

На правах рукописи

БОЗРОВА СВЕТЛАНА ВИКТОРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ
ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
НАНОКРИСТАЛЛОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ**

03.01.06 - Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»» (НИЯУ МИФИ) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

Суханова Алена Владимировна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»» (НИЯУ МИФИ) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Лаборатория нано-биоинженерии, ведущий научный сотрудник, Москва.

Официальные оппоненты:

Уласов Илья Валентинович, доктор биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Отдел современных биоматериалов института регенеративной медицины, ведущий научный сотрудник. Москва.

Агапова Ольга Игоревна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория бионанотехнологий, научный сотрудник, Москва.

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В связи с интенсивным развитием биотехнологии и, в частности, бионанотехнологий, в течении последние двух десятилетий особый интерес исследователей связан с получением новых синтетических наноматериалов с заданными свойствами. За это время наноматериалы и в частности нанокристаллы (НК) нашли широкое применение в области сельского хозяйства в качестве противомикробных агентов или инсектицидов (Singh S. et al., 2015), в косметологии в качестве средств доставки активных препаратов или кислорода (Raj S. et al., 2012), в электронике в составе дисплеев (Chen H.-S. et al., 2015), при разработке возобновляемых источников энергии, таких как солнечные батареи (Yang Z. et al., 2017) или при добыче и переработки нефти и газа (Liu H. et al., 2016; Ponmani S. et al., 2013). В биотехнологических приложениях НК используются в качестве флуоресцентных меток, при создании гибридных диагностических систем (Cordeiro M. et al., 2016), для антибактериальной обработки имплантатов (Parnia F. et al., 2017), а также для биологической визуализации (Wang L.-W. et al., 2015). Применение наноматериалов в биотехнологии невозможно без всесторонней оценки их токсичности и изучения возможных негативных последствий их взаимодействия с организмом.

Данная диссертационная работа посвящена системному исследованию влияния физико-химических свойств полупроводниковых флуоресцентных НК на их токсичность на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях для разработки подходов к контролю безопасности применения наноматериалов в составе медицинских изделий, косметических и парфюмерных средств, пищевых продуктов и других продуктов, получаемых бионанотехнологическим путем. Изучение воздействия различных НК на живые системы позволит определить основные механизмы проявления их токсичности, что актуально для разработки подходов по снижению их общего токсического воздействия на организм. Выяснение того, какие именно свойства НК вносят максимальный вклад в их токсичность, позволит создавать менее токсичные НК, например, путем изменения их состава, размера и т.п. Накопленные данных о токсичности НК с различными

физико-химическими свойствами могут быть использованы в различных биотехнологических приложениях для создания и дальнейшего исследования отдельных видов НК и гибридных материалов на их основе.

Степень разработки темы исследования

Несмотря на то, что НК уже активно применяются в различных производственных сферах и входят во множество технологических процессов и конечных изделий, вопросы их токсичности наиболее активно изучаются применительно к медицинским изделиям, что связано с наиболее жестким регулированием безопасности данного вида продукции (Wolfram J. et al., 2015).

Большая часть научных публикаций в области гибридных нанобиоматериалов посвящена разработке новых типов НК и примерам их использования в животных или клеточных моделях, и только часть исследователей проводит соответствующие исследования их токсического воздействия (Valizadeh A. et al., 2012). Пути реализации токсического воздействия НК и основные клеточные мишени, а также вопросы их накопления и выведения из организма изучаются с использованием различных моделей *in vitro* и *in vivo* (Liu F. et al., 2017; Kumar V. et al., 2017). При этом значительное внимание уделено вопросам влияния размера и химического состава НК на токсичность, в то время как изучение других физико-химических параметров, таких как внешний заряд, природа и свойства органической оболочки, представлено довольно скудно (Liu F. et al., 2017). Сопоставление результатов, полученных разными научными группами, также затруднено в силу того, что не все исследователи оценивают такие параметры НК, как особенности их структуры и физико-химических свойств, что не позволяет провести системный анализ литературных данных по каждому из типов НК на соответствующей *in vitro* или *in vivo* модели (Pelaz V. et al., 2017).

Цель и задачи исследования

Целью данной диссертационной работы является исследование зависимости токсических свойств полупроводниковых флуоресцентных НК от их физико-химических свойств, а также сравнительный анализ их влияния на живую систему на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях для выявления критических параметров для безопасного применения наноматериалов.

В соответствии с поставленной целью работы были поставлены следующие **задачи**:

- получить серии водорастворимых флуоресцентных полупроводниковых НК, стабильных в водных растворах и различающихся по химическому составу, размеру и поверхностным свойствам;

- провести детальную характеристику полученных образцов НК;

- исследовать цитотоксическое действия различных типов НК *in vitro* на клетки соединительной ткани человека, а также на клетки рака молочной железы человека, определить значения полумаксимального ингибирования (ИК₅₀) для всех типов НК, а также изучить скорость их трансмембранного транспорта и внутриклеточного накопления;

- исследовать особенности влияния НК на стабильность биологических молекул *in vitro* на примере их взаимодействия с инсулином человека;

- провести сравнительную оценку острой токсичности различных типов НК *in vivo*, а также оценить отдаленные последствия инъекций исследуемых препаратов с использованием модельных животных – мышей линии BALB/c;

- провести сравнительный анализ токсических эффектов кадмий-содержащих НК на состояние иммунитета мышей линии CBAxС57BL/6.

Научная новизна

Получены серии водорастворимых флуоресцентных полупроводниковых НК, имеющих структуру ядро-оболочка и различающихся химическим составом ядра, количеством слоев в составе неорганической оболочки, размером, а также поверхностным зарядом в водной среде.

Впервые системно исследовано и проанализировано влияние физико-химических параметров на цитотоксичность НК *in vitro* в отношении нормальных и опухолевых клеток человека. Для каждого типа НК определены диапазоны концентраций, в которых проявляются их цитотоксические свойства.

С использованием в качестве модельного объекта инсулина человека исследована кинетика взаимодействия НК с определенными физико-химическими свойствами с белковыми молекулами.

Проведена оценка острой токсичности НК и отдаленных последствий инъекций исследуемых препаратов НК *in vivo*. Показано, в каких диапазонах концентраций НК могут оказывать существенное токсическое воздействие. Кроме того, исследовано влияние наиболее токсичных кадмий-содержащих НК на функциональное состояние иммунной системы модельных животных.

Таким образом, впервые продемонстрировано, какие именно параметры НК необходимо учитывать для разработок безопасных наноматериалов для их дальнейшего использования в биотехнологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Использование наноматериалов в различных отраслях невозможно без оценки безопасности их применения. Таким образом, исследование их возможных токсических эффектов носит несомненную практическую значимость.

Важным аспектом проведенных исследований является разработка систематизированного подхода к экспериментам, которые позволяют проводить контроль качества и оценку безопасности препаратов НК на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Проведенный сравнительный анализ зависимости токсических эффектов от физико-химических параметров НК, позволяет сделать выводы о возможных путях снижения токсичности, что актуально для разработки наноматериалов со сниженным токсическим воздействием на биосистемы. В работе продемонстрирован механизм образования фибрилл инсулина в присутствии НК с определенными свойствами, что несомненно нужно учитывать при возможном использовании наноматериалов в производстве фармацевтических препаратов. Практическая значимость диссертационной работы подтверждена наличием у автора патента Российской Федерации на изобретение по теме диссертации.

Методология и методы исследования

Использованные в работе методологические подходы соответствуют современному уровню развития соответствующих областей экспериментальной науки. Для получения первичных данных был использован широкий диапазон современных методов исследования, а также метод дедукции для формулирования выводов на основе полученных экспериментальных данных и эмпирического

поиска закономерностей. При планировании экспериментов были критически проанализированы опубликованные данные из российских и международных информационных ресурсов. Отдельное внимание в экспериментах уделялось контрольным параметрам и их анализу в сравнении с полученными экспериментальными данными. Все эксперименты воспроизводили независимым образом не менее трех раз и полученные данные анализировали с помощью общепринятых статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

- Разработанный подход к оптимизации свойств и оценке безопасности использования потенциально биосовместимых водорастворимых флуоресцентных полупроводниковых НК;
- Результаты исследования зависимости цитотоксичности *in vitro* и токсичности *in vivo* водорастворимых флуоресцентных полупроводниковых НК от их физико-химических свойств;
- Результаты исследования влияния кадмий-содержащих НК на состояние иммунной системы мышей CBAxС57BL/6 *in vivo*;
- Результаты исследования динамики и механизма образования амилоидных фибрилл рекомбинантного инсулина человека в физиологических условиях в присутствии НК с определенными физико-химическими свойствами.

Личный вклад автора в получении научных результатов

Все представленные в диссертационной работе научные результаты получены автором лично. Планирование экспериментов, анализ полученных результатов и их оформление в виде научных публикаций выполнялось автором совместно с научным руководителем.

Апробация работы

Апробация диссертационной работы состоялась 20 февраля 2019 г. на научном заседании межкафедральной лаборатории нано-биоинженерии НИЯУ МИФИ. Основные результаты и научные положения работы были представлены на следующих конференциях и конгрессах: 7th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" (Crete, Греция, 2016), 1st International Symposium "Physics, Engineering and Technologies for

Bio-Medicine" (Москва, 2016), 2nd International Scientific Conference «Science of the Future» (Казань, 2016), Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 2017), 2nd International Symposium “Physics, Engineering and Technology for Biomedicine” (Москва, 2017), 3rd International Symposium "Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine" (Москва, 2018), 9th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" (Crete, Греция, 2018).

Публикации

По теме диссертации было опубликовано 7 работ в научных журналах, из них 4 в журналах, рекомендуемых ВАК, а также опубликовано 9 тезисов докладов в сборниках научных трудов конференций и получен один патент РФ.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке Министерства Образования и Науки Российской Федерации, Государственное задание № 16.1034.2017/ПЧ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 5 глав результатов и их обсуждения, выводы, заключение, благодарности, список сокращений и условных обозначений, список литературы и список публикаций по теме диссертации. Работа изложена на 145 страницах и включает 31 рисунок и 12 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 219 источников.

Соответствие паспорту специальности

По тематике диссертационной работы, сформулированной цели и поставленным задачам научного исследования, а также исходя из полученных результатов, их научной новизны и практической значимости, диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии) по пунктам 2 и 8.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы; степень разработки темы исследования; изложены цель и задачи работы; научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов.

Раздел 1 посвящен обзору научной литературы, где проанализированы современные научные данные по теме работы, связанные с применением НК, известные данные о проявлениях и механизмах их токсичности в зависимости от их свойств, а также методы изучения токсичности НК.

В разделе 2 содержится характеристика объектов исследования, а также использованных в работе исходных синтетических наноматериалов, линий клеток человека, модельных животных, реактивов, расходных материалов и оборудования. Данная глава также содержит детальное описание всех использованных в работе экспериментальных методик.

Раздел 3 состоит из 5 основных глав и посвящен описанию полученных результатов и их обсуждению.

3.1 Характеристика наноматериалов, использованных в работе

Для проведения исследований готовили серии водорастворимых полупроводниковых флуоресцентных НК сферической формы (квантовых точек (КТ), полученных из исходных синтетических НК структуры ядро-оболочка с помощью функционализации их поверхности низкомолекулярными производными полиэтиленгликоля (PEG). Полученные водорастворимые наноматериалы различались химическим составом ядра (кадмий-; свинец- или медь-содержащие); количеством монослоев защитной неорганической оболочки из сульфида цинка или сульфида кадмия; физическим размером, а также поверхностным зарядом за счет использования для модификации поверхности КТ производных PEG сходного размера, но различающихся концевыми функциональными группами (-ОН; -СООН или -NH₂). Поверхностный заряд и гидродинамический диаметр (ГДД) образцов полученных водорастворимых КТ приведены в Таблице 1.

Коллоидную стабильность КТ оценивали по изменению ГДД КТ при инкубации полученных препаратов КТ в натрий-фосфатном буфере (рН 7,2) или в культуральной среде RPMI-1640. Было показано, что ГДД остается постоянным

для всех типов КТ использованных в работе как минимум в течение 5 дней в данных условиях. Получение достаточно больших количеств одинаковых по своим физико-химическим свойствам водорастворимых коллоидно-стабильных функционализированных КТ является важнейшим фактором с точки зрения проведения сравнительных экспериментов в одинаковых условиях и дальнейшего анализа полученных результатов.

Таблица 1 - Характеризация полученных образцов квантовых точек

№	Состав КТ	ГДД, нм	ζ-потенциал, мВ
1	PbS/CdS/ZnS-PEG-OH*	32,04±0,87	-10,60±2,92
2	CuInS ₂ /ZnS-PEG-OH	16,08±0,51	-6,12±1,81
3	CdSe/CdS/ZnS (6+3 MC [#])-PEG-OH	26,48±0,92	-8,88±1,87
4	CdSe/ZnS (8 MC)-PEG-OH	25,86±1,22	-11,20±1,37
5	CdSe/ZnS-PEG-OH	16,74±0,28	-4,72±0,38
6	CdSe/ZnS-PEG-COOH*	15,37±0,14	-17,80±3,01
7	CdSe/ZnS-PEG-NH ₂ *	22,77±0,36	+6,43±1,12
* - Лиганд PEG-OH соответствует 100% HS-(CH ₂) ₁₁ -EG ₆ -OH PEG-COOH - смесь 70% HS-(CH ₂) ₁₁ -EG ₆ -OH и 30% HS-(CH ₂) ₁₁ -EG ₆ -OCH ₂ -COOH PEG-NH ₂ - смесь 70% HS-(CH ₂) ₁₁ -EG ₆ -OH и 30% HS-(CH ₂) ₁₁ -EG ₆ -NH ₂ # - количество монослоев неорганической эпитаксиальной оболочки			

3.2 Оценка цитотоксичности квантовых точек *in vitro*

В качестве модельных клеточных линий были выбраны нормальные (клеточная линия фибробластов Wi-38) и опухолевые (клеточная линия аденокарциномы молочной железы SK-BR-3) клетки человека. Результаты исследования токсичности КТ в зависимости от их размера, поверхностного заряда и химического состава приведены в Таблице 2.

3.2.1 Зависимость цитотоксичности КТ *in vitro* от их гидродинамического диаметра

Для анализа зависимости цитотоксичности КТ от их размера были приготовлены три типа препаратов КТ с одинаковым химическим составом, поверхность которых была функционализирована PEG-OH. Наименьшее значение ГДД (около 17 нм) наблюдалось для препаратов КТ CdSe/ZnS-PEG-OH; ГДД препаратов КТ CdSe/CdS/ZnS (6+3 MC)-PEG-OH и препаратов КТ CdSe/ZnS (8 MC)-PEG-OH составляло около 26 нм. Оценка полученных значений ИК₅₀ показывает, что меньшие по размеру КТ являются более токсичными для любого из тестируемых типов клеток, чем большие по размеру КТ (Таблица 2). При инкубировании в течение 48 часов цитотоксичность КТ повышается, а разница между опухолевыми

и нормальными клетками снижается, что может говорить о внутриклеточном накоплении КТ.

3.2.2 Зависимость цитотоксичности квантовых точек *in vitro* от их поверхностного заряда

Для исследования влияния поверхностного заряда на цитотоксичность КТ были выбраны препараты КТ химического состава CdSe/ZnS, модифицированные различными типами лигандов: производными PEG-OH – для придания поверхности КТ слабо-отрицательного заряда; смесью лигандов, содержащей PEG-COOH, – для придания поверхности КТ отрицательного заряда и смесью лигандов, содержащей PEG-NH₂, – для придания поверхности положительного заряда. При этом ГДД препаратов КТ со слабо-отрицательным и отрицательным зарядом был одинаков (15-16 нм), а ГДД положительно заряженных КТ составлял 22-23 нм. Наиболее токсичными для обоих типов клеток оказались КТ со слабо-отрицательным зарядом, в то время как отрицательно заряженные КТ были наименее токсичны (Таблица 2). Оценка взаимодействия КТ с клетками показывает, что положительно заряженные КТ наиболее эффективно проникают в клетку и накапливаются в ней, однако не оказывают большего токсического эффекта, в сравнении с другими типами КТ, вероятно, вследствие молекулярных взаимодействий с органическими соединениями в клетке. Инкубация клеток с КТ в течение 48 часов показывает пропорциональное уменьшение ИК₅₀ для каждого из видов КТ, что может свидетельствовать о том, что именно скорость транспорта КТ, зависящая от поверхностного заряда, является лимитирующим фактором для проявления токсичности.

3.2.3 Зависимость цитотоксичности квантовых точек *in vitro* от их химического состава

Зависимость токсичности КТ от их химического состава исследовали с использованием серии КТ структуры ядро/оболочка с различным химическим составом ядра. Поверхность всех типов, исследуемых КТ была функционализована PEG-OH. Были исследованы КТ с ядром на основе тяжелых металлов (Cd и Pb), а также с ядром состава CuInS₂. Как показывают результаты, КТ с одинаковым ГДД, но с различным составом ядра обладают практически

одинаковыми ИК₅₀ для всех протестированных типов клеток, хотя известно, что КТ с ядром на основе CuInS₂ менее токсичны, чем с CdSe ядром. Скорее всего, полученные данные обусловлены тем, что внешняя неорганическая оболочка ZnS и дополнительная оболочка, образованная алифатической частью молекул лигандов, использованных для модификации поверхности КТ, достаточно эффективно предохраняют КТ от деградации и, таким образом, клетки от воздействия тяжелых металлов. Дополнительным подтверждением этой гипотезы является тот факт, что спустя 24 и 48 часов инкубации клеток в присутствии этих типов КТ глобальных различий в цитотоксичности исследуемых наноматериалов не наблюдается. Таким образом, цитотоксичность КТ в данных условиях инкубаций с клетками *in vitro* практически не зависит от химического состава ядра, так как внешние оболочки хорошо защищают ядро КТ от разрушения, а разница в ИК₅₀ в большей степени может быть обусловлена различием размеров КТ.

Таблица 2 - Цитотоксичность квантовых точек *in vitro*

Время, час	Использованные КТ	SK-BR-3		Wi-38	
		ИК ₅₀ , мг/мл	СО*	ИК ₅₀ , мг/мл	СО
Зависимость токсичности КТ от их размера					
24	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,044	0,025	0,044	0,000
	CdSe/CdS/ZnS(6+3MC)-PEG-OH	0,058	0,003	0,108	0,004
	CdSe/ZnS (8 MC)-PEG-OH	0,053	0,003	0,104	0,003
48	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,031	0,018	0,032	0,008
	CdSe/CdS/ZnS(6+3MC)-PEG-OH	0,046	0,001	0,056	0,009
	CdSe/ZnS (8 MC)-PEG-OH	0,035	0,002	0,046	0,002
Зависимость токсичности КТ от их поверхностного заряда					
24	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,044	0,025	0,044	0,000
	CdSe/ZnS-PEG-COOH	0,058	0,005	0,078	0,003
	CdSe/ZnS-PEG-NH ₂	0,055	0,003	0,061	0,009
48	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,031	0,018	0,032	0,008
	CdSe/ZnS-PEG-COOH	0,052	0,003	0,058	0,003
	CdSe/ZnS-PEG-NH ₂	0,035	0,006	0,045	0,009
Зависимость токсичности КТ от химического состава					
24	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,044	0,025	0,044	0,000
	PbS/CdS/ZnS-PEG-OH	0,083	0,003	0,080	0,011
	CuInS ₂ /ZnS-PEG-OH	0,045	0,007	0,051	0,006
48	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,031	0,018	0,032	0,008
	PbS/CdS/ZnS-PEG-OH	0,036	0,008	0,054	0,006
	CuInS ₂ /ZnS-PEG-OH	0,033	0,011	0,033	0,003
* - стандартное отклонение, по результатам 3-х независимых экспериментов					

3.3 Анализ токсического действия квантовых точек на молекулярном уровне в модели их взаимодействия с инсулином человека

На первом этапе работы были проведены контрольные эксперименты по изучению кинетики образования фибрилл инсулина с помощью флуоресцентного красителя тиофлавина Т (ThT) в различных температурных условиях в присутствии КТ CdSe/ZnS-PEG-OH. Полученные данные показали, что с повышением температуры процесс образования амилоидных структур инсулина в присутствии КТ происходит более интенсивно. Так как ThT является высокоспецифичным флуоресцентным красителем для детекции наличия амилоидных структур и позволяет оценить только факт их наличия, оценку их динамики роста и размер изучали с помощью метода динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS. Было показано, что в течение 6 часов происходит изменение ГДД смеси инсулина/КТ с $12,56 \pm 0,14$ нм до 3787 ± 141 нм.

Результаты исследования процесса индукции и кинетики роста амилоидных фибрилл инсулина человека в присутствии КТ при помощи высокоскоростной атомно-силовой микроскопии показали, что в начальный момент времени и спустя 30 минут после начала совместной инкубации инсулина и КТ в экспериментальном образце инсулин оставался в форме мономеров размером $18,4 \pm 4,6$ нм (Рисунок 1).

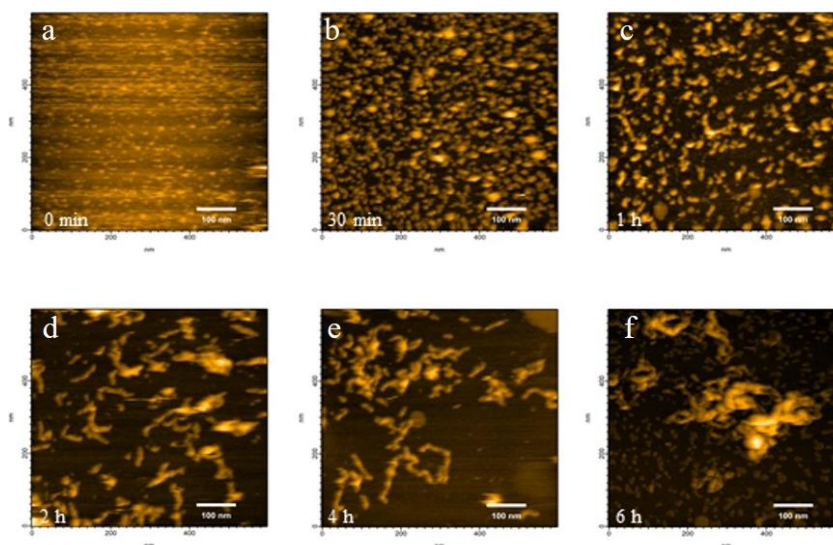


Рисунок 1 – Исследование динамики процесса образования амилоидных фибрилл инсулина в присутствии квантовых точек с помощью атомно-силовой микроскопии

Через час после начала инкубации отмечается начало процесса формирования протофибрилл инсулина размером $22,4 \pm 4,5$ нм, а ещё через час отмечается существенное увеличение протофибрилл инсулина в размерах до $51,7 \pm 9,0$ нм. В течение последующих двух часов процесс образования фибрилл продолжался, и размер фибрилл увеличился до $133,6 \pm 17,6$ нм, что свидетельствует о высокой скорости процесса. Таким образом, нами было показано, что НК могут проявлять молекулярную токсичность в отношении белков, конформационно стабильных в физиологических условиях, являясь центром инициации образования патологических структур белка.

3.4 Оценка токсичности квантовых точек *in vivo*

В рамках диссертационной работы нами были определены значения LD_{50} для различных типов КТ, оценена физиологическая реакция лабораторных животных на инъекции препаратов КТ, а также оценено токсическое воздействие КТ на поведенческие реакции и патологические изменения в тканях и внутренних органах.

3.4.1 Оценка острой токсичности квантовых точек *in vivo*

Токсичность КТ *in vivo* изучалась для препаратов КТ с различным химическим составом ядра и для препаратов КТ с различным поверхностным зарядом. Исходя из полученных результатов, были рассчитаны значения LD_{50} для всех типов исследованных препаратов КТ. Результаты проведенных исследований показали, что наиболее токсичными являются КТ CdSe/ZnS-PEG-OH со слабо-отрицательно заряженной поверхностью. При этом наименьшей токсичностью обладают КТ с отрицательным поверхностным зарядом, что согласуется с нашими данными по токсичности *in vitro*. Кроме того, КТ с ядром на основе $CuInS_2$, также обладают низкой токсичностью, по сравнению с КТ, ядро которых содержит тяжелые металлы (Таблица 3).

Таблица 3 - Значения ЛД₅₀ препаратов квантовых точек для мышей линии BALB/c

№	Тип КТ	ЛД ₅₀ , мг/кг
1	CdSe/ZnS-PEG-OH	112,5
2	CuInS ₂ /ZnS-PEG-OH	200
3	PbS/CdS/ZnS-PEG-OH	150
4	CdSe/ZnS-PEG-COOH	>300
5	CdSe/ZnS-PEG-NH ₂	240

Различия в результатах *in vivo* и *in vitro* скорее всего обусловлена тем, что в условиях живого организма деградация защитной оболочки происходит быстрее и токсический эффект во многом обусловлен именно токсичностью тяжелых металлов.

3.4.2 Оценка отдаленных последствий инъекции квантовых точек *in vivo*

Оценку отдаленных последствий инъекций КТ *in vivo* проводили после однократных инъекций здоровым мышам самкам линии BALB/c препаратов КТ с различным химическим составом ядра (CuInS₂/ZnS-PEG-OH, PbS/CdS/ZnS-PEG-OH и CdSe/ZnS-PEG-OH) и сходными свойствами поверхности. На протяжении всего времени наблюдения по прошествии кратковременных токсических эффектов КТ (рвотные рефлексы, парез конечностей, измененное дыхание) сразу после инъекций нарушений в жизнедеятельности мышей не наблюдалось. Исследование токсического воздействия КТ на органы экспериментальных животных через 1



Рисунок 2- Селезенка мышей спустя месяц после инъекции

месяц после инъекций выявило значительное увеличение селезенки (Рисунок 2), а также признаки воспаления в селезенке, печени и почках. Кроме того, особенно для препаратов медь-содержащих и кадмий-содержащих КТ, выявлены зоны массивного воспаления и геморрагии в легких, что обусловлено, видимо, преимущественным накоплением и деградацией КТ в селезенке и в печени, а также реактивным воспалительным процессом в легких.

3.5 Анализ влияния кадмий-содержащих квантовых точек на состояние иммунной системы мышей CBAxС57BL/6

Анализ влияния низких доз КТ CdSe/ZnS-PEG-OH на состояние органов иммунной системы проводился на селезенке, тимусе и красном костном мозге мышей линии CBAxС57BL/6. Показано, что введение КТ вызывает незначительное изменение массы селезенки и тимуса при значительном снижении их клеточности на 7-й день после введения КТ. Через 21 день клеточность органов восстанавливается, что говорит об обратимом действии КТ. Клеточность красного костного мозга не изменяется относительно контрольной группы спустя 7 дней после введения КТ, однако, по прошествии 21 дня наблюдается снижение его клеточности на 20%, что говорит об угнетении гемопоэтической функции красного костного мозга с течением времени. Также было показано, что КТ не оказывают действия на активность клеток иммунной системы, хотя и снижают их жизнеспособность.

ВЫВОДЫ

1. В соответствии с разработанным подходом к оптимизации свойств потенциально биосовместимых водорастворимых флуоресцентных полупроводниковых НК были получены серии водорастворимых флуоресцентных полупроводниковых НК структуры ядро-оболочка, различающихся по трем параметрам: химическому составу ядра, размеру и поверхностному заряду.

2. Показано, что приготовленные серии НК с переменными параметрами служат удобной моделью для проведения систематического анализа их биосовместимости на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях.

3. Продемонстрировано, что чем меньше размер НК, тем выше их цитотоксичность *in vitro*, при этом скорость проявления цитотоксических свойств НК выше при тестировании опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками.

4. Показано, что цитотоксический эффект НК *in vitro* более выражен для НК со слабым отрицательным поверхностным зарядом, чем для положительно и

отрицательно заряженных КТ, причем опухолевые клетки больше подвержены этому воздействию.

5. Показано, что химический состав ядра НК практически не влияет на их цитотоксичность *in vitro* при условии того, что эпитаксиальная неорганическая оболочка и дополнительная оболочка модифицирующего лиганда на поверхности НК, обеспечивающая коллоидную стабильность и биосовместимость НК, надежно защищает их от деградации.

6. Показано, что НК, характеризующиеся слабо-отрицательным поверхностным зарядом, могут служить центром инициации образования амилоидных фибрилл рекомбинантного инсулина человека в физиологических условиях.

7. Продемонстрировано, что токсичность НК *in vivo* определяется их поверхностным зарядом и химическим составом ядра. При этом показано, что все исследуемые НК вызывают гистологические изменения в тканях органов-мишеней, в частности, селезенки, печени и легкого, которые, как правило, связаны с локальным воспалением, а также с образованием областей некроза.

8. Показано, что кадмий-содержащие НК могут уменьшать клеточность тимуса и селезенки модельных животных после однократной инъекции при полном восстановлении клеточности спустя три недели после введения препаратов НК, а также вызывают снижение клеточности красного костного мозга на 20% через 3 недели после инъекции. При этом НК не влияют на активность клеток иммунной системы и не снижают иммунный ответ, определяемый в реакции гиперчувствительности замедленного типа.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработанные системные подходы к анализу токсических свойств полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов могут быть использованы при изучении биосовместимости новых синтетических гибридных бионаноматериалов, имеющих потенциальную возможность применения в области биотехнологии, в том числе бионанонанотехнологиях.

2. Полученные экспериментальные результаты по токсичности наночастиц целесообразно использовать при оценке безопасности применения наноматериалов биотехнологическом производстве, при создании систем биологической визуализации и гибридных диагностических систем, а также при разработке систем доставки лекарственных средств и создании лекарственных препаратов.

3. Полученные результаты могут быть использованы для разработки экологически безопасных электронных приборов (например, дисплеев), источников возобновляемой энергии (солнечных батарей), а также в агропромышленном производстве.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Bozrova S.V.** Semiconductor quantum dot toxicity in a mouse *in vivo* model. / **S.V. Bozrova**, M.A. Baryshnikova, I.R. Nabiev, A.V. Sukhanova // Journal of Physics: Conference Series. – 2017. – V.784. – P.012013. IF=0,22, Q3, Scopus Цит.=2.
2. Sukhanova A. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties / A. Sukhanova, **S. Bozrova**, P. Sokolov, M. Berestovoy, A. Karaulov, I. Nabiev // Nanoscale Research Letters. – 2018. – V.13, №1. - P.13-44. IF= 3.159; Scopus Цит.=34.
3. Ramos-Gomes F. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. / F. Ramos-Gomes, J. Bode, A. Sukhanova, A., **S.V. Bozrova**, M. Saccomano, M. Mitkovski, J.E. Krueger, A.K. Wege, W. Stuehmer, P.S. Samokhvalov, D. Baty, P. Chames, I. Nabiev, F. Alves // Nature: Scientific Reports. – 2018. – V.8 – P.4595. IF= 4.122; Scopus Цит.=7.
4. Sukhanova A. Nanoparticles with a specific size and surface charge promote disruption of the secondary structure and amyloid-like fibrillation of human insulin under physiological conditions. / A. Sukhanova, S. Poly, **S. Bozrova**, E. Lambert, E. Ewald, M. Molinari, A.V. Karaulov, I. Nabiev // Frontiers in Chemistry. - 2019. – V.7. – A.480. IF= 3.782. Scopus Цит.=0.

Патент на изобретение

Патент RU 2639125 Российская Федерация. Способ биологической визуализации / Соколов П., Суханова А., **Бозрова С.**, Набиев И.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»» (НИЯУ МИФИ). – N 2016149211; заявл 14.12.2016; опубл. 19.12.2017, Бюл. N 35.

Публикации в других научных изданиях

5. **Bozrova S.V.** In vitro cytotoxicity of CdSe/ZnS quantum dots and their interaction with biological systems / **S.V. Bozrova**, M.A. Baryshnikova, Z.A. Sokolova, I.R. Nabiev, A.V. Sukhanova // Knowledge E Energy and Physics. – 2018. – P.58–63.
6. Nifontova G.O. Cytotoxicity of polyelectrolyte microcapsules encoded with semiconductor nanocrystals. / G.O. Nifontova, M.A. Baryshnikova, **S.V. Bozrova**, Z.A. Sokolova, I.R. Nabiev, A.V. Sukhanova // Knowledge E Energy and Physics. – 2018. – P.299–304.
7. Zvaigzne M.A. Fine-tuning of silica coating procedure for preparation of biocompatible and bright PbS/SiO₂ QDs. / M.A. Zvaigzne, I.L. Martynov, V.S. Voronin, **S.V. Bozrova**, K.V. Vokhminceva, S.A. Goncharov, D.S. Dovzhenko, A.V. Korenkova, P.S. Samokhvalov, I.R. Nabiev, A.A. Chistyakov // Knowledge E Energy and Physics. – 2018. – P.578–582.

Тезисы докладов в сборниках научных трудов конференций

1. **Bozrova S.**, Baryshnikova M., Nabiev I., Sukhanova A. Semiconductor quantum dot toxicity in a mouse *in vivo* model // Book of abstracts of the 7th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". – Crete, 2016, May 8-15. – P. 30-31.
2. **Bozrova, S.**, Baryshnikova, M., Nabiev, I. and Sukhanova, A. Semiconductor quantum dot toxicity in a mouse *in vivo* model // Book of abstracts of the 1st International Symposium "Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine". – Moscow, 2016, October 20-23 . – P. 52–54.
3. **Bozrova, S.**, Baryshnikova, M., Nabiev, I., Sukhanova, A. Semiconductor quantum dot toxicity in a mouse *in vivo* model // Book of abstracts of the 2nd International Scientific Conference «Science of the Future». – Kazan, 2016, September 20-23. – С. 214-217.
4. **Бозрова С.**, Барышникова М., Мочалов К., Кривенков В., Тухватуллин А., Логунов Д., Набиев И., Суханова А. Разработка подхода к прижизненной визуализации опухолей в мышинной модели с помощью инфракрасных квантовых точек // Биотехнология: состояние и перспективы развития, материалы IX международного конгресса. – Москва, 2017, Февраль 20-22. – С. 393-396.
5. Nifontova, G., Baryshnikova M., **Bozrova S.**, Sokolova, Z., Nabiev, I., Sukhanova, A. Cytotoxicity of polyelectrolyte microcapsules encoded with semiconductor nanocrystals // Book of abstracts of the 2nd International Symposium “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine”. – Moscow, 2017, October 10-14. –P. 311–312.
6. **Bozrova S.**, Baryshnikova M., Sokolova, Z., Nabiev, I., Sukhanova, A. (2017) *In vitro* cytotoxicity of CdSe/ZnS quantum dots and their interaction with biological systems // Book of abstracts of the 2nd International Symposium “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine”. – Moscow, 2017, October 10-14. – P. 149–150.
7. Zvaigzne, M., Martynov, I., Voronin, V., **Bozrova, S.**, Vokhmintcev, K., Goncharov, S., Dovzhenko, D., Korenkova, A., Samokhvalov, P., Nabiev, I., Chistyakov, A. Fine-tuning of silica coating procedure for preparation of biocompatible and bright PbS/SiO₂ QDs // Book of abstracts of the 2nd International Symposium “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine”. – Moscow, 2017, October 10-14. – P. 459–460.
8. **Bozrova, S.**, Baryshnikova, M., Sokolova, Z., Tukhvatullin A., Logunov D., Nabiev, I. and Sukhanova, A. In vivo analysis of quantum dots fluorescence signal intensity after subcutaneous injection // Book of abstracts of the 3rd International Symposium "Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine". – Moscow, 2018, October 15-17. – P. 89-91.
9. **Bozrova S.**, Baryshnikova M., Sokolova Z., Nabiev I. and Sukhanova A. Assessment of PEGylated CdSe/ZnS quantum dots cytotoxicity in vitro // Book of abstracts of the 9th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". – Crete, 2018, May 6-13. – P. 28.