

Nanodariniai diagnostikai ir gydymui: nanomedicinos link

Ričardas Rotomskis^{1,2}, Giedrė Streckytė¹, Vitalijus Karabanovas¹

Vilniaus universiteto ¹Lazerinių tyrimų centras, ²Onkologijos institutas

Raktažodžiai: nanodalelės, priešvėžiniai vaistai, vaistų pernaša, puslaidininkiniai kvantiniai taškai, fluorescencinis vaizdinimas.

Santrauka. Nanotechnologijos apima plačią mokslinių tyrinėjimų ir technologijų kūrimo sritį, kurios objektas – labai mažų dydžių – nuo 1 iki 100 nm struktūros. Šios srities mokslininkai kuria daugiafunkčius nanodalelių darinius, kurie taikomi medicinoje ligoms diagnozuoti bei gydyti. Tyrimų duomenimis, tikslingas priešnavikinių vaistų pristatymas į konkrečius taikinius ląstelėse ar audiniuose gali būti pasiektas patalpinus vaistus į nanodaleles. Įkapsuliuoti į nanodaleles citostatikai veikia veiksmingiau ir sukelia mažiau šalutinių poveikių. Puslaidininkiniai kvantiniai taškai yra nanodalelės, pasižyminčios unikaliomis fotocheminėmis ir fotofizikinėmis savybėmis. Jų fluorescencija keliomis eilėmis intensyvesnė nei įprastų fluoroforų, o fluorescencijos juostos siauros. Prie kvantinių taškų kovalentiniais ryšiais prijungus biologinio atpažinimo molekules, tokias kaip peptidai, antikūnai ar nukleorūgštys, juos galima tikslingai nukreipti į taikinius ląstelėse ar audiniuose ir taip gauti fluorescencinius vaizdus. Taikant kvantinius taškus, fluorescencinio vaizdinimo jautrumas, lyginant su įprastais organiniais fluoroforais, padidėja nuo 10 iki 100 kartų. Šioje apžvalgoje aptariamas nanodalelių taikymas navikų diagnostikai ir gydymui, taip pat kvantinių taškų taikymas biomedicinoje ląstelėms ir audiniams atvaizduoti.

Įvadas

Šių dienų onkologijoje naudojami keturi pagrindiniai kovos su vėžiu metodai: chirurginis navikų šalinimas, chemoterapija, spindulinė terapija ir pastaraisiais metais pradėta diegti į klinikinę praktiką fotosensibilizuota navikų terapija. Siekiant veiksmingo gydymo, įvairūs metodai ir metodikos derinami tarpusavyje, ieškoma naujų būdų ir cheminių junginių, kurie veiksmingai veiktų navikines ląsteles ir kuo mažiau kenktų sveikoms. Tačiau, nepaisant mokslininkų ir medikų pastangų, kova su navikinėmis ligomis išlieka didelė problema, o mirčių skaičius nuo navikinių ligų tebėra antroje vietoje po širdies ir kraujagyslių ligų.

Viena pagrindinių šiandieninio onkologijos mokslo problemų – selektyvaus navikinio darinio pašalinimo ar sunaikinimo būdo radimas. Chemoterapiniai vaistai nėra selektyvūs naviko atžvilgiu ir neigiamai veikia visą žmogaus organizmą. Spinduliai, naudojami navikams švitinti, taip pat nėra selektyvūs, todėl gydant spindulinės terapijos metodu, pažeidžiami ir aplinkiniai sveiki audiniai. Vienas iš radikaliausių metodų yra chirurginis, tačiau ir chirurgai turi daug problemų, šalindami arti pažeidimams jautrių vietų esantį naviką. Be to, norint užtikrinti sėkmingą operaciją, tenka šalinti ir prie naviko esančius sveikus audinius. XX a. aštuntajame dešimtmetyje sukurtas naujas navikinių

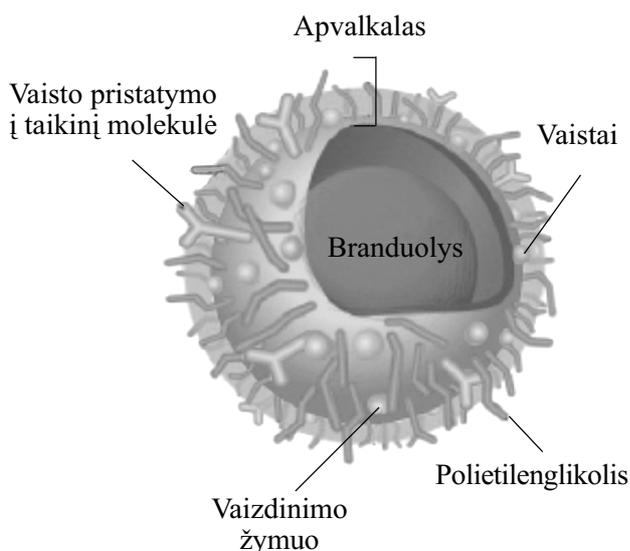
ligų gydymo metodas – sensibilizuota navikų terapija (literatūroje dažnai vadinamas fotodinamine terapija) pasižymi selektyvumu navikiniams dariniams, tačiau jo taikymą riboja daugelis kitų veiksnių (1, 2). Todėl ir toliau mokslininkų onkologų ir kitų sričių specialistų tyrinėjimų objektas – naujų veiksmingų priešvėžinių vaistų bei metodų paieška.

Į pagalbą medikams ateina naujausios technologijos. Atrodo, ypač perspektyvios yra nanotechnologijos. Gal dauguma hipotezių kol kas dar atrodo fantastiškos ir nelabai realios, tačiau pastaraisiais metais pasirodžiusių šia tema mokslinių straipsnių autoriai jau siūlo realų nanotechnologijų taikymą sprendžiant kai kurias medicinos problemas.

Nanotechnologijoms priskiriamos tyrinėjimų ir technologijų sritys, kurių objektas – struktūrų, įrankių ar sistemų, jeigu jų matmenys yra nuo 1 iki 100 nm, kūrimas. Dėl mažo dydžio tokios struktūros pasižymi unikaliomis savybėmis bei funkcijomis. Beveik visos šios dalelės, atitinkamai chemiškai modifikavus jų paviršius, gali tapti biosensoriais, fluorescenciniais žymenimis, tiksliniais vaistų nešikliais (1 pav.).

Nanotechnologijos sudaro beveik neribotas galimybes kuriant modifikuotas nanodaleles įvairiausiems medicinos tikslams (2 pav.).

Nanodydžių instrumentai ir jų komponentai yra tos

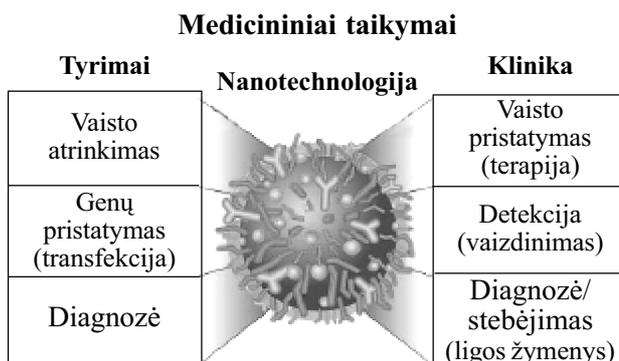


1 pav. Daugiafunkcė nanodalelė

Dalelės apvalkalas gali būti modifikuotas hidrofiliniais polimerais, tikslinėmis biologinio atpažinimo, vaistų molekulėmis arba vaizdinimo žymenimis. Vidinis dalelės branduolys gali būti kietas (pvz., kvantinių taškų) arba skystas (pvz., liposomų).

pačios eilės dydžiai kaip biologiniai vienetai (3 pav.).

Jie mažesni už žmogaus ląsteles, kurių skersmuo 10000–20000 nm ir jų organelės, panašaus dydžio kaip didelės biologinės makromolekulės, tokios kaip fermentai ir receptoriai (3). Nanodalelės, kurių skersmuo iki 50 nm, yra mažesnės už biologinių ląstelių membraną poras. Tai didžiulis privalumas, kuris panaudojamas įvairiausiems diagnostikos ir gydymo tikslams. Vaistams pernešti tinkama dalelė turi būti pakankamai maža, kad būtų išvengta filtracijos per blužnies filamentus ir išvengta fagocitozės (4). Mažos dalelės sąly-

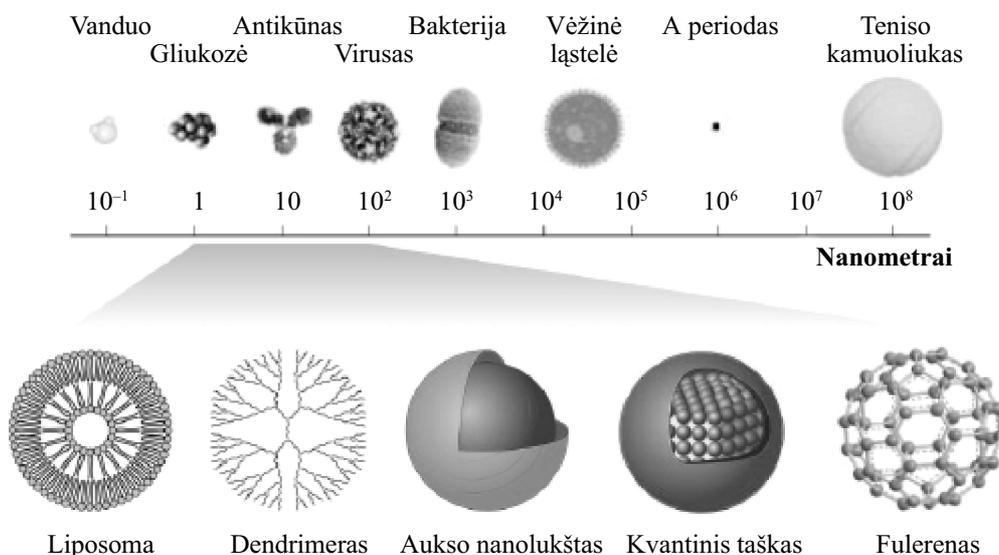


2 pav. Nanotechnologijų taikymas medicinos tikslams

Keičiant nanodalelių dydį ir modifikuojant paviršių, galima jas taikyti įvairiose medicinos srityse.

goja jų sąveiką su biomolekulėmis ant ląstelių paviršiaus ir viduje (5). Galimybė patekti į gyvą ląstelę – puiki klinikinės praktikos perspektyva. Sąveikos su receptoriais, nukleorūgštėmis, transkripcijos faktoriais ir kitais signaliniais baltymais molekulių dydžių lygmenyje suteikia informacijos, kuria remiantis, galima geriau suprasti sudėtingus informacijos perdavimo ir procesų reguliavimo tinklus, kurie valdo sveikų (6) ir ligos pažeistų (7) ląstelių veiklą.

Nanostruktūros gali būti gaminamos iš polimerų, keramikos, silicio arba sukuriamos dendritų ar lipo-



3 pav. Santykiniai nanodalelių dydžiai palyginus su žinomų dydžių vienetais
Adaptuota iš 3 literatūros šaltinio.

somų pagrindu (3 pav.). Šios struktūros yra lankstesnės ir gali atlikti daugiau funkcijų. Patekusios į organizmą, nanodalelės nesukelia imuninio atsako. Galima sukurti tokias nanodaleles, kurių neveikia mikrobai. Jų nesuardo fermentai, todėl į daleles įkapsuliuoti vaistai yra apsaugoti.

Diagnostikai ir gydymui nanodalelės panaudojamos įvairiais būdais: (a) į jų ertmę galima įkapsuliuoti vaistus arba žymenis; (b) jų paviršių galima įvairiai modifikuoti arba prijungti specifines molekules, selektyviai nukreipiančias daleles į pasirinktą tikslą ląstelėje; (c) nanodalelių porų dydį galima reguliuoti pagal poreikį selektyviai įsiurbti arba išleisti biologinius ar terapinius agentus. Tinkamai modifikuoto paviršiaus (1 pav.) ir mažiau nei 50 nm nanodalelės patenka į ląsteles endocitozės būdu. Ši savybė panaudojama viduląstelinei diagnostikai ir gydymui. Puslaidininkinės nanodalelės („kvantiniai taškai“) pasižymi specifinėmis optinėmis savybėmis, kurios panaudojamos diagnostiniam fluorescenciniam vaizdinimui.

Šiame apžvalginiame straipsnyje apžvelgiami pastarųjų metų tyrinėjimų rezultatai taikant nanodaleles navikų diagnostikai ir gydymui bei kvantinius taškus fluorescenciniam vaizdinimui.

Navikų ypatybės ir priešnavikinių vaistų pernaša

Kuriant chemoterapinius vaistus, stengiamasi pasinaudoti tam tikromis navikinių darinių savybėmis, kurios gali padėti priešnavikiniam vaistui selektyviai kauptis navike arba ieškoma būdų, kaip selektyviai pažeisti gyvybines navikinių darinių funkcijas nepažeidžiant aplinkinių sveikų audinių. Ieškoma struktūrinių, genetinių, morfologinių navikinių darinių ypatybių ir būdų, kaip, pasinaudojant šiomis ypatybėmis, pažeisti navikinius darinius kaip visumą arba selektyviai navikines ląsteles.

Neoplazminiai audiniai gali būti suskirstyti į tris sritis: kraujagyslių, intersticinę (tarpaudinę) ir ląstelinę (8) (4 pav.). Navikų vaskulizacija yra nehomogeniška, egzistuoja nekroziniai bei hemoraginiai regionai ir sutankėjusių kraujagyslių regionai, kurių vystymąsi sukelia poreikis aprūpinti naviką maisto medžiagomis ir deguonimi (angiogenezė) (9). Lyginant su fiziologiškai normaliomis kraujagyslėmis, navikų kraujagyslėms būdingi tokie pakitimai: didelis kiekis proliferuojančių endotelinių ląstelių, padidėjęs vingiuotumas, sumažėjęs pericitų kiekis ir netaisyklingas membranų formavimasis (10, 11). Manoma, kad padidėjusį kraujo indų pralaidumą reguliuoja įvairūs tarpininkai, tokie kaip kraujagyslių endotelio ląstelių augimo faktorius (angl. *vascular endothelial growth*

factor – VEGF), bradikininas, azoto monoksidas (NO), prostaglandinai ir matrikso metalų proteinazės (12). Įrodyta, jog makromolekulių pernaša naviko indais vyksta per atvirus plyšius (tarpendotelines jungtis ir transendotelinius kanalus), kraujo indų vakuolių organelės (angl. *vesicular vacuolar organelles – VVO*) ir fenestracijas (13). Tačiau vienareikšmio atsakymo, kuris iš šių būdų vyrauja ir labiausiai yra atsakingas už navikų hiperpralaidumą ir makromolekulių pernašą per kraujagyslių sienelės, nėra (13). Nepriklausomai nuo pernašos mechanizmo, kelių rūšių navikų modelių porų dydis svyruoja nuo 380 iki 780 nm (13,14). Tiesiogiai stebint fluorescenciniu mikroskopu liposomų ekstravazaciją į kietą naviką (neuroblastomą C-1300), nustatytas porų dydis apie 400 nm (15).

Intersticinę naviko sritį sudaro kolageno ir elastino skaidulų tinklas (8). Šioje struktūroje pasklidę intersticinis skystis ir makromolekuliniai komponentai (hialuronatas ir proteoglikanai) sudaro hidrofilinį gelį (8). Šiai sričiai, skirtingai nuo sveikų audinių, būdingas intersticinis slėgis, kuris sukuria jungiamojo intersticinio skysčio tėkmę į išorę; joje nėra anatomiškai aiškaus veikiančio limfinio tinklo (8, 9). Taigi priešnavikinių vaistų pernaša intersticinėje srityje bus valdoma fiziologinių (pvz., slėgio), fizikocheminių (pvz., sudėties, struktūros, krūvio) aplinkos ir fizikocheminių vaisto molekulių (dydžio, struktūros, krūvio, hidrofobiškumo) savybių (8).

Viena iš navikinių ligų gydymo strategijų – priešvėžinių vaistų pernaša į navikines ląsteles susiduria su tokiomis problemomis:

- kaip naviko lygmenyje nugalėti fiziologinį barjerą (neląsteliniai mechanizmai);
- kaip nugalėti atsparumą vaistui ląstelių lygmenyje (ląsteliniai mechanizmai);
- kaip kontroliuoti tolygų vaisto pasiskirstymą navikiniam darinyje, jo biotransformacijas ir pasišalinimą iš organizmo.

Chemoterapijoje atsparumas (trūkumas) vaistui suprantamas kaip poveikio nebuvimas: navikas po gydymo nesumažėja, arba po pradinio pagerėjimo navikas atauga (16).

Neląsteliniai atsparumo vaistams mechanizmai, matyt, susiję su prastai vaskulizuotomis naviko sritimis, kurios žymiai sumažina vaistų patekimą į naviką ir taip apsaugo navikines ląsteles. Rūgštinė navikų aplinka taip pat gali priešintis bazinių vaistų poveikiui. Baziniai vaistai jonizuojami ir negali prasiskverbti per membranas. Didelis intersticinis slėgis ir mažas slėgis smulkiosiose kraujagyslėse taip pat trukdo vaisto molekulių skverbimuisi (17).

Navikų atsparumas vaistams galimas ir dėl ląste-

linių mechanizmų, kuriuos sąlygoja pakitusi piktybinių ląstelių biochemija – tai gali būti pakitęs specifinių fermentų sistemų (pvz., topoizomerazių) aktyvumas, sutrikusi apoptozės reguliacija ar pakitę pernašos mechanizmai (16, 17).

Be to, priešnavikiniai vaistai yra toksiški tiek vėžinėms, tiek ir sveikoms ląstelėms, todėl chemoterapija visada sukelia šalutinių poveikių.

Naujausia gydymo strategija, padėsianti apeiti neląstelinius ir ląstelinius atsparumo vaistams mechanizmus ir padidinti vaistų selektyvumą, yra priešnavikinių vaistų jungimas prie koloidinių nanodalelių.

Nanodalelės – tai koloidinė sistema, kurios dispersinės fazės dalelės yra mažesnės už 1 μm , dažnai, bet nebūtinai, pagamintos iš polimerų. Skirtingai gaminant gali būti gaunamos nanosferos arba nanokapsulės (5 pav.) (18). Nanosferose polimeriniame matrikse disperguotos vaisto molekulės, o nanokapsulėse vaisto molekulės yra vandens arba riebalų terpėje apgaubtos polimerine, metalo ar puslaidininkio membrana. Nanokapsulės yra tarsi vaistų rezervuarai. Nanodalelės veikia kaip vaistų nešikliai į taikinius navike ir apsaugo vaistus nuo priešlaikinės deaktyvacijos pernešimo metu. Intraveniškai į organizmą vartojamos dalelės gali kauptis navike dėl pasyvios difuzijos arba per pralaidžias naviko kraujagysles (19). Kaupimasis galimas ir per specifinį atpažinimą, jei prie nanodalelių yra prijungti atitinkami ligandai („tikslingas taikymas“) (20). Limfos apytakos sutrikimas navikiniuose audiniuose taip pat padeda geresniam koloidinių dalelių kaupimuisi tarpuose tarp audinių (intersticinėje sri-

tyje) (12, 21, 22). Kontroluojamą vaistų pasklidimą naviko intersticinėje srityje galima pasiekti ir keičiant nanodalelių struktūrą: parenkant tinkamus polimerus ir atitinkamas vaisto ir nešiklio sąveikas (adsorbciją ar įkapsuliavimą).

Nanodalelių pernaša į navikinius audinius

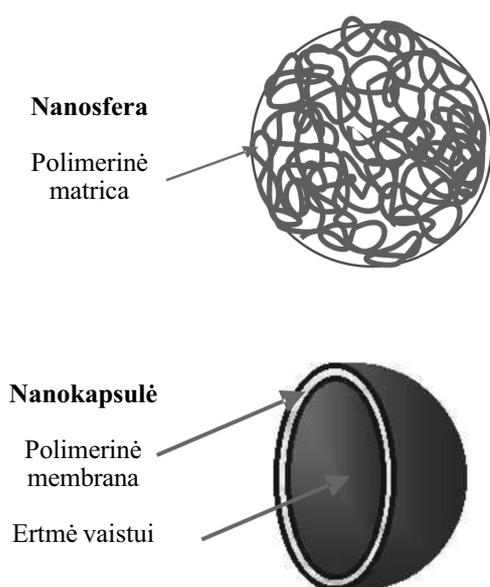
Įprastinės nanodalelės. Pirmą kartą vėžiui gydyti nanodalelės buvo panaudotos liposomų, į kurias buvo inkorporuotas doksorubicinas, pavidalo. Toks darinys turėjo didesnę gydomąją poveikį dėl pasyvaus patekimo į naviką ir mažesnio toksiškumo (23). Liposomų paviršių padengus polietilenglikolio sluoksniu, jos sunkiau pagaunamos makrofagų ir geriau kaupiasi navikuose (6 pav.).

Citostatikų prijungimas prie įprastinių nešiklių keičia jų pasiskirstymą organizme, nes daugiausia jų patenka į monobranduolinių fagocitų sistemas (MFS), t. y. kepenis, blužnį, plaučius ir kaulų čiulpus. Atsižūrusios kraujotakoje, įprastinės nanodalelės (tokios, kurių paviršius nemonifikuotas) greitai opsonizuojamos ir pašalinamos MFS organų makrofagų (24). Įjungus doksorubiciną į poliizoheksilcianoakrilato (PIHCA) nanosferas ir tokių dalelių suleidus pelėms, paaiškėjo, kad, lyginant su pelėmis, kurioms buvo suleista gryno doksorubicino, daugiausia vaisto susikaupė kepenyse, blužnyje ir plaučiuose (25). Panašūs rezultatai gauti žiurkėms suleidus polimetilcianoakrilato (PMCA) nanosferų, ant kurių buvo adsorbuotas aktinomocinas D: didžiausi jo kiekiai aptikti žiurkių plaučiuose (26). Tačiau tą patį vaistą įterpus į lėčiau skylančias polietilcianoakrilato (PECA) nanosferas, jis daugiausia kaupėsi plonosiose žarnose, o į to paties polimero nanosferas inkorporavus kitą citostatiką – vinblastiną, didžiausias jo kiekis aptiktas žiurkių blužnyse (27).

Taigi tiek nanodalelių polimero savybės (cheminė sudėtis, hidrofobiškumas, biologinio skilimo būdas), tiek citostatiko savybės (molinė masė, krūvis, patalpinimo į nanosferą būdas: adsorbcija ar inkorporavimas) turi didelę įtaką vaisto pasiskirstymui retikuloendoteliniuose organuose.

MFS makrofagų polinkis endocituoti (fagocituoti) gali būti panaudojamas su įprastinėmis nanodalelėmis sujungtų vaistų pristatymui į šias ląsteles. Toks darinys labai naudingas chemoterapiniam MFS organų navikų (pvz., hepatokarcinomos, virškinimo trakto ar reprodukcinę organų navikų metastazių kepenyse, bronchų pirminių navikų ar metastazių) gydymui.

Tokio derinio veiksmingumas užfiksuotas gydant metastazes eksperimentinių gyvūnų kepenyse PIHCA-doksorubicino nanodalelėmis (28). Ryškūs gydomasis



5 pav. Nanodalelės: nanosfera (matrica) ir nanokapsulė (rezervuaras)

poveikis aiškinamas tuo, kad doksorubicinas kaupėsi sveikuose kepenų audiniuose ir veikė kaip rezervuaras, teikiantis vaistą navikiniams audiniams (29).

Klinikiniai farmakokinetiniai tyrimai buvo atliekami su hepatoma sergančiais ligoniais suleidus jiems į veną vienkartinę doksorubicinu adsorbuotų polimetilmetakrilato nanosferų dozę. Šis nešiklis, nors nelabai tinkamas vartoti *in vivo*, nes biologinėse sistemose nesuskyla, padėjo žymiai sumažinti doksorubicino pasiskirstymo tūrį ir pasiūalinimo trukmę (30). Taigi šie rezultatai taip pat patvirtino prielaidą, kad MFS organai veikia kaip vaistų rezervuaras.

Taigi įprastinės nanodalelės gali sustiprinti priešnavikinių vaistų veiksmingumą tik gydant MFS organuose lokalizuotus navikus. Kadangi įprastinių nanodalelių vidutinė gyvavimo trukmė yra 3–5 min. po injekcijos, jų patekimas į kitus navikinius audinius nėra tikėtinas.

Ilgai cirkuliuojančios nanodalelės. Įprastines nanodaleles, vos patekusias į organizmą, puola MFS organų makrofagai, todėl atsirado būtinybė kurti kitas nanodaleles, tokias, kurios nesunaikintos galėtų nunešti vaistus į navikus, esančius kituose organuose. Neseniai sukurtos dalelės, kurių „nemato“ makrofagai (31). Tokios dalelės, pavadintos „Stealth™“, gyvuoja kraujotakos sistemoje žymiai ilgiau (32, 33). Todėl jos gali selektyviai ekstravazuoti pažeistose vietose (navikuose ar uždegiminėse srityse), kur kraujas indai labiau pralaidūs (7 pav.) (20). Tikimasi, kad tokios ilgai cirkuliuojančios dalelės gali selektyviai patekti į navikus, esančius ne MFS organuose.

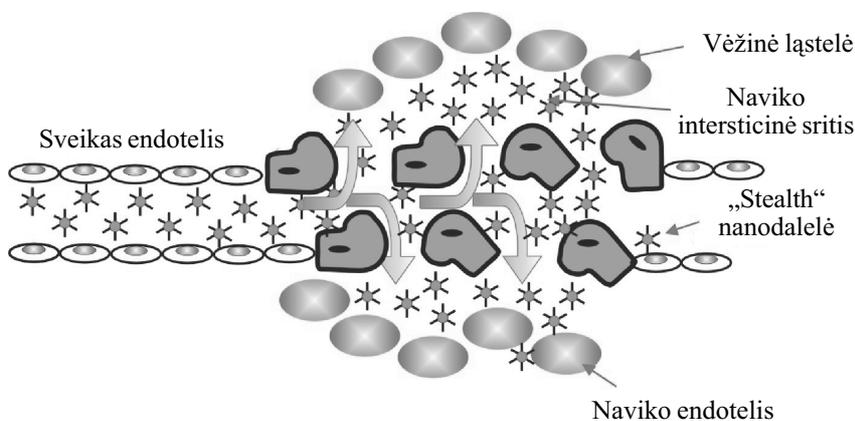
Užtikrinant tikslingą pernašą ir apsaugant nuo makrofagų nanodaleles, labai svarbus vaidmuo tenka koloidinių nešiklių dydžiui ir paviršiaus parametrams. Kad kuo mažiau būtų veikiamos opsonizacijos ir po jos sekančios fagocitozės, dalelės turi būti mažos (<100 nm), o jų paviršius hidrofiliškas (31).

Chemoterapija su $\approx 50\text{--}60$ nm skersmens polivinilpirolidino nanosferas inkorporuotu taksolu (34) ir ≈ 100 nm skersmens chitozono nanosferas inkorporuotu dekstrano-doksorubicino konjugatu (35) buvo taikyta eksperimentuose su gyvūnais. Abiem atvejais nustatytas didesnis vaisto kaupimasis navike ir nepertraukiamas jo tiekimas buvo priskirtas tinkamam dalelių dydžiui ir hidrofiliškumui, o abu šie faktoriai žymiai padidino chemoterapijos veiksmingumą (34, 35).

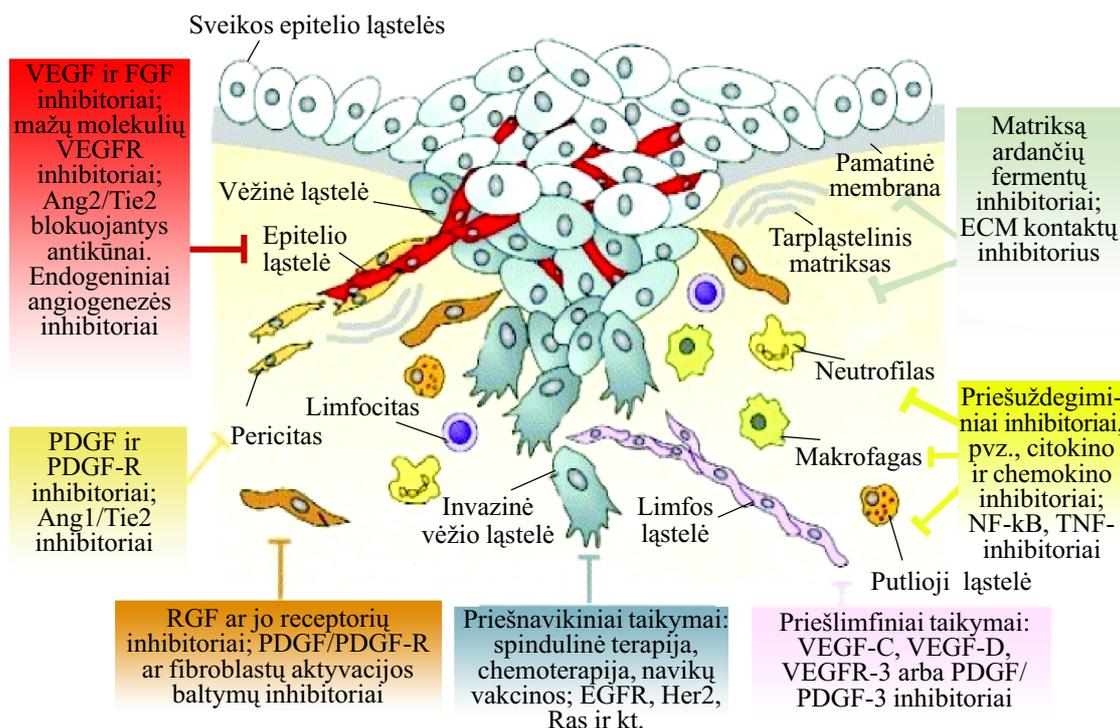
Naujas proveržis nanodalelių srityje prasidėjo ėmus dengti dalelių paviršių hidrofilišiais polimerais (polietilenglikoliu, polisacharidais ir kt.) (8 pav.) (31, 36). Tokie apvalkalai sudaro dinamišką hidrofilišią ir neutralių grandinių „debesėlį“ ant dalelės paviršiaus ir atstumia plazmos baltymus (37, 38). Tobulinant ilgai cirkuliuojančius vaistų nešiklius, susiformavo dvi jų modifikavimo kryptys. Pirmoji – įprastinių nanodalelių padengimas paviršinio aktyvumo medžiagomis, antroji – kovalentiškai prijungiant amfifilinius kopolimerus, nes jie sudaro patvarų hidrofilišką nanodalelės apvalkalą ir apsaugo ją nuo greitos desorbcijos susidūrus su kraujo komponentais. Tikėtina, kad antroji kryptis perspektyvi, o tikslingai modifikuotos nanodalelės bus naujas žingsnis chemoterapijoje.

Nanodalelės kovoje su vėžinių ląstelių dauginiu atsparumu vaistams

Priešvėžinių vaistų poveikį dažnai labai silpnina vėžinių ląstelių atsparumas vaistams (16, 17). Atsparumo mechanizmai ląstelėse padeda joms priešintis chemoterapijai. Dauginis atsparumas vaistams daugiausia atsiranda dėl plazmos membranos glikoproteino P ekspresijos, kuris išstumia iš ląstelių daugelį ksenobiotikų, tarp jų ir priešvėžinius vaistus (16, 17). Žinoma, atsparumas vaistams priklauso nuo įvairių kitų faktorių, tokių kaip sutrikusi fermentų veikla ar

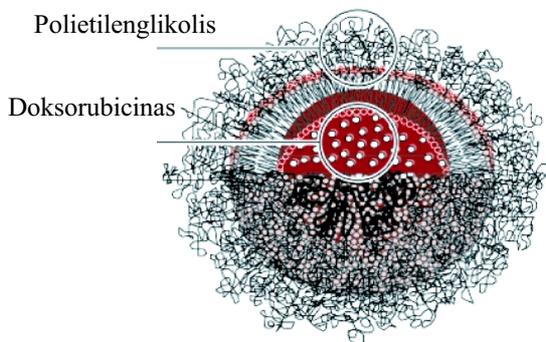


7 pav. Ilgai cirkuliuojančių „Stealth™“ nanodalelių ekstravazacija naviko intersticinėje srityje dėl pasyvios difuzijos arba konvekcijos per pralaidų naviko endotelį



4 pav. Navikas ir gydymui siūlomi būdai, veikiantys įvairias naviko aplinkoje esančias ląsteles

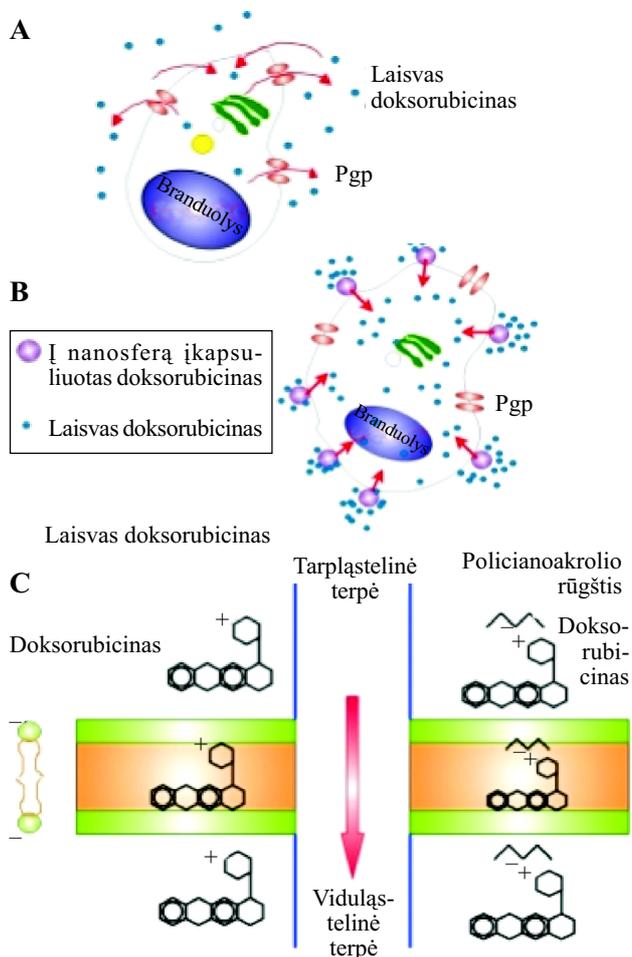
VEGF – kraujagyslių endotelio ląstelių augimo faktorius; FGF – fibroblastų augimo faktorius; PDGF – kraujo plokštelių kilmės augimo faktorius; HGF – hepatocitų augimo faktorius; EGF – epiderminis augimo faktorius; NF-kB – branduolio transkripcijos faktorius; TNF – navikų nekrozės faktorius; ECM – tarpląstelinis matriksas.

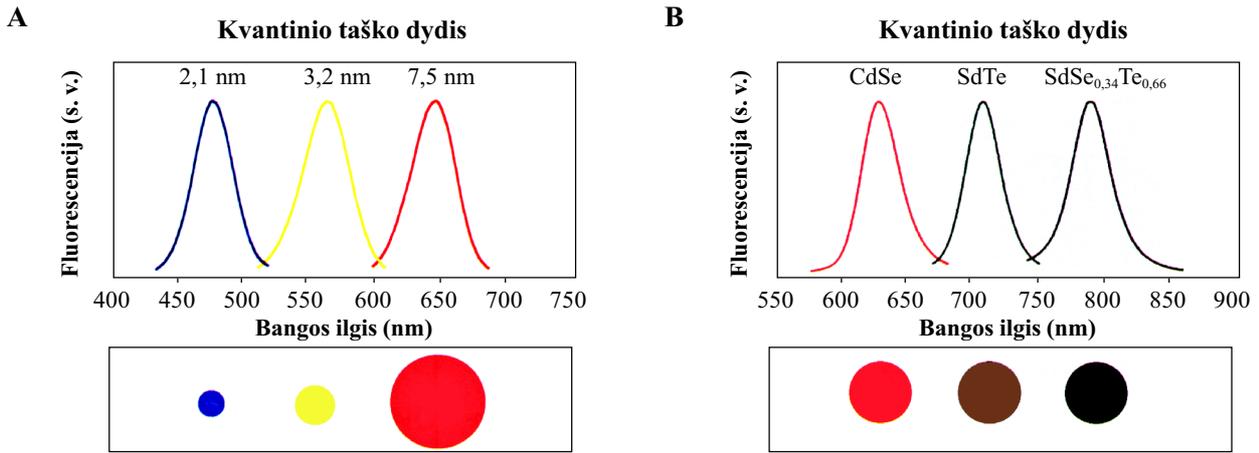


6 pav. Liposominė nanodalelė, kurios paviršius dengtas polietilenglikolio sluoksniu, o į vidų inkorporuotas doksorubicinas

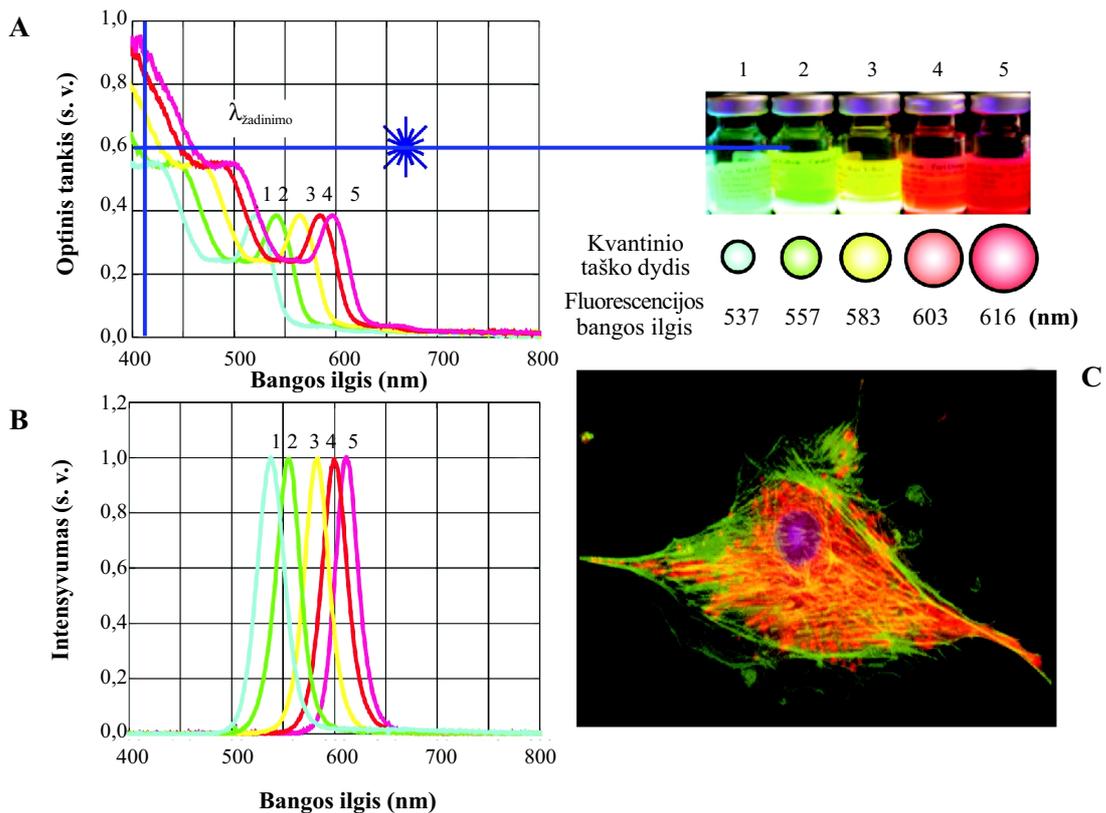
9 pav. Doksorubicino poveikis navikinei ląstelei, išskiriančiai glikoproteiną P (Pgp)

A – teigiamą krūvį turintis laisvas doksorubicinas dėl difuzijos skverbiasi į ląstelę, tačiau yra išmetamas padedant Pgp, todėl terapinis poveikis silpnas. B – policianoakrilato nanosferos su įkapsuliuotu doksorubicinu kaupiasi prie navikinės ląstelės membranos, kur išleidžia vaistą; dėl to prie membranos susidaro vaisto mikrokoncentracijų gradientas, kuris padeda išvengti atsparumo vaistui. C – doksorubicinas su policianoakrilato nanosferos skilimo produktais sudaro jonų porą; tai palengvina doksorubicino internalizaciją į ląstelę.





10 pav. Kvantinių taškų spektrinių savybių priklausomumas nuo dydžio ir cheminės sudėties
A – vienodos cheminės sudėties CdSe kvantinių taškų fluorescencijos juostų padėtys priklauso nuo dalelių dydžio (skersmens). **B** – vienodo dydžio, bet skirtingos cheminės sudėties kvantiniai taškai fluorescuoja skirtingų bangų ilgio šviesa.



11 pav. Kvantinių taškų sugerties (A) ir fluorescencijos (B) spektrai
 Ląstelės organoidų vaizdinimas įvairaus dydžio kvantiniais taškais (C).

<p>Nanodalelė Kiautas TOP Branduolys ZnO TOPO Tirpus: toluene, heksane, chloroforme Hidrofobiškas Ligandas Tirpus baziniame buferyje Hidrofiliškas</p>			
<p>Nanodalelė Biologinis atpažinimas Biomolekulė baltymas/DNR Molekulių biologinio atpažinimo funkcijos Hidrofobinė sąveika, disulfidinis tiltelis, adsorbicija, silanas Tirpumas vandenyje Elektrostatinė sąveika Disulfidinis tiltelis metalo afiniškumui, amido ryšys</p>			
Paviršiaus modifikavimo būdai		Sąveikos mechanizmas	
<p>Monotioliai</p> <p>$HS(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_mOR$ R = -H, -CH₂COOH</p>		<p>Datyvinis tiolio ryšys</p>	
<p>Bidentantiniai tioliai</p> <p>R = -OH -(OCH₂CH₂)_n, n = 3,5,~12</p>		<p>Dvi sąveikos/vienas ligandas</p>	
<p>Silano kiautas arba dendrimeras</p> <p>R = -SH, -NH₂, -PO₂CH₃</p>		<p>Skersinių ryšių kiautas</p>	
<p>Hidrofobinės sąveikos</p> <p>R = Streptavidinas</p>		<p>Hidrofobinis Hidrofilinis</p> <p>TOP/TOPO</p>	
<p>Funkciniai oligomeriniai fosfinai</p> <p>H = OH; NH - Streptavidinas Hidrofilinis</p>		<p>Hidrofobinis</p> <p>R Hidrofilinis</p>	
<p>Amfifilinis trijų blokų kopolimeras</p> <p>Hidrofilinis Hidrofobinis</p>		<p>*Antikūno konjugacijos vieta per EDC</p> <p>COOH CONH-PEG COOH Hidrofobinis</p> <p>Hidrofilinis</p>	
<p>Amfifilinis sacharidas</p> <p>X = O(CH₂)_n</p>		<p>Per vidinius alkanus, per TOPO</p> <p>Hidrofobinis</p> <p>Hidrofilinis</p>	
<p>Tiesioginis baltymų/peptidų jungimas prie nanodalelių paviršiaus</p> <p>(AHHAHHAAD)_n n = 12 H = histidinas Afiniškumas metalams Maltosę prijungiantis baltymas -(H)₅-COOH</p>		<p>BiotinG-Cys-E-Cys-G-G-Cys-E-Cys-G-Cha-C-C-Cha-Cmd</p> <p>Datyvinis tiolio ryšys</p> <p>Cys = cisteinas Cmd = karboksiamidas Cha = 3cikloheksilalaninas</p>	

8 pav. Nanodalelių paviršiaus modifikavimo būdai

EDC – 1-etil-3-(3dimetilaminopropil)karbodiimidis.

pakitęs vaistų viduląstelinis pasiskirstymas, atsirandantis dėl padidėjusios vaisto sekvestracijos į rūgštines citoplazmos vezikules (17, 39). Dėl šios priežasties sekvestruotas vaistas išstumiamas į išorę, todėl nepasiekia DNR arba branduolio fermentų – svarbiausių priešvėžinių vaistų taikinių (39).

Bandant išvengti atsparumo citostatikams, atsirandančio dėl glikoproteino P, vaistai buvo įkapsuliuoti į nanodaleles (17). Manoma, kad glikoproteinas P atpažįsta ir išstumia vaistą tik tada, kai jis yra plazmos membranoje, bet ne citoplazmoje ar lizosomose, kur jis atsiduria po endocitozės (33, 34).

Doksorubicinas, inkorporuotas į PIHCA nanosferas (9 pav.), eksperimentuose *in vitro* visada buvo citotoksiškesnis už gryną (40). Aiškinantis, koku būdu į nanosferas įkapsuliuoti citostatikai išvengia navikinių ląstelių atsparumo vaistams, nustatyta, kad tai susiję ne tik su nanodalelių adsorbcija ant ląstelių paviršiaus, bet ir su padidėjusia doksorubicino difuzija per membraną dėl to, kad susidaro jonų pora iš neigiamą krūvį turinčios cianoakrilo rūgšties (nanodalelės skilimo produkto) ir teigiamą krūvį turinčio doksorubicino (9C pav.) (41). Visa supramolekulinė struktūra yra hidrofobiška, o tai palengvina difuziją per membraną (9B pav.) (42).

Kol kas nugalėti navikinių ląstelių atsparumą vaistams pavyko tik su cianoakrilato tipo nanodalelėmis. Kad tokios dalelės, vartojamos chemoterapijai, būtų veiksmingos, jos turi atitikti tris svarbius kriterijus:

- prilipti prie ląstelės membranos, kad susidarytų koncentracijų gradientas;
- vaisto išsiskyrimas ir dalelės skilimas turi vykti vienu metu;
- turi susidaryti jonų pora, kuri neutralizuotų teigiamą vaisto krūvį.

Kvantiniai taškai ir jų panaudojimas biomedicinoje

Svarbi medicinoje, ypač onkologijoje, yra ligos pažeistų audinių ar ląstelių vizualizacija (vaizdinimas). Ankstyvųjų navikinio darinio formavimosi stadijų metu būtina nustatyti tikslią jo lokalizaciją, nes laiku nustatyta diagnozė užtikrina sėkmingą gydymą. Tikslus navikinio darinio išplitimo ribų nustatymas būtinas ir chirurginiu būdu šalinant naviką, nes tik visiškas navikinio darinio pašalinimas gali apsaugoti nuo jo ataugimo. Sparčiai tobulėjant optinėms technologijoms, biomedicinoje vis plačiau naudojami optiniai diagnostikos metodai, kurie yra neinvaziniai, o informacija gaunama iškart – nereikia laukti kaip naudojant biocheminius ar imuninius diagnostinius metodus. Dabar šie metodai tampa vieni iš perspektyviausių onkologijoje ir prognozuojama, jog artimiausiu metu

navikinio darinio išplitimo ribos bus nustatomos naudojant fluorescencinės diagnostikos metodus. Iš fluorescencinių žymenų ateitis taip pat priklauso nanodalelėms – kvantiniams taškams.

Terminas „kvantiniai taškai“ vartojamas nanometrų dydžio puslaidininkiniams dariniams vadinti. Taigi kvantiniai taškai – tai sferinės formos neorganiniai puslaidininkiniai kristalai, kurių skersmuo – nuo 1 iki 10 nm (43, 44). Šie dariniai pasižymi specifinėmis optinėmis ir elektroninėmis savybėmis, kurios priklauso nuo darinio erdvinio matmenų. Ši įdomi nanodydžio darinių savybė jau 20 metų yra intensyvių tyrinėjimų objektas. Nuo dalelių dydžio priklauso daugelis kvantinių taškų parametru, o svarbiausia – fluorescencijos bangos ilgis. Keičiant dalelių cheminę sudėtį ir dydį, gaunami kvantiniai taškai, kurie fluorescuoja plačiame spektriniame ruože – nuo 400 iki 2000 nm (45–49).

Taigi kvantiniai taškai skiriasi nuo puslaidininkinių kristalų tuo, kad jų švytėjimo savybės priklauso ne tik nuo cheminės sudėties, bet ir nuo dydžio (10 pav.). Ši savybė įgalina kurti naujus fluorescencinius žymenis, turinčius griežtai suderintus fluorescencijos bangų ilgius. Pavyzdžiui, kadmio selenido (CdSe) puslaidininkinio kristalo draustinės juostos energija yra 1,7 eV (atitinka 730 nm fluorescencijos bangos ilgį). Keičiant CdSe nanokristalų dydį nuo 2 iki 7 nm, galima sukurti kvantinius taškus, kurie fluorescuos 450–650 nm spektrinio ruožo bangas (10A pav.). Nuo puslaidininkinio lydinio cheminės sudėties taip pat priklauso išspinduliuojamos šviesos bangos ilgis. Pavyzdžiui, keičiant trinario lydinio $\text{CdSe}_x\text{Te}_{1-x}$ 5 nm dydžio dalelių komponentų santykius, gaunami kvantiniai taškai, fluorescuojantys spektriniame ruože nuo 610 iki 800 nm (10B pav.) (47).

Dėl savo išskirtinių savybių kvantiniai taškai gali būti naudojami tiek subląsteliniam lygmenyje, kai norima vaizdinti ląstelės struktūrą, jos sudėtines dalis ar pažaidas, arba audinių lygmenyje, kai nustatomos audinio struktūros ypatybės arba vaizdinamos audinių pažaidos.

Biologinių molekulių fluorescenciniam vaizdinimui taikomi organiniai fluorescenciniai žymenys, kurių sugerties juostos yra siauros, o fluorescencijos – plačios. Kvantiniai taškai pasižymi kitokiomis spektrinėmis savybėmis, kurios yra labai perspektyvios įvairiose biologinių ir biomedicininų tyrimų srityse. Kvantinių taškų sugerties juostos plačios, o fluorescencijos – siauros (juostų pusplotis 25–35 nm) (50) (11 pav.). Dėl jų plačių sugerties juostų įvairių spalvų kvantinius taškus galima žadinti vienu šviesos šaltiniu, taip realizuojant ląstelės organoidų daugiaspalvį

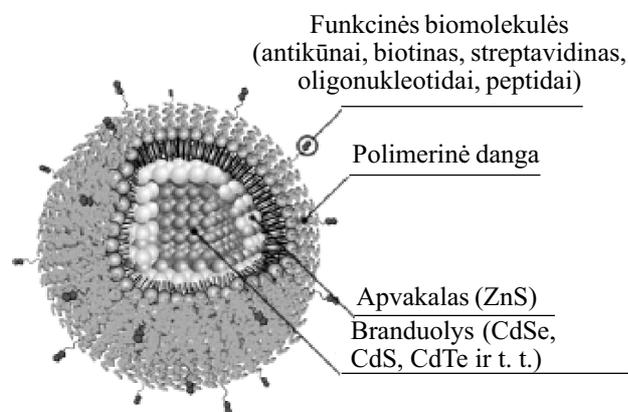
vaizdinimą (51) (11 pav.). Puslaidininkiniai kvantiniai taškai taip pat pasižymi fotostabilumu, o tai užtikrina ląstelių ir jos sudėtinių dalių didelės skyros vaizdinimą bei įgalina stebėti pavienes molekules bei jų dinamiką ląstelės viduje (52–54).

Tik XX a. pabaigoje pavyko susintetinti pakankamai geros kokybės monodispersinius puslaidininkinius koloidinius kvantinius taškus. Šiuolaikinės cheminės sintezės ir gamybos technologijos įgalina pagaminti norimos formos bei dydžio kvantinius taškus. Labai preciziškai (nanometrų eilės tikslumu) kontroliuojant kvantinių taškų struktūrą, jų savybes galima reguliuoti taip, kad kvantiniai taškai tiktų biologinėms sistemoms. Paviršinis sluoksnis modifikuojamas taip, kad padidėja tirpumas vandenyje, kovalentiškai prijungiami ligandai, skirti bioatpažinimui ar biosuderinamumui. Skirtingi sintezės metodai užtikrina kvantinių taškų gamybos įvairovę. Nemažai mokslininkų grupių dirba šioje srityje, o pastarųjų metų rezultatai išties išpūdingi. Sukurtos įvairios kvantinių taškų paviršiaus modifikavimo metodikos, kurios didina jų tirpumą vandenyje.

Kvantinių taškų prototipas yra kadmio selenidas (CdSe), nes šio puslaidininkio monodispersinių nanokristalų sintezės metodai gana seniai sukurti ir pakankamai tobuli. CdSe šerdis dažniausiai yra apgaubiami plonu ZnS arba CdS, medžiagų, kurių draustinės juostos tarpas didesnis, apvalkalu (12 pav.). CdSe nanokristalą padengus ZnS sluoksniu, fluorescencijos kvantinis našumas nuo 5 proc. padidėja iki daugiau kaip 50 proc.

Norint naudoti kvantinius taškus, kaip fluorescencinį žymenį, reikia išspręsti dvi pagrindines problemas:

- pagaminti aukštos kokybės nanokristalą, suspenduojamą vandeninėje terpėje;



12 pav. Daugiafunkcio kvantinio taško struktūra

- parinkti tinkamą paviršiaus modifikacijos techniką, kuri įgalintų prie nanokristalo prijungti biologines makromolekules nepakenkiant kvantinių taškų optinėms savybėms.

Kvantinių taškų paviršiu hidrofilškumas dažniausiai suteikiamas įvairiais paviršiaus modifikavimo metodais (8 pav.). Vienas jų – hidrofobiniai paviršiaus ligandai pakeičiami bifunkciniais ligandais, tokiais kaip merkptoacto rūgštis, kuri turi tiolio grupę, gerai sukimbančią su kvantinių taškų paviršiumi, ir į išorę nukreiptą hidrofilinę karboksilo grupę (52). Kitas paviršiaus modifikavimo būdas pagrįstas koordinacinio ligando (pavyzdžiui, TOPO) sąveika su amfifiliniu polimeru (54, 55). Polimerai turi alkilinių grupių, kurios sąveikauja su hidrofobinėmis TOPO grupėmis ir hidrofilinių karboksilo grupių, kurios nukreiptos į išorę. Šis metodas yra pranašesnis, nes, naudojant jį, galima geriau išlaikyti kvantinių taškų optines savybes, tačiau šiuo atveju gaunamos didesnės kvantinių taškų dalelės.

Tirpumą kvantiniams taškams suteikia neigiamą krūvį turinčios karboksilo grupės. Kad juos būtų galima taikyti biologiniuose ir mediciniuose tyrimuose, reikalingas papildomas padengimas biomolekulėmis išsaugant jų aktyvumą ir kvantinių taškų spektrines savybes. Sintetinant tokius biokonjugatus, dažniausiai prie karboksilo liekanų kovalentiniu ryšiu prijungiamos įvairios biomolekulės, pavyzdžiui, peptidai, baltymai ar nukleorūgštys (8 pav.).

Molekulių ir ląstelių vaizdinimas. Fluorescencija yra gana paprastas ir jautrus biologinių struktūrų vaizdinimo metodas. Pastaruosius penkerius metus kvantiniai taškai buvo tiriami kaip potencialūs fluorescenciniai žymenys įvairiems biomediciniams tikslams, kuriems įprastinių organinių žymenų taikymas buvo neefektyvus. Kvantinių taškų spektroskopinės galimybės pranoko visus lūkesčius, svarstoma apie kvantinių taškų taikymą vėžinių ligų *in vivo* tyrimams.

Fiksuotų ląstelių ir audinių vaizdinimas. Yra nemažai metodų, kuriais galima aptikti biomolekules bei kontroliuoti biologinius vyksmus *in vitro*. Tačiau tyrimai *in vitro* yra tik labai supaprastintas sudėtingos gyvosios biologinės sistemos modelis, kuriame prarandama erdvinė informacija. Šią erdvinę informaciją galima gauti tiriant fiksuotas ląstelių kultūras arba audinių mėginius. Kvantiniai taškai dėl savo unikalių optinių savybių (siauras fluorescencijos spektras, didelis fluorescencijos kvantinis našumas) tokiems tyrimams buvo greitai pritaikyti.

Pirmą kartą kvantiniai taškai antigeno žymėjimui fiksuotų ląstelių kultūrose buvo panaudoti 1998 metais (53). Fiksuotuose pelės fibroblastuose branduolio

antigenai buvo žymimi žaliai fluorescuojančiais (CdSe)ZnS kvantiniais taškais, o F-aktino filamentai – raudonai fluorescuojančiais kvantiniais taškais; taip šie viduląsteliniai antigenai buvo užfiksuoti vienu metu. Šio tyrimo metu taip pat buvo įrodyta, jog kvantiniai taškai yra žymiai stabilesni šviesos poveikiui ir fluorescuoja daug ryškiau už organinius fluorescencinius žymenis.

Fotostabilūs kvantiniai taškai padeda stebėti pavienių molekulių judėjimą gyvoje ląstelėje; ankstesni bandymai vizualizuoti pavienės molekulės, naudojant paprastus organinius fluorescencinius žymenis, buvo nesėkmingi (56, 57). Pavienių molekulių judėjimo eksperimentai, panaudojant kvantinius taškus, yra labai perspektyvūs. Tokie eksperimentai padės suprasti atskiro receptoriaus paplitimo dinamiką, jo sąveiką su ligandu, bimolekulinę pernašą, fermento veikimą ir t. t.

Fiksuotose ląstelių kultūrose kvantiniais taškais buvo pažymėti beveik visi viduląsteliniai antigenai įskaitant ir atskiras genomines sekas (58, 59), plazminės membranos baltymai, citoplazminiai baltymai ir branduolio baltymai (54, 60–62).

Gyvų ląstelių vaizdinimas. Gyvų ląstelių žymėjimas fluorescenciniais žymenimis yra sudėtingesnis, nes ląstelės turi išlikti gyvos, o žymenys turi prisiskverbti per membraną ir pasiekti viduląstelinis taikinius. Tokių fluorescencinių žymenų yra nedaug, todėl manoma, jog šioje srityje ateitis taip pat priklausys kvantiniais taškams.

Pirmieji viduląsteliniai gyvos ląstelės žymėjimai kvantiniais taškais buvo atlikti 1998 metais (52). Prie merkaptoacto rūgštimi apgaubtų (CdSe)ZnS kvantiniais taškais kovalentiškai prijungus transferiną, jie savaiminės endocitozės būdu patekdavo į vėžines ląsteles. Šis tyrimas parodė, kad kvantiniai taškai nepraranda savo optinių savybių ir *in vivo*. Taip pat pastebėta, jog gyvų ląstelių membranų antigenai gali būti žymimi tokiais pačiais metodais kaip ir fiksuotų, t. y. per antikūno-antigeno, receptoriaus-ligando sąveiką (63, 64). Kvantinių taškų pernaša į konkrečius viduląstelinis taikinius yra sudėtinga problema, būtinas išsamus kvantinių taškų pernašos mechanizmų supratimas. Geriausiai iširtas kvantinių taškų patekimas į ląsteles endocitozės būdu, kiti mechanizmai iki šiol mažai iširti.

Ilgalaikiam gyvų ląstelių struktūrų vaizdinimui žalią šviesą fluorescuojantys (CdSe)ZnS kvantiniai taškai, įkapsuliuoti į fosfolipidines micles, buvo panaudoti varlės embrionams (55). Gana ilgą laiką kvantiniai taškai buvo stabilūs ir nepažeidė normalaus embrionų vystymosi. Šis tyrimas paprasto daugialąstelinio

organizmo pavyzdžiu parodė kvantinių taškų panaudojimo gyvų sistemų stebėjimui galimybes.

Tyrimų duomenimis, dideli kvantinių taškų kiekiai į gyvas ląsteles patenka daugiausia trimis skirtingais mechanizmais: nespecifine pinocitoze, mikroinjekcija arba peptido-indukuota pernaša. Pastebėtas dar vienas įdomus faktas, kad apie du milijardai kvantinių taškų patenka į vienos ląstelės branduolį ir toks jų kiekis visai nesutrikdo ląstelės gyvybinių funkcijų, jos dalijimosi ir judėjimo (55, 65). Pavienės ląstelės vaizdinimas ir jos diferenciacijos stebėjimas realiu laiku taps svarbiu instrumentu tiriant embriogenezę, įvairias vėžio metastazes ir kamieninių ląstelių terapijos mechanizmus. Lyginant su fiksuotomis ląstelėmis, gyvų ląstelių žymėjimas yra daug sudėtingesnis, nes, tiriant viduląstelines struktūras, žymenys turi prasiskverbti per plazminę membraną ir nepaveikti ląstelės gyvybingumo. Žinomų organinių fluorescencinių žymenų, su kuriais galima tirti *in vivo* struktūrą realiu laiku, skaičius yra ribotas. Todėl gyvų ląstelių vaizdinimas gali būti viena iš biologijos sričių, kurios vystymuisi kvantiniai taškai turi didžiausią įtaką.

In vivo vaizdinimas. Fluorescuojantys baltymai ir organiniai fluorescenciniai žymenys jau seniai naudojami *in vivo* vaizdinimui. Idealus fluorescencinis žymuo turi pasižymėti dideliu giminingumu specifiniam audinio tipui ir pakankamu fluorescencijos intensyvumu prisijungus prie taikinio. Pageidautina, kad giminingumas audiniui galėtų būti moduluojamas pagal konkrečius poreikius. Be to, idealus žymuo turi pasižymėti minimalia nespecifine sąveika, būti stabilus, lengvai pasišalinti iš organizmo arba suskilti į netoksiškus produktus. Norint optimaliai išnaudoti kvantinių taškų optines savybes *in vivo* eksperimentuose, reikia atsižvelgti į galimas taikymo problemas. Pirmoji problema – tai kvantinių taškų dydis, kuris po cheminės modifikacijos gali siekti iki 20 nm. Tokie kvantiniai taškai sunkiai prisiskverbs pro kraujagyslių endotelį, jie bus per dideli, kad būtų šalinami su šlapimu. Tokio dydžio kvantiniai taškai nespecifiškai fagocituojami kepenyse ir blužnyje. Nuo fagocitozės kvantinius taškus iš dalies apsaugo hidrofiliųjų polimerų, pavyzdžiui, polietilenglikolio apvalkalas. Toks apvalkalas užtikrina ilgesnį cirkuliacijos laiką kraujotakoje, tačiau visiškai išvengti nespecifinės fagocitozės neįmanoma (66, 67).

Pirmą kartą kvantinių taškų injekcija laboratoriniams gyvūnams atlikta 2002 metais, tada ir išaiškėjo nespecifinės fagocitozės problemos (68). Tyrimuose *ex vivo* žaliai arba raudonai fluorescuojantys (CdSe)ZnS kvantiniai taškai buvo injekuoti pelėms į veną. Konjuguoti konkrečiam audiniui specifiniais peptidais, kvantiniai taškai buvo nunešti į plaučių kraują

gysles, naviko kraujagysles ir naviko limfinius indus. Audinių mėginių fluorescenciniai tyrimai parodė, kad kvantiniai taškai gerai kaupėsi numatytuose taikiniuose, tačiau pastebėtas ir nespecifinis kaupimasis.

Injekavus polietilenglikoliu (PEG) dengtų kvantinių taškų į pelės kraujotaką, buvo tirta, kaip kvantinių taškų gyvavimo trukmė kraujotakoje priklauso nuo jų paviršiaus padengimo (67). Lyginant su mažomis organinių dažiklių molekulėmis, kurios pašalinamos iš kraujotakos praėjus kelioms minutėms po injekavimo, PEG dengti kvantiniai taškai cirkuliuoja kraujotakoje žymiai ilgesnį laiką (gyvuoja 3 valandas ir ilgiau). Tokia ilga kvantinių taškų cirkuliacijos kraujotakoje trukmė aiškinama unikaliomis struktūrinėmis kvantinių taškų savybėmis. Šiomis savybėmis buvo pasinaudota taikant dvifotonį kvantinių taškų žadinimą (69). Injekavus vandenyje tirpių kvantinių taškų pelėms į uodegos veną, per odą kelių šimtų mikrometrų gylyje buvo gerai matoma labai smulkių kapiliarų struktūra. Nustatyta, kad kvantinių taškų dvifotonės sugerties skerspjūviai yra 3–4 eilėmis didesni už tradicinių fluorescencinių žymenų. Kadangi artimos infraraudonos (IR) spektrinės srities šviesa yra mažiau sklaidoma ir sugerama audinio komponentų negu ultravioletiniai spinduliai (UV) ir regimosios srities šviesa, dvifotonis žadinimas giliau prasiskverbia į audinius, tačiau kvantiniai taškai fluorescuoja regimojoje spektro srityje. Taigi artimoji infraraudonoji spektro sritis (>650 nm) būtų labai tinkamas „optinis langas“ fluorescenciniam vaizdinimui. Tačiau tokio vaizdinimo svarbiausia problema – tinkamų, t. y. tokių, kurie gerai fluorescuotų artimojoje infraraudonojoje srityje ir būtų žadinami šios srities šviesa, fluoroforų trūkumas. Iš organinių fluoroforų žinoma tik keletas, kurių fluorescencijos žadinimo ir emisijos juostos yra artimojo IR srityje. Šioje srityje ateitis taip pat priklauso kvantiniams taškams. Visai neseniai buvo susintetinti CdTe, CdSeTe, (CdTe)CdSe, PbS, PbSe kvantiniai taškai, kurie gerai fluorescuoja artimojoje infraraudonojoje srityje (47–49, 70, 71).

Jau susintetinta naujo tipo „branduolys – apvalkalas“ nanostruktūra, kuri pavadinta antrojo tipo kvantiniais taškais. Šie taškai turi gana plačią fluorescencijos juostą su smaile ties 850 nm (72). Tokie kvantiniai taškai buvo panaudoti tiriant limfmazgius gilesniuose audinių sluoksniuose. Šios grupės tyrimai parodė, kad kvantiniai taškai ateityje bus pritaikyti optinių vaizdų gavimui operacijos metu. Chirurgas galės tiksliai ir greitai nustatyti ir pašalinti sunkiai pastebimus pažeidimus (pvz., metastazinius navikinius darinius).

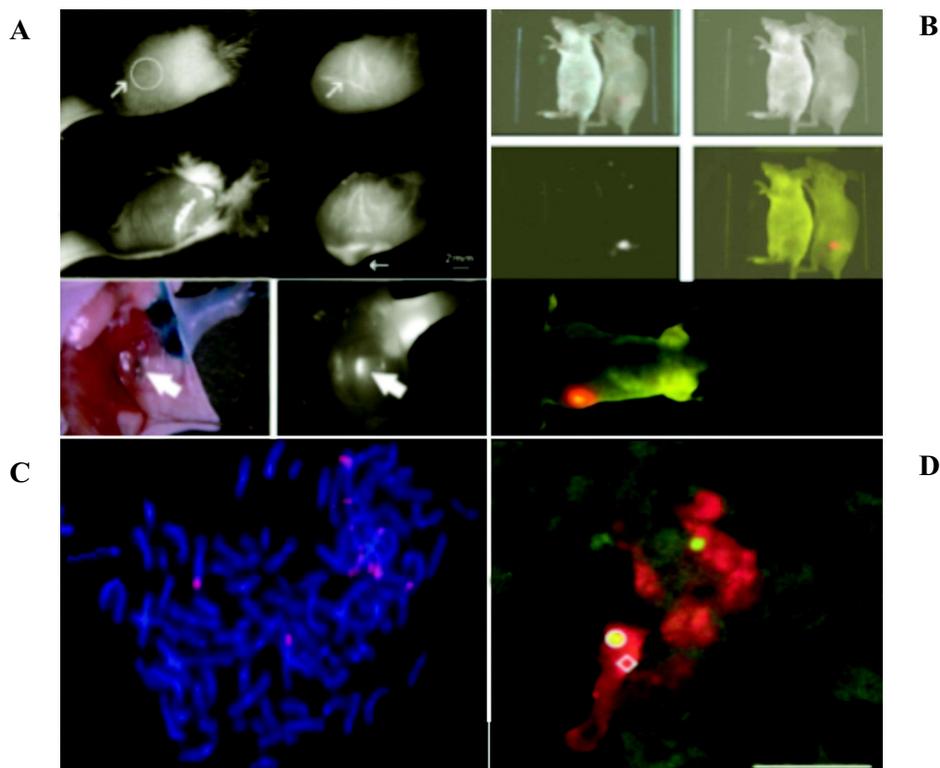
Prieš naudojant kvantinius taškus klinikiniais tyrimams, turi būti ištirtas biologinis suderinamumas.

Biologiškai suderinama nanodalelė turi būti netoksiška, inertiška ir stabili tyrimo metu. Iki šiol skelbtose publikacijose, kur aprašomas kvantinių taškų panaudojimas *in vivo* tyrimams, neaptikta didelio toksiškumo ar poveikio normalaus organizmo vystymuisi (51, 73). Ilgalaikis kvantinių taškų stabilumas ir pasišalinimo iš organizmo mechanizmas kol kas nepakankamai ištirtas.

Navikų vaizdinimas *in vivo*. Pirmasis kvantinių taškų taikymas onkologijoje atliktas 2002 metais, kai audiniams specifiniais peptidais dengti kvantiniai taškai buvo sistemaiškai injekuojami eksperimentiniams gyvūnams (68). Atlikti *ex vivo* tyrimai parodė, kad tokie kvantiniai taškai kaupiasi naviko kraujagyslėse ir limfmazgiuose (13 pav. A). Kiek vėliau paskelbta studija, kurios metu pavyko užfiksuoti pelėms įskiepyto žmogaus prostatos naviko raudoną fluorescenciją (13 pav. B) (74). Selektyvus kvantinių taškų kaupimasis navike aiškinamas pirmiausia antikūno-antigeno sąveika. Toks kaupimosi būdas yra efektyvesnis už pasyvų kaupimąsi. Pasyvaus kaupimosi esmė yra ta, kad navikinių darinių kraujotakos sistema dažniausiai esti pažeista, todėl kvantiniai taškai linkę kauptis joje (75, 76). Aktyvios pernašos esmė kiek kitokia: prie kvantinių taškų yra jungiami specifiniai antikūnai, kurie nuneša kvantinius taškus tiksliai ten, kur yra specifinis antigenas. Fluorescenciniam naviko vaizdinimui pasyvaus kaupimosi būdu reikėjo 6 nmol kvantinių taškų ir teko laukti 24 val., o naudojant kvantinius taškus, dengtus TOPO apvalkalu ir prijungtais PEG ir antikūnų ligandais, pakako 0,4 nmol ir fluorescencinis vaizdas buvo matomas jau po dviejų valandų.

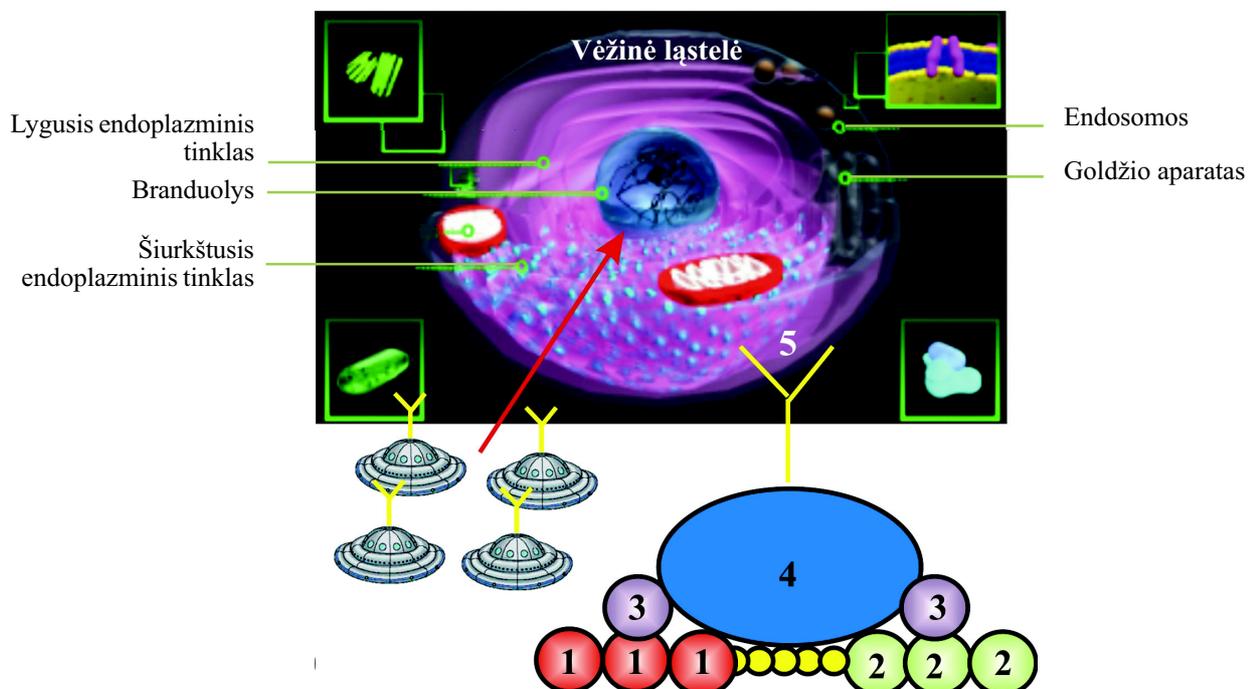
Vienas naujausių pasiekimų – naujos klasės daugiafunkčių kvantinių taškų, turinčių specifinio kaupimosi navikuose ir vaistų pernašos savybių, kūrimas. Tinkamai modifikuojant kvantinių taškų paviršius, gaunami kvantiniai taškai, atsparūs hidrolizei ir fermentiniam skaidymui *in vivo* sąlygomis. Jau sukurti tokie kvantiniai taškai, kurių apvalkalai savaiminės saviorganizacijos būdu apgaubia jų šerdis taip, kad jų optinės savybės (sugerties ir fluorescencijos spektrai, fluorescencijos kvantinis našumas) išlieka nepakitusios net drastiškai pasikeitus aplinkos sąlygoms (pH, druskų koncentracijai ir t. t.) (74). Kvantinių taškų taikymas įvairiems vaizdinimo tikslams pateikiamas 13 C ir D paveiksluose.

Puslaidininkinių kvantinių taškų toksiškumas tapo aktualiausia tema, nes toksiškumas *in vivo* sąlygomis yra pagrindinis faktorius, sąlygojantis kvantinių taškų panaudojimo klinikiniais tyrimams galimybes. Tirtas (CdSe)ZnS kvantinių taškų su skirtingais paviršiaus dangalais toksiškumas ląstelių kultūroms (77). Nustatyta, kad (CdSe)ZnS kvantiniai taškai yra labai



13 pav. Kvantinių taškų panaudojimas įvairiems vaizdinimo tikslams

(A) Fluorescencinis vaizdinimas išryškina kraujagysles ir limfinius mazgus; (B) prostatos vėžio vaizdinimas *in vivo* raudonai fluorescuojančius kvantinius taškus; (C) tinkamai modifikuoti kvantiniai taškai padeda aptikti krūties vėžio ląsteles; (D) kvantiniai taškai įgalina tirti navikinių ląstelių pasiskirstymą organuose ir audiniuose: pelės, kuriai buvo įleista kvantinių taškų su B16F10 ląstelėmis, plaučių mėginys.



14 pav. Tinkamai modifikavus kvantinio taško paviršių, jis gali būti naudojamas ir gydymui, ir vaizdinimui vienu metu

1 – A vaistas; 2 – B vaistas; 3 – fluorescencinis vaizdinimas; 4 – magnetinis vaizdinimas; 5 – aptikimas.

toksiški ląstelėms, kurios gana ilgą laiką buvo švitintos ultravioletinių spindulių šviesa. Šis rezultatas nebuvo netikėtas, nes ultravioletinės spinduliuotės energija yra artima kovalentinio ryšio energijai, todėl, vykstant kvantinių taškų fotolizei, į ląstelių kultūrą patenka nuodingi Cd^{2+} jonai. Tačiau kvantiniai taškai, dengti stabilium polimeriniu apvalkalu, po švitinimo UV spinduliuote nesukeldavo jokių neigiamų poveikių ląstelių funkcionavimui, jų dalijimuisi ir ATP generacijai. Tyrimai *in vivo* parodė, jog kvantiniai taškai su stabilium polimeriniu apvalkalu nesukelia jokių toksiškų padarinių (67). Bet ląstelinio toksiškumo mechanizmai, susiję su kvantinių taškų biodegradacija *in vivo* sąlygomis, dar nepakankamai ištirti. Stabilium polimeriniu apsauginiu sluoksniu dengtų kvantinių taškų neveikia nei cheminė, nei fermentinė degradacija, tačiau tokie kvantiniai taškai yra sunkiai pašalinami iš organizmo. Kad kvantiniai taškai būtų pradėti taikyti klinikiniam tyrimams, turi būti sukaupta daug daugiau toksiškumo duomenų, gerai ištirtos ir tobulos jų paviršiaus modifikavimo technologijos.

Ateities perspektyvos

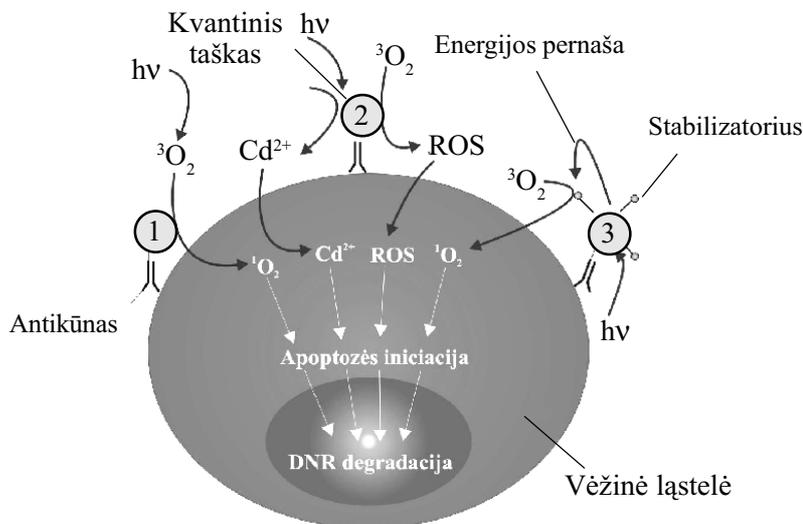
Nanotechnologijos atneša permąstymą kuriant įprastus vaistų vartojimo ir diagnostinio vaizdinimo metodus. Manoma, kad per ateinančius 10 metų bus sukurta ir klinikinėse laboratorijose įdiegta nanoskalės dydžių diagnostinė aparatūra, įgalinanti diagnozuoti, tiksliai pernešti vaistus ir padėti stebėti gydymo eigą. Norint realizuoti tokius planus, būtini išsamūs fiziologinių ir fizikocheminių procesų tyrinėjimai. Tiriamos nanonešiklių sąveikos su biologine aplinka: jų stabilumas, vaistų ištekėjimas iš nešiklių tarpląstelinėje ir viduląstelinėje terpėse, esant įvairioms pato-

logijoms, sandūros su anatominiiais, fiziologiniais, imunologiniais ir biocheminiais barjeriais. Kuriami nešikliai ir jų tikslinio taikymo strategijos atsižvelgiant į ligos stadiją bei lokalizaciją.

Labai perspektyvus atrodo kvantinių taškų daugiafunkcis panaudojimas – įvairių gydomųjų medžiagų prijungimas prie jų paviršiaus, kad audinys būtų vaizdinamas ir gydomas vienu metu (14 pav.). Neseniai įrodyta, jog kvantiniai taškai patys pasižymi fotodinaminėmis savybėmis (78). Šis atradimas gali padėti sukurti naujos kartos sensibilizatorių, tinkamų ne tik išoriniams, bet ir gilesniuose audinių sluoksniuose lokalizuotiems navikams gydyti. Kvantiniai taškai pasižymi savybėmis, pageidautinomis geriems sensibilizatoriams (79).

Jų cheminė sudėtis pastovi, o sintezė nėra nei labai sudėtinga, nei brangi. Be šviesos jie ne citotoksiški, tačiau švitinami ultravioletinių spindulių šviesa gali sukelti citotoksiškumą. Prie kvantinių taškų prijungus atitinkamus antikūnus, galima juos pristatyti į navikines ląsteles, kur jie, sužadinti šviesa, generuoja singuletinį deguonį (15 pav. 1). CdSe kvantiniai taškai, veikiami šviesos, generuoja singuletinį deguonį (78) ir aktyvias deguonies formas, kurios gali sukelti ląstelių apoptozę (15 pav. 2). Prijungus prie kvantinių taškų įprastinių sensibilizatorių molekules tokiu būdu, kuris užtikrintų gerą energijos pernašą, jie veiktų kaip efektyvūs fotosensibilizatoriai (15 pav. 3).

Tokie deriniai – tai tik keletas laimėjimų, pranašaujančių viltingą perspektyvą. Praktiniai daugiafunkčių nanostruktūrų panaudojimai galimi tik po ilgų išsamių eksperimentinių ir klinikinių tyrimų, bet jau žinomi rezultatai rodo, kad nanotechnologijos bus vis plačiau taikomos biomedicinoje.



15 pav. Galimi kvantinių taškų sukelti fotosensibilizuotų vyksmų mechanizmai

Nanoparticles in diagnostics and therapy: towards nanomedicine

Ričardas Rotomskis^{1,2}, Giedrė Streckytė¹, Vitalijus Karabanovas¹

¹Laser Research Center, ²Institute of Oncology, Vilnius University, Lithuania

Key words: nanoparticles, anticancer drugs, drug delivery, semiconductor quantum dots, fluorescent imaging.

Summary. Nanotechnology is an area of scientific research and technology development dealing with the structures and devices with length scales in the 1- to 100-nanometer range. Multifunctional nanoparticles that can target, diagnose, and treat diseases such as cancer are designed and developed. Numerous studies have shown that anticancer drugs encapsulated into nanoparticles can be delivered to target tumor cells and tissue. This would increase antitumor efficacy and reduce systemic side effects. Quantum dots are kind of nanoparticles with unique photochemical and photophysical properties. They are several orders of magnitude brighter than conventional fluorophores, and their emission spectra are very narrow and can be tuned by adjusting the size of the dots. Quantum dots are a new class of fluorescent labels with improved brightness and resistance against photobleaching. These properties could improve the sensitivity of biological detection and imaging by at least 10- to 100-fold. In this review, data of tumor targeting with conventional and long-circulating nanoparticles as well as applications of semiconductor quantum dots for *in vivo* imaging are discussed.

Correspondence to R. Rotomskis, Laser Research Center, Vilnius University, Saulėtekio 9, 10222 Vilnius, Lithuania
E-mail: ricardas.rotomskis@ff.vu.lt

Literatūra

- Dolmans DEJGJ, Fukumara D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nature Publishing Group 2003;3:380-7.
- Rotomskis R, Streckytė G, Gričiūtė L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai. (Photosensitized tumour therapy: primary processes.) Vilnius: Lietuvos mokslas; 2002.
- McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. J Leuk Bio 2005;78:585-94.
- Chen LT, Weiss L The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. Blood 1973;41:529-37.
- Bogunia-Kubik K, Sugisaka M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. Biosystems 2002;65:123-8.
- Xu XH, Brownlow WJ, Kyriacou SV, et al. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. Biochemistry 2004;43:10400-13.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.
- Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. Cancer Res 1987;47:3039-51.
- Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from *in vivo* imaging of gene expression and function. J Control Release 2001;74:7-25.
- Seymour LW. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1992;9:135-87.
- Baban D, Seymour LW. Control of tumor vascular permeability. Adv Drug Deliv Rev 1998;34:109-19.
- Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor – selective macromolecular drug targeting. Adv Enzyme Regul 2001;41: 189-207.
- Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and micro-environment. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:4607-12.
- Yuan F, Dellian M, Fukumura M, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. Cancer Res 1995;55:3752-6.
- Unezaki K, Maruyama J-I, Hosoda I, et al. Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by *in vivo* fluorescence microscopy. Int J Pharm 1996;144:11-7.
- Links M, Brown R. Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs. Expert Rev Mol Med 1999;1:1-21.
- Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer – mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur J Cancer Sci 2000;11:265-83.
- Couvreur P, Couarraze J-P, Devissaguet F, Puisieux. Nanoparticles: preparation and characterization. In: Benita S, editor. Microencapsulation: methods and industrial application. New York; 1996. p. 183-211.
- Yuan F. Transvascular drug delivery in solid tumors. Semin Radiat Oncol 1998;8:164-75.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacol Rev 2001;53:283-318.
- Noguchi Y, Wu J, Duncan J, et al. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. Jpn J Cancer Res 1998;89: 307-14.
- Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Control Release 2000;65:271-84.
- Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated)

- liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 1997;54:15-21.
24. Grislain L, Couvreur P, Lenaerts M, et al. Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int J Pharm* 1983;15:335-45.
 25. Verdun C, Brasseur F, Vranckx H, et al. Tissue distribution of doxorubicin associated with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;26:13-8.
 26. Brasseur F, Couvreur P, Kante B, et al. Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor. *Eur J Cancer* 1980;10:1441-5.
 27. Couvreur P, Kante B, Lenaerts V, et al. Tissue distribution of antitumor drug associated with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *J Pharm Sci* 1980;69:199-202.
 28. Chiannilkulchai N, Driouich Z, Benoit JP, et al. Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastasis. *Sel cancer Ther* 1989;5:1-11.
 29. Chiannilkulchai N, Ammoury N, Caillou JPh, et al. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded particles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;26:122-6.
 30. Rolland A. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in hepatoma patients after a single intravenous injection of free nanoparticle-bound anthracycline. *Int J Pharm* 1989;54:113-21.
 31. Storm G, Belliot SO, Daemen T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv Drug Deliv Rev* 1995;17:31-48.
 32. Stolnik S, Illum L, Davis SS. Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 1995;16:195-214.
 33. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, et al. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994;263:1600-3.
 34. Sharma D, Chelvi TP, Kaur K, et al. Novel Taxol® formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticles-encapsulated Taxol® for drug delivery in cancer therapy. *Oncol Res* 1996;8:281-6.
 35. Mitra S, Gaur U, Gosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Control Release* 2001;74:317-23.
 36. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Publishing Group* 2005;4:435-46.
 37. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, de Gennes PG. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *J Colloid Interface Sci* 1991;142:149-58.
 38. Jeon SI, Andrade JD. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. II. Effect of protein size. *J Colloid Interface Sci* 1991;142: 159-66.
 39. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 2000;88:217-29.
 40. Bennis S, Chapey P, Couvreur P, Robert J. Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyhexylcyanoacrylate against multi-drug-resistant tumour cells in culture. *Eur J Cancer* 1994;A30:89-93.
 41. Colin de Verdiere A, Dubernet C, Nemati F, et al. Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. *Br J Cancer* 1997;76:198-205.
 42. Pepin X, Attali C, Domrault S, et al. On the use of ion-pair chromatography to elucidate doxorubicin release mechanism from polyalkylcyanoacrylate nanoparticles at the cellular level. *J Chromatogr* 1997;B702:181-97.
 43. Alivisatos AP. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *J Phys Chem* 1996;100:13226-39.
 44. Sutherland AJ. Quantum dots as luminescent probes in biological systems. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2002;6:365-70.
 45. Qu LH, Peng XG. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *J Am Chem Soc* 2002;124:2049-55.
 46. Zhong XH, Feng YY, Knoll W, Han MY. Alloyed ZnxCd1-xS nanocrystals with highly narrow luminescence spectral width. *J Am Chem Soc* 2003;125:13559-63.
 47. Bailey RE, Nie SM. Alloyed semiconductor quantum dots: tuning the optical properties without changing the particle size. *J Am Chem Soc* 2003;125:7100-6.
 48. Kim S, Fisher B, Eisler HJ, Bawendi M. Type-II quantum dots: CdTe/CdSe(core/shell) and CdSe/ZnTe(core/shell) heterostructures. *J Am Chem Soc* 2003;125:11466-7.
 49. Wehrenberg BL, Wang CJ, Guyot-Sionnest P. Interband and intraband optical studies of PbSe colloidal quantum dots. *J Phys Chem B* 2002;106:10634-40.
 50. Gao XH, Chan WCW, Nie SM. Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *J Biomed Opt* 2002;7:532-37.
 51. Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, Simon SM. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol* 2003;21:47-51.
 52. Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998;281:2016-8.
 53. Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998;281:2013-6.
 54. Wu XY, Liu HJ, Liu JQ, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003;21:41-6.
 55. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002;298:1759-62.
 56. Dahan M, Levi S, Luccardini C, et al. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003;302:442-5.
 57. Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, et al. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol* 2004;22:198-203.
 58. Pathak S, Choi SK, Arnheim N, Thompson ME. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for *in situ* hybridization. *J Am Chem Soc* 2001;123:4103-4.
 59. Xiao Y, Barker PE. Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e28.
 60. Sukhanova A, Devy M, Venteo L, et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal Biochem* 2004;324:60-7.
 61. Alexson D, Li Y, Ramadurai D, et al. Binding of semiconductor quantum dots to cellular integrins. *IEEE T Nanotechnol* 2004;3:86-92.
 62. Nisman R, Dellaire G, Ren Y, et al. Application of quantum dots as probes for correlative fluorescence, conventional, and energy-filtered transmission electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2004;52:13-8.
 63. Minet O, Dressler C, Beuthan J. Heat stress induced redistribution of fluorescent quantum dots in breast tumor cells. *J*

- Fluoresc 2004;14:241-7.
64. Rosenthal SJ, Tomlinson A, Adkins EM, et al. Targeting cell surface receptors with ligand-conjugated nanocrystals. *J Am Chem Soc* 2002;124:4586-94.
 65. Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med* 2004;10:993-8.
 66. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:631-51.
 67. Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate Chem* 2004;15:79-86.
 68. Akerman ME, Chan WCW, Laakkonen P, et al. Nanocrystal targeting *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12617-21.
 69. Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*. *Science* 2003;300:1434-6.
 70. Hines MA, Scholes GD. Colloidal PbS nanocrystals with size-tunable near-infrared emission: observation of post-synthesis self-narrowing of the particle size distribution. *Adv Mater* 2003;15:1844-9.
 71. Yu WW, Wang YA, Peng XG. Formation and stability of size-, shape-, and structure controlled CdTe nanocrystals: ligand effects on monomers and nanocrystals. *Chem Mater* 2003;15:4300-8.
 72. Kim S, Lim YT, Soltesz EG, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol* 2004;22:93-7.
 73. Parak WJ, Boudreau R, Le Gros M, et al. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv Mater* 2002;14:882-5.
 74. Gao XH, Cui YY, Levenson RM, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2004;22:969-76.
 75. Jain RK. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng* 1999;1:241-63.
 76. Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from *in vivo* imaging of gene expression and function. *J Control Release* 2001;74:7-25.
 77. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett* 2004;4:11-8.
 78. Samia ACS, Chen X, Burda C. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc* 2003;125:15736-7.
 79. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, et al. Quantum dots as photosensitizers? *Nat Biotechnol* 2004;22:1360-1.

Straipsnis gautas 2006 01 07, priimtas 2006 05 09
Received 7 January 2006, accepted 9 May 2006