



PAULA STRADIŅA
KLĪNISKĀ UNIVERSITĀTES SLIMNĪCA

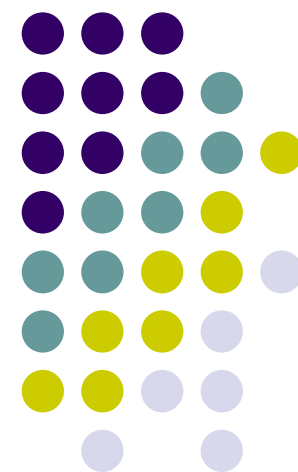
Ar nanodaļiņām lādētu šūnu izveide

Dr.biol. Inese Čakstiņa

Ēriks Jakobsons

Šūnu Transplantācijas centrs

Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca

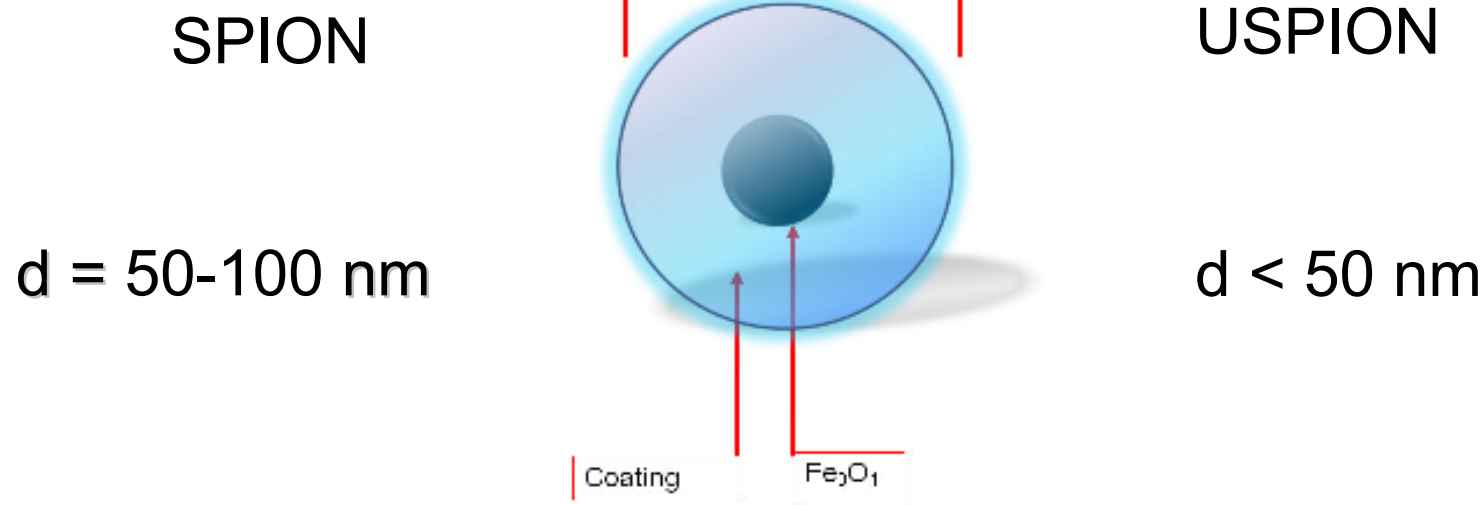


Nanodaļiņas audu inženierijā



- Nanodaļiņas kā nanomateriālu izejviela
- Magnētiski lādētas nanodaļiņas

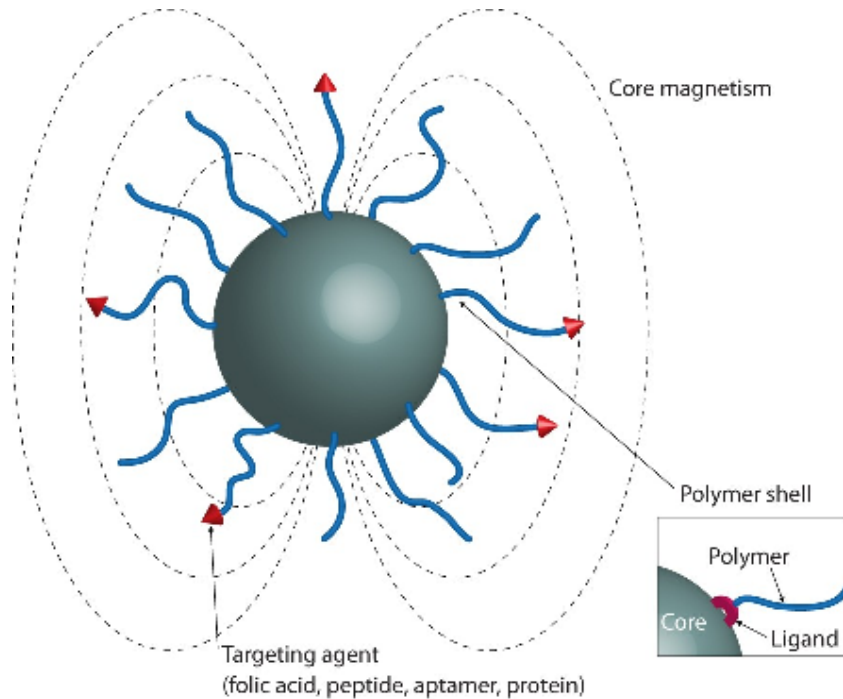
IONPs (dzelzs oksīda nanodaļiņas)



Mandarano et al., 2010 Biomed Imaging Interv J

MRI kontrastaģenti un kā vektori zāļu un gēnu transportam organismā; potenciāls pielietojums hipertermijas terapijā, jo dažas magnētiskās daļiņas var uzkarst augstas frekvences magnētiskajā laukā

SPION - superparamagnetic iron-oxide nanoparticles

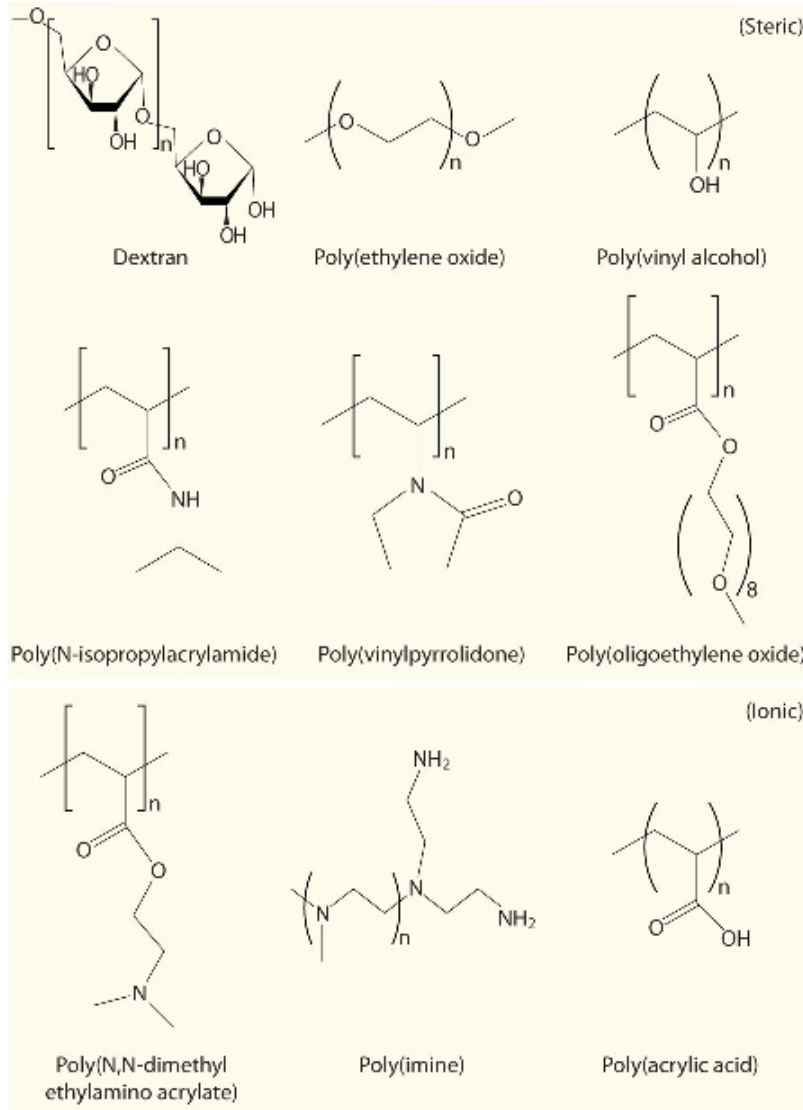


Funkcionāla dzelzs oksīda nanodaļiņa. Uz magnetīta (Fe_3O_4) vai magemīta (Fe_2O_3) virsmas piesaistīti funkcionāli polimēri ar dažādu “enkuru” palīdzību (amīnu, organisko skābju (R-COOH) vai fosforskābes (H_3PO_4) grupām).

Boyer et al., 2010 NPG Asia Mater

Polimēru apvalks nodrošina daļiņas stabilitāti, kā arī ļauj dažādu terapeitisko aģentu iekapsulēšanu.

Nanodaļiņu stabilizējošie polimēri



Dekstrāni un ogļhidrātu atvasinājumi - pirmās paaudzes polimēri:

“+” saistās ar IONPs, piešķirot vienlaicīgi stabilitāti asins plazmā (zema salipšana ar proteīniem)

“-” savstarpēja polimēru mijiedarbība veidojot sakopojumus

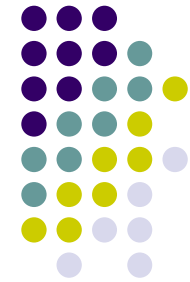
PVP, PVA un PEG:

“+” biosaderīgi, PEG - anti-salipšanas (fouling) īpašības

“-” PVA un PVP var absorbēt proteīnus (H saites)

Polimēri, kas lādēti ar katjoniem arī reizēm tiek izmantoti (polyethyleneimine (PEI)), tomēr tie spēcīgi mijiedarbojas ar proteīniem un ir citotoksiski - neizmanto in vivo, toties var izmantot transfekcijās (DNS un RNS pārnese)

IONPs asins cirkulācijā



Izmērs

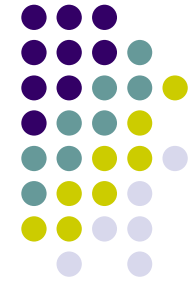
Pussabrukšana asinīs

Lādiņš

Polimēra morfoloģija

Polimēra blīvums

IONPs asins cirkulācijā



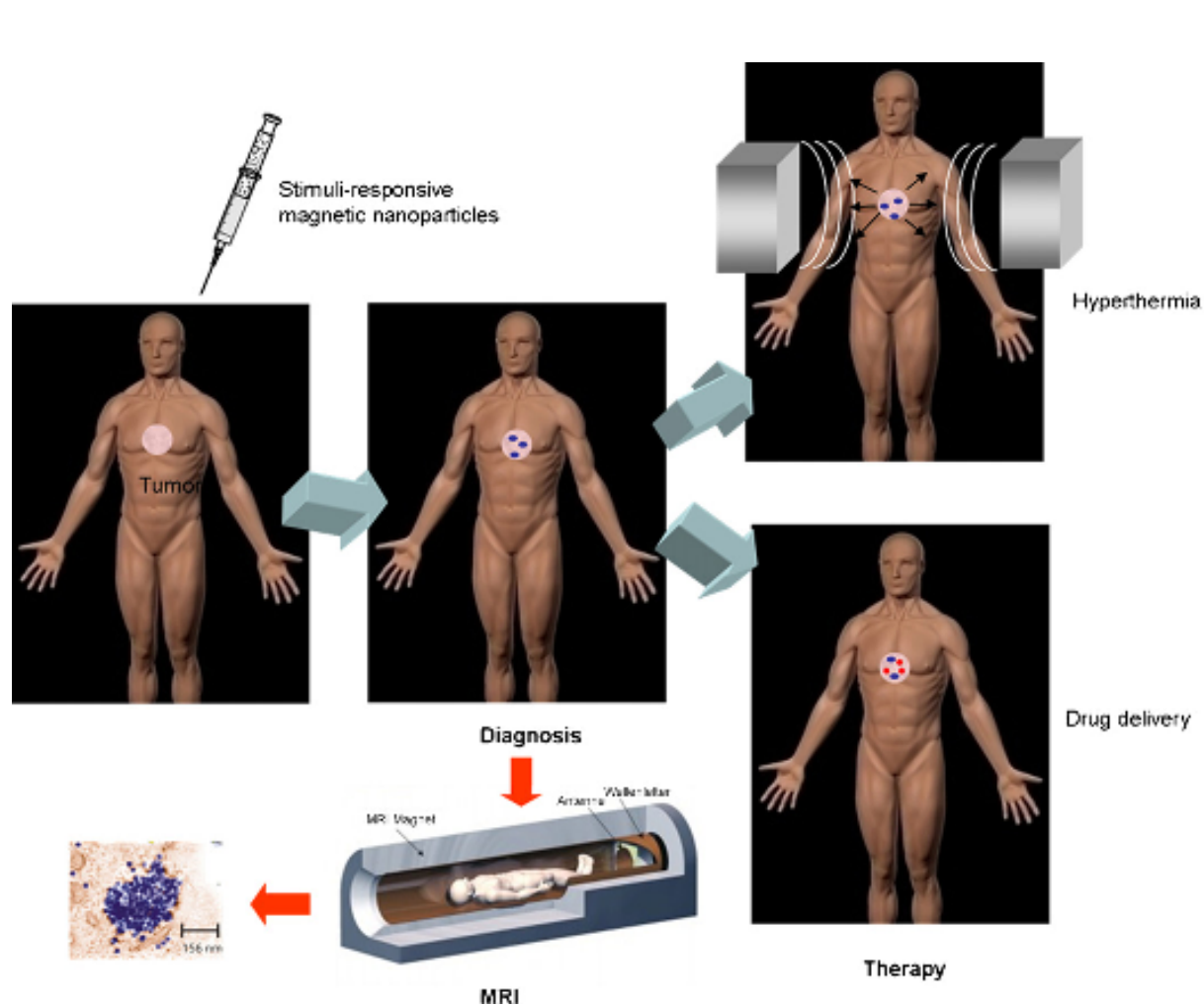
Izmērs

< 10 nm tiek salīdzinoši ātri
izvadītas caur nierēm

> 200 nm jau salīdzinoši ātri
tiek nogādātas uz liesu
(makrofāgi)

10 - 100 nm - optimālas
ilgstošai cirkulācijai in vivo

pussabrukšanas periods asinīs paaugstinās, ja daļiņas “serde” ir mazāka
cirkulācijas laika samazināšanos saista ar PEG molmasas pazemināšanos

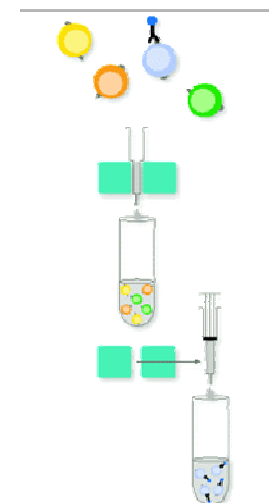


Mērķis: Noteiktu šūnu populāciju noturēšana miokarda infarkta skartajos rajonos ar mērķi stimulēt “klusējošās” šūnas veicinot audu funkciju uzlabošanu



Uzdevumi:

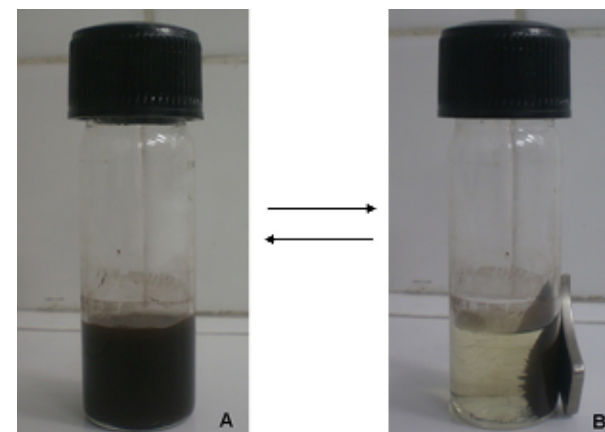
- 1) Iegūt pēc iespējas “tīrāku” cilmes un priekštečšūnu populāciju (Lineage depletion)
- 2) Inkubēt ar nd-dx dažādās koncentrācijās
- 3) Noteikt šūnu “kustīgumu” magnētiskā lauka ietekmē
- 4) Noskaidrot nd-dx+šūnas magnētismu (spēju noturēties vēlamajā vietā)
- 5) Noteikt, cik ļoti nd-dx pārklāj šūnas



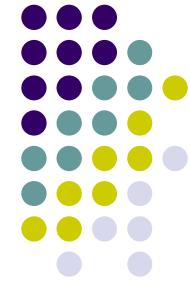
Šūnu avots:
Kaulu smadzenes no *sternum*

Šūnu tips:
Mononukleārās šūnas pēc Ficoll apstrādes, kas
attīrītas izmantojot *Lineage depletion* kitu
(aizmetņšūnu (*progenitor*) populācija)

Nanodaļiņas:
 Fe_2O_3 , izmērs: ap 19 nm; pārklājums: dekstrāns
Izmantotās koncentrācijas: 0.1 mg/ml; 0.5 mg/ml un
0.75 mg/ml



Rezultāti



Koncentrācija (mg/ml)

0.1

0.5

1

Ātrums (cm/s)

0.001

0.003

0.009474

Magnētiskais moments (emu)

2.88809E-10

8.64759E-10

2.60359E-09

Paraugs tika novietots 2 cm attālumā no spēcīga 50 x 50 x 10 mm neodīma magnēta, kur magnētiskā lauka indukcija ir 628 G un gradients 360 G/cm.

Šūnas saistās ar nd-dx un virzās magnētiskā lauka ietekmē

Rezultāti



Noteiktais cilmes šūnu vidējais rādiuss ir **5,9** μm .

Ar magnetometru noteikts, ka nanodaļiņas magnētiskais moments ir $6,69\text{E}-16$ emu, līdz ar to nanodaļiņu skaits uz šūnas virsmas pie dažādām koncentrācijām:

Koncentrācija (mg/ml)

0.1

0.5

1

Noteiktais daļiņu skaits uz šūnas

$4.32\text{E}+05$

$1.29\text{E}+06$

$3.89\text{E}+06$

Uz šūnas virsmas ideālā gadījumā vienā slānī var izvietoties ne vairāk kā **$2,68\text{E}+06$** daļiņu.

Pie dotajām magnētisko daļiņu koncentrācijām ir sasniegts maksimālais daļiņu skaits uz cilmes šūnas virsmas.

Rezultāti/Secinājumi



Pie lielām nanodaļiņu koncentrācijām ir būtisks brīvo (ar šūnām nesaistīto) magnētisko daļiņu skaits, kas veido milzīgus aglomerātus.

Šie aglomerāti gan ar savu radīto iekšējo lauku (ja lauks ir liels, tad var no sevis "izspiest" mazāk magnētiskās šūnas), gan ar radīto plūsmu (rauj sev līdzī) būtiski ietekmē šūnu kustību, tāpēc skaitliskie aprēķini gadījumā kur ir novērojami šādi lieko daļiņu veidojumi ir maz ticami. Secinājums, nav īsti jēgas no augstām koncentrācijām (virs 0.5 mg/ml). Iespējams ir jāuzlabo nanodaļiņu kvalitāte, lai novērstu to salipšanu veidojot aglomerātus.

Rezultāti/Secinājumi

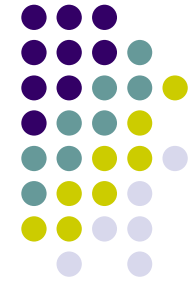


Lai sasniegtu kapilāra rādiusu $4 \mu\text{m}$ notiek 25 sākotnējā asinsvada zarošanās. Noteiktā plūsma šādā kapilārā būs $3,44\text{E}-6 \text{ ml/min}$, jeb $0,11 \text{ cm/s}$. Redzams ka tā ir no 100 - 10 reizēm lielāka kā šūnu ātrums magnetoforēzē.

Secinājums: šādas konfigurācijas magnētiskais lauks nav pietiekams, lai noturētu šūnas konkrētā rajonā tik lielā asins plūsmā.

Nepieciešams piemeklēt atbilstošas formas magnētus, lai iegūtu maksimāli lielu magnētiskā lauka gradientu, ņemot vērā, ka magnētam ir jāatrodas ļoti tuvu apstrādājamai zonai, varētu pat apsvērt iespēju izveidot organismā ievadāmu magnētu (piem. laproskopiski).

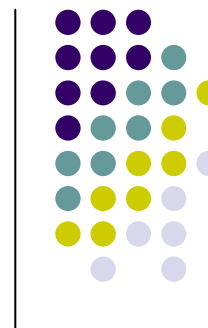
Kopsavilkums



- 1) Izveidota metode noteiktu šūnu populāciju attīrīšanai
- 2) Noteikta optimālā nd-dx saistīšanās metode
- 3) Izveidota metode nesaistītā magnētiskā materiāla aizvākšanai
- 4) Noteikts šūnu virsmas pārklājums ar nd-dx

Turpmāk:

- 1) Noskaidrot pie šūnas virsmas saistīto nd ietekmi uz šūnas funkcionalitāti
- 2) Tiek meklēti iespējamie magnētiskā lauka konfigurācijas tehniskie risinājumi



Pateicos par uzmanību!