis). Gyvybingose ląstelėse esantys dehidrogenazės fermentai tetrazolį skaido ir verčia į formazaną, kuris yra oranžinės spalvos. Gyvybingų ląstelių skaičius ir formazano kiekis koreliuoja – kuo daugiau ląstelių, tuo formazano spalvos intensyvumas bus didesnis. Dėl to galima įvertinti ląstelių gyvybingumą matuojant dažo sugerties koeficiento pokyčius. Optinis tankis matuojamas spektrofotometru ties 490 nm bangos ilgiu. XTT tyrimui buvo panaudota 96 šulinėlių plokštelė. Kraštiniai šulinėliai buvo palikti tušti, esantys viduryje užsėti NIH3T3 ląstelėmis, po 12 000 ląstelių į šulinėlį. Pasirinkta eksperimentuose naudota 10 nM KT koncentracija. Po inkubacijos su nanodalelėmis kiekvienas šulinėlis buvo praplaunamas, ir pripilama po 100 µl

naujos terpės. Tuomet atitinkamais kiekiais sumaišius XTT reagentą su aktyvacijos reagentu, į kiekvieną šulinėlį įpilta po 50 µl tirpalo ir plokštelė paliekama 3 val. inkubatoriuje.

Citotoksiškumo analizei ląstelės buvo veikiamos kvantiniais taškais 1 val., 3 val., 24 val. ir 48 val., šie inkubavimo laikotarpiai buvo pasirinkti tokie, kaip ankstesniuose eksperimentuose. Neinkubuotos su KT ląstelės buvo skirtos kontrolei. Iš karto po numatytos poveikio trukmės ląstelės buvo suspenduotos į tripsinizuojant, ir naudojantis automatinio ląstelių skaičiuotuvu ADAM (Digital Bio, NanoEnTek Inc., Korėja) buvo įvertinamas gyvybingų ir negyvybingų ląstelių skaičius. Gyvybingumas buvo apskaičiuojamas pagal žemiau pateikiamą formulę:

$$\text{Gyvybingumas} = (\text{Gyvybingų ląstelių skaičius} / \text{Visas ląstelių skaičius}) \times 100 \text{ proc.}$$

ADAM automatinis ląstelių skaičiuotuvas yra labai tikslus mikroskopas, integruotas su optine fotoluminescencijos registravimo sistema ir vaizdų analizės kompiuterine programa. Kai bandiniai yra nudažomi su fluorescenciniu dažu, propidžio jodidu, kuris įsiskverbia į DNR ir nudažo ląstelių branduolius, fluorescenciniai vaizdai yra užregistruojami automatiškai. Sistema registruoja ~40–60 vaizdų automatiškai judant staliukui X-Y ašių kryptimis. Gauti vaizdai yra apdorojami vaizdų analizavimo kompiuterine programa.

Ląstelių dalinimosi įvertinimui buvo naudojamos dvi 12 šulinėlių plokštelės – kontrolei ir inkubavimui su kvantiniais taškais, naudojant KT koncentraciją, kaip ir visuose eksperimentuose – į kiekvieną šulinėlį užsėjant po 80 000 NIH3T3 ląstelių. Ląstelės buvo skaičiuojamos automatinio ląstelių skaičiuotuvu ADAM kas 24 val.

#### **4.4.8 Ląstelių atsparumo cisplatinai tyrimai**

NIH3T3 ląstelės buvo veikiamos 24 val. dviem skirtingomis (0,075 µg/ml ir 0,5 µg/ml) cisplatinos koncentracijomis (cisplatinos koncentracija ir poveikio

laikas pasirinkti remiantis A.B. Coleman et al. siūloma metodika<sup>[136]</sup>). Šiame bandyme buvo naudojama teigiama kontrolė, t. y., kontrolinės ląstelės, kurios nebuvo inkubuojamos su KT, bet buvo veikiamos cisplatina, pagal jas buvo vertinamas bendras ląstelių gyvybingumas. Buvo suskaičiuotos ir “atkibusios” nuo substrato, esančios terpėje ląstelės. Ląstelės buvo nudažytos su negyvų ląstelių dažu 0,4 proc. TrypanBlue (Sigma-Aldrich Co. LLC, JAV) ir naudojantis automatiniu ląstelių skaičiuotuvu ADAM.

#### **4.4.9      *Statistinė analizė***

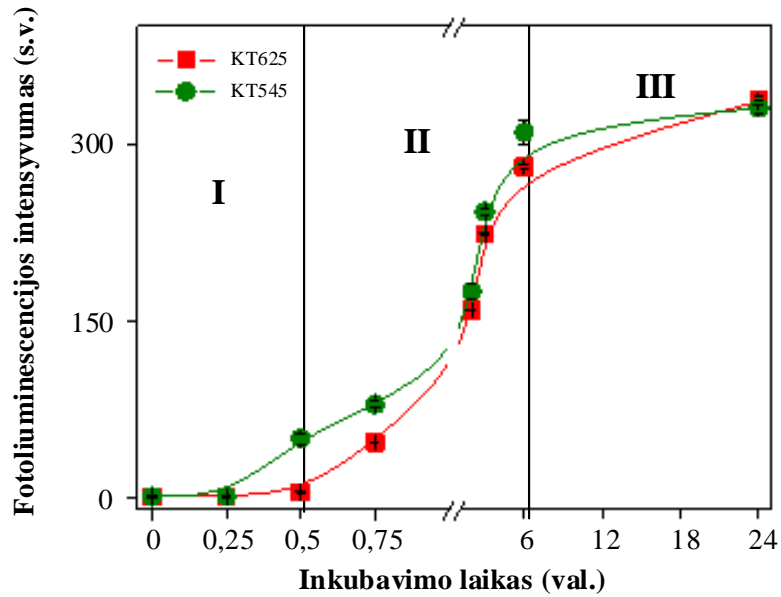
Duomenys yra pateikiami kaip vidutinės mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vertės  $\pm S_e$  (standartinė paklaida). Statistinė analizė buvo atliekama naudojantis vienfaktorinės dispersinės analizės Anova testu; skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais jei  $p < 0.05$ .

## 5 Rezultatai ir jų aptarimas

### 5.1 Kvantinių taškų kaupimasis ir pasiskirstymas ląstelėse

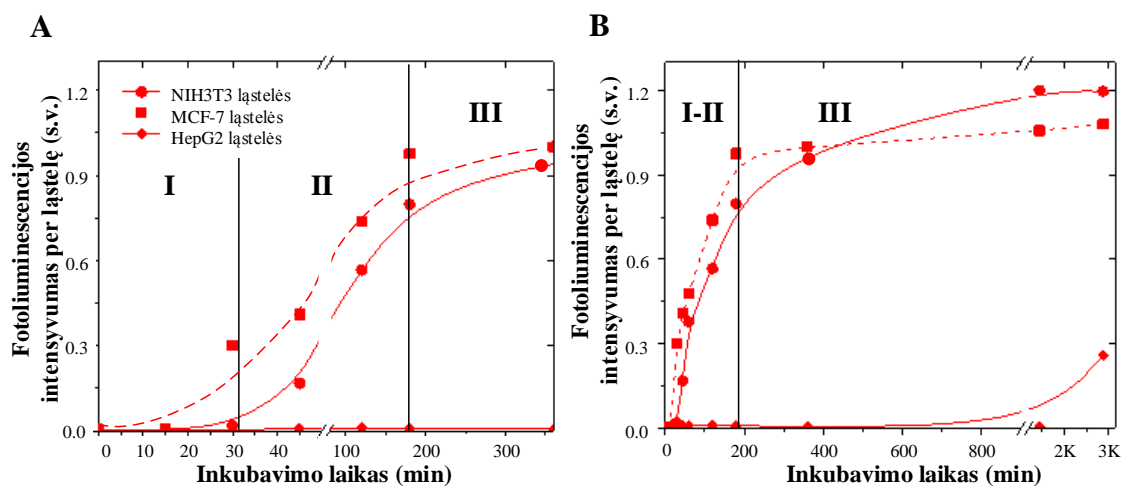
#### 5.1.1 *Kvantinių taškų kaupimosi kinetika*

Kvantinių taškų (KT) kaupimosi ląstelėse dinamika buvo tiriama matuojant dviejų vienodos cheminės sudėties, bet turinčių liuminescencijos spektro smailes ties skirtingais bangos ilgiais (KT545 – didžiausias intensyvumas ties 545 nm – registruojamas mikroskopo vaizdinimo sistemos žaliajame kanale ir KT625 – ties 625 nm, – registruojamas raudonajame kanale) kvantinių taškų, dengtų neigiamo paviršinio krūvio karboksilo grupėmis, fotoliuminescencijos (FtL) intensyvumą. Suvidurkintos FtL intensyvumo vertės, užregistruotos ląstelių suspensijose po skirtingų inkubacijos trukmių, pateikiamos 9 pav. Šių tyrimų rezultatai parodė, kad KT625 ir KT545 kaupimosi ląstelėse kinetikos yra panašios, nepriklausomai nuo nedidelio šių KT dydžio skirtumų. KT kaupimosi ląstelėse kinetika yra „S“-formos, ir ją galima suskirstyti į tris pagrindinius etapus: I – lėtąjį ( $t_{\text{ink}} < 0.5$  val.), II – augimo ( $t_{\text{ink}} 0.5-6$  val.) ir III – soties ( $t_{\text{ink}} > 6$  val.). Raudonos liuminescencijos KT625 lėtasis etapas yra raiškesnis, tačiau abiejų KT patekimas į ląstelę yra gan spartus procesas, ir jau po 0,5 val. inkubacijos ląstelėse registruojamas FtL intensyvumo augimas, kuris pradeda sotintis po 6 val. ir pasiekia sotį apie 24 val. po inkubacijos.



9 pav. Identiškos cheminės sudėties karboksilintų KT su skirtingomis FtL smailėmis, ties 545 nm (KT545) ir ties 625 nm (KT625), kaupimosi etapai NIH3T3 ląstelėse, inkubuotose terpėje be baltymų 37°C temperatūroje: (I) lėtasis, (II) augimo ir (III) soties

Atlikus KT625 kaupimosi tyrimus skirtingų ląstelių (NIH3T3, HepG2 ir MCF-7) linijose, buvo nustatyta, kad šiose ląstelėse KT kaupimasis vyksta tais pačiais etapais, tačiau kiekvienai ląstelių linijai etapų trukmė yra skirtinga (10 pav.).



10 pav. Karboksilo grupėmis dengtų KT kaupimosi dinamika NIH3T3, HpG2 ir MCF-7 ląstelėse 37°C temperatūroje, atvaizduota skirtingose (A ir B) skalėse

KT FtL intensyvumas NIH3T3 ir MCF-7 ląstelėse augo sparčiai, MCF-7 ląstelėse lėtasis etapas buvo trumpesnis ir mažiau išreikštas. Po 6 val. šių abiejų ląstelių linijose KT FtL intensyvumas, t.y. ir KT kaupimasis, pradėjo sotintis ir sotį pasiekė po ~ 24 val. Tačiau HepG2 ląstelėse lėtasis KT kaupimosi etapas buvo žymiai ilgesnis. KT FtL intensyvumas 0-24 val. intervale palyginus su FtL intensyvumu NIH3T3 ir MCF-7 ląstelėse buvo labai silpnas ir pradėjo augti tik po 30 val. Toks pats lėtas analogiškos koncentracijos karboksilintų KT kaupimasis HepG2 ląstelėse ir jo įsisotinimas tik artėjant 48 val. buvo užregistruotas ir atliekant KT citotoksiškumo tyrimus.<sup>[114]</sup>

Nemažai skelbtų tyrimų parodė, kad KT kaupimosi ląstelėse greitis yra priklausomas nuo KT koncentracijos, t.y. kuo didesnė KT koncentracija, tuo greičiau KT patenka į ląsteles.<sup>[114,137]</sup> KT kaupimasis daugeliu tyrimų atvejų yra registruojamas iki 24 val. ir aprašomas kaip tiesinė, auganti KT signalo laikinė priklausomybė, nepriklausomai nuo naudojamos KT koncentracijos,<sup>[126,138,139]</sup> tačiau registruojamame laiko intervale priklausanti nuo ląstelių tipo,<sup>[68,140]</sup> pvz., didesnis nanodalelių patekimas dažnai buvo registruojamas vėžinių ląstelių atvejais.<sup>[141-143]</sup>

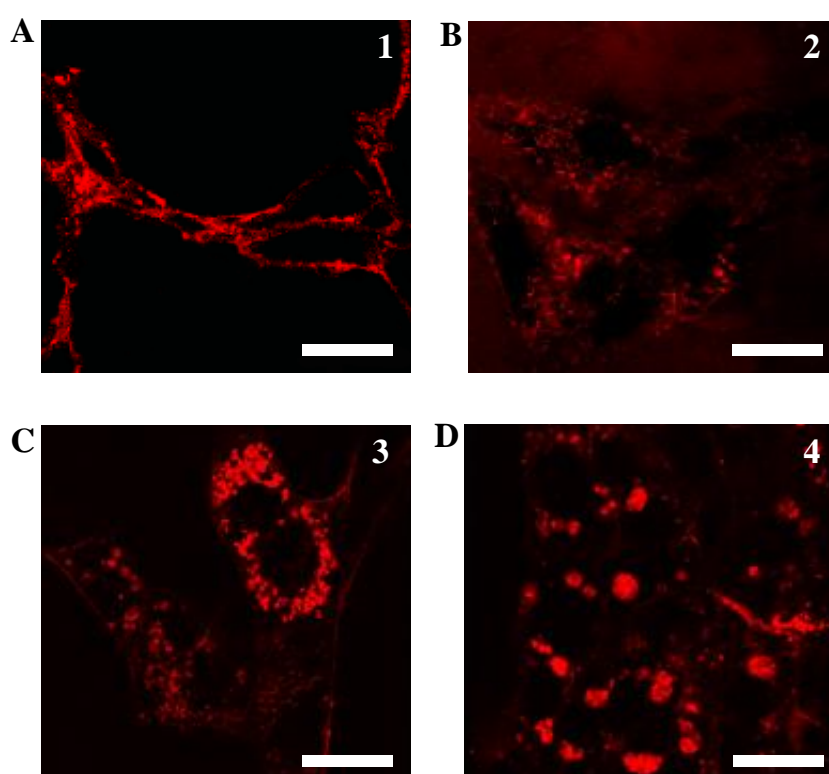
Tačiau mūsų atlikti tyrimai parodė, kad intervale nuo 24 val. iki 48 val. neigiamo paviršiaus krūvio KT kaupimasis ląstelėse įsisotina, nepriklausomai ar tirtosios ląstelės buvo vėžinės, ar ne.

## **5.1.2 Kvantinių taškų pasiskirstymas ląstelėse**

### **5.1.2.1 Kvantinių taškų kaupimosi ląstelėse fazės**

Sukauptų ląstelėse KT625 konfokaliniai fotoluminescencijos vaizdai, kurie buvo užregistruoti skirtingose ląstelių linijose iškart po inkubacijos, ir po 0,5 val., 1 val., 6 val., 24 val. bei 48 val. (11 pav. ir 12 pav.), atskleidė, kad nuo II kaupimosi etapo, kai KT patenka į ląsteles, jie yra vezikulinėse struktūrose. KT šiose vezikulinėse struktūrose išlieka visą stebėjimo laikotarpį. Ilgainiui auga tik vezikulių skaičius ir dydis, kas sąlygoja išaugusį FtL intensyvumą

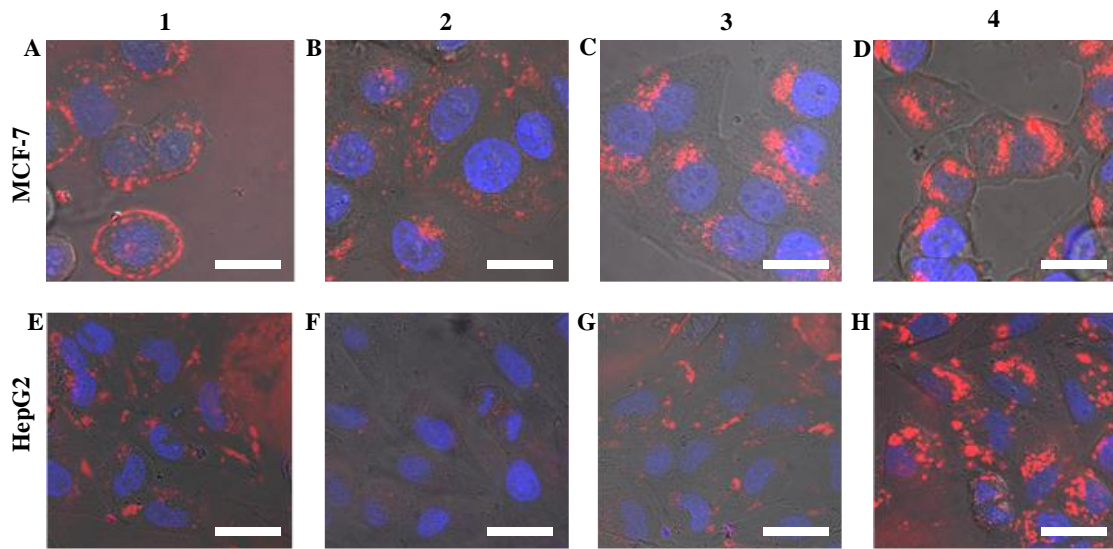
(10 pav.) bei vyksta vezikulių viduląstelinis persiskirstymas. Analizuojant KT-ais pripildytų vezikulių viduląstelinio pasiskirstymo kitimą laike, buvo nustatytos keturios KT kaupimosi fazės: 1 fazė – prikibimas prie membranos ( $t_{\text{ink}}$  0,5-1 val.) (11 pav., A), 2 fazė – vezikulių struktūrų formavimas ir pasklidimas citoplazmoje ( $t_{\text{ink}}$  0,5-6 val.) (11 pav., B), 3 fazė – vezikulių susilieėjimas ir lokalizacija aplink branduolį ( $t_{\text{ink}}$  6-24 val.) (11 pav., C) ir 4 fazė – struktūrų, panašių į multivezikulinius darinius, formavimas ir pasiskirstymas citoplazmoje ( $t_{\text{ink}} > 24$  val.) (11 pav., D).



11 pav. KT kaupimosi NIH3T3 ląstelėse dominuojančios fazės: A – 1 fazė, prikibimas prie membranos; B – 2 fazė, vezikulių struktūrų formavimas ir išsklidimas citoplazmoje; C – 3 fazė, vezikulių susilieėjimas ir lokalizacija aplink branduolį; D – 4 fazė, multivezikulinių kūnelių formavimas ir pasiskirstymas citoplazmoje. Terpė be baltymų, mastelis 20  $\mu\text{m}$

Nepaisant skirtingų KT kaupimosi etapų trukmių (10 pav.), tikslingai nemodifikuotų neigiamo krūvio apvalkalo KT kaupimosi fazės, nors stebėtos ir skirtingu inkubacijos metu, pagal susiformavusių vezikulių tipus ir

viduląstelinių vezikulių paskirstymą buvo panašios visose tirtose ląstelių linijose (11 pav., 12 pav.).



12 pav. KT kaupimosi dinamikos MCF-7 (A-D,  $t_{\text{ink}}$  0.5-24 val.) ir HepG2 (E-H,  $t_{\text{ink}}$  0.5-48 val.) ląstelėse konfokaliniai fluorescencijos ir fazinio kontrasto vaizdai: kaupimosi fazės.

Terpė be baltymų, branduoliai nudažyti su DAPI, mastelis 20  $\mu\text{m}$

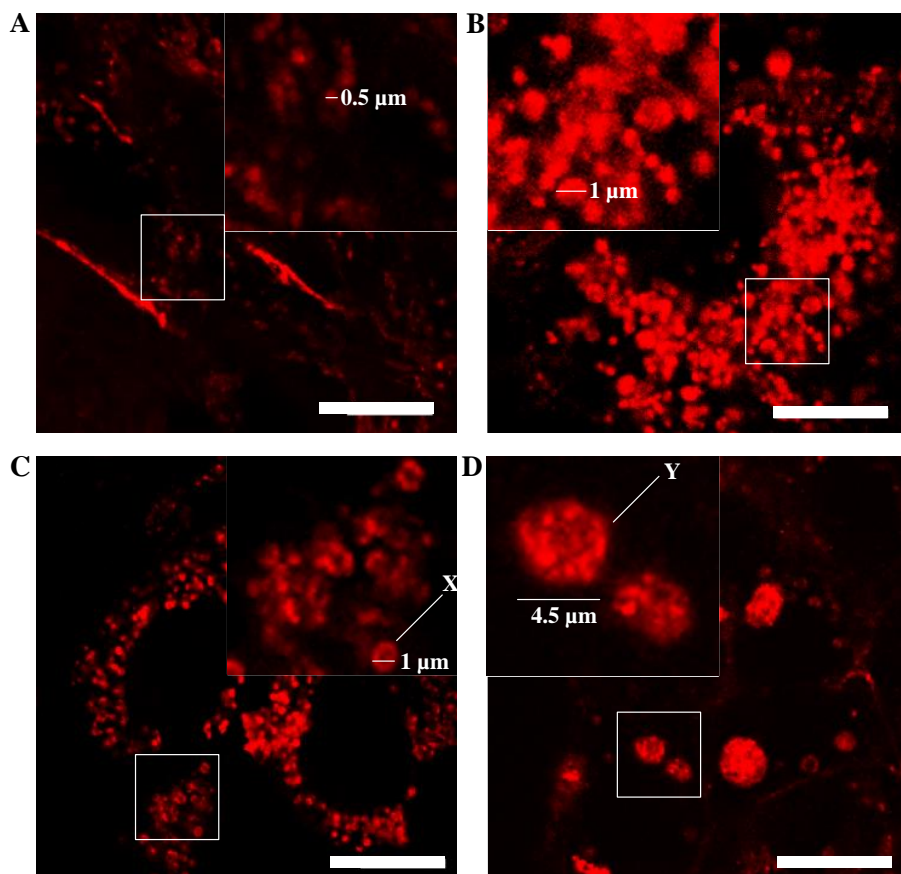
Kaip matosi 11 pav. ir 12 pav., visos KT kaupimosi ląstelėse fazės nebuvo vienodai aiškiai išreikštos tirtose ląstelių linijose. Ryškiausios jos buvo NIH3T3 ląstelėse, taip pat lengvai identifikuojamos MCF-7 ląstelėse. HepG2 ląstelėse, į kurias KT patekimas vyko lėčiausiai, kaupimosi fazės buvo sunkiau atskiriamos. Šiose ląstelėse nestebima prikibimo prie membranos fazė, tačiau 3-oji fazė (lokalizacija aplink branduolį) ir 4-oji fazė (multivezikulinių kūnelių formavimas ir pasiskirstymas citoplazmoje) pasireiškė charakteringomis KT sankauptomis. Pagrindinės šių skirtumų priežastys galėtų būti nuo ląstelių tipo priklausanti plazminės membranos sudėtis (pvz., teigiamą krūvį turinčių membranos domenų dydžio ir paskirstymo skirtumai, bei skirtingi receptorių, dalyvaujančių KT patekimo į ląsteles procese, kiekiai).<sup>[144]</sup> Nevienodos KT patekimo trukmės skirtingose ląstelių linijose taip pat gali būti sąlygotos ir specifinių KT patekimo mechanizmų į skirtingų linijų ląsteles.



Svarbu atkreipti dėmesį, kad 1-oji ir 2-oji KT pasiskirstymo ląstelėse fazės buvo anksčiau aprašytos A. Hoshino et al.,<sup>[122]</sup> M.J.D. Clift et al.,<sup>[123]</sup> W. Jiang et al.<sup>[124]</sup> ir T.A. Kelf et al.<sup>[68]</sup> parengtose publikacijose. Y. Williams et al.<sup>[59]</sup> ir F. Corsi et al.<sup>[145]</sup> parodė susiformavusių vezikulinių struktūrų pasiskirstymą citoplazmoje, atitinkantį 2-ąją fazę. 3-oji fazė – vezikulių susiliejimas ir lokalizacija aplink branduolį – buvo aprašyta L.W. Zhang et al.<sup>[125]</sup> ir Y. Xiao et al.<sup>[126]</sup> bei apžvelgta W.J. Parak.<sup>[146]</sup> 4-oji fazė yra panaši į pateikiamus duomenis apie multivezikulinių kūnelių formavimąsi ir jų pasiskirstymą citoplazmoje, kurie buvo pristatyti Y. Yuan et al.<sup>[147]</sup> ir W. Jiang et al.<sup>[61]</sup> Tačiau nei vienoje iš paminėtų studijų nebuvo pristatyti išsamūs tyrimai, iliustruojantys, kaip nuo laiko priklauso nemodifikuotų neigiamų KT patekimas ir pasiskirstymas gyvoose ląstelėse.

#### *5.1.2.2 Susiformavusių vezikulių tipai*

Atidi KT625 patekimo į ląsteles metu susiformavusių ir laike kintančių viduląstelinių vezikulių apžiūra atskleidė kelis skirtingus vezikulių tipus, kurių skersmuo kito nuo ~0,5 μm iki 8 μm (13 pav.). Mažiausios vezikulės (skersmuo iki 0,5 μm) buvo aptiktos 2-osios kaupimosi fazės metu (13 pav., A). Dviejų skirtingų tipų, tačiau vienodo dydžio vezikulės (~1 μm skersmens) buvo pastebėtos 3-osios fazės metu: pilnai KT-ais užpildytos (13 pav., B) ir panašios į žiedą vezikulės, kuriose KT buvo lyg prisitvirtinę prie vidinio membranos paviršiaus ir nepasiskirstę per visą vezikulės tūrį (13 pav., C). Didžiausios vezikulės (~5-8 μm), kurios stebėtos 4 fazėje, buvo panašios į multivezikulinius kūnelius struktūros, sudarytos iš daugelio mažų, pilnai KT užpildytų vezikulių, apjungtų vienoje didelėje vezikulėje (13 pav., D).



13 pav. Vezikulinių struktūrų susiformavusių NIH3T3 ląstelėse konfokaliniai fotoluminescencijos vaizdai skirtingų KT kaupimosi fazių metu: A – 2 fazė, B ir C – 3 fazė ir D – 4 fazė. X – vaizdas panašios į žiedą vezikulės, kurioje KT yra matomi, kaip prisitvirtinę prie vidinio paviršiaus ir nepasiskirstę per visą vezikulės tūrį; Y – heterogeniška didelės vezikulės, panašios į multivezikulinius kūnelius, struktūra. Mastelis 10 μm

Į šiuos KT patekimo į ląsteles dėsningumus buvo atsižvelgta vėlesniuose eksperimentuose, pagal nustatytą KT kaupimosi dinamiką (10 pav.) pasirenkant inkubacijos su KT trukmes, bei atrenkant vieną, NIH3T3 ląstelių liniją, kurios ląstelės sparčiai kaupia KT ir turi aiškiai išreikštus KT kaupimosi etapus bei fazes. Nuoseklūs KT patekimo į ląsteles tyrimai taip pat įgalino analizuoti ir palyginti tarpusavyje skirtingų tyrėjų pateikiamus rezultatus apie KT ir kitas nanodaleles ląstelėse.

Literatūros analizė atskleidė, kad nanodalelių patekimo, kaupimosi ir pasiskirstymo ląstelėse tyrimų rezultatų interpretavimas yra sudėtingas. Įvairių

mokslinių grupių pateikiami *in vitro* tyrimų rezultatai priklauso nuo daugelio skirtingų veiksnių, pvz., tyrimuose naudotų nanodalelių medžiagos, jų dydžio, formos, paviršiaus krūvio ir dangalo, kurie gali paveikti kvantinių taškų patekimą ir transportą ląstelėse. Pateikiamos KT patekimo į ląsteles trukmės, net jeigu lyginami panašūs KT, kurių paviršius dengtas karboksilo grupėmis ir turi neigiamą krūvį, kinta nuo 15 minučių iki kelių parų, o patekimo keliai apima daugumą endocitozės mechanizmų. Daugiausia prieštaringos informacijos yra apie patekimo trukmes ir viduląstelinį KT pasiskirstymą (3 lentelė). Atlikti nuoseklūs, apimantys ilgą laiko intervalą (0 – 48 val. ir 96 val.) KT patekimo į ląsteles tyrimai įgalino iškelti prielaidą, kad skirtumai tarp skirtingų mokslininkų grupių pateikiamų rezultatų yra sąlygoti ląstelėse vykstančių KT kaupimosi ir viduląstelinio pasiskirstymo pokyčių, kurie tais pačiais laiko momentais dar skiriasi ir kiekvienoje ląstelių linijoje. Tad identifikuoti KT kaupimosi etapai ir fazės palengvino tų rezultatų interpretavimą, kuomet pagal pateikiamas atliktų tyrimų metodikas tapo įmanoma suprasti, kuriame KT kaupimosi ir pernašos ląstelėje etape buvo atliekami tyrimai.

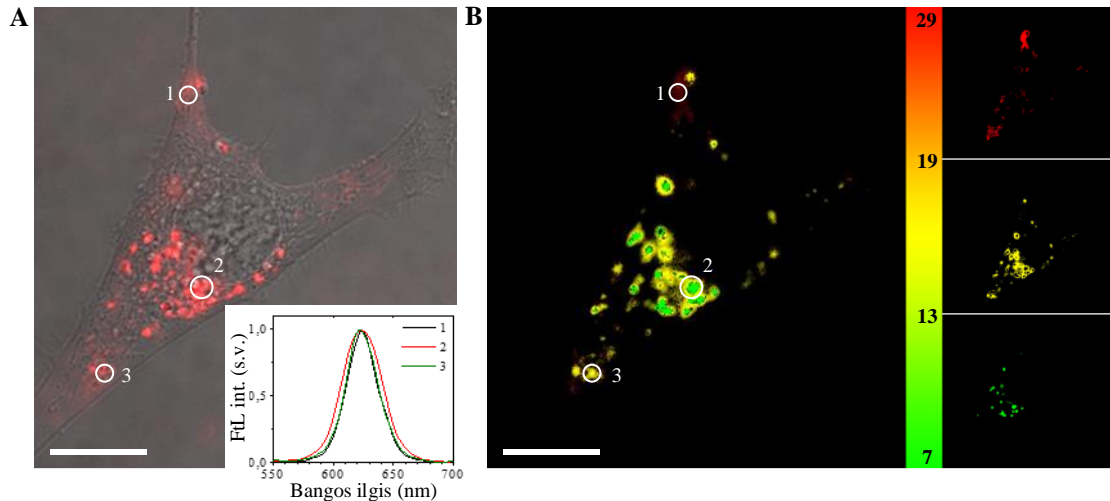
### 5.1.2.3 Vezikulių vidinės struktūros pokyčiai

Šiame skyriuje bus pristatyti bei aptariami KT viduląstelinio transporto ir endocitotinių vezikulių vidinės struktūros, kintančios priklausomai nuo KT kaupimosi fazės, tyrimų rezultatai, taikant fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopijos (FLIM) metodiką.

FLIM yra naudinga priemonė siekiant gauti didelės skyros vaizdus<sup>[148]</sup> ir nustatyti erdvinį nanodalelių pasiskirstymą,<sup>[149]</sup> bei ištirti jų mikroaplinką bei sąveikas.<sup>[134]</sup> FLIM metodikos galimybės jau buvo pademonstruotos *in vivo* ir *in vitro*, tyrimams ir vaizdinimui pritaikant nanodaleles. Ši metodika įgalina tiesiogiai vaizdinti ir analizuoti gyvose ląstelėse vykstančius procesus. Naujausi pavyzdžiai yra nanodydžio fluorescuojantys polimeriniai termometrai, naudojami vidinių ląstelės organelių temperatūros vertinimui,<sup>[150]</sup> dažais pripildytos polistireno nanodalelės, skirtos, išnaudojant

fotoluminescencijos gyvavimo trukmes, pažymėti bendrai auginamas skirtingų linijų ląstelės,<sup>[151]</sup> *in situ* vaisto doksorubicino išleidimo iš nanodalelių stebėjimai,<sup>[152]</sup> *in vivo* vaizdinimas naudojant artimojo infraraudonojo spektro ruože spinduliuojančias nanodaleles<sup>[153]</sup> ir deimantines nanodaleles.<sup>[154]</sup> O būtent kvantiniai taškai dėl ilgų FtL gyvavimo trukmių ir multieksponentinio gesimo pobūdžio<sup>[26]</sup> suteikia ypatingai dideles galimybes, išnaudojant vaizdinimui atitinkamus FtL gyvavimo trukmės intervalus, selektyviau aptikti ir jautriau užregistruoti biologiškai svarbius viduląstelinius tiriamuosius objektus. Naujausiuose tyrimuose yra pristatomi merkaptopropionine rūgštimi padengti CdSe/ZnS<sup>[155]</sup> kvantiniai taškai ir karboksilo grupėmis padengti KT,<sup>[156]</sup> kurie galėtų būti panaudoti kaip pH nanojutikliai, viduląsteliniai zondai gyvose ląstelėse. Pritaikant FLIM metodiką buvo siekiama vaizdinti skirtingas viduląstelines struktūras, kuriose susikaupę KT dėl aplinkos skirtumų pasižymi skirtingomis gyvavimo trukmėmis. Taip pat KT galima naudoti kaip energijos donorus rezonansinei energijos pernašai į fotosensibilizatorių, naudojamų fotodinaminėje navikų terapijoje, molekules. Buvo parodyta, kad FLIM suteikia papildomą informaciją apie KT ir chlorino e6 komplekso paskirstymą ląstelėse.<sup>[157,158]</sup>

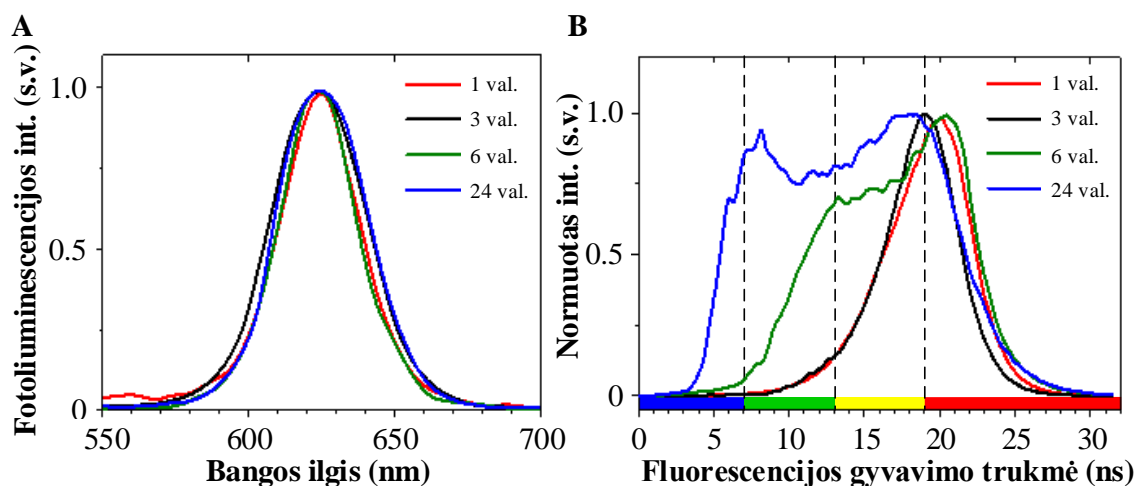
Paprastuose konfokaliniuose FtL vaizduose po 3 val. inkubacijos buvo matomas įprastasvezikulinis endocituotų raudonai (fotoluminescencijos smailė ties 625 nm) liuminescuojančių KT pasiskirstymas ląstelės citoplazmoje (14 pav., A). Tačiau FLIM vaizdai užregistruoti trijuose pasirinktuose laiko intervaluose įgalino nustatyti viduląstelinių pūslelių sandaros erdvinį heterogeniškumą (14 pav., B ir intarpai).



14 pav. NIH3T3 ląstelių, 3 val. inkubuotų su KT, mikroskopijos vaizdai: A – fazinio kontrasto ir konfokalinis fotoluminescencijos vaizdas, intarpas – normuotas fotoluminescencijos spektras baltais apskritimais nurodytose srityse; B fluorescencijos gyvavimo trukmės (FLIM) vaizdas, su parinktais skirtingais gyvavimo trukmės intervalais (7-13 ns – žalias, 13-19 ns – geltonas ir 19-29 ns – raudonas), dešinėje parodant kiekvienam parinktam intervalui (žalias, geltonas ir raudonas) atitinkančius FLIM vaizdus.

Mastelis: 5  $\mu$ m

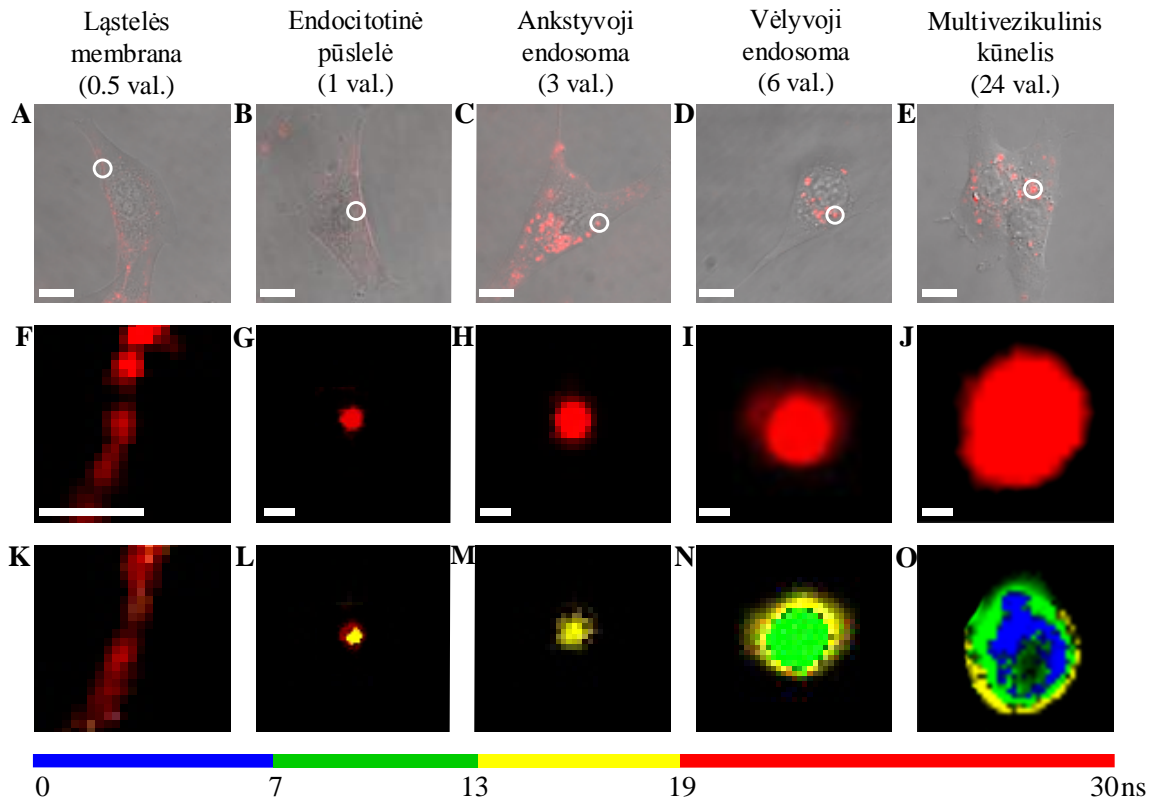
Stebimi ląstelėje esančių vezikulių su KT-ais fotoluminescencijos gyvavimo trukmių skirtumai parodo, kad viduląstelinių vezikulių viduje esantys KT yra apsupti skirtingos aplinkos.<sup>[159]</sup> Kitu atveju, t.y., jei KT esantys vezikulėse būtų homogeniškoje aplinkoje, FLIM vaizdai nesiskirtų, tik, pasirinkus skirtingus trukmių intervalus, būtų registruojamas skirtingas FtL intensyvumas. Aptikti KT sukaupusių endosomų struktūros pokyčiai laikui bėgant (11 pav. – 13 pav.) buvo toliau tiriama FLIM metodika, siekiant nustatyti KT pernašos ląstelės viduje ypatumus skirtinguose jų kaupimo etapuose. Reikšmingų skirtumų KT FtL spektruose, užregistruotuose fluorescenciniu spektrometru (15 pav., A) skirtingais momentais po inkubacijos pradžios, nebuvo, tačiau skirtumai nustatyti KT vidutinių FtL gyvavimo trukmių skirstiniuose (15 pav., B).



15 pav. A – normuoti viduląstelinių vezikulių fotoluminescencijos spektrai skirtingais inkubacijos su KT laiko intervalais; B – normuoti KT, esančių viduląstelinėse NIH3T3 ląstelių vezikulėse, vidutinės fotoluminescencijos trukmės skirstiniai skirtingais inkubacijos su KT laiko intervalais

Po 1 val. ir 3 val. inkubacijos, kai KT yra prilipę prie išorinės membranos arba jau patekę į nedideles (iki 1  $\mu\text{m}$  skersmens) endocitotines vezikules, pasiskirsčiusias citoplazmoje, vyraujančios vidutinės FtL gyvavimo trukmės yra 16-22 ns sekundžių intervale. Po ilgesnės inkubacijos (< 6 val.), kai didesnės endosomos (~2-3  $\mu\text{m}$  skersmens) su KT yra susitelkusios aplink branduolį, santykinai išaugo ir trumpesnių (10-15 ns) vidutinių FtL gyvavimo trukmių intensyvumų vertės. Kai KT patekimas į ląsteles buvo soties etape – po 24 val. inkubacijos, ir kai jau buvo susiformavusios ir pasiskirsčiusios citoplazmoje didelės (~3-8  $\mu\text{m}$ ), panašios į multivezikulinius kūnelius struktūros, – santykinai išaugo dar trumpesnių (5-9 ns) FtL gyvavimo trukmių intensyvumai (15 pav., B). KT, kurių fotoluminescencija buvo užregistruota arčiau ląstelės membranos, turėjo ilgesnes vidutines gyvavimo trukmes, lyginant su KT, kurie buvo patekę į endosomas ir įsiterpę į jų vidinę struktūrą. Taigi, ląstelėje esančių CdSe/ZnS karboksilintų KT FtL gyvavimo trukmės labai priklauso nuo viduląstelinės mikroaplinkos pokyčių, kurie yra susiję su KT inkubacijos trukme, ir su KT lokalizacija ląstelėje. FtL gyvavimo trukmės pokyčiai buvo pasitelkti tam, kad detaliam užregistruoti viduląstelinę KT pernašą pagal jau anksčiau aprašytas KT kaupimosi fazes, atsižvelgiant į

literatūroje paskelbtus endosomų tipus,<sup>[160]</sup> pradedant nuo plazminės membranos ir ankstyvųjų endosomų (<3 val.), iki vėlyvųjų endosomų (~ 6 val.) ir multivezikulinių kūnelių (MVBs, ~ 24 val.). 16 pav. pateikti įvairiose endosomose susikaupusių KT vaizdai.



16 pav. Sudėti kartu fazinio kontrasto ir konfokaliniai fotoluminescencijos NIH3T3 ląstelių vaizdai skirtingais inkubacijos su KT laiko intervalais, iliustruojantys KT pasiskirstymą ląstelėse: A – KT yra prilipę prie plazminės membranos, B ir C – endocitotinės pūslelės ir ankstyvosios endosomos, pasiskirsčiusios citoplazmoje, D – vėlyvosios endosomos, susitelkusios aplink ląstelės branduolį, E – į multivezikulinius kūnelius panašios struktūros, pasiskirsčiusios citoplazmoje, mastelis: 10  $\mu$ m. Konfokaliniai fluorescenciniai vaizdai ir fotoluminescencijos gyvavimo trukmės vaizdai: A-E vaizduose baltais apskritimais pažymėtose srityse: membrana (F, K), endocitotinė pūslelė (G, L), ankstyvoji endosoma (H, M), vėlyvoji endosoma (I, N) ir multivezikulinis kūnelis (J, O); mastelis: 1  $\mu$ m

Atkreiptinas dėmesys, kad kvantinių taškų FtL spektrai vezikulėse iš skirtingų ląstelės vietų (14 pav. A, intarpas) ir FtL spektrai užregistruoti skirtingose endocitotinių vezikulių brandos fazėse (15 pav., A) buvo beveik

vienodi. Tačiau FLIM metodikos dėka tapo įmanoma atskirti KT susikaupusius skirtingo tipo endosomose. Pačioje pirmoje fazėje, kai KT yra prilipę prie membranos (16 pav. A, F), KT vidutinės FtL gyvavimo trukmės yra ilgiausios (15 pav., B ir 16 pav. K). Kai KT yra patekę į NIH3T3 ląsteles ir susiformavusios pilnai KT pripildytos endocitotinės vezikulės, trumpesnės vidutinės FtL gyvavimo trukmės yra užregistruojamos vidiniame vezikulės tūryje, kuris yra apsuptas išorinės struktūros, turinčios ilgesnę vidutinę FtL gyvavimo trukmę, kaip ir tų KT, kurie yra sąveikoje su plazmine membrana (16 pav., B, G, L). Ankstyvosioms endosomoms pripildytoms KT buvo būdinga homogeniška vidinė struktūra (16 pav., C, H), kuriai priskirtina trumpesnė gyvavimo trukmė (16 pav., M). Vezikulės, turinčios sudėtingesnę vidinę struktūrą, buvo užregistruotos po to, kai ankstyvosios endosomos susiliejo su vėlyvosiomis endosomomis (16 pav., D, I, N bei E, J, O). FLIM vaizdai parodė skirtingų gyvavimo trukmių pasiskirstymą išorinėje vezikulių dalyje ir vidiniame tūryje. Heterogeninės multivezikulinio kūnelio struktūros vaizdas buvo gautas naudojant tris trukmių intervalus, o trumpiausios vidutinės gyvavimo trukmės buvo užregistruotos vidurinėje pūslelės dalyje (16 pav., O, pavaizduota mėlyna spalva). Žalios spalvos plotas regimas pačiame centre, labai tikėtina, vaizduoja membranos įlinkius arba vidines (*angl. intraluminous*) vezikules. Yra žinoma, kad vidinių membranų įlinkiai į vezikulių vidinį tūrį prasideda ankstyvųjų endosomų fazėje ir tęsiasi, kol endosoma bręsta iki vėlyvosios endosomos.<sup>[161]</sup> Lipidų sudėtis vėlyvosiose endosomose skiriasi nuo lipidų sudėties ankstyvosiose endosomose. Jie yra praturtinti trigliceridais, cholesterolio esteriais ir fosfolipidais. Palyginus su išorine vezikulės membrana, vidinėse vėlyvųjų endosomų ir multivezikulinių kūnelių membranose yra ženkliai daugiau hidrofobinių, kūgio formos fosfolipidų, kurie yra skirti membranų išlenkimui, svarbiam formuojantis multivezikuliniams kūneliams.<sup>[161]</sup>

Vienas iš svarbių aplinkos veiksnių, darančių įtaką ląstelės viduje esančių KT FtL gyvavimo trukmei, yra terpės rūgštingumas arba pH. Ankstyvosios endosomos viduje pH vertė yra 6,5–6,4 (palyginus su pH 7,2 citozolio), o



multivezikuliniuose kūneliuose pH yra 6,0–5,0 ir, po susilieimo su lizosomomis, yra pasiekiamas pH 5,0–4,5<sup>[162]</sup> Tiriant KT FtL gyvavimo trukmių pokyčius nuo pH, buvo nustatyta, kad ląstelės aplinka, kurios pH yra žemas, gesina KT fotoluminescenciją,<sup>[163]</sup> ir vidutinės gyvavimo trukmės, kurios buvo matuojamos plazminėje membranoje, citoplazmoje ir endosomose, buvo trumpesnės labiau rūgštiniame pH.<sup>[156]</sup> Taip pat buvo pademonstruota, kad KT gyvavimo trukmė rūgštinėse lizosomose (pH 4,5–5,0) buvo dar trumpesnė, negu rūgštiniame vandeniniame tirpale, kurio pH 2,2, parodant, kad rūgštinė aplinka nėra vienintelė priežastis, trumpinanti ląstelių viduje esančių KT fotoluminescencijos gyvavimo trukmes. Fotofizikinės puslaidininkinių KT savybės yra labai priklausomos nuo procesų, kurie vyksta šių nanodalelių paviršiuje. Žinoma, kad bendroju atveju FtL gyvavimo trukmė  $\tau$  yra atvirkščiai proporcinga relaksacijos vyksmų spartos konstantai  $k = k_s + k_{ns}$ , kur  $k_s$  ir  $k_{ns}$  yra atitinkamai spindulinio ir nespindulinio gesimo spartos konstantos. Didesnė nespindulinio gesimo sparta sąlygoja FtL kvantinio našumo mažėjimą ir trumpesnę FtL gyvavimo trukmę.<sup>[164]</sup> Sąveika tarp terpės biomolekulių ir tų, kuriomis yra padengtas KT, gali paskatinti nespindulinį gesimą ir sąlygoti trumpesnes vidutines FtL gyvavimo trukmes. KT suspenduotų fosfatiname buferyje (PBS, pH 7.4), kuriame buvo ištirpdytos ir skirtingos aminorūgštys bei baltymai, FtL gesimo analizė parodė, kad didesnė aminorūgščių koncentracija sąlygojo trumpesnes KT FtL gyvavimo trukmes.<sup>[164]</sup> FtL gyvavimo trukmių mažėjimas taip pat buvo užregistruotas ir neigiamo paviršiaus krūvio KT, kurie sąveikavo su teigiamą krūvį turinčiais viduląsteliniiais baltymais.<sup>[165]</sup> Dar viena prielaida dėl atsirandančių trumpiausių vidutinių FtL gyvavimo trukmių, kurios užregistruotos vėliausiame KT kaupimosi etape, yra tai, kad subrendusiose endosomose KT gali būti žymiai tankiau suspausti,<sup>[166]</sup> ir jų FtL gyvavimo trukmės gali trumpėti dėl energijos pernašos tarp šalia esančių skirtingo dydžio KT. Tiriamųjų KT stabilizuojantis sluoksnis (dangalas) yra pagamintas iš PEG su jonizuojamomis karboksilo rūgšties grupėmis, taigi KT sąveika su mikroaplinka yra priklausoma nuo jos pH. Žemo pH sąlygomis, kai protonuotų karboksilo

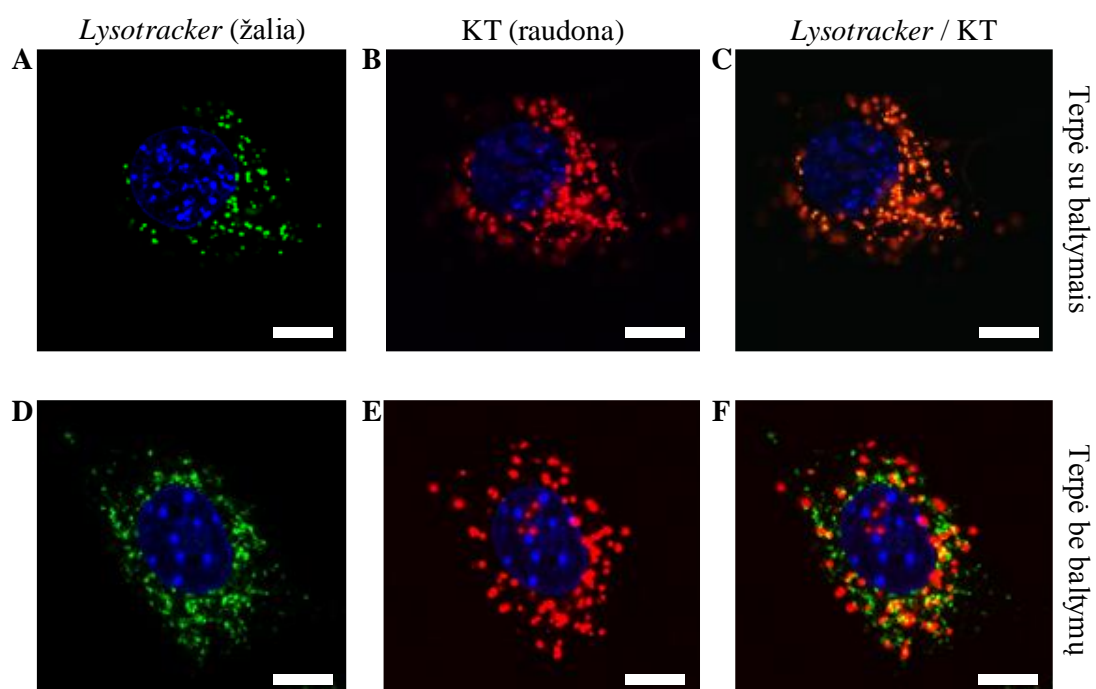
grupių frakcija didėja, tai skatina vandenilinių jungčių formavimąsi tarp KT dangalo ir biomolekulių,<sup>[165]</sup> taip skatinant ir stipresnę KT tarpusavio sąveiką. Taigi, KT FtL vidutinių gyvavimo trukmių pokyčiai, užregistruoti jų kaupimosi ląstelėse metu, labiausiai tikėtina, yra sąlygoti besikeičiančios biomolekulių sudėties ir rūgštingumo heterogeniškoje viduląstelinėje mikroaplinkoje, kurie keitė KT dangalo molekulinę sąveiką, o tai sukėlė nanodalelių fotoluminescencijos pokyčius.

Šiais eksperimentais buvo pirmą kartą parodyta, kad naudojant FLIM metodiką ir kvantinius taškus, galima atskirti KT sukaupusias endosomas bei vizualizuoti vidines endosomų membranų ir vidinių vezikulių struktūras. Pastebėtas erdvinis šių endocitozės metu susiformavusių ląstelės organelių heterogeniškumas leidžia svarstyti apie galimybes, naudojant KT kartu su FLIM metodika, bei parinkus tinkamus gyvavimo trukmių intervalus, tiksliai atskirti skirtingos brandos endosomas pagal jų struktūros ypatybes. Tačiau reikia tolesnių tyrimų, siekiant nustatyti ląstelių viduje esančių KT skirtingų FtL gyvavimo trukmių sąsajas su biomolekulinėmis struktūromis (membranomis, baltymais).

### ***5.1.3 Netikslinių kvantinių taškų paskirstymą ir likimą ląstelėse sąlygojantys veiksniai***

Papildomi inkubacijos sąlygų įtakos KT pasiskirstymui ir likimui NIH3T3 ląstelėse tyrimai buvo atliekami naudojantis fluorescenciniu per membranas prasiskverbiančiu selektyviu rūgštinės terpės organelių žymekliu *Lysotracker*. *Lysotracker* molekuliniai zondai yra sudaryti iš fluoroforo, prijungto prie silpnos bazės, kuri neutraliame pH yra tik dalinai protonuota ir laisvai prasiskverbia per ląstelės membranas. Jie dažniausiai yra naudojami žymėti organelės (lizosomas) esant tam tikram (rūgštiniam) pH. Kadangi tos pačios keturios KT kaupimosi ląstelėse fazės buvo užregistruotos naudojant inkubacijos terpę su baltymais ir terpę be jų, *Lysotracker* buvo panaudotas, siekiant įvertinti, ar abiem atvejais viduląstelinė KT pernaša įtraukė ir lizosomas.

Konfokaliniai NIH3T3 ląstelių mikroskopijos vaizdai po 24 val. inkubacijos su KT parodė, kad fluorescenciniai KT pripildytų vezikulių ir *Lysotracker* (žaliai fluorescuojantis) nudažytų vezikulių vaizdai sutapo, kai buvo inkubuojama terpėje su baltymais (17 pav., A-C), bet KT ir *Lysotracker* bendra lokalizacija konfokalinuose fluorescenciniuose vaizduose nėra stebima, kai ląstelės su KT buvo inkubuojamos terpėje be baltymų (17 pav., D-F). *Lysotracker*-sukaupusios vezikulės be KT buvo pasklidusios ląstelės citoplazmoje (17 pav., D). KT buvo stebimi *Lysotracker*-nesukaupusiose vezikulėse, su, tikėtina, didesnėmis vidinio pH vertėmis (17 pav., E).



17 pav. Konfokaliniai fluorescencijos vaizdai iliustruojantys kvantinių taškų lokalizaciją NIH3T3 ląstelėse po 24 val. inkubacijos terpėje su baltymais (A-C) ir be baltymų (D-F): A, D – užregistruota žaliame ir mėlyname kanale, rodo žalią *Lysotracker* dažo fluorescenciją, B, E – užregistruota raudoname ir mėlyname kanale, rodo raudoną kvantinių taškų fotoluminescenciją, C, F – apjungti vaizdai. Branduoliai nudažyti su DAPI, mastelis 10  $\mu\text{m}$

Aprašytieji trys KT susikaupimo ląstelėse etapai ir keturios KT viduląstelinio pasiskirstymo fazės buvo nustatytos konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos metodu ir nepriklausė nuo inkubacijos terpės

sudėties. Tačiau eksperimentas su *Lysotracker* žymekliu parodė, kad inkubacijos terpės sudėtis veikia viduląstelinį KT, esančių vezikulėse, transportą ir lemtį ląstelėse. Baltymai ar jų stygius terpėje paveikia pirminius patekimo į ląsteles žingsnius: ląstelėse, inkubuotose terpėje be baltymų, KT pripildytos vezikulės nesusiliejo su lizosomomis (17 pav., D-F), tačiau ląstelėse, inkubuotose terpėje su serumo baltymais, KT užpildytos vezikulės atitiko žymeklį sukaupusias lizomas (17 pav., A-C).

Tyrimuose, atliktuose su nemodifikuotais karboksilo grupėmis dengtais ZnS/CdSe kvantiniais taškais (KT545) ir J774.A1 ląstelėmis taip pat buvo nustatyta, kad KT fotoluminescencijos sritys po 2 val. inkubacijos terpėje su baltymais atitiko *Lysotracker* fluorescenciją.<sup>[123]</sup> KT lokalizacija lizosomose po 12 val. inkubacijos buvo patvirtinta ir MCF-7 ląstelėse, naudojant KT655 ir geltonai fluorescuojantį *Lysotracker*.<sup>[126]</sup> Dalinė KT užpildytų vezikulių ir lizosomų atitiktis terpėje be baltymų užregistruota ir aprašyta S. Barua et al.,<sup>[121]</sup> tačiau ženkli KT užpildytų vezikulių dalis *Lysotracker* nebuvo sukaupusi. Aprašytuose tyrimuose viduląstelinių KT užpildytų vezikulių prigimtis nebuvo įvardinta, o buvo pasiūlytas paaiškinimas, kad vezikulių rūgštėjimas ir ryškus nusidažymas su *Lysotracker* gali būti sąlygotas rūgštinės vezikules užpildančių KT karboksilo dangalų prigimties. Viduląstelinio pasiskirstymo tyrimai, atlikti kelioms nerūgštinės dangalų prigimties nanodalelėms,<sup>[167,168]</sup> atskleidė, kad užpildytų šiomis nanodalelėmis vezikulių lokalizacija nesutapo nei su ankstyvosiomis endosomomis, nei su lizosomomis. Todėl, interpretuojant KT kaupimosi ir viduląstelinio pasiskirstymo rezultatus turi būti atsižvelgiama į KT dangalo prigimtį ir galimą jo poveikį intravezikuliniam pH.

Labai tikėtina, kad inkubuojant terpėje su serumo baltymais, prilipę prie KT paviršiaus baltymai stabilizavo KT dangalą.<sup>[169]</sup> Kitu atveju, patekę į lizomas KT būtų buvę degraduojami ir sąlygotų ląstelių inaktyvaciją, kadangi KT nėra stabilūs rūgštinėje aplinkoje,<sup>[170,171]</sup> ir šerdies elementai yra labai toksiški ląstelėms. Tačiau buvo pastebėta, kad KT susikaupimas neturi įtakos ląstelių

gyvybingumui, ir net po 96 val. inkubacijos jos išlieka morfologiškai nepakitusios (18 pav., C). Šių užregistruotų stabilių ir ilgamažių endocitotinių struktūrų likimas yra aktyviai diskutuojamas literatūroje.<sup>[19,172]</sup> Bendros lokalizacijos skirtumai, nustatyti tarp baltymais nepadengtų KT (5 pav., A) ir KT su baltymų vainiku (5 pav., B), leidžia kelti prielaidą, jog ląstelės nevienodai atpažįsta KT su skirtingais dangalais, ir jie į ląsteles patenka ne tais pačiais endocitozės keliais.

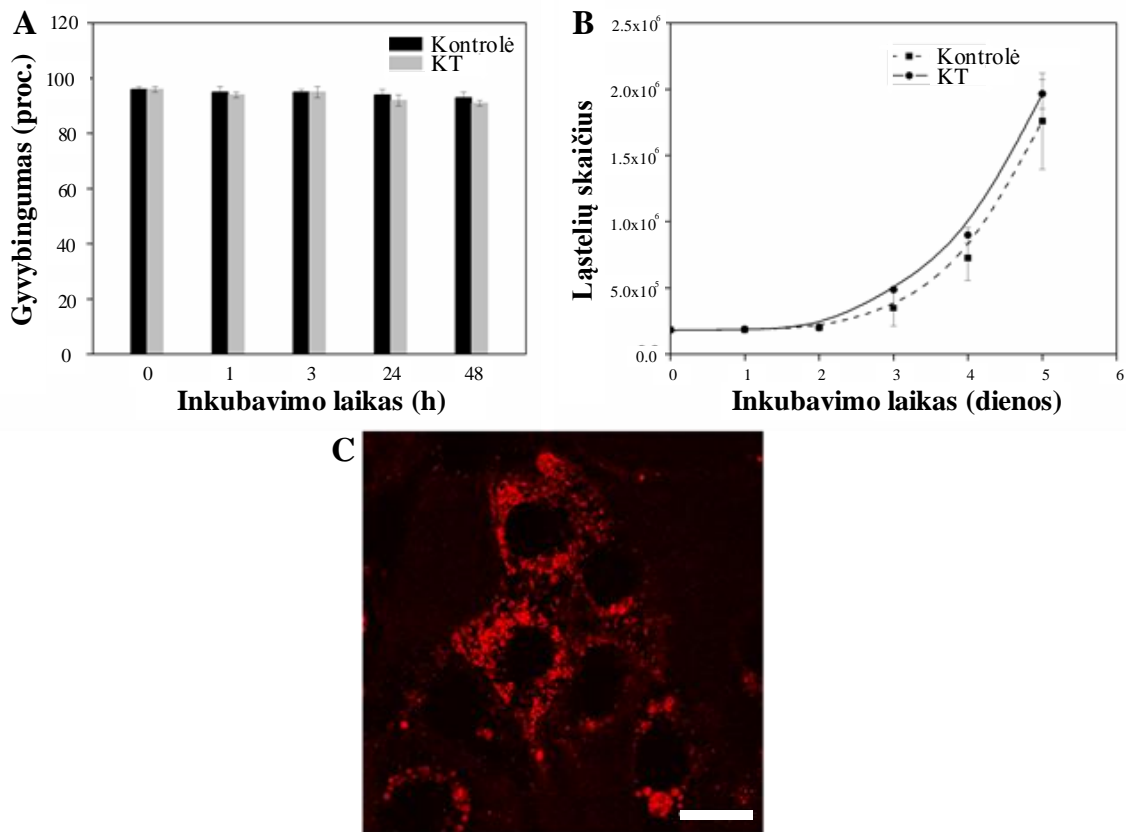
#### **5.1.4 Kvantinių taškų citotoksiškumas bei pašalinimas iš ląstelių**

##### **5.1.4.1 Kvantinių taškų įtaka ląstelių gyvybingumui ir dalinimuisi**

KT toksiškumas yra svarbus aspektas, į kurį būtina atsižvelgti siekiant pritaikyti KT biomediciniuose tyrimuose bei diagnostikoje ar terapijoje. Per pastarąjį dešimtmetį siekiant pagrindinio tikslo – naudoti KT klinikiuose taikymuose<sup>[173]</sup> – labai daug mokslininkų pastangų buvo nukreipta į aukštos kokybės KT sintezę, optimizuojant nanokristalų sintetinimo metodus, funkcionalizuojant KT paviršius, siekiant padidinti jų biosuderinamumą bei formuojant įvairius paviršinius KT dangalus, skirtus tiksliniam taikymui ar terapiniam poveikiui.<sup>[174]</sup> KT nanokristalai daugiausia yra sudaryti iš sunkiųjų metalų (pvz., Cd, Te, Pb ir kt.), todėl yra atliekama daug tyrimų *in vitro* ir *in vivo* siekiant nustatyti potencialų žalingą KT poveikį organizmui. Skirtingų mokslinių grupių atlikti tyrimai parodė, kad endocituoti KT, ilgainiui patekę į rūgščios terpės vėlyvasias endosomas ir/ar lizosomas, yra ląstelėms toksiški, dėl KT sudarančių medžiagų išsiskyrimo,<sup>[175-177]</sup> sąlygojančio ląstelių žūtį.<sup>[178]</sup> Tačiau yra rezultatų, kuriais parodyta, kad jeigu KT paviršius yra tinkamai ir pilnai pasyvuotas, tuomet KT yra mažiau toksiški ar visai netoksiški.<sup>[179-181]</sup> Yra nustatyta, kad CdSe šerdies KT, padengtų ZnS apvalkalu, toksiškumas yra ženkliai mažesnis, nei KT be apvalkalo. KT paviršiaus cheminė sudėtis, struktūra ir krūvis taip pat veikia KT toksiškumą. Kartu su šerdies apvalkalu padengiant KT ir polimeriniu dangalu (pvz., polietilenglikoliu, PEG) ar kitais neorganiniais dangalais, pvz., siliciu, galima suformuoti barjerą, izoliuojantį iš kadmio sudarytą šerdį nuo biologinės aplinkos. Dažniausiai naudojamas PEG

darinys yra fosfolipidinis-PEG (DSPE-PEG), nes jis KT suteikia pakankamą stabilumą ir yra patogiai pritaikomas tolimesniam KT funkcionalizavimui. Nustatyta, kad saugi *in vitro* eksperimentuose naudojamų DSPE-PEG padengtų KT dozė yra iki 100–150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ,<sup>[182]</sup> tačiau taip pat labai svarbu atsižvelgti ne tik į išorinę, bet ir į endocituotų KT koncentraciją.<sup>[183]</sup> Pateikiami kontrastuojantys citotoksiškumo rezultatai yra daugiausia sąlygoti to, kad biologinis atsakas į sąveiką su nanodalelėmis priklauso nuo nanodalelių tipo (nanokristalo medžiagos), jų savybių (formos, krūvio, paviršiaus), o taip pat ir citotoksiškumo eksperimentuose naudotų ląstelių linijų (atsparumo) bei naudotų tyrimų metodų.<sup>[184,185]</sup> Jau yra iškeltas poreikis standartizuoti *in vitro* ir *in vivo* nanodalelių toksiškumo tyrimus, kad rezultatai galėtų būti interpretuojami vienareikšmiškai, ir išvados perkeliamos iš *in vitro* į *in vivo* eksperimentus ir tolimesnius klinikinius tyrimus.<sup>[12]</sup> Dažniausiai *in vitro* nanodalelių toksiškumo tyrimas apima ląstelių gyvybingumo, dalinimosi ir morfologinių pokyčių analizę, taip įvertinant nanodalelių biosuderinamumą. O siekiant nustatyti citotoksiškumo mechanizmus yra naudojami atitinkamų genų raiškos ar imuninių atsakų sukėlimo biocheminiai tyrimai.<sup>[12,186]</sup>

NIH3T3 ląstelių inkubuotų su KT625 citotoksiškumo vertinimo rezultatai yra pateikiami 18 pav. KT citotoksiškumas ląstelėms buvo vertinamas pagal KT poveikį NIH3T3 ląstelių gyvybingumui ir dalinimuisi, naudojant XTT metodą. Gyvybingų ląstelių skaičius ir gaminamo dažo kiekis koreliuoja – kuo daugiau ląstelių, tuo dažo spalvos intensyvumas yra didesnis. Taip sveikų ir negyvų ląstelių skaičius įvertinamas matuojant dažo sugerties koeficiento pokyčius. Gautos optinio tankio vertės buvo prilygintos gyvybingumo vertėms procentais – kontrolinės grupės sugertis buvo prilyginta 100 proc., o likusios vertės skaičiuotos pagal proporcijas.



18 pav. NIH3T3 ląstelių inkubuotų su KT625 gyvybingumas – A ir dalinimasis laike – B; C – konfokalinis NIH3T3 ląstelių fotoluminescencijos vaizdas po 96 val. inkubacijos su KT.

Terpė su baltymais, mastelis 10  $\mu\text{m}$ .

Įprastos koncentracijos (10 nM) KT citotoksiškumas, t.y., poveikis ląstelių gyvybingumui ir dalijimuisi, – pastebėtas nebuvo. Ląstelės liko gyvybingos lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, esančiomis tokioje pačioje aplinkoje, bet be KT (18 pav., A). Taip pat nebuvo pastebėtas ir KT poveikis ląstelių dalinimuisi (18 pav., B), ląstelės inkubuojamos su KT dalinasi ne lėčiau, nei kontrolinės ląstelės.

Keliose mokslininkų grupėse buvo iškelta mintis, kad KT viduląstelinė lokalizacija taip pat yra svarbi jų sukeliama citotoksiškumui,<sup>[187,189]</sup> nes susikaupę citoplazmoje aplink konkrečias ląstelės organelės, KT gali paveikti tos organelės funkcijas. Tačiau šiuose tyrimuose nebuvo įvertintas KT kaupimosi ląstelėse kitimas laike ir užpildytų KT vezikulių persiskirstymas ląstelės viduje. Mūsų tyrimai parodė, kad ląstelių vezikulių struktūros net ir po

96 val. inkubacijos terpėje su KT ir baltymais nebuvo pakitusios (18 pav., C), o ląstelės išlaikė savo įprastą formą, t.y. nesitraukė, nesidarė apvalesnės ir neatkibo nuo paviršiaus. Tad KT išlieka stabilūs net ir po ilgalaikio susikaupimo vėlyvose endosomose ar lizosomose, nesukeldami poveikio ląstelių gyvybingumui ir dalinimuisi.

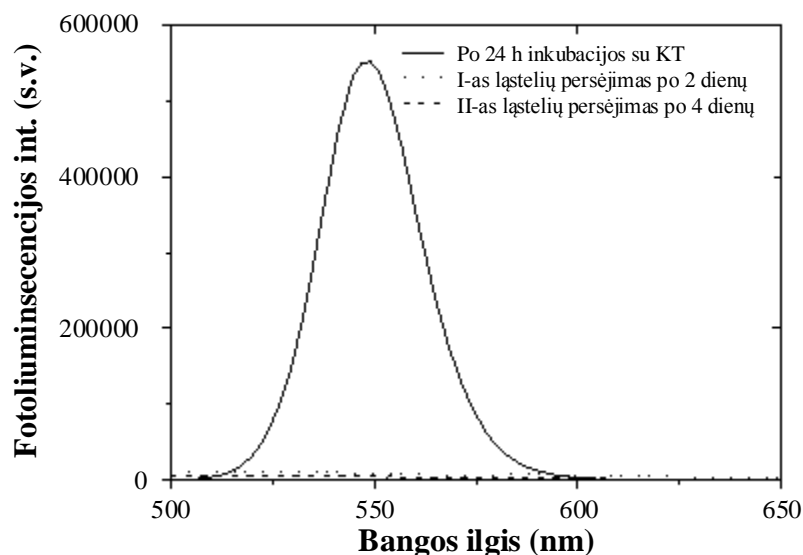
HepG2 ir PHL (pirminėse žmogaus kepenų) ląstelėse atlikti tyrimai taip pat nustatė, kad KT (iki 40 nM koncentracijos) 48 val. ir 72 val. inkubacija neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau po 24 val. inkubacijos PHL ląstelėse sukėlė uždegiminius atsakus.<sup>[189]</sup> Taip pat buvo nustatyta, kad didesnės KT koncentracijos (> 75 nM) jau pradeda stabdyti ląstelių dalinimąsi, o viršijus 300 nM, beveik visai jį inhibuoja.<sup>[187]</sup> Ląstelių dalinimasis ir jų metabolizmas yra susiję ląsteliniai procesai.<sup>[190]</sup> Kaip parodė ląstelių gyvybingumo tyrimai, Cd turinčių kvantinių taškų citotoksiškumas yra labiau susijęs su ląstelių metabolinio aktyvumo slopinimu, nei su tiesiogiai sukelta ląstelių žūtimi. O metabolinių procesų slopinimas ląstelėse dažniausiai yra siejamas su mitochondrijų pažeidimu ir oksidaciniu stresu.<sup>[191]</sup> Oksidacinis stresas yra įvardinamas kaip pagrindinis nanodalelių sukeliama citotoksiškumo mechanizmas.<sup>[192]</sup> Patekę į ląsteles KT gali sutrikdyti oksidacinį ląstelės balansą dėl išaugusios reaktyvių deguonies atmainų (*angl. reactive oxygen species*, ROS), tokių kaip superoksidas ( $O_2^-$ ), hidroksilo radikalas ( $HO^\cdot$ ), peroksido radikalas ( $ROO^\cdot$ ) ar singuletinis deguonis bei vandenilio peroksido ( $H_2O_2$ ) generacijos. Daugelyje pastarųjų metų tyrimų yra teigiama, kad ROS generavimas ir to pasėkoje kylantis oksidacinis stresas yra dažnai stebimi ląstelių atsakai paveikus įvairiomis nanodalelėmis, priklausomai nuo jų dydžio (ir paviršiaus reaktyvumo) bei naudojamos dozės.<sup>[193-195]</sup> Nanodalelių sukeltas oksidacinis stresas taip pat sukelia vėlesnius nuo streso priklausančius ląstelės molekulinis signalus ir patofiziologinius atsakus, įskaitant genotoksiškumą, uždegimą, apoptozę, lipidų peroksidaciją ir fibrozę.<sup>[193]</sup> *In vitro* tyrimais galima įvertinti nanodalelių toksiškumą kultivuojamoms ląstelėms.<sup>[8]</sup> Tokių tyrimų svarba atsiskleidžia galimybėmis iš anksto numatyti galimą nanodalelių toksiškumo mechanizmą prieš tiriant nanodaleles gyvūnų modeliuose. Tik



įsitikinus, kad nanodalelės yra biosuderinamos ir nesukelia citotoksinio poveikio *in vitro*, prasminga pradėti *in vivo* tyrimus.

#### 5.1.4.2 Kvantinių taškų pašalinimas iš ląstelių

KT pašalinimo iš ląstelių tyrimams NIH3T3 ląstelės buvo 24 val. inkubuojamos su KT, po to tris kartus plautos ir persėtos, paliekant jas terpėje be KT. Po 2-jų ir po 4-ių dienų nuo persėjimo buvo tirta terpė, kurioje buvo inkubuotos ląstelės, siekiant nustatyti, ar joje atsirado KT. Tačiau KT šalinimas iš ląstelių, naudojantis fluorescencinės spektroskopijos metodais, nebuvo aptiktas (19 pav.). Kad KT išlieka vezikulinėse struktūrose parodė ir konfokaliniai fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, užregistruoti po 96 val. inkubacijos (18 pav., C).



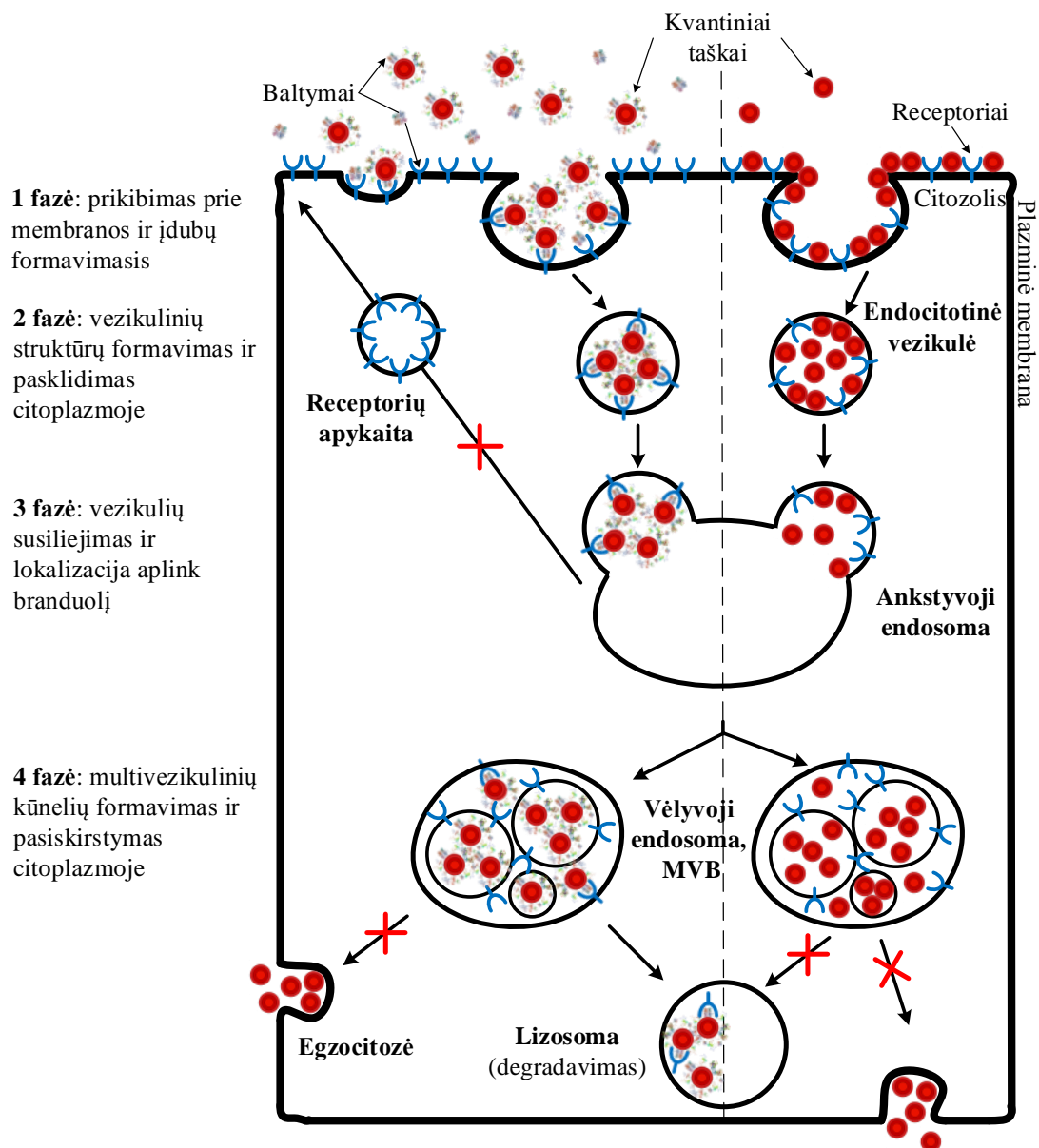
19 pav. Terpės su baltymais, naudotos NIH3T3 ląstelių inkubavimui su KT545 ir terpių, naudotų persėjant sukaupusias KT NIH3T3 ląsteles, fotoluminescencijos spektrai. Žadinimo bangos ilgis 405 nm

Literatūroje yra teigiama, kad KT į ląsteles patenka endocitozės būdu, o iš ląstelių pašalinami egzocitozės būdu.<sup>[8,19]</sup> L. Peng et al.<sup>[114]</sup> atliktuose tyrimuose su karboksilintais kvantiniais taškais CdSe/ZnS ir HepG2 ląstelėmis, panaudojant indukuotos plazmos masių spektrometrija, buvo nustatyta, kad po

24 val. inkubacijos su KT (koncentracija 20 nM) palikus ląsteles 12 val. įprastoje terpėje, viduląstelinė KT koncentracija mažėjo, tačiau išliko didesnė nei 40 proc. pirminės koncentracijos, o KT buvo likę ląstelėse ir po 48-ių valandų. X. Jiang et al.<sup>[124]</sup> tyrė cviterjoninių KT (CdSe/ZnS, padengtų D-penicilaminu) patekimo į ląsteles ir šalinimo mechanizmus. Šių tyrimų metu nustatyta, kad per pirmąją valandą endocituoti KT vezikulėse juda nuo išorinės membranos link branduolio, o po to KT pripildytos endosomos ilgainiui ima grįžti link plazminės membranos. Egzocitozė buvo tiriama pagal pasilikusių ląstelėse KT koncentraciją, egzocituotų KT frakciją apskaičiuojant pagal sumažėjusį viduląstelinį KT FtL intensyvumą. Tačiau nei vienoje iš šių publikacijų nebuvo aprašyti terpės, kurioje buvo inkubuojamos ląstelės, tyrimai, siekiant įvertinti nanodalelių atsiradimą švarioje terpėje. Be to, aptartuose tyrimuose nebuvo atsižvelgta į ląstelių dalinimąsi. Šio veiksnio įtaka, ir to pasėkoje mažėjantis KT FtL intensyvumas ląstelėse aptariamas 5.2.3 skyriuje. Aptartuose tyrimuose taip pat nebuvo atsižvelgta į KT kaupimosi laikinius pokyčius bei KT kaupimosi fazes, kurių metu KT pripildytos vezikulės persiskirto ląstelėje. Kitose publikacijose, aprašančiose nanodalelių pašalinimo iš ląstelių tyrimus, taip pat buvo skelbiama, kad į ląsteles patekusios nanodalelės nėra visai pašalinamos ilgiau nei po 24 val.,<sup>[56,124,196]</sup> arba pašalinamos žymiai lėčiau, nei kaupiasi ląstelėse,<sup>[56,197,198]</sup> tačiau nanodalelių užlaikymo ląstelėse priežastys nėra įvardinamos.

#### ***5.1.5 Kvantinių taškų kaupimosi ir pasiskirstymo ląstelėse tyrimų rezultatų apibendrinimas***

Apibendrinant kvantinių taškų kaupimosi ir pasiskirstymo ląstelėse tyrimų rezultatus, patiekama schema (20 pav.), iliustruojanti tikslingai nemodifikuotų karboksilo grupėmis dengtų KT kaupimosi procesą ir pagrindines KT kaupimosi ląstelėse fazes.



20 pav. Schema, iliustruojanti tikslingai nmodifikuotų neigiamo paviršiaus krūvio kvantinių taškų lemtį NIH3T3 ląstelėse: kaupimąsi, viduląstelinį transportą ir pasiskirstymą. Raudonais „X“ pažymėti vyksmai, kurie nebuvo stebimi eksperimentų metu, bet įprastai aprašomi literatūroje

KT patekimas į ląsteles gali vykti keliais galimais pradiniais būdais: baltymai iš augimo terpės adsorbuojami ant KT paviršiaus, o po to baltymų vainiku padengti KT patenka į ląsteles per receptoriais reguliuojamą endocitozės kelią,<sup>[68]</sup> arba KT nespecifiškai jungiasi prie plazminės membranos, susidarant neigiamų nanodalelių klasteriams prie katijoninių

membranos sričių, taip suaktyvinant receptorių ir inicijuojant endocitozę.<sup>[53]</sup> Siūlomoje schemoje KT kaupimosi ląstelėse procesas prasideda nuo KT prilipimo prie plazminės membranos (11 pav., A). Tuomet, 1 fazės metu (11 pav., B), KT patenka į ląstelę, kaip kroviny, uždarytas į receptoriais padengtą pūslelę, vadinamą endocitotine vezikule. KT prilipimas prie membranos, t.y., 1 fazė (11 pav.) dominavo I-ame, lėtajame kaupimosi etape. Sugretinus šį faktą su laike stebimu kaupimosi įsisotinimu (III-as – soties etapas, 10 pav.), šių procesų priežastimi būtų galima įvardinti palaiptinį receptorių rūšiavimo ir apykaitos procesų slopinimą. Kad KT patekimas į ląstelę galėtų tęstis, receptoriai turi būti sugražinami atgal prie plazminės membranos. O jeigu šis receptorių apykaitos procesas užtrunka, sumažėja galimų receptorių skaičius, kuriuos gali suaktyvinti nanodalelės, kai jos prilimpa prie membranos. Todėl į ląstelę gali patekti vis mažiau naujų nanodalelių, KT patekimo į ląstelės procesas ima sotintis. O vėlesniame etape užpildytos vezikulės persiskirsto ląstelės viduje. Tuomet skirtingose ląstelių linijose stebėtus skirtumus tarp užregistruotų kaupimosi fazių galėjo sąlygoti plazminės membranos sudėties nevienodumas<sup>[199]</sup> bei kitokie plazminėje membranoje esančių receptorių kiekiai.

Nepriklausomai nuo patekimo į ląsteles būdo, 2 fazės metu, kuri dominuoja II-ame (augimo) etape, endocituotas kroviny patenka į ankstyvąsias endosomas (11 pav., B).<sup>[200]</sup> Toliau vyksta kontroliuojama migracija (prieš koncentracijos gradientą), susiliejimasis į didesnes vezikules ir koncentracija aplink branduolį (3 fazė), arti Goldžio komplekso ir mikrotubulių valdymo centro,<sup>[201]</sup> (11 pav., C). 3 fazė dominuoja prasidedant soties etapui. Per 24 val. ankstyvosios endosomos subręsta iki vėlyvųjų endosomų (4 fazė), kurios vėl pasiskirto po citoplazmą ir susiliedamos tarpusavyje suformuoja ilgai gyvuojančius multivezikulinius kūnelius (11 pav., D, 18 pav., C). Pagal aptiktų KT pripildytų vezikulių dydžius ir tipus bei FLIM metodikos dėka galima atskirti KT susikaupusius skirtingo tipo endosomose ir susiformavusias endosomas suskirstyti į tris tipus. Pirmojo tipo endocitotinės vezikulės (skersmuo iki 1 μm, formavimosi trukmė 15 min – 1 val.) homotipiškai

susilieja į didesnes vezikules.<sup>[202]</sup> Nors KT fotoluminescencija tokioje vezikulėje yra tolygi visame tūryje (16 pav., G), tačiau su FLIM galima išskirti KT vezikulės membranoje ir jos tūryje pagal jų FtL gyvavimo trukmes (16 pav., L). Antrojo tipo, ankstyvosios endosomos (iki 5 μm skersmens, formavimosi trukmė 1-3 val.) daugiausia yra sferos pavidalo,<sup>[203]</sup> KT jose pasiskirstę tolygiai, tačiau juos taip pat galima atskirti pagal trumpesnes KT FtL gyvavimo trukmes (16 pav. H, M). Trečiojo tipo, vėlyvosios endosomos/multivezikuliniai kūneliai, savo tūryje turi vidines vezikules,<sup>[204]</sup> šią heterogeninę struktūrą taip pat galima įžvelgti FLIM vaizduose (16 pav., E, J).

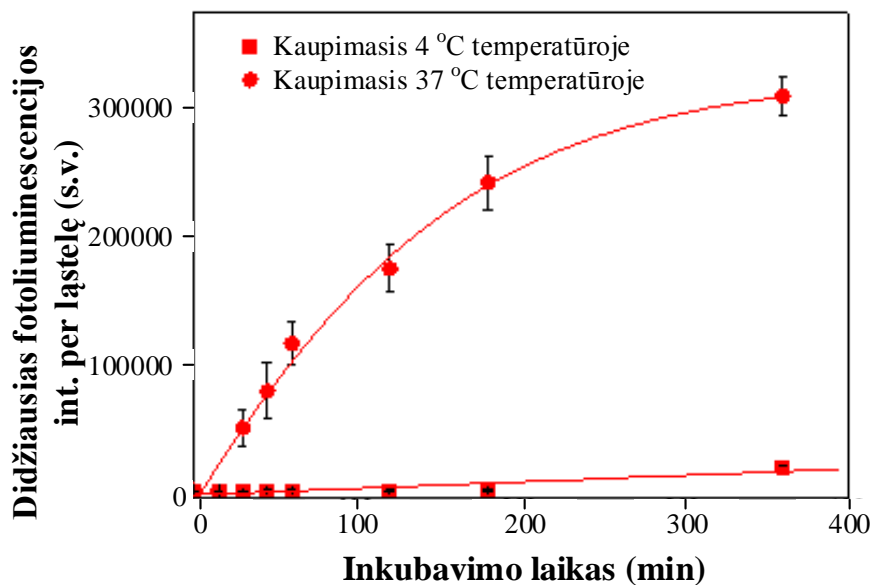
Svarbu pabrėžti, kad KT patekimas į ląsteles priklauso ne tik nuo pačių KT, jų formos, dydžio ir paviršiaus krūvio, kurių įtaka įvairiuose moksliniuose tyrimuose analizuojama dažniausiai. KT patekimo į ląstelę kelius bei jų viduląstelinę lemtį taip pat gali keisti ir išoriniai veiksniai, pvz., inkubacijos terpės sudėtis, dėl kurios KT paviršiuje susiformuoja baltymų vainikas. Todėl tikėtina, kad tos pačios nanodalelės skirtingai pasiskirstys visame organizme, organų sistemoje, audinyje, ląstelės ir organelės lygmeniu, priklausomai nuo baltymų vainiko, kuris padengia nanodalelę, sudėties, struktūros ir pokyčių laike. Todėl nemažėja poreikis sukurti „nematomas“ nanodaleles, kurios galėtų būti ilgai cirkuliuojančiais nešikliais, tinkamais taikymams *in vivo*.

## **5.2 Kvantinių taškų patekimo mechanizmas**

### **5.2.1 Kvantinių taškų patekimas į ląsteles endocitozės būdu**

#### **5.2.1.1 Temperatūros įtaka KT kaupimui ląstelėse**

Tiriant temperatūros įtaką KT kaupimosi ląstelėse procesui buvo parodyta, kad KT patekimas į NIH3T3 ląsteles ženkliai sumažėjo 4°C temperatūroje (21 pav.), tad yra priklausomas nuo energijos sąnaudų ląstelėje. KT patekimo į ląsteles atsistatymas ir augimas 37°C temperatūroje taip pat leidžia manyti, kad KT atveju dominuoja aktyvus kaupimosi mechanizmas, o ne pasyvi difuzija būdinga mažo dydžio molekulėms patenkant į ląsteles.<sup>[40,205]</sup>



21 pav. KT kaupimosi NIH3T3 ląstelėse, esant 4°C ir 37°C temperatūrai, dinamika. Inkubacijos tarpė abiem atvejais be baltymų

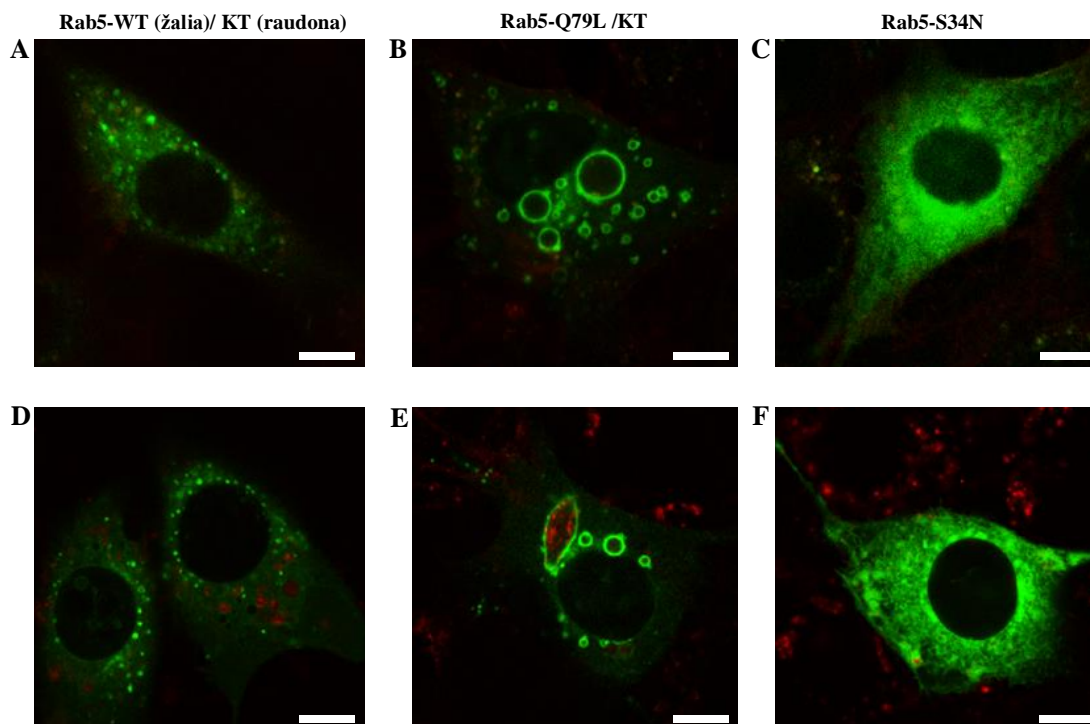
Temperatūros įtaka tikslingai nemodifikuotų KT kaupimosi ląstelėse dinamikai rodo, kad KT patenka į ląstelių vidų energiją naudojančios pernašos per membraną keliu, tikėtinausia, endocitozės mechanizmo dėka, kuris yra neaktyvus 4°C temperatūroje.<sup>[146,206]</sup> Toks nanodalelių kaupimosi nuslopinimas žemose temperatūrose (~ 4–6°C) laikomas įrodymu, kad ląstelėse yra sustabdomas iš ATF (Adenozin 5' trifosfato) energiją gaunantis endocitotinis procesas.<sup>[122,183]</sup> Tačiau tokiose temperatūrose ląstelės membraną sudarantys lipidai yra linkę pereiti į fazinę būseną, panašią į gelį, kuri stabdo tiek nanodalelių įsisavinimą per endocitozę, tiek ir pasyvią difuziją.<sup>[207]</sup> Žinoma, kad lipidiniuose dvisluoksniuose, esančiuose gelio būsenoje, porų formavimasis yra sustabdomas, tad tai gali sulėtinti ir pasyvų nanodalelių patekimą į ląsteles žemose temperatūrose.<sup>[208]</sup> Vis dėlto, difuzija per lipidinį dvisluoksnį yra apibūdinama kaip prasidedantis be užlaikymo, tiesinis<sup>[209]</sup> ir neįsisotinantis procesas.<sup>[40]</sup> Kadangi, kylant temperatūrai, KT kaupimosi metu buvo stebimi lėtasis pradžios etapas ir įsisotinimo etapas, galima manyti, kad KT pasyvi difuzija per išorinę ląstelės membraną yra nežymi, netgi jei

tyrimuose naudotų KT dydis nesudarytų kliūčių jiems pakliūti į ląsteles per porų defektus.

#### 5.2.1.2 *Rab5 GTF-azės vaidmuo kvantinių taškų patekimo į ląsteles procese*

Vienas pirmųjų žingsnių endocitozės procese ir susiformavusių endocitotinių vezikulių pernašoje nuo plazminės membranos į ankstyvasias endosomas, nepriklausomai nuo endocitozės kelio, yra valdomas baltymo Rab5,<sup>[210-216]</sup> kuris koncentruojasi endosomų membranų mikrodomenuose ir vidinėje plazminės membranos pusėje.<sup>[217,218]</sup> Rab5 yra maža GTF-azė, kuri kontroliuoja endocitozę ir ankstyvųjų endosomų dinamiką. Ji reguliuoja iš plazminės membranos susiformavusių endocitotinių vezikulių susiliejamą su ankstyvosiomis endosomomis, o taip pat ir homotipinį ankstyvųjų endosomų susiliejamą ir tolimesnę jų pernašą per mikrotubules.<sup>[219]</sup>

Kadangi Rab GTF-azės reguliuojantis poveikis membranos transportui yra gerai žinomas, buvo iširta, ar ji dalyvauja KT patekimo į ląsteles procese, taip įvertinant, ar energijos reikalaujantis KT kaupimasis (21 pav.) išties vyksta endocitozės būdu. Buvo atliktas palyginamasis pirmųjų KT patekimo į NH3T3 ląsteles etapų tyrimas panaudojant genetiškai pakeistus Rab5 baltymus. Rab5-WT (natūralus baltymas) ir Rab5-Q79L (baltymas su nuslopinta GTF hidrolize) buvo parinkti endocitozės skatinimui. Rab5-S34N (baltymas su nuslopintu GTF prisijungimu) buvo naudotas siekiant priešingo poveikio – endocitozės slopinimo. NIH3T3 ląstelės buvo transfekuotos su trimis skirtingais genetiškai pakeistais Rab5: Rab-WT (kontrolė), Rab5-Q79L (skatinantis endosomų susiliejamą) ir Rab5-S34N (inhibuojantis endosomų susiliejamą), sujungtais su žaliai fluorescuojančio baltymo EGFP plazmide. Transfekuotos su visais Rab5 mutantais NIH3T3 ląstelės buvo inkubuojamos su KT625 1-ą val. ir 24-ias val. Užregistruoti konfokaliniai fluorescencijos vaizdai pateikiami 22 pav.



22 pav. NIH3T3 ląstelių, transfekuotų su modifikuotais Rab5 baltymais, sulietais su EGFP plazmide, konfokaliniai fluorescencijos vaizdai po 1 val. (A – Rab5-WT, B – Rab5-Q79L, C – Rab5-S34N) ir po 24 val. (D – Rab5-WT, E – Rab5-Q79L, F – Rab5-S34N) inkubacijos su KT625. Mastelis 10  $\mu$ m

Kontrolinis Rab5-WT baltymas išryškino susidarančias ankstyvasias endosomas (22 pav., A), kurios po 24 val. inkubacijos su KT buvo pripildytos kvantiniais taškais (22 pav., D). Rab5-Q79L baltymo raiška NIH3T3 ląstelėse sukėlė ženklus ląstelės vidinės struktūros pokyčius, nes atsirado neįprastai dideli ankstyvųjų endosomų dariniai. Po 1 val. inkubacijos su KT, lyginant su įprasta kaupimosi dinamika, KT fotoluminescencija nebuvo užregistruota ląstelės viduje, ir šios didelės endosomos dar nebuvo pripildytos KT (22 pav., B). Tačiau po 24 val. inkubacijos KT buvo išskirtinai pripildę šias vezikules (22 pav., E), nes citozolyje esantis Rab5-Q79L skatina homotipinį ankstyvųjų endosomų susiliejamą. Kitas modifikuotas baltymas, Rab5-S34N, neleidžiantis susiliesti ankstyvosioms endosomoms, inicijavo labai mažų endocitotinių pūslelių formavimąsi (22 pav., C) ir inhibavo KT endocitozę, net ir po 24 val. inkubacijos (22 pav., F). Šis priešingas Rab5-Q79L ir Rab5-S34N

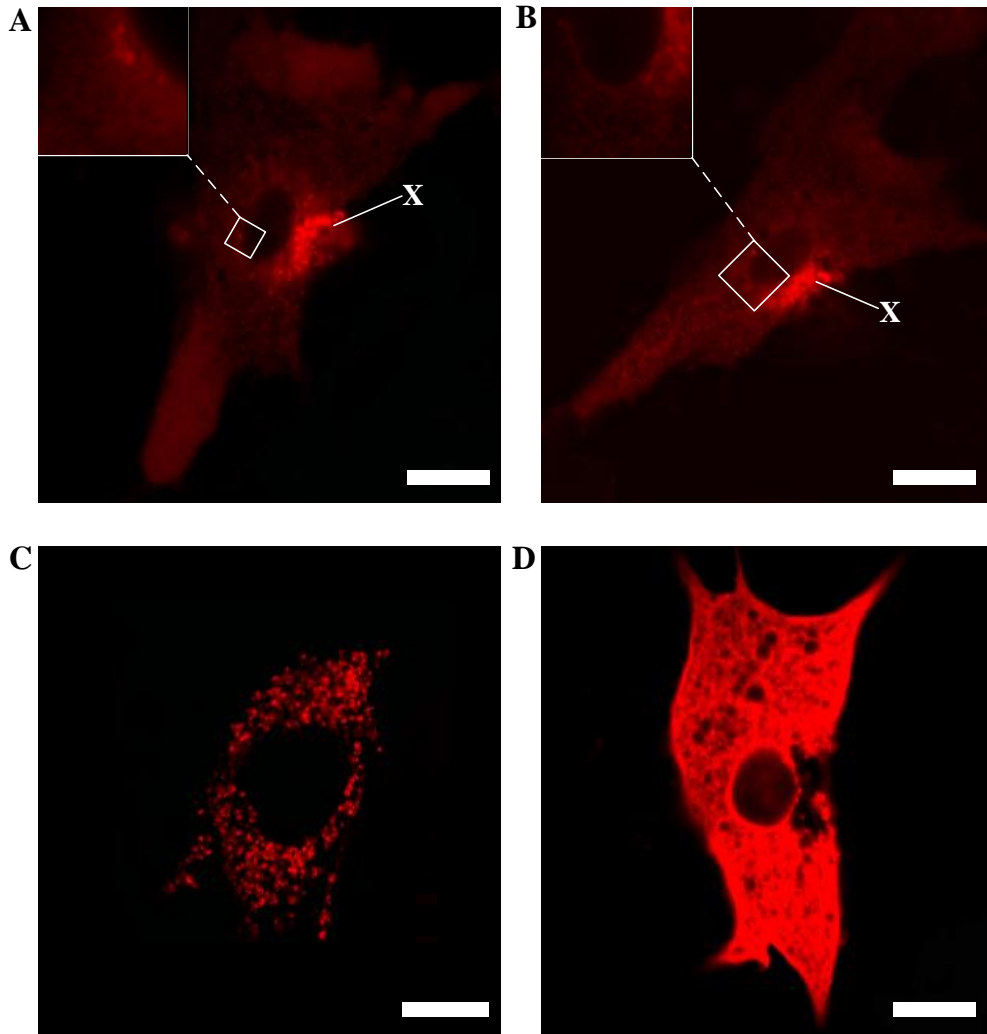


sukeltas efektas parodė, kad Rab5 valdo KT kaupimosi ląstelėse procesą. Todėl galima teigti, kad KT į ląsteles patenka per Rab5 kontroliuojamą endocitozę, t.y., iš plazminės membranos su adsorbuotais KT arba KT, susijungusiais su membrana per receptorius, susiformuoja endocitotinės vezikulės.

## ***5.2.2 Galimos kvantinių taškų difuzijos per išorinę ir vidines membranas tyrimas***

### ***5.2.2.1 Kvantinių taškų difuzija nevyksta per išorinę membraną***

Keliose publikacijose yra aprašomi nanodalelių patekimo į ląsteles tyrimai, analizuojantys galimybę, kad nanodalelės ląstelėse kaupiasi ne per receptoriais valdomus endocitozės ar fagocitozės kelius,<sup>[53,70,220,221]</sup> bet tiesioginės difuzijos per membraną būdu.<sup>[40,120,222]</sup> Dėl to buvo nuspręsta atlikti palyginamąjį KT patekimo į ląsteles ir pasiskirstymo po jas tyrimą, imituojant pasyvią difuziją – t.y., tiesiogiai suleidžiant KT į ląsteles. Stebėta KT fotoluminescencija ląstelėse (24 pav., A, B) buvo visiškai kitokia, nei natūraliai patekusių KT (23 pav., C). Mikroinjekcijos būdu suleisti KT iškart pasiskirstė per visą citoplazmą. Nebuvo stebimas granuliuotų struktūrų susidarymas, išskyrus suleidimo sritį, kurioje, tikėtina, KT aplipo dūrio metu mechaniškai deformuotą plazminę membraną. Taip pat neregistruota ir KT agregacijos į klasterius (23 pav., A). Net ir po ilgesnio laikotarpio (24 val.) nebuvo pastebėtas KT pripildytų vezikulinių struktūrų atsiradimas (23 pav., B). Toks injektuotų KT viduląstelinis pasiskirstymas yra panašus į KT fluorescencijos pasiskirstymo pobūdį ląstelėse su pažeista plazmine membrana, stebėtose inkubacijos su KT metu (23 pav., D).



23 pav. Konfokaliniai NIH3T3 ląstelių liuminescencijos vaizdai: A – užregistruoti iškart po KT injekcijos, B – po 24 val. nuo injekcijos ir C – po 24 val. inkubacijos su KT; D – ląstelė su pažeista plazmine membrana. X – injekcijos vieta; balta linija apibrėžtos išdidintos vietos, parodytos tarpuose. Mastelis 10  $\mu\text{m}$

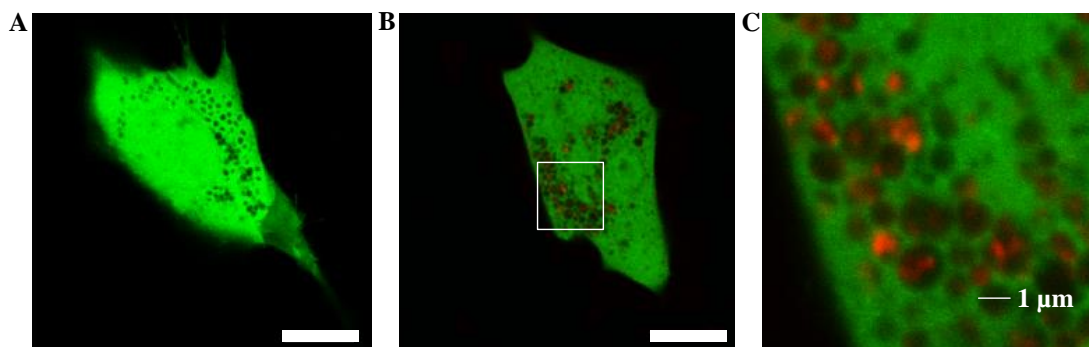
Literatūroje kvantinių taškų mikroinjekcijos eksperimentai beveik nėra aprašyti.<sup>[174,223]</sup> Pirmą kartą mikroinjekcija buvo išbandyta B. Dubertret su kolegomis *Xenopus* embrioninių ląstelių *in vivo* vaizdinimui.<sup>[224]</sup> CdSe/ZnS KT įterptų į fosfolipidines micles tirpalas buvo suleistas į atskiras embrionines ląsteles. KT ląstelėse išliko net po jų pasidalinimo. Panašiai ir J.R. Slotkin et al. pritaikė KT mikroinjekciją embrioninių ląstelių tyrimams *in vitro*.<sup>[225]</sup> Buvo atskirai suleisti žaliai ir raudonai liuminescuojantys KT, jie tolygiai pasiskirstė ląstelių citoplazmoje, taip pat nepaveikė ląstelių dalinimosi.

Pritaikęs mikroinjekciją HeLa ląstelėms A.M. Derfus et al. išbandė selektyvų ląstelės organelių – branduolių ir mitochondrijų – žymėjimą, naudodamas KT padengtus PEG ir KT konjuguotus su branduolio lokalizacijos signaliniu peptidu arba su mitochondrijų lokalizacijos signalo peptidu.<sup>[226]</sup> Po mikroinjekcijos tik KT padengti PEG pasiskirstė tolygiai po visą ląstelės citoplazmą, o modifikuoto su atitinkamais peptidais paviršiaus KT daugelyje ląstelių buvo aktyviai pernešami iš citoplazmos į branduolį ar mitochondrijas. Keli kiti mikroinjekcijos bandymai buvo atlikti siekiant KT suleisti tiesiogiai į ląstelių branduolį.<sup>[227-229]</sup> Šie pavyzdžiai parodo, kad ląstelės po mikroinjekcijos išlieka gyvybingos, taip pat, kad patekę į ląsteles KT išlieka citoplazmoje, jeigu tikslinga jų paviršiaus modifikacija nesukelia aktyvios pernašos į vidines ląstelės organeles.

Pagrindiniai mikroinjekcijos privalumai yra didelis KT patekimo į ląstelę efektyvumas ir selektyvumas, nes KT suspensijos yra injektuojamos į atskiras, pasirinktas ląsteles. Taip pat mikroinjekcijos būdu galima gauti tolygų KT pasiskirstymą ląstelės citoplazmoje ar branduolyje, išvengiant KT sąveikos su plazmine membrana ir uždarymo į endosomas. Tačiau mikroinjekcija yra kruopštumo ir daug laiko reikalaujantis metodas, todėl nėra tinkamas vienalaikiams daugelio ląstelių tyrimams.

#### 5.2.2.2 *Kvantinių taškų difuzija nevyksta per vidines membranas*

Pastebėtas vykstantis KT užpildytų vezikulių persitvarkymas (vezikulių dydžio pokyčiai, multivezikulinių kūnelių formavimasis) paskatino detaliau ištirti KT pernašą ląstelėse, KT užpildytų vezikulių susiliejimą bei patikrinti galimybę, ar uždaryti vezikulėse KT ištrūksta į citozolį. Tam buvo pasirinktos EGFP transfekuotos ląstelės. Pati transfekcija nepaveikė KT kaupimosi etapų ir fazių, t.y., raudonai liuminescuojančių vezikulių formavimosi (24 pav., B). Tamsios ir raudonai liuminescuojančios endosomos buvo užregistruotos žaliame EGFP transfekuotų ląstelių fluorescencijos fone po 24 val. inkubacijos su KT augimo terpėje be baltymų (24 pav., A).



24 pav. Bendri konfokaliniai EGFP transfekuotų NIH3T3 ląstelių fluorescencijos vaizdai užregistruoti žaliame ir raudoname kanaluose: A – kontrolinė NIH3T3 ląstelė, B – ląstelė po 24 val. inkubacijos su KT; C – padidinta B dalis, apibrėžta balta linija. Mastelis 10  $\mu\text{m}$

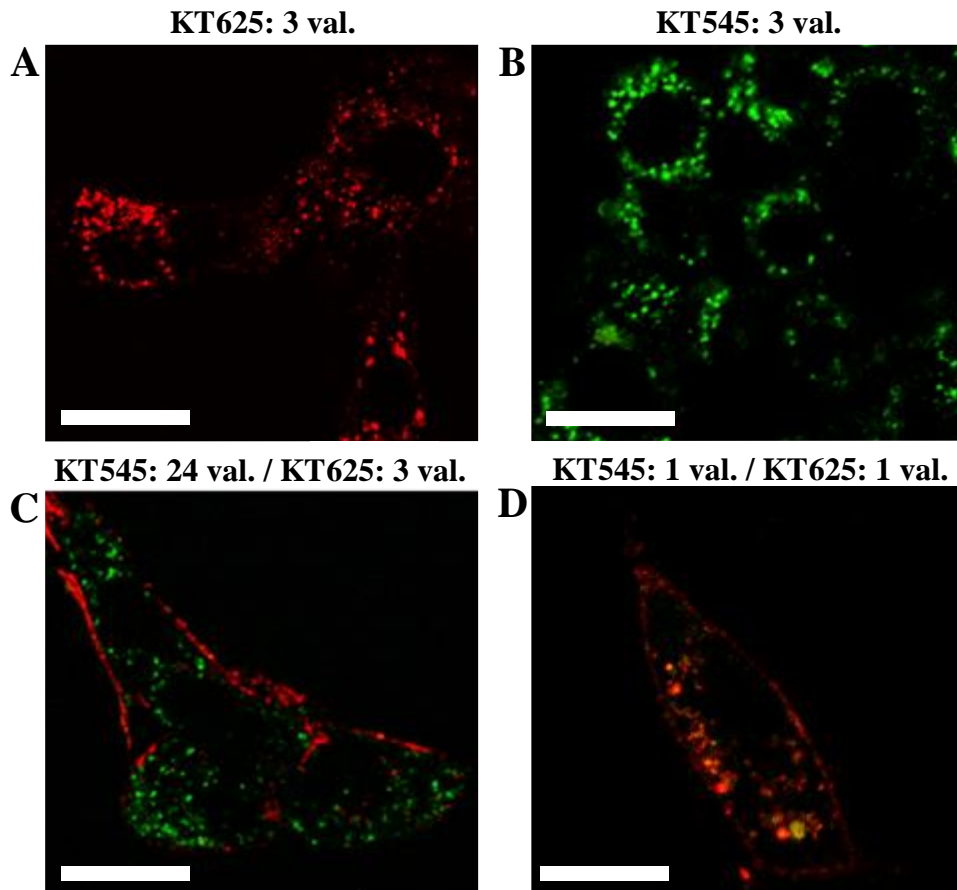
Susiformavusių vezikulių vaizdų peržiūra atskleidė, kad didesnių tamsių endosomų ( $\sim 1,5 \mu\text{m}$ ) viduje buvo mažesnės ( $\sim 0,5 \mu\text{m}$ ) raudonai liuminescuojančios vezikulės (24 pav., C), kurios galėjo susidaryti, susiliejus KT užpildytoms ir neturinčioms KT endosomoms. Tačiau nebuvo pastebėta jokios KT raudonos liuminescencijos citozolyje (24 pav., B, C), kaip kad buvo stebima po KT mikroinjekcijos (23 pav., A, B). Nebuvo gautuose vaizduose stebima ir geltona spalva, kuri galėtų atsirasti persidengus raudonai KT FtL ir žaliai EGFP fluorescencijai. Taip pat buvo nustatyta, kad baltymų buvimas ar nebuvimas inkubacijos terpėje nedarė jokio poveikio šiems pastebėjimams.

Taigi iš mikroinjekcijos poveikio bei EGFP ir KT bendrų eksperimentų galima daryti išvadą, kad KT difuziškai nepereina per ląstelės plazminę membraną (nei iš išorės į vidų, nei iš vidaus į išorę), o taip pat nėra pasyvios KT pernašos iš citozolio į endosomas, bei iš endosomų į citozolį.

### 5.2.3 *Kvantinių taškų kaupimosi nuslopinimas ir atsistatymas*

Tam, kad detalčiau išsiaiškinti KT patekimo proceso į ląsteles sotes reguliacinius mechanizmus ir jų poveikį endocitozei, buvo atlikti dviejų dalių tyrimai, panaudojant identišką cheminę sudėtį, bet skirtingą fotoluminescencijos spalvą turinčius kvantinius taškus. Iš pradžių ląstelės buvo 24 val., t.y., iki sotes etapo, inkubuojamos su vienu KT (KT545, žali), tuomet

plaunamos ir 1-3 val. inkubuojamos terpėje su kitais KT (KT625, raudoni). Viduląstelinis KT pasiskirstymas buvo vaizdintas registruojant konfokaliinius fluorescencinės mikroskopijos vaizdus įprastai inkubuojamose su KT (kontrolinėse) ląstelėse ir ląstelėse, kurių pirminė inkubacija su KT buvo skirtingos trukmės. Kaip matyti iliustracijose (25 pav., A, B), 3 val. inkubacija su KT sukėlė įprastą jų susikaupimą kontrolinėse ląstelėse ir granuliuotą fotoluminescencijos pasiskirstymą citoplazmoje. Tačiau po 24 val. pirminės inkubacijos su KT545 ir 3 val. antrinės inkubacijos su KT625 (25 pav., C), pastarieji (raudoni) buvo stebėti tik ant ląstelių plazminės membranos. Nors raudonų KT lokalizacija buvo labai panaši, kaip pradinėje patekimo į ląsteles fazėje, prilipimo prie plazminės membranos nepakako jų patekimui į ląsteles – nebuvo registruojamas FtL signalų iš raudonų ir žalių sričių persidengimas. Kita vertus, abiejų KT bendra lokalizacija – geltonos/oranžinės zonos, esančios ant membranos ir citoplazmoje, – buvo aptikta bendruose FtL vaizduose iš žalio ir raudono kanalų, registruotuose po 1 val. pirminės ir po 1 val. antrinės inkubacijos (25 pav., D). Kaip ir kituose eksperimentuose, KT FtL nebuvo aptikta ląstelių branduoliuose.

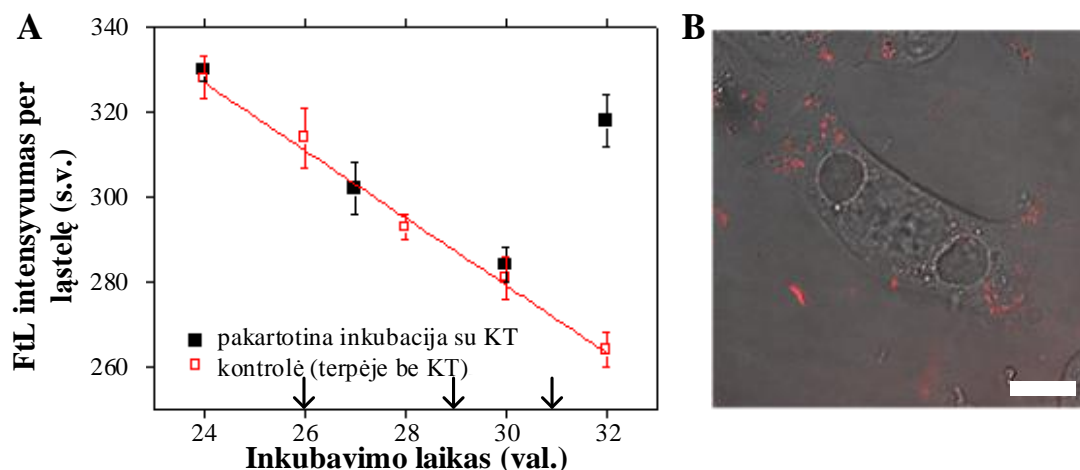


25 pav. Konfokaliniai fluorescencijos vaizdai, vaizduojantys identiškos cheminės sudėties kvantinių taškų su FL smailės bangos ilgiu ties 625 nm (A - KT625) ir 545 nm (B - KT545) kaupimąsi NIH3T3 ląstelėse 37°C temperatūroje; C – kvantinių taškų kaupimosi slopinimas – vaizdai po 24 val. inkubacijos su KT545 ir po 3 val. inkubacijos su KT625; D – po 1 val. inkubacijos su KT545 ir po 1 val. inkubacijos su KT625. Mastelis 20 μm

Šie eksperimentai, parenkant skirtingus KT inkubacijos intervalus, atskleidė, kad KT545 ir KT625 gali vieni po kitų patekti į tų pačių ląstelių vidų, tačiau pirmųjų KT patekimas blokuoja antrųjų, identiškos cheminės sudėties KT patekimą priklausomai nuo pirminės inkubacijos trukmės: antrinio patekimo slopinimas stiprėja proporcingai ilgėjančiai pirminės inkubacijos trukmei, taigi, jis priklauso nuo jau susikaupusių ląstelėje KT kiekio. Skirtingos spalvos KT patekimo į ląsteles tarpusavio konkurencija (25 pav., C), bei trumpalaikės pirminės inkubacijos metu užregistruota KT545 ir KT625 bendra lokalizacija (geltona/oranžinė spalva 25 pav., D) parodė, kad, nepriklausomai nuo nedidelių

nanokristalų dydžio ir hidrodinaminio skersmens skirtumų, nanodalelės į ląsteles patenka tuo pačiu keliu.

Siekiant nustatyti, kiek trunka KT patekimo slopinimas iki tikėtino jo atsistatymo, buvo atlikti KT inkubacijos eksperimentai su įsisotinimo etape esančiomis ląstelėmis. Fluorescenciniu spektrometru registruotas signalas po 24 val. inkubacijos su KT625 FtL buvo normuojamas vienetinei ląstelei, t.y. FtL intensyvumas dalinamas iš ląstelių skaičiaus. Tolesnė ląstelių inkubacija su KT atlikta skirtingomis sąlygomis (26 pav., A). KT susikaupusių kontrolinėse ląstelėse, kurios buvo plautos ir toliau inkubuojamos terpėje be baltymų ir be KT, FtL intensyvumas mažėjo (26 pav., A, raudoni tušti kvadratai). Šis normuoto ląstelei intensyvumo mažėjimas gali būti paaiškinamas ląstelių dalinimusi (26 pav., B), nes bendras visų ląstelių FtL intensyvumas nekito. Kitos 24 val. inkubuotos su KT ląstelės buvo nuplautos ir toliau inkubuojamos terpėje be baltymų ir be KT skirtingus laiko intervalus. Tada į terpę buvo vėl dedama KT625 (pažymėta rodyklėmis 26 pav., A) ir ląstelės inkubuojamos dar 1 val. iki liuminescencijos matavimų. Vidutinės trijų nepriklausomų eksperimentų metu gautos susikaupusių KT FtL intensyvumo normuotos vertės, išmatuotos po 24+3 val. ir 24+6 val. (26 pav., A, juodi kvadratai), mažėjo panašiai, kaip ir ląstelių terpėje be KT (26 pav., A, raudoni tušti kvadratai), tuo parodant, kad KT įsisavinimas dar neatsistatė. Tačiau po 24+8 val. vidutinis normuotas FtL intensyvumas beveik pasiekė pradinį lygį, būdingą soties etapui.



26 pav. A – kvantinių taškų patekimo į ląsteles atsistatymas, rodyklėmis pažymėtas pakartotino kvantinių taškų įdėjimo į terpę momentas; B – fazinio kontrasto ir fluorescencijos vaizdas: besidalijanti ląstelė po 24 val. inkubacijos. Mastelis 10  $\mu$ m

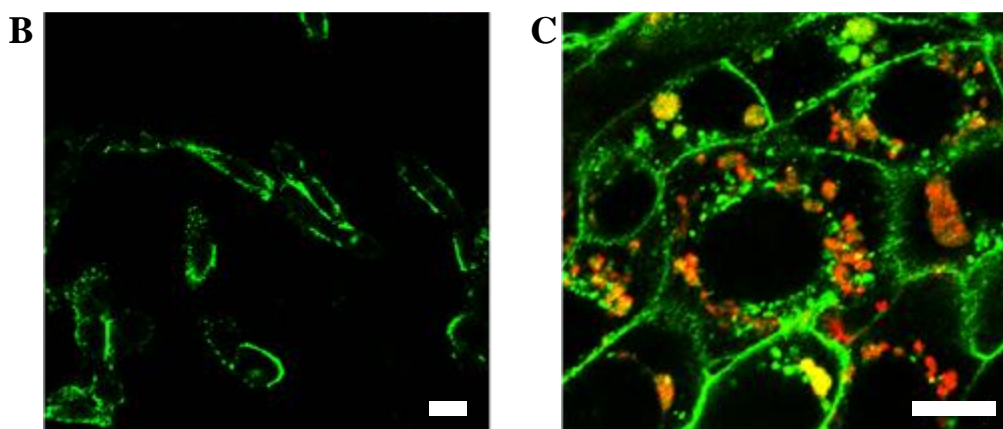
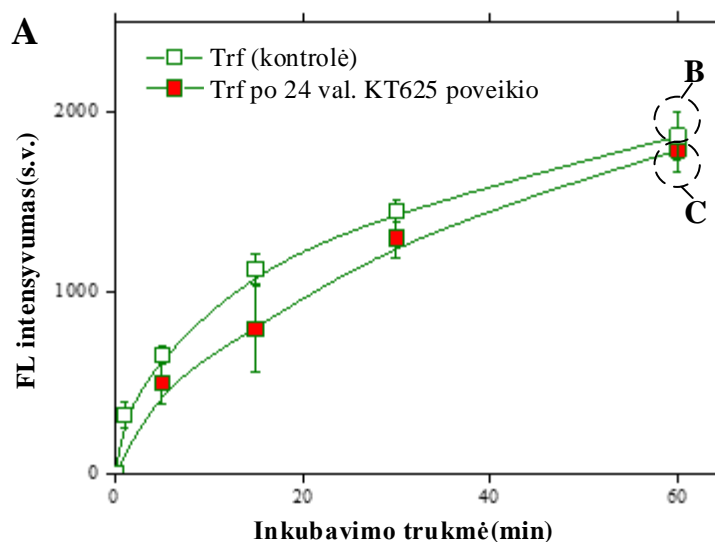
Ląstelių vaizdinimas fazinio kontrasto ir konfokalinės fluorescencijos mikroskopijos metodais parodė, kad kai ląstelės dalinasi, patekę į ląstelių vidų KT pasiskirsto tarp dukterinių ląstelių, sumažėjant bendram KT kiekiui ląstelėje (26 pav., B). Ląstelių dalinimasis gali būti nuoseklus (iki 20 proc.) normuoto FtL signalo mažėjimo, gauto po 2 val., 4 val. ir 8 val. terpėje be KT (26 pav., A, raudoni tušti kvadratai), priežastimi, nes KT šalinimas iš ląstelių tuo laikotarpiu neaptiktas (26 pav., A). Kelios publikacijos, kuriose buvo tiriama nanodalelių patekimo į ląstelių vidų priklausomybė nuo ląstelės ciklo fazės, taip pat parodė, kad ląstelių dalinimasis sumažina viduląstelinę nanodalelių koncentraciją.<sup>[113]</sup>

Pastebėtas po 8 val. KT kaupimosi užlaikytas atsistatymas gali būti sąlygotas natūraliu medžiagų, dalyvaujančių endocitozės mechanizmuose, atsistatymu naujai pasidalinusiose ląstelėse. Šis akivaizdus ląstelių gebėjimas slopinti ir atstatyti tikslingai nemonifikuotų KT patekimą taip pat pagrindžia jo vyksmą specifiniu endocitozės keliu.



#### 5.2.4 *Kvantinių taškų patekimo į ląsteles mechanizmo nustatymas*

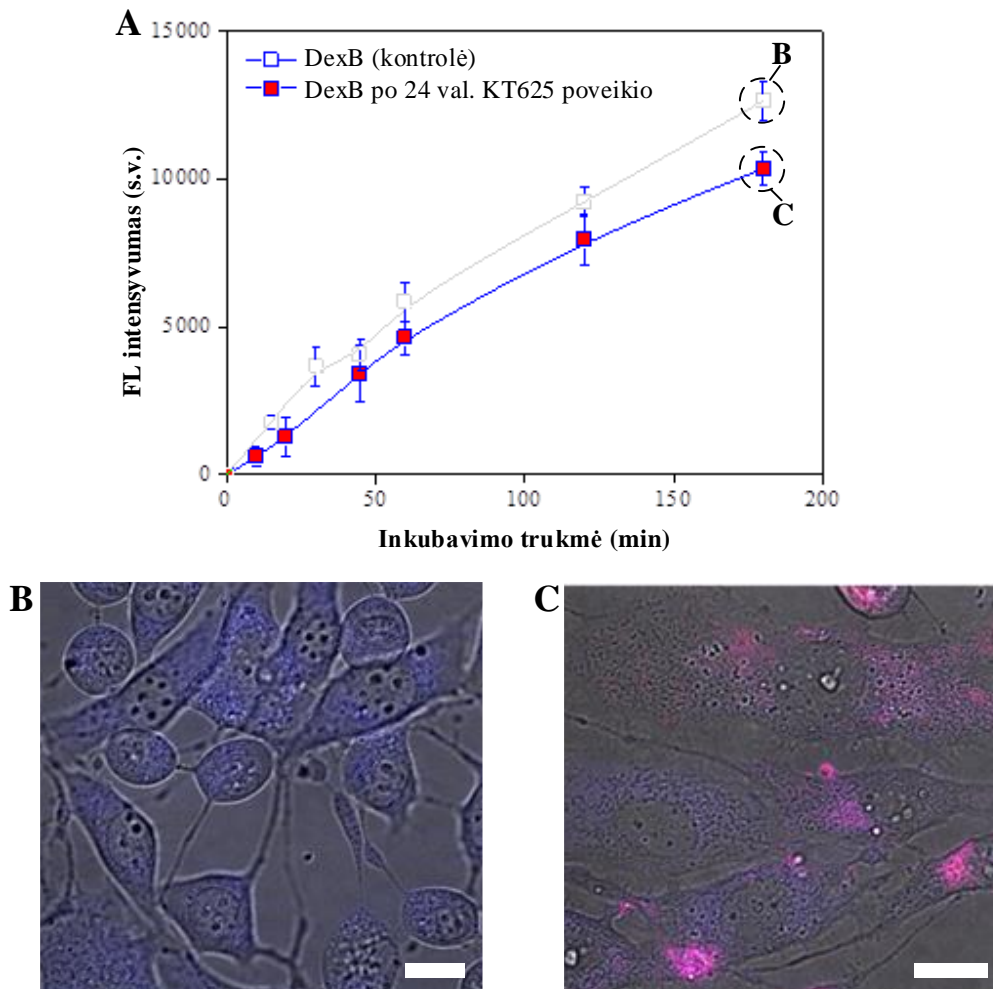
Kad atskleisti molekulinį KT endocitozės mechanizmą, buvo tiriamas įsisotinamo KT kaupimosi poveikis skirtingų endocitozės žymeklių patekimui į ląsteles. Konjuguotas su žaliai fluorescuojančiu fluoroforu transferinas (Trf) buvo pasirinktas siekiant patikrinti, ar karboksilo grupėmis dengtų KT sukeltas slopinimas reguliuojamas nuo klatrino priklausančios endocitozės<sup>[230]</sup> mechanizmu. Vidutinės žymėto Trf fluorescencijos intensyvumo vertės, užregistruotos skirtingais kontrolinių ląstelių inkubacijos momentais (tušti kvadratai), o taip pat ląstelėse, kurios prieš tai buvo 24 val. inkubuotos su KT, palyginamos 27 pav., A. Šių verčių skirtumai tarp dviejų ląstelių grupių patenka į paklaidų ribas. Konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdai kontrolinėse ląstelėse su žymėtu Trf (užregistruota žaliame kanale, 27 pav., B) iliustruoja, kad po 1 val. inkubacijos Trf buvo lokalizuotas ant plazminės ląstelių membranos ir dar sudarė granulinę struktūrą citoplazmoje. Kaip ir KT, Trf neaptiktas ląstelių branduolyje. Ląstelių, prieš tai 24 val. inkubuotų su KT (raudonos vezikulės citoplazmoje) ir po to 1 val. inkubuotų su žymėtu Trf, vaizdai parodė, kad viduląstelinis Trf pasiskirstymas yra panašus kaip kontrolinėse ląstelėse: Trf buvo aptiktas ir ant plazminės membranos, ir susikaupęs vezikulinėse struktūrose, pasiskirsčiusiose citoplazmoje (27 pav., C). Kai kurios iš vezikulių buvo geltonos spalvos, tuo parodant Trf ir KT lokalizaciją toje pačioje vezikulėje.



27 pav. Nuo klatrino priklausoma endocitozė – NIH3T3 ląstelėse nėra stebimas KT susikaupimo slopinamasis poveikis Trf patekimui: A – žymėto Trf patekimo dinamika kontrolinėse ląstelėse ir ląstelėse po 24 val. inkubacijos su KT625, įvertinta fluorescencijos spektroskopiniais matavimais; konfokaliniai fluorescencinės mikroskopijos vaizdai viduląstelinio žymėto Trf (žalia spalva) pasiskirstymo po 1 val. inkubacijos (B) kontrolinėse ląstelėse, mastelis 20  $\mu\text{m}$  ir (C) ląstelėse, 24 val. inkubuotose su KT625 (raudona spalva), mastelis 10  $\mu\text{m}$

Menkas susikaupusių KT slopinantis poveikis, nedaug viršijantis paklaidų ribas, buvo pastebėtas ir dekstrano (DexB) – makropinocitozės substrato<sup>[231]</sup> patekimui į ląsteles (28 pav.). Panašios vidutinės DexB, konjuguoto su mėlynai fluorescuojančiu organiniu dažu, fluorescencijos intensyvumo vertės buvo užregistruotos visose ląstelių suspensijose, nepriklausomai nuo inkubacijos su

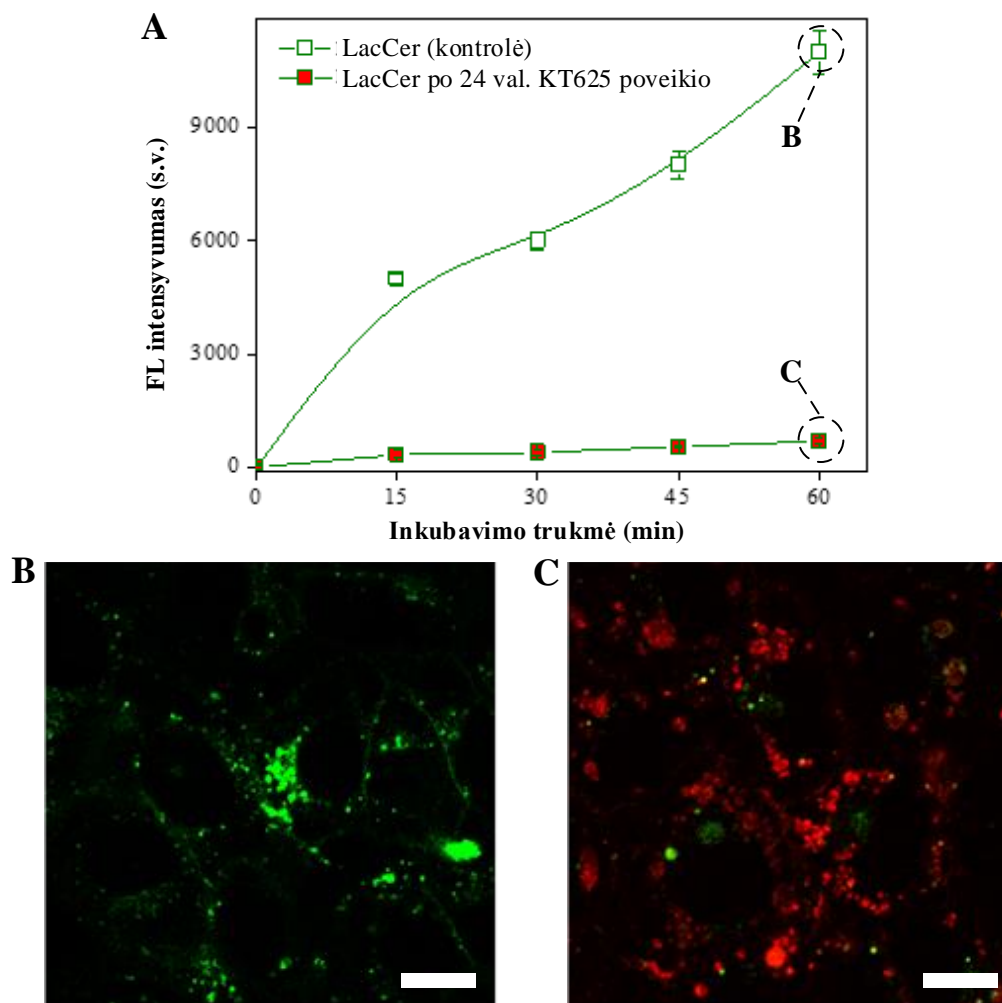
KT (28 pav., A). Bendruose fluorescencinės mikroskopijos ir fazinio kontrasto vaizduose matėsi viduląstelinis DexB pasiskirstymas (mėlyna spalva) (28 pav., B), o 24 val. inkubacija su KT nesukėlė ląstelėse jokių regimų DexB fluorescencijos pokyčių (28 pav., C).



28 pav. Makropinocitozė – NIH3T3 ląstelėse nėra stebimas KT625 susikaupimo sąlygotas DexB patekimo slopinimas: A – DexB patekimo dinamika kontrolinėse ląstelėse ir ląstelėse po 24 val. inkubacijos su KT625, įvertinta fluorescencijos spektroskopiniais matavimais; bendri fluorescencinės mikroskopijos ir fazinio kontrasto vaizdai viduląstelinio DexB (mėlyna spalva) pasiskirstymo po 1 val. inkubacijos (B) kontrolinėse ląstelėse ir (C) ląstelėse, 24 val. inkubuotose su KT625 (rausva spalva), mastelis 10  $\mu\text{m}$

Priešingai ankstesniems rezultatams, žymėto žaliu fluoroforu laktozilceramido (LacCer), kuris yra gerai žinomas kaveolino ligandas, į

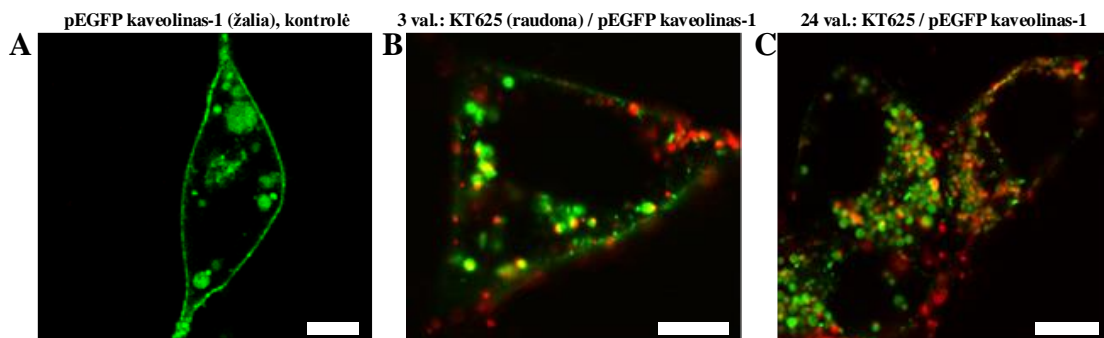
žinduolių ląsteles selektyviai patenkantis kaveolino / lipidinių plaustelių (t.y. lipidų ir cholesterolio darinių, judančių išilgai plazminės membranos) reguliuojamu transportu,<sup>[232]</sup> kaupimasis buvo beveik pilnai sutrikdytas ląstelėse, kurios buvo 24 val. inkubuotos su KT625, ką akivaizdžiai parodė fluorescencinės spektroskopijos duomenys (29 pav., A). Šis LacCer patekimo nuslopinimo faktas taip pat buvo patvirtintas ir lyginant konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdus, kurie buvo užregistruoti po 1 val. inkubacijos su žymėtu LacCer kontrolinėse (29 pav., B) ir su KT inkubuotose ląstelėse (29 pav., C). LacCer fluorescencijos pasiskirstymo pobūdis kontrolinėse ląstelėse, užregistruotas žaliame kanale, buvo labai panašus į įprastą viduląstelinės KT liuminescencijos vaizdą. Tuo pat metu ląstelėse, prieš tai inkubuotose su KT, buvo matomos tik pavienės LacCer žaliai fluorescuojančios zonos, vyraujant raudonai KT liuminescencijai.



29 pav. Nuo kaveolino / lipidinių plaustelių priklausančios endocitozės NIH3T3 ląstelėse KT625 susikaupimo sąlygotas slopinimas: A – LacCer patekimo dinamika neveiktose (kontrolinėse) ląstelėse ir ląstelėse po 24 val. inkubacijos su KT625, įvertinta fluorescencijos spektroskopiniais matavimais; konfokaliniai fluorescencijos mikroskopijos vaizdai viduląstelinės žymėto LacCer (žalia spalva) pasiskirstymo po 1 val. inkubacijos (B) kontrolinėse ląstelėse ir (C) 24 val. inkubuotose su KT625 (raudona spalva) ląstelėse, mastelis 10  $\mu\text{m}$ . Adaptuota pagal V. Karabanovas et al.<sup>[160]</sup>

Siekiant suprasti KT patekimo nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu mechanizmą, buvo atlikta laikinoji ląstelių transfekcija su EGFP-C1-kaveolinas-1 plazmidėmis, skirtomis vizualizuoti viduląstelinį kaveolino-1, kuris yra pagrindinė molekulė, reikalinga membranos įlenkimui ir kaveolino struktūrų formavimui,<sup>[233,234]</sup> pasiskirstymą. 3 val. ir 24 val. inkubacijos su

KT626 poveikis viduląsteliniam modifikuoto kaveolino-1 pasiskirstymui parodytas 30 pav. Modifikuotas EGFP-kaveolinas-1 išryškino skirtingų dydžių (0,5-3,5  $\mu\text{m}$  skersmens) žaliai fluorescuojančias vezikulines struktūras ląstelių citoplazmoje ir plazminę membraną (30 pav., A). KT ir EGFP-kaveolino-1 bendras pasiskirstymas konfokalinės fluorescencijos vaizduose po 3 val. ląstelių inkubacijos su KT buvo stebima kaip geltonos sritys, sudėjus žalio ir raudono kanalų vaizdus, kurios buvo pasiskirsčiusios ląstelės plazminėje membranoje ir citoplazmoje (30 pav., B). Geltonų vezikulių ( $\sim 1 \mu\text{m}$  skersmens) skaičius ženkliai išaugo, kai KT inkubacija pasiekė įsisotinimo etapą. Žalias plazminės membranos švytėjimas jau nebuvo registruojamas (30 pav., C).



30 pav. Viduląstelinio kaveolino-1 (žalias) pasiskirstymo konfokaliniai fluorescencijos vaizdai: A – kontrolinėse ląstelėse, B – ląstelėse inkubuotose su KT625 (raudona spalva) 3 val. ir C – 24 val. Mastelis 10  $\mu\text{m}$

KT patekimo slopinimo ir vėlesnio atsistatymo paaiškinimas gali būti grindžiamas dviem priežastimis. Viena jų ta, kad KT patekimo įsisotinimas ir slopinimas gali būti sukeltas plazminės membranos paviršinių receptorių stygiaus,<sup>[68]</sup> nes receptoriai yra uždaryti į endosomas kartu su patekusiais į ląsteles KT.<sup>[235]</sup> Ši prielaida yra grindžiama ir kitais tyrimais, kurie parodė, kad receptorių, kurie atpažįsta ir dalyvauja makromolekulių, turinčių neigiamą krūvį, transporte į ląstelę, blokavimas sumažino karboksilo grupėmis dengtų KT patekimą į ląsteles.<sup>[236]</sup> Todėl nuslopęs papildomų KT patekimas į inkubuotas su KT ląsteles soties etape taip pat gali būti sąlygotas reikalingu

receptorių plazminėje membranoje trūkumo, ir jau patekusių į ląstelės vidų KT slopinančio poveikio sudėtingam endocitozės signalų perdavimui, medžiagų pernašai ir rūšiavimui. Nors pakartotinės inkubacijos metu KT taip pat prilimpa prie anksčiau su kvantiniais taškais inkubuotų ląstelių plazminės membranos (25 pav., C), tai gali sąlygoti ir nespecifinė KT adsorbcija, nes prilipę KT nepatenka į ląstelių vidų ir dažniausiai yra lengvai nuplaunami su buferiniu tirpalu.

Kita KT ir kitų medžiagų patekimo į ląsteles slopinimo priežastis gali būti nepakankama aktyvaus kaveolino-1 koncentracija, reikalinga tam, kad būtų pradėtas kaveolų formavimasis ląstelės vidiniame membranos paviršiuje. Šią priežastį paremia tas faktas, kad įprastas viduląstelinis kaveolino-1 pasiskirstymas nebebuvo stebimas po ilgalaikės inkubacijos su KT (30 pav.). Tai galėtų būti susiję su kaveolino-1 sintezės sulėtėjimu<sup>[237]</sup> arba kaveolino sąveikos su KT ir jo uždarymo į multivezikulinius kūnelius (MVBs). Viduląstelinis KT kaupimasis MVBs gali ženkliai padidinti uždaryto kaveolino kiekį (kiekvieną kaveolę apytiksliai sudaro 140–150 kaveolino-1 molekulių<sup>[234]</sup> ir, kaip pasekmė, nuo kaveolino priklausantis endocitozės būdas yra laikinai nuslopinamas.

Daugelyje paskelbtų tyrimų teigiama, kad nanodalelių, įskaitant ir KT, patekimas vyksta ne vienu, bet keliais endocitozės būdais, priklausančiais nuo klatrino, kaveolino, dinamino, lipidinių plaustelių ar specifinių receptorių.<sup>[236]</sup> Patekimo mechanizmai pirmiausia paveikiami KT paviršiaus dangalo savybių, įskaitant susidariusį baltymų vainiką, kai yra inkubuojama terpėje su serumo baltymais, taip pat specifinės sąveikos su ląstelės paviršiaus receptoriais, kurių sužadimas aktyvuoja skirtingus endocitozės kelius.<sup>[238]</sup> Po 24 val. inkubacijos su KT, kai KT susikaupimas yra soties etape, LacCer nebegalėjo patekti į ląsteles, nes nuo kaveolino / lipidinių plaustelių priklausantis endocitozės būdas buvo sutrikdytas. Tačiau kiti endocitozės būdai, pvz., Trf patekimą į ląsteles sąlygojanti nuo klatrino priklausoma endocitozė (27 pav.) ir DexB patekimą į ląsteles sąlygojanti makropinocitozė (28 pav.), nebuvo nuslopinti

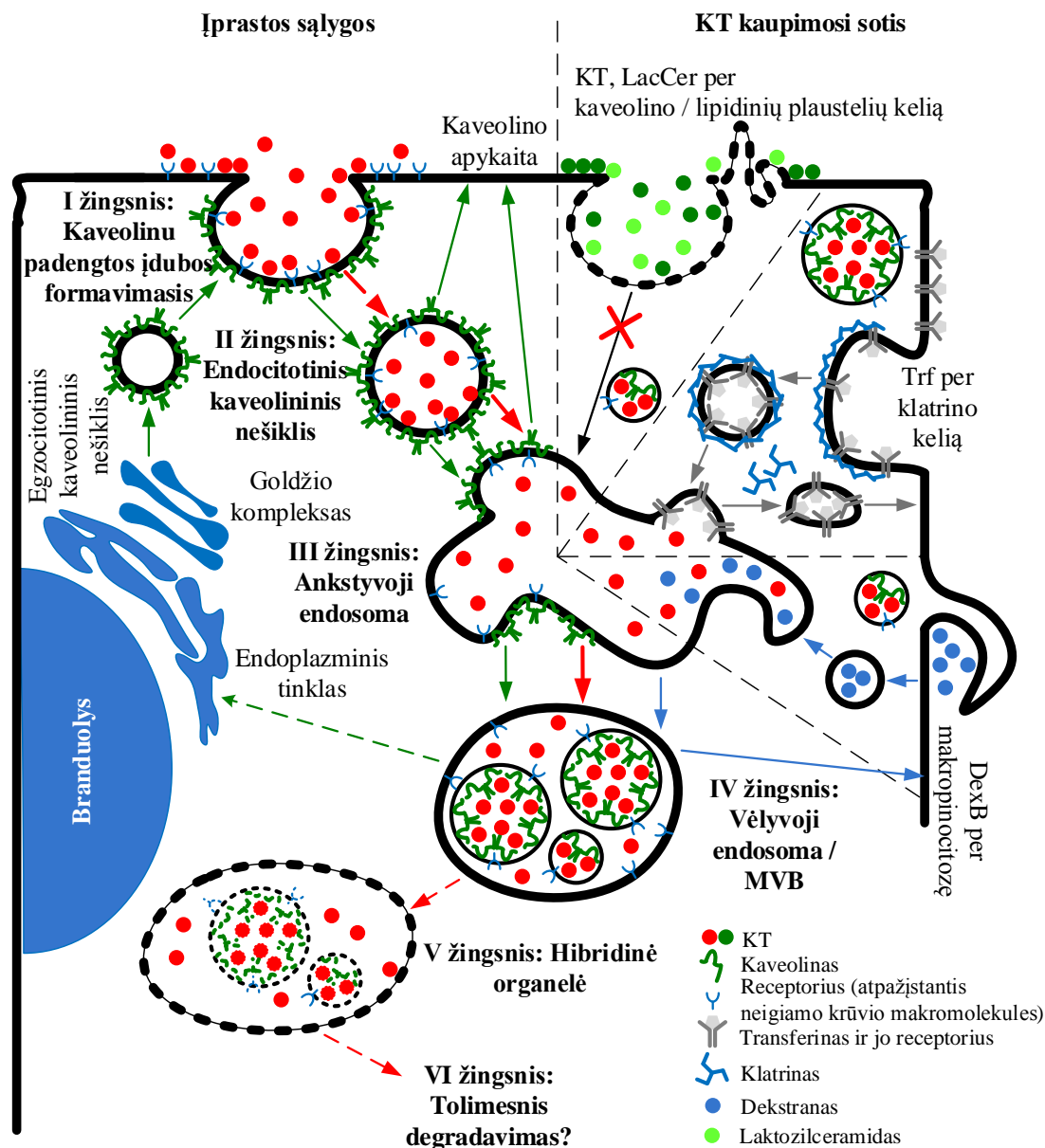
ilgalaikės inkubacijos su KT. Šie rezultatai ir išvados atitinka kitų mokslininkų pastarųjų metų tyrimų rezultatus, kuriais buvo parodyta, kad karboksilo rūgšties grupės KT paviršiuje nukreipia šiuos taškus nuo dinamino priklausančiu endocitozės keliu,<sup>[238]</sup> tačiau nuo klatrino priklausančio endocitozės kelio blokavimas neturėjo įtakos karboksilo grupėmis dengtų KT patekimui.<sup>[236]</sup>

Specifinių endocitozės kelių, per kuriuos vyksta tikslingai nemodifikuotų karboksilo grupėmis dengtų KT patekimas, remiantis pastebėtu KT sukeltu patekimo į ląsteles slopinimu ir jau gerai ištirtų endocitozės substratų panaudojimu, padėjo nustatyti, kad neigiamo krūvio KT dominuojantis patekimo į ląsteles būdas yra nuo kaveolino / lipidinių plaustelių priklausanti endocitozė (29 pav.). Nustatytas, KT kaupimosi ląstelėse sąlygotas kaveolino-1 persiskirstymas ląstelės viduje (30 pav.) įgalino atskirti šiuos du kelius ir nustatyti, kad neigiamo paviršiaus krūvio KT į tirtąsias ląsteles patenka nuo kaveolino priklausančios endocitozės keliu. Šią išvadą darome remdamiesi tyrimais, kurie parodė, kad kaveolino trūkumas nesutrikdo lipidinių plaustelių reguliuojamo patekimo į ląsteles.<sup>[239]</sup>

### ***5.2.5 Kvantinių taškų patekimo į ląsteles mechanizmo tyrimo rezultatų apibendrinimas***

Kvantinių taškų patekimo į ląsteles mechanizmo tyrimo rezultatai apibendrinami pateikiamoje schemeje (31 pav.), kuri iliustruoja galimą tikslingai nemodifikuotų neigiamo krūvio KT kaupimąsi ląstelėse nuo kaveolino priklausančios endocitozės būdu ir šio proceso slopinimą.





31 pav. Schema iliustruojanti viduląstelinę KT kaupimąsi nuo kaveolino priklausančios endocitozės būdu (parodyta raudonomis rodyklėmis) ir šiam procesui daromą įsotinančio KT kaupimosi įtaką. Kaveolino apykaita normaliomis sąlygomis, pradedant pernaša nuo membranos endocitozės būdu ir grįžimu egzocitozės būdu (pavaizduota žaliomis rodyklėmis) yra pateikiama palyginimui, remiantis R. G. Parton et al.<sup>[234]</sup> išvadomis; hibridinė organelė (vėlyvoji endosoma/lizosoma) yra vaizduojama remiantis J. P. Luzio et al.<sup>[240]</sup> ir A. Hayer et al.<sup>[172]</sup> tyrimais. Transferino endocitozė nuo klatrino priklausančiu būdu ir apykaita yra pavaizduota pilkomis rodyklėmis, o makropinocitozė – mėlynomis; pernašos keliai, kurie dar nėra ištirti, yra pažymėti punktyrinėmis rodyklėmis

KT patekimo į ankstyvasias endosomas metu (I-III žingsniai), receptoriai gali būti rūšiuojami ir gražinami į ląstelės paviršių. Plazminės membranos patekimo į ląstelę endocitozės būdu sparta yra gana didelė; fibroblastų ląstelės per vieną valandą įprastai kartu su membrana įtraukia apie 50 proc. jų paviršiuje esančių baltymų ir fosfolipidų.<sup>[241]</sup> Dauguma ląstelės paviršiaus receptorių, dalyvaujančių endocitozėje, palieka savo ligandus ląstelėje ir gražinami į plazminę membraną, kad vėl inicijuotų ligandų molekulių patekimą į ląstelę. Pavyzdžiui, mažo tankio lipoproteinų (LDL) receptoriaus pilnas apykaitos ciklas (į ląstelės vidų ir į ląstelės išorinę membraną) užtrunka nuo 10 iki 20 minučių, o per jo 20 val. gyvavimo trukmę, iki to, kai receptoriaus – ligando kompleksas yra degraduojamas lizosomoje, susidaro keli šimtai transporto ciklų.<sup>[242]</sup> Kai kurie endocituoti ligandai disocijuoja nuo jų receptorių, kai pakliūna į rūgštinę ankstyvųjų endosomų terpę, ir toliau nukreipiami į lizosomas degradavimui. Šis procesas taip pat įgalina atsilaivusių receptorių sugražinimą į ląstelės membranos paviršių. Kai kurie ligandai išlieka prisijungę prie savo receptorių (kurie yra ubikvitinuojami) ir po endocitozės. Tuomet receptoriaus – ligando kompleksas patenka nuo endosomų paviršiaus į vidines endosomų vezikules. Vėlyvosios endosomos, kuriose yra vidinių vezikulių, susilieja su lizosomomis.<sup>[240]</sup> Tolesnis kelias (IV žingsnis) vaizduoja receptoriaus, kurie yra susijungę su kaveole, ir kurie yra patekę į vidines multivezikulinių kūnų vezikules,<sup>[160]</sup> o tai sąlygoja lėtesnę receptorių apykaitą ir degradavimo signalo sustabdymą.<sup>[243]</sup> Šių labai stabilių ir ilgai gyvuojančių kaveolių išardymas ir kaveolino-1 degradacija gali įvykti tik vėlyvosiose endosomose ir lizosomose<sup>[172]</sup> arba tarpinėse, vadinamose hibridinėmis, organelėse.<sup>[240]</sup> Labai tikėtina, kad dėl to, jog multivezikuliniai kūneliai vis dar yra stebimi ląstelėse po 96 val. inkubacijos su KT (18 pav., C), ir atsiranda kaveolino kontroliuojamo endocitozės proceso įsisotinimas ir slopinimas. Atitinkamai, KT patekimo atsinaujinimas, užregistruotas po ~ 8 val. (26 pav., A), gali būti sąlygotas atsistačiusios reikiamų receptorių ir kaveolino apykaitos, kuri, tikėtina, apima biosintezės procesus, atsinaujinančius po ląstelių pasidalinimo. Tuomet neseniai pasidalinusios ląstelės vėl gali tėti

KT endocitozę, kol terpėje yra nanodalelių arba iki kito KT kaupimosi įsisotinimo.

Kaveolinas-1 yra transmembraninis baltymas.<sup>[244]</sup> Išsamūs morfologiniai ir biocheminiai fibroblastų tyrimai parodė, kad normaliomis sąlygomis kaveolino-1, esančio iš kaveolių susiformavusiose vezikulėse, ciklas vyksta tarp plazminės membranos ir Goldžio komplekso (kur kaveolinas-1 yra inkorporuojamas į lipidinius domenų, rūšiuojant molekules grąžinimui į ląstelės paviršių), dalį ciklo tampa vidiniu endoplazminio tinklo baltymu.<sup>[172]</sup> Dažniausia kaveolino-1 lokalizacija prie ląstelės paviršiaus yra kaveolė.<sup>[244]</sup> Kaveolė yra ilgai gyvuojantis plazminės membranos mikrodomenas, sudarytas iš kaveolinas, kavinas (*angl. cavin*) ir cholesteroliu praturtintos membranos. Kaveolių išardymo ir jų komponentų degradacijos tyrimai parodė, kad kaveolinas-1 yra degraduojamas labai lėtai. Įprastomis sąlygomis iš kaveolės susiformavusios vezikulės yra transportuojamos endocitozės keliu į lizosomas.<sup>[172]</sup> Susiformavusios kaveolės susilieja su ankstyvosiomis endosomomis, kuriose vyksta krovinių išrūšiavimas. Kaveolinas-1 gali būti nugabentas į ankstyvasias endosomas ir iš jų perdirbimo endosomos perneša kaveoliną atgal prie ląstelės membranos. Kai ankstyvosios endosomos subręsta, kaveolinas-1 yra aptinkamas vidinėse vėlyvųjų endosomų vezikulėse ir degraduojamas vėlyvosiose endosomose / lizosomose.

Tačiau mūsų rezultatai parodė, kad kaupiantis KT, kai jie patenka į ląsteles nuo kaveolino priklausančiu endocitozės būdu, normali kaveolino-1 apykaita sutrikdoma dėl sąveikos tarp KT ir kaveolino (kuri įprastai vyksta tarp endocituojamo krovinių ir kaveolino baltymų,<sup>[239]</sup> ir tai sąlygoja kaveolino-1 persiskirstymą nuo ląstelės išorinės membranos į endosomas. Galima svarstyti dvi šio persiskirstymo priežastis. Tokia KT ir kaveolino sąveika gali sąlygoti neatstatomą proceso nutraukimą, kas reiškia, kad uždarytas vezikulėse kaveolinas nebėra grąžinamas į plazminę membraną įprastu apykaitos keliu. KT kaupimosi atsistatymas tuomet tampa galimu tik dėl naujo kaveolino sintezės. Alternatyviu atveju, kaveolino apykaita visiškai nenuslopsta, bet

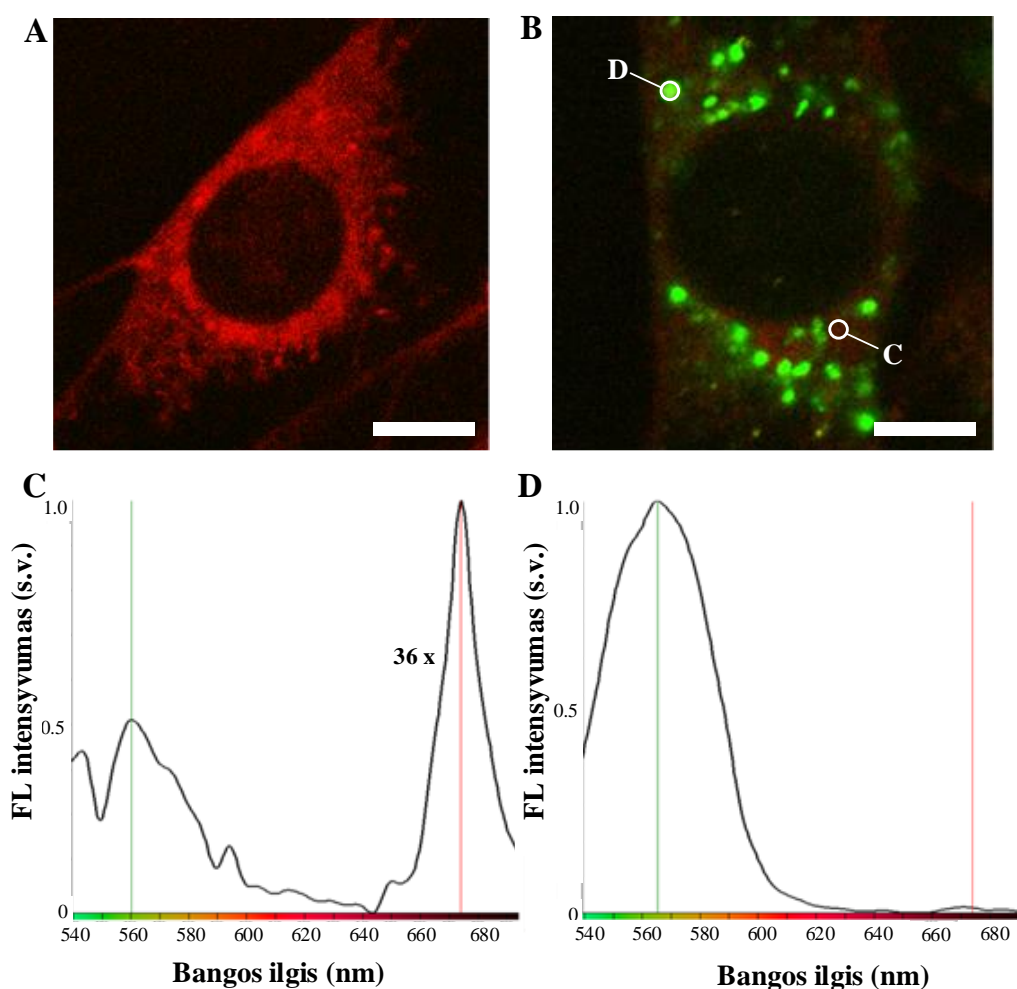
vyksta labai lėtai. Galima daryti prielaidą, kad kaveolino apykaita vyksta per endoplazminį tinklą, arba kaveolinas degraduojamas, kaip parodyta VI žingsnyje, tačiau keliai, kuriais vyksta apykaita ar degradacija, dar nėra ištirti (31 pav. pažymėta punktyrinėmis linijomis).

### **5.3 Kvantinių taškų taikymo nanomedicinoje galimybių vertinimas**

Atlikti KT kaupimosi ląstelėse tyrimai parodė, kad KT biomedicininuose taikymuose neturėtų būti laikomi paprastais zondais, žymekliais ar nešėjais, nes jie taip pat sąlygoja ir įvairius biologinius efektus. Šiuo metu kuriama daug įvairių metodologijų, kurios apjungia įprastai naudojamas terapijas su naujais nanomediciniais būdais.<sup>[245,246]</sup> Tačiau kol kas yra labai mažai tyrimų rezultatų apie bendrą KT ir antivėžinių preparatų naudojimą, pademonstruojant pagerinto gydymo galimybes.<sup>[247]</sup> Žinios apie biologinius atsakus, kuriuos sukelia nanodalelės, ir apie biologinių sistemų sąveikos su nanodalelėmis mechanizmus yra labai vertingos mokslininkams, nes tai padėtų išvengti netikėtų efektų ir pagerintų vystomus nanodalelėmis paremtos diagnostikos ir kombinuotos terapijos metodus.<sup>[248]</sup> Dėl to, siekiant praplėsti žinias, kurios padėtų įvertinti naujų kombinuotos terapijos metodų sukūrimo ir teranostinio KT panaudojimo galimybes, buvo atlikti *in vitro* tyrimai vertinant KT suderinamumą su kitais terapijoje naudojamais preparatais.

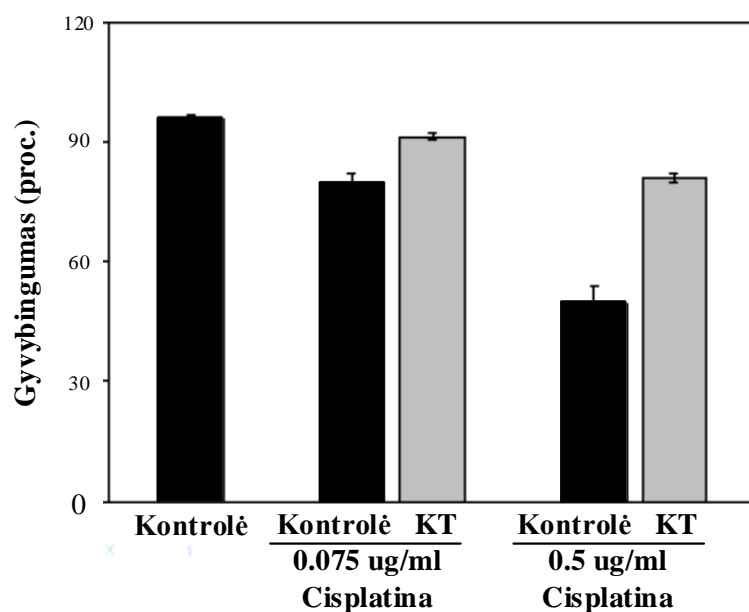
Kaip buvo nustatyta, karboksilo grupėmis dengti KT slopina medžiagų patekimą į ląsteles tam tikru endocitozės būdu. Dėl to buvo svarbu patikrinti galimybes naudoti šias nanodaleles drauge su įprastais vėžio terapijoje naudojamais preparatais. Vienu tyrimams pasirinktu junginiu buvo fotosensibilizatorius chlorinas e6, plačiai taikomas fotodinaminėje vėžinių susirgimų terapijoje,<sup>[249]</sup> o taip pat kuriant naujus šios terapijos metodus, kuriuose būtų naudojami KT ir fotosensibilizatoriaus kompleksai. Eksperimentai su NIH3T3 ląstelių kultūra parodė, kad jų inkubacija su KT545 neturėjo įtakos chlorino e6 (Ce<sub>6</sub>) kaupimuisi ląstelėse (32 pav.). Ce<sub>6</sub> yra amfifilinė molekulė, kuri prilimpa prie plazminės membranos ir pasyviai

prasiskverbia per ją,<sup>[250]</sup> arba patenka į ląsteles endocitozės būdu, reguliuojamu LDL receptoriaus.<sup>[251]</sup> Konfokaliniuose fluorescencijos vaizduose buvo užregistruota difuziškai pasiskirsčiusi raudona Ce<sub>6</sub> fluorescencija kontrolinėse ląstelėse (32 pav., A), ir ląstelėse, inkubuotose su KT545 (32 pav., B), kur žalia KT fotoluminescencija lokalizuota vezikulinėse struktūrose. Po dviejų valandų inkubacijos vaizduose, gautuose iš raudono ir žalio registravimo kanalų, nebuvo aptikta geltonos spalvos sričių, atitinkančių bendrą Ce<sub>6</sub> fluorescencijos ir KT fotoluminescencijos lokalizaciją.



32 pav. Konfokaliniai fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, perteikiantys Ce<sub>6</sub> viduląstelinį pasiskirstymą (raudona spalva): A – po 2 val. inkubacijos kontrolinėse NIH3T3 ląstelėse ir B – ląstelėse inkubuotose 24 val. su KT545 (žalia spalva), mastelis 10 μm. Normuoti spektrai užregistruoti naudojantis konfokalinio fluorescencinio mikroskopo spektriniu priedu baltais apskritimais pažymėtose (B) vietose: C – raudoname fone ir D – vezikulinėje struktūroje

Tačiau ląstelių inkubacija su KT545 turėjo poveikį cisplatinos, kuri yra plačiai naudojama kaip priešvėžinis vaistas,<sup>[252]</sup> chemotoksiniam poveikiui. Patekusi į branduolį cisplatina jungiasi prie DNR ir sukelia DNR pažaidas<sup>[253]</sup> bei sukelia apoptozę.<sup>[254]</sup> Cisplatinos junginiai pernešami per plazminę membraną keliais specifiniais molekuliniais transporteriais.<sup>[255]</sup> Kaip parodė ankstesni tyrimai, vieni KT citotoksinio poveikio ląstelių gyvybingumui nesukelia (18 pav., A ir B). Eksperimentų, kuriais buvo tiriamas kontrolinių ląstelių (be inkubacijos su KT) ir ląstelių, 24 val. prieš poveikį su cisplatiną inkubuotų su KT, gyvybingumas, rezultatai parodė, kad po poveikio dviem skirtingomis cisplatinos dozėmis inkubuotos su KT ląstelės buvo santykinai labiau atsparios cisplatinai, nei kontrolinės (33 pav.). Statistiškai patikrinus lyginamas grupes, *p* reikšmė kito nuo 0,024 iki 0,026, tad skirtumas tarp lyginamų grupių buvo reikšmingas statistiniu požiūriu.



33 pav. Padidėjęs NIH3T3 ląstelių atsparumas cisplatinai, sukeltas 24 val. inkubacijos su KT545

Stebėtas mažesnis chemotoksinis efektas gali būti pasekmė to, kad po inkubacijos su KT cisplatinos ląstelėse susikaupė mažiau. Taip galėtų būti, jeigu šio vaisto patekimas į ląsteles būtų slopinamas išisotinančio KT

susikaupimo ląstelėse. Tačiau KT patekimas į ląsteles priklauso nuo nanodalelių krūvio, o kaupimosi mechanizmas yra skirtingas teigiamo ir neigiamo paviršiaus krūvio KT.<sup>[70,112,236]</sup> Atlikti kontroliniai eksperimentai parodė, kad neigiamo krūvio KT įsisotinęs kaupimas neturi įtakos po jo vykstančiam KT su teigiamo paviršiaus krūvio dangalu patekimui į ląsteles. Cisplatina fiziologiniame pH (pKa = 6,56)<sup>[256]</sup> yra teigiamo krūvio jonas ir į ląsteles pakliūna su vario ir katijonų nešikliais.<sup>[255]</sup> Todėl tikėtina, kad neigiamo krūvio KT neturėtų paveikti šių receptorių ir nuslopinti cisplatinos kaupimosi ląstelėse, kaip nepaveikė ir ampifilinio fotosensibilizatoriaus chlorino e6 susikaupimo ląstelėse. Manoma, kad įsisotinantis neigiamo paviršiaus krūvio KT kaupimasis tiesiogiai veikia tik receptorių-gaudyklės (*angl. scavenger receptors, SRA*), atpažįstančius ir padedančius įsisavinti neigiamo krūvio makromolekules, bei receptorių, aktyvių nuo kaveolino/lipidinių plaustelių priklausomoje endocitozėje,<sup>[236]</sup> kuri būdinga ląstelėms pernešant per membraną neigiamą krūvį turinčias molekules.<sup>[236,257]</sup> Todėl labiau tikėtina, kad KT susikaupimas ląstelėse ir didėjantis ląstelių atsparumas cisplatinai vyksta per skirtingus mechanizmus. Pavyzdžiui, atsparumo didėjimas gali būti susijęs su KT sankaupos sukeliama streso atsakais ląstelėse.<sup>[258]</sup> Kaip parodyta bendraautorių darbuose, karboksilo grupėmis funkcionalizuoti PEG-KT, selektyviai patenkantys į ląsteles nuo kaveolino/lipidinių plaustelių<sup>[160]</sup> ir SRA priklausančios endocitozės būdu, inicijuoja NF-κB (*angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ir citoplazminių baltymų kinazės (*angl. mitogen-activated protein kinase, MAPK*) signalų sekas (kurios yra dvi pagrindinės signalų sekos ląstelėse, aktyvuojamos streso ir uždegiminiuose atsakuose), o taip pat sukelia ir citokinų sintezę žmogaus odos ląstelėse ar chemokinų sintezę pirminiuose monocituose.<sup>[236]</sup> Yra tyrimų, kuriuose parodyta, kad NF-κB aktyvacija fibroblastuose inicijuoja autofaginę kaveolino-1 degradaciją,<sup>[259]</sup> teigiant, kad oksidacinio streso sukelta autofagija (normalus ir valdomas ląstelės savęs virškinimo procesas, kai šalinamos ląstelės dalys apgaubiamos endoplazminio tinklo sluoksniu, taip susidarant autofaginei pūslelei; jai susiliejus su lizosoma,

į lizosomos vidų patekusios struktūros visiškai suardomos) yra apsauginis/išgyvenimo mechanizmas nuo KT citotoksiškumo.<sup>[260]</sup> Keliuose tyrimuose taip pat nurodoma, kad ląstelės, patiriančios kaveolino-1 trūkumą, kas mūsų atliktų tyrimų atveju yra labai tikėtinas KT kaupimosi ląstelėse rezultatas, tampa atsparios oksidacinio streso sukeliama citotoksiškumui.<sup>[261]</sup> Tad galima teigti, kad įsisotinantis karboksilo grupėmis dengtų KT susikaupimas ląstelėse, vykstantis nuo kaveolino priklausančiu endocitozės būdu, gali sukelti įvairius su stresu susijusius signalus, pavyzdžiui, autofagiją,<sup>[259,262]</sup> kurie ir sąlygoja didesnę atsparumą cisplatinai.

Tikslingai nemodifikuoti karboksilo grupėmis padengti KT yra tinkamas objektas nespecifinių nanodalelių kaupimosi ir viduląstelinės pernašos tyrimų modeliavimui.<sup>[263]</sup> Daugelyje tyrimų yra aprašoma, kad reaktyvių deguonies formų generavimas yra pagrindinis nanodalelių sukeliama citotoksiškumo mechanizmas,<sup>[192]</sup> o sukelti streso atsakai inicijuoja nuo streso priklausomų signalų kaskadas ir įvairius patofiziologinius atsakus. Į galimą ryšį tarp ilgalaikio nanodalelių kaupimosi ir sukulto ląstelėse streso turi būti atsižvelgta nanodalelių, numatytų taikyti vėžio terapijos poreikiams, atveju, įskaitant aukso,<sup>[264]</sup> polistireno,<sup>[69]</sup> polimerines,<sup>[257]</sup> porėto silicio<sup>[265]</sup> ir geležies oksido<sup>[266]</sup> nanodaleles. Ypatingas dėmesys turėtų būti skirtas jų dydžio, formos, padengimo PEG, paviršiaus modifikavimo tikslinės paskirties ligandais kontrolei, kad neskatinti visų ląstelių kaupti nanodaleles nuo kaveolino priklausančiu endocitozės būdu. Galimas daugialypis kombinuotos terapijos su nanodalelėmis poveikis yra iliustruojamas ne tik šiame darbe pateiktais tyrimų rezultatais, nustatčius sukeltą didesnę ląstelių atsparumą cisplatinai dėl įsisotinamo KT kaupimosi, bet ir kitais tyrimais, kurie parodė, kad kai kaveolino-1 trūkumą ir autofagiją sukelia oksidacinis stresas naviko aplinkoje esančiuose fibroblastuose, tai paskatina naviko augimą, o tuo tarpu autofagija naviko ląstelėse sumažina vėžio augimą.<sup>[259]</sup> Todėl ypatingai svarbu nanodalelių paviršių modifikuoti tokiu būdu, kuris leistų parinkti norimus jų patekimo į ląsteles būdus arba apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso sukėlimo.<sup>[267,268]</sup> Svarbu atsižvelgti ir į tai, kad *in vivo* nanodalelės gali pasiekti



numatyta tikslinę vietą (pvz., naviką) pasyvaus selektyvumo mechanizmo dėka. Tikslinių ligandų prikabinimas prie nanodalelių nepadidina jų kiekio, kuris pasiekia tikslą, tačiau paskatina patekimą į reikiamos ląstelės vidų.<sup>[269]</sup> Tikslinio taikymo efektyvumas priklauso ir nuo receptorių tankio ląstelės membranos paviršiuje.<sup>[270]</sup> Dėl to, daugeliu atvejų, nespecifinis prikibimas ir kaupimasis ląstelėje (kaip ir tirtų tikslingai nemodifikuotų KT atveju) santykinai išauga dėl nepakankamo ligando giminingumo vyraujančiam receptoriui, mažo receptorių tankio ir/ar “prisijungimo vietos” užblokavimo.<sup>[269]</sup> Be to, nanodalelės biologinėje aplinkoje yra sparčiai padengiamos baltymais, kurie veikia ne tik nanodalelių patekimą, transportą ir lemtį ląstelėse,<sup>[140]</sup> bet ir ląstelinius atsakus, galinčius turėti svarbių pasekmių gydomojo poveikio veiksmingumui.<sup>[271]</sup> Buvo nustatyta, kad baltymų adsorbcijos sumažinimas *in vivo* padeda išvengti retikuloendotelinės sistemos,<sup>[272]</sup> pagrindinio iššūkio, siekiant padidinti biožymenimis pažymėtų nanodalelių selektyvumą ir specifiškumą *in vivo*.<sup>[273]</sup> Tačiau reikalingas subalansuotas sprendimas, nes nespecifinis kaupimosi būdas gali pasitarnauti ir tam, kad medžiaga patektų į ląstelę dar efektyviau,<sup>[68]</sup> o sumažinta nanodalelių nespecifinė adhezija prie plazminės membranos sąlygoja sumažėjusį kaupimąsi ir tikslinėse ląstelėse.<sup>[274]</sup> Norimo optimizavimo efekto galima būtų siekti derinant tarpusavyje kelias strategijas, pavyzdžiui, formuojant cviterjoninį nanodalelių dangalą, kuris turėtų neigiamo krūvio PEG-karboksilo grupę ir reikiamu paviršiniu tankiu pasiskirsčiusį teigiamo krūvio PEG-tikslinį ligandą, taip padidinant specifinį kaupimąsi tikslinėse ląstelėse, ir sumažinant nespecifinį kaupimąsi.<sup>[273]</sup>

## 6 Išvados

1. Spektroskopiniais metodais ištyrus kvantinių taškų patekimo į ląsteles laikinę dinamiką nustatyta, kad neigiamo krūvio apvalkalo kvantinių taškų patekimo į ląsteles procesą galima suskirstyti į tris etapus: I – lėtąjį, II – augimo ir III – soties, kurie yra būdingi tirtoms vėžinių MCF-7, HepG2 ir nevėžinių NIH3T3 ląstelių linijoms. Tačiau šie kaupimosi etapai skirtingose ląstelių kultūrose yra nevienodos trukmės.
2. Konfokalinės fluorescencijos mikroskopijos metodu ištyrus neigiamo paviršiaus krūvio kvantinių taškų patekimo į ląsteles procesą, pagal viduląstelinį kvantinių taškų pasiskirstymą ir susiformavusių pūslelių tipus, galima suskirstyti į keturias fazes: 1-oji fazė – prikibimas prie membranos; 2-oji fazė – vezikulinių struktūrų formavimas ir pasklidimas citoplazmoje; 3-oji fazė – vezikulių susilieėjimas ir lokalizacija aplink branduolį; 4-oji fazė – multivezikulinių kūnelių formavimas ir pasiskirstymas citoplazmoje.
3. Naudojant fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimo mikroskopijos metodą užregistruotas nuo endosomų brandos priklausantis viduląstelinių vezikulių vidinės struktūros heterogeniškumas. Skirtingos brandos endosomos gali būti apibūdinamos ir vaizdinamos remiantis jose sukauptų kvantinių taškų savitomis fotoluminescencijos gyvavimo trukmėmis (endocitotinės vezikulės – 16-22 ns, ankstyvosios endosomos – 10-15 ns, ir vėlyvosios endosomos bei multivezikuliniai kūnai – 5-9 ns).
4. Skirtingais fizikiniais ir biocheminiais metodais nustatyta, kad difuzijos būdu kvantiniai taškai per ląstelės membraną neprasiskverbia, bet į ląsteles patenka endocitozės būdu. Kvantinių taškų patekimo kelią keičia jų paviršiuje susiformuojantis baltymų vainikas. Nepadengti baltymais neigiamo paviršiaus krūvio kvantiniai taškai į ląsteles patenka tik vienu nuo kaveolino priklausančiu endocitozės keliu.

5. Kvantinių taškų, kaip modelinių diagnostinių priemonių, ir antivėžinio preparato cisplatinos bendras panaudojimas *in vitro* atskleidė, kad kvantiniai taškai, nesukeldami toksinio poveikio ląstelių gyvybingumui ir dalijimuisi, padidino ląstelių atsparumą. Tokio pobūdžio sąveikas būtina įvertinti prieš naudojant nanodaleles su vaistiniais preparatais kombinuotoje diagnostikoje ir terapijoje *in vivo*.

## 7 Publikacijos

Straipsniai, kurių pagrindu yra parengta disertacija, paskelbti recenzuojamuose mokslo leidiniuose:

- L. Damalakiene, V. Karabanovas, S. Bagdonas, L. Pupelis, M. Valius, R. Rotomskis. Suppression of a Specific Intracellular Uptake Pathway by a Saturating Accumulation of Quantum Dots. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. (priimta, numatoma publikuoti 2015 m.);
- L. Damalakiene, V. Karabanovas, S. Bagdonas, M. Valius, R. Rotomskis. Intracellular distribution of non-targeted quantum dots after natural uptake and microinjection. *International Journal of Nanomedicine*. 8(1): 555–568 (2013).

Konferencijos medžiaga:

- L. Damalakiene, S. Bagdonas, R. Rotomskis, V. Karabanovas, M. Ger, M. Valius. Influence of growth factor on internalization pathway of quantum dots into cells: PDGF effects internalization of QDs. 9th IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO), 465–468, 2009, July 26-30, Genoa, Italy.

Pranešimai mokslinėse konferencijose:

- L. Damalakiene. Cluster Lithuanian Plastic and Novel Materials Cluster: activities in the area of nano-bio interface. 2nd International Conference on Biomaterials Science – ISBC2013. Kovo 19-22 d., 2013 m., Tsukuba, Japonija.
- L. Damalakiene, S. Bagdonas, R. Rotomskis, M. Ger, M. Valius. Accumulation of quantum dots in different cell lines. *Nanotech Europe 2009*. Rugsėjo 28-30 d., 2009 m., Berlynas, Vokietija;
- L. Bandzaityte, M. Ger, T. Daunoravičius, V. Karabanovas, S. Bagdonas, M. Valius, R. Rotomskis. Accumulation and distribution

of quantum dots in cell cultures. International conference "Innovative methods and technologies in biomedicine". Gegužės 22-24 d., 2009 m., Vilnius, Lietuva;

- L. Bandzaitytė, S. Bagdonas, R. Rotomskis, Z. Žitkus, M. Valius. Influence of growth factor on accumulation of quantum dots in cells. 7th ScanBalt Forum and Biomaterials Days 2008. Rugsėjo 24-26 d., 2008 m., Vilnius, Lietuva.

## 8 Literatūros sąrašas

1. C. Vauthier, P. Couvreur, E. Fattal. Nanomaterials: Applications in Drug Delivery. p. 131-151. Nanomaterials: A danger or a promise? A chemical and biological perspective. Redaktoriai: R. Brayner, F. Fiévet, T. Coradin. Springer, 2013 (elektroninė knyga)
2. L.Y. Rizzo, B. Theek, G. Storm, F. Kiessling, T. Lammers. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 24, 6: 1159–1166 (2013)
3. L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64: 206–212 (2012)
4. A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.* 63: 185–98 (2012)
5. J. Panyama, V. Labhasetwar. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64: 61–71 (2012)
6. J. Breger, J.B. Delehanty, I.L. Medintz. Continuing progress toward controlled intracellular delivery of semiconductor quantum dots. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 6, 5 (2014)
7. M.J.D. Clift, V. Stone. Quantum dots: an insight and perspective of their biological interaction and how this relates to their relevance for clinical use. *Theranostics*. 2, 7: 668–680 (2012)
8. F.M. Winnik, D. Maysinger. Quantum dot cytotoxicity and ways to reduce it. *Acc Chem Res*. 19, 46(3): 672–680 (2013)
9. C.E. Probst, P. Zrazhevskiy, V. Bagalkot, X. Gao. Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65: 703–718 (2013)
10. S. Ghaderi, B. Ramesh, A. M. Seifalian. Fluorescence nanoparticles “quantum dots” as drug delivery system and their toxicity: a review. *Journal of Drug Targeting*. 19, 7: 475–486 (2011)
11. F. Joris, B.B. Manshian, K. Peynshaert, S.C. Smedt, K. Braeckmans, S.J. Soenen. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the *in vitro*–*in vivo* gap. *Chem. Soc. Rev.* 42: 8339–8359 (2013)
12. A. Albanese, P.S. Tang, W.C. Chan. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 14: 1–16 (2012)
13. A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–biointerface. *Nature Materials*. 8, 7: 543–557 (2009)

14. R. Duncan, R. Gaspar. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharmaceutics*. 8: 2101–2141 (2011)
15. M. Zhu, G. Nie, H. Meng, T. Xia, A. Nel, Y. Zhao. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport and fate. *Acc. Chem. Res.* 46, 3: 622–631 (2013)
16. L.O. Cinteza. Quantum dots in biomedical applications: advances and challenges. *J. Nanophoton.* 4, 1: 042503 (2010)
17. B. Wang, X. He, Z. Zhang, Y. Zhao, W. Feng. Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. *Acc. Chem. Res.* 46, 3: 761–769 (2013)
18. N.M. Zaki, N. Tirelli. Gateways for the intracellular access of nanocarriers: a review of receptor-mediated endocytosis mechanisms and of strategies in receptor targeting. *Expert Opin Drug Deliv.* 7, 8: 895–913 (2010)
19. T.G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today*. 6: 176–185 (2011)
20. Y.P. Ho, K.W. Leong. Quantum dot-based theranostics. *Nanoscale*. 2, 1: 60–68 (2010)
21. K.P. García, K. Zarschler, L. Barbaro, J.A. Barreto, W. O'Malley, L. Spiccia, H. Stephan, B. Graham. Zwitterionic-coated “stealth” nanoparticles for biomedical applications: recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. *Small*. 10, 13: 2516–2529 (2014)
22. A.P. Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*. 271, 5251: 933–937 (1996)
23. A.L. Efros, M. Rosen. The electronic structure of semiconductor nanocrystals. *Annual Review of Materials Science*. 30: 475–521 (2000)
24. X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*. 307: 538–544 (2005)
25. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* 5, 763–775 (2008)
26. B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M.G. Bawendi. (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B*. 101, 46: 9463–9475 (1997)
27. R.D. Schaller, M. Sykora, S. Jeong, V.I. Klimov. High-efficiency carrier multiplication and ultrafast charge separation in semiconductor nanocrystals studied via time-resolved photoluminescence. *J. Phys. Chem. B*. 110, 50: 25332–25338 (2006)

28. X. Wang, L. Qu, J. Zhang, X. Peng, M. Xiao. Surface-related emission in highly luminescent CdSe QDs. *Nano Lett.* 3, 1103–1106 (2003)
29. M. Grabolle, M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller, U. Resch-Genger. Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties. *Anal. Chem.* 81, 15: 6285–6294 (2009)
30. T.R. Pisanic, Y. Zhang, T.H. Wang. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *Analyst.* 139: 2968-2981 (2014)
31. F.T. Boxberg, J. Tulkki. Quantum Dots: Phenomenology, Photonic and Electronic Properties, Modeling and Technology, (Ch. 4), p. 37. *The Handbook of Nanotechnology. Nanometer Structures: Theory, Modeling, and Simulation.* Redalorius: Aklesh Lakhtakia. ASME, 2004
32. N.A. Anderson, T. Lian. Ultrafast electron transfer at the molecule-semiconductor nanoparticle interface. *Annual Review of Physical Chemistry.* 56: 491-519 (2005)
33. V.I. Klimov, A.A. Mikhailovsky, D.W. McBranch, C.A. Leatherdale and M.G. Bawendi. Quantization of multiparticle auger rates in semiconductor quantum dots. *Science.* 287: 1011–1013 (2000)
34. I.L. Medintz, T. Pons, S.A. Trammell, A.F. Grimes, D.S. English, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson and H. Mattoussi. Interactions between redox complexes and semiconductor quantum dots coupled via a peptide bridge. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 16745–16756 (2008)
35. M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D.S. Chemla, A.P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss. Time-gated biological imaging by use of colloidal QDs. *Opt. Lett.* 26, 825–827 (2003)
36. G. Schlegel, J. Bohnenberger, I. Potapova, A. MewsA. Fluorescence decay time of single semiconductor nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.* 88, 137401 (2002)
37. K. Zhang, H. Chang, A. Fu, A.P. Alivisatos, H. Yang. Continuous distribution of emission states from single CdSe/ZnS QDs. *Nano Lett.* 6, 843–847 (2006)
38. S.D. Conner, S.L. Schmid. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422, 6927: 37-44 (2003)
39. L.Y.T. Chou, K. Ming, W.C.W. Chan. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 40, 233–245 (2011)
40. K. Sugano, M. Kansy, P. Artursson et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 8: 597–614 (2010)
41. C.G. Hansen, B.J. Nichols. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci.*, 122, 11: 1713–1721 (2009)
42. F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen, Y. Zhao. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small.* 7, 10: 1322–1337 (2011)



43. K. Sandvig, M.L. Torgersen, H. Raa, B. Deurs. Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. *Histochemistry and Cell Biology*. 129, 3: 267–276 (2008)
44. M.T. Howes, S. Mayor, R.G. Parton. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 22, 4: 519–527 (2010)
45. S. Kumari, S. Mayor. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research* 20: 256–275 (2010)
46. T.G. Iversen, N. Frerker, K. Sandvig. Quantum dot bioconjugates: uptake into cells and induction of changes in normal cellular transport. *SPIE Proceedings*. 7189: 71890–71899 (2009)
47. T. Soldati, M. Schliwa. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7: 897–908 (2006)
48. M. Jovic, M. Sharma, J. Rahajeng, S. Caplan. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopath*. 25, 1: 99–112 (2010)
49. N.M. Zaki, N. Tirelli. Assessment of nanomaterials cytotoxicity and internalization. *Methods in Molecular Biology*. 695: 243–259 (2011)
50. G. Scita, P.P. Fiore. The endocytic matrix. *Nature*. 28, 463(7280): 464–73 (2010)
51. J. Rauch, W. Kolch, S. Laurent, M. Mahmoudi. Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles. *Chem. Rev.* 113, 5: 3391–3406 (2013)
52. M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K.A. Dawson. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23, 105(38):14265-14270 (2008)
53. A. Verma, F. Stellacci. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*. 6, 1: 12-21 (2010)
54. X. Duan, Y. Li. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small: Nanotoxicology*. 9, 9-10: 1521–1532 (2013)
55. X. Ma, Y. Wu, S. Jin, Y. Tian, X. Zhang, Y. Zhao, L. Yu, X. Liang. Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS Nano*. 5, 11: 8629–8639 (2011)
56. B.D. Chithrani, W.C.W. Chan. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 7, 6: 1542–1550 (2007)

57. S. Li, L. Huang. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics*. 5, 4: 496–504 (2008)
58. C. Dong, J. Irudayaraj. Hydrodynamic size-dependent cellular uptake of aqueous QDs probed by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*. 116, 40: 12125–12132 (2012)
59. Y. Williams, A. Sukhanova, M. Nowostawska, A. M. Davies, S. Mitchell, V. Oleinikov, Y. Gun'ko, I. Nabiev, D. Kelleher, Y. Volkov. Probing cell-type-specific intracellular nanoscale barriers using size-tuned quantum dots. *Small*. 5, 22: 2581–2588 (2009)
60. D. Walczyk, F.B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson. What the cell “sees” in bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 16: 5761–5768 (2010)
61. W. Jiang, B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology* 3, 145–150 (2008)
62. P. Decuzzi, M. Ferrari. The receptor-mediated endocytosis of nonspherical particles. *Biophysical Journal*. 94, 10: 3790–3797 (2008)
63. F.E. Alemdaroglu, N.C. Alemdaroglu, P. Langguth, A. Herrmann. Cellular uptake of DNA block copolymer micelles with different shapes. *Macromolecular Rapid Communications: Self-Assembly and Hierarchical Structure Formation of Macromolecules*. 29, 4: 326–329 (2008)
64. S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *PNAS*. 105, 33: 11613–11618 (2008)
65. X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*. 31, 3: 438–448 (2010)
66. H.L. Herd, A. Malugin, H. Ghandehari. Silica nanoconstruct cellular toleration threshold in vitro. *Journal of Controlled Release*. 153, 1: 40–48 (2011)
67. Z. Yue, W. Wei, P. Lv, H. Yue, L. Wang, Z. Su, G. Ma. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*. 12, 7: 2440–2446 (2011)
68. T.A. Kelf, V.K. Sreenivasan, J. Sun, E.J. Kim, E.M. Goldys, A.V. Zvyagin. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology*. 16, 21(28): 285105 (2010)
69. J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromolecular Bioscience*. 8, 12: 1135–1143 (2008)

70. O. Harush-Frenkel, N. Debotton, S. Benita, Y. Itschuler. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353, 1: 26–32 (2007)
71. A. Nan, X. Bai, S.J. Son, S.B. Lee, H. Ghandehari. Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes. *Nano Lett.* 8, 8: 2150–2154 (2008)
72. B. Kim, G. Han, B.J. Toley, C.K. Kim, V.M. Rotell, N.S. Forbes. Tuning payload delivery in tumour cylindroids using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol.* 5, 6: 465–472 (2010)
73. B.H. Kenzaoui, M.R. Vila, J.M. Miquel, F. Cengelli, L. Juillerat-Jeanneret. Evaluation of uptake and transport of cationic and anionic ultrasmall iron oxide nanoparticles by human colon cells. *Int. J. Nanomed.* 7: 1275–1286 (2012)
74. D.L.J. Thorek, A. Tsourkas. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials.* 29: 3583–3590 (2008)
75. I. Slowing, B.G. Trewyn, V.S.Y. Lin. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 14792–14799 (2006)
76. H. Jin, D.A. Heller, R. Sharma, M.S. Strano. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano* 3: 149–158 (2009)
77. J. Wang, S. Tian, R.A. Petros, M.E. Napier, J.M. Desimone. The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 11306–11313 (2010)
78. P. Mukherjee, R.R. Arvizo, O.R. Miranda, M.A. Thompson, C.M. Pabelick. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Lett.* 10: 2543–2548 (2010)
79. B. Wang, L. Zhang, S.C. Bae, S. Granick. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 18171–18175 (2008)
80. H.K. Shete, R.H. Prabhu, V.B. Patravale. Endosomal escape: a bottleneck in intracellular delivery. *J Nanosci Nanotechnol.* 14, 1: 460–474 (2014)
81. S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, S. Seal. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials.* 28, 31: 4600–4607 (2007)
82. C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 31, 13: 3657–3666 (2010)

83. C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J.N. Pons, J. C. Bacri, F. Gazeau. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 24, 6: 1001–1011 (2003)
84. E. Fröhlich. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 7: 5577–5591 (2012)
85. N.M. Schaeublin, L.K. Braydich-Stolle, A.M. Schrand. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*. 3, 2: 410–420 (2011)
86. M. Baek, I.S. Kim, J. Yu, H.E. Chung, J.H. Choy, S.J. Choi. Effect of different forms of anionic nanoclays on cytotoxicity. *J Nanosci Nanotechnol*. 11, 2: 1803–1806 (2011)
87. S. Bhattacharjee, L.H. Haan, N.M. Evers. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part Fibre Toxicol*. 7: 25 (2010)
88. C.M. Goodman, C.D. McCusker, T. Yilmaz, V.M. Rotello. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem*. 15, 4: 897–900 (2004)
89. W.K. Oh, S. Kim, M. Choi. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano*. 4, 9: 5301–5313 (2010)
90. L. Ruizendaal, S. Bhattacharjee, K. Pournazari. Synthesis and cytotoxicity of silicon nanoparticles with covalently attached organic monolayers. *Nanotoxicology*. 3, 4: 339–347 (2009)
91. A. Nagy, J.A. Hollingsworth, B. Hu, A. Steinbrück, P.C. Stark, C.R. Valdez, M. Vuyisich, M.H. Stewart, D.H. Atha, B.C. Nelson, R. Iyer. Functionalization-dependent induction of cellular survival pathways by CdSe quantum dots in primary normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*. 7, 10: 8397–8411 (2013)
92. M.J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, S. Li. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 172: 782–794 (2013)
93. K. Xiao, Y. Li, J. Luo, J.S. Lee, W. Xiao, A.M. Gonik, R.G. Agarwal, K.S. Lam. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*. 32, 13: 3435–3446 (2011)
94. B. Kim, G. Han, B.J. Toley, C. Kim, V.M. Rotello, N.S. Forbes. Tuning payload delivery in tumour cylindroids using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 5: 465–472 (2010)

95. S. Jiang, Z. Cao. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Advanced Materials*. 22, 9: 920–932 (2010)
96. A. Musyanovych, J. Dausend, M. Dass, P. Walther, V. Mailänder, K. Landfester. Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: a study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomaterialia*. 7, 12: 4160–4168 (2011)
97. Z.P. Chen, R.Z. Xu, Y. Zhang, N. Gu. Effects of proteins from culture medium on surface property of silanes-functionalized magnetic nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 4: 204–209 (2008)
98. D.P. Lankveld, R.G. Rayavarapu, P. Krystek, A.G. Oomen, H.W. Verharen, T.G. van Leeuwen, W.H. De Jong, S. Manohar. Blood clearance and tissue distribution of PEGylated and non-PEGylated gold nanorods after intravenous administration in rats. *Nanomedicine (Lond)*. 6, 2: 339–349 (2011)
99. J. Lipka, M. Semmler-Behnke, R.A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, W.J. Parak, W.G. Kreyling. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials*. 31, 25: 6574–6581 (2010)
100. T.J. Daou, L. Li, P. Reiss, V. Josserand, I. Texier. Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots. *Langmuir*. 3, 25(5): 3040–3044 (2009)
101. E.K.U. Larsen, T. Nielsen, T. Wittenborn, L.M. Rydtoft, A.R. Lokanathan, L. Hansen, L. Ostergaard, P. Kingshott, K.A. Howard, F. Besenbacher, N.C. Nielsen, J. Kjems. Accumulation of magnetic iron oxide nanoparticles coated with variably sized polyethylene glycol in murine tumors. *Nanoscale*. 4: 2352 (2012)
102. K. Chaudhari, M. Ukawala, A. Manjappa, A. Kumar, P. Mundada, A. Mishra, R. Mathur, J. Mönkkönen, R. Murthy. Opsonization, biodistribution, cellular uptake and apoptosis study of PEGylated PBCA nanoparticle as potential drug delivery carrier. *Pharm. Res.* 29, 1: 53–59 (2012)
103. A.S. Zahr, C.A. Davis, M.V. Pishko. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol). *Langmuir*. 12, 22(19): 8178–8185 (2006)
104. M.P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F.B. Bombelli, K.A. Dawson. Physical–chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 8: 2525–2534 (2011)
105. S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S.K. Knauer, R.H. Stauber. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology* 8: 772–781 (2013)

106. M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, K. A. Dawson. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology* 7: 779–786 (2012)
107. E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. Puentes. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*. 4, 7: 3623–3632 (2010)
108. M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M.B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*. 5, 9: 7503–7509 (2011)
109. G. Caracciolo, L. Callipo, S. C. De Sanctis, C. Cavaliere, D. Pozzi, A. Lagana. Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol–DOPE/DNA lipoplexes in serum. *Biochim Biophys Acta*. 1798, 3: 536–543 (2010)
110. A. Lesniak, F. Fenaroli, M.P. Monopoli, C. Åberg, K.A. Dawson, A. Salvati. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano*. 6, 7: 5845–5857 (2012)
111. F. Marano, S. Hussain, F. Rodrigues-Lima, A. Baeza-Squiban, S. Boland. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch. Toxicol.* 85: 733–741 (2011)
112. J. Park, J. Nam, N. Won, H. Jin, S. Jung, S. H. Cho, S. Kim, Compact and stable quantum dots with positive, negative, or zwitterionic surface: specific cell interactions and non-specific adsorptions by the surface charges. *Advanced Functional Materials*. 21, 9: 1558–1566 (2011)
113. J.A. Kim, C. Åberg, A. Salvati, K.A. Dawson. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat. Nanotechnol.* 7: 62–68 (2012)
114. L. Peng, M. He, B. Chen, Q. Wu, Z. Zhang, D. Pang, Y. Zhu, B. Hu, Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. *Biomaterials*. 34, 37: 9545–9558 (2013)
115. A.M. Smith, H. Duan, A.M. Mohs, S. Nie. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 17, 60(11): 1226–1240 (2008)
116. M. Massignani, C. LoPresti, A. Blazs. Controlling cellular uptake by surface chemistry, size, and surface topology at the nanoscale. *Small*. 5, 21: 2424–2432 (2009)
117. M. Massignani, I. Canton, T. Sun. Enhanced fluorescence imaging of live cells by effective cytosolic delivery of probes. *PLoS One*. 3, 5(5): e10459 (2010)
118. S. Jin, Y. Hu, Z. Gu, L. Liu, H. Wu. Application of quantum dots in biological imaging. *Journal of Nanomaterials*. 2011: 834139 (2011)
119. J.B. Delehanty, H. Mattoussi, I.L. Medintz. Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. *Anal Bioanal Chem.* 393, 4: 1091–1105 (2009)

120. M.G. Qaddoumi, H. Ueda, J. Yang, J. Davda, V. Labhasetwar, V.H. Lee. The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Pharm Res.* 21, 4: 641–648 (2004)
121. S. Barua, K. Rege. Cancer-cell-phenotype-dependent differential intracellular trafficking of unconjugated quantum dots. *Small.* 5, 3: 370–376 (2009)
122. A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto. Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochem Biophys Res Commun.* 30, 314(1): 46–53 (2004)
123. M.J. Clift, C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, D.M. Brown, V. Stone. The uptake and intracellular fate of a series of different surface coated quantum dots in vitro. *Toxicology.* 15, 286(1-3): 58–68 (2011)
124. X. Jiang, C. Röcker, M. Hafner, S. Brandholt, R.M. Dörlich, G.U. Nienhaus. Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live HeLa cells. *ACS Nano.* 23, 4(11): 6787–6797 (2010)
125. L.W. Zhang, N.A. Monteiro-Riviere. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicol Sci.* 110, 1: 138–155 (2009)
126. Y. Xiao, S.P. Forry, X. Gao, R.D. Holbrook, W.G. Telford, A. Tona. Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *J Nanobiotechnology.* 15, 8: 13 (2010)
127. J. Im, K.K. Maiti, W. Kim, K.T. Kim, S.K. Chung. Cellular uptake properties of the complex derived from quantum dots and G8 molecular transporter. *Bull. Korean Chem. Soc.* 32, 4: 1282–1292 (2011)
128. W.C. Chan, S. Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science.* 25, 281(5385): 2016-2024 (1998)
129. M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 25, 281(5385): 2013-2019 (1998)
130. ATCC-LGC Standards Partnership [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>]: the distributor of ATCC cultures and bioproducts: NIH/3T3 (CRL-1658); Hep G2 (HB-8065) and MCF-7 (HTB-22) (2012)
131. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng. Experimental determination of the size dependent extinction coefficients of high quality CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* 15: 2854–2860 (2003)
132. J. Travis, B.C. Triulzi, T. Scott, S. Spindel, O. Jain, P. Delehanty, A. Boeneman. Reactive semiconductor nanocrystals for chemoselective biolabeling and multiplexed analysis. *ACS Nano.* 5, (7): 5579–5593 (2011)

133. T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A.L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile, W.J. Parak. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals. *Nano Lett.* 4 (4): 703–707 (2004)
134. H.C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G.P.C. Drummen. Advanced fluorescence microscopy techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules.* 17: 4047–4132 (2012)
135. W. Becker. Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy.* 247, 2: 119–136 (2012)
136. A.B. Coleman, J. Momand, S.E. Kane. Basic fibroblast growth factor sensitizes NIH3T3 cells to apoptosis induced by cisplatin. *Mol Pharmacol.* 57, 2: 324–333 (2000)
137. L. Hu, Z. Mao, C. Gao. Colloidal particles for cellular uptake and delivery. *J. Mater. Chem.* 19: 3108–3115 (2009)
138. L.W. Zhang, W. Bäumer, N.A. Monteiro-Riviere. Cellular uptake mechanisms and toxicity of quantum dots in dendritic cells. *Nanomedicine.* 6, 5: 777–791 (2011)
139. S.S. Yu, C.M. Lau, S.N. Thomas, W.G. Jerome, D.J. Maron, J.H. Dickerson, J.A. Hubbell, T.D. Giorgio. Size- and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages. *Int J Nanomedicine.* 7: 799–813 (2012)
140. K. Prapainop, D.P. Witter, P. Wentworth. A chemical approach for cell-specific targeting of nanomaterials: small-molecule-initiated misfolding of nanoparticle corona proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 9: 4100–4103 (2012)
141. O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delacher, K. Tron, G.U. Nienhaus, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, T. Simmet. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano.* 5, 3: 1657–1669 (2011)
142. R. Bazak, M. Houry, S. Achy, S. Kamel, T. Refaat. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* Epub. (2014)
143. H.S. Choi, W. Liu, F. Liu, K. Nasr, P. Misra, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nature Nanotechnology.* 5: 42–47 (2010)
144. K.L. Douglas, C.A. Piccirillo, M. Tabrizian. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur J Pharm Biopharm.* 68: 676–687 (2008)
145. F. Corsi, C. Palma, M. Colombo. Towards ideal magnetofluorescent nanoparticles for bimodal detection of breast-cancer cells. *Small.* 5: 2555–2564 (2009)



146. W.J. Parak, T. Pellegrino, C. Plank. Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*. 16: 9–25 (2005)
147. Y. Yuan, C. Liu, J. Qian, J. Wang, Y. Zhang. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials*. 31: 730–740 (2010)
148. E.B. Munster, T.W.J. Gadella. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Microscopy Techniques, Advances in Biochemical Engineering*. 95: 143–175 (2005)
149. Y. Lu, J. Zhao, R. Zhang, Y. Liu, D. Liu, E. M. Goldys, X. Yang, P. Xi, A. Sunna, J. Lu, Y. Shi, R.C. Leif, Y. Huo, J. Shen, J.A. Piper, J.P. Robinson, D. Jin. Tunable lifetime multiplexing using luminescent nanocrystals. *Nature Photonics*. 8: 32–36 (2014)
150. K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Communications*. 3: 705 (2012)
151. K. Hoffmann, T. Behnke, D. Drescher, J. Kneipp and U. Resch-Genger. Near-infrared-emitting nanoparticles for lifetime-based multiplexed analysis and imaging of living cells. *ACS Nano*. 7, 8: 6674–6684 (2013)
152. J.S. Basuki, H.T.T. Duong, A. Macmillan, R.B. Erlich, L. Esser, M.C. Akerfeldt, R.M. Whan, M. Kavallaris, C. Boyer and T.P. Davis. Using fluorescence lifetime imaging microscopy to monitor theranostic nanoparticle uptake and intracellular doxorubicin release. *ACS Nano*. 7, 11: 10175–10189 (2013)
153. H. Sun, J. Yang, M. Fujii, Y. Sakka, Y. Zhu, T. Asahara, N. Shirahata, M. Ii, Z. Bai, J. Li and H. Gao. Highly fluorescent silica-coated bismuth-doped aluminosilicate nanoparticles for near-infrared bioimaging. *Small*. 7, 2: 199–203 (2011)
154. Y. Kuo, T. Hsu, Y. Wu, J. Hsu and H. Chang. Fluorescence lifetime imaging microscopy of nanodiamonds in vivo. *SPIE 8635: Advances in Photonics of Quantum Computing, Memory and Communication*. VI: 863503 (2013)
155. A. Orte, J.M. Alvarez-Pez and M.J. Ruedas-Rama. Fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of Intracellular pH with quantum dot nanosensors. *ACS Nano*. 7, 7: 6387–6395 (2013)
156. L. Carlini and J. L. Nadeau. Uptake and processing of semiconductor quantum dots in living cells studied by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Chem. Commun.* 49: 1714 (2013)
157. S. Steponkiene, J. Valanciunaite, A. Skripka and R. Rotomskis. Cellular uptake and photosensitizing properties of quantum dot-chlorin e(6) complex: in vitro study. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10, 4: 679–686 (2013)

158. J. Valanciunaite, A.S. Klymchenko, A. Skripka, L. Richert, S. Steponkiene, G. Streckyte, Y. Melyc and R. Rotomskis. Non-covalent complex of quantum dots and chlorin e6: efficient energy transfer and remarkable stability in living cells. *RSC Adv.* 4: 52270–52278 (2014)
159. J.R. Lakowicz, H. Szmajda, K. Nowaczyk, K. W. Berndt and M. Johnson. Fluorescence lifetime imaging. *Anal. Biochem.* 202: 316–230 (1992)
160. V. Karabanovas, Z. Zitkus, D. Kuciauskas, R. Rotomskis and M. Valius. Surface properties of quantum dots define their cellular endocytic routes, mitogenic stimulation and suppression of cell migration. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10: 775–786 (2014)
161. R.C. Piper and J.P. Luzio. Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic.* 2, 9: 612–621 (2001)
162. R. Dobrowolski and E.M. De Robertis. Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 1: 53–60 (2012)
163. Y.S. Liu, Y.H. Sun, P.T. Vernier, C.H. Liang, S.Y.C. Chong and M.A. Gundersen. pH-sensitive photoluminescence of CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots in human ovarian cancer cells. *J. Phys. Chem. C.* 111: 2872–2878 (2007)
164. Y. Zhang, L. Mi, J. Chen, P. Wang. The environmental influence on the photoluminescence behavior of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells. *Biomed. Mater.* 4: 012001 (2009)
165. E. Kalwarczyk, N. Ziębacz, T. Kalwarczyk, R. Hołyst, M. Fiałkowski. A “wrap-and-wrest” mechanism of fluorescence quenching of CdSe/ZnS quantum dots by surfactant molecules. *Nanoscale.* 5: 9908–9916 (2013)
166. J. Conroy, S.J. Byrne, Y.K. Gunko, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, A. Davies, D. Kelleher, Y. Volkov. CdTe nanoparticles display tropism to core histones and histone-rich cell organelles. *Small.* 4, 11: 2006–2015 (2008)
167. H.J. Johnston, M. Semmler-Behnke, D.M. Brown, W. Kreyling, L. Tran L, V. Stone. Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1, 242(1): 66–78 (2010)
168. A. Ray, Y.E.K. Lee, T. Epstein, G. Kim, R. Kopelman. Two-photon nano-PEBBLE sensors: subcellular pH measurements. *Analyst.* 21, 136(18): 3616–3622 (2011)
169. V. Poderys, M. Matulionyte, A. Selskis, R. Rotomskis. Interaction of water-soluble CdTe quantum dots with bovine serum albumin. *Nanoscale Res Lett* 2011: 6–9 (2011)
170. V. Karabanovas, E. Zakarevicius, A. Sukackaite, G. Streckyte, R. Rotomskis. Examination of the stability of hydrophobic (CdSe)ZnS quantum dots in the digestive tract of rats. *Photochem Photobiol Sci.* 7, 6: 725–729 (2008)

171. V. Kulvietis, G. Streckyte, R. Rotomskis. Spectroscopic investigations of the quantum dot stability in different aqueous media. *Lithuanian Journal of Physics*. 51, 2: 163–171 (2011)
172. A. Hayer, M. Stoeber, D. Ritz, S. Engel, H.H. Meyer, A. Helenius. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol*. 1, 191(3): 615–629 (2010)
173. A. Taylor, K.M. Wilson, P. Murray, D.G. Fernig and R. Levy. Long-term tracking of cells using inorganic nanoparticles as contrast agents: are we there yet? *Chem. Soc. Rev.* 41: 2707–2717 (2012)
174. V. Biju, T. Itoh, M. Ishikawa. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* 39: 3031–3056 (2010)
175. G. Lin, Z. Ding, R. Hu, X. Wang, Q. Chen, X. Zhu, K. Liu, J. Liang, F. Lu, D. Lei, G. Xu, K. Yong. Cytotoxicity and immune response of CdSe/ZnS quantum dots towards a murine macrophage cell line. *RSC Adv.* 4: 5792–5797 (2014)
176. X. Li, N. Chen, Y. Su, Y. He, M. Yin, M. Wei, L. Wang, W. Huang, C. Fan, Q. Huang. Autophagy-sensitized cytotoxicity of quantum dots in PC12 Cells. *Advanced Healthcare Materials*. 3, 3: 354–359 (2014)
177. Y. Liu, P. Wang, Y. Wang, Z. Zhu, F. Lao, X. Liu, W. Cong, C. Chen, Y. Gao, Y. Liu. The influence on cell cycle and cell division by various cadmium-containing quantum dots. *Small: National Center for Nanoscience and Technology of China*. 9, 14: 2440–2451 (2013)
178. A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 4: 11–18 (2004)
179. C.E. Bradburne, J.B. Delehanty, K.B. Gemmill, B.C. Mei, H. Mattoussi, K. Susumu, J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, I.L. Medintz. Cytotoxicity of quantum dots used for in vitro cellular labeling: role of QD surface ligand, delivery modality, cell type, and direct comparison to organic fluorophores. *Bioconjugate Chem.* 24, 9: 1570–1583 (2013)
180. Y. Yeh, K. Saha, B. Yan, O.R. Miranda, X. Yua, V.M. Rotello. The role of ligand coordination on the cytotoxicity of cationic quantum dots in HeLa cells. *Nanoscale*. 5: 12140–12143 (2013)
181. A. Romoser, D. Ritter, R. Majitha, K.E. Meissner, M. McShane, C. M. Sayes. Mitigation of quantum dot cytotoxicity by microencapsulation. *PLoS ONE*. 6, 7: e22079 (2011)

182. J. Wang, S. Han, D. Ke, R. Wang. Semiconductor quantum dots surface modification for potential cancer diagnostic and therapeutic applications. *Journal of Nanomaterials*. 2012: 129041 (2012)
183. E. Chang, N. Thekkek, W.W. Yu, V.L. Colvin, R. Drezek. Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. *Small*. 2: 1412–1417 (2006)
184. A. Nel, T. Xia, H. Meng, X. Wang, S. Lin, Z. Ji, H. Zhang. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc. Chem. Res.* 46, 3: 607–621 (2013)
185. S.J. Soenen, J. Montenegro, A.M. Abdelmonem, B.B. Manshian, S.H. Doak, W.J. Parak, S.C. De Smedt, K. Braeckmans. The effect of nanoparticle degradation on poly(methacrylic acid)-coated quantum dot toxicity: The importance of particle functionality assessment in toxicology. *Acta Biomaterialia*. 10, 2: 732–741 (2014)
186. K. Yong, W. Law, R. Hu, L. Ye, L. Liu, M.T. Swihart, P.N. Prasad. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies. *Chem. Soc. Rev.* 42: 1236–1250 (2013)
187. N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, C. Fan. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials*. 33, 5: 1238–1244 (2012)
188. C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A.M. Javier, H.E. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig, W.J. Parak. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters*. 5, 2: 331–338 (2005)
189. W.E. Smith, J. Brownell, C.C. White, Z. Afsharinejad, J. Tsai, X. Hu, S.J. Polyak, X. Gao, T.J. Kavanagh, D.L. Eaton. In vitro toxicity assessment of amphiphilic polymer-coated CdSe/ZnS quantum dots in two human liver cell models. *ACS Nano*. 6, 11: 9475–9484 (2012)
190. V. Fritz, L. Fajas. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*. 29, 31: 4369–4377 (2010)
191. S.J. Cho, D. Maysinger, M. Jain, B. Roder, S. Hackbarth, F.M. Winnik. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*. 23: 1974–1980 (2007)
192. H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang, Z. Xi. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*. 29, 1: 69–78 (2009)
193. A. Manke, L. Wang, Y. Rojanasakul. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*. 2013: 942916 (2013)

194. M. Ahamed, H.A. Alhadlaq, J. Alam, M.A Khan, D. Ali, S. Alarafi. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Current Pharmaceutical Design*. 19, 37: 6681–6690 (2013)
195. S. Kim, D. Ryu. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology*. 33, 2: 78–89 (2013)
196. S. Ohta, S. Inasawa, Y. Yamaguchi. Real time observation and kinetic modeling of the cellular uptake and removal of silicon quantum dots. *Biomaterials*. 33: 4639–4645 (2012)
197. H. Jin, D.A. Heller, R. Sharma, M.S. Strano. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano*. 3: 149–158 (2009)
198. P.V. Asharani, M.P. Hande, S. Valiyaveetil. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol*. 10: 65 (2009)
199. J.L. Kavanau. Structure and Functions of Biological Membranes. *Nature*. 198: 525–530 (1963)
200. B.D. Grant, J.G. Donaldson. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 9: 597–608 (2009)
201. I. Dikic. Endosomes Molecular Biology Intelligence Unit. New York: Landes Bioscience, Springer Science+Business Media, LLC, 2006 (elektroninė knyga)
202. M. Pavelka, J. Roth. Functional Ultrastructure: An Atlas of Tissue Biology and Pathology. 2nd ed. Wien: SpringerWienNewYork, 2010 (elektroninė knyga)
203. A. Sorkin, M. von Zastrow. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 9: 609–622 (2009)
204. K. Abe, H. Takano, T. Ito. Appearance of peculiar multivesicular bodies in the principal cells of the epididymal duct after efferent duct cutting in the mouse. *Arch Histol Jpn*. 47, 2: 121–135 (1984)
205. P.D. Dobson, D.B. Kell. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nature Reviews Drug Discovery*. 7: 205–220 (2008)
206. S.C. Silverstein, R.M. Steinman, Z.A. Cohn. Endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 46: 669–722 (1977)
207. K. Shapero, F. Fenaroli, I. Lynch, D.C. Cottell, A. Salvati, K.A. Dawson. Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. *Mol. BioSyst*. 7: 371–378 (2011)
208. A. Mecke, D. Lee, A. Ramamoorthy, B.G. Orr, M.M.B. Holl. Synthetic and natural polycationic polymer nanoparticles interact selectively with fluid-phase domains of DMPC lipid bilayers. *Langmuir*. 21: 8588–8590 (2005)

209. M. Eze, R.N. McElhaney. The effect of alterations in the fluidity and phase state of the membrane lipids on the passive permeation and facilitated diffusion of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*. 124: 299–307 (1981)
210. C. Bucci, R. G. Parton, I. H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack, M. Zerial. The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*. 70: 715–728 (1992)
211. M.A. Barbieri, A.D. Kohn, R.A. Roth, P. Stahl. Protein kinase B/akt and rab5 mediate Ras activation of endocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 273, 31: 19367–19370 (1998)
212. T. Zech, L. Machesky. Rab5 and Rac team up in cell motility. *Cell*. 134, 1: 18–20 (2008)
213. C.M. Hunker, I. Kruk, J. Hall, H. Giambini, M.L. Veisaga, M.A. Barbieri. Role of Rab5 in insulin receptor-mediated endocytosis and signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 449, 1-2(15): 130–142 (2006)
214. L.A. Volpicelli, J.J. Lah, A.I. Levey. Rab5-dependent trafficking of the m4 muscarinic acetylcholine receptor to the plasma membrane, early endosomes, and multivesicular bodies. *The Journal of biological chemistry*. 276, 50: 47590–47598 (2001)
215. M. Hagiwara, Y. Shirai, R. Nomura, M. Sasaki, K. Kobayashi, T. Tadokoro, Y. Yamamoto. Caveolin-1 activates Rab5 and enhances endocytosis through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2, 378(1): 73–78 (2009)
216. W.D. Feliciano, S. Yoshida, S.W. Straight, A. Swanson. Coordination of the Rab5 cycle on macropinosomes. *Traffic*. 12, 12: 1911–1922 (2011)
217. T.J. Pucadyil, S.L. Schmid. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science*. 325, 5945: 1217–1220 (2009)
218. J. Gorvel, P. Chavrier, M. Zerial, J. Gruenberg. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 64, 5: 915–925 (1991)
219. L. Pelkmans, T. Bürli, M. Zeria, A. Helenius. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*. 118, 6: 767–780 (2004)
220. P.R. Leroueil, S. Hong, A. Mecke, J.R. Baker, B.G. Orr, M.M.B. Holl. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a janus face? *Accounts of chemical research*. 40: 335–342 (2007)
221. B.M. Rothen-Rutishauser, S. Schurch, B. Haenni, N. Kapp, P. Gehr. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental science and technology*. 40: 4353–4359 (2006)
222. L. Shang, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*. 12: 5 (2014)

223. J.B. Delehanty, H. Mattoussi, I.L. Medintz. Delivering quantum dots into cells strategies progress and remaining issues. *Anal Bioanal Chem.* 393: 1091–1105 (2009)
224. B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science.* 298: 1759–1762 (2002)
225. J.R. Slotkin, L. Chakrabarti, H.N. Dai, R.S. Carney, T. Hirata, B.S. Bregman, G.I. Gallicano, J.G. Corbin, T.F. Haydar. In vivo quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells. *Dev Dyn* 236: 3393–3401 (2007)
226. A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia. Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking. *Adv. Mater.* 16: 961–966 (2004)
227. Y. Ishihama, T. Funatsu. Single molecule tracking of quantum dot-labeled mRNAs in a cell nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 33–38 (2009)
228. M.J. Roberti, M. Morgan, G. Menendez, L.I. Pietrasanta, T.M. Jovin, E.A. Jares-Erijman. Quantum dots as ultrasensitive nanoactuators and sensors of amyloid aggregation in live cells. *Am. Chem. Soc.* 131: 8102–8107 (2009)
229. K. Yum, S. Na, Y. Xiang, N. Wang and M.F. Yu. Mechanochemical delivery and dynamic tracking of fluorescent quantum dots in the cytoplasm and nucleus of living cells. *Nano Lett.* 9: 2193–2198 (2009)
230. C.L. Roy, J.L. Wrana. Clathrin- and non-clathrin mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 6: 112–126 (2005)
231. M.K. Zenni, P.C. Giardina, H.A. Harvey, J. Shao, M.R. Ketterer, D.M. Lubaroff, R.D. Williams, M.A. Apicella. Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by neisseria gonorrhoeae. *Infect Immun.* 68, 3: 1696–1699 (2000)
232. V. Puri, R. Watanabe, R.D. Singh, M. Dominguez, J.C. Brown, C.L. Wheatley, D.L. Marks, R.E. Pagano. Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol.* 6, 154(3): 535–548 (2001)
233. I.R. Nabi, P.U. Le. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *JCB.* 161, 4: 673–677 (2003)
234. R.G. Parton, M.A. Pozo. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 14: 98–112 (2013)
235. J. Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377: 159–169 (2004)
236. Y. Zhang, H. Pan, P. Zhang, N. Gao, Y. Lin, Z. Luo, P. Li, C. Wang, L. Liu, D. Pang, L. Cai, Y. Ma. Functionalized quantum dots induce proinflammatory responses in vitro: the

- role of terminal functional group-associated endocytic pathways. *Nanoscale*. 5: 5919–5929 (2013)
237. C.L. Roy, J.L. Wrana. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 112–126 (2005)
238. L. Treuel, X. Jiang, G.U Nienhaus. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface*. 10: 20120939 (2013)
239. R.G. Parton, A.A. Richards. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. 4, 11: 724–738 (2003)
240. J.P. Luzio, P.R. Pryor, N.A. Bright, Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 622–632 (2007)
241. M. Koval, R.E. Pagano. Lipid recycling between the plasma membrane and intracellular compartments: transport and metabolism of fluorescent sphingomyelin analogues in cultured fibroblasts. *JCB*. 108, 6: 2169–2181 (1989)
242. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4<sup>th</sup> edition. Redaktorius: W. H. Freeman. New York, 2000
243. R. Dobrowolski, E.M. Robertis, Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signaling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23, 13 (1): 53–60 (2011)
244. P. Liu, M. Rudick, R.G.W. Anderson. Multiple functions of caveolin-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 41295–41298 (2002)
245. K. Bourzac. Nanotechnology: carrying drugs. *Nature*. 491: S58–S60 (2012)
246. R. Wang, P.S. Billone, W.M. Mullett. Nanomedicine in action: an overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *Journal of Nanomaterials*. 2013: 629681 (2013)
247. Y. Zhou, L. Shi, Q. Li, H. Jiang, G. Lv, J. Zhao, C. Wu, M. Selke, X. Wang. Imaging and inhibition of multi-drug resistance in cancer cells via specific association with negatively charged CdTe quantum dots. *Biomaterials*. 31: 4958–4963 (2010)
248. F.R. Bezerra de Lira, M. A. B. L. Seabra, T. Gomes da Silva, A. Gomes de Castro Neto, B. S. Santos in *Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine* (Chapter 12). Redaktoriai: R. Hudak, M. Penhaker, J. Majernik. InTech, 2012
249. D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3: 380–387 (2003)
250. K.A. Al-Khazaleh, K. Omar, M.S. Jaafar. pH effect on cellular uptake of Sn(IV) chlorine e6 dichloride trisodium salt by cancer cells in vitro. *Journal of Biological Physics*. 37, 1: 153–161 (2011)



251. H. Mojzisova, S. Bonneau, C. Vever-Bizet, D. Brault. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1768, 11: 2748–2756 (2007)
252. T. Boulikas, M. Vougiouka. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). *Oncology Reports*. 10, 6: 1663–1682 (2003)
253. G. Chu. Cellular responses to cisplatin the roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem*. 14, 269(2): 787–790 (1994)
254. X. Wang, J.L. Martindale, N.J. Holbrook. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 275, 50: 39435–39443 (2000)
255. G. Ciarimboli. Membrane transporters as mediators of cisplatin effects and side effects. *Scientifica*. 2012: 473829 (2012)
256. A. Andersson, H. Hedenmalm, B. Elfsson, H. Ehrsson. Determination of the acid dissociation constant for cis-diammineaquachloroplatinum(II) ion. A hydrolysis product of cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 83, 6: 859–862 (1994)
257. S. Bhattacharjee, D. Ershov, J. Gucht, G. M. Alink, I. M. C. M. Rietjens, H. Zuilhof, A. T. M. Marcelis. Surface charge-specific cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles. *Nanotoxicology*. 7, 1: 71–84 (2013)
258. V. Karabanovas, R. Rotomskis, A. Beganskiene, A. Kareiva, S. Bagdonas, P. Grigaravicius, K.O. Greulich. Degradation Related Cytotoxicity Of Quantum Dots. 9<sup>th</sup> IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO). 2009: 454-457 (2009)
259. U.E. Martinez-Outschoorn, D. Whitaker-Menezes, S. Pavlides, B. Chiavarina, G. Bonuccelli, C. Trimmer, A. Tsigirigos, G. Migneco, A.K. Witkiewicz, R. Balliet, I. Mercier, C. Wang, N. Flomenberg, A. Howell, Z. Lin, J. Caro, R.G. Pestell, F. Sotgia, M.P. Lisanti. The autophagic tumor stroma model of cancer or “battery-operated tumor growth” - a simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle*. 9, 21: 4297–4306 (2010)
260. Y.H. Luo, S. Wu, Y. Wei, Y. Chen, M. Tsai, C. Ho, S. Lin, C. Yang, P. Lin. Cadmium-Based Quantum Dot Induced Autophagy formation for cell survival via oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol*. 26, 5: 662–673 (2013)
261. W. Li, H. Liu, J. Zhou, J. Cao, X. Zhou, A. M. K. Choi, H. Shen, Z. Chen, Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p 45-relatedfactor-2 (Nrf2). *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 20922–20930 (2012)
262. A.M. Florea, D. Büsselberg. Cisplatin as an anti tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 3, 1: 1351–1371 (2011)

263. B.A. Kairdolf, A.M. Smith, T.H. Stokes, M.D. Wang, A.N. Young, S. Nie. Semiconductor quantum dots for bioimaging and biodiagnostic applications. *Annu Rev Anal Chem.* 12, 6(1): 143–162 (2013)
264. P. Nativo, I.A. Prior, M. Brust. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano.* 2, 8: 1639–1644 (2008)
265. N. Hao, L. Li, Q. Zhang, X. Huang, X. Meng, Y. Zhang, D. Chen, F. Tang, L. Li. The shape effect of PEGylated mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake pathway in Hela cells. *Microporous and Mesoporous Materials.* 162, 1: 14–23 (2012)
266. M. Moros, B. Hernáez, E. Garet, J.T. Dias, B. Sáez, V. Grazú, Á. González-Fernández, C. Alonso, J.M. de la Fuente. Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: influence in the cellular uptake. *ACS Nano.* 6, 2: 1565–1577 (2012)
267. S. Tedesco, H. Doyle, J. Blasco, G. Redmond, D. Sheehan. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 151: 167–174 (2010)
268. E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B.E. Ocampo-García, L.M. Gómez-Oliván. Engineered multifunctional RGD-gold nanoparticles for the detection of tumour specific expression: chemical characterisation and ecotoxicological risk assessment. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 8, 6: 991–999 (2012)
269. T.M. Allen. P.R. Cullis. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 65, 1: 36–48 (2013)
270. J.W. Park, K. Hong, D.B. Kirpotin, G. Colbern, R. Shalaby, J. Baselga, Y. Shao, U.B. Nielsen, J.D. Marks, D. Moore, D. Papahadjopoulos, C.C. Benz. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery, *Clin. Cancer Res.* 8: 1172–1181 (2002)
271. M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, J. Zheng. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 5: 106–117 (2009)
272. S. Guo, L. Huang. Nanoparticles escaping RES and endosome: challenges for siRNA delivery for cancer therapy. *Journal of Nanomaterials.* 2011: 742895 (2011)
273. H. Chen, H. Paholak, M. Ito, K. Sansanaphongpricha, W. Qian, Y. Che, D. Sun. 'Living' PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities. *Nanotechnology.* 6, 24(35): 355101 (2013)
274. A. Lesniak, A. Salvati, M.J. Santos-Martinez, M.W. Radomski, K.A. Dawson, C. Åberg. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 4: 1438–1444 (2013)