

VILNIAUS UNIVERSITETAS

SIMONA STEPONKIENĖ

NANODARINIŲ POVEIKIO VĖŽINĖMS KAMIENINĖMS
LĄSTELĖMS TYRIMAS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biofizika (02B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universitete

Eksperimentiniai darbai atlikti Vilniaus universiteto Onkologijos institute ir Oslo universitetinės ligoninės Vėžio tyrimų insitute

Mokslinis vadovas:

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

Padėka

Esu dėkinga Vilniaus universiteto Onkologijos instituto administracijai už suteiktą galimybę atlikti disertacinį darbą. Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui profesoriui Ričardui Rotomskiui už naudingus patarimus ir pastabas rengiant šį darbą. Norėčiau padėkoti Rasai Purvinienei bei visai Imunologijos laboratorijai už apmokymus ir konsultacijas, bei galimybę pasinaudoti jų laboratorijos infrastruktūra.

Esu dėkinga Vilniaus universitetui už suteiktą stipendiją ir galimybę išvykti pagal Erasmus praktikos programą į Norvegiją, bei padirbėti Radiumhospitalet ligojinės Vėžio mokslinių tyrimų institute. Norėčiau padėkoti Erasmus praktikos vadovui dr. Petrui Juzėnui, bei visai jo vadovaujamai projektų grupei už apmokymus, konsultacijas, bei pagalbą eksperimentuose, kurių rezultatus galiu panaudoti šiame darbe. Taip pat dėkoju tėkmės citometrijos inžinierei *Idun Dale Rein* už atliktą ląstelių rūšiavimą.

Norėčiau padėkoti visam Biomedicininės fizikos laboratorijos kolektyvui. Ačiū jums už arbatos pertraukėles, vertingas diskusijas ir palaikymą. Ačiū Danutei Bulotienei už pagalbą atliekant eksperimentus su pelėmis, bei Artiomui Skripkai už pagalbą atliekant eksperimentus su kvantinio taško-chlorino e_6 kompleksu.

Esu dėkinga visai savo šeimai ir ypač savo vyrui Vladui, kurio kantrybė ir gera nuotaika visada lydėjo mane sunkesnėmis akimirkomis.

Simona,
2014-06-01

TURINYS

Sutartiniai žymėjimai	6
1. ĮVADAS.....	8
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai	9
1.2. Ginamieji teiginiai.....	10
1.3. Aktualumas ir naujumas	11
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1. Kamieninės ląstelės, vėžys ir vėžinės kamieninės ląstelės	13
2.1.1. Kamieninės ląstelės	13
2.1.2. Vėžinių kamieninių ląstelių teorija	14
2.2. Vėžinės kamieninės ląstelės krūties vėžyje.....	16
2.3. Vėžinės kamieninės ląstelės melanomoje, kasos adenokarcinomoje ir kiaušidžių karcinomoje	19
2.4. Vėžinių kamieninių ląstelių atsparumas chemoterapijai ir radioterapijai..	22
2.5. Taikininė vėžinių kamieninių ląstelių terapija	23
2.6. Kvantiniai taškai – daugiafunkciniai nanodariniai	25
2.7. Kvantinio taško ir sensibilizatoriaus nanodarinyš	29
2.8. Kvantinių taškų toksiškumas	32
3. MEDŽIAGOS IR METODAI	37
3.1. Medžiagos.....	37
3.2. Ląstelių auginimas	37
3.3. Vėžinių ląstelių kamieniškumo įvertinimas	38
3.4. Žmogaus vėžinių ląstelių naviko formavimas Rag2 pelėse	40
3.5. Kvantinių taškų kaupimasis ir poveikis vėžinėms ląstelėms	41
3.6. Nuostovioji ir kinetinė kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso spektroskopija.....	43
3.7. Kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso spektrinis ir gyvavimo trukmių vaizdinimas MiaPaCa2 vėžinėse ląstelėse	44
3.8. Kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso fotosensibilizacinis poveikis MiaPaCa2 vėžinėms ląstelėms	46

3.9. Kvantinio taško ir anti-CD44-KT konjugato kaupimasis MCF-7 ir MDA-MB-231 vėžinėse ląstelėse	47
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	49
4.1. Vėžinių kamieninių ląstelių aptikimas	49
4.1.1. CD44 ir CD133 paviršiaus antigenų raiška žmogaus vėžinių ląstelių linijose	49
4.1.2. FEMX-I subpopuliacijų gebėjimas atstatyti pradinę prieš rūšiavimą buvusią savo fenotipinę sudėtį.....	51
4.1.3. FEMX-I subpopuliacijų atsparumas rentgeno spinduliuotės poveikiui..	53
4.2. Kvantinių taškų CdTe-MPA kaupimasis skirtingo fenotipo FEMX-I ląstelių subpopuliacijose	55
4.3. Paviršiaus žymenų raiška A2780 ir MiaPaCa2 ląstelių linijose.....	57
4.4. A2780 ir MiaPaCa2 ląstelių gebėjimas formuoti navikus <i>in vivo</i>	59
4.5. CdTe-MPA ir CdSe-ZnS-(AMP)-COOH KT kaupimasis MiaPaCa2 ir A2780 ląstelėse.....	62
4.6. CdTe-MPA ir CdSe-ZnS-(AMP)-COOH KT poveikis MiaPaCa2 ir A2780 ląstelių gyvybingumui, išgyvenimui ir proliferacijai	64
4.7. Kvantinio taško ir antikūno prieš CD44 antigeną konjugato kaupimasis krūties vėžinėse kamieninėse ląstelėse	67
4.7.1. Krūties vėžinių kamieninių ląstelių aptikimas.....	68
4.7.2. Anti-CD44-KT nanodarinių kaupimasis krūties vėžinėse ląstelėse	70
4.8. Kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso kaupimasis, stabilumas ir fotosensibilizacinės savybės MiaPaCa2 vėžinėse ląstelėse	75
4.9. Kvantinio taško ir chlorino e_6 kompleksas OptiMEM® mitybinėje terpėje: kiuvetėse ir <i>in vitro</i>	84
5. APIBENDRINIMAS.....	90
6. IŠVADOS.....	92
7. PUBLIKACIJOS.....	94
8. FINANSINĖ PARAMA.....	98
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS	99
10. Gyvenimo, mokslinės, kūrybinės veiklos aprašymas	113

Sutartiniai žymėjimai

VKL – vėžinės kamieninės ląstelės

KL – kamieninės ląstelės

KT – kvantiniai taškai

AMP – amfifilinis polimeras

AML – amfifilinis lipidai

CdTe-MPA – kvantiniai taškai, kurių šerdis sudaryta iš CdTe, padengti merkapto propionine rūgštimi, kuri turi –COOH grupę

CdSe/ZnS-(AML/AMP)-COOH – CdSe šerdies ir ZnS apvalkalo kvantiniai taškai. Šerdies/apvalkalo struktūra yra padengiama vandenyje tirpiomis amfifilinėmis molekulėmis (polimerais arba lipidais), kurių į išorę iškišti galai pasibaigia –COOH grupe

CdTe-5 – CdTe-MPA KT, kurių koncentracija tirpale 5 nM

CdTe-25 – CdTe-MPA KT, kurių koncentracija tirpale 25 nM

CdSe-5 – CdSe/ZnS-(AML/AMP)-COOH KT, kurių koncentracija tirpale 5 nM

CdSe-40 – CdSe/ZnS-(AML/AMP)-COOH KT, kurių koncentracija tirpale 40 nM

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* mitybinė terpė ląstelių auginimui

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium* mitybinė terpė ląstelių auginimui

DPBS – *Dulbecco* fosfatinis druskų buferis (pH 7,4), papildytas Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonais

PBS - fosfatinis druskų buferis, pH 7,4

MEM – *Minimal essential medium* terpė, tinkama ląstelių auginimui;

EDTA – etilendiamintetraacetatas

XTT – (2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-karboksianilido druska

FITC – fluoresceino izotiocianatas – dažas, kuris naudojamas imunofluorescencinėse metodikose

PE – fikoeritrinas – dažas, kuris naudojamas imunofluorescencinėse metodikose

Anti-CD44 – antikūnas prieš CD44 paviršiaus antigeną

Anti-CD133 – antikūnas prieš CD133 paviršiaus antigeną

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

ND – nanodalelė

FL – fotoluminescencija

ALDH1- aldehido dehidrogenazės fermentas

FRET – Fiersterio rezonansinė energijos pernaša

FDT – fotodinaminė terapija

FS – fotosensibilizatorius

Ce₆ – fotosensibilizatorius chlorinas e₆

Alfc – fotosensibilizatorius aliuminio ftalocianinas

Cys – cisteinas

TGA – tioglikolio rūgštis

MPA – merkaptopropioninė rūgštis

PEG - polietilenglikolis

IC₅₀ – preparato koncentracija, kuriai esant pasiekiamas 50 % efektyvumo poveikis, sutrikdantis gyvo organizmo tam tikrą funkciją.

$\langle \tau \rangle$ – vidutinė fotoluminescencijos gyvavimo trukmė

JSA – jaučio serumas albuminas (angl. *bovine serum albumin*)

1. ĮVADAS

Nepaisant pažangos vėžio gydymo srityje, daugelis mokslininkų ir tyrėjų pripažįsta, kad šiuo metu taikomos standartinės terapijos pasižymi žemu gydymo efektyvumu, o vėžio atsinaujinimas po taikytos terapijos išlieka opi gydymo problema. Pasaulinio vėžio registro duomenimis, sergančiųjų šia klastinga liga vis daugėja: 2012 metais užregistruota ~14 milijonų sergančiųjų vėžiu ir prognozuojama, jog šis skaičius 2035 metais sieks 24 milijonus [1]. Atliktų fundamentaliųjų darbų bei mokslo tyrimų rezultatai rodo, kad už prastą gydomąjį efektą, metastazes bei naviko atsinaujinimą po taikyto gydymo gali būti atsakinga vėžinių ląstelių subpopuliacija, pasižyminti kamieninių ląstelių savybėmis [2]. Šios subpopuliacijos vėžinėms ląstelėms būdingi genų raiškos pokyčiai ir/ar mutacijos, susijusios su apoptozės slopinimu, proliferacijos aktyvinimu, molekulių transportavimo ir vaistų šalinimo iš ląstelės mechanizmų įjungimu [3, 4]. Todėl daroma prielaida, kad nuo vėžinių kamieninių ląstelių, pasižyminčių aktyviais molekuliniais rezistentiškumo mechanizmais, priklauso atsparumas taikomai terapijai bei metastazių formavimasis [5]. Ekspertų, dirbančių onkologijos srityje, nuomone, efektyvios vėžio terapijos taikynys turėtų būti vėžinės kamieninės ląstelės (VKL). VKL aptikimas ir toksinio poveikio joms realizavimas leistų padidinti onkologinių susirgimų gydymo veiksmingumą ir specifiškumą bei padėtų išvengti antrinių auglių ir metastazių.

Spartus nanomedicinos vystymasis jau šiandien pateikia įvairius onkologinių problemų sprendimo kelius. Nanodalelės ar nanodariniai pasižymintys išskirtinėmis savybėmis sėkmingai taikomi eksperimentinėje klinikoje [6], tad neabejotinai aktualus ir nanodarinių sąveikos su VKL klausimas vystant neinvazinę diagnostiką ir tikslinį vaisto nuvedimą į pažeistos vietą. Jau dabar paskelbta straipsnių, kuriuose parodyta, kaip sėkmingai yra įveikiamos chemoterapijai ir radioterapijai atsparios VKL nanotechnologijų pagalba [7, 8]. Todėl VKL aptikimas, nanotechnologijų sintezė, modifikavimas ir tyrimai su įvairaus tipo vėžinėmis ląstelėmis yra svarbūs šių dienų moksliniai uždaviniai.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Ištirti nanodarinių pritaikymo galimybes vėžinių kamieninių ląstelių aptikimui ir sunaikinimui.

Darbo uždaviniai:

- 1) Ištirti CdTe-MPA kaupimąsi melanomos kamieninėse ląstelėse;
- 2) Palyginti CdTe-MPA ir CdSe/ZnS-(AMP)-COOH kaupimąsi ir poveikį žmogaus vėžinių ląstelių linijose;
- 3) Ištirti CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH ir antikūno prieš CD44 antigeną konjugato kaupimosi ir pasiskirstymo dėsninumus krūties vėžinėse kamieninėse ląstelėse;
- 4) Ištirti CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH ir sensibilizatoriaus Ce₆ komplekso kaupimąsi, energijos pernašą ir sensibilizacinį poveikį *in vitro*;
- 5) Įvertinti CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH ir sensibilizatoriaus Ce₆ komplekso stabilumą baltymais prisotintoje mitybinėje terpėje, imituojuojant *in vivo* sistemos kraujotaką.

1.2. Ginamieji teiginiai

1) Melnomos ląstelių linijos FEMX-I CD44^{daug}CD133^{mažai}- fenotipo subpopuliacija pasižymi vėžinėms kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis.

2) Nepaisant skirtingų kamieniškumo savybių, KT kaupimosi dėsningumai beveik vienodi visose vėžinėse ląstelėse: KT patenka į ląstelių citoplazmą, išsidėsto ląstelėje pūslelinėmis struktūromis aplink branduolį, o didinant KT koncentraciją, matomas didesnis KT fotoluminescencijos intensyvumas ląstelėse.

3) CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT pasižymi didesniu fotoluminescencijos intensyvumu ląstelėse ir mažesniu toksiniu poveikiu joms nei ZnS sluoksnio ir AMP dangalo neturintys CdTe-MPA KT.

4) Antikūnais prieš paviršiaus antigeną CD44 padengti CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT selektyviai patenka į CD44⁺ fenotipo, kuris būdingas krūties vėžinėms kamieninėms ląstelėms, vidų ir pasiskirsto pūslelėse aplink branduolį, o anti-CD44, konjuguotas su organine fluorescuojančia molekule, nepatenka į ląstelių vidų ir bėgant laikui lieka prisijungęs prie ląstelės plazminės membranos.

5) Sensibilizatoriaus chlorino e₆ ir CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT kompleksas per 3 valandas susikaupia plazminėje membranoje ir vėžinių ląstelių viduje, pūslelinėse struktūrose, o paveikus regimąja šviesa geba sukelti vėžinių ląstelių žūtį per energijos pernašą iš KT į chloriną e₆.

6) Nekovalentiškai sujungtas CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT ir Ce₆ nanodariny yra stabilesnis ląstelėse, kai inkubacija atliekama baltymais ir vitaminais prisotintoje, *in vivo* sistemą primenančioje terpėje, nei fiziologiniame druskų tirpale.

1.3. Aktualumas ir naujumas

Tiek pasaulyje, tiek Lietuvoje onkologinių susirgimų vis daugėja, o mirtingumas nuo vėžio yra antroje vietoje, po širdies ir kraujagyslių ligų. Tai verčia įvairių sričių mokslininkus apjungti savo žinias ir ieškoti ne tik ankstyvą vėžio diagnostiką užtikrinančių priemonių, bet ir išsiaiškinti priežastis bei mechanizmus, lemiančius vėžio atsparumą gydymui.

Pastarąjį 10-metį vis gausėja įrodymų apie vėžyje esančią nedidelę subpopuliaciją, pavadintą – vėžio kamieninėmis ląstelėmis. Teigiama, jog būtent VKL yra atsakingos už naviko formavimą, atsparumą taikomai terapijai bei metastazių formavimą [9-11]. Intensyviai ieškoma žymenų, kurie leistų aptikti „pavojingąsias“ ląsteles bei sunaikinti jas, tokiu būdu užkertant kelią vėlesniam ligos atsinaujinimui ir progresavimui. Šiai dienai jau yra pasiūlyta nemažai žymenų, kurie galėtų aptikti VKL ląsteles įvairių lokalizacijų navikuose [12-14]. Tačiau vis dar yra ginčijamasi dėl žymenų patikimumo ir jų gebėjimo pažymėti visas VKL [15], dėl to, norint atskirti/išgryninti „piktąsias“ ląsteles, atliekami kiti tyrimai, kurie parodo žymenimis atskirtų VKL gebėjimą formuoti navikus, gebėjimą migruoti, metastazuoti ir atsparumą chemoterapiniams vaistams bei jonizuojančiai spinduliuotei.

Nanodalelės pateikia naujas galimybes vėžio diagnostikos ir gydymo srityje. Ypač svarbi ND savybė – diagnostikos ir terapijos funkcijų apjungimas į vieną darinį. Diagnostiką ir terapiją atliekantys nanodariniai yra vadinami nauju terminu – teranostiniais nanodarinais [16]. Kvantiniai taškai mokslinėje literatūroje minimi kaip ryškiausiai šviečiantys fluorochromai, pasižymintys reguliuojamomis spektrinėmis savybėmis, leidžiančiomis pasirinkti sugerties ir emisijos spektrinius ruožus audinių skaidrumo lange [17, 18]. Jų lengvai modifikuojamas paviršius leidžia prijungti norimas bioaktyvias molekules, pavyzdžiui antikūnus, bei terapinę funkciją atliekančius vaistus – chemopreparatus ir fotosensibilizatorius [19, 20]. KT dengti peptidais ir antikūnais prieš EGFR antigeną, buvo sėkmingai panaudoti selektyviam vėžio aptikimui *in vivo* [21, 22]. Tačiau nepavyko rasti duomenų apie VKL žymenimis dengtų KT panaudojimą VKL aptikimui *in vitro* ir *in vivo*.

KT panaudojimas kaip diagnostiką ir terapiją atliekančio nanodarinio buvo pasiūlytas dar 2003 metais, kai Samia pristatė KT (kaip galimo šviesos energijos donoro) ir fotosensibilizatoriaus (šviesos akceptorius) apjungimą į kompleksą [23]. Tokia sistema leistų parinkti žadinančiąją spinduliuotę audinių skaidrumo lange, o prikabinatas sensibilizatorius atliktų aktyvių deguonies formų generavimą, sukeldamas navikinių ląstelių žūtį. KT-FS nanodariniai buvo pasiūlyti ir kitų mokslininkų, buvo parodytas jų susikompleksavimas, gebėjimas perduoti energiją iš KT į FS, bei singuletinio deguonies generavimas [24, 25]. Tačiau vis dar trūksta duomenų apie KT-FS suderinamumą su biologine aplinka, jų kaupimąsi ir gebėjimą inicijuotą vėžinių ląstelių žūtį.

Šiame darbe pirmą kartą įvertintas FEMX-I ląstelių jautrumas jonizuojančiai spinduliuotei, įvertinta, jog KT kaupiasi neatsižvelgiant į imunofenotipinius ar funkcinius ląstelių skirtumus. Taip pat parodyta, jog antikūnais (prieš antigeną CD44, kuris būdingas VKL) dengti KT kaupiasi selektyviai tik CD44⁺ ląstelėse, bei patenka į jų vidų, priešingai nei FITC dažų žymėtas analogiškas antikūnas. Pirmą kartą parodytas sukonstruoto KT ir sensibilizatoriaus chlorino e₆ komplekso kaupimasis, energijos pernaša ir inicijuota ląstelių žūtis vėžinėse ląstelėse. Šie rezultatai parodo KT galimybes tiek selektyviai diagnostikai, tiek terapijai. Ateityje bus siekiama apjungti abi funkcijas (selektyvaus kaupimosi ir terapijos) į vieną KT nanodarinį ir taip priartėti prie norimo nanotechnologinio teranostinio preparato.

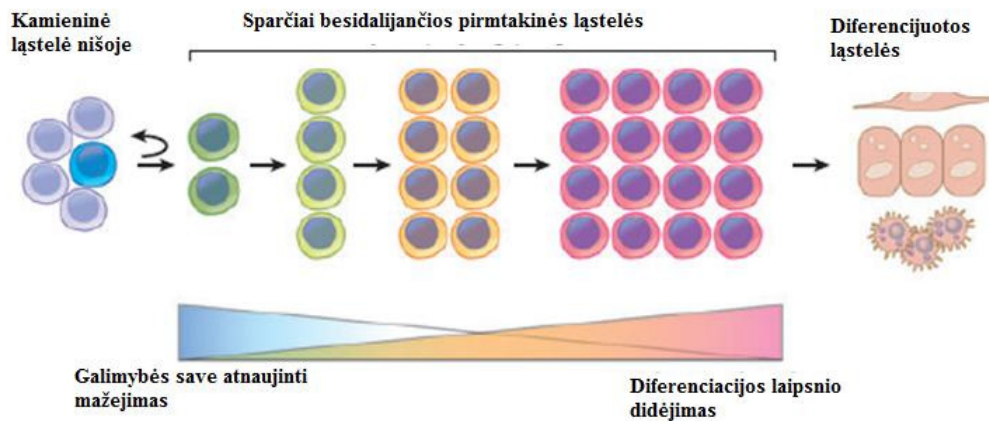
2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Kamieninės ląstelės, vėžys ir vėžinės kamieninės ląstelės

Anksčiau vyravusią teoriją, jog vėžiu susergama dėl genetiškai mutavusių somatinių organizmo ląstelių, pradėjusių neribotai dalintis ir suformavusių į aplinkos audinį panašų kūną – naviką – ne per seniausiai pakeitė vis labiau įsigalinti vėžinių kamieninių ląstelių teorija.

2.1.1. Kamieninės ląstelės

Vienas didžiausių pasaulio stebuklų yra sudėtingo daugialąščio organizmo išsivystymas iš mikroskopinio apvaisinto kiaušinėlio. Zigota virsta totipotentių KL kamuolėliu, kuris toliau diferencijuojasi į tris gemalinius lapelius: ektodermą, mezodermą ir endodermą [26]. Sąvoka „kamieninės ląstelės“ naudojama apibūdinant šias primityvias ląsteles, gebančias atsinaujinti (sugeba produkuoti daugiau KL) bei diferencijuotis į vieną ar kelias skirtingas konkrečią funkciją atliekančias ląsteles. Diferenciacijos procesas susideda iš kelių pakopų: prieš virsdamos pilnai diferencijuotomis ląstelėmis, kamieninės ląstelės tarpiniame etape tampa labiau specializuotomis



2.1.1.1 pav. Audinius sudarančių ląstelių hierarchija. Sveikų KL ir jų pirmtakų dauginimasis ir diferenciacijos procesas. Lenkta rodykle pavaizduotas KL gebėjimas atsinaujinti [27].

pirmtakinėmis ląstelėmis, kurios jau yra praradusios gebėjimą atsinaujinti ir, priešingai nei kamieninės ląstelės, turi ribotą pasidalijimų skaičių [27] (2.1.1.1 pav.).

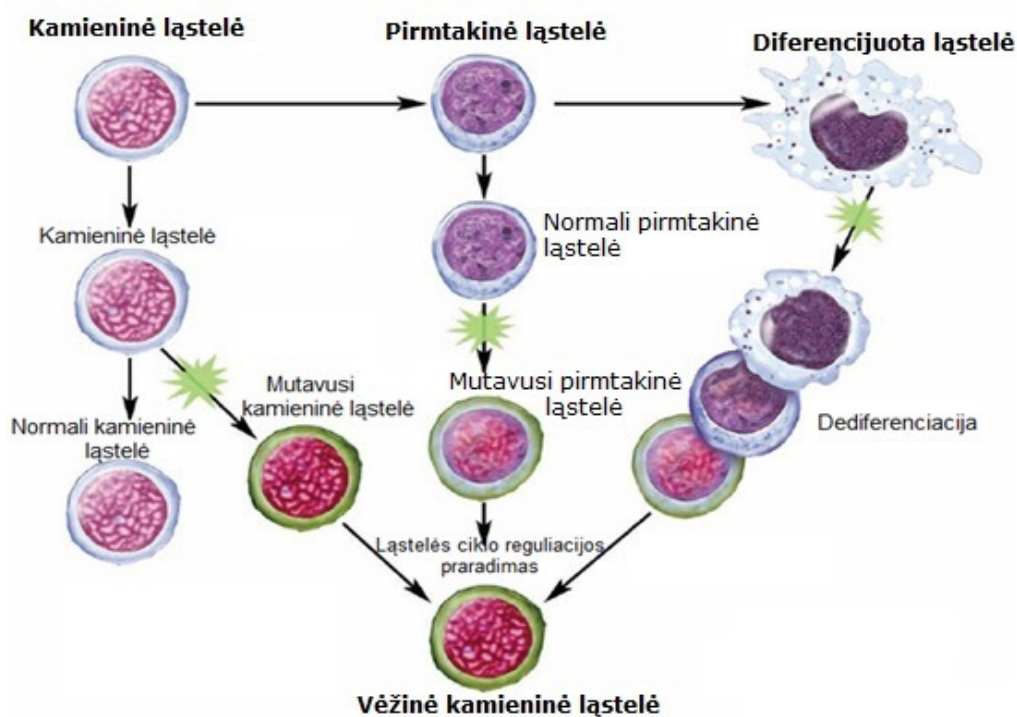
2.1.2. Vėžinių kamieninių ląstelių teorija

Sveikuose audiniuose KL iš jas supančios mikroaplinkos gauna signalus dalytis į vieną ar dvi KL. KL dalijimosi metu atskilusi pirmtakinė ląstelė diferencijuojasi į funkciją atliekančią ląstelę (2.1.1.1 pav). Procesas yra griežtai valdomas: žuvus vienai organizmo ląstelei, sukuriama ne daugiau nei viena dukterinė funkcinė ląstelė. Vėžys atsiranda tuomet, kai dalijimosi ir programuotos žūties pusiausvyra sutrinka: dėl tam tikrų mutacijų sveikos ląstelės įgauna gebėjimą nenormaliai intensyviai dalytis. Šios vėžinės ląstelės dalydamosi kuria į save panašias ląsteles – klonus – ir galiausiai, patyrusios dar daugiau mutacijų, suformuoja metastazuojantį auglį. Pagrindinis vėžio biologijos klausimas – kurios sveiko organizmo ląstelės gali mutuoti ir suformuoti auglius?

1970 m. *Pierce* ir *Wallace* pateikė eksperimentinių įrodymų, jog navikas yra heterogeninis darinys, kuriame egzistuoja, panašiai kaip normaliuose audiniuose, ląstelių hierarchija [28]: ląstelės tarpusavyje skiriasi fenotipu ir proliferacijos potencialu. 1997 m. *John Dick* ir *M. Bonnet* pateikė svaresnių įrodymų apie egzistuojančią vėžį inicijuojančių ląstelių populiaciją. Tyrinėdami pacientų, sergančių mielogenine leukemija, kraują mokslininkai panaudojo hematopoetinių KL fenotipo žymenis CD34 ir CD38, ir išskyrė nedidelę vėžinių ląstelių populiaciją, bei pademonstravo šios populiacijos savybę atsinaujinti: implantuotos imunodeficitinėms pelėms šios ląstelės laikui bėgant formavo navikus, kai tuo tarpu neturinčios šių žymenų ląstelės laikui bėgant neišgyveno pelėse [29]. Išskirtos ląstelės pasižymėjimo gebėjimu save atnaujinti ir diferencijuotis, ir buvo pavadintos vėžinėmis kamieninėmis ląstelėmis. Panašių tyrimų metu mokslininkas *Guan* su kolegomis pastebėjo, jog VKL yra „miegojimo“ būsenoje, skirtingai nei didžiąją naviko dalį sudarančios ląstelės, kurios išsiskiria savo aktyvia proliferacija [30]. Šis

pastebėjimas iš esmės pakeitė požiūrį į vėžio gydymą, nes dauguma chemoterapinių preparatų nukreipti į aktyviai besidalijančių ląstelių populiaciją.

KL savybėmis pasižyminčios ląstelių populiacijos atrastos ir kietuosiuose navikuose. 2003 m. *Al-Hajj* ir kiti mokslininkai tyrinėdami krūties piktybinius navikus pastebėjo, jog nedidelė ląstelių populiacija, pasižyminti $CD44^+CD24^-$ fenotipu, gebėjo formuoti navikus imunodeficitinėse pelėse [31]. Galvos piktybinių auglių tyrinėjimai atskleidė dar vieną kamieninėms ląstelėms būdingą žymenį – CD133 antikūną [32]. Vėliau atrasti ir kiti VKL žymenys, tokie kaip ALDH1, ABSB5, CD90, CXCR4, ESA ir kiti [14, 33].



2.1.2.1 pav. Vėžinių kamieninių ląstelių atsiradimo hipotezė. VKL ląstele gali tapti bet kuri iš audinio ląstelių, dėl aplinkos poveikio įgijusi kamieninėms ląstelėms būdingą savybę – savęs atnaujinimą [9].

Iš daugelio tyrinėjimų suformuota VKL teorija teigia, jog tik nedidelė dalis visų auglio ląstelių turi išskirtinę savybę skatinti naviko augimą bei metastazes. Šios, taip vadinamos VKL, duoda pradžią vėžinėms pirmtakinėms, o vėliau ir labiau diferencijuotoms ląstelėms, turinčioms ribotą pasidalijimų

skaičių. VKL turi požymius, panašius į sveikų KL – geba save atnaujinti, turi neribotą pasidalijimų skaičių, aktyvų antiapoptotinį signalinį kelią bei telomerazinį aktyvumą [9]. VKL ląstelė gali būti bet kuri iš audinio ląstelių, dėl aplinkos poveikio įgijusi KL būdingą savybę – savęs atnaujinimą (2.1.2.1 pav.). Save atnaujinančios ląstelės, panašiai kaip ir sveikame audinyje esančios KL, atlieka naviko audinių atstatymo funkciją.

Literatūroje pateikiamas VKL aptikimo metodas susideda iš kelių etapų:

1) Citometriškai ištiriamas ląstelių navikinės medžiagos arba ląstelių linijų heterogeniškumas pagal literatūroje skelbiamus VKL žymenis arba pagal gebėjimą išmesti *Hoechst* dažą iš citozolio [34, 35];

2) Tiriamos fenotipiškai skirtingų populiacijų „kamieniškumo“ savybės:

2.1) sugebėjimas formuoti sferoidus *in vitro* ir/ar tumorigeninis potencialas *in vivo* pelių modeliuose [31]. Citometriškai patikrinama, ar suformuotos kolonijos/navikai primena pirminę savo heterogeninę sudėtį.

2.2) jautrumas radioterapijai [36];

2.3) jautrumas chemoterapijai [37];

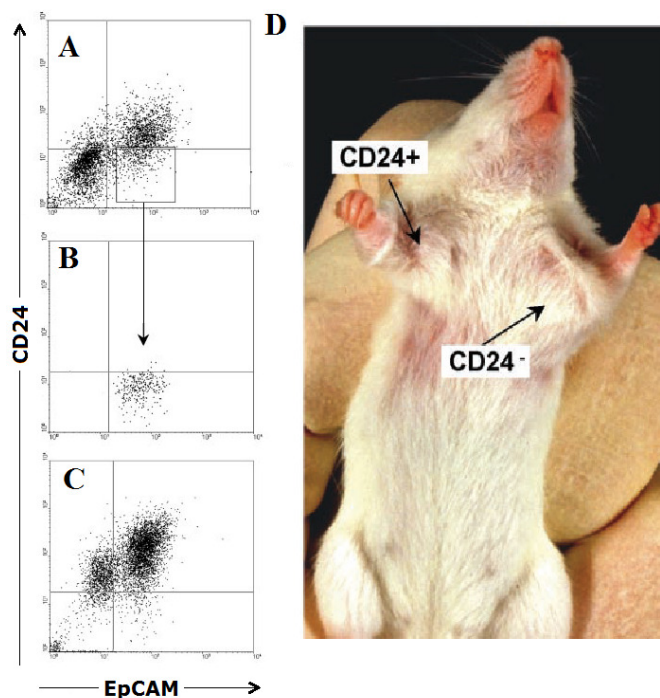
3) Tiriami fenotipiškai skirtingų ląstelių KL būdingų genų raiška [38].

Pagrindinė VKL savybė – savęs atnaujinimas ištiriamas 2.1 metodu. Jautrumas chemoterapijai ir radioterapijai yra pagalbiniai metodai, tačiau esminiai įrodant šių populiacijų padidintą agresyvumą. Pastarosios VKL savybės svarbios prognozuojant ligą ir parenkant gydymo taktiką.

2.2. Vėžinės kamieninės ląstelės krūties vėžyje

Krūties vėžys yra dažniausia onkologinė moterų liga Lietuvoje ir daugelyje išsivysčiusių pasaulio šalių. Pavyzdžiui, Jungtinėse Amerikos Valstijose kas trečias moterų onkologinių susirgimų atvejis yra krūties vėžys [1]. Krūties vėžys prasideda krūties audinyje, kuris sudarytas iš pieno liaukų ir pieno lataukų. Navikas būna sudarytas iš fenotipiškai skirtingų krūties vėžio

ląstelių populiacijų, tik nedidelė populiacija pasižymi kancerogeniniu aktyvumu.



2.2.1 pav. Iš paciento operacinės medžiagos išskirtų krūties vėžinių ląstelių, kurios suformavo naviką imunodeficitinėje pelėje, fenotipas (A). CD24⁻ EpCAM⁺ ląstelės buvo išrūšiuotos (B) ir implantuotos imunodeficitinei pelei. Išaugusio naviko citometrinė analizė atvaizduota (C), o pelės nuotrauka su išaugusiais CD24⁺ ir CD24⁻ ląstelių navikais atvaizduota (D) dalyje [31].

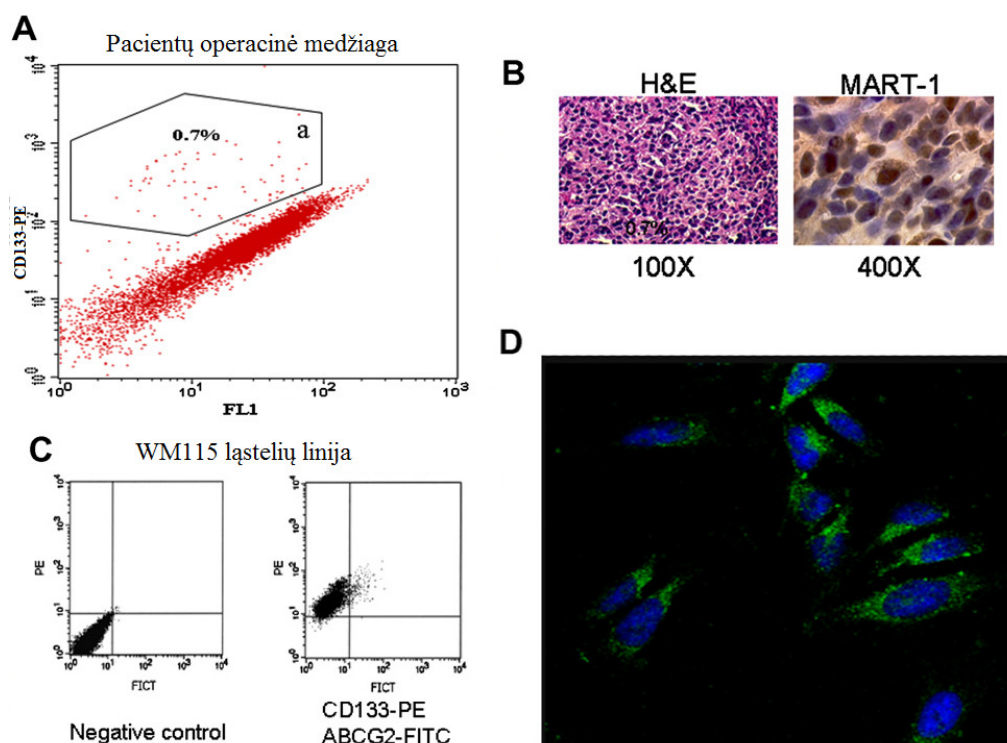
Krūties vėžys buvo pirmoji karcinoma, iš kurios buvo išskirta vėžinių kamieninių ląstelių subpopuliacija. Nustatant krūties vėžinių ląstelių kamieniškumą buvo tiriami 3 ląstelių paviršiaus antigenai – CD44, CD24 ir EpCAM. CD44 ir CD24 ląstelės paviršiaus antigenai susiję su ląstelių adhezija, tarpusavio kontaktais, judrumu ir metastazėmis. Epitelinės kilmės navikuose stipriai ekspresuojamas EpCAM (anksčiau vadintas ESA), bet mezenchiminės kilmės augliuose ekspresija pastebėta retai ir ji dažniausiai būdavo silpna. Nustatyta, kad CD44⁺/CD24^{-low}/EpCAM⁺ fenotipo krūties vėžio ląstelės pasižymi VKL savybėmis. Jos intensyviai dauginasi ir iš jų kyla skirtingo fenotipo, bet jau sumažėjusio proliferacijos potencialo ląstelės. Tokie rezultatai

buvo gauti tĕkmĕs citometrijos bŭdu iŝrŭŝiuotas ląsteles su skirtingais fenotipais suleidus pelĕms. Po 12 savaiĉiŭ CD44⁺/CD24^{-low}/EpCAM⁺ fenotipo ląstelĕs suformavo 10 navikŭ iŝ 10 injekcijŭ, kai tuo tarpu ląstelĕs, kuriŭ fenotipas buvo CD44⁺/CD24⁺/EpCAM⁺ nesuformavo nĕ vieno naviko iŝ 10 injekcijŭ (2.2.1 pav.) [31]. Ląsteliŭ gebĕjimas formuoti navikus imunodeficitinĕse pelĕse ir jŭ gebĕjimas atkurti pradinĕ naviko sudĕtį tapo „auksiniu standartu“ tolimesniuose VKL aptikimo tyrimuose kitŭ lokalizacijŭ navikuose [38-40].

Krŭties VKL tyrimai buvo atlikti ir űmogaus vĕűiniŭ ląsteliŭ linijose. Vis dar diskutuojama, ar ląsteliŭ linijos visiŝkai atspindi navikŭ, iŝ kuriŭ jie kilĕ, heterogeniŝkumą. Taĉiau naudojant ne vieną, o kelias skirtingo tipo ląsteliŭ linijas, gaunami duomenys, reikalingi pilnaverĉiams krŭties karcinomŭ tyrimams. MCF-7 ląsteliŭ linija priklauso luminalinĕms-epitelinĕms ląstelĕms, formuoja susijungusiŭ viena su kita daugiakampiŭ ląsteliŭ kolonijas bei pasiűymi CD44⁺/CD24⁺/EpCAM⁺ fenotipu [41]. MDA-MB-231 linijos ląstelĕs pasiűymi bazaliniu-mezenchiminiu fenotipu, yra űvaigűdiŝkos, panaŝios į fibroblastus. Jose intensyviai ekspresuojamas vimentinas, randamas mezenchimos ląstelĕse, o koneksinŭ, svarbiŭ plyŝiniŭ jungĉiŭ tarp ląsteliŭ sudarymui, kateninŭ bei kadherinŭ, uűtikrinanĉiŭ tarpląstelinius ryŝius, sintezĕ yra nuslopinta [42]. Dĕl mezenchiminio fenotipo MDA-MB-231 ląstelĕs yra itin agresyvios. Polimerazĕs grandininĕs reakcijos analizĕs metodu nustatyta, kad MDA-MB-231 ląstelĕse, kuriose CD44⁺/CD24⁺/EpCAM⁺ ląsteliŭ populiacija sudaro daugiau nei 85% visŭ ląsteliŭ, yra padidĕjusi kaulŭ metastazes sukelianĉiŭ genŭ ir genŭ, atsakingŭ uű invaziją, ekspresija [41]. Remiantis ŝiais duomenimis galima daryti iŝvadą, kad MDA-MB-231 krŭties vĕűio linijos ląstelĕs turi daugiau kamieniŝkumo poűymiŭ nei MCF-7 ląstelĕs. MCF-7 ir MDA-MB-231 ląsteliŭ linijas patogiu naudoti kartu norint sukurti skirtingŭ savybiŭ navikŭ modelines sistemas ir jas lyginti.

2.3. Vėžinės kamieninės ląstelės melanomoje, kasos adenokarcinomoje ir kiaušidžių karcinomoje

Melanoma – piktybinis melanocitų navikas – yra agresyviausia odos vėžio forma. Ji aptinkama mažiau nei 5% diagnozuotų odos navikų atvejų, tačiau yra dažniausia mirties nuo odos vėžio priežastis [43]. Dėl didėjančio piktnaudžiavimo saulės spinduliais, melanomos diagnozių kasmet taip pat daugėja [44]. Geresnio gydymo efektyvumo ieškojimai paskatino mokslininkus ištirti VKL egzistavimą melanomos audiniuose. 2005 metais *Frank* su kolegomis pademonstravo padidintą CD133 ekspresiją chemoterapiniams vaistams atspariose melanomos ląstelių kultūrose bei pacientų operacinėje medžiagoje [45]. CD133⁺ ląstelių padidintas piktybiškumas buvo patvirtintas



2.3.1 pav. CD133 antigenų ekspresija pacientų operacinės medžiagos ląstelėse (A) ir WM115 ląstelių linijoje (B). Mikroskopijos nuotraukos rodo imunodeficitinėse pelėse išaugintų CD133⁺ ląstelių melanocitinę prigimtį (MART-1 melanocitų žymuo) (C) ir CD133 antigeno lokalizaciją 4% paraformaldehide fiksuotose WM115 ląstelėse (D) [38].

jas suleidus imunodeficitinėms pelėms. Vos 100 000 ląstelių formavo auglius, kai tuo tarpu CD133⁻ ląstelės nesuformavo apčiuopiamų navikų [38]. Autoriai VKL aptikimo tyrimus atliko iš pacientų operacinės medžiagos ir WM115 ląstelių linijos. Įdomu tai, jog operacinėje medžiagoje rastos vos 0,7% CD133⁺ ląstelių (2.3.1 pav). Tai patvirtina VKL teoriją, kuri teigia, jog VKL ląstelės, kaip ir sveikos KL, yra retos organizmo ląstelės, tačiau jų mažo kiekio visiškai pakanka augliui palaikyti ir metastazėms formuoti. Ląstelių linijoje aptiktos ląstelės beveik visos pasižymėjo CD133⁺ fenotipu. Autoriai tokį operacinės medžiagos ir ląstelių linijų analizės neatitikimą priskyrė pačiai ląstelių linijų išvedimo prigimčiai – linijinės ląstelės yra išgryninto vieno klonu proliferacijos rezultatas [38]. Melanomos VKL egzistavimas buvo patvirtintas ir kituose mokslininkų darbuose. Šios lokalizacijos VKL žymėjimui pasiūlyti prieš CD133, CD20, ABCB5, CD271, CD86 ir kitus antigenus susintetinti antikūnai su fluorescuojančia žyme [46].

Kasos adenokarcinoma – piktybinė liga, susidaranti kasos audinyje. Kasos vėžys užima 10 vietą pagal kasmet diagnozuojamų piktybinių ligų skaičių, tačiau šios ligos 5 metų išgyvenamumas po diagnozės siekia vos 4% [47]. Kasos vėžys pasižymi ypatingai dideliu invazyvumu ir metastazių formavimu kituose organuose, todėl mokslininkų noras suprasti po šia agresyvia liga slypinčius molekulinis mechanizmus atvedė prie VKL paieškos kasos vėžyje. Pirmieji duomenys buvo gauti *Li* ir kitų kolegų 2006 metais. Iš kasos vėžiu sergančių pacientų operacinės medžiagos tėkmės citometrijos būdu buvo išskirtos CD44⁺CD24⁺EpCAM⁺ fenotipo ląstelės ir suleistos imunodeficitinėms pelėms. Vos 100 šio fenotipo ląstelių formavo auglius imunodeficitinėse pelėse 50% efektyvumu. Svarbu tai, jog mokslininkai parodė, kad būtent visų trijų antigenų ekspresijos kombinacija lemia didžiausią ląstelių piktybiškumą: 100 fenotipo CD44⁺, CD24⁺, EpCAM⁺, CD44⁺CD24⁺ ar CD44⁺EpCAM⁺ ląstelių neformavo navikų pelėse, arba formavo juos žymiai mažesniu efektyvumu (iki 25%) [39]. Kitų mokslininkų kasos vėžio tyrinėjimai parodė, jog CD133 antigeno raiška yra sietina su agresyvesniu vėžinių ląstelių

fenotipu nei CD44⁺CD24⁺. Antigenas CD133 sietinas su išreikštomis migracijos ir invazyvumo savybėmis [48].

Kasos vėžinių ląstelių linijos MiaPaCa2 tyrinėjimai panaudojant įvairius literatūroje skelbiamus VKL žymenis, atskleidė šiai linijai būdingas žymenų kombinacijas. Grupė mokslininkų iš Vokietijos publikavo duomenis, jog MiaPaCa2 ląstelės ekspresuoja CD44 antigeną ir turi ALDH1 aktyvumą, neturi CD24 antigeno, pasižymi greitu augimu po suleidimo imunodeficitinėms pelėms, invazyviu augimu, dideliu sugebėjimo atsinaujinti ir diferencijuoti potencialu, rezistentiškumu apoptozei [49]. Kinų mokslininkai eksperimentiniais tyrimais patvirtino CD44⁺CD24⁻ fenotipą MiaPaCa2 ląstelėse ir papildomai nustatė, kad ląstelės neturi EpCAM antigeno [50]. Kitų autorių duomenimis 60% MiaPaCa2 ląstelių turi CD44⁺ ir 3–5% CD133⁺ žymenis, tačiau, tik 1–2% ląstelių turi CD44⁺CD133⁺ fenotipą. Pastebėta, kad būtent CD44⁺CD133⁺ subpopuliacija pasižymi kamieninėmis savybėmis, nes atsinaujina specialioje sferoidų formavimo mitybinėje terpėje per 7-10 dienų suformuodamos navikines sferas, CD44⁺CD133⁻ ar CD44⁻CD133⁺ ląstelės sferas formuoja rečiau ir mažesnes, o CD44⁻CD133⁻ sferų neformuoja [51].

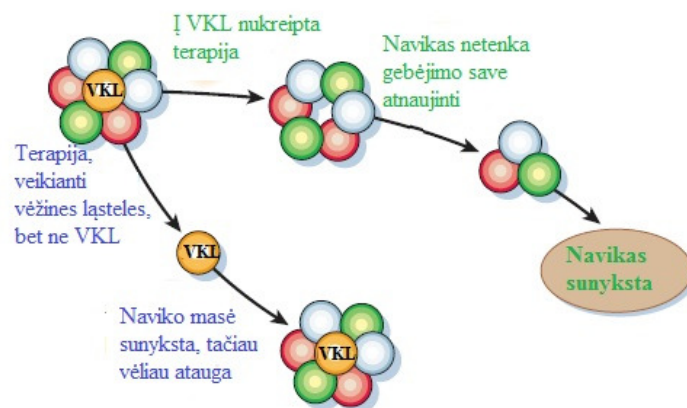
Kiaušidžių karcinoma – tai piktybinis navikas, susidaręs kiaušidėse. Amerikoje kas penktai nuo vėžio mirusiai pacientei buvo diagnozuotas kiaušidžių vėžys. Vėžinių kamieninių ląstelių paieška kiaušidžių navikuose pradėta 2007 metais. *Ferrandina* vadovaujama mokslininkų grupė aptiko padidintą CD133 ekspresiją kiaušidžių operacinėje medžiagoje [52]. Kiti mokslininkai eksperimentiškai patvirtino operacinės medžiagos ir kiaušidžių vėžio ląstelių linijos A2780 heterogeniškumą pagal CD133 antigeno raišką, išskirdami dviejų tipų ląsteles - CD133⁺ ir CD133⁻. Auginant CD133⁻ ląsteles *in vitro* jos dalijosi simetriškai ir produkavo tą patį žymenį turinčias ląsteles, o CD133⁺ ląstelės dalijosi asimetriškai ir produkavo daugiau CD133⁺ ląstelių arba mišraus fenotipo ląsteles. Suleidus CD133⁺ ir CD133⁻ fenotipo ląstelių į poodį 4-5 savaičių imunodeficitinėms pelėms, CD133⁺ ląstelės buvo piktybiškesnės nei CD133⁻ ląstelės: formavo didesnius auglus bei pasižymėjo mažesniu jautrumu cisplatinai [53]. VKL aptikimui kiaušidžių vėžyje buvo

pasiūlyti ir kiti žymenys – CD44, CD117, ALDH1 [54, 55]. Šiais žymenimis pasižyminčios ląstelės geriau formavo auglius imunodeficitinėse pelėse ir pasižymėjo atsparumu chemoterapiniams vaistams.

2.4. Vėžinių kamieninių ląstelių atsparumas chemoterapijai ir radioterapijai

Viena iš svarbiausių priežasčių, lėmusių vėžio heterogeniškumo tyrinėjimus ir VKL paiešką, yra vėžio atsinaujinimas po taikyto gydymo. Chemo- ir radioterapijos yra nukreiptos į didžiąją dalį naviką sudarančių ląstelių, jų gydomasis efektas pastebimas, kai naviko kūnas ima mažėti. Tačiau bėgant laikui neretai navikas atauga ir liga atsinaujina.

Sveikų KL tyrinėjimai atskleidė, jog KL yra labiau atsparios chemoterapiniams vaistams nei kitos audinius sudarančios ląstelės [56]. Atsparumas siejamas su padidinta anti-apoptotinių baltymų raiška [57] bei ABC nešiklių raiška [58]. ABC šeimos nešikliai išmeta chemoterapinius vaistus pro plazminę membraną į ląstelės išorę. Vėžyje taip pat buvo aptikti panašūs į sveikų KL atsparumo vaistams mechanizmai. Gausu tyrimų, kurie



2.4.1 pav. Įprastinės terapijos sunaikina didžiąją daugumą ląstelių, kurios pasižymi ribotu proliferacijos potencialu. Tačiau VKL ląstelės išlieka nepažeistos. Siūloma ieškoti naujų terapijos galimybių, kurios būtų nukreiptos į naviko „gyvybės šaltinį“ – VKL ląsteles [59].

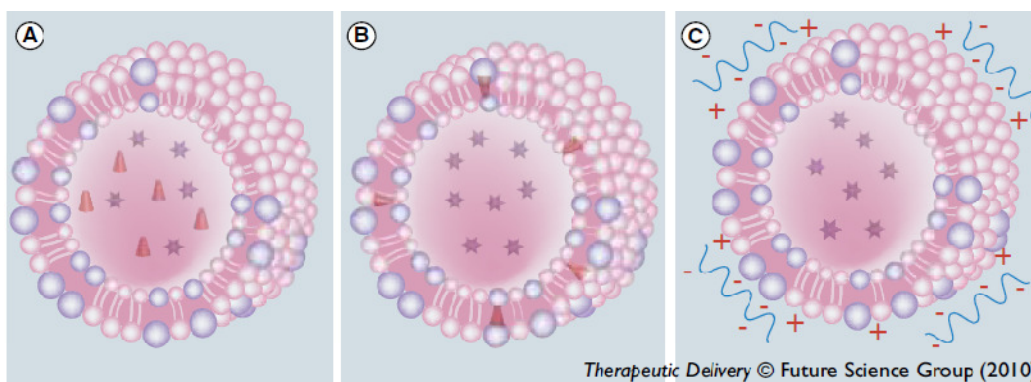
aptiko ABC nešiklių raišką įvairių lokalizacijų VK ląstelėse [37, 60]. Galiausiai VKL atsparumas chemoterapiniams vaistams buvo panaudotas kaip naujas metodas joms aptikti ir išgryninti [61].

Atsparumas radioterapijai taip pat nagrinėjamas mokslinėje literatūroje. Mokslininkai savo darbuose demonstruoja padidintą VKL antigenų raišką po poveikio jonizuojančia spinduliuote [62]. Taip pat yra duomenų apie VKL žymenimis išrūšiuotų ląstelių mažesnę jautrumą radioterapijai [63]. Manoma, jog VKL yra mažiau jautrios jonizuojančiai spinduliuotei dėl padidintos DNR reparacinės sistemos baltymų raiškos [64]. DNR reparacijos metu pažaidų sugeneruoti nesuporuoti nukleotidai (neatitinkantys komplementarumo taisyklių) yra atpažįstami, nustatoma jonizuojančios spinduliuotės poveikio padaryta klaida, įjungiami pataisos mechanizmai.

Atsižvelgiant į VKL gebėjimą „išvengti“ chemo- ir radioterapijos, buvo pasiūlyta į VKL nukreiptos taikininės terapijos idėja (2.4.1 pav).

2.5. Taikininė vėžinių kamieninių ląstelių terapija

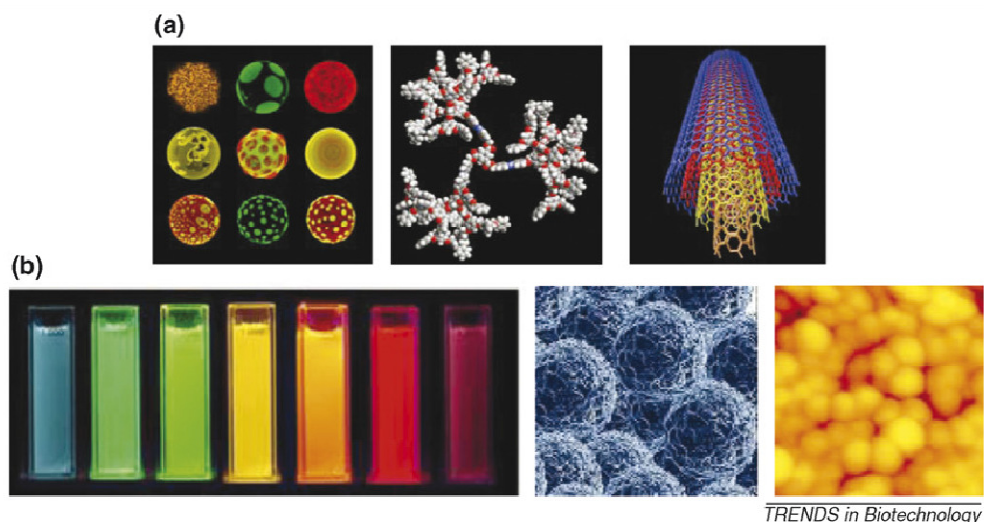
VKL ląstelių aptikimas įvairių lokalizacijų navikuose ir atsparumo gydymui nustatymas privertė mokslininkus ieškoti naujų alternatyvių vėžio gydymo metodų. Vienas iš pasiūlymų – įvilkti chemoterapinius vaistus į nanomatmenų dydžio kapsulę ir taip „apgauti“ ląstelių savisaugos mechanizmus. Įvilkimui buvo panaudotos įvairios amfifilinės medžiagos, pradedant lipidais baigiant įvairiais polimerais. Tokios suformuotos nanodalelės susilaukė sėkmės: jos efektyviau kaupėsi vėžinėse ląstelėse *in vitro* ir *in vivo*. O jų prailginta cirkuliacijos kraujyje trukmė lėmė selektyvesnę susikaupimą navike: ND tiesiog „užstrigdavo“ naviko kraujagyslių raizginyje. Taip pat buvo sumažinti šalutiniai chemoterapinių vaistų efektai aplinkiniams audiniams bei naudojamos chemopreparatų dozės. Šiai dienai chemoterapiniai vaistai, įvilkti į polimerą, taikomi klinikiniuose bandymuose (2.5.1 pav.) [65, 66].



2.5.1 pav. Lipidų nanokapsulės principinė schema. (A) – keleto rūšių hidrofilinių vaistų liposoma (žvaigždutės ir kūgeliai vaizduoja chemoterapinį vaistą), (B) - hidrofilinių (žvaigždutės) ir hidrofobinių (kūgeliai) vaistų įterpimas į liposomą, (C) – oligonukleotidų kilmės vaistų (siRNR) prikabinimas prie liposomos [66].

Nanodalelės atvėrė naujas galimybes vėžio gydymo srityje. Todėl išaugo ir pats susidomėjimas nanodalelėmis. Iki 2013 metų buvo atrasta ir susintetinta didelė įvairovė polimerinių, lipidinių, dendrimerų, anglies, metalo ND su galimu pritaikymu medicinoje (2.5.2 pav.) [67]. Vienos jų naudojamos diagnostikoje dėl ryškaus švytėjimo arba sustiprinto magnetinio rezonanso kontrasto, kitos dėl šiluminių savybių taikomos hiperterminėi terapijai [68]. ND yra laikomos daug žadančiomis ne tik dėl minėtų diagnostikos ir terapijos funkcijų. Viena svarbiausių jų savybių – santykinai didelis (lyginant tūrio ir paviršinio ploto santykį) ir lengvai chemiškai modifikuojamas paviršius [69]. Prie paviršiaus galima jungti molekules, dėl kurių ND tampa tirpios vandenyje ir papildomai atlieka biologinę, pavyzdžiui, taikinio atpažinimo, funkciją. Dažniausiai taikinio atpažinimui siūlomos biologinės molekulės yra antikūnai arba membraninio receptoriaus ligandai. Išskiriami keli pagrindiniai reikalavimai prie ND jungiamiems ligandams ir antikūnams [69]:

- 1) Afiniškumas jungimuisi prie pasirinktos vėžinės ląstelės paviršiaus molekulės;
- 2) Endocitozės mechanizmo įjungimas.



2.5.2 pav. Organinės (A) ir metalo (B) nanodalelės. Iš kairės į dešinę: (A) – liposomos, dendrimerai, anglies nanovamzdeliai, (B) – puslaidininkinės, magnetinės, aukso nanodalelės [67].

Pastaraisiais metais didelis dėmesys skiriamas diagnostikos ir terapijos funkcijoms apjungti į vieną nanodarinį, bandant sukurti universalią teranostinę nanodalelę. Tokia teranostinė daugiafunkcinė ND apjungtų naviko selektyvų vaizdinimą, sunaikinimą bei ligos stebėjimą po gydymo [67]. Prisiminus aprašytą VKL aptikimo įvairių lokalizacijų navikuose istoriją, būtų galima pasiūlyti sukurti nanodalelę, kuri atpažintų VKL pagal jos paviršiuje esančius antigenus, pasižymėtų vaizdinimui reikalingomis savybėmis ir gebėtų įjungti žudymo mechanizmą tik tada, kai jau yra susikaupusios VKL ląstelių viduje. Kitaip tariant, reikia sukurti nanodalelę, kuri pasižymėtų taikinine VKL terapija.

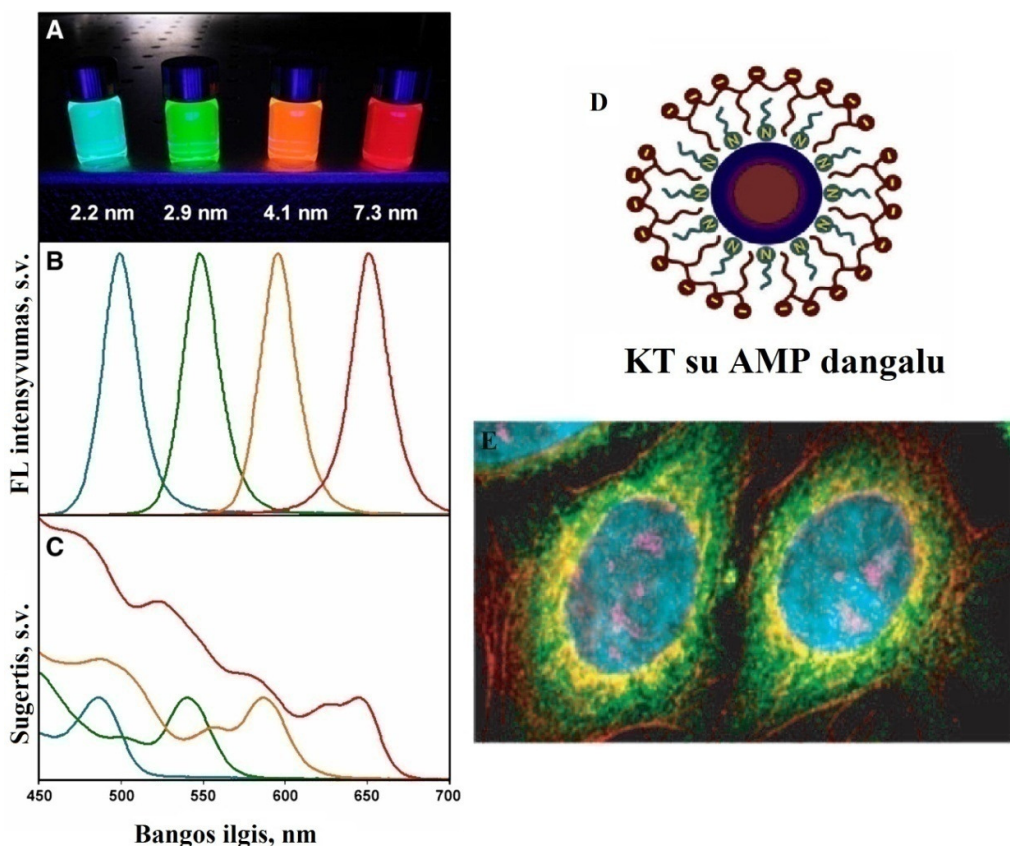
2.6. Kvantiniai taškai – daugiafunkciniai nanodariniai

Vienos iš labiausiai diagnostikai tinkančių nanodalelių yra kvantiniai taškai. Kvantiniai taškai – tai neorganiniai puslaidininkiniai kelių nanometrų dydžio kristalai, pasižymintys unikaliomis optinėmis ir elektroninėmis savybėmis, priklausančiomis nuo jų erdviųjų matmenų [18]. Pagrindinės KT optinės ir cheminės savybės, lemiančios susidomėjimą jais biologijoje ir medicinoje [19]:

- 1) Platus sugerties spektras, apimantis didžiąją regimojo spektro sritį. Tai suteikia galimybę sužadinti skirtingus KT to paties bangos ilgio žadinančiąja spinduliuote (2.6.1 pav.);
- 2) Didelis ekstinkcijos koeficientas (10^5 - 10^6 M⁻¹ cm⁻¹ ties pirma eksitonine sugerties juosta). Net silpno intensyvumo šviesa yra pakankamai efektyviai sugerama, todėl juos sužadinti galima gilesniuose audinių sluoksniuose;
- 3) Didelis kvantinis našumas ir siauras bei simetriškas FL spektras. Dėl to galima parinkti keletą skirtingų KT, kurių emisijos spektrai nepersidengia, ir atlikti kelių objektų vaizdinimą vienu metu (2.6.1 pav). FL spektras gali būti tikslingai keičiamas plačiame intervale nuo ultravioleto iki artimosios infraraudonosios spektro srities, keičiant KT dydį bei sudėtį;
- 4) Pasižymi dideliu Stokso poslinkiu bei ilga FL gyvavimo trukme (nuo 20 ns ir daugiau);
- 5) Atsparūs fotodegradacijai, lyginant su įprastais organiniais dažais, neblunka ilgą laiką veikiant šviesa;
- 6) Paviršius nesunkiai modifikuojamas suteikiant tirpumą vandeninėje terpėje bei stabilumą biologinėje aplinkoje (2.6.1 pav). Galima prie KT paviršiaus prijungti įvairias specifines biomolekules, užtikrinančias jų selektyvų susikaupimą tiriamame biologiniame objekte ar jo dalyje;
- 7) Pasižymi efektyvia dvifotone sugertimi, kelis kartus didesne už organinių dažų dvifotonę sugertį. Dėl to leidžia atlikti vaizdinimą gilesniuose audinių sluoksniuose [70].

KT dažniausiai sudaryti iš 1-10 nm dydžio branduolio, kuris koloidų chemijos metodu sintetinamas iš II ir VI (ZnS, ZnSe, CdS, CdSe, CdTe ir HgS), bei III ir V (GaAs, InP ir InAs) grupių elementų. Branduolio dydis bei sudėtis lemia pagrindines KT optines ir elektronines savybes [71]. Branduolys paprastai yra apgaubiamas plonu ZnS arba CdS sluoksniu, kuris pašalina paviršiaus defektus ir apsaugo nuo nespindulinės rekombinacijos, todėl

fotoluminescencijos kvantinis našumas padidėja iki 50 ir daugiau procentų [72]. ZnS apvalkalas taip pat pasyvuoja branduolio paviršių, apsaugo KT nuo išorinio biologinės terpės poveikio, saugo nuo oksidacijos.

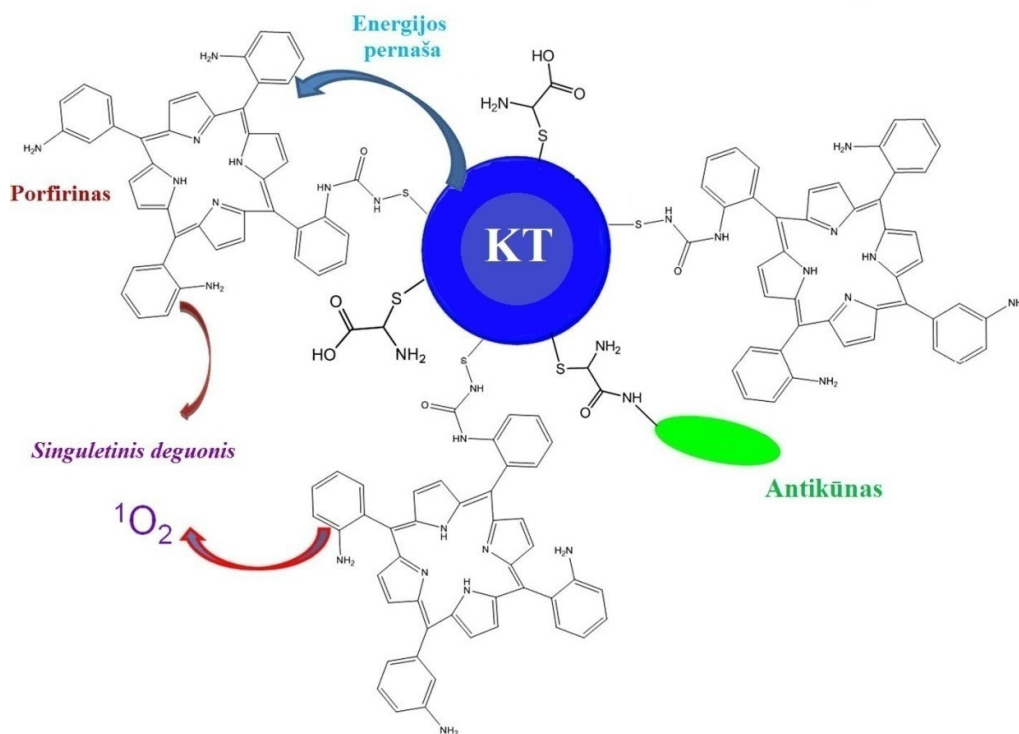


2.6.1 pav. KT pasižymi nuo jų didžio priklausomomis optinėmis savybėmis (A), plačia sugertimi (B) ir siauriu FL spektru (C). (D) - AMP dengtų KT schema (E) - skirtingais KT pažymėti žmogaus epitelio ląstelės komponentai: mėlva – branduoliai, rausva – Ki-67 baltymas, geltona – mitochondrijos, žalia – mikrotubulės, raudona – aktino siūlai [19, 73].

Šiuo metu KT jau yra taikomi biologiniuose vaizdinimo tyrimuose: gyvų ir fiksuotų ląstelių vaizdinimui imunofluorescencinėmis metodikomis, fluorescencijos *in situ* hibridizacijai, viduląstelių pavienių molekulių dinamikos tyrimuose, kamieninių ląstelių migracijos tyrimuose, receptoriaus-ligando sąveikos tyrimuose panaudojant FRET mechanizmą bei kituose tyrimuose [74]. Nemažai yra pasiekta pritaikant KT ir diagnostikos srityje:

antikūnais funkcionalizavus KT vėžinės ląstelės yra atskiriamos nuo sveikų [75, 76]. Antikūnais CD44v6, CD24 ir Ki67 funkcionalizuoti KT buvo panaudoti VKL aptikti pirminiuose žmogaus krūties navikuose *ex vivo* [77]. KT panaudojimas krūties vėžio metastazių diagnostikai sėkmingai įgyvendintas pelės ir kiaulės modelyje *in vivo* [78].

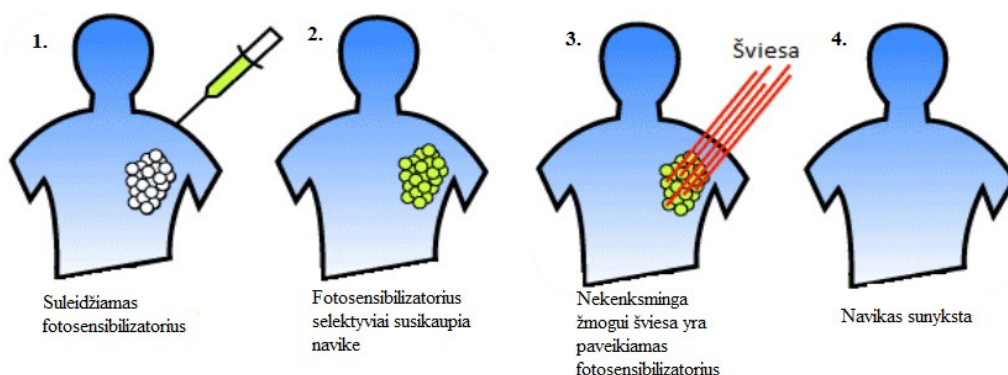
KT pritaikymo galimybės neapsiriboja vien vaizdinimu. KT taip pat bandoma pritaikyti ir terapijoje kaip vaistų ar kitų medžiagų nešiklius [79, 80] arba energijos donorus fotosensibilizatoriams, atliekant fotosensibilizuotą navikų terapiją [23]. Apjungus vaizdinimo ir terapijos funkcijas, KT galima panaudoti kaip daugiafunkcinį nanodarinį vėžio aptikimui ir gydymui (2.6.2 pav.).



2.6.2 pav. Daugiafunkcinio nanodarinio schema. Prijungtas antikūnas atlieka vėžinių ląstelių atpažinimo funkciją, kvantinio taško šerdis atlieka vaizdinimo ir energijos sugėrimo-perdavimo funkciją, porfirinai atlieka fotovaisto funkciją (išsamiau – žr. 2.7 skyrelį) [20].

2.7. Kvantinio taško ir sensibilizatoriaus nanodariny

Fotodinaminė navikų terapija – tai neinvazinis vėžio gydymo būdas, kurio metu šviesos aktyvuotas fotovaistas – fotosensibilizatorius – generuoja aktyvias deguonies formas, sukeliančias vėžinių ląstelių žūtį [81, 82]. Dažniausiai FDT naudojami FS yra linkę kauptis navikiniuose audiniuose arba yra suleidžiami tiesiai į naviką. Navike esantis FS, veikiamas šviesos, yra sužadinas, o sužadimo energija toliau gali būti perduodama aplinkoje



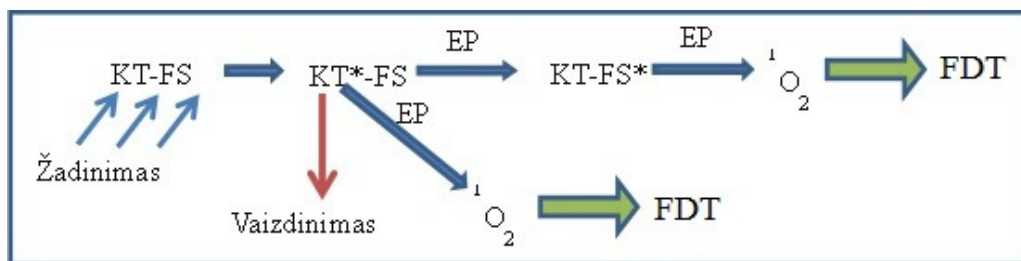
2.7.1 pav. Fotodinaminės terapijos principinė schema. Pirmiausia pacientui suleidžiamas FS, tuomet naviko sritis veikiama pacientui nekenksminga šviesa. Šviesos poveikyje FS generuoja reaktyvias deguonies formas, kurios žudo vėžines ląsteles.

esančioms molekulėms, pavyzdžiui, deguoniui. Susidaręs singuletinis deguonis ir laisvieji deguonies radikalai yra aktyvios deguonies formos, linkusios sąveikauti su biomolekulėmis, sukeldamos jų pažeidimą. Tokiu būdu pažeidus ląstelėse esančias gyvybiškai svarbias organeles, yra inicijuojama vėžinių ląstelių žūtis (2.7.1 pav.).

Taikant FDT visgi yra susiduriama ir su problemomis. Savaiame suprantama, jog svarbiausias FDT komponentas yra FS. Mokslininkai daug dirba, jog priartintų FS prie idealo, demonstruojančio selektyvų susikaupimą navike, didelį ekstinkcijos koeficientą audinių skaidrumo lange (680-800 nm ruože), efektyvų aktyvių deguonies formų generavimą, būtų stabilus biologinėje aplinkoje ir pasišalintų iš organizmo [83]. Šiai dienai yra nemažai

sensibilizatorių, kurie patvirtinti naudojimui klinikoje [84], tačiau jų visų priartėjimas prie idealiam fotosensibilizatoriui keliamų reikalavimų yra ribotas. Jeigu FS pasižymi sugertimi audinių skaidrumo lange, tai singuletinio deguonies generavimo efektyvumas yra gerokai mažesnis nei kitų sensibilizatorių [84]. Taigi, ieškant FS alternatyvų, nanodalelės buvo pastebėtos ir šioje medicinos srityje.

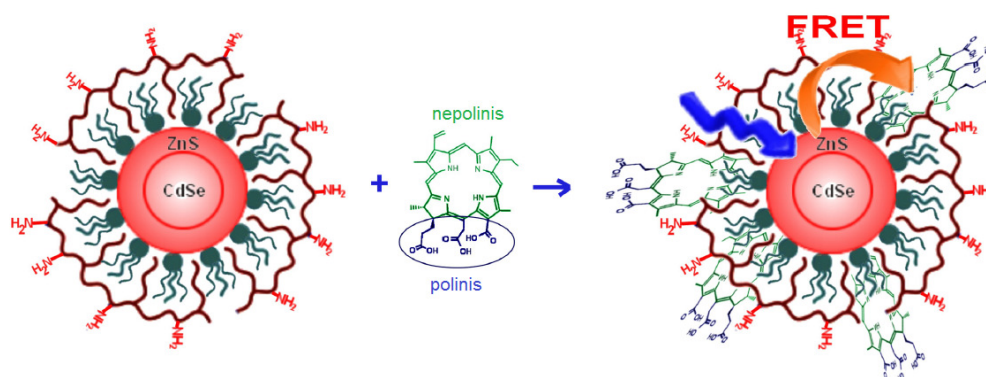
Kvantiniai taškai, dėl savo ypatingų optinių savybių, buvo pasiūlyti kaip galimi FS fotodinaminei terapijai [85]. Nors savo optinėmis savybės KT „aplenkė“ klasikinius FS, singuletinio deguonies generavimo efektyvumas buvo daugiau nei 10 kartų mažesnis nei klasikinių FS. Dėl to buvo pasiūlyta apjungti KT su FS, suformuojant KT-FS nanodarinį, kuriame KT atliktų šviesos surinkimo dalelės ir energijos pernešėjo į FS, vaidmenį (2.7.2 pav.) [85, 86], o FS generuotų aktyvias deguonies formas. Tikimasi, kad šitokia KT-FS sistema ne tik padės efektyviau ir plačiau taikyti FDT, tačiau dėl intensyvios KT fotoluminescencijos leis atlikti terapijos vaizdinimą realiu laiku, suteikiant galimybę stebėti gydymo procesą.



2.7.2 pav. Galimi procesai sužadinus KT-FS sistemą vykdant FDT. KT-FS – kvantinio taško ir fotosensibilizatoriaus kompleksas, KT* - sužadinti kvantiniai taškai, FS* - sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės, EP – energijos pernaša, $^1\text{O}_2$ – singuletinis deguonis.

Pirmieji KT-FS kompleksų tyrimai buvo atlikti organiniuose tirpikliuose [87, 88], todėl gautieji rezultatai negalėjo būti pritaikyti biologinėse sistemose. Vėlesniuose KT-FS kompleksų tyrimuose buvo naudojami vandenyje tirpūs KT, kurių paviršius padengtas nesudėtingais ligandais [25], tačiau prie tokių KT prijungus porfirinus, kompleksai nebuvo

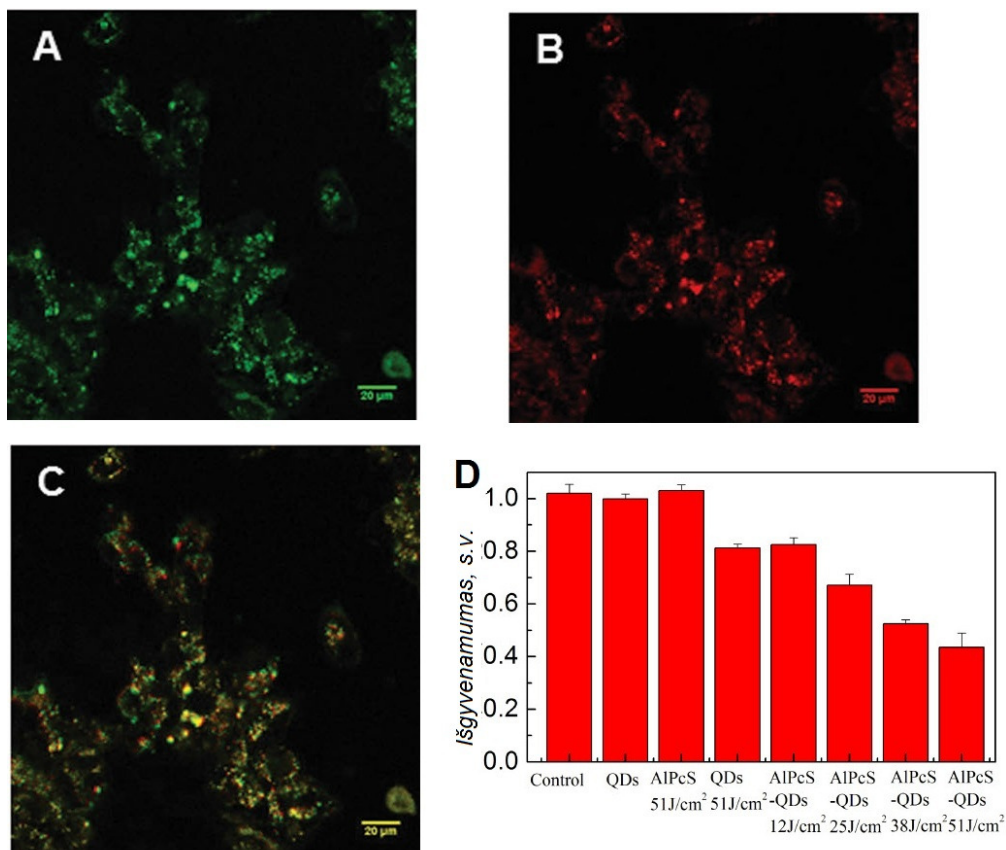
stabilūs – vandenyje sudarė agregatus ir iškrisdavo į nuosėdas [24, 89]. Vėliau buvo parodyta, jog prie KT prijungus FS molekulės yra įmanoma jas netiesiogiai sužadinti Fiersterio rezonansinės energijos pernašos būdu ir taip inicijuoti fotosensibilizacinius procesus, kurių metu yra naikinamas navikas [90]. 2010 metais Valančiūnaitė su kolegomis pademonstravo kvantinio taško ir sensibilizatoriaus chlorino e_6 komplekso susidarymą vandeninėje terpėje ir FRET pernašą [91]. Tolimesni tyrimai, parenkant įvairaus išorinio krūvio KT, padėjo išsiaiškinti, jog komplekso formavimasi galimai lemia ne elektrostatinė, o hidrofobinė sąveika. Labiausiai tikėtina, jog Ce_6 molekulė nepoliniu galu įsiterpia į kvantinio taško AML dangalą [91] (2.7.3 pav).



2.7.3 pav. Kvantinio taško ir chlorinio e_6 komplekso susidarymo schema. Manoma, kad Ce_6 įsiterpia į lipidinį KT dangalą (nupiešta nesilaikant mastelio) [91].

Nuo 2003 metų, kai buvo pasiūlyta KT ir FS apjungti į vieną kompleksą, nemažai pasiekta tokių kompleksų fizikiniuose ir cheminiuose tyrimuose, tačiau tik pastaraisiais metais pasirodė pirmieji KT-FS komplekso pritaikymo biologinėse sistemose tyrimai. Parodytas kvantinio taško ir aliuminio ftalocianino komplekso susikaupimas vėžinėse ląstelėse bei FRET mechanizmo inicijuota ląstelių žūtis [92, 93]. KT-Alfc kompleksas kaupėsi pūslelinėse struktūrose ląstelių viduje aplink branduolį. Vaizdinimo sistema buvo pritaikyta taip, jog KT emisija nufiltruojama 590-640 nm filtru, o Alfc emisija – 670-700 nm filtru. KT-Alfc lokalizacija ląstelėse nustatyta FL

kolokalizacijos (geltona) metodu (2.7.4 pav). Kombinuotas KT-Alfc poveikis ląstelėms buvo atliktas ląsteles inkubuojant 40 min su kompleksu ir šviečiant 12-51 J/cm² dozėmis 532 nm diodiniu lazeriu (taikant į KT sugertį). Matosi, jog KT-Alfc sukeltas fototoksinis poveikis yra ženkliai didesnis, nei tokios pačios koncentracijos gryno Alfc (2.7.4 pav).



2.7.4 pav. Kvantinio taško ir aliuminio ftalocianino komplekso kaupimasis ir poveikis vėžinėms ląstelėms. Vaizdinimas atliktas konfokaliniu mikroskopu, parenkant žalią pseudospalvą KT emisijai (A), raudoną – Alfc emisijai (B). Geltona spalva rodo abiejų medžiagų kolokalizaciją (C). (D) – KT, Alfc ir KT-Alfc sukeltas poveikis ląstelėms per FRET mechanizmą, šviečiant į KT sugertį su 532 nm diodiniu lazeriu [92, 93].

2.8. Kvantinių taškų toksiškumas

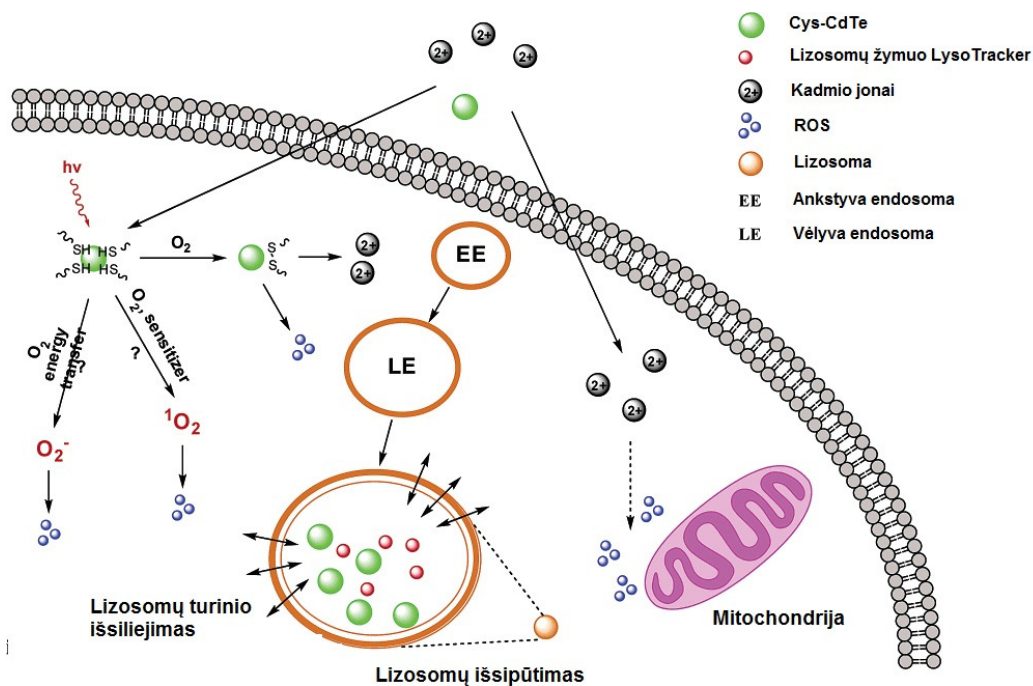
Patikrinus bet kurią mokslinių straipsnių paieškos sistemą, galima pastebėti, jog daugybė publikacijų yra skiriama kvantiniams taškams. Jų

taikymas neapsiriboja vien biologija ir medicina, šios nanodalelės taikomos vystant itin jautrius inovatyvius prietaisus, skirtus įvairioms cheminėms ir biologinėms medžiagoms aptikti [94]. Nors fizikinės ir cheminės KT savybės yra išsamiai ištyrinėtos, tačiau vis dar mažai žinoma apie galimą kenksmingą KT poveikį žmogaus sveikatai. Žinių apie KT toksiškumą trūkumas yra pagrindinė priežastis, kodėl KT vis dar nėra naudojami klinikiniuose tyrimuose.

KT toksiškumas biologinėje aplinkoje priklauso nuo labai daug veiksnių, į kuriuos reikia atsižvelgti: stabilumo, cheminio aktyvumo, pasiskirstymo, metabolizmo ir pasišalinimo iš organizmo [95]. KT biologinis poveikis priklauso ne vien tik nuo jų sunkiųjų metalų šerdies, kurių toksinis poveikis organizmams gerai žinomas [96]. Vis daugėja įrodymų, kad KT toksiškumas ir jų biologinis aktyvumas daug labiau priklauso nuo KT apvalkalo, o ne šerdies sudėties [97]. Be to, KT toksiškumas priklauso ir nuo jų dydžio, naudojamos dozės bei aplinkos sąlygų (oksidacinis, fotolizinis, mechaninis ar kitas poveikis gali sukelti KT destabilizaciją ir taip padidinti jų toksiškumą) [95].

Kai KT yra dengti dangalais, jų šerdies ir apvalkalo metalai neveikia tiriamų ląstelių, todėl labai svarbus aspektas, lemiantis KT toksiškumą, yra jų stabilumas tiek *in vivo*, tiek sintezės ir saugojimo metu. Mokslininko *Lovrić* tyrėjų grupė nustatė, jog MPA ir Cys dengti CdTe KT buvo toksiški PC12 ląstelėms, kai jos buvo veikiamos 10 µg/ml arba didesne koncentracija [98]. Tačiau MPA ir Cys suformuoti apvalkalai nėra stabilūs vandeninėje terpėje, dėl to negalima kalbėti apie visišką KT šerdies apsaugojimą [99]. Mokslininkas *Cho* ir jo kolegos 2007 metais aprašė toksišką CdTe KT poveikį žmogaus krūties vėžio ląstelėms MCF-7. Šias ląsteles veikiant 10 µg/ml CdTe KT, dengtais MPA ($\lambda_{em}=535$ nm), Cys ($\lambda_{em}=554$ nm) ir N-acetil-L-cisteinu ($\lambda_{em}=528$ nm), jau po 1 valandos poveikio buvo stebimas ryškus metabolinio ląstelių aktyvumo sumažėjimas. Po poveikio taip pat buvo stebima: chromatino agregacija ir deformacija, mitochondrijų bei lizosomų išsipūtimas, suapvalėjimas ir susitelkimas apie branduolį (2.8.1 pav). Stebimi pokyčiai

galėjo įvykti dėl ląstelės atsako į fotooksidacinį stresą ir toksiško Cd^{2+} jonų poveikio. Būtent Cd^{2+} jonai gali sukelti lizosomų išsipūtimą ir net trūkimą, jų turinio išsiliejimą į ląstelės vidų. Fotooksidacija galėjo būti sukelta laisvų Cd^{2+} jonų arba pačių KT poveikio [100]. Mokslininkas *Liu* su kolegomis tyrė toksišką CdTe-TGA KT poveikį žmogaus krūties vėžio MCF-7 ir MBA-MD-231 bei prostatos vėžio PC3 ląstelėms. Po 24-48 valandų ląstelių inkubacijos su 5-100 μM koncentracijos KT buvo stebimas nuo dozės ir inkubacijos laiko priklausantis ląstelių gyvybingumo mažėjimas [101].



2.8.1 pav. CdTe-Cys KT sukulto toksiškumo galimi mechanizmai. Schema nubraižyta pagal *Cho* ir jo kolegų morfologinius pastebėjimus ir samprotavimus remiantis kitų mokslininkų rezultatais. Rodyklėmis pažymėtos galimos cheminės reakcijos, vedančios link kadmio jonų išlaisvinimo arba ROS generacijos [100].

Bėgant laikui buvo patobulintas KT šerdies apdengimas. Nestabilūs MPA ir Cys ligandai buvo keičiami į PEG, AMP ir AML. Polimerai ir lipidai pagerino ne tik KT optines savybės, bet ir jų biosuderinamumą su gyvais organizmais. Mokslininkas *Sun* su savo tyrimų grupe naudojo komerciškai

įsigytus *Qtracker*TM 800 KT gyvų ląstelių vaizdinimui ir sekimui. Jie parodė, jog vaizdinimui naudotos KT koncentracijos nepaveikė ląstelių gyvybingumo, proliferacijos, kolonijų formavimo bei auglių formavimo pelėse [102]. Naudodami panašios serijos KT, *Muller-Borer* su kolegomis tyrė KT poveikį žiurkių mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, žymėdami jas 5 nM ir 20 nM koncentracijų KT. Mokslininkai nepastebėjo, jog KT veiktų proliferaciją, gyvybingumą ar sukeltų DNR pažaidas [103]. Kvantiniais taškais pažymėtos kamieninės ląstelės rodė gebėjimą sąveikauti su širdies miocitais *in vitro*. Tiesa, 20 nM koncentracijos KT rodė nedidelį apoptozės išstiktų ląstelių pagausėjimą, kai buvo atlikta 120 valandų inkubacija. Tačiau toks inkubacijos laikas nėra logiškas, nes KT susikaupia ląstelėse per pirmas 24 valandas [103]. Pasitaiko ir daugiau duomenų, kuriuose toksiškumas buvo vertintas parenkant gana “nepraktiškas” sąlygas: panaudojant labai dideles KT koncentracijas (siekiančias virš 100 nM) arba ilgas inkubacijos trukmes (daugiau nei kelios dienos) [104]. Tokio pobūdžio tyrimuose neretai aptinkama, jog KT sukelia vienokį ar kitokį biologinių funkcijų sutrikdymą. Tačiau tyrimuose, kuriuose KT koncentracijos bei inkubacijos trukmės parenkamos tokios, jog tikėtų vaizdinimo ir sekimo eksperimentams, dažnai neaptinkama jokių šalutinių efektų. Mokslininkas *Peng* su kolegomis tyrinėjo net kelių dydžių AML ir PEG dengtus 10-100 nM koncentracijų KT HepG2 ląstelėse, matavo jų oksidacinį stresą, DNR pažaidas, gyvybingumą, proliferaciją bei morfologinius pokyčius, tačiau visi parametrai buvo panašūs į kontrolinių, nepaveiktų ląstelių parametrus [105].

In vivo KT toksiškumo eksperimentai atskleidė, jog ZnS, AML ir AMP dengti KT neturi žymaus toksinio poveikio pelių, žiurkių ir primatų organizmams [106]. Jų svoris, elgsena, kraujo parametrai buvo palyginami su nepaveikta kontroline gyvūnų grupe, tačiau atliktas išsamesnis atskirų organų metalų analizės tyrimas parodė, jog KT nepasišalina iš organizmo, “užstringa” blužnyje, kepenyse, inkstuose [106]. Dažniausiai pasitaikanti tyrimų trukmė buvo 28-90 dienos, todėl nepakanka duomenų, jog būtų galima įvertinti, ar

laikui bėgant organuose „užstrigę“ KT nepradės irti išleisdami toksiškus sunkiuosius metalus.

3. MEDŽIAGOS IR METODAI

3.1. Medžiagos

Kiaušidžių karcinoma (A2780) bei kasos (MiaPaCa2) ir krūties (MCF-7) adenokarcinomos ląstelių linijos įsigytos iš Europos ląstelių kultūrų kolekcijos. Prostatos adenokarcinomos (PC3), glioblastomos (U87) ir krūties adenokarcinomos (MDA-MB-231) ląstelių linijos įsigytos iš Amerikos ląstelių kultūrų kolekcijos. Melanomos (FEMX-I) ląstelės 1980 metais buvo išskirtos iš Norvegijos Radžio ligoninėje besigydančio paciento, kuriam buvo nustatytos metastazės limfmazgių audiniuose [107]. CdTe-MPA KT įsigyti iš *PlasmaChem GmbH* (Vokietija), jų emisijos smailė $\lambda_{maks} = 710 \pm 5$ nm. CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT įsigyti iš *Life Technologies* (JAV), jų emisijos smailė $\lambda_{maks} = 705 \pm 5$ nm. Kvantinio taško ir sensibilizatoriaus komplekso formavimui buvo naudojami CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT (*eBioscience*, JAV), kurių emisijos smailė ties 605 nm, ir chlorinas e_6 (*Frontier Scientific Inc.*, JAV). Selektyviam nanodarinių kaupimuisi krūties vėžinėse kamieninėse ląstelėse buvo naudojamas anti-CD44-KT konjugatas (*eBioscience*, JAV), sudarytas iš antikūno prieš CD44 paviršinį antigeną ir CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT.

3.2. Ląstelių auginimas

Ląstelės auginamos standartinėmis sąlygomis (37 °C , 5 % CO₂) 25/75 cm² flakonėliuose arba plastikinėse 6/12/96 šulinėlių plokštelėse, užpildtos mitybine terpe RPMI arba DMEM (*Gibco*, JAV), papildytą 2 mM l-alanyl-glutamino (*Biochrom*, Vokietija), 10 % jaučio serumo (*Gibco*, JAV) ir 1 % (10000 U/10000 µg/ml) penicilino/streptomicino (*Biochrom*, Vokietija). Gliomos ląstelių auginimo terpė papildoma 3 % MEM pakeičiamų amino rūgščių (*Sigma-Aldrich*, JAV). Ląstelės auginamos iki kol užpildo ~90 % paviršiaus ploto, tuomet yra persėjamos eksperimentams.

3.3. Vėžinių ląstelių kamieniškumo įvertinimas

Ląstelių paviršiaus antigenų CD44, CD133, CD24, CD117, ALDH1, EpCAM raiška tiriama tėkmės citometrijos metodu su pasirinktais antikūno-fluorochromo žymenimis. Ląstelių imunofenotipavimo procedūra: ląstelės šulinėliuose paveikiamos 0,25% (*Biochrom*, Vokietija) tripsino-EDTA tirpalu, gauta suspensija surenkama į mėgintuvėlį ir nusodinama centrifuguojant 7 min, 1029 aps./min greičiu, 20 °C temperatūroje (*ROTIXA 50 RS*, rotoriaus spindulys 211 mm). Ląstelės pakartotinai plaunamos užpilant 1 ml PBS, centrifuguojant. Pašalinus supernatantą atliekamas žymėjimas antikūno-fluorochromo konjugatais pagal gamintojo protokolą [108, 109]. Po inkubacijos neprisijungę prie membranų žymenys nuplaunami centrifuguojant. Ląstelių fluorescencija registruojama *BD™ LSR II* arba *BD™ FACSort* tėkmės citometru. Likus 2-3 min iki imunofenotipinės analizės, į kiekvieną ląstelių mėginį įlašinama propidžio jodido dažo (fluorescencijos spektras raudonoje srityje), kuris per kelias sekundes patenka į žuvasias ląsteles. Analizės metu ryškiai raudonai švytinčios ląstelės atmetamos kaip negyvos, didesniu priekinės sklaidos signalo plokčiu pasižyminčios ląstelės atmetamos kaip sukibusios [110]. Vienam mėginiui surenkama 10 000 – 20 000 ląstelių. Duomenys analizuojami *FlowJo* (JAV) programine įranga.

FEMX-I ląstelių rūšiavimas atliekamas *BD™ FACSort* tėkmės citometru, Norvegijos vėžio tyrimų institute, Radžio ligoninėje. Ląstelės auginamos 75 cm² flakonuose, vėliau suspenduojamos, dažomos anti-CD44-FITC ir anti-CD133-PE žymenimis pagal anksčiau išdėstytą metodiką. Po rūšiavimo viena dalis ląstelių užsėjamos į plokšteles, kita dalis – į 25 cm² flakonėlius tolimesniam auginimui. Gebėjimas atstatyti prieš rūšiavimą buvusią pradinę imunofenotipinę sudėtį įvertinamas atliekant tėkmės citometriją praėjus 10 dienų po rūšiavimo. Iškart po rūšiavimo subpopuliacijų grynumas siekė >90 %.

Jautrumo jonizuojančios spinduliuotės poveikiui tyrimams FEMX-I ląstelės užsėjamos į 6 šulinėlių plokšteles. Ląstelėms prisiplastavus prie dugno (apytiksliai po 24 val.), atliekamas 7 Gy ir 10 Gy švitinimas rentgeno aparatu

(Norvegijos vėžio tyrimų institutas, Radžio ligoninė). Praėjus 24 val. po švitinimo atliekamas imunofenotipavimas su antiCD44-FITC ir antiCD133-PE žymenimis.

Jautrumo chemoterapinio vaisto doksorubicino poveikiui nustatyti MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės užsėjamos į 96 šulinėlių plokšteles. Po 24 valandų ląstelių augimo terpė išsiurbiama, ant ląstelių užpilama šviežia terpė su joje ištirpintu 0-0,5 µg/ml chemoterapiniu vaistu doksorubicinu. Inkubacija atliekama 72 val., vėliau terpė su vaistais nusiurbiama, ląstelės praplaunamos su DPBS, užpilama šviežia terpė ir 50 µl XTT druskų tirpalo. Ląstelėse esanti mitochondrijų dehidrogenazė verčia tetrazolo XTT druską į spalvą turintį junginį – formazaną. Mitochondrijų dehidrogenazės fermentas yra aktyvus tik gyvose ląstelėse, kurių plazminė membrana ir mitochondrijų kvėpavimo grandinė nepažeistos [111]. Spalvoto formazano sugertis ties 490 nm nuskaitoma plokštelių skaitytuvu *Biotek ELx800™* (JAV). Ląstelių gyvybingumas nubraižomas kaip procento dalis nuo kontrolinių, nepaveiktų ląstelių sugerties:

$$\text{Gyvybingumas} = \frac{A_{\text{eksp}} \cdot 100\%}{A_{\text{kontr}}};$$

Kur A_{eksp} – doksorubicinu paveikto bandinio optinis tankis, matuojant ties 490 nm; A_{kontr} – kontrolinio (nepaveikto) bandinio optinis tankis, matuojant ties 490 nm. Paklaidos atidedamos kaip standartinis nuokrypis iš 6 nepriklausomų bandinių.

Ląstelių gebėjimas formuoti kolonijas įvertinamas standartiniu kolonijų formavimo metodu [112]: į 6 šulinėlių plokštelę užsėjama po 400 ląstelių/šulinėlyje, po ~10 dienų auginimo standartinėmis sąlygomis, kai ląstelės suformuoja kolonijas (iš ne mažiau kaip 40 ląstelių), kolonijos fiksuojamos. Fiksavimo procedūra: ląstelės praplaunamos 1 ml PBS tirpalu, tuomet 10 min inkubuojamos su 70% ir 10 min su 96% etanoliu. Pašalinus etanolį plokštelė išdžiovinama ir ląstelės nakčiai užpilamos 1 ml 0,4% kristalinio violeto dažu (*Carl Roth*, Vokietija). Vėliau kristalinis violetas

nuplaunamas, kolonijos suskaičiuojamos. Kolonijų formavimo efektyvumas skaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Efektyvumas} = \frac{\text{Suformuotų kolonijų skaičius}}{\text{Užsėtų ląstelių skaičius}} \cdot 100\%;$$

Paklaidos atidedamos kaip standartinis nuokrypis iš 3 nepriklausomų bandinių.

3.4. Žmogaus vėžinių ląstelių naviko formavimas Rag2 pelėse

Rag2 linijos imunodeficitinės pelės gautos iš Laboratorinių gyvūnų veisimo, auginimo ir tyrimo centro (Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras). Eksperimentams buvo gautas Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas Nr. 0190 (išduotas 2009-03-23) atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais. Visi veiksmai su gyvūnais buvo atliekami laikantis Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES. Gyvūnai buvo laikomi pastovios temperatūros, drėgnumo ir apšvietimo ciklo (12 val. šviesos/12 val. tamsos) sąlygomis. Maisto ir švaraus vandens buvo tiekama neribotai. Prieš atliekant eksperimentus gyvūnai buvo aklimatizuojami ne mažiau kaip 7 dienas. Su gyvais gyvūnais dirbo FELASA C kategoriją turinti specialistė.

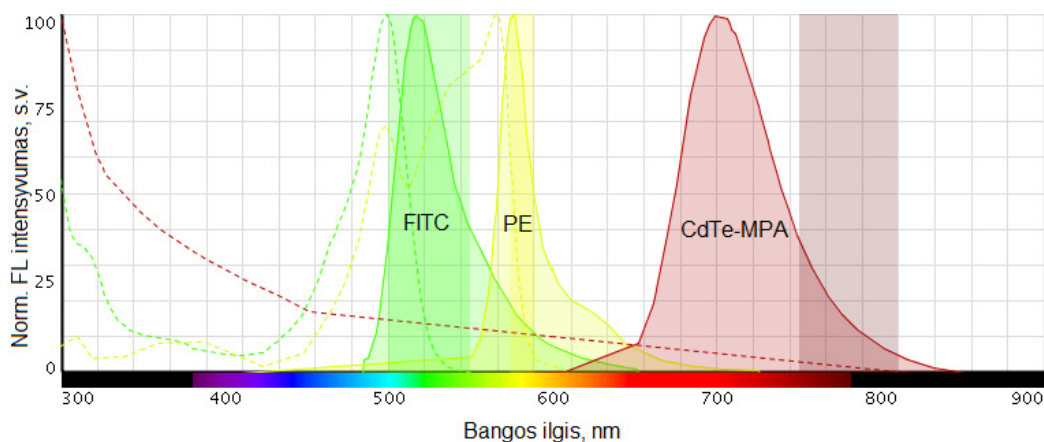
MiaPaCa2 ir A2780 ląstelių gebėjimas formuoti navikus imunodeficitinėse pelėse buvo atliekamas pagal literatūroje aprašytą metodiką [113]. Milijonas ląstelių buvo įskiepyta pelėms į poodį. Navikas auginamas iki kol pasieks apytiksliai 1 cm² tūrį. Pasiekus reikiamą naviko tūrį pelės buvo žudomos, išpreparuojami suformuoti navikai.

MiaPaCa2 suformuoti navikai buvo siunčiami Valstybiniam patologijos centrui, kur buvo atliekamos standartinės bandinių paruošimo procedūros: jie buvo šaldomi kriostatu iki ~240 K ir atliekami 20 μm storio pjūviai. Vėliau ploni naviko bandiniai dažomi anti-CD44-FITC žymenimis ir branduolių dažu Hoechst 33258, atliekama jų fluorescencinė mikroskopija. Siekiant įvertinti audinio morfologiją, dalis naviko audinių buvo dažomi hematoksilino-eozino dažu.

A2780 ląstelių suformuoti navikai smulkinami iki pavienių ląstelių suspensijos mechanškai dezagreguojant. Ląstelių suspensija dėl mažo gyvybingumo buvo auginama standartinėmis A2780 ląstelių kultivavimo sąlygomis atgaivinimo laikotarpiui. Po 8 parų atliekama imunofenotipinė analizė pasirenkant ant-CD44-FITC, anti-CD24-FITC, anti-ESA-PE ir anti-CD117-PE žymenis.

3.5. Kvantinių taškų kaupimasis ir poveikis vėžinėms ląstelėms

CdTe-MPA KT susikaupimas FEMX-I ląstelėse buvo vertinamas tėkmės citometru *BD™ LSR II*. Ląstelės užsėjamos į 6 šulinėlių plokštelę ir po 24 valandų sena terpė keičiama į šviežią terpę su ištirpintais 50 µg/ml (25 nM) ir 100 µg/ml (50 nM) koncentracijų CdTe-MPA KT. Inkubuojama 24 val., tuomet terpė su nanodalelėmis pašalinama, ląstelės suspenduojamos, atliekamas ląstelių imunofenotipavimas su anti-CD44-FITC ir anti-CD133-PE žymenimis. Parenkami tėkmės citometro filtrai visų naudojamų dažų ir nanodalelių FL registruoti (3.5.1 pav.). Negyvos ląstelės „išmetamos“ iš analizės pagal propidžio jodido signalą.



3.5.1 pav. Tėkmės citometro *BD™ LSR II* filtrų pralaidumo juostos (žalias, geltonas, violetinis stačiakampiai) ir FITC, PE, CdTe-MPA FL žadinimo (punktyrinė linija) ir emisijos spektrai (ištisinė linija).

CdTe-MPA ir CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT susikaupimas A2780 ir MiaPaCa2 ląstelėse buvo vertinamas tėkmės citometru *BD™ FACSort* ir

lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu *Nikon Eclipse C1si* (Japonija). Tėkmės citometrijos matavimams ląstelės buvo užsėjamos į 12 šulinėlių plokšteles. Po 24 valandų sena terpė keičiama į šviežią terpę su ištirpintais CdTe-MPA KT (5 nM ir 25 nM) ir CdSe/ZnS-(AMP)-COOH (5 nM ir 40 nM) KT, atliekama 24 valandų inkubacija. Po inkubacijos, terpė su KT nusiurbama, ląstelės suspenduojamos, praplaunamos su 1 ml PBS centrifuguojant ir analizuojamos tėkmės citometru. Negyvos ląstelės atmetamos pagal propidžio jodido fluorescenciją. Mikroskopijos matavimams ląstelės užsėjamos į 8 šulinėlių mikroskopavimui skirtas *Nunc™ Lab-Tek™* (*Thermo Scientific*, JAV) plokšteles. Po 24 valandų sena terpė keičiama į šviežią terpę su ištirpintais CdTe-MPA KT (25 nM) ir CdSe/ZnS-(AMP)-COOH (40 nM) KT, inkubuojama 24 valandas. Po inkubacijos ląstelės praplaunamos 2 kartus DPBS, užpilama šviežia terpė ir atliekamas vaizdinimas lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu su x60/1,4 *Plan Apo VC oil* objektyvu. Fluorescencijos žadinimui naudojamas argono dujų lazeris, $\lambda_{\text{zad}}=488$ nm. Detekcijai naudojami standartiniai trijų spalvų (filtrų pralaidumo sritys: 433-467 nm; 500-590 nm; 620-755 nm) PMT detektoriai.

KT poveikio MiaPaCa2 ir A2780 įvertinimui buvo pasirinktos 2 metodikos: gyvybingumo ir proliferacijos vertinimas automatinio ląstelių skaičiuotuvu *ADAM-MC* (*NanoEnTek Inc.*, Pietų Korėjos Respublika) ir išgyvenimo vertinimas anksčiau aprašytu kolonijų metodu (žr. 3.3. skyrelį). Gyvybingumo ir proliferacijos vertinimui ląstelės buvo užsėtos į 12 šulinėlių plokšteles. Po 24 valandų sena terpė keičiama į šviežią terpę su ištirpintais CdTe-MPA KT (5 nM ir 25 nM) ir CdSe/ZnS-(AMP)-COOH (5 nM ir 40 nM) KT, atliekama 24 valandų inkubacija. Po inkubacijos, terpė su KT nusiurbama, ląstelės suspenduojamos, praplaunamos su 1 ml PBS centrifuguojant, suspenduojamos 100 μ l tūryje ir analizuojamos automatinio skaičiuotuvu. Skaičiuotuvo veikimo principas: žinomame tūryje suspenduotos ląstelės veikiamos reagentu, kurio sudėtyje yra propidžio jodido, ir membraną lizuojančios medžiagos. Paveiktos ląstelės yra įšvirkščiamos į plokštelę, kurioje jos pasiskirsto monosluoksniu. Tada prietaisas automatiškai

suskaičiuoja fluorescuojančių branduolių skaičių ir taip nustato ląstelių koncentraciją tirpale. Žuvusios ląstelės yra suskaičiuojamos analogiškai, tačiau nenaudojamas membraną lizuojantis reagentas, todėl propidžio jodidas į gyvas ląsteles nepatenka. Gyvybingumas apskaičiuojamas:

$$\text{Gyvybingumas} = \frac{\text{Ląstelės} - \text{Žuvusios ląstelės}}{\text{Ląstelės}} \cdot 100\%;$$

Kur *Ląstelės* – suskaičiuotas bendras visų ląstelių skaičius. Paklaidos atidedamos kaip standartinis nuokrypis iš dviejų nepriklausomų bandinių.

A2780 ląstelių morfologiniai vaizdai plokštelėse po inkubacijos su CdTe-MPA KT matuojami pralaidumo mikroskopu *Nikon Eclipse TE2000* su x10/0,25 *Plan Fluor* objektyvu. Pralaidumo mikroskopijos vaizdai registruojami *Leica DFC-290* RGB CCD kamera. Vaizdai apdoroti *ImageJ 1.43* programine iranga.

3.6. Nuostovioji ir kinetinė kvantinio taško ir chlorino e₆ kompleksio spektroskopija

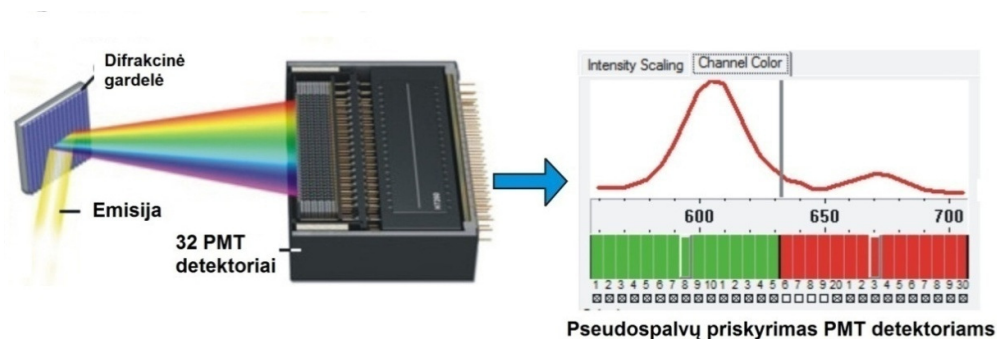
Visuose tirpalų sugerties, fluorescencijos bei fluorescencijos gesimo kinetikų eksperimentuose buvo naudotos plastikinės kiuvetės, kurių optinis kelias 1 cm. Sugerties spektrai registruojami *Cary 50* spektrofotometru (*Varian, JAV*), 350 – 750 nm srityje. Fluorescencijos spektrai registruojami *Cary Eclipse* fluorimetru (*Varian, JAV*), žadinant 470 nm bangos ilgio spinduliuote. Fluorescencijos gesimo kinetikos matuojamos fluorimetru *FLS920* (*Edinburgh Instrument, JK*), naudojant laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo metodiką [114]. Žadinimui buvo naudoti 405 nm, 490 nm impulsiniai šviesos diodai. Kinetikų analizei buvo naudotos *FAST* (*Edinburgh Instrument, JK*) ir *OriginPro8* (*OriginLab, JAV*) programinės įrangos. FL gesimo kinetikos aproksimuojamos, naudojant trijų eksponenčių FL gesimo modelį. O vidutinė molekulių sužadintos būsenos gyvavimo trukmė įvertinama naudojant išraišką [114]:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i B_i \tau_i^2}{\sum_i B_i \tau_i}$$

Kur τ_i – vidutinė gyvavimo trukmė, B_i – komponentių amplitudė pradinio laiko momentu ($t = 0$), i – komponentės numeris.

3.7. Kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso spektrinis ir gyvavimo trukmių vaizdinimas MiaPaCa2 vėžinėse ląstelėse

Mikroskopijos eksperimentams ląstelės paruošiamos pagal 3.5 skyrelyje aprašytą metodiką. Po 24 valandų sena terpė keičiama į DPBS su ištirpintais CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT ($0.2 \mu\text{M}$), Ce_6 ($1 \mu\text{M}$) ir KT- Ce_6 (molinis santykis 1:5), inkubuojama 3 val. Po inkubacijos ląstelės praplaunamos 2 kartus DPBS, užpilama šviežia DPBS terpė ir atliekamas vaizdinimas lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu su $\times 60/1,4 \text{ Plan Apo VC oil}$ objektyvu. Fluorescencijos žadinimui naudojamas argono dujų lazeris, $\lambda_{\text{žad}}=488 \text{ nm}$. Fluorescencijos detekcijai naudojamas spektrinis priedas, difrakcine gardele

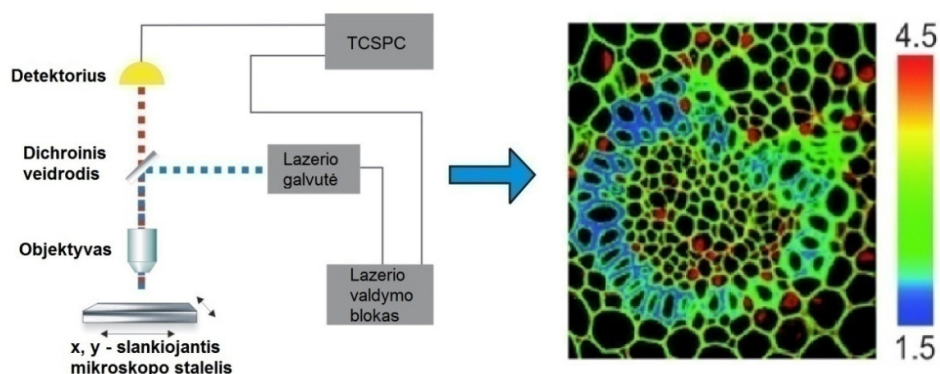


3.7.1 pav. *Nikon C1si* konfokalinio mikroskopo spektrinio priedo veikimo principas. Bandinio emisija yra nukreipiama į difrakcinę gardelę, kuri nukreipia šviesą skirtingu kampu, priklausomai nuo jos bangos ilgio (**kairėje**). Išskaidyta šviesa detektuojama 32 PMT detektoriais. Programinės įrangos *EZ-C1 3.80* pagalba užregistruotam spektrui priskiriama pseudo spalva, susieta su PMT detektoriais: KT emisijai priskiriama žalia spalva (580-630 nm), Ce_6 – raudona spalva (656-710 nm) (**dešinėje**). Priskirtos spalvos matomos mikroskopijos vaizduose (žr. Rezultatai ir jų aptarimas) [115].

išskaidantis emisiją pagal bangos ilgus ir nukreipiantis į 32 PMT detektorius. Tokiu būdu iš kiekvieno nuskanuoto taško nubraižomas emisijos spektras, o

vaizdų analizei KT ir Ce_6 emisijai priskiriamos atitinkamai 580-630 nm (žalia) ir 656-710 nm (raudona) pseudospalvos (3.7.1 pav). Toks vaizdinimas yra ženkliai tikslesnis, prisitaikantis prie fluorochromų spektrų, leidžiantis išvengti klaidingą interpretaciją sukeliančio emisijos signalo „nutekėjimo“ į gretimus detektorius. O užregistruoti spektrai neša papildomą informaciją apie fluorochromų sąveiką su aplinka.

Gyvavimo trukmių vaizdinimas atliekamas mikroskopo priedu *Lifetime and FCS Upgrade (PicoQuant GmbH, Vokietija)*. Jo schema pateikta 3.7.2 paveiksle. Bandinys žadinamas 404 nm impulsiniu diodiniu lazeriu, kurio pasikartojimo dažnis 10 MHz. Siekiant užregistruoti vien tik KT FL, fluorescencijos signalas nufiltruojamas juostiniu 525-630 nm filtru. Fotonai užregistruojami ir suskaičiuojami laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiuotuvu *PicoHarp 300 (PicoQuant GmbH, Vokietija)*. Bandinio skenavimas pataškiui kontroliuojamas *Nikon C1si* lazerinės skenuojančios konfokalinės mikroskopijos sistemos. FLIM vaizdai analizuojami *SymPhoTime* programine įranga (*PicoQuant GmbH, Vokietija*). Vid.gyvavimo trukmių ($\langle\tau\rangle$) histogramos braižomos iš visų paveikslėlyje užregistruotų $\langle\tau\rangle$, o FLIM vaizduose esančios skirtingos spalvos rodo skirtingas gyvavimo



3.7.2 pav. Gyvavimo trukmių vaizdinimui skirtų priedų schema (kairėje) ir pavyzdinis FLIM vaizdas, kuriame spalvos reiškia konkrečias gyvavimo trukmes (dešinėje). Gyvavimo trukmių skalė pateikta paveikslo dešinėje [116].

trukmės. Fluorochromo gyvavimo trukmė – parametras, rodantis sąveiką su supančia aplinka. Ląstelėse gausu įvairių baltymų, lipidų, todėl yra labai svarbu įvertinti gyvavimo trukmę, ypač nagrinėjant donoro-akceptorius (KT-Ce₆) sistemą.

3.8. Kvantinio taško ir chlorino e₆ komplekso fotosensibilizacinis poveikis MiaPaCa2 vėžinėms ląstelėms

Ląstelės paruošiamos mikroskopijai kaip anksčiau buvo aprašyta 3.5 ir 3.7 skyreliuose. Naudojamos 20 kartų mažesnės KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ koncentracijos. Po inkubacijos ląstelės perkeliamos į specialų, plokštelėms pritaiktą inkubatorių *Microscope Stage Incubation System (OkoLab, Italija)*. Tuomet, įstačius 470±5 nm juostinį filtrą, ląstelės švitinamos MAX-302 (*Asahi Spectra CO., Ltd, Japonija*) šviesos šaltiniu. 470 nm šviesa pasirinkta siekiant sužadinti Ce₆ netiesiogiai, o per KT energijos pernašą. Šviesos galia ties šulinėlio dugno apačia siekė 33 mW/cm². Kiekvienas šulinėlis buvo švitinimas 9 minutes, todėl šviesos dozė siekė ~18 J/cm². Gyvybingumas buvo matuojamas praėjus 20 valandų po švitinimo. Ant ląstelių užlašinamas 5 µg/ml propidžio jodido tirpalas ir registruojami šviesiniai ir fluorescenciniai mikroskopiniai vaizdai su anksčiau aprašyta *Nikon CIsi* lazerine skenuojančia konfokaline sistema.

Siekiant įvertinti kiekybinį fotosensibilizacinį poveikį ląstelės buvo užsėtos į 96 šulinėlių plokšteles. Inkubacija su KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ bei švitinimas atlikti kaip anksčiau aprašyta. Praėjus 24 valandoms po švitinimo, ląstelės užpilamos aktyvuotu XTT druskų tirpalu (*Biological Industries, Izraelis*) pagal gamintojo protokolą : 50 µl aktyvuoto tirpalo užpilama ant 100 µl ląstelių mitybinės terpės. Inkubacija su druskomis vykdoma 4 valandas, iškart po to pasikeitusi terpės spalva nuskaitoma plokštelių skaitytuvu (*BioTek Industries Inc., JAV*). Statistinė analizė atlikta apskaičiuojant standartinį nuokrypį. Reikšmingumo lygmuo įvertinamas *Studento T-testu*, apskaičiuojant gautų verčių pasikliautinių intervalų persiklojimą tarpusavyje. Visi skaičiavimai atlikti naudojant *Excel* programinę įrangą.

3.9. Kvantinio taško ir anti-CD44-KT konjugato kaupimasis MCF-7 ir MDA-MB-231 vėžinėse ląstelėse

MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės paruošiamos mikroskopijai kaip anksčiau buvo aprašyta 3.5 skyrelyje. Po 24 valandų sena terpė keičiama į šviežią su joje ištirpintais CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT (0,05 μ M). Inkubacija atliekama 24, 6 ir 3 valandas, vėliau mėginiai fiksuojami. Ląstelių fiksavimas ir ruošimas mikroskopijai atliekamas pagal adaptuotą *Schnell* protokolą [117]. Ląstelės kelis kartus atsargiai praplaunamos DPBS stengiantis neatkabinti jų nuo plokštelės dugno. Užfiksavimui 15 min ląstelės veikiamos 4% PFA tirpalu ir po to 4 min jų membranos permeabilizuojamos naudojant 0,2% *Triton X-100* (*Fluka*, JAV) tirpalą. Vėliau 20 min blokuojamos 1% JSA tirpalu. Po blokavimo ląstelės 20 min paveikiamos faloidino tirpalu ląstelės citoskeletui (F-aktinui) nudažyti. Metanolinis faloidino tirpalas iki reikiamos koncentracijos skiedžiamas 1% JSA tirpalu. Nudažius faloidinu ląstelės 30 min inkubuojamos 10 μ g/ml branduolių žymeniu *Hoechst* 33428. Po kiekvieno fiksavimo žingsnio ląstelės kelis kartus praplaunamos PBS. Po fiksavimo procedūros ląstelės suvilgomos klijavimo ir tvirtinimo terpe *QMountTM* (*Life Technologies*, JAV) ir uždengiamos dengiamuoju stikleliu.

Inkubacijai su anti-CD44-KT konjugatu, MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės paruošiamos kaip anksčiau buvo aprašyta 3.5 skyrelyje. Po 24 valandų terpė nusiurbama ir užpilama 100 μ l DPBS, su jame ištirpintais 20 μ l anti-CD44-KT arba 20 μ l anti-CD44-FITC. Po 30 min inkubacijos ląstelės praplaunamos DPBS ir 30 min inkubuojamos 10 μ g/ml branduolių žymeniu *Hoechst* 33258. Po inkubacijos ląstelės praplaunamos ir vaizdinamos su lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu 2 kartus – iškart po 30 minučių inkubacijos ir praėjus 24 valandoms.

Vaizdinimas atliekamas su anksčiau aprašyta *Nikon C1si* lazerine skenuojančia konfokaline sistema. *Hoechst* 33258 sužadinimui naudojamas 405 diodinis lazeris, emisija registruojama PMT detektoriais, panaudojant 433-467 nm juostinį filtrą. Faloidino ir FITC sužadinimui naudojamas 488 nm

argono jonų lazeris, emisija registruojama panaudojant 500-530 nm filtrą. KT sužaditimui naudojamas 405 nm lazeris, emisija registruojama, panaudojant 569-640 nm juostinį filtrą. Siekiant išvengti signalų patekimo į gretimus detektorius, buvo naudojama *Frame Lambda* funkcija, leidžianti vienu metu įjungti tik vieną pasirinktą lazerį ir vieną norimą detektorių. Kiti lazeriai ir detektoriai matavimo metu išjungiami, todėl, arba pašaliniai fluoroforai nėra sužadunami, arba į kanalus nukreipta pašalinė emisija nėra registruojama.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. Vėžinių kamieninių ląstelių aptikimas

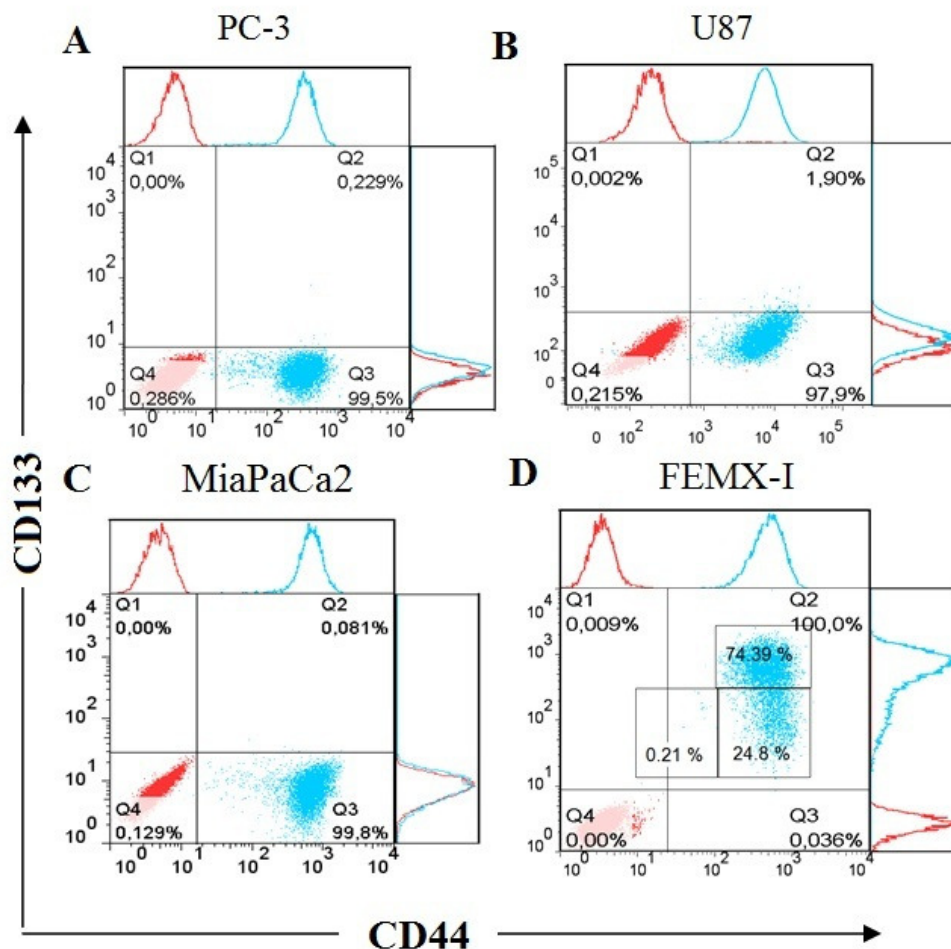
Vėžinių kamieninių ląstelių aptikimas yra gana sudėtingas, daugelio metodų reikalaujantis procesas. Kadangi vėžinės kamieninės ląstelės pasižymi tam tikromis unikaliosiomis savybėmis, šių savybių įvertinimas ir yra laikomas standartu moksliniuose tyrimuose. Pirmiausia yra ištiriamas ląstelių imunofenotipas bei heterogeniškumas pagal paviršiaus antigenų raišką. Tam naudojami molekuliniai žymenys, kurie mokslinėje literatūroje yra pastebėti ir įvardijami kaip galimi vėžinių kamieninių ląstelių žymenys. Pagal imunofenotipą ląstelės yra suskirstomos į subpopuliacijas, išrūšiuojamos. Tuomet tikrinamas išrūšiuotų subpopuliacijų gebėjimas atkurti pradinę savo imunofenotipinę sudėtį, atsparumas jonizuojančiai spinduliutei bei chemoterapiniams vaistams. Taip pat gebėjimas formuoti kolonijas. Galiausiai išrenkama subpopuliacija, kuri pasižymi visomis anksčiau išvardintomis savybėmis, o ją žymintys molekuliniai žymenys priskiriami kaip galimi vėžinių kamieninių ląstelių žymenys.

4.1.1. CD44 ir CD133 paviršiaus antigenų raiška žmogaus vėžinių ląstelių linijose

Tyrimams buvo pasirinktos keturios skirtingos žmogaus ląstelių linijos: glioblastomos (U87), prostatos adenokarcinomos (PC-3), kasos adenokarcinomos (MiaPaCa2) ir melanomos (FEMXI) ląstelės. Tėkmės citometrijos metodu buvo ištirtas ląstelių heterogeniškumas naudojant du literatūroje skelbiamus vėžinių kamieninių ląstelių žymenis: anti-CD44 ir anti-CD133 [12, 14].

Visose tirtose ląstelių linijose aptikta didelė CD44 paviršiaus antigeną ekspresuojančių ląstelių procento dalis, svyruojanti nuo 96,2% iki 99,9% (4.1.1.1 pav.), tačiau CD133 ekspresija yra labai silpna: vos 0,001–0,23% MiaPaCa2 ir PC-3 ląstelių pasižymi šio baltymo ekspresija. Šiek tiek didesnė dalis CD133 ekspresuojančių ląstelių aptikta U87 linijoje (1,94%, 4.1.1.1 pav.

B). Pagal CD133 paviršinio antigeno ekspresiją išsiskyrė FEMX-I ląstelės, jose šio baltymo raiška būdinga net 99% ląstelių populiacijos (4.1.1.1 pav. D). Taigi, FEMX-I ląstelės, skirtingai nei prieš tai aptartos ląstelės, ekspresuoja ne tik daug CD44 baltymo (99,9 % ląstelių), bet ir daug CD133 baltymo (99,1 % ląstelių). Žymenų anti-CD44-PE ir anti-CD44-FITC signalai 100-1000 kartų ryškesni už autofluorescencijos signalą, todėl yra patikimi.



4.1.1.1 pav. Membranos paviršiaus antigenų CD133 ir CD44 ekspresija skirtingose žmogaus vėžinėse ląstelėse: prostatos adenokarcinoma (A), glioblastoma (B), kasos adenokarcinoma (C) ir melanoma (D). Procentai nurodo į apibrėžtą stačiakampį patenkančių ląstelių sudaromą procentinę dalį.

Ląstelių heterogeniškumą galima apibūdinti ne tik tiriant, kurie žymenys jungiasi prie ląstelių membranos, bet taip pat ir įvertinant, kokie šių

žymenų ekspresijos kiekiai būdingi kiekvienai ląstelei. Tai įvertinti mums leidžia prisijungusių anti-CD44-FITC ir anti-CD133-PE žymenų fluorescencijos intensyvumas, kuris yra proporcingas membranoje esančių antigenų kiekiui. Pagal fluorescencijos intensyvumą 4.1.1.1 paveiksle matyti, jog kiekvienai ląstelių linijai būdingas tam tikras taškinės diagramos erdvinis išsidėstymas, kuris toliau bus vadinamas *imunofenotipiniu profiliu*. U87 ląstelių taškinė diagrama yra vienalytė, įstriža, ovalo formos (4.1.1.1 pav. B), o PC-3 (4.1.1.1 pav. A) ir MiaPaCa2 (4.1.1.1 pav. C) ląstelių taškinės diagramos susideda iš dviejų populiacijų: skritulio formos tankaus debesies, esančio didesnių fluorescencijos intensyvumų pusėje ($CD44^{daug}$) ir blyškesnio ovalo formos debesies, esančio mažesnių fluorescencijos intensyvumų pusėje, dalinai persiklojančio su autofluorescencija ($CD44^{mažai/-}$). Pažvelgus į FEMX-I ląstelių imunofenotipinį profilį, galima išskirti net 3 atskirus sutankėjimo debesėlius (4.1.1.1 pav. A) ir tokiu būdu padalinti ląsteles į skirtingas subpopuliacijas: $CD44^{daug}CD133^{daug}$ (74,39%), $CD44^{daug}CD133^{mažai/-}$ (24,80%), ir $CD44^{mažai/-}CD133^{mažai/-}$ (0,21%) (4.1.1.1 pav. D).

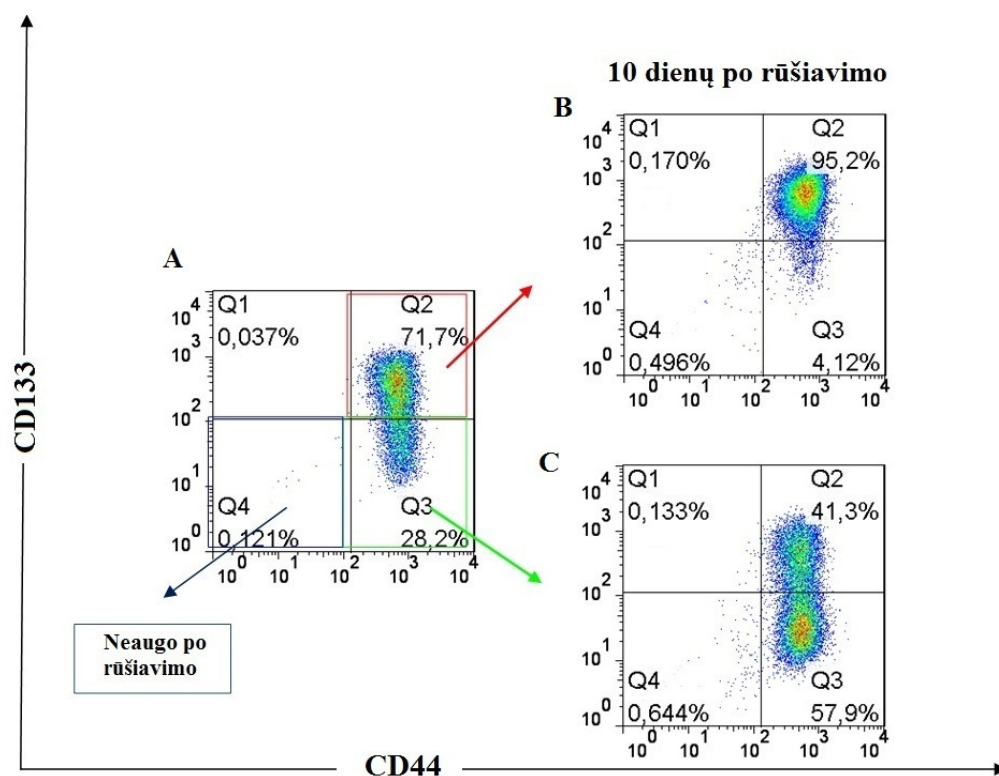
Iš visų tyrinėtų žmogaus ląstelių linijų, FEMX-I ląstelių $CD44^{daug}CD133^{daug}$ subpopuliacija turi daugiausiai kamieninėms ląstelėms būdingų membraninių antigenų, tačiau dar negalime teigti, jog tai „kamieniškiausia“ subpopuliacija. Prisijungę žymenys – būdas išskirstyti ląsteles į subpopuliacijas, tačiau būtina patikrinti, kuri iš išskirtų subpopuliacijų pasižymi kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis.

4.1.2. FEMX-I subpopuliacijų gebėjimas atstatyti pradinę prieš rūšiavimą buvusią savo fenotipinę sudėtį

Norint atrinkti kamieninėmis savybėmis pasižyminčias ląsteles, FEMX-I ląstelės buvo suskirstytos į tris subpopuliacijas pagal anti-CD44-FITC ir anti-CD133-PE žymenų prisijungimą: $CD44^{daug}CD133^{daug}$, $CD44^{daug}CD133^{mažai/-}$, ir $CD44^{mažai/-}CD133^{mažai/-}$. Subpopuliacijos buvo išrūšiuotos į atskirus mėgintuvėlius tėkmės citometru ir užsėtos įprastam augimui į 6 šulinėlius

plokšteles. Po 10 dienų buvo įvertintas kiekvienos iš subpopuliacijų imunofenotipinis profilis.

Rezultatai rodo, jog $CD44^{daug}CD133^{daug}$ ląstelės po 10 dienų augimo neparodė jokių pokyčių imunofenotipo profilyje: iškart po rūšiavimo $CD44^{daug}CD133^{daug}$ ląstelės sudarė ~95% visos populiacijos ir bėgant laikui procentinė sudėtis nesikeitė. Priešingai nei aptarta subpopuliacija, $CD44^{daug}CD133^{mažai/-}$ ląstelės keitė savo imunofenotipinį profilį 10 dienų



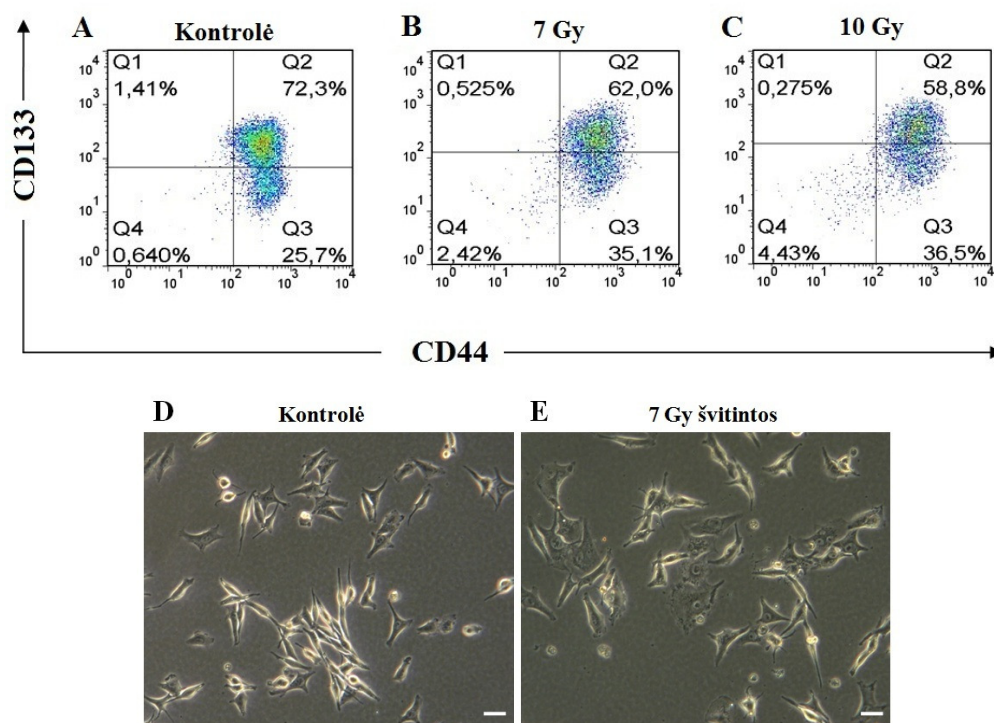
4.1.2.1 pav. Antigenų CD133 ir CD44 raiška FEMX-I ląstelių linijoje, išmatuota tėkmės citometru, prieš (A) ir po rūšiavimo (B, C). Skirtingos diagramų taškelių spalvos žymi taškų persiklojimo tankį: raudona spalva žymi tankesnes taškų sritis nei mėlyna.

eigoje: iškart po rūšiavimo $CD44^{daug}CD133^{mažai/-}$ ląstelės sudarė ~80% populiacijos, o po 10 dienų augimo $CD44^{daug}CD133^{mažai/-}$ ląstelių dalis populiacijoje siekė tik ~58% , likusią didžiąją dalį sudarė $CD44^{daug}CD133^{daug}$ ląstelės (4.1.2.1 pav.). Šie rezultatai leidžia teigti, jog tik $CD44^{daug}CD133^{mažai/-}$

fenotipo ląstelės po atskyrimo geba diferencijuotis ir taip priartėti prie pradinės neišrūšiuotų ląstelių fenotipinės sudėties. Fenotipas CD44^{daug}CD133^{mažai} galėtų būti priskiriamas kamieninėmis savybėmis pasižyminčiai ląstelių subpopuliacijai.

4.1.3. FEMX-I subpopuliacijų atsparumas rentgeno spinduliuotės poveikiui

Atsparumo rentgeno spinduliuotei tyrimams, FEMX-I ląstelės buvo užsėtos į plokšteles ir apšvitintos 7 Gy ir 10 Gy Rentgeno spinduliuote. Švitinimo dozė pasirinkta tokia, kad sukeltų atitinkamai 60% ir 70% ląstelių žūtį [118]. Praėjus 24 valandoms po švitinimo, ląstelės buvo atkabintos nuo plokštelės dugno, citometriškai ištirta CD133 ir CD44 raiška.



4.1.3.1 pav. Antigenų CD133 ir CD44 raiška FEMX-I ląstelių linijoje, išmatuota tėkmės citometru, prieš (A) ir po švitinimo 7 Gy ir 10 Gy rentgeno spinduliuotės dozėmis (B, C). Fazinio kontrasto mikroskopijos nuotraukos rodo ląstelių morfologijos pokyčius prieš ir po švitinimo rentgeno spinduliuote

(D, E). Skalė-10 μm . Skirtingos diagramų taškelių spalvos žymi taškų persiklojimo tankį: raudona spalva žymi tankesnes taškų sritis nei mėlyna.

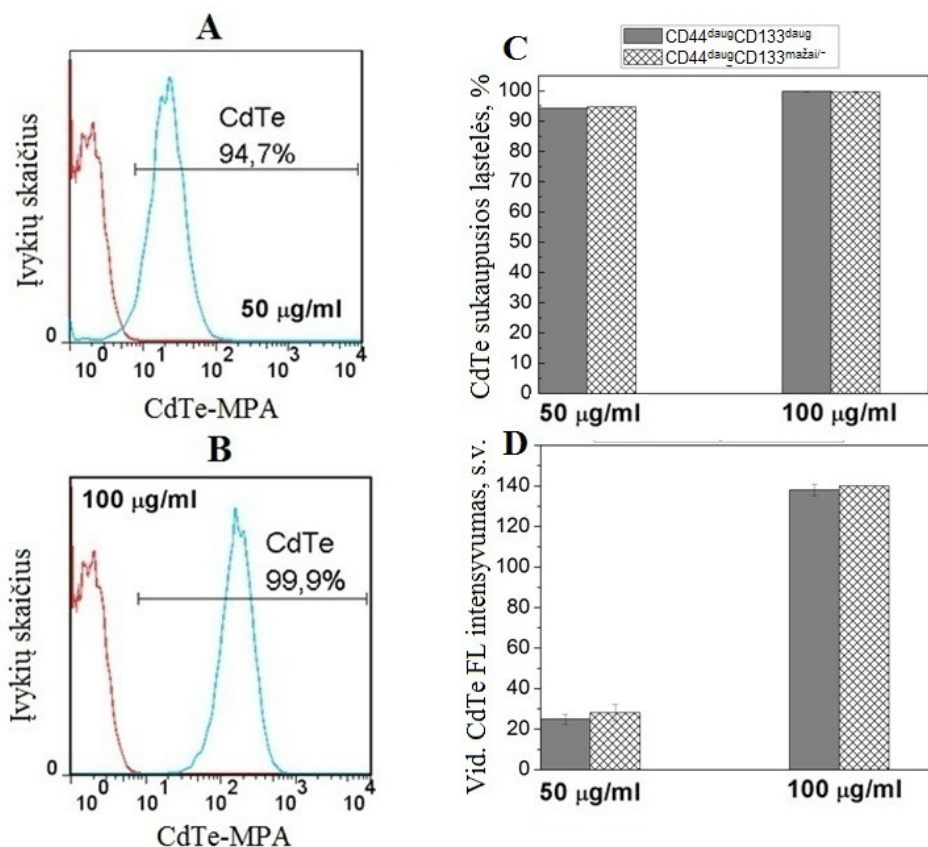
Tėkmės citometrijos taškinėse diagramose matosi, jog po švitinimo keičiasi FEMX-I ląsteles sudarančių $\text{CD44}^{\text{daug}}\text{CD133}^{\text{daug}}$ ir $\text{CD44}^{\text{daug}}\text{CD133}^{\text{mažai/-}}$ subpopuliacijų procentinės dalys. $\text{CD44}^{\text{daug}}\text{CD133}^{\text{daug}}$ ląstelės prieš švitinimą sudarė 72% visos populiacijos, tačiau po švitinimo jų sudaroma procentinė dalis sumažėjo iki 58–62%. Priešingos krypties pokyčiai užregistruoti $\text{CD44}^{\text{daug}}\text{CD133}^{\text{mažai/-}}$ subpopuliacijoje, po švitinimo jų sudaroma procentinė dalis padidėjo nuo 26% iki 35–36% (4.1.3.1 pav. A,B,C). Šie rezultatai rodo, jog $\text{CD44}^{\text{daug}}\text{CD133}^{\text{mažai/-}}$ populiacijos padidėjimas po sukeltos žūties gali būti nulemtas šių ląstelių didesnio atsparumo jonizuojančiai spinduliutei.

Fazinio kontrasto mikroskopijos nuotraukos aiškiai parodo, jog po švitinimo keitėsi ne tik ląstelių imunofenotipinė sudėtis, bet ir morfologija. Ląstelės išdidėjo, pakeitė formą, lyginant su kontroline nepaveikta grupe (4.1.3.1 pav. D, E).

Apibendrinant visus vėžinių kamieninių ląstelių aptikimo eksperimentus būtų galima padaryti išvadą, jog $\text{CD44}^{\text{daug}}\text{CD133}^{\text{mažai/-}}$ subpopuliacija, pasižyminti didele CD44 antigeno raiška ir mažesne antigeno CD133 raiška, geba atkurti pradinę savo imunofenotipinę sudėtį po išrūšiavimo ir yra atsparesnė jonizuojančiai spinduliutei, dėl to gali būti laikoma vėžinių kamieninių ląstelių modeliu FEMX-I ląstelių linijoje. Tokie rezultatai gana netikėti, nes mokslinėje literatūroje pasitaiko nemažai straipsnių, kurie teigia, jog CD133 baltymas yra vienas svarbiausių aptinkant vėžį inicijuojančias kamienines ląsteles [12, 48, 53, 119]. Tačiau yra ir tokie nuomonei prieštaraujančių straipsnių, juose pateikiami įrodymai, jog, baltymas CD133 nėra pagrindinis veiksnys, apsprendžiantis ląstelių vėžines kamienines savybes [15].

4.2. Kvantinių taškų CdTe-MPA kaupimasis skirtingo fenotipo FEMX-I ląstelių subpopuliacijose

Kvantinių taškų CdTe-MPA kaupimosi FEMX-I ląstelių subpopuliacijose tyrimas buvo atliktas užpilant kvantinių taškų ir inkubuojant 24 valandas ląstelėms įprastomis sąlygomis (5% CO₂, 37°). Po inkubacijos ląstelės buvo atkabintos nuo plokštelės dugno, atliktas jų žymėjimas anti-CD133-PE ir anti-CD44-FITC antikūnais, citometriškai užregistruoti fluorescencijos intensyvumai (2-jų antikūnų ir CdTe-MPA kvantinių taškų) kiekvienoje ląstelėje.



4.2.1 pav. CdTe-MPA KT kaupimasis FEMX-I ląstelėse po 24 valandų inkubacijos. Raudona kreivė žymi kontrolinių nepaveiktų ląstelių autofluorescenciją, mėlyna kreivė žymi KT sukaupusių ląstelių fotoluminescencijos intensyvumą, esant 50 µg/ml (A) ir 100 µg/ml (B) KT koncentracijai (inkubacijos metu). CD44^{daug}CD133^{daug} ir CD44^{daug}CD133^{mažai}-subpopuliacijose aptikta 94–99% ląstelių, pasižyminčių KT

fotoluminescencija (C). Abiejų subpopuliacijų vidutinis FL intensyvumas siekė ~25-140 s.v. priklausomai nuo koncentracijos (D).

Iš citometrijos histogramų matyti, jog po 24 valandų CdTe-MPA KT susikaupia ląstelėse. Taip pat stebima koncentracinė priklausomybė: esant didesnei kvantinių taškų koncentracijai, stebimas didesnis fotoluminescencijos intensyvumas, vadinasi, didesnis KT kiekis susikaupia ląstelėse (4.2.1 pav. A, B).

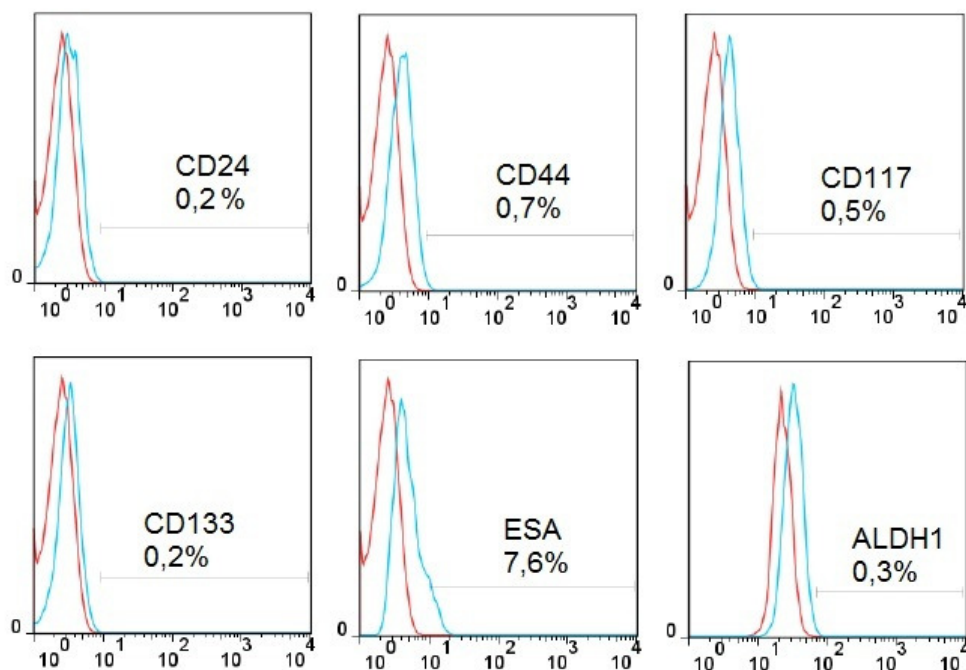
Norint įvertinti, ar skirtingos FEMX-I ląstelės sudarančios CD44^{daug}CD133^{daug} ir CD44^{daug}CD133^{mažai/-} subpopuliacijos vienodai kaupia CdTe-MPA KT, buvo atlikta papildoma citometrinių duomenų analizė: subpopuliacijų taškinės diagramos buvo pavieniui atidėtos CdTe-MPA fotoluminescencijos skalėje. KT sukaupusių ląstelių procentinės dalys ir vidutinis KT FL intensyvumas buvo apskaičiuoti ir atidėti histogramose (4.2.1 pav. C, D). CdTe-MPA fotoluminescencija aptikta 94–99% ląstelių ir šis procentas nesiskyrė tarp CD44^{daug}CD133^{daug} ir CD44^{daug}CD133^{mažai/-} ląstelių. Taip pat beveik nesiskyrė CdTe-MPA vidutinių fotoluminescencijos intensyvumų vertės.

Apibendrinant CdTe-MPA kaupimosi FEMX-I ląstelėse citometrijos rezultatus, galima teigti, jog, nors ir skiriasi pagal kamienines savybes, subpopuliacijos CD44^{daug}CD133^{daug} ir CD44^{daug}CD133^{mažai/-} beveik vienodai kaupia kvantinius taškus. Tokie rezultatai yra gana svarbūs ir reikšmingi, kalbant apie kvantinių taškų kaip galimų vaistų nešėjų pritaikomumą tikslinėse priešvėžinėse terapijose. Mokslinėje literatūroje yra nemažai duomenų, parodančių įvairaus dydžio ir padengimo kvantinių taškų kaupimąsi vėžinėse ląstelėse [19], tačiau nepavyko aptikti duomenų, kuriuose būtų kalbama apie KT kaupimąsi vėžinėse kamieninėse ląstelėse. Galbūt tam turi reikšmės CdTe-MPA toksiškumas, kuris parodytas ne vienoje mokslinėje publikacijoje [98, 100, 101, 118]. Tačiau toksiškumas sietinas su CdTe-MPA nestabilumu ir Cd ir Te sunkiųjų metalų jonų išsilaisvinimu, o pastaruoju metu ši nestabilumo problema išspręsta, apvelkant kvantinius taškus papildomais dangalais [97,

102, 106]. Yra pasirodę straipsnių, kuriuose tokie įvairiais dangalais apsaugoti KT kaupiasi sveikose kamieninėse ląstelėse, nepažeisdami jų gyvybinių funkcijų [103, 120].

4.3. Paviršiaus žymenų raiška A2780 ir MiaPaCa2 ląstelių linijose

Kiaušidžių ir kasos vėžio ląstelių linijų A2780 ir MiaPaCa2 paviršiaus antigenų raiškos tyrimas buvo atliktas tėkmės citometru. Žymenis ekspresuojančių ląstelių fluorescencijos signalas buvo lyginamas su kontrolinės grupės (nedažytų su antikūnais) ląstelių autofluorescencijos signalu.

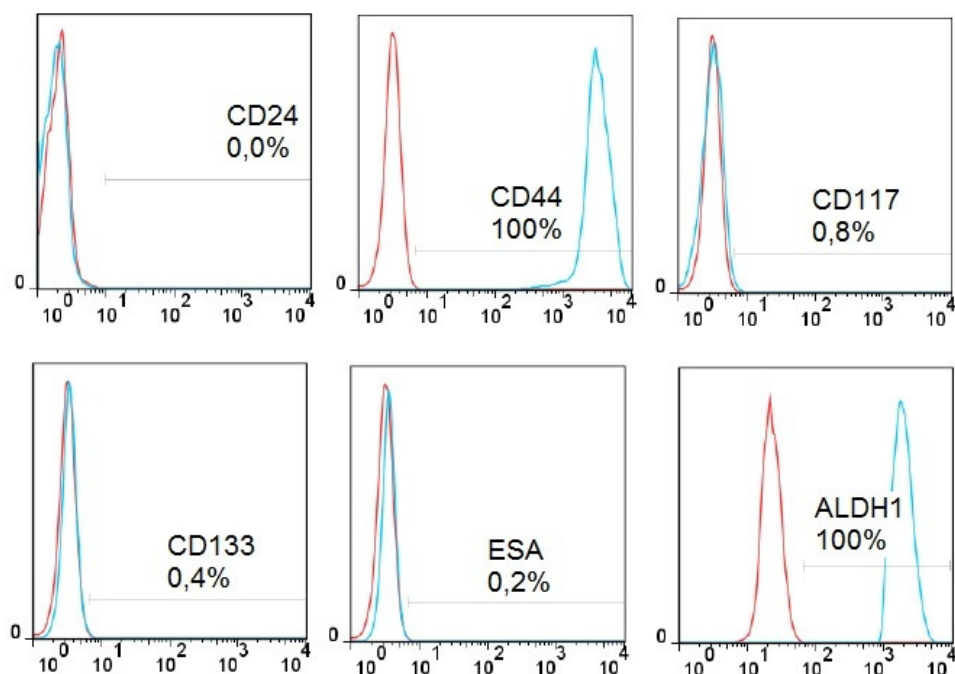


4.3.1 pav. CD24, CD44, CD117, CD133, ESA paviršiaus antigenų ir ALDH1 fermento raiška žmogaus kiaušidžių vėžio ląstelių linijoje A2780.

Tyrimų rezultatai parodė, kad A2780 ląstelėse aptikta tik nedidelė 7,58 % subpopuliacija ląstelių, pasižyminčių ESA raiška (4.3.1 pav.). Kitus kamieninių ląstelių žymenis (CD24, CD117, CD133 bei ALDH1) ekspresavo dar mažesnės (0,2-0,7%) ląstelių subpopuliacijos. Kasos vėžio ląstelių linijos

MiaPaCa2 paviršiaus žymenų ekspresija pavaizduota 4.3.2 paveiksle. Atlikus imunofenotipinę ląstelių analizę nustatyta, kad CD44 ir ALDH1 žymenis ekspresavo 100% ląstelių (4.3.2 pav.). Kitus tirtus kamieninių ląstelių žymenis (CD24, CD117, CD133 bei ESA) ekspresavo mažos (0,2-0,8%) ląstelių subpopuliacijos.

Apibendrinant gautus imunofenotipavimo rezultatus galima padaryti išvadą, jog A2780 ląstelės pasižymi menka kamieninėms ląstelėms būdingų antigenų raiška, o MiaPaCa2 galima laikyti daug CD44 ir ALDH1 antigenų, būdingų vėžinėms kamieninėms ląstelėms, ekspresuojančia linija.



4.3.2 pav. CD24, CD44, CD117, CD133, ESA paviršiaus antigenų ir ALDH1 fermento raiška žmogaus kasos vėžio ląstelių linijoje MiaPaCa2.

Mokslinėje literatūroje vėžio kamieninių ląstelių tyrimai atskleidžia, jog žmogaus kiaušidžių ir kasos vėžio navikuose egzistuoja nediferencijuotų ir chemoterapijai atsparių ląstelių populiacija [39, 121]. Žmogaus kiaušidžių vėžio ląstelių linijoje A2780 aptikta 9,4% ALDH1⁺ subpopuliacija ir nedidelė CD133⁺ subpopuliacija [53, 122]. Buvo parodyta, jog CD133 ekspresija lemia didesnio tūrio navikų augimą imunodeficitinėse pelėse, o ALDH1 fermento

aktyvumas rodė ląstelių padidintą atsparumą chemoterapiniams vaistams. Nepavyko rasti duomenų apie CD117, CD44, ESA, CD24 ekspresiją A2780 linijoje, tačiau tyrimai su kitomis žmogaus kiaušidžių vėžinių ląstelių linijomis atskleidžia šių antigenų svarbą aptinkant vėžio kamienines ląsteles kiaušidžių navikuose [123]. *Wei* su savo mokslininkų grupe aptiko, jog žmogaus kasos vėžio ląstelės MiaPaCa2 ekspresuoja CD44 žymenį, tačiau CD24 ir ESA raiška beveik nebuvo aptikta [50]. Tokie rezultatai sutampa su šiame darbe atlikta MiaPaCa2 ląstelių imunofenotipine analize. Kitų autorių duomenimis 3-5 % šios linijos ląstelių yra CD133⁺ [51, 124], tačiau šie autoriai nenurodė, ar atliekant imunofenotipinę analizę buvo atmetamos negyvos ląstelės. Negyvoms ląstelėms būdingas nespecifinis antikūnų jungimasis, todėl negyvų ląstelių įtraukimas į analizę lemia jos tikslumą [110]. Tai ypač svarbu aptinkant nedideles ląstelių subpopuliacijas. ALDH1 aktyvumo tyrimas laikomas atskiru metodu, nurodančiu galimą atsparumą chemoterapiniams vaistams [125]. Kasos vėžys klinikoje vertinamas kaip labai agresyvi vėžio forma, todėl ALDH1 aktyvumas aptinkamas tiek pirminėse kasos vėžio kultūrose [126], tiek ląstelių linijose [49]. Tą patvirtina ir mūsų rezultatai.

4.4. A2780 ir MiaPaCa2 ląstelių gebėjimas formuoti navikus *in vivo*

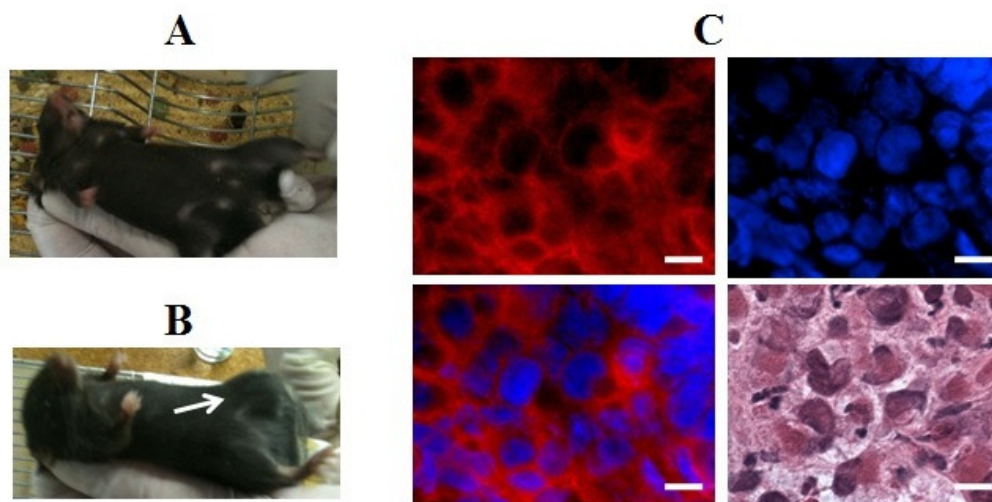
Norint išsiaiškinti, ar turima antigenų raiška turi įtakos vienai iš pagrindinių kamieniškumo savybių - ląstelių gebėjimui formuoti tokio pačio fenotipo auglius, buvo atliktas tolimesnis šių ląstelių tyrimas – gebėjimas formuoti navikus imunodeficitinėse pelėse.

Žemiau esančioje lentelėje matome žmogaus vėžinių ląstelių skiepijimo pelėse rezultatus. MiaPaCa2 žmogaus vėžinės ląstelės augo lėtai, prireikė 6 mėnesių, jog 1 milijonas ląstelių suformuotų 1 cm³ naviką. Priešingai, A2780 vėžinės ląstelės pelėse augo palyginti greitai, jau po 1 mėnesio 1 milijonas ląstelių suformavo 1 cm³ navikus (4.4.1 pav. A, B). Abiejų ląstelių linijų navikų formavimo efektyvumas siekė 50% MiaPaCa2 ląstelėms ir 60% A2780 ląstelėms (1 lentelė). Tokie rezultatai gana netikėti, nes būtent MiaPaCa2

ląstelės pasižymėjo padidinta kamieninėms ląstelėms būdingų antigenų raiška (žr. 4.3 skyrelį). Tačiau eksperimento tiriamosios grupės buvo pernelyg mažos, jog šiuos duomenis būtų galima laikyti statistiškai patikimais.

1 lentelė. Žmogaus vėžinių ląstelių gebėjimas formuoti navikus pelėse.

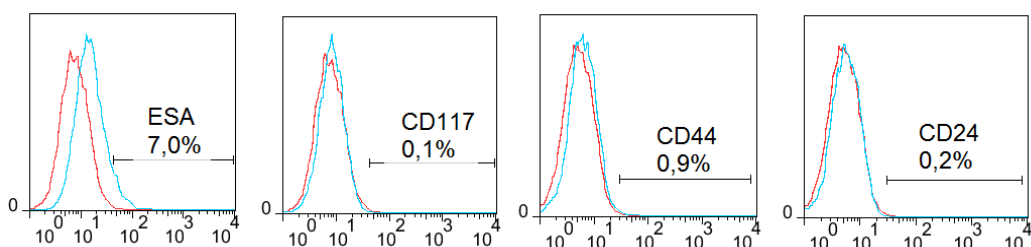
	Patinai	Patelės	VISO	Efektyvumas
<i>MiaPaCa2</i>	1/4	3/4	4/8	50%
<i>A2780</i>	3/6	3/4	6/10	60%



4.4.1 pav. Pelių nuotraukos praėjus 1 mėnesiui nuo naviko įskiepijimo: kontrolinė (A) ir skiepyta (B) Rag2 linijos pelės. C - MiaPaCa2 auglio bandinių pjūvių fluorescencinės ir šviesinės mikroskopijos vaizdai. Raudona ir mėlyna spalvos žymi fluorescenciniais žymenimis padažytus **CD44 antigenus (PE)** ir **ląstelių branduolius (Hoechst33258)**. Rožinių ir violetinių atspalvių šviesinėje nuotraukoje matyti hematoksilinu ir eozinu dažytas audinys. Skalė- 10 μm.

Iš histologinių MiaPaCa2 navikų pjūvių matome, jog suformuoti navikai savo CD44 antigenų ekspresija yra panašūs į kultivuojamas MiaPaCa2 ląsteles (4.3.2 pav): visos matymo lauke užregistruotos ląstelės pasižymi raudonu švytėjimu aplink branduolį, tokiu būdu parodydamos, jog antigenas CD44 ekspresuojamas visose ląstelėse (4.4.1 pav. C).

Iš tĕkmĕs citometrijos rezultatų buvo išsiaiškinta, jog A2780 ląstelėse kamieninėms ląstelėms būdingų antigenų raiška yra labai silpna (4.3.1 pav), todėl A2780 ląstelių suformuotų navikų histologinė analizė nebuvo atlikta. Antigenų raiškai įvertinti buvo pasirinkta jautresnė ir mažiau bandinius blukinanti metodika – tĕkmĕs citometrija. 4.4.2 paveiksle matomi A2780 ląstelių naviko (toliau vadinamo – A2780NAV) imunofenotipinės analizės pagal anti-ESA-PE, anti-CD117-PE, anti-CD44-FITC ir anti-CD24-FITC žymenis rezultatai. A2780NAV ląsteles sudaro 7% ESA⁺ fenotipo ląstelių. Kitų antigenų raiška siekia vos 0,1-0,9% A2780NAV ląstelių. Panašūs rezultatai gauti imunofenotipuojant A2780 linijos ląsteles (4.3.1 pav.). Šie rezultatai rodo, jog A2780 ląstelėms augant navikuose paviršinių baltymų raiška beveik nesikeičia.

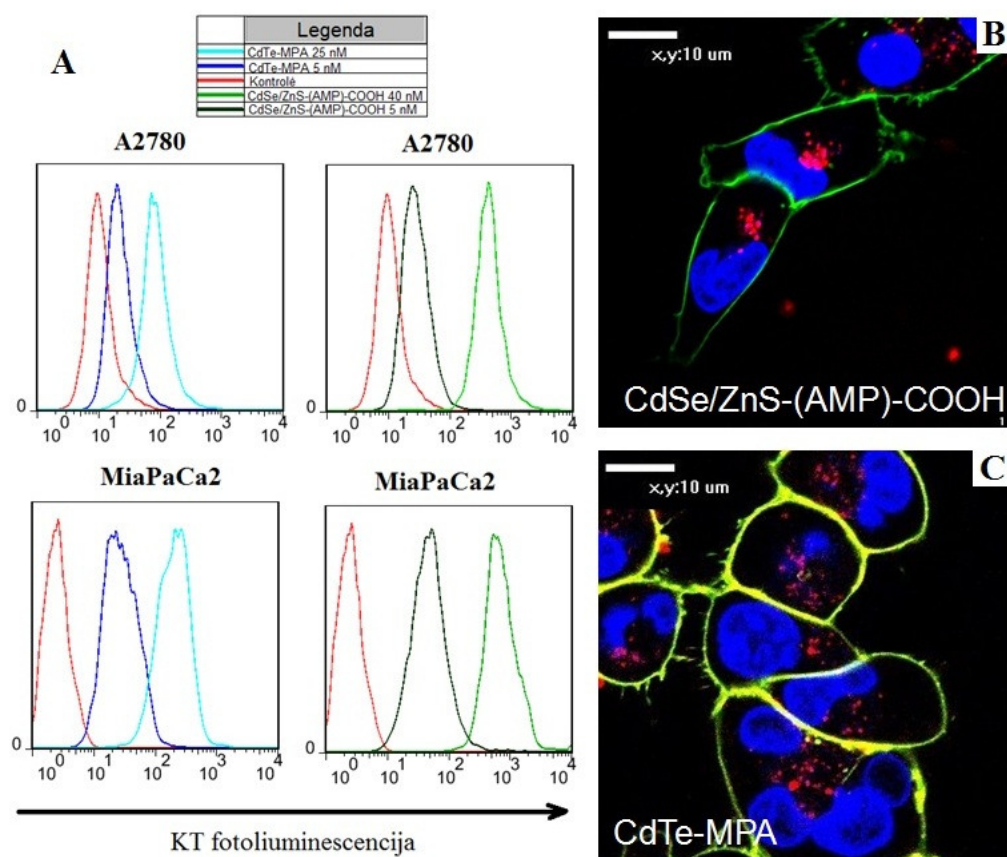


4.4.2 pav. Navikinių ląstelių A2780NAV, išskirtų iš A2780 ląstelių suformuotų navikų, fenotipas. Matyti, jog A2780NAV fenotipas yra artimas pirminių A2780 ląstelių fenotipui (palyginimui, žr. 4.3.1 pav).

Apibendrinant būtų galima pasakyti, jog pirminis pabandydas išauginti žmogaus navikus pelės modelyje sėkmingai pavyko. Ateityje bus planuojami panašūs tyrimai, tačiau bus parenkamos didesnės pelių grupės ir skiepijama ne tik 1 milijonas ląstelių, bet ir mažesni ląstelių kiekiai, siekiant išsiaiškinti, koks mažiausias kiekis ląstelių suformuoja navikus. Navikų formavimo efektyvumo eksperimentai, pasirenkant skirtingas skiepytų ląstelių koncentracijas, gana dažnai aptinkami vėžinių kamieninių ląstelių tyrimuose [31]. Iš imunofluorescencinės histologinių pjūvių analizės ir tĕkmĕs citometrijos rezultatų matome, jog suformuoti navikai *in vivo* yra panašūs pagal heterogeniškumą į *in vitro* kultivuojamas MiaPaCa2 ir A2780 ląstelių linijas.

4.5. CdTe-MPA ir CdSe-ZnS-(AMP)-COOH KT kaupimasis MiaPaCa2 ir A2780 ląstelėse

KT kaupimasis ląstelėse buvo įvertintas tėkmės citometrijos ir lazerinės skenuojančios konfokalinės mikroskopijos metodikomis. KT koncentracijų pasirinkimą nulėmė literatūroje pateikti duomenys [103].



4.5.1 pav. Kvantinių taškų kaupimasis A2780 ir MiaPaCa2 žmogaus vėžinėse ląstelėse po 24 valandų inkubacijos. Tėkmės citometrijos histogramose matosi, jog didėjant KT koncentracijai, ląstelėse sukauptų KT FL intensyvumas taip pat didėja (A). CdSe/ZnS-(AMP)-COOH ir CdTe-MPA susikaupimo MiaPaCa2 ląstelėse vaizdai buvo užregistruoti fluorescenciniu konfokaliniu mikroskopu *Nikon C1si* (B, C).

Po 24 valandų inkubacijos su KT, tėkmės citometrijos histogramose matomas KT FL signalas (4.5.1 pav.). Didėjant KT koncentracijai, matomas

nuo koncentracijos priklausomas FL signalo didėjimas. Toks dėsniumas stebimas abiejose ląstelių linijose, tačiau lyginant KT FL intensyvumą santykinės vertės, matosi, jog MiaPaCa2 ląstelėse esančių KT emisija yra intensyvesnė (4.5.1 pav. A), nei A2780 ląstelėse. Tokie intensyvumų skirtumai gali būti nulemti ląstelių dydžio: A2780 ląstelių skersmuo yra 2 kartus mažesnis nei MiaPaCa2 ląstelių (nustatyta iš mikroskopijos, duomenys nepateikti).

Taip pat matyti skirtumai tarp CdSe/ZnS-(AMP)-COOH ir CdTe-MPA KT fotoluminescencijos intensyvumų. ZnS ir amfifilinių dangalų turinčių KT švytėjimas ląstelėse yra intensyvesnis (4.5.1 pav. A, žalio ir juodo atspalvio kreivės) nei CdTe-MPA KT (4.5.1 pav. A, mėlyno atspalvio kreivės). FL intensyvumas ląstelėje gali priklausyti nuo sukauptų KT kiekio. Tačiau šiuo atveju labiausiai tikėtina, jog tokį rezultatą lemia skirtingos KT fotofizikinės savybės: mažiau dangalų turintys, ir, iš kadmio ir telūro sudaryti KT pasižymi mažesniu FL kvantiniu našumu, bei yra jautresni aplinkos sąlygų pokyčiams [127, 128].

Tėkmės citometrijos histogramos parodo KT FL signalą iš vienos ląstelės, tačiau, norint įvertinti KT lokalizaciją, buvo atlikti papildomi tyrimai panaudojant lazerinės skenuojančios konfokalinės mikroskopijos metodiką. Mikroskopijos rezultatai rodo, jog KT lokalizuojasi ląstelių viduje, pūslelinėse struktūrose aplink branduolį (4.5.1 pav. B ir C). KT lokalizacija abiejose ląstelių linijose panaši, dėl to efekto parodymui paveiksle pateiktos tik MiaPaCa2 ląstelių fluorescencinės nuotraukos.

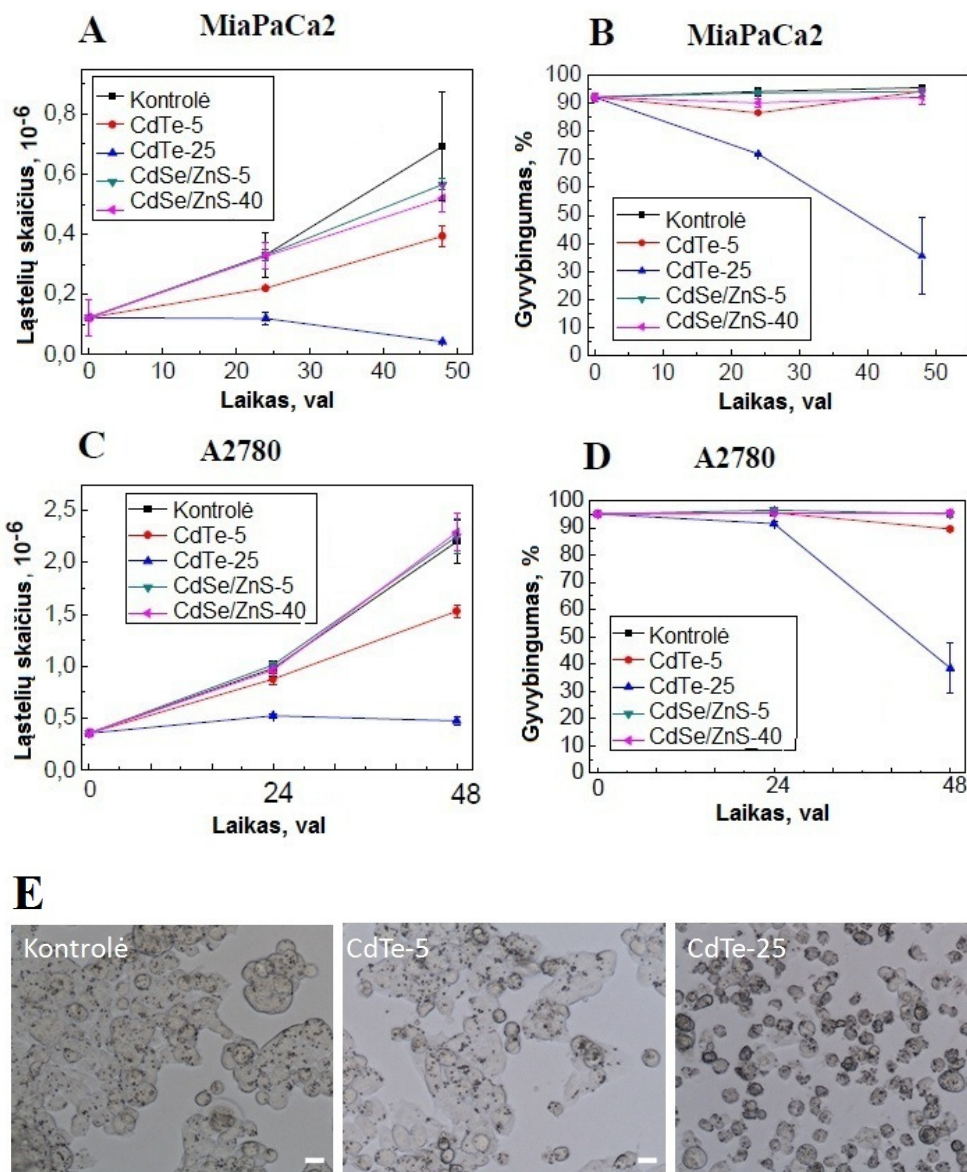
Apibendrinant būtų galima padaryti išvadą, jog CdSe/ZnS-(AMP)-COOH ir CdTe-MPA KT kaupimosi dėsniumai beveik vienodi A2780 ir MiaPaCa2 ląstelių linijose, kurios pasižymi skirtinga kamieninėms ląstelėms būdingų baltymų CD44 ir ALDH1 ekspresija. Abiejų tipų KT patenka į ląstelių citoplazmą, išsidėsto ląstelėje pūslelinėse struktūrose aplink branduolį. Didinant KT koncentraciją, matomas didesnis KT FL intensyvumas ląstelėse.

Literatūroje yra nemažai duomenų, kurie taip pat parodo, jog KT patenka į ląsteles ir išsidėsto pūslelinėse struktūrose aplink branduolį [103,

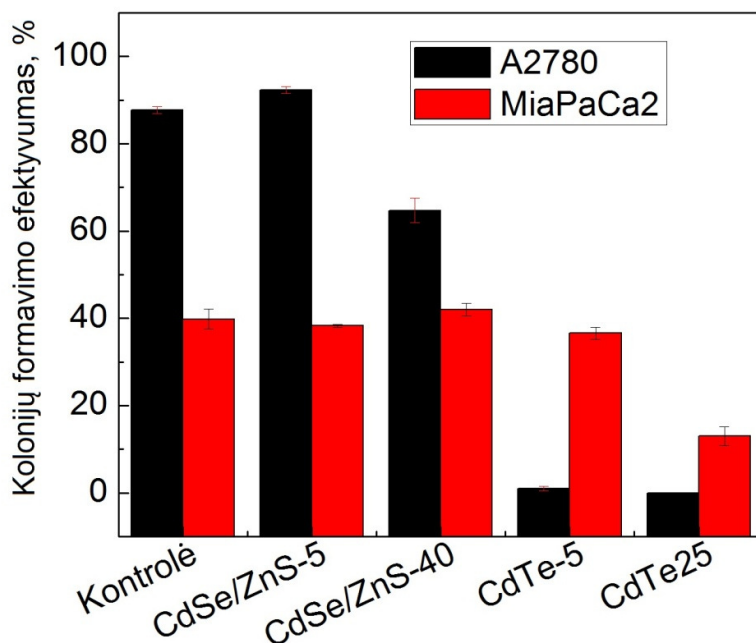
129-131]. Taip pat yra tyrimų, kurie nagrinėja KT migracijos ląstelės viduje mechanizmus. Yra įrodymų, jog KT patenka į ląsteles endocitozės būdu ir galiausiai nukeliauja į lizosomas [132]. Tiriant KT pritaikymo galimybes vėžinių ląstelių žymėjimui ir terapinių medžiagų įnešimui į ląstelę, išsiaiškinta, jog abiejų tipų KT patenka į skirtingo tipo vėžines ląsteles, yra gana svarbios ir reikšmingos. Tačiau papildomai dar būtina iširti daugybę svarbių dalykų, vienas iš jų - ar žymėjimui ir prikabintų vaistų įnešimui į ląstelę naudojamos KT koncentracijos nesukels ląstelių toksiškumo.

4.6. CdTe-MPA ir CdSe-ZnS-(AMP)-COOH KT poveikis MiaPaCa2 ir A2780 ląstelių gyvybingumui, išgyvenimui ir proliferacijai

Kvantinių taškų poveikis ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai buvo įvertintas automatinio ląstelių skaičiuotuvu. Žemiau pateiktuose paveiksluose matomi ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo kitimai, kuriuos lemia skirtingų koncentracijų, inkubacijos trukmių bei cheminės sudėties KT (4.6.1 pav.). Proliferacijos kreivėse matyti, jog po 24 valandų inkubacijos su CdTe-25 KT ląstelės ne tik nustoja dalytis, bet ir stebimas jų skaičiaus mažėjimas (4.6.1 pav.). Ląstelių skaičiaus mažėjimas yra nulemtas ląstelių žūtis, kurią patvirtina 4.6.1 paveiksle B ir D dalyse pateiktas sumažėjęs ląstelių gyvybingumas bei E dalyje pateikti morfologiniai ląstelių pokyčiai. Mažesnės koncentracijos CdTe-MPA kvantiniai taškai sukelia, palyginti, mažesnę toksišką poveikį. Net po 24 valandų inkubacijos su KT ląstelių gyvybingumas pakito nežymiai (4.6.1 pav. B, D), tačiau ląstelių proliferacija sulėtėjo 1,4 karto A2780 ląstelių linijoje (4.6.1 pav. C) ir dvigubai MiaPaCa2 ląstelių linijoje (4.6.1 pav. A). Priešingai, didesnės ir mažesnės koncentracijos CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT nesukėlė pastebimų gyvybingumo ir proliferacijos pokyčių.



4.6.1 pav. MiaPaCa2 ir A2780 ląstelių skaičius (A, C) ir gyvybingumo (B, D) priklausomybė nuo KT koncentracijos ir inkubacijos trukmių, išmatuota automatinio ląstelių skaičiuotuvu ADAM MC. A2780 ląstelių morfologiniai pokyčiai po inkubacijos su 5 nM (CdTe-5) ir 25 nM (CdTe-25) CdTe-MPA KT užregistruoti šviesiniu mikroskopu (E). Skalė-10 μm .



4.6.2 pav. A2780 ir MiaPaCa2 vėžinių ląstelių kolonijų formavimo efektyvumas po 24 valandų inkubacijos su skirtingų koncentracijų CdSe/ZnS-(AMP)-COOH ir CdTe-MPA kvantiniais taškais.

KT poveikis ląstelių išgyvenamumui buvo įvertintas kolonijų formavimo metodu. Po 24 valandų inkubacijos su KT vėžinės ląstelės buvo suspenduojamos ir išsėjamos pavieniui, po 200 A2780 ląstelių ir 300 MiaPaCa2 ląstelių į vieną šulinėlį. Iš 4.6.2 stulpelinės diagramos matyti, jog po CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT poveikio MiaPaCa2 ląstelės formavo kolonijas taip pat kaip kontrolinė (nepaveikta) ląstelių grupė, apie 40% efektyvumu. Įdomu tai, jog CdSe/ZnS-5 KT paveiktų A2780 ląstelių kolonijų formavimo efektyvumas 5% didesnis nei kontrolinėje ląstelių grupėje. Tačiau norint įsitikinti šio nedidelio efekto reikšmingumu, reikėtų daugiau duomenų.

Esant didesniajai CdSe/ZnS-40 KT koncentracijai, A2780 ląstelės rodė 23% mažesnę kolonijų formavimo efektyvumą. Abiejų koncentracijų CdTe-MPA KT ženkliai mažino abiejų ląstelių linijų kolonijų formavimo efektyvumą. Nors gyvybingumas iškart po CdTe-25 KT poveikio atrodė neblogas, siekė 70-90% (4.6.1 pav. B, D), tačiau praėjus 10 dienų paaiškėjo,

jog ląstelės buvo stipriai pažeistos: A2780 ląstelės neformavo kolonijų, MiaPaCa2 ląstelės formavo kolonijas 3 kartus mažesniu efektyvumu. Mažesniosios koncentracijos CdTe-5 KT neveikė MiaPaCa2 ląstelių kolonijų formavimo efektyvumo, tačiau A2780 ląstelės po poveikio suformavo vos 1 koloniją. Tai rodo, jog nors A2780 ląstelės yra ~2 kartus efektyviau formuojančios kolonijas, tačiau jautresnės CdTe-MPA KT poveikiui.

Iš gyvybingumo, išgyvenimo ir proliferacijos rezultatų galima padaryti išvadą, jog CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT yra mažiau toksiški ląstelėms nei ZnS ir amfifilinio dangalo neturintys CdTe-MPA KT. CdTe-MPA kvantinių taškų toksiškumas yra žinomas literatūroje, siejamas su sunkiųjų kadmio jonų išsilaisvinimu ir atskilimu nuo KT paviršiaus [100]. CdSe/ZnS-(AMP)-COOH kvantinių taškų 5 nM koncentracija nedaro jokio neigiamo poveikio pagrindiniams ląstelių funkciniais parametrams, dėl to gali būti tinkama vėžinių ląstelių vaizdinimui. Tokius rezultatus patvirtina ir *Muller-Borer* mokslininkų grupės tyrimai, kuriuose naudojo CdSe/ZnS-(AMP)-COOH 5 nM KT mezenchiminių kamieninių ląstelių žymėjimui. KT susikaupimas buvo stebimas jau po 1 valandos, o 24 valandų inkubacija su KT nedarė jokio poveikio nei ląstelių gyvybingumui, nei proliferacijai [103].

Tolimesniuose tyrimuose, siekiant išsiaiškinti KT pritaikymo taikininėse priešvėžinėse terapijose galimybes, bus naudojami netoksiškų koncentracijų CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT.

4.7. Kvantinio taško ir antikūno prieš CD44 antigeną konjugato kaupimasis krūties vėžinėse kamieninėse ląstelėse

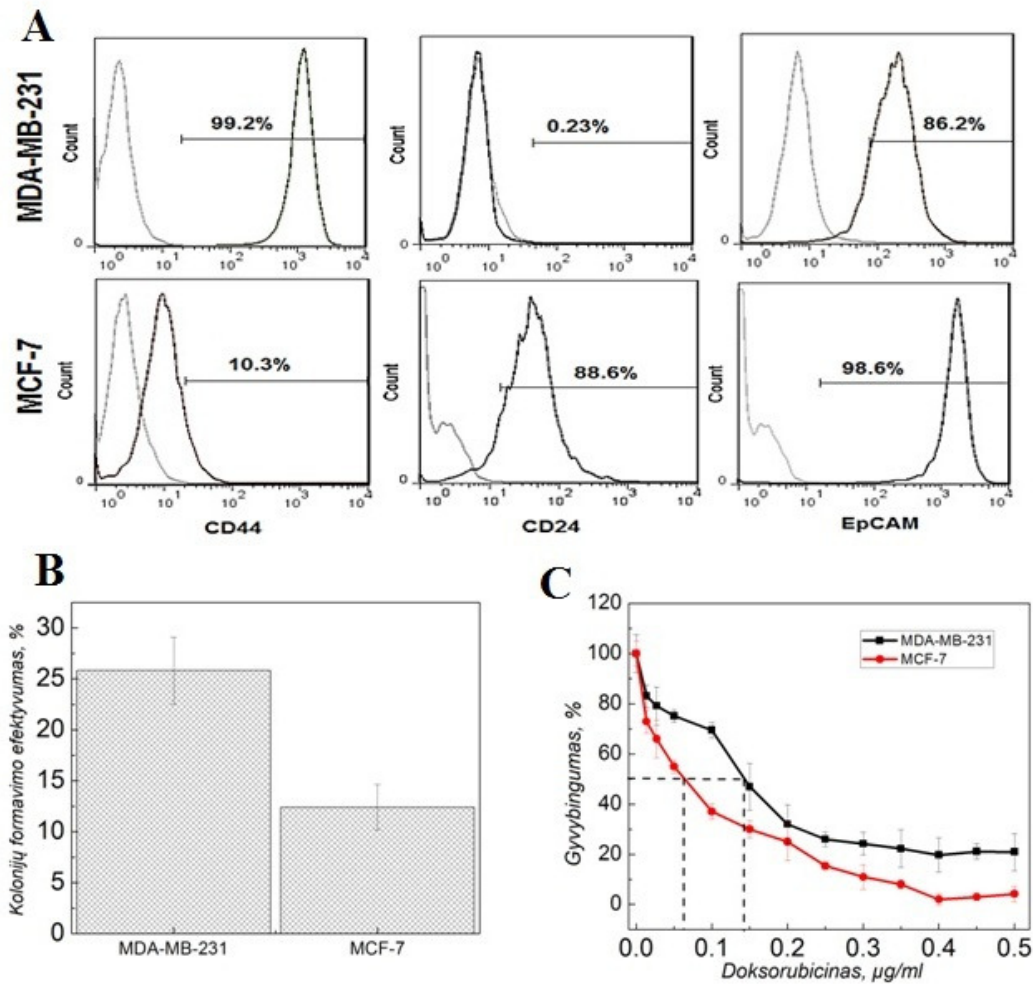
Vystant taikininės į vėžines kamienines ląsteles nukreiptas terapijas, neužtenka parinkti tinkamas, poveikio nedarančias kvantinių taškų koncentracijas. Reikia užtikrinti selektyvų nanodarinio nuvedimą į reikiama ląstelę. Selektyvumą vėžinėms kamieninėms ląstelėms būtų galima įgyvendinti modifikuojant KT paviršių. Vienas iš modifikavimo būdų – prijungti antikūną prieš krūties vėžinių kamieninių ląstelių paviršiaus antigeną CD44. Tačiau antikūnas, palyginti su KT, yra labai maža molekulė. Iškyla klausimas, ar

prijungus prie KT paviršiaus antikūną, “KT-antikūnas” konjugatas kaupsis ląstelėse panašiu mechanizmu, kaip kauptūsi KT, ar visgi antikūnas lems visai kitokį kaupimosi mechanizmą ir lokalizaciją ląstelėje? O gal visai nesikaups ląstelių viduje? CD44 antigenas yra paviršinė ląstelės membranos molekulė, kurios įtraukimas į ląstelės vidų yra aktyvuojamas tik tuomet, kai prisijungia hialurono rūgštis [133].

4.7.1. Krūties vėžinių kamieninių ląstelių aptikimas

Vėžinių kamieninių ląstelių aptikimo tyrimams buvo pasirinktos dvi skirtingo agresyvumo žmogaus krūties vėžio ląstelių linijos: MCF-7 ir MDA-MB-231. Tėkmės citometrijos metodu buvo ištirta CD44, CD24 ir EpCAM baltymų raiška abiejose ląstelių linijose (4.7.1.1 pav. A). MDA-MB-231 linijos ląstelėse net 99,2% ląstelių ekspresuoja CD44 ir 86,2% - EpCAM paviršiaus molekules. Tuo tarpu CD24 glikoproteino ekspresijos beveik nėra – tik 0,23% ląstelių yra teigiamos pagal CD24 žymenį. Iš tėkmės citometrijos galima padaryti išvadą, kad MDA-MB-231 ląstelėms būdingas fenotipas yra CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺. MCF-7 ląstelėse dar intensyviau nei MDA-MB-231 ląstelėse ekspresuojamas EpCAM žymuo (98,6%), tačiau CD44 molekulės raiška yra minimali – tik 10,3%. Priešingai nei MDA-MB-231 ląstelėse, MCF-7 ląstelėse užfiksuota intensyvi CD24 žymens ekspresija – 88,6% ląstelių sintetina šią molekulę. Todėl MCF-7 ląstelėms pagal ląstelių paviršiaus žymenis yra būdingas CD44^{mažai}⁻/CD24⁺/EpCam⁺ fenotipas. Literatūros duomenimis, CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺ fenotipas patvirtintas kaip vėžinėms kamieninėms ląstelėms būdingas fenotipas [31], dėl to iš dviejų ląstelių linijų, MDA-MB-231 ląstelės yra panašesnės į vėžines kamienines ląsteles.

Efektyvus kolonijų formavimas yra vienas iš kamieniškumo požymių, parodantis, jog bent nedidelė subpopuliacija ląstelių turi gebėjimą atsinaujinti ir išauginti dukterines ląsteles. 4.7.1.1 paveikslo B dalyje matyti, kad MCF-7 ląstelės kolonijas formuoja 12,4% efektyvumu, o MDA-MB-231 – net 25,8%, t.y. du kartus efektyviau, nei MCF-7 ląstelės.



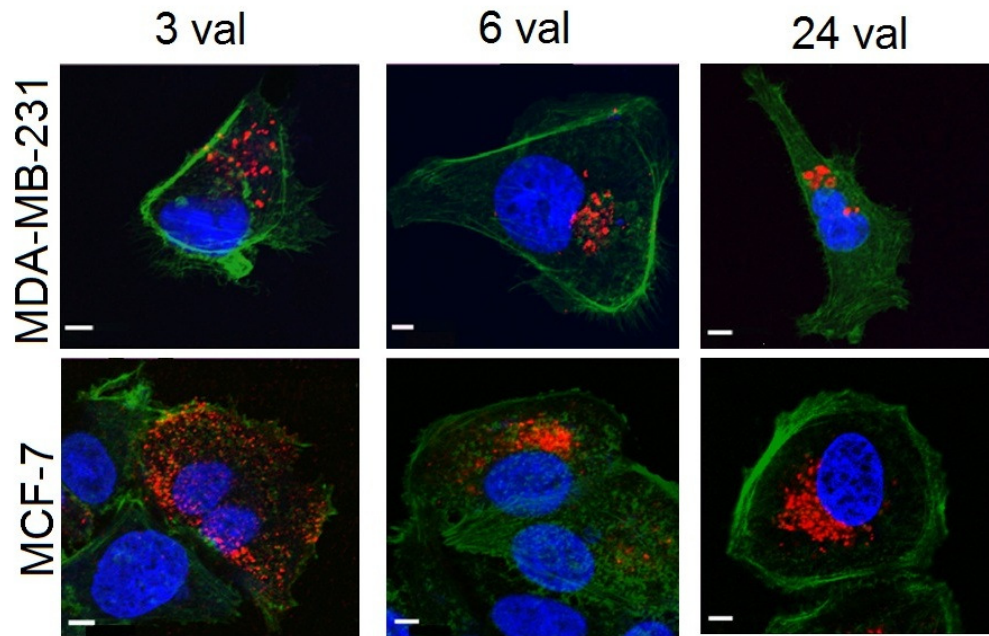
4.7.1.1 pav. MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių kamieniškumo tyrimai: CD44, CD24 ir EpCAM antigenų raiška (A), kolonijų formavimo efektyvumas (B) ir atsakas į chemoterapinio vaisto doksorubicino poveikį (C). Punktyrinės linijos žymi IC₅₀ koncentracijas.

3.7.1.1 paveikslo C dalyje pavaizduotos MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelių gyvybingumo kreivės, parodančios jų jautrumą chemoterapiniam vaistui doksorubicinui. Apskaičiuota, jog MDA-MB-231 ląstelėms doksorubicino IC₅₀ ≈ 0,14 µg/ml, o MCF-7 ląstelėms doksorubicino IC₅₀ ≈ 0,065 µg/ml, o tai reiškia, jog doksorubicino koncentracija, reikalinga sustabdyti pusės MCF-7 ląstelių proliferaciją, yra apie 2 karto mažesnė nei MDA-MB-231 ląstelėms.

Apibendrinant būtų galima padaryti išvadą, jog krūties vėžinių ląstelių linija MDA-MB-231 pasižymi vėžinėms kamieninėms ląstelės būdingomis savybėmis ir dėl to gali būti laikomos krūties vėžinių kamieninių ląstelių modeliu. Tokie rezultatai sutampa su kitų autorių pateiktais duomenimis. Galima aptikti ne vieną publikaciją, kurioje CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺ fenotipas priskirtas MDA-MB-231 ląstelėms [134, 135]. Gausu duomenų apie šio fenotipo ląstelių atsparumą chemoterapiniams vaistams, jonizuojančiai spinduliuotei ir padidintą invazyvumo potencialą [4, 134, 135]. Taip pat yra duomenų, jog MDA-MB-231 ląstelės formuoja kolonijas efektyviau nei MCF-7 ląstelės [136]. Visose šiose publikacijose pateikiama išvada, jog aptiktas CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺ fenotipas, būdingas kai kurioms ląstelių linijoms, sukuria galimybę išbandyti naujos kartos vaistus su vėžinėmis kamieninėmis savybėmis pasižyminčiu ląstelių tipu ir tokiu būdu įvertinti, ar vaistai yra tinkami šių ląstelių proliferacijos slopinimui bei sunaikinimui įgyvendinti.

4.7.2. Anti-CD44-KT nanodarinio kaupimasis krūties vėžinėse ląstelėse

Kvantinių taškų kaupimasis MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijose buvo įvertintas lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu po 3, 6 ir 24 valandų inkubacijos su CdSe/ZnS-(AMP/PEG)-COOH KT. Po inkubacijos bandiniai buvo fiksuojami, nudažomi ląstelių branduoliai ir citoskeletas. KT kaupiasi abiejose ląstelių linijose, jau po 3 valandų KT aptinkami ląstelių viduje, pūslelinėse struktūrose (4.7.2.1 pav.). Pradiniu laiko momentu KT pasiskirstę po visą ląstelę (3 val), vėliau lokalizuojasi arčiau branduolio (6-24 val.). Skirtumai tarp ląstelių linijų išryškėja tuomet, kai yra vertinamas viduje esančių pūslelių dydis: MDA-MB-231 formuoja 2,5-3 μm skersmens pūsleles, o MCF-7 formuoja iki 2,5 karto mažesnes 1-1,5 μm pūsleles.



4.7.2.1 pav. KT kaupimasis MCF-7 ir kamieninėmis savybėmis pasižyminčiose MDA-MB-231 ląstelėse po 3, 6 ir 24 valandų inkubacijos su KT. Vaizdai užregistruoti lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu. Skalė-5 μm . Raudona spalva žymi **KT**, mėlyna spalva žymi **branduolius** (dažas Hoechst 33428), žalia žymi **aktino gijas** (dažas Faloidinas).

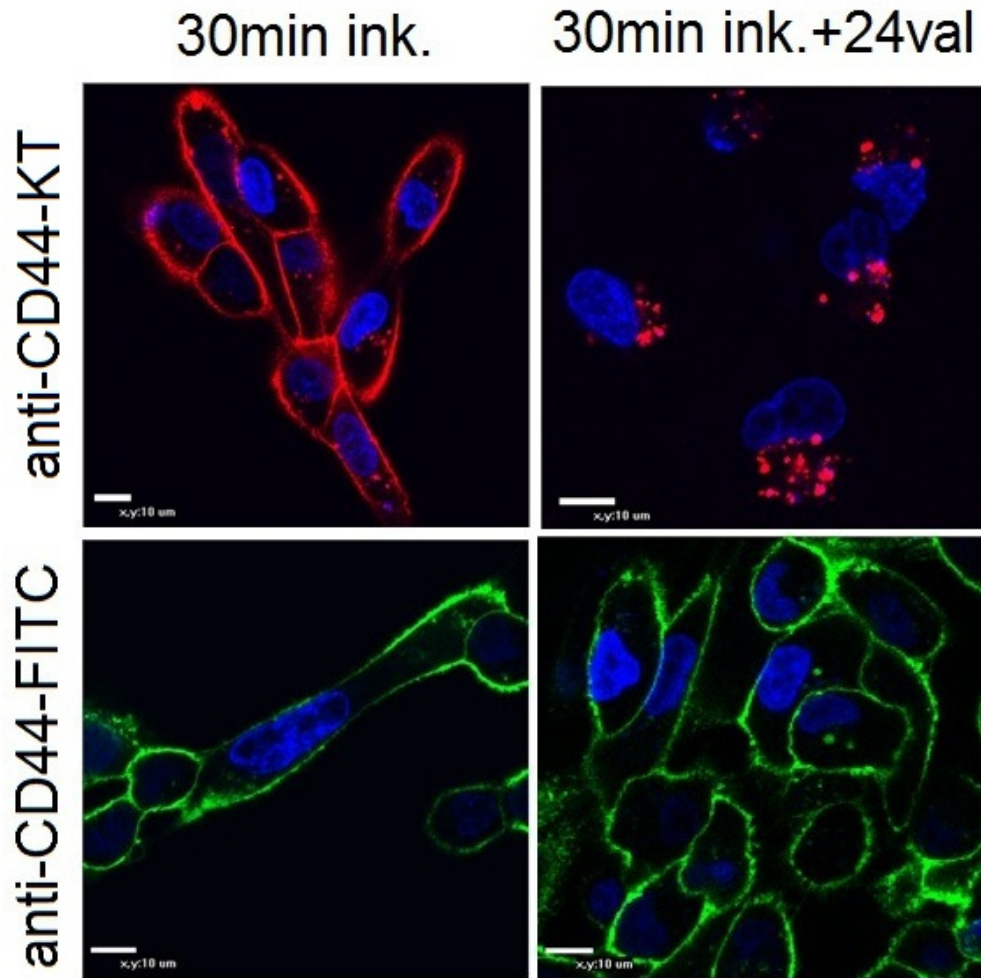
Literatūroje galima aptikti nemažai publikacijų, kuriose nagrinėjamas KT kaupimasis įvairaus tipo ląstelėse. Panašiai kaip ir pateiktuose mikroskopijos rezultatuose, taip ir literatūroje įvardijami KT pūslelių dydžio ir lokalizacijos pokyčiai esant skirtingoms inkubacijos trukmėms [129]. Šie skirtumai siejami su ląstelės metabolizmu. Teigiama, jog bėgant laikui ląstelė sulieja pūsleles, formuodama daugiapūslelinę struktūrą. Šios daugiapūslelinės struktūros nepasišalina iš ląstelės, tačiau ir netrukdo gyvybiniam procesams. Ląstelė toliau auga, o dalijimosi metu paskirsto viduje esančias KT pūsleles dukterinėms ląstelėms [137].

Iš ankstesnių tyrimo rezultatų yra žinoma, jog MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės skiriasi savo savybėmis. Viena iš ląstelės skiriančių savybių – CD44 paviršinio antigeno raiška. MDA-MB-231 ląstelėse CD44 raiška intensyvi, o MCF-7 ląstelėse – atvirkščiai – labai silpna. Taigi, šios dvi ląstelių linijos buvo

pasirinktos antikūnais prieš CD44 paviršinį antigeną dengtų KT selektyvaus kaupimosi tyrimams. Buvo tikimasi, jog antikūnais modifikuoti KT nesikaups/silpnai kaupsis ląstelėse, kurios pasižymi menka baltymo raiška. Taip pat buvo tikimasi, jog kaupimosi lokalizacija bus nulemta anti-CD44 kaupimosi mechanizmo ląstelėse.

MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelės buvo 30 min inkubuojamos su anti-CD44-FITC ir anti-CD44-KT. Tuomet ląstelės buvo vaizdinamos lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu dviem laiko momentais: iškart po 30 min inkubacijos ir praėjus 24 valandoms po 30 min inkubacijos. Kaip ir galima buvo tikėtis, abu antikūnų konjugatai (anti-CD44-FITC ir anti-CD44-KT) po 30 min inkubacijos kaupiasi ląstelių membranoje. Tačiau kaupimasis stebimas ne tik ląstelių plazminėje membranoje, matyti pavienės raudonos ir žalios pūslelės ląstelių viduje (4.7.2.2 pav.). Vadinasi anti-CD44-FITC ir anti-CD44-KT nedideliais kiekiais yra endocituojami į ląstelės vidų.

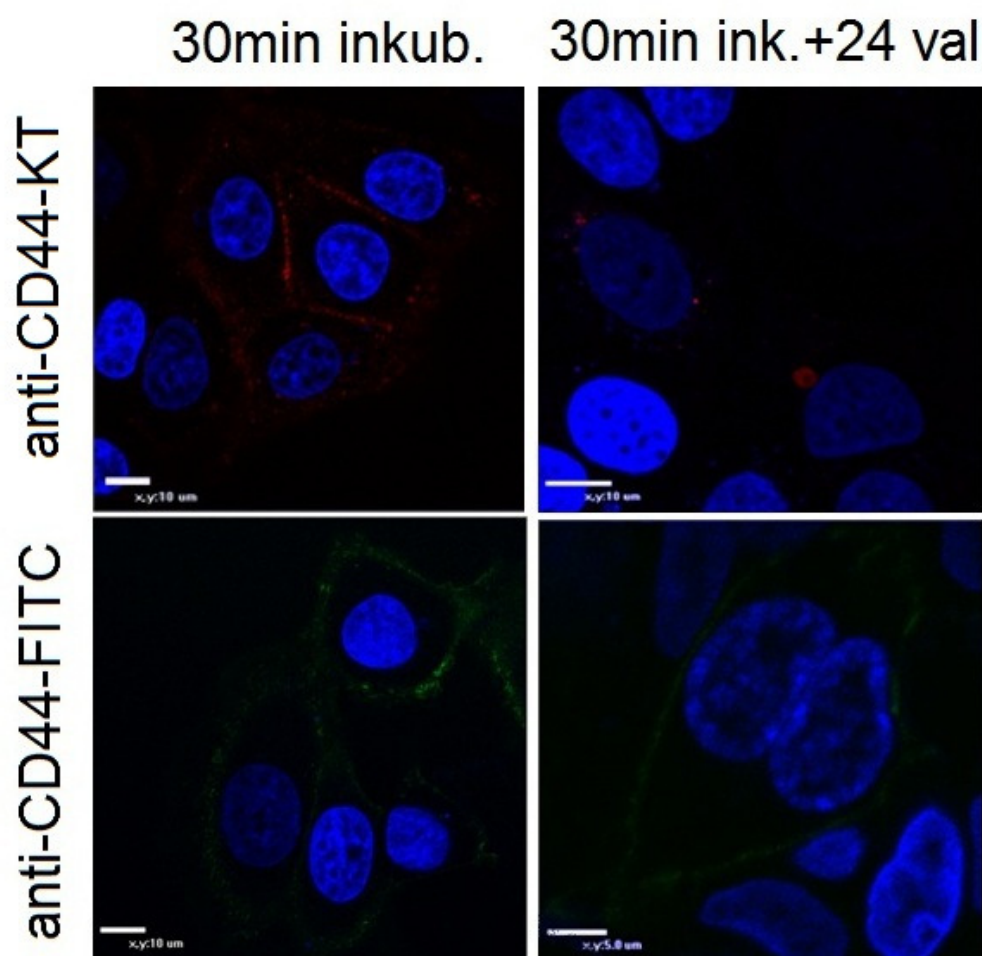
Praėjus 24 valandoms po 30 min inkubacijos, anti-CD44-KT konjugatas yra visiškai įtraukiamas į ląstelės vidų (4.7.2.2 pav.), tačiau anti-CD44-FITC žymuo lieka plazminėje membranoje, lygiai taip pat, kaip ir buvo iškart po 30 min inkubacijos. Tokie rezultatai netikėti, tačiau optimistiškai nuteikiantys, nes selektyvios terapijos tikslas yra įnešti terapinį agentą į ląstelės vidų. Jeigu anti-CD44-KT konjugatas liktų ląstelių išorėje, tuomet netektų prasmės terapinę funkciją atliekančio vaisto (sensibilizatorius, chemoterapinis vaistas) prikabinimas ant KT paviršiaus. Žinoma, vistiek išiktų nanodalelių – kvantinių taškų – panaudojimo ląstelių žymėjimui galimybė, nes jungimasis prie plazminės membranos yra pakankamas, kad ląstelė būtų “matoma” optinės biopsijos metodais.



4.7.2.2 pav. Anti-CD44-FITC ir anti-CD44-KT kaupimasis MDA-MB-231 ląstelėse po 30 min inkubacijos. Kairėje pusėje konfokalinės mikroskopijos vaizdai užregistruoti iškart po inkubacijos, dešinėje – praėjus 24 valandoms po inkubacijos. Skalė-10 μm . Raudona spalva žymi **anti-CD44-KT**, mėlyna spalva – **branduolius** (Hoechst 33428), žalia spalva – **anti-CD44-FITC**.

Siekiant išsiaiškinti, ar anti-CD44-KT selektyviai kaupiasi tik CD44 raiška pasižyminčiose ląstelėse, buvo atliktas analogiškas eksperimentas su MCF-7 ląstelių linija, kuri pasižymi menka CD44 antigeno raiška. Kaip matyti 4.7.2.3 paveiksle, iškart po 30 min inkubacijos su anti-CD44-FITC ir anti-CD44-KT, stebimas labai neryškus susikaupimas MCF-7 ląstelių membranoje (4.7.2.3 pav. kairė pusė), rodantis, jog anti-CD44 konjugatai beveik nesijungia

prie ląstelių, kurių membranoje menkas CD44 antigenų kiekis, todėl yra selektyvūs CD44⁺ ląstelėms.



4.7.2.3 pav. Anti-CD44-FITC ir anti-CD44-KT kaupimasis MCF-7 ląstelėse po 30min inkubacijos. Vienu atveju konfokalinės mikroskopijos vaizdai užregistruoti iškart po inkubacijos (kairėje), kitu atveju – praėjus 24 valandoms po inkubacijos (dešinėje). Raudona spalva žymi **anti-CD44-KT**, mėlyna spalva – **branduolius** (Hoechst 33428), žalia spalva – **anti-CD44-FITC**.

Po 24 valandų augimo ląstelėms įprastomis sąlygomis, per 30 minučių membranoje sukauptas nedidelis anti-CD44-KT kiekis endocituojamas į ląstelių vidų: matyti pavienės raudonos pūselės (4.7.2.3 pav. dešinė pusė), tačiau anti-CD44-FITC silpnas membraninis žymėjimas (žalias) išlieka nepakitęs.

Apibendrinant konfokalinės mikroskopijos rezultatus galima padaryti išvadą, jog anti-CD44-KT konjugatas selektyviai kaupiasi vėžinių kamieninių ląstelių citoplazmoje. Siekiant nanodalelių pritaikymo vėžio vaizdinimui ir sunaikinimui, šis rezultatas yra daug žadantis, nes sukuria prielaidą, jog prie anti-CD44-KT nanodarinio prijungtas terapinis vaistas būtų įtrauktas į ląstelės vidų. Standartiniai vėžio gydymo metodai neretai susiduria su vaistų patekimo į vėžines ląsteles problema, todėl nanodalelių panaudojimas galbūt galėtų pagerinti vaistų patekimo į ląsteles procesą: ne tik įtrauktų vaistą į ląstelės vidų, bet tai įvyktų selektyviai vėžinėse kamieninėse ląstelėse. Literatūroje pateikiami duomenys, kaip nanodalelės, modifikuotos bioaktyviomis molekulėmis, kiekybiškai daugiau kaupiasi ligandus turinčiose vėžinėse ląstelėse [21, 22, 138]. Tačiau nėra išanalizuota, kurioje tiksliai ląstelių vietoje kaupiasi tokie konjugatai. Nėra diskutuojama, ar prijungti vaistai patenka į gyvybiškai svarbias organėles. Nepaisant to, neretai yra parodomas gana efektyvus gydomasis nanodalelių konjugatų poveikis *in vivo* [8], navikai susitraukia ar net išnyksta.

4.8. Kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso kaupimasis, stabilumas ir fotosensibilizacinės savybės MiaPaCa2 vėžinėse ląstelėse

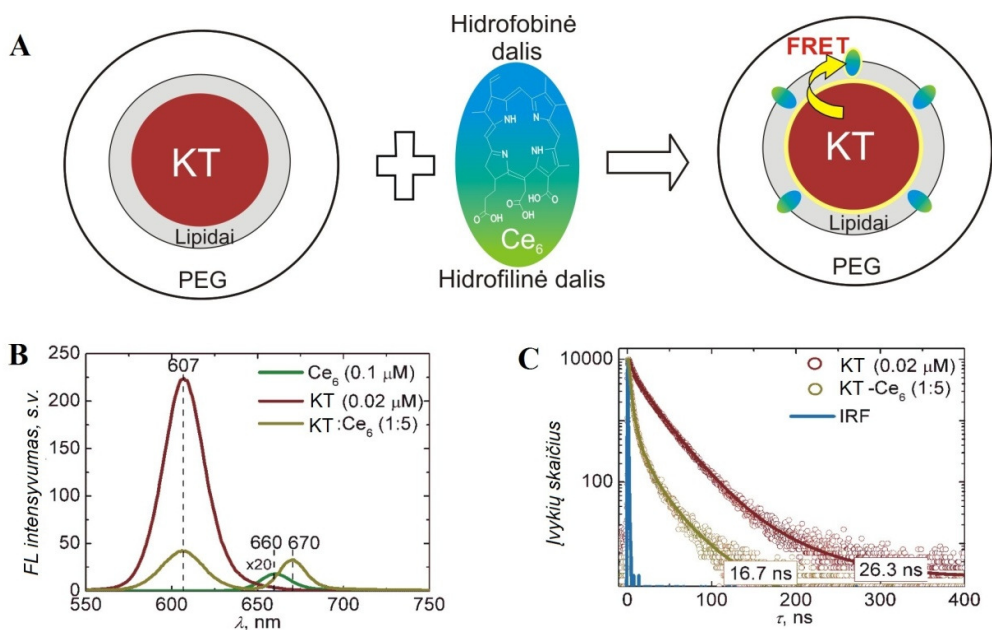
Kvantinio taško ir chlorino e_6 (KT- Ce_6) komplekso suformavimas – tai dviejų svarbių savybių – vaizdinimo ir terapijos – apjungimas į vieną nanodarinį. KT dėl savo unikalių optinių savybių yra tinkami biologinių objektų vaizdinimui [18, 73], o chlorinas e_6 yra antros kartos fotosensibilizatorius, taikomas fotodinaminėje terapijoje [139]. Valančiūnaitė su mokslininkų grupe atliko spektrinius tyrimus ir išsiaiškino, jog KT- Ce_6 komplekso susiformavimą lemia hidrofobinė sąveika tarp lipidinio KT dangalo ir polinės Ce_6 molekulės dalies [91]. Tačiau nebuvo aišku, ar, palyginti silpnos – hidrofobinės - sąveikos rišamas, KT- Ce_6 kompleksas išliks stabilus ląstelių viduje, kur gausu baltymų ir lipidų, galinčių „pasiūlyti“ konkurencinę hidrofobinę aplinką chlorino molekulėms. Taip pat nebuvo aišku, ar kaupsis

KT-Ce₆ kompleksas vėžinių ląstelių viduje ir ar bus sukelta sensibilizatoriaus Ce₆ nulemta ląstelių žūtis.

Kaip jau buvo minėta, KT ir Ce₆ molekules rišanti sąveika yra palyginti silpna, todėl, prieš atliekant tyrimus ląstelėse, buvo tikrinama spektroskopiškai, ar KT ir Ce₆ molekulės yra susijungusios į kompleksą. Žadinimo bangos ilgis pasirenkamas toks, kad tiesiogiai nesužadintų Ce₆ molekulių. KT ir Ce₆ spektrinės savybės yra gerai aprašytos literatūroje [91, 140]. Ce₆ sugerties spektras sudarytas iš intensyvios Soret sugerties juostos ties 403 nm ir keturių silpnesnių Q juostų, iš kurių intensyviausia Q(I) yra raudonojoje spektro srityje – 654 nm. KT sugertis apima didžiąją dalį regimosios spektro srities, tačiau mažėja einant link raudonosios spektro pusės ir užsibaigia ties 593 nm eksitonine juosta [91, 140]. Laisvų Ce₆ molekulių fluorescencijos juosta DPBS tirpale užregistruota ties 660 nm, laisvų KT FL juosta ties 607 nm.

Komplekso susiformavimo schema yra atvaizduota 4.8.1 paveikslo A dalyje. Kvantinių taškų šerdies ir apvalkalų dydis, Ce₆ molekulės dydis ir įsiterpimo vieta lipidiniame apvalkale yra nupiešti išlaikant mastelį, remiantis *Jennings* bei *Valanciunaite* ankstesniais tyrimų rezultatais [91, 141]. Sumaišius Ce₆ tirpalą su KT tirpalu yra stebimi pokyčiai jų FL spektruose. Įpylus Ce₆ į KT tirpalą, jų FL intensyvumas mažėja ir per kelias minutes nusistovi ties 40 s.v. verte (4.8.1 pav. B). Priešingi pokyčiai stebimi ties Ce₆ emisijos juosta: ji ima ryškėti, FL intensyvumas užauga nuo 0 s.v. iki 30 s.v. Tokie spektriniai pokyčiai rodo komplekso susiformavimą [91, 143]. Taip pat stebimas Ce₆ juostos batochrominis 10 nm poslinkis, siejamas su Ce₆ molekulės aplinkos keitimusi iš hidrofilinės į hidrofobinę [142].

Sumaišius Ce₆ ir KT tirpalą, atsiranda pokyčiai ir bandinio FL gesimo kreivėse (4.8.1 pav. C). Įpylus Ce₆ tirpalo, KT vidutinė FL gyvavimo trukmė sumažėja nuo 26,3 ns iki 16,7 ns. Pagal Fiorsterio rezonansinės energijos pernašos teoriją, vykstant energijos pernašai tarp donoro (KT) ir akceptorius

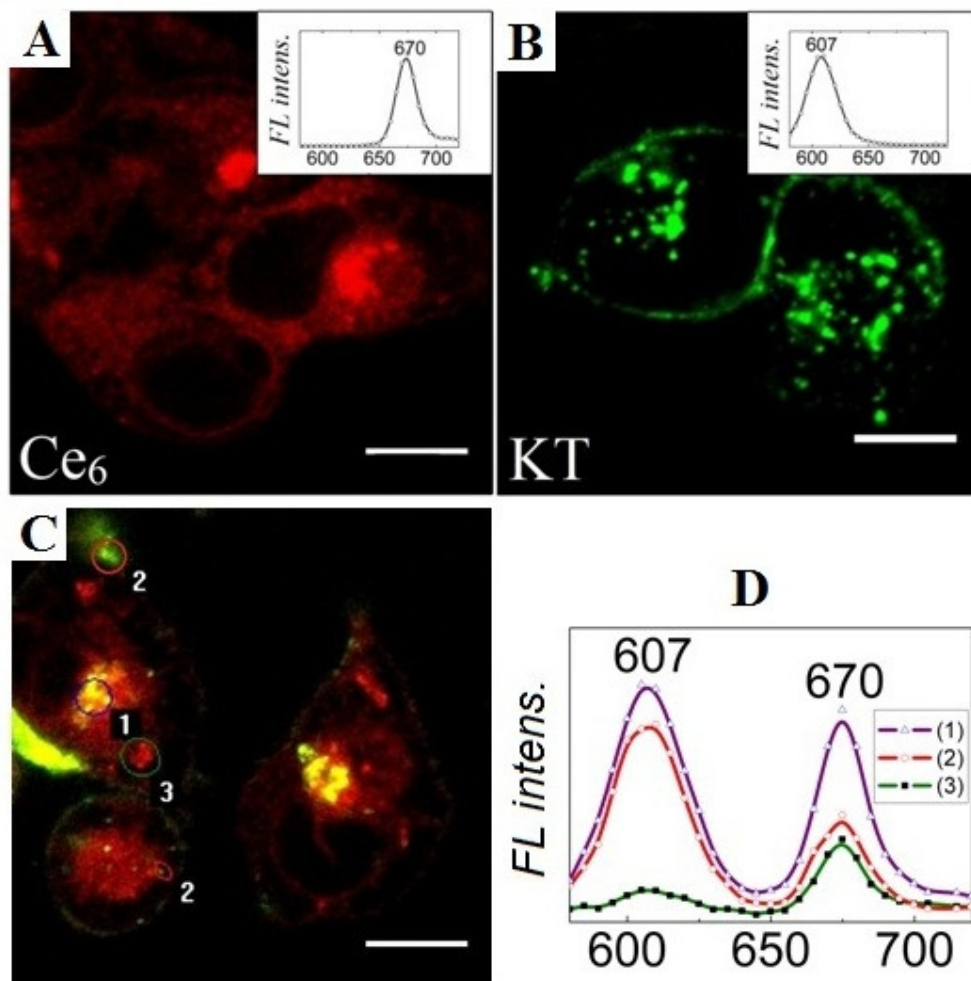


4.8.1 pav. KT-Ce₆ komplekso susiformavimo schema (A). KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ FL spektrai, kai KT:Ce₆ koncentracijų santykis 1:5 (B). Ce₆ emisijos spektro intensyvumas yra padaugintas 20 kartų ($\lambda_{\text{žad}} = 470 \text{ nm}$). KT ir KT-Ce₆ FL gesimo kreivės ($\lambda_{\text{žad}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{reg}} = 605 \text{ nm}$) atvaizduotos paveikslo C dalyje. IRF rodo prietaiso žadinančios spinduliuotės charakteristiką.

(Ce₆), donoro sužadintos būsenos gyvavimo trukmė sutrumpėja [114]. Tą ir rodo mūsų rezultatai, dėl to galima daryti išvadą, jog DPBS tirpale susidaro kompleksas ir vyksta energijos pernaša iš KT į Ce₆.

Norint iširti KT-Ce₆ kaupimąsi MiaPaCa2 vėžinėse ląstelėse, paruoštas ir spektroskopiškai patvirtintas KT-Ce₆ kompleksas buvo užpiltas ant ląstelių. Palyginamiesiems tyrimams, KT ir Ce₆ tirpalai buvo taip pat užpilti ant ląstelių atskiruose šulinėliuose. Iš mikroskopijos vaizdų matosi, jog Ce₆ molekulės kaupiasi MiaPaCa2 ląstelėse, pasiskirsto difuziškai visame ląstelės tūryje, išskyrus branduolio sritį (4.8.2 pav. A). Atlikta spektrinė analizė parodė, jog ląstelių viduje esančio Ce₆ emisijos juosta yra 10 nm pasislinkusi į raudonąją sritį ($\lambda_{\text{maks}}=670 \text{ nm}$) (4.8.2 pav. A, intarpas), lyginant su Ce₆ emisija tirpale ($\lambda_{\text{maks}}=660 \text{ nm}$) [140]. Ce₆ molekulės yra greitai reaguojančios į besikeičiančią tirpiklio aplinką, todėl tikėtina, jog šis poslinkis įvyko dėl Ce₆ sąveikos su

hidrofobinėmis ląstelių struktūromis: membranomis ir vandenyje netirpiomis baltymų dalimis [142, 144].

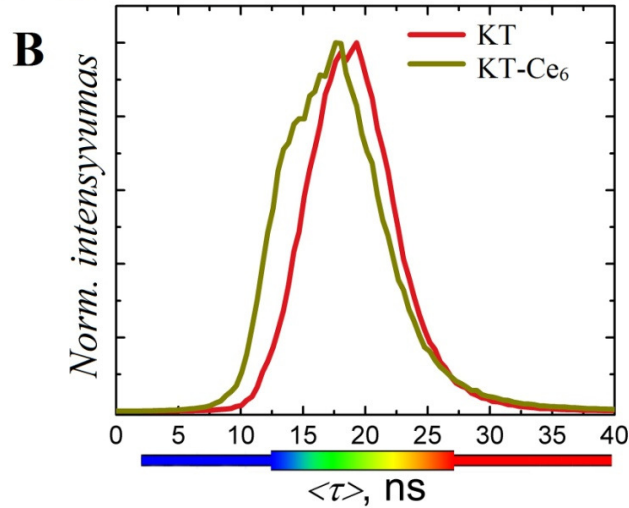
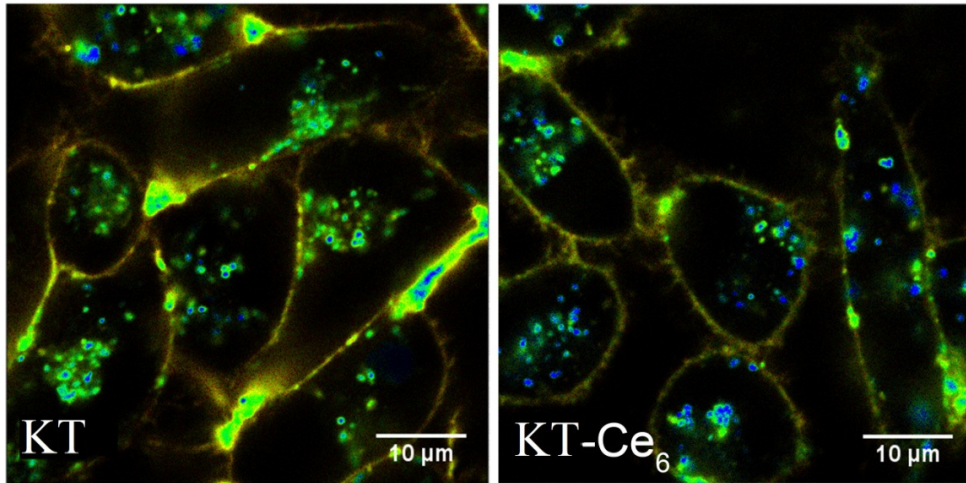


4.8.2 pav. Ce₆ (A), KT (B), ir KT-Ce₆ (C) kaupimasis žmogaus kasos vėžinėse ląstelėse MiaPaCa2. Vaizdai užregistruoti lazerine skenuojančia konfokaline sistema su spektrinio vaizdinimo priedu. Intarpuose pateikti vaizdų spektrai, D – paveikslo C dalies apibrėžtų sričių spektrai. Skalė-10 μm. Raudona spalva žymi Ce₆, žalia spalva – KT, geltona spalva rodo raudonos ir žalios emisijos kolokalizaciją.

Skirtingai nei Ce₆ molekulės, KT pasiskirto po ląstelę netolygiai, diskretinėmis struktūromis (4.8.2 pav. B). Daugiausiai KT susitelkę plazminėje membranoje ir endocitinėse pūslelėse. Po susikaupimo ląstelėse KT nerodė jokių spektrinių pokyčių (4.8.2 pav. B, intarpas). KT-Ce₆ komplekso susikaupimo ląstelėse

vaizdai atrodė itin spalvingi, demonstruodami KT ir Ce_6 emisiją, pažymėtą atitinkamai žalia ir raudona spalvomis, o geltonai išryškindami erdvėje sutampančias KT ir Ce_6 emisijos sritis (kolokalizaciją). Detalesnei analizei, žalios, geltonos ir raudonos sritys buvo apsibrėžtos, o jų spektrai atvaizduoti 4.8.2 paveikslo D dalyje. Matosi, jog visų spalvų apsibrėžtose srityse aptikta KT- Ce_6 komplekso emisija, tačiau ją sudarančių KT ir Ce_6 emisijos komponenčių intensyvumų santykiai skiriasi: geltonųjų sričių emisijos spektre (4.8.2 pav. D, 1 kreivė) matyti, jog KT: Ce_6 FL intensyvumų santykis yra panašus į vandeniniame DPBS tirpale užregistruotą jų santykį (4.8.1 pav. B), žaliųjų sričių emisijos spektre matyti, jog KT emisijos intensyvumas yra ženkliai didesnis nei Ce_6 , raudonosiose srityse stebimas atvirkščias, lyginant su žaliomis, KT ir Ce_6 intensyvumų santykis. Iš literatūros yra žinoma, kad KT FL gesinimas priklauso nuo prisijungusių Ce_6 molekulių skaičiaus: kuo daugiau prisijungusių molekulių, tuo daugiau nespindulinės relaksacijos kelių atsiveria donorui ir tai lemia jo FL intensyvumo sumažėjimą [91]. Dėl to galime teigti, jog matomose žaliose srityse KT- Ce_6 komplekso sudėtis yra iš dalies pasikeitusi, dalis Ce_6 molekulių galėjo atskilti ir prisijungti prie hidrofobinių ląstelės struktūrų. Tai patvirtina difuzinis raudonas pasiskirstymas, kuriame matyti gerokai intensyvesnė Ce_6 emisijos smailė (4.8.2 pav. D, 3 kreivė), galimai reiškianti KT- Ce_6 komplekso emisijos ir laisvo Ce_6 emisijos superpoziciją.

Norint išsiaiškinti, ar po patekimo į ląstelę KT- Ce_6 kompleksas pasižymėjo pagrindine svarbia savybe – energijos pernaša – buvo atlikta FL gyvavimo trukmių vaizdinimo mikroskopija. 4.8.3 paveiksle yra parodytas skirtingų KT FL gyvavimo trukmių pasiskirstymas ląstelėse. Kiekviena spalva reiškia tam tikrą konkrečią vidutinę FL gyvavimo trukmę, svyruojančią nuo 12 ns (mėlynos sritys) iki 27 ns (raudonos sritys) (4.8.3 pav. B dalies spalvų

A

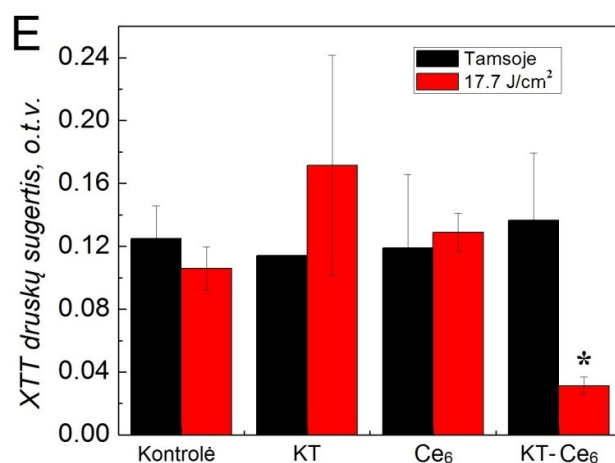
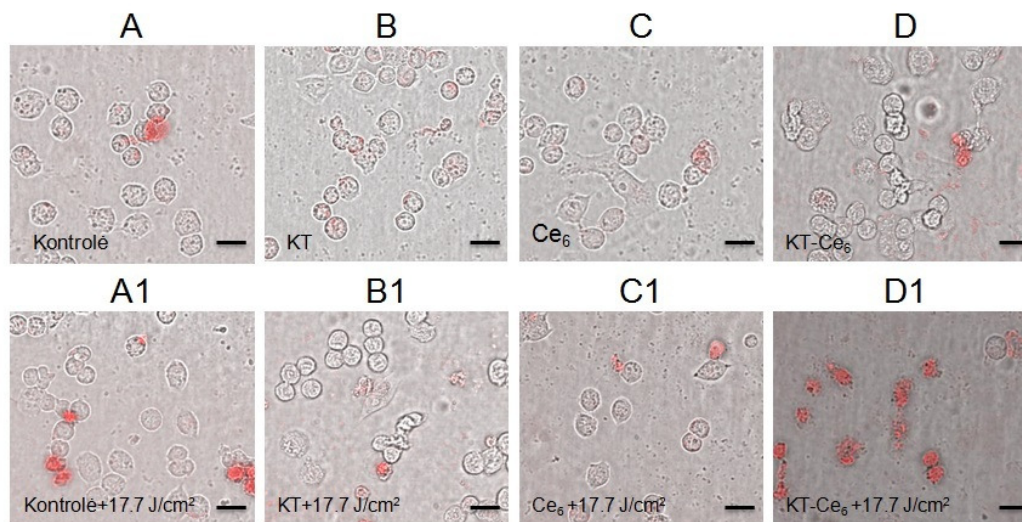
4.8.3 pav. KT ir KT-Ce₆ komplekso FL gyvavimo trukmių mikroskopijos vaizdai (A) MiaPaCa2 ląstelėse ($\lambda_{\text{zad}} = 404$ nm, filtras prieš detektorius – 578/110). (B) - visų vienoje nuotraukoje esančių taškų vidutinė KT ir KT-Ce₆ FL gyvavimo trukmė. FLIM nuotraukų spalvos žymi konkrečias vidutines gyvavimo trukmes, jų skalė pavaizduota B dalyje.

skalė). KT FL vidutinių gyvavimo trukmių ($\langle \tau \rangle$) vaizde matyti, jog plazminėje membranoje susikaupusių KT FL $\langle \tau \rangle$ yra ilgesnės nei ląstelių pūslelėse esančių KT (4.8.3 pav. A, kairėje). Panaši tendencija matoma ir greta esančiame KT-Ce₆ FLIM vaizde, tačiau skiriasi $\langle \tau \rangle$ vertės: ląstelių viduje esančių pūslelių KT-Ce₆ FL $\langle \tau \rangle$ vertės, pagal skalę reiškiančios 7-15 ns

trukmės, yra 1,5-2 kartus trumpesnės nei kairėje pusėje matomos KT pūslelės (15-20 ns).

Norint kiekybiškai įvertinti dviejų užregistruotų vaizdų (4.8.3 pav. A) FL $\langle\tau\rangle$ skirtumus, buvo nubraižytos histogramos, vaizduojančios visų vienoje nuotraukoje esančių $\langle\tau\rangle$ skirstinį (4.8.3 pav. B). Vidutinė dažniausiai pasitaikanti FL gyvavimo trukmė ląstelėse po inkubacijos su KT siekė 19 ns, o po inkubacijos su KT-Ce₆ kompleksu – 16 ns. KT FL gesimo trukmės sutrumpėjimas, kuris buvo stebimas ir anksčiau pateiktose KT-Ce₆ kinetikose DPBS tirpale (4.8.1 pav. C), yra siejamas su energijos pernaša iš KT į Ce₆ molekules. Energijos pernašos užregistravimas ląstelių viduje byloja ir apie KT-Ce₆ komplekso stabilumą. Jeigu vyksta energijos pernaša, vadinasi KT ir Ce₆ molekulės yra labai arti viena kitos, pagal FRET teoriją, ne toliau nei 10 nm [114].

Toliau buvo siekiama išsiaiškinti, ar KT-Ce₆ lokalizacija ląstelių membranoje ir pūslelėse yra tinkama, jog ant KT paviršiaus esančios Ce₆ molekulės sukeltų ląstelių žūtį. Tyrimams ląstelės buvo inkubuotos su KT-Ce₆ kompleksu ir apšvitintos 17,7 J/cm² 470 nm spinduliuote, kuri pataiko tik į KT sugertį. Po 24 valandų buvo įvertintas poveikis ląstelėms, panaudojant vėlyvų apoptotinių/nekrotinių ląstelių dažą propidžio jodidą, bei gyvybingumo ir proliferacijos testą XTT. Po poveikio su KT-Ce₆ kompleksu ir 470 nm spinduliuote, MiaPaCa2 ląstelių morfologija pasikeitė, daugumoje jų kaupėsi propidžio jodidas, žymintis žuvusias ląsteles (4.8.4 pav. D1). Visos kitos ląstelių grupės atrodė panašiai: jų morfologija tarpusavyje nesiskyrė, propidžio jodidu nudažytų ląstelių kiekis neviršijo 4 ląstelių (A, A1, B, B1, C, C1, D). Kiekybiniai ląstelių gyvybingumo ir proliferacijos rezultatai sutapo su mikroskopu užfiksuotais vaizdais: KT-Ce₆ paveiktos ir 470 nm spinduliuote apšvitintos ląstelės pasižymi ~4 kartus mažesniu gyvų ląstelių skaičiumi nei visos kitos tyrimo grupės (E).



4.8.4 pav. MiaPaCa2 ląstelių gyvybingumas ir proliferacija po fotosensibilizacinio poveikio su KT-Ce₆ kompleksu ir į Ce₆ sugerties minimumą pataikančia 470nm 17,7 J/cm² spinduliuote, kuri sužadina tik KT. Nuotraukose (**A**, **A1**, **B**, **B1**, **C**, **C1**, **D**, **D1**) pavaizduoti ląstelių šviesinės ir fluorescencinės mikroskopijos sulieti vaizdai. Skalė-10 μm. Raudona žymi **propidžio jodidą**. Histogramoje pateikta ląstelių gyvybingumo ir proliferacijos kiekybinė analizė (**E**). *P<0,05, lyginant su visomis kitomis bandinių grupėmis.

Apibendrinant kvantinio taško ir chlorino e₆ komplekso kaupimosi, energijos pernašos ir fotosensibilizacinių savybių tyrimus MiaPaCa2 vėžinėse

ląstelėse, galima teigti, jog KT-Ce₆ kompleksas per 3 valandas susikaupia vėžinių ląstelių endocitinėse pūslelėse, neprarasdamas gebėjimo perduoti šviesos energiją Ce₆ molekulėms. KT-Ce₆ lokalizacija ląstelėse ir energijos pernašos efektyvumas yra pakankami, jog būtų inicijuoti fotosensibilizaciniai vyksmai, pasibaigiantys vėžinių ląstelių žūtimi. Nors ląstelėse susikaupęs Ce₆ yra pasiskirstęs difuziškai, KT-Ce₆ kompleksas, panašiai kaip KT, kaupiasi ląstelių pūslelėse. Toks rezultatas gali būti paaiškintas tuo, jog KT yra gerokai didesnis darinys, nei Ce₆ molekulė (žr. 4.8.1 pav), ir dėl to komplekso kaupimasis ląstelėje yra nulemtas KT patekimo į ląstelę mechanizmu. Tiksliai KT-Ce₆ lokalizacija ląstelėje nebuvo tirta, tačiau literatūroje yra duomenų, įrodančių, jog KT kaupiasi lizosomose [132]. Tikėtina, kad panašiai gali lokalizuotis ir KT-Ce₆ kompleksas, bet tam reikia papildomų tyrimų.

Dviem skirtingais metodais buvo patvirtintas KT-Ce₆ komplekso stabilumas ląstelės viduje – spektrinio ir FL gyvavimo trukmių vaizdinimo metodais. Tačiau ląstelių viduje išmatuoti KT ir KT-Ce₆ komplekso spektrai tik iš dalies sutapo su rezultatais, gautais DPBS tirpale. Šį neatitikimą galėjo lemti KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ sąveika su ląstelės sudarančiomis molekulėmis. Yra manoma, jog sąveikos su molekulėmis metu atsiranda konkurenciniai nespinduliniai relaksacijos keliai, kurie ir lemia KT FL $\langle\tau\rangle$ sutrumpėjimą, lyginant su $\langle\tau\rangle$ vandeniniuose tirpaluose [145].

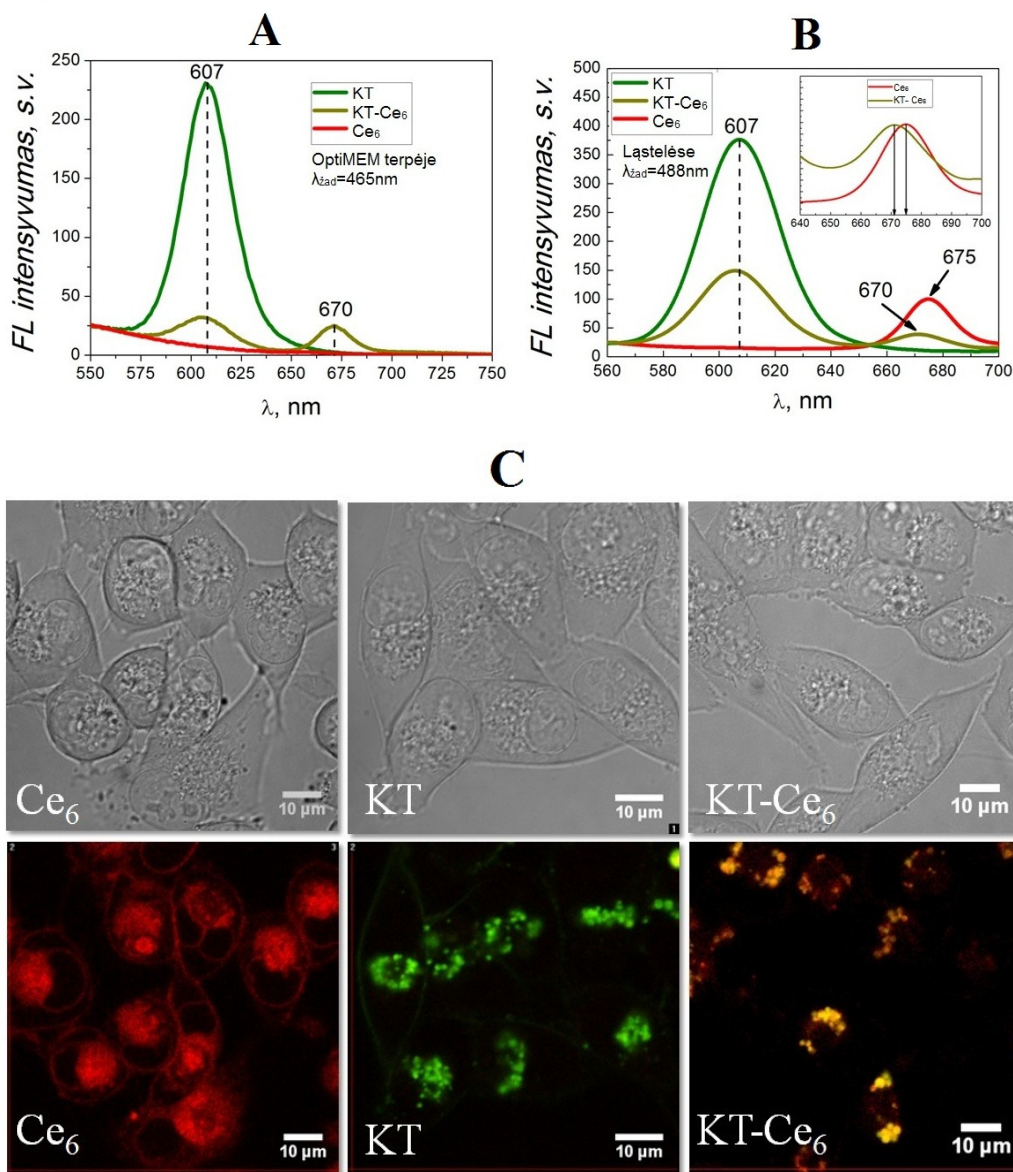
Kaip vieną iš svarbiausių rezultatų būtų galima įvardinti KT-Ce₆ sukeltą ląstelių žūtį žadinant Ce₆ molekules ne tiesiogiai, o per FRET mechanizmą. Pirmieji eksperimentai, kuriuose KT buvo panaudoti kaip sensibilizatorių energijos donoriai per FRET mechanizmą neorganiniuose tirpaluose, buvo pademonstruoti 2003 metais *Samia* ir jos bendražygių [23]. *Zenkevich* su kolegomis parodė, jog KT-sensibilizatoriaus nanojunginiai tirpaluose efektyviau generuoja ¹O₂ nei vien sensibilizatoriai [146]. Vėlesniuose tyrimuose parodytas kvantinio taško ir aliuminio ftalocianino komplekso susikaupimas vėžinėse ląstelėse bei FRET mechanizmo inicijuota ląstelių žūtis [92, 93].

4.9. Kvantinio taško ir chlorino e_6 kompleksas OptiMEM® mitybinėje terpėje: kiuvetėse ir *in vitro*

Siekiant priartinti atliekamus KT-Ce₆ komplekso tyrimus ląstelėse prie tyrimų gyvame organizme, buvo atliekami KT-Ce₆ komplekso kaupimosi ląstelėse tyrimai, tačiau nebe DPBS tirpale, o ląstelių mitybinėje terpėje OptiMEM®. DPBS tirpalo sudėtyje yra kalio, kalcio, natrio, magnio chloridai ir kitos druskos. OptiMEM® mitybinės terpės sudėtyje be jau paminėtų druskų aptinkama ir amino rūgščių, vitaminų, augimo faktorių, albuminų bei kitų baltymų [147]. Pirmiausia buvo spektroskopiškai patikrinta, ar KT-Ce₆ kompleksas formuojasi OptiMEM® terpėje. Vėliau suformuotas kompleksas užpiltas ant ląstelių, (tokie patys veiksmai atlikti su kontrolinėmis grupėmis (KT, Ce₆)), ir atliekamas vaizdinimas fluorescenciniu konfokalinio mikroskopu su spektriniu ir gyvavimo trukmių vaizdinimo priedais.

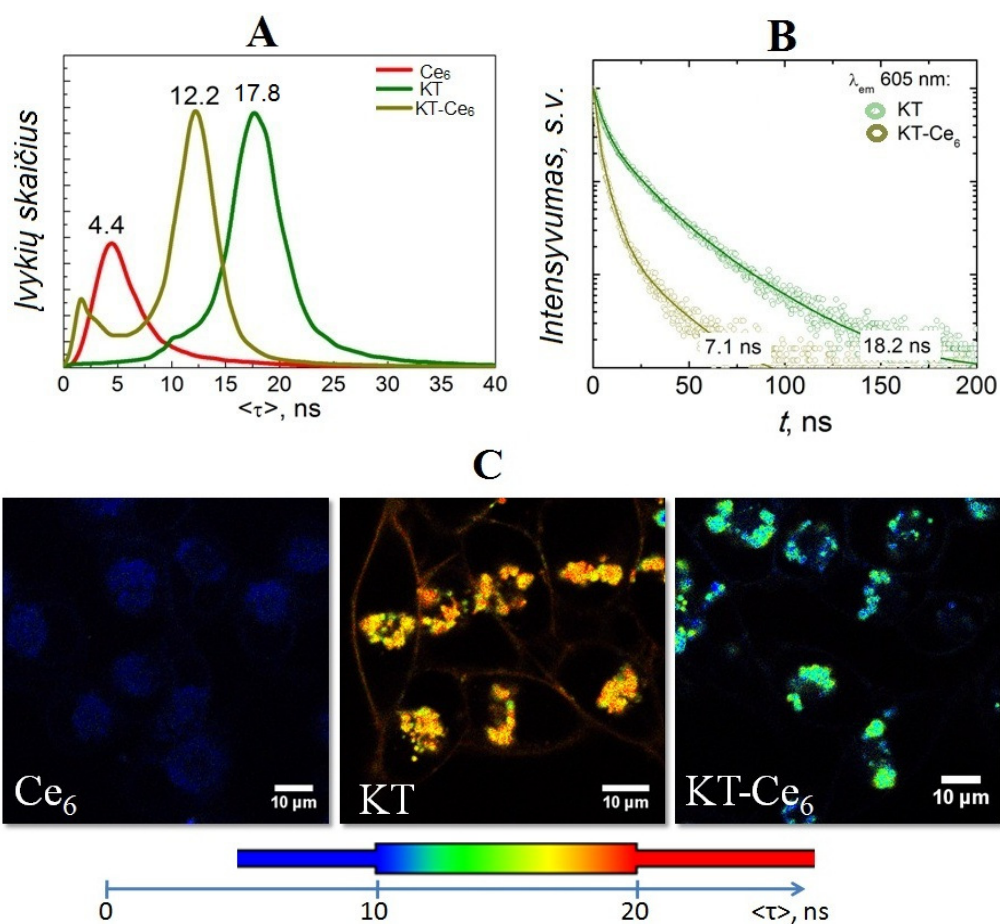
4.9.1 paveiksle, A dalyje pateikti KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ FL spektrai OptiMEM® terpėje, žadinant 465 nm. Tokia spinduliuotė pataiko į Ce₆ sugerties minimumą, todėl gryno Ce₆ emisija minimali, nesieka 5 s.v. Po KT ir Ce₆ sumaišymo, žadinant ta pačia spinduliuote, KT emisijos intensyvumas sumažėja, išryškėja Ce₆ emisijos smailė, ir tai yra vienas iš požymių, jog susiformavo KT-Ce₆ kompleksas [140, 143]. KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ užpylus ant ląstelių stebimas susikaupimas jose panašiai kaip buvo stebėta ankstesniame skyrelyje (žr. 4.8. skyrelį): Ce₆ kaupiasi difuziškai, o KT pasiskirsto po ląstelę diskrečiose pūslelėse (4.9.1 pav. C). KT-Ce₆ susikaupimas taip pat panašus į anksčiau užregistruotąjį: diskrečios geltonos pūslelės, rodančios KT ir Ce₆ emisijos kolokalizaciją (4.9.1 pav. C), tačiau paveiksle nesimato raudonų ir žalių emisijos sričių, galimai parodančių dalinai iširusio komplekso lokalizaciją. Toks rezultatas leidžia iškelti hipotezę, jog KT-Ce₆ kompleksas, inkubuojamas su ląstelėmis OptiMEM® terpėje, yra stabilesnis, nei KT-Ce₆ kompleksas DPBS terpėje.

Mikroskopo spektriniu priedu užregistruoti FL spektrai ląstelėse rodo, jog KT-Ce₆ kompleksas abiejų emisijų smailių maksimumų padėtys yra ties



4.9.1 pav. KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ FL spektrai OptiMEM® terpėje ($\lambda_{\text{žad}}=465\text{nm}$) (A) ir MiaPaCa2 ląstelėse ($\lambda_{\text{žad}}=488\text{ nm}$) (B). Intarpe atvaizduotas sunormuotas Ce₆ FL spektras. MiaPaCa2 ląstelių šviesiniai ir spektriniai konfokaliniai vaizdai (C) po 24 val. inkubacijos su KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ ląstelių augimo terpėje OptiMEM®. Raudona spalva žymi **Ce₆** emisiją, žalia spalva žymi **KT** emisiją, o geltona spalva žymi **kolokalizaciją**, t.y. sritis, kuriose raudona ir žalia spalvos erdvėje persikloja.

607 nm ir 670 nm, kaip ir tirpaluose (4.9.1 pav. A, B). KT emisijos smailės maksimumo padėtis tiek tirpaluose, tiek ląstelių viduje taip pat išliko nepakitusi. Įdomu tai, jog gryno Ce_6 smailės maksimumo padėtis 5 nm pasislinkusi į raudonąją pusę, lyginant su kompleksu Ce_6 smailės padėtimi. Deja, neužtenka prietaiso skyros, jog būtų galima patikimai teigti šį poslinkį esant. Spektrinio priedo pasirinkta gardelė spektrą leido registruoti 5 nm tikslumu. Ateityje būtų galima pasirinkti kitokią gardelę, kuri leistų spektrą išmatuoti 2,5 nm tikslumu ir taip įsitikinti dėl subtilių Ce_6 emisijos maksimumo poslinkių ląstelės viduje.

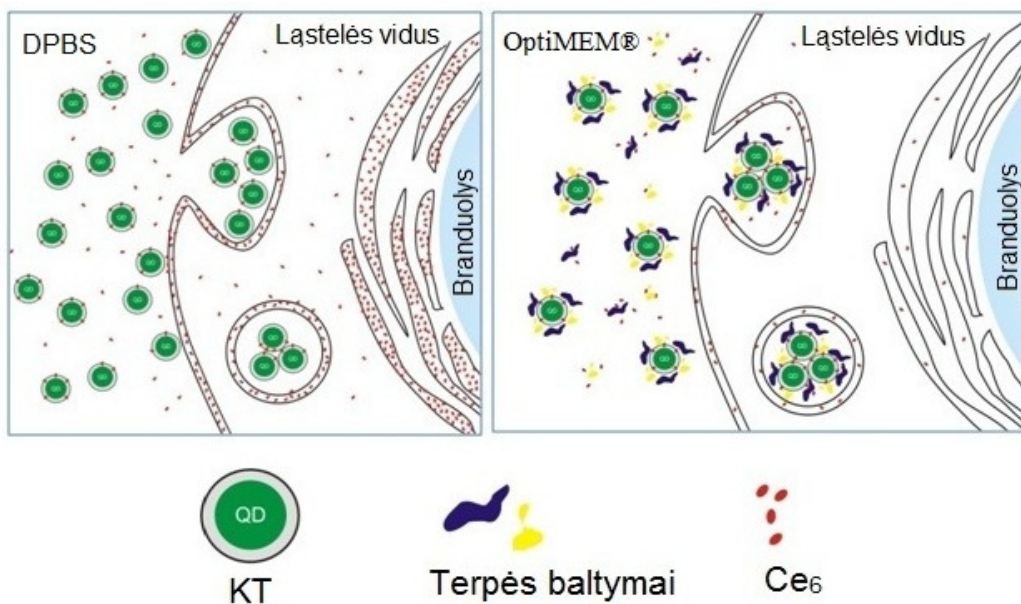


4.9.2 pav. KT, Ce_6 ir KT- Ce_6 FL gyvavimo trukmės MiaPaCa2 ląstelėse matuojant dviem metodikomis: FLIM metodika (A) ir pavienius fotonus fiksuojančio laikinės skyros FL spektrometru *Edinburgh* (B). MiaPaCa2 ląstelių FLIM vaizdai (C) po 24 val inkubacijos su KT, Ce_6 ir KT- Ce_6 ląstelių

augimo terpėje OptiMEM®. Apačioje pavaizduotos FLIM vaizde esančių spalvų vertės.

Norint patvirtinti iškeltą hipotezę, jog KT-Ce₆ kompleksas, suspenduotas OptiMEM® terpėje, yra stabilesnis nei DPBS, buvo išmatuotos KT, Ce₆ ir KT-Ce₆ FL gyvavimo trukmės ląstelėse dviem metodikomis: FLIM ir pavienius fotonus fiksuojančio laikinės skyros FL spektrometru *Edinburgh*. 4.9.2 paveiksle matyti užregistruotas KT ir KT-Ce₆ komplekso FL $\langle\tau\rangle$ MiaPaCa2 ląstelėse. KT pasižymi 17,8 ns FL $\langle\tau\rangle$, kuri yra beveik tokia pati kaip ir anksčiau užregistruotuose bandiniuose, inkubuotuose DPBS terpėje (žr. 4.8.3 pav.). KT-Ce₆ komplekso FL $\langle\tau\rangle$ siekia 12,2 ns ir yra ~4 ns trumpesnė, nei buvo užregistruota bandiniuose, inkubuotuose DPBS terpėje (žr. 4.8.3 pav.). Pagal ankstesnius rezultatus, KT-Ce₆ gesimo kinetika priklauso nuo prisijungusių Ce₆ molekulių skaičiaus [91]. Todėl trumpesnė KT-Ce₆ FL $\langle\tau\rangle$ ląstelėse gali reikšti, jog Ce₆ molekulių kiekis ant KT paviršiaus yra didesnis tose ląstelėse, kuriose inkubacijos metu buvo naudojama OptiMEM® mitybinė terpė. Šį rezultatą patvirtina atlikta kiekybinė FL $\langle\tau\rangle$ analizė *Edinburgh* spektrometru: ląstelių suspensijos FL $\langle\tau\rangle$ siekia ~7 ns. Tokia trukmė yra dar trumpesnė, nei buvo išmatuota FLIM metodika, ir tai dar kartą patvirtina hipotezę, jog ląstelių inkubacija su KT-Ce₆ OptiMEM® mitybinėje terpėje lemia stabilesnį kompleksą ląstelių viduje. Nedidelis KT-Ce₆ FL $\langle\tau\rangle$ verčių neatitikimas, matuojant 2 skirtingais prietaisais, gali būti susiję su matavimo metodikų skirtumais: FLIM metu matavimas atliekamas iš 7-10 ląstelių vienoje pasirinktoje konfokalinio mikroskopo plokštumoje, o *Edinburgh* spektrometru matavimas atliekamas iš milijono tirpale maišomų ląstelių 1 cm optinio kelio kiuvetėje. FLIM matavimo metu vienos ląstelės plokštumos registravimas greitai išblyškina Ce₆, dėl to matavimo metu gali vykti KT FL $\langle\tau\rangle$ ilgėjimas, kuris ir yra užregistruojamas bei patenka į bendrą statistinį pasiskirstymą. Dėl to gali būti gaunamos ne visai teisingos pailgėjusios KT-Ce₆ FL $\langle\tau\rangle$ komponentės bendroje histogramoje.

Apibendrinant būtų galima padaryti išvadą, jog KT-Ce₆ kompleksas kaupiasi MiaPaCa2 ląstelių viduje ir pasižymi energijos pernaša nepriklausomai nuo to, kokios sudėties vandeninėje terpėje atlikta inkubacija su ląstelėmis. Literatūroje yra nemažai duomenų, kurie teigia, jog nanodalelė, patekusi į baltymais prisotintą aplinką (mitybinę terpę, serumą), aplimpa jais, todėl aplink nanodalelę susiformuoja baltymų kompleksas, vadinamas *vainiku*



4.9.3 pav. KT-Ce₆ komplekso patekimo į ląsteles modelis, kai inkubavimas atliekamas DPBS terpėje (**kairėje**) ir OptiMEM® terpėje (**dešinėje**). Nubraižyta remiantis mokslinės literatūros duomenimis [148-151] ir gautais mikroskopijos rezultatais.

(angl. *corona*) [148, 149]. Nanodalelių aplipimas biologiniu vainiku yra energetiškai „naudingas“ nanodalei, todėl susidarantis *vainikas* yra gana stabilus ir, manoma, nedaug keičiasi nanodalelei judant tarp skirtingos biocheminės sudėties aplinkų [149]. Vis dar nėra žinoma, kas konkrečiai lemia baltymų vainiko tankumą ir sudėtį, tačiau tyrimuose su KT yra pastebėta, jog neigiamą krūvį ir amfifilinį dangalą turinčios nanodalelės aplimpa baltymais [151]. Komplekso formavimui naudojami KT taip pat turi neigiamą krūvį ir amfifilinį dangalą, todėl labai tikėtina, jog patalpinus į OptiMEM® terpę, KT

aplimpa įvairiais baltymais. Lygiai taip pat baltymais aplimpa ir KT-Ce₆ kompleksas (4.9.3 pav.). Toks baltymų apvalkalas gali padidinti KT-Ce₆ komplekso stabilumą. Hidrofobinės sąveikos dėka susiformavęs KT-Ce₆ kompleksas galimai tampa „įkalintas“ susiformavusioje proteosomoje, dėl to patenka į ląstelę išlaikydamas KT:Ce₆ molinį santykį, artimą šviežiai sumaišytam kompleksui. Netiesiogiai apie molinį santykį galime spręsti iš sutrumpėjusių KT-Ce₆ FL <τ> ląstelėse, lyginant su grytais KT [91]. Baltymų vainiko susiformavimo teigiami aspektai buvo pastebėti ir kitų autorių, kurie parodė, jog baltymais aplipę KT yra stabilesni tirpale, ilgesnį laiką išlieka nesuagregavę [152].

5. APIBENDRINIMAS

Šiame darbe, pagal literatūroje nurodytą vėžio kamieninių ląstelių aptikimo metodiką, buvo ištirtos krūties, kasos, kiaušidžių vėžio ir melanomos ląstelių savybės. Buvo rasti minėtų ląstelių paviršiaus žymenų ekspresijos skirtumai, jautrumo chemoterapiniams vaistams ir jonizuojančiai spinduliuotei skirtumai. Taip pat skyrėsi ląstelių gebėjimai formuoti navikus imunodeficitinėse pelėse ir atstatyti prieš rūšiavimą buvusią fenotipinę sudėtį. Nepaisant šių ląstelių skirtumų, kvantiniai taškai kaupėsi beveik vienodai visose ląstelėse. Toks rezultatas rodo, kad kvantiniai taškai galbūt geba įveikti vėžio kamieninėms ląstelėms būdingą daugiavaistinį atsparumą.

Pastaruoju metu vis dažniau mokslinėje literatūroje aptinkama duomenų apie nanodarinius, kurie selektyviai pažymėtų vėžines ląsteles ir jas sunaikintų, tačiau trūksta žinių apie tokių nanodarinių kaupimąsi ir lokalizaciją ląstelėse. Šiame darbe buvo įvertintas kvantinių taškų, kaip galimų diagnostiką ir terapiją atliekančių nanodarinių, kaupimosi ir lokalizacijos ląstelėse tyrimai. Buvo parodyta, jog antikūnais prieš paviršiaus antigeną CD44 padengti kvantiniai taškai selektyviai kaupiasi tik CD44⁺ fenotipo ląstelėse. Nors CD44 molekulė yra paviršinė, tačiau kvantiniai taškai laikui bėgant pateko į ląstelių vidų, išsidėstė pūslelinėse struktūrose. Ateityje atradus selektyvesnę vėžinėms kamieninėms ląstelėms būdingą membranos molekulę, būtų galima sukonstruoti prieš ją antikūną ir tikėtis, jog kvantiniai taškai, padengti tokiais antikūnais, taip pat pateks į vėžinių ląstelių vidų.

Kvantinio taško ir antikūno nanodarinis atrodo daug žadantis, tačiau tinkamas tik vėžinių ląstelių atpažinimui ir vaizdinimui. Norint atlikti vėžio terapiją, reikalinga papildoma molekulė, kuri inicijuotų vėžinių ląstelių žūtį. Šiame darbe buvo ištirta kvantinio taško ir, fotodinaminėje terapijoje naudojamo, sensibilizatoriaus chlorino e₆ nanodarinio kaupimasis vėžinėse ląstelėse ir atsakas į fotosensibilizacinį poveikį. Parodyta, jog toks nanodarinis lokalizuojasi pūslelėse ląstelių viduje ir sukelia tik tų ląstelių žūtį, kurioms pritaikytas apjungtas KT-Ce₆ komplekso ir 470 nm spinduliuotės poveikis.

Tokie rezultatai papildo prieš tai aptartus kvantinio taško padengto CD44 antikūnais kaupimosi ląstelėse rezultatus, parodo, jog galima kvantinį tašką ne tik selektyviai nukreipti į norimas ląsteles, bet taip pat ir įnešti į jų vidų norimą terapinę molekulę.

Kvantinio taško ir chlorino e_6 komplekso formavimasis bei kaupimasis ląstelėse buvo atliktas fiziologiniuose druskų tirpaluose, tačiau siekiant tęsti komplekso kaupimosi ir poveikio tyrimus *in vivo* sistemoje, buvo nuspręsta patikrinti, ar nanodarinio patalpinimas į baltymais ir vitaminais prisotintą mitybinę ląstelių terpę nepaveiks komplekso stabilumo. Rezultatai atskleidė, jog baltymai ir kiti terpės komponentai neišardo hidrofobinės sąveikos rišamo komplekso. Priešingai, KT-Ce₆ kompleksas, inkubuojant baltymais ir vitaminais prisotintoje terpėje, buvo stabilesnis, nei inkubacijos metu naudojant fiziologinį druskų tirpalą. Tai tik pirminiai rezultatai, atlikti modelinėje kraujotaką primenančioje sistemoje. Tačiau tokie rezultatai padrąsina tolimesniems KT-Ce₆ komplekso kaupimosi ir pasiskirstymo tyrimams sudėtingoje *in vivo* sistemoje.

6. IŠVADOS

1) Tėkmės citometrijos metodika parodyta, jog melanomos ląstelių FEMX-I CD44^{daug}CD133^{mažai/-} subpopuliacija geba atkurti pradinę, prieš rūšiavimą buvusią, sudėtį ir yra mažiau jautri jonizuojančiai spinduliutei, dėl to gali būti naudojama kaip vėžinių kamieninių ląstelių modelis priešvėžinių preparatų tyrimuose.

2) Vėžinės ląstelės, kurios yra skirtingos pagal jautrumą chemoterapiniam vaistui bei jonizuojančiai spinduliutei, paviršinių baltymų raišką, pagal gebėjimą diferencijuotis ir formuoti navikus *in vivo*, panašiais dėsningumais kaupia CdTe-MPA ir CdSe/ZnS-(AMP)-COOH kvantinius taškus: kvantiniai taškai patenka į ląstelių citoplazmą, išsidėsto pūslelinėse struktūrose aplink branduolį, o didinant KT koncentraciją, matomas didesnis KT fotoluminescencijos intensyvumas ląstelėse.

3) CdSe/ZnS-(AMP)-COOH KT yra intensyviau švytintys ir mažiau toksiški ląstelėms nei ZnS ir amfifilinio dangalo neturintys CdTe-MPA KT, dėl to yra tinkamesni vėžinių ląstelių vaizdinimui ir sekimui.

4) CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH kvantiniai taškai, konjuguoti su antikūnu prieš vėžinių kamieninių ląstelių antigeną CD44, selektyviai jungiasi tik prie CD44⁺ ląstelių ir yra įtraukiami į citoplazmą, priešingai nei organiniu dažu FITC žymėti analogiški antikūnai. Tai iš dalies rodo anti-CD44-KT nanodarinio gebėjimą įnešti prijungtą „krovinį“ selektyviai tik į taikiniu pasirinktų ląstelių vidų.

5) Lazerine skenuojančia konfokaline mikroskopija su spektriniu ir gyvavimo trukmių vaizdinimo priedu parodyta, jog CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT ir sensibilizatoriaus chlorino e₆ kompleksas per 3 valandas susikaupia vėžinių ląstelių membranoje ir endocitinėse pūslelėse, neprarasdamas gebėjimo perduoti sugertos šviesos energiją iš KT į Ce₆ molekules. Komplexo lokalizacija ląstelėse, stabilumas ir energijos pernašos efektyvumas yra pakankami, jog būtų sukelta fotosensibilizacinių vyksmų nulemta vėžinių ląstelių žūtis. Tai rodo KT gebėjimą aktyvuoti prie jo

prikabintą terapinį agentą ir tokiu būdu atlikti ne tik vaizdinimo, bet ir terapijos funkciją.

6) FL gyvavimo trukmių matavimai atskleidė, jog nekovalentiškai sujungtas CdSe/ZnS-(AML/PEG)-COOH KT ir Ce₆ nanodariny yra stabilesnis ląstelėse, kai inkubacija atliekama baltymais ir vitaminais prisotintoje, *in vivo* sistemą primenančioje terpėje, nei fiziologiniame druskų tirpale. Rezultatai atrodo daug žadantys būsimuose KT-Ce₆ komplekso tyrimuose, kurių metu bus įvertinamas jų diagnostinis ir terapinis potencialas *in vivo* aplinkoje.

7. PUBLIKACIJOS

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

1. S.Petrosiute, R.Purviniene, V.Pasukoniene, S.Lukoseviciute, P.Juzenas, R.Rotomskis. Characterization of cancer stem cells and their response to CdTe quantum dots. *Medical Physics in Baltic States 8; Proceedings of International conference, Kaunas, 2010; 8:71-76.*
2. S.Steponkiene, R.Purviniene, S.Kavaliauskiene, P.Juzenas, R.Rotomskis. Quantum dots affect expression of CD133 surface antigen in melanoma cells. *International Journal of Nanomedicine 2011; 6:2437–2444.*
3. A.Mlynska, V.Pašukonienė, R.Purvinienė, S.Steponkienė, A.Jagminas, R.Rotomskis. The effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) on human pancreatic and ovarian cancer cells. *Proceedings of International Conference “Medical Physics in the Baltic States”. Kaunas, Lithuania. 2012;10:31-36.*
4. R.Rotomskis, J.Valanciunaite, A.Skripka, S.Steponkiene, G.Spogis, S.Bagdonas, and G.Streckyte. Complexes of functionalized quantum dots and chlorin e(6) in photodynamic therapy. *Lithuanian Journal of Physics, 2013; 53(1): 57–68.*
5. S.Steponkiene, A.Skripka, J.Valanciunaite, R.Rotomskis. Cellular uptake and photosensitizing properties of quantum dot-chlorin e6 complex: in vitro study. *Journal of Biomedical Nanotechnology. 2014; 10(4):679-686.*

Dalyvavimas tarptautinėse ir šalies konferencijose

1. S.Petrosiute, R. Purviniene, P.Juzenas, R.Rotomskis. Cancer Stem-like Cells in FEMXI Culture and Their Response to CdTe Quantum Dots. Tarptautinė studentų ir jaunųjų mokslininkų konferencija „Chemija ir Cheminė technologija”, 2010, Vilniaus, Lithuania.

2. S.Petrošiūtė, R. Purvinienė, V. Pašukonienė, S. Lukoševičiūtė, P. Juzėnas, R. Rotomskis. Characterization of cancer stem cells and their response to CdTe quantum dots, International Conference “Medical Physics in the Baltic States”. 14 – 16 October 2010, Kaunas, Lithuania, 71-76 p.
3. S. Petrosiute, R. Purviniene, V.Pasukoniene, R. Rotomskis. Influence of Quantum Dots on expression of cancer stem cell markers ESA and CD44 in cancer cell line. International Conference “1st Advanced Summer School on Cancer/Regeneration Interface”, 20-24 June, 2011, Porto, Portugal, 54 p.
4. S. Steponkiene, S. Kavaliauskiene, P. Juzenas, R. Rotomskis. Cancer stem-like cells and their response to quantum dots. 14th European Society for Photobiology, 1-6 September, 2011, Geneva, Switzerland, 38 p.
5. J.Valanciunaite, S.Steponkiene, A.Skripka, M.Cernych, G.Streckyte, R.Rotomskis. Photosensitizing properties and accumulation in cancer cells of non-covalent quantum dot-chlorin e6 complex. 12th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, September 11-14, Strasbourg, France, 221 p.
6. D.Vasiliauskaitė, S.Steponkienė, R.Rotomskis. Kvantinių taškų kaupimosi ir poveikio tyrimas MiaPaCa2 ląstelėse. Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, Spalio 4-6 d.,2011, Vilnius, Lietuva.
7. D.Vasiliauskaite, S.Steponkiene, R.Rotomskis. Phototoxicity of CdTe quantum dots in MiaPaCa2 cancer cells. 6th International Scientific Conference „The Vital Nature Sign“. 1-4 June, 2012, Kaunas, Lithuania, 137 p.
8. A.Mlynska, V.Pašukonienė, R.Purvinienė, S.Steponkienė, A.Jagminas, R.Rotomskis. The effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) on human pancreatic and ovarian cancer cells. International Conference “Medical Physics in the Baltic States”. 8 – 10 November 2012, Kaunas, Lithuania, 31-36 p.
9. S.Steponkiene, J.Valanciunaite, A. Skripka, R. Rotomskis. Quantum dot-chlorin e6 complex for cancer diagnostics and treatment. International Conference “Nanomedicine 2013”. 11-12 April, 2013, Barcelona, Spain, 18 p.

10. R. Rotomskis, J. Valanciunaite, A. Skripka, S. Steponkiene, G. Spogis, G. Dauderis, V. Karabanovas, S. Bagdonas, V. Poderys (Vilnius, Lithuania). Photosensitizer-conjugated quantum dots for photodynamic therapy. 15th Congress of the European Society for Photobiology, Liège (Belgium), 2 - 6 September 2013, 104 p.
11. Steponkiene S, Valanciunaite J, Skripka A, Rotomskis R. Confocal spectral and lifetime imaging of quantum dot-chlorin e6 complex in living cancer cells. International Multidisciplinary Microscopy Congress, October 10-13, 2013, Turkey. Abstract book, p. 73.
12. D. Dapkute, S. Steponkiene, R. Rotomskis. Selective accumulation of quantum dots in breast cancer stem cells. Open Readings, March 19-21, 2014, Vilnius, Lithuania. Abstract book 47 p.
13. S. Steponkiene, R. Purviniene, S. Kavaliauskiene, P. Juzenas, R. Rotomskis. Cancer stem cells – a potential target in development of nanotechnology-based anticancer therapies. Nanotechnology: Research and Development, May 15-16, Vilnius, Lithuania. Abstract book 32 p.
14. D. Dapkute, S. Steponkiene. Selective accumulation of quantum dots in CD44+ breast cancer cells. Nanotechnology: Research and Development, May 15-16, Vilnius, Lithuania. Abstract book 85 p.
15. S. Bagdonas, J. Valanciunaite, A. Skripka, G. Spogis, S. Steponkiene, G. Streckyte. Complexation of a nanoparticle and a photosensitizer: implications for the photosensitized therapy. Nanotechnology: Research and Development, May 15-16, Vilnius, Lithuania. Abstract book 31 p.

Kitos konferencijos ne doktorantūros darbo tema

1. Ruta Araminaite, Vitalijus Karabanovas, Marija Ger, Mindaugas Valius, Simona Steponkiene, Ricardas Rotomskis. Targeting of Quantum Dots with Adaptor Protein Nck. 12th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, September 11-14, Strasbourg, France, 215 p.
2. D. Sabonis, V. Poderys, S. Steponkienė, R. Rotomskis. Au - JSA nanoklasterių spektrinių savybių ir kaupimosi vėžinėse ląstelėse tyrimai.

Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, Spalio 4-6 d.,2011, Vilnius, Lietuva, 125 p.

3. Zdanevičius J, Statkutė U, Svirskas K, Steponkienė S. GSM-900 korinio ryšio įtaisų kuriamos elektromagnetinės spinduliuotės poveikis gyviems organizmams. 40-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija; 2013 birželio 10-12; Vilnius, Lietuva., p.134 .

8. FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti šių projektų lėšomis:

- ERASMUS praktikos stipendija;
- Lietuvos ir Europos struktūrinių fondų projektas “Vėžio kamieninių ląstelių žymenys neinvazinei optinei diagnostikai ir gydymo taktikos parinkimui” (2010-2011);
- Lietuvos ir Europos struktūrinių fondų projektas “*In vitro* moduluotų ląstelių genominių ir funkcinių savybių panaudojimas individualizuotai terapijai onkologijoje” (2013-2015);
- Lietuvos, Latvijos ir Taivano trišalio bendradarbiavimo projektas “Mezenchiminių kamieninių ir vėžinių kamieninių ląstelių atsakas į nanodalelių poveikį” (2014-2016);
- Europos socialinių struktūrinių fondų projektas “Aukštos kvalifikacijos specialistų, atitinkančių valstybės ir visuomenės poreikius, biomedicinos srityje rengimo tobulinimas” (2010-2013).

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. *World Cancer Research Fund International*. 2014 [2014-05-07]; [Pasaulio sergančiųjų vėži 2012 metų statistika]. Available from: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/index.php.
2. Huang, E.H., et al., Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery*, 2007. 141(4): 415-9.
3. Liu, G., et al., Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 2006. 5: 67.
4. Phillips, T.M., W.H. McBride, and F. Pajonk, The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(24): 1777-85.
5. Malik, B. and D. Nie, Cancer stem cells and resistance to chemo and radiotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012. 4: 2142-9.
6. Zhou, Q., et al., A randomized multicenter phase II clinical trial of mitoxantrone-loaded nanoparticles in the treatment of 108 patients with unresected hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine*, 2009. 5(4): 419-23.
7. Burke, A.R., et al., The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Biomaterials*, 2012. 33(10): 2961-70.
8. Wang, C.H., et al., Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. *Nanomedicine*, 2011. 7(1): 69-79.
9. Goldthwaite, C.A., *Are Stem Cells Involved in Cancer?*, in *Regenerative Medicine*. 2006. p. 89-95.
10. Baumann, M., M. Krause, and R. Hill, Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(7): 545-54.
11. An, Y. and W.M. Ongkeko, ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009. 5(12): 1529-42.

12. Al Dhaybi, R., et al., Expression of CD133+ cancer stem cells in childhood malignant melanoma and its correlation with metastasis. *Mod Pathol*, 2010. 23(3): 376-80.
13. De Beca, F.F., et al., Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol*, 2013. 66(3): 187-91.
14. Chen, K., Y.H. Huang, and J.L. Chen, Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*, 2013. 34(6): 732-40.
15. Chen, J., et al., CD133 and CD44 are universally overexpressed in GIST and do not represent cancer stem cell markers. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. 51(2): 186-95.
16. Melancon, M.P., M. Zhou, and C. Li, Cancer theranostics with near-infrared light-activatable multimodal nanoparticles. *Acc Chem Res*, 2011. 44(10): 947-56.
17. Zrazhevskiy, P., M. Sena, and X. Gao, Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chem Soc Rev*, 2010. 39(11): 4326-54.
18. Alivisatos, A.P., W. Gu, and C. Larabell, Quantum dots as cellular probes. *Annu Rev Biomed Eng*, 2005. 7: 55-76.
19. Smith, A.M., et al., Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(11): 1226-40.
20. Juzenas, P., et al., Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(15): 1600-14.
21. Yang, K., et al., In-vivo imaging of oral squamous cell carcinoma by EGFR monoclonal antibody conjugated near-infrared quantum dots in mice. *Int J Nanomedicine*, 2011. 6: 1739-45.
22. Cai, W., et al., Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett*, 2006. 6(4): 669-76.
23. Samia, A.C., X. Chen, and C. Burda, Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc*, 2003. 125(51): 15736-7.

24. Idowu, M., J.Y. Chen, and T. Nyokong, Photoinduced energy transfer between water-soluble CdTe quantum dots and aluminium tetrasulfonated phthalocyanine. *New Journal of Chemistry*, 2008. 32(2): 290-296.
25. Shi, L.X., B. Hernandez, and M. Selke, Singlet oxygen generation from water-soluble quantum dot-organic dye nanocomposites. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. 128(19): 6278-6279.
26. McClay, D.R., Gastrulation. *Curr Opin Genet Dev*, 1991. 1(2): 191-5.
27. Lobo, N.A., et al., The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. 23: 675-99.
28. Pierce, G.B. and C. Wallace, Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res*, 1971. 31(2): 127-34.
29. Bonnet, D. and J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997. 3(7): 730-7.
30. Guan, Y., B. Gerhard, and D.E. Hogge, Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2003. 101(8): 3142-9.
31. Al-Hajj, M., et al., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(7): 3983-8.
32. Singh, S.K., et al., Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004. 432(7015): 396-401.
33. Tarnok, A., H. Ulrich, and J. Boci, Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*, 2010. 77(1): 6-10.
34. Natarajan, T.G. and K.T. FitzGerald, Markers in normal and cancer stem cells. *Cancer Biomark*, 2007. 3(4-5): 211-31.
35. Moserle, L., et al., Side population and cancer stem cells: therapeutic implications. *Cancer Lett*, 2010. 288(1): 1-9.
36. Lopez, J., et al., Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*, 2012. 12: 48.

37. Alvero, A.B., et al., Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle*, 2009. 8(1): 158-66.
38. Monzani, E., et al., Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer*, 2007. 43(5): 935-46.
39. Li, C., et al., Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007. 67(3): 1030-7.
40. Kang, M.K., et al., Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci*, 2008. 9: 15.
41. Sheridan, C., et al., CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 2006. 8(5): R59.
42. Nagaraja, G.M., et al., Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene*, 2006. 25(16): 2328-38.
43. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., Melanoma. *N Engl J Med*, 2006. 355(1): 51-65.
44. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2012. 62(1): 10-29.
45. Frank, N.Y., et al., ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 2005. 65(10): 4320-33.
46. Lee, N., S.R. Barthel, and T. Schatton, Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Lab Invest*, 2014. 94(1): 13-30.
47. Jemal, A., et al., Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, 2004. 54(1): 8-29.

48. Ding, Q., et al., Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Cell*, 2012. 25(1): 1-8.
49. Kallifatidis, G., et al., Sulforaphane increases drug-mediated cytotoxicity toward cancer stem-like cells of pancreas and prostate. *Mol Ther*, 2011. 19(1): 188-95.
50. Wei, H.J., et al., Expression of CD44, CD24 and ESA in pancreatic adenocarcinoma cell lines varies with local microenvironment. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2011. 10(4): 428-34.
51. Ji, Q., et al., MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One*, 2009. 4(8): e6816.
52. Ferrandina, G., et al., Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2008. 18(3): 506-14.
53. Baba, T., et al., Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene*, 2009. 28(2): 209-18.
54. Silva, I.A., et al., Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res*, 2011. 71(11): 3991-4001.
55. Luo, L., et al., Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. *Exp Mol Pathol*, 2011. 91(2): 596-602.
56. Harrison, D.E. and C.P. Lerner, Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood*, 1991. 78: 1237-1240
57. Domen, J., K.L. Gandy, and I.L. Weissman, Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood*, 1998. 91(7): 2272-82.
58. Zhou, S., et al., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 2001. 7(9): 1028-34.

59. Reya, T., et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001. 414(6859): 105-11.
60. Nakai, E., et al., Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer Invest*, 2009. 27(9): 901-8.
61. Dou, J., et al., Using ABCG2-molecule-expressing side population cells to identify cancer stem-like cells in a human ovarian cell line. *Cell Biol Int*, 2011. 35(3): 227-34.
62. Diehn, M. and M.F. Clarke, Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(24): 1755-7.
63. Yin, H. and J. Glass, The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PLoS One*, 2011. 6(9): e24080.
64. Kim, Y.S., M.J. Kang, and Y.M. Cho, Low production of reactive oxygen species and high DNA repair: mechanism of radioresistance of prostate cancer stem cells. *Anticancer Res*, 2013. 33(10): 4469-74.
65. Betancourt, T., B. Brown, and L. Brannon-Peppas, Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine (Lond)*, 2007. 2(2): 219-32.
66. Hu, C.M., S. Aryal, and L. Zhang, Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Ther Deliv*, 2010. 1(2): 323-34.
67. Sanvicens, N. and M.P. Marco, Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*, 2008. 26(8): 425-33.
68. Huang, H.C., et al., Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J Control Release*, 2011. 155(3): 344-57.
69. Sinha, R., et al., Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(8): 1909-17.
70. Voura, E.B., et al., Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med*, 2004. 10(9): 993-8.

71. Qu, L. and X. Peng, Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *J Am Chem Soc*, 2002. 124(9): 2049-55.
72. Hines, M.A. and G.-S. G., Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-Capped CdSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry*, 1996. 100(2): 468-471.
73. Medintz, I.L., et al., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*, 2005. 4(6): 435-46.
74. Rizvi, S.B., et al., Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging. *Nano Rev*, 2010. 1.
75. Chen, L.D., et al., The biocompatibility of quantum dot probes used for the targeted imaging of hepatocellular carcinoma metastasis. *Biomaterials*, 2008. 29(31): 4170-6.
76. Gao, X., et al., In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(8): 969-76.
77. Snyder, E.L., et al., Identification of CD44v6(+)/CD24- breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies. *Lab Invest*, 2009. 89(8): 857-66.
78. Kim, S., et al., Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(1): 93-7.
79. Obonyo, O., et al., Quantum dots synthesis and biological applications as imaging and drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol*, 2010. 30(4): 283-301.
80. Chen, M.L., et al., Quantum dots conjugated with Fe₃O₄-filled carbon nanotubes for cancer-targeted imaging and magnetically guided drug delivery. *Langmuir*, 2012. 28(47): 16469-76.
81. Oleinick, N.L., R.L. Morris, and T. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2002. 1(1): 1-21.
82. Schuitmaker, J.J., et al., Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1996. 34(1): 3-12.

83. Pushpan, S.K., et al., Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2002. 2(2): 187-207.
84. Ormond, A.B. and H.S. Freeman, Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 2013. 6: 817-840.
85. Samia, A.C.S., X.B. Chen, and C. Burda, Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. 125(51): 15736-15737.
86. Bakalova, R., et al., Quantum dots as photosensitizers? *Nature Biotechnology*, 2004. 22(11): 1360-1361.
87. Dayal, S., et al., Observation of non-Förster-type energy-transfer behavior in quantum dot-phthalocyanine conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. 128(43): 13974-13975.
88. Zenkevich, E., et al., Photophysical properties of self-aggregated porphyrin: Semiconductor nanoassemblies. *International Journal of Photoenergy*, 2006.
89. Orlova, A.O., et al., Spectral-Luminescence Study of the Formation of QD-Sulfophthalocyanine Molecule Complexes in an Aqueous Solution. *Optics and Spectroscopy*, 2008. 105(5): 726-731.
90. Medintz, I.L. and H. Mattoussi, Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys Chem Chem Phys*, 2009. 11(1): 17-45.
91. Valanciunaite, J., et al. Complex of water-soluble CdSe/ZnS quantum dots and chlorin e6: interaction and FRET. in *Laser Applications in Life Sciences*. 2010 2010. 7376.
92. Yaghini, E., et al., Fluorescence lifetime imaging and FRET-induced intracellular redistribution of Tat-conjugated quantum dot nanoparticles through interaction with a phthalocyanine photosensitizer. *Small*, 2014. 10(4): 782-92.

93. Li, L., et al., Quantum dot-aluminum phthalocyanine conjugates perform photodynamic reactions to kill cancer cells via fluorescence resonance energy transfer. *Nanoscale Res Lett*, 2012. 7(1): 386.
94. Frasco, M.F. and N. Chaniotakis, Semiconductor quantum dots in chemical sensors and biosensors. *Sensors (Basel)*, 2009. 9(9): 7266-86.
95. Rzigalinski, B.A. and J.S. Strobl, Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. 238(3): 280-8.
96. True, L.D. and X. Gao, Quantum dots for molecular pathology: their time has arrived. *J Mol Diagn*, 2007. 9(1): 7-11.
97. Hoshino, A., S. Hanada, and K. Yamamoto, Toxicity of nanocrystal quantum dots: the relevance of surface modifications. *Arch Toxicol*, 2011. 85(7): 707-20.
98. Lovric, J., et al., Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med (Berl)*, 2005. 83(5): 377-85.
99. Kulvietis, V., G. Streckyte, and R. Rotomskis, Spectroscopic investigations of CdTe quantum dot stability in different aqueous media. *Lithuanian Journal of Physics*, 2011. 51(2): 163-171.
100. Cho, S.J., et al., Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*, 2007. 23(4): 1974-80.
101. Liu, L., et al., In vitro and In vivo Assessment of CdTe and CdHgTe Toxicity and Clearance. *J Biomed Nanotechnol*, 2008. 4(4): 524-528.
102. Sun, D., et al., Study on effect of peptide-conjugated near-infrared fluorescent quantum dots on the clone formation, proliferation, apoptosis, and tumorigenicity ability of human buccal squamous cell carcinoma cell line BcaCD885. *Int J Nanomedicine*, 2010. 5: 401-5.
103. Muller-Borer, B.J., et al., Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnology*, 2007. 5: 9.
104. Valizadeh, A., et al., Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Res Lett*, 2012. 7(1): 480.

105. Peng, L., et al., Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. *Biomaterials*, 2013. 34(37): 9545-58.
106. Yong, K.T., et al., Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies. *Chem Soc Rev*, 2013. 42(3): 1236-50.
107. Fodstad O, K.I., Aamdal S, Extrapulmonary, tissue-specific metastasis formation in nude mice injected with FEMX-I human melanoma cells. *Cancer Research*, 1988. 48: 4382-4388.
108. Biosciences, B. *User Protocol*. 2010; Available from: http://www.bdbiosciences.com/ecat/txDetailedTable.jsp?size=20&item=744851&form=formNavigator&action=LIST_PAGE&pageItem=40.
109. Sigma-Aldrich. *User Protocol*. 2014; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&N=0+14574647&mode=partialmax&focus=product&lang=en®ion=LT>.
110. Petrosiute, S., et al. Characterization of cancer stem cells and their response to CdTe quantum dots in MEDICAL PHYSICS IN THE BALTIC STATES 8 (2010). 2010. Kaunas, Lithuania 2010. 8: p. 71-76.
111. Roehm, N.W., et al., An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*, 1991. 142(2): 257-65.
112. Plumb, J.A., *Cell Sensitivity Assays: Clonogenic Assay*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, S.P. Langdon, Editor. 2003. p. 159-164.
113. Morton, C.L. and P.J. Houghton, Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*, 2007. 2(2): 247-50.
114. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. 2006, New York: Springer. xxvi, 954 p.
115. Nikon. *Confocal Microscopy: Spectral Imaging and Linear Unmixing*. 2014; Available from: <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/spectralimaging.html>.
116. PicoQuant. *Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)*. 2014; Available from: <http://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-lifetime-imaging-flim>.

117. Schnell, U., et al., Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat Methods*, 2012. 9(2): 152-8.
118. Steponkiene, S., et al., Quantum dots affect expression of CD133 surface antigen in melanoma cells. *Int J Nanomedicine*, 2011. 6: 2437-44.
119. Gisina, A.M., et al., Subpopulation of colorectal adenocarcinoma cells co-expressing CD133 and cancer stem cells markers of other tumors. *Bull Exp Biol Med*, 2012. 152(6): 739-42.
120. Shah, B., et al., Labeling and imaging of human mesenchymal stem cells with quantum dot bioconjugates during proliferation and osteogenic differentiation in long term. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2006. 1: 1470-3.
121. Burgos-Ojeda, D., B.R. Rueda, and R.J. Buckanovich, Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett*, 2012. 322(1): 1-7.
122. Han, X., et al., A2780 human ovarian cancer cells with acquired paclitaxel resistance display cancer stem cell properties. *Oncol Lett*, 2013. 6(5): 1295-1298.
123. Foster, R., R.J. Buckanovich, and B.R. Rueda, Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness. *Cancer Lett*, 2013. 338(1): 147-57.
124. Olempska, M., et al., Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007. 6(1): 92-7.
125. Kim, M.P., et al., ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*, 2011. 6(6): e20636.
126. Bao, Q., et al., Cancer stem cells in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*, 2010. 2(3): 1629-41.
127. Grabolle, M., et al., Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties. *Anal Chem*, 2009. 81(15): 6285-6294.
128. Michalet, X., et al., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 2005. 307(5709): 538-44.

129. Damalakiene, L., et al., Intracellular distribution of nontargeted quantum dots after natural uptake and microinjection. *Int J Nanomedicine*, 2013. 8: 555-68.
130. Qian, J., et al., Imaging pancreatic cancer using surface-functionalized quantum dots. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007. 111(25): 6969-6972.
131. Generalov, R., et al., Entrapment in phospholipid vesicles quenches photoactivity of quantum dots. *Int J Nanomedicine*, 2011. 6: 1875-88.
132. Zhang, L.W. and N.A. Monteiro-Riviere, Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake. *Toxicological Sciences*, 2009. 110(1): 138-155.
133. Aguiar, D.J., W. Knudson, and C.B. Knudson, Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp Cell Res*, 1999. 252(2): 292-302.
134. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(2): R25.
135. Hwang-Verslues, W.W., et al., Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One*, 2009. 4(12): e8377.
136. Li, S., et al., MicroRNA-132 is frequently down-regulated in ductal carcinoma in situ (DCIS) of breast and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Pathology Research and Practice*, 2013. 209(3): 179-183.
137. Pi, Q.M., et al., Degradation or excretion of quantum dots in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*, 2010. 10: 36.
138. Galanzha, E.I., J.W. Kim, and V.P. Zharov, Nanotechnology-based molecular photoacoustic and photothermal flow cytometry platform for in-vivo detection and killing of circulating cancer stem cells. *J Biophotonics*, 2009. 2(12): 725-35.
139. Istomin, Y.P., et al., Photodynamic therapy of cervical intraepithelial neoplasia grades II and III with Photolon. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2010. 7(3): 144-51.

140. Steponkiene, S., et al., Cellular uptake and photosensitizing properties of quantum dot-chlorin e6 complex: in vitro study. *J Biomed Nanotechnol*, 2014. 10(4): 679-86.
141. Jennings, T.L., et al., Reactive semiconductor nanocrystals for chemoselective biolabeling and multiplexed analysis. *ACS Nano*, 2011. 5(7): 5579-93.
142. Frolov, A.A., et al., Chlorin e6-liposome interaction. Investigation by the methods of fluorescence spectroscopy and inductive resonance energy transfer. *J Photochem Photobiol B*, 1990. 7(1): 43-56.
143. Rotomskis, R., et al., Complexes of Functionalized Quantum Dots and Chlorin E(6) in Photodynamic Therapy. *Lithuanian Journal of Physics*, 2013. 53(1): 57-68.
144. Mojzisova, H., et al., The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1768(2): 366-74.
145. Zhang, Y., et al., Photoluminescence decay dynamics of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells under microexcitation. *Small*, 2008. 4(6): 777-80.
146. Zenkevich, E.I., et al., Quantitative Analysis of Singlet Oxygen ($O_2(^1O_2)$) Generation via Energy Transfer in Nanocomposites Based on Semiconductor Quantum Dots and Porphyrin Ligands. *Journal of Physical Chemistry C*, 2011. 115(44): 21535-21545.
147. LifeTechnologies. *Opti-MEM® I Reduced Serum Media*. 2014; Available from: <http://www.lifetechnologies.com/lt/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/opti-mem.html>.
148. Monopoli, M.P., et al., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol*, 2012. 7(12): 779-786.
149. Monopoli, M.P., et al., Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2011. 133(8): 2525-2534.

150. Tenzer, S., et al., Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano*, 2011. 5(9): 7155-67.
151. Rucker, C., et al., A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2009. 4(9): 577-80.
152. Poderys, V., et al., Interaction of Water-Soluble CdTe Quantum Dots with Bovine Serum Albumin. *Nanoscale Res Lett*, 2011. 6.

10. Gyvenimo, mokslinės, kūrybinės veiklos aprašymas



Vardas (-ai) Pavardė (-és)	Simona Steponkienė (buvusi - Petrošiūtė)
El. paštas(-ai)	simona.steponkiene.lt@gmail.com simona.steponkiene@nvi.lt
Pilietybė	Lietuvių
Gimimo data	1986-03-13
Lytis	moteris
Mokslinė patirtis	
Datos	2010 08 – dabar
Profesija arba pareigos	Jaunesnioji mokslo darbuotoja
Pagrindinės veiklos ir atsakomybės	Įvairių nanodalelių (kvantinių taškų, aukso nanoklasterių, magnetinių nanodalelių) kaupimosi bei šviesinio ir tamsinio poveikio tyrimai <i>in vitro</i> . Gyvybingumo, klonogeniškumo ir išgyvenimo tyrimai. Vėžinių kamieninių ląstelių aptikimas ir charakterizavimas. Ląstelių kultivavimas, fenotipavimas, tėkmės citometrija, spektroskopija, konfokalinė mikroskopija.
Darbovietės pavadinimas ir adresas	Vilniaus universiteto Onkologijos institutas Mokslinių tyrimų centras P. Baublio g 3b.,LT-08406, Vilnius
Datos	2010 02 01 – 2010 04 30

Profesija arba pareigos	Praktikantė pagal programą „Erasmus Praktika“
Pagrindinės veiklos ir atsakomybės	Vėžinių ląstelių liniją sudarančių subpopuliacijų atsakas į kombinacinę nanodalelių ir jonizuojančios spinduliuotės terapiją. Ląstelių gyvybingumo nustatymas kolorimetriniais metodais, darbas su tėkmės citometru, konfokaliniu mikroskopu. Įvairių žmogaus ląstelių linijų kultyvavimas, eksperimentų planavimas, žodinis ir rašytinis rezultatų pristatymas.
Darbovietės pavadinimas ir adresas	Vėžio mokslinių tyrimų institutas Norvegijos Radžio ligoninė prie Oslo universitetinės ligoninės Ullernchaussen 70, Montebello, Oslas, Norvegija.
Datos	2009 09 – 2010 06
Profesija arba pareigos	Vyresnioji specialistė
Pagrindinės veiklos ir atsakomybės	Kvantinių taškų kaupimosi bei šviesinio ir tamsinio poveikio tyrimai in vitro. Mia-PaCa-2 ląstelių kultivavimas, spektroskopija, konfokalinė mikroskopija, tėkmės citometrija.
Darbovietės pavadinimas ir adresas	<u>ES ir Norvegijos grantas Nr. 2004-LT0036-IP-1NOR.</u> Vilniaus universitetas Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius
Datos	2009 07 – 2009 09
Profesija arba pareigos	Praktikantė pagal programą „Studentų mokslinė praktika“
Pagrindinės veiklos ir atsakomybės	Mikrosatelitų nestabilumo (MSI) nustatymas paveldimo nepolipozinio storosios žarnos vėžio (HNPCC) mėginiuose naudojant didelės skiriamosios gebos lydymosi (HRM) analizės metodą. DNR išskyrimas, polimerazės grandininės reakcijos, elektroforezė.

Darbovietės pavadinimas ir adresas	Vilniaus universiteto Santariškių klinikos, Hematologijos, Onkologijos ir Transfuziologijos centras Santariškių g. 2, Vilnius, Lietuva
Datos	2007 09 – 2008 11
Profesija arba pareigos	Projektų vadybininkė
Pagrindinės veiklos ir atsakomybės	Įmonės visų dokumentų administravimas, registravimas „Axapta“ sistemoje. Klientų aptarnavimo centro valdymas, pasiūlymų klientams rengimas. Darbuotojų darbinimas, biuro reikmenų aprūpinimas, dalyvavimas posėdžiuose dėl įmonės strategijos ir ženklo kūrimo.
Darbovietės pavadinimas ir adresas	Informacinių technologijų įmonė – UAB 8k Verkių g. 29, 8 korp., LT-09108 Vilnius
Išsilavinimas	
Datos	2010 spalio – dabar
Doktorantūros kryptis	Biofizika
Disertacijos tema	Nanodarinių poveikio vėžinėms kamieninėms ląstelėms tyrimai
Įstaigos, kurioje įgytas išsilavinimas, pavadinimas ir tipas	Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius
Datos	2004 rugsėjis – 2008 birželis
Kvalifikacija	Fizikos bakalauro kvalifikacinis laipsnis (Modernių technologijų fizika ir vadyba)
Bakalauro baigiamojo darbo tema	GaBiAs netiesinės optinės sugerties tyrimas z-skenavimo metodu

Įstaigos, kurioje įgytas išsilavinimas, pavadinimas ir tipas | Vilniaus universitetas, Fizikos fakultetas
Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius

Datos | 2000 rugsėjis – 2004 birželis
Įstaigos, kurioje įgytas išsilavinimas, pavadinimas ir tipas | Kauno technologijos universiteto gimnazija
Studentų g. 65, Kaunas, Lietuva

Asmeniniai gebėjimai

Gimtoji kalba | **Lietuvių**
Užsienio kalbos

*	Supratimas		Kalbėjimas		Rašymas	
Anglų	C 1	Įgudęs vartotojas	C 1	Įgudęs vartotojas	C 1	Įgudęs vartotojas
Vokiečių	A 2	Pradedantysis vartotojas	A 1	Pradedantysis vartotojas	A 2	Pradedantysis vartotojas
Rusų	A 2	Pradedantysis vartotojas	A 1	Pradedantysis vartotojas	A 2	Pradedantysis vartotojas

Socialiniai gebėjimai | Lengvai prisitaikanti tarptautinėje aplinkoje, geri bendravimo įgūdžiai, gebėjimas dirbti dinamiškame kolektyve.

Darbas kompiuteriu | MS Office, Origin Lab, Statistica, ImageJ, Corel Draw, FlowJo.
Susipažinus su: Matlab, HTML, Turbo Pascal.

Vairuotojo pažymėjimas | B kategorija nuo 2004 m.