

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный
университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ)

На правах рукописи

Бозрова Светлана Викторовна

**Исследование токсичности полупроводниковых
флуоресцентных нанокристаллов с различными
физико-химическими свойствами**

03.01.06 - Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук
Суханова Алена Владимировна

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Свойства и потенциальная токсичность нанокристаллов	14
1.2 Применение гибридных материалов на основе нанокристаллов в медицине	15
1.3 Механизмы токсичности нанокристаллов	17
1.4 Взаимосвязь физико-химических свойств нанокристаллов и их токсичности	21
1.4.1 Токсичность и размер нанокристаллов	22
1.4.2 Токсичность и форма нанокристаллов	24
1.4.3 Токсичность и химический состав нанокристаллов	24
1.4.4 Токсичность и поверхностный заряд нанокристаллов	25
1.4.5 Токсичность и функционализация нанокристаллов	28
1.5 Изучение токсичности нанокристаллов	29
1.5.1 Изучение цитотоксичности нанокристаллов	30
1.5.2 Совместно культивируемые клеточные линии и 3D-культуры клеток	45
1.5.3 Исследование токсичности нанокристаллов <i>in vivo</i>	46
1.6 Заключение	50
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 Объекты исследования	52
2.1.1 Основные использованные наноматериалы, животные, клеточные линии, реактивы и расходные материалы	52
2.1.2 Основное использованное оборудование	54
2.2 Получение водорастворимых квантовых точек составов CdSe/ZnS, CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), CdSe/CdS (8 МС), CuInS ₂ /ZnS и PbS/CdS/ZnS	55
2.3 Модификация поверхности квантовых точек производными полиэтиленгликоля	57
2.4 Оптическая характеристика, определение размеров и зарядов квантовых точек	59

2.5 Оценка и мониторинг коллоидной стабильности квантовых точек	59
2.6 Оценка цитотоксичности квантовых точек <i>in vitro</i>	60
2.7 Флуоресцентная микроскопия	62
2.8 Исследование механизма образования амилоидных фибрилл инсулина при взаимодействии с квантовыми точками	63
2.9 Тиофлавиновый флуоресцентный тест	63
2.10 Атомно-силовая микроскопия	64
2.11 Оценка острой токсичности квантовых точек	65
2.12 Оценка отдаленных последствий инъекции квантовых точек в мышиную модели BALB/c	66
2.13 Приготовление гистологических образцов тканей	67
2.14 Окрашивание парафиновых слайдов гематоксилином и эозином	67
2.15 Определение массы и клеточности органов иммунной системы	68
2.16 Оценка влияния квантовых точек на клеточный иммунитет в реакции гиперчувствительности замедленного типа	68
2.17 Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов	69
2.18 Статистическая обработка полученных результатов	70
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	71
3.1 Характеризация наноматериалов, использованных в работе	71
3.1.1 Характеризация синтетических водонерастворимых квантовых точек	71
3.1.2 Солюбилизация и характеризация полученных квантовых точек	74
3.2 Оценка цитотоксичности квантовых точек <i>in vitro</i>	79
3.2.1 Зависимость цитотоксичности квантовых точек <i>in vitro</i> от их гидродинамического диаметра	79
3.2.2 Зависимость цитотоксичности квантовых точек <i>in vitro</i> от их поверхностного заряда	83
3.2.3 Зависимость цитотоксичности квантовых точек <i>in vitro</i> от их химического состава	85
3.2.4 Оценка взаимодействия квантовых точек с клетками <i>in vitro</i>	88

3.3 Анализ токсического действия квантовых точек на молекулярном уровне в модели их взаимодействия с инсулином человека.....	89
3.4 Оценка токсичности квантовых точек <i>in vivo</i>	98
3.4.1 Оценка острой токсичности квантовых точек <i>in vivo</i>	98
3.4.2 Оценка отдаленных последствий инъекции квантовых точек <i>in vivo</i>	101
3.5 Анализ влияния кадмий-содержащих квантовых точек на состояние иммунной системы мышей СВАхС57BL/6.....	110
3.5.1 Анализ влияния квантовых точек на состояние органов иммунной системы	110
3.5.2 Анализ влияния квантовых точек на клеточный иммунитет.....	113
ВЫВОДЫ	116
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
БЛАГОДАРНОСТИ	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В связи с интенсивным развитием биотехнологии и, в частности, бионанотехнологий в течение последние двух десятилетий особый интерес исследователей связан с получением новых синтетических наноматериалов с заданными свойствами. Впервые интерес к таким объектам как наночастицы (НЧ) или нанокристаллы (НК) проявился в 70-х годах прошлого столетия [52]. Полупроводниковые флуоресцентные НК или квантовые точки (КТ) были впервые синтезированы в 1981 году А. И. Екимовым и А. А. Онущенко в диэлектрической матрице [219]. НК представляют собой частицы кристаллической или поликристаллической структуры, размер которых в одном или нескольких измерениях находится в диапазоне от 1 до 100 нм и которые могут иметь разнообразную форму, например, листы, стержни, трубки, точки, сферы, кольца, торы и многие другие. За последние 20 лет НК нашли широкое применение в области сельского хозяйства в качестве противомикробных агентов или инсектицидов [171], в косметологии в качестве средств доставки активных препаратов или кислорода [155], в электронике в составе дисплеев и оптоэлектронных приборов [28], при разработке возобновляемых источников энергии, таких как солнечные батареи [203], или при добыче и переработке нефти и газа [106, 150]. Также данные нанообъекты, например, НК серебра, применяются в текстильных изделиях для придания им антибактериальных свойств [14]. В медицинском приложении биотехнологий НК используются в качестве флуоресцентных меток, при создании гибридных диагностических систем [36], для антибактериальной обработки имплантатов [141] и биологической прижизненной визуализации [190].

В настоящий момент ведутся активные исследования и разработки, связанные с использованием наноматериалов для доставки лекарственных препаратов, например, мицелл или полимерных нано- и микрокапсул [160], для терапии

некоторых видов нозологий человека [22], а также для создания гибридных бионаноматериалов, состоящих из НК и различных целевых биомолекул, например антител, фрагментов антител, олигонуклеотидов и т.д.. Применение НК в биотехнологии невозможно без всесторонней оценки их токсичности и изучения возможных негативных последствий их взаимодействия с организмом. Это принципиально отличает данную сферу их использования от всех остальных, где они применяются уже сейчас, хотя и не снимает вопросы, связанные с токсичностью НК, входящих в состав электронных или других устройств.

Широкие перспективы применения НК в самых различных научных и технологических областях обусловлены их уникальными свойствами, такими как высокая проникающая и реакционная способность, возможность специфического взаимодействия с биологическими молекулами, своим оптическим свойствам. В этой связи исследование безопасности их применения в составе пищевых, медицинских, ветеринарных и косметических биопрепаратов на этапах производства, применения и утилизации становится особенно актуальным.

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 данные 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 разработанности темы исследования

Несмотря на то, что НК уже активно применяются в различных производственных сферах и входят во множество технологических процессов и конечных изделий, их токсичность наиболее активно изучается применительно к медицинским изделиям, что связано с наиболее жестким регулированием безопасности данного вида продукции [193]. При этом, с точки зрения токсичности НК, не столь важен вопрос из какого вида продукции они поступают в человеческий организм. Принципиальное значение имеет путь их попадания в человеческий организм, например, при контакте с кожей или слизистыми оболочками, вдыхании, проглатывании или при внутривенном введении [177].

Таким образом, становится очевидным, что важны исследования безопасности не только НК, входящих в состав медицинских или косметических продуктов, но и всех производимых и природных наноматериалов. При этом большая часть исследований, связанных с изучением проблемы безопасности НК, посвящена наноматериалам, входящим в состав медицинских изделий [193], косметических средств [155] и других продуктов, так как они находятся в непосредственном контакте с организмом человека. Куда меньше работ проводится по исследованию безопасности применения НК в агропромышленном комплексе [6, 74], электронике и топливной энергетике [156], хотя при использовании и утилизации данной продукции НК из их состава также могут попасть в организм человека.

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 [184]. Тем не

менее, в последнее время вопросы токсичности наноматериалов стали все чаще выходить на первый план, так как использование НК является составной частью многих перспективных производственных технологий. Пути реализации токсического воздействия НК и их основные клеточные мишени, а также вопросы их накопления и выведения из организма изучаются с использованием различных моделей *in vitro* и *in vivo* [90, 105]. При этом значительное внимание уделено вопросам влияния размера и химического состава НК на их транспорт и токсичность, в то время как результаты изучения других физико-химических параметров, таких как заряд, природа и свойства поверхностной оболочки НК представлены довольно скудно [105]. 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-химические свойства, что не позволяет провести системный анализ литературных данных по каждому из типов НК на соответствующей *in vitro* или *in vivo* модели [143].

Цели 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 организменном 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 действие 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 подтверждения безопасности их применения. По этой причине исследование их возможных токсических эффектов носит несомненную практическую значимость.

Важным аспектом проведенных исследований является разработка систематизированного подхода к экспериментам, который позволяет проводить контроль качества и оценку безопасности препаратов НК на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Разработанные систематические подходы и полученные результаты анализа токсичности НК *in vitro* и *in vivo* могут быть приняты во внимание в случае доклинических исследований безопасности гибридных бионаноматериалов или использоваться при составлении плана клинических исследований, проведение которых необходимо, например, для регистрации лекарственных и диагностических средств на их основе. Кроме того, проведенный сравнительный анализ зависимости наблюдаемых токсических эффектов от физико-химических параметров НК, позволяет сделать вывод о том, что токсичность НК может быть значительно снижена путем подбора внешней неорганической и органической оболочек, что актуально для разработки наноматериалов со сниженным токсическим воздействием на биосистемы. В работе также продемонстрирован механизм образования агрегатов белка инсулина амилоидной природы в присутствии НК с определенными свойствами в физиологических условиях, 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 №2639125 «Способ биологической визуализации», зарегистрированного в Государственном реестре изобретений РФ 19 декабря 2017.

Методология и методы исследования

Использованные в работе методологические подходы соответствуют современному уровню развития соответствующих областей экспериментальной науки. В соответствии с поставленной целью и сформулированными задачами в ходе работы 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. Отдельное внимание в каждом эксперименте уделялось контрольным параметрам и их анализу.

При планировании экспериментов были критически проанализированы опубликованные данные из российских и международных информационных ресурсов (e-library, Scopus и Web of Science) а также доступные материалы российских и международных научных конференций. Для статистического анализа полученных в работе массивов данных использовали общепринятые методы анализа.

Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся:

- 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 СВАхС57BL/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.

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.

Достоверность и апробация результатов работы

Цели и задачи диссертационной работы были поставлены, исходя из критического анализа накопленных к настоящему моменту литературных данных. Методология исследования выбрана в полном соответствии с поставленными научными задачами. Проведенные эксперименты воспроизводили независимым образом не менее трех раз и полученные данные анализировали с помощью современных статистических методов.

Полученные экспериментальные результаты, их обсуждение и научные выводы были опубликованы в 6-ти научных изданиях и в форме тезисов

докладов в сборниках трудов 9-ти научных конференций. На основании проделанной работы получен патент на изобретение Российской Федерации. Все вышесказанное подтверждает достоверность результатов диссертационной работы.

Апробация диссертационной работы состоялась 20 февраля 2019 г. на научном заседании межкафедральной лаборатории нано-биоинженерии НИЯУ МИФИ.

Результаты работы были представлены на следующих российских и международных 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).

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.

Связь работы с научными программами

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

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Свойства и потенциальная токсичность нанокристаллов

Согласно определению Международной организации по стандартизации, наночастицы (НЧ) представляют собой структуры, размер которых в одном (одномерные), двух (двумерные) или трёх (трехмерные) измерениях находится в диапазоне от 1 до 100 нм. Кроме размеров НЧ или НК, можно классифицировать по физическим свойствам - например, по заряду; по химическим свойствам - составу ядра частицы или её оболочки; по форме - трубки, пленки, стержни и т.д.; по природе происхождения НК – природные, содержащиеся в вулканической пыли, вирусный частицы и т.д. или искусственно созданные, о которых и пойдет речь в данном обзоре.

НК нашли широкое применение в электронике, сельском хозяйстве, производстве текстильных изделий, медицине и многих других областях науки и промышленности [164]. Однако основным фактором, ограничивающим широкое применение НК в различных биотехнологических приложениях, является их токсичность для живых систем. В настоящий момент перед исследователями, зачастую, встает вопрос выбора между полезным эффектом от использования НК и побочными явлениями, вызванными их потенциальной токсичностью. При этом большую роль играет выбор релевантной модели для определения токсичности: модели *in vitro* (клеточные линии) или исследования *in vivo* (лабораторные животные). Так, на моделях *in vitro* проще проследить зависимость токсичности НК на отдельные клеточные компоненты и типы клеток, при исследованиях *in vivo* появляется возможность оценить токсичность НК на тканевом, органном и организменном уровнях. Кроме того, токсические эффекты НК определяются их концентрацией, временем взаимодействия с живой материей, стабильностью препаратов НК в биологических жидкостях, а также их способностью аккумулироваться в тканях и органах. Только полное понимание взаимосвязи всех факторов и механизмов, которые обуславливают токсичность

наноматериалов, может послужить основой для создания безопасных, биосовместимых НК для их применения в биотехнологических разработках.

1.2 Применение гибридных материалов на основе нанокристаллов в медицине

В медицине НК могут быть использованы в диагностических или терапевтических целях. Так, НК могут применяться для флуоресцентного мечения биологических молекул, детекции патогенов, в качестве контрастных веществ при магнитно-резонансных и иных исследованиях. Кроме того, НК могут использоваться для доставки лекарств, в том числе белковой или полинуклеотидной природы, при фотодинамической терапии или тепловом разрушении опухолей, а также в протезировании [72, 102, 115, 142, 147, 172]. При этом уже сегодня некоторые НК успешно используются в клинике для транспортировки лекарственных средств и в качестве систем для визуализации опухолевых клеток [18, 23, 117].

В настоящий момент в литературе появляется все больше примеров использования НК золота, которые хорошо зарекомендовали себя в качестве систем-носителей лекарственных и химиотерапевтических препаратов. НК золота обладают хорошей биосовместимостью, но, несмотря на общую инертность золота к биологическим объектам, утверждать то же самое применительно и к золотым наноструктурам не представляется возможным, так как пока не получено утвердительных данных об отсутствии каких-либо отдаленных токсических эффектов [35]. Кроме НК золота для транспорта лекарств уже используются НК на основе мицелл или липосом [37] и полимеров, связанных с «распознающими» молекулами [20]. В научной литературе также было показано, что примером НК для доставки лекарственных средств могут являться однослойные и многослойные нанотрубки, которые очень удобны при включении в них различных функциональных групп и молекул для таргетной доставки препаратов. Их уникальная форма помогает им селективно проникать

через биологические барьеры [41]. Применение НК в качестве «транспорта» для лекарственных препаратов повышает специфичность доставки лекарственных средств, позволяет снизить их токсичность и их количество, необходимое для достижения и поддержания терапевтического эффекта, что особенно важно при использовании высокотоксичных и короткоживущих химио- и радиопрепаратов [38].

Еще одной группой НК, имеющей высокий потенциал для использования в медицине, являются полупроводниковые флуоресцентные НК (или КТ), имеющие размер от 2 до 10 нм и состоящие из ядра или ядра и оболочки. Благодаря возможности поглощать свет в широком диапазоне длин волн и наличию узких характеристических спектров испускания флуоресценции, положение максимума длины волны испускания флуоресценции которых зависит от физического размера ядра [5], данные НК могут использоваться для визуализации клеток, клеточных структур или патогенных биологических агентов, а также для многопараметрической детекции различных процессов, происходящих внутри клеток, тканей и целых органов [122, 127, 209], в том числе с диагностическими целями [13, 17]. Еще одним примером НК, разрабатываемых для применения в медицине, являются НК суперпарамагнитного оксида железа, которые используются в качестве эффективных контрастных веществ при визуализации тканей печени, костного мозга и лимфатических узлов при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) [124]. Кроме того, можно привести пример, когда радиоактивно меченные однослойные нанотрубки из углерода, функционализированные фосфолипидами, используются для маркирования интегрин-содержащих опухолей в мышцах с их последующей детекцией при помощи позитронно-эмиссионной томографии [79].

Также НК нашли свое применение в создании биосенсоров на основе углеродных нанотрубок для определения уровня глюкозы [125], для детекции специфических фрагментов и участков ДНК [181] и даже для обнаружения бактериальных клеток [182].

Кроме того, НК серебра (или НК, в состав которых входит серебро) обладают антимикробными и цитостатическими эффектами, благодаря чему широко применяются в медицине. Такими НК обрабатывают различные перевязочные материалы, хирургические инструменты, протезы и средства контрацепции [41, 79]. Существуют работы, посвященные применению НК серебра в качестве эффективных и безопасных консервантов при производстве косметических средств [85].

Однако, несмотря на доказанную безопасность применения многих отдельных химических соединений для организма человека, НК как объекты, имеющие жесткую структуру, тем не менее, могут быть высокотоксичными и небезопасными. При этом разнообразные токсические эффекты НК могут возникать вследствие накопления НК в организме, а также из-за принципиально иных механизмов взаимодействия НК с живыми системами. В целом, это определяет высокую актуальность изучения причин и механизмов потенциального токсического эффекта НК с целью совершенствования стандартных подходов к контролю качества и оценки безопасности наноматериалов.

1.3 Механизмы токсичности нанокристаллов

В значительной степени токсичность НК обусловлена их физико-химическими свойствами, такими, как размер НК, их форма, площадь удельной поверхности, поверхностный заряд, химический состав, каталитическая активность, а также наличие или отсутствие оболочки и активных функциональных групп на поверхности.

Благодаря своим малым размерам НК могут проникать через эпителиальные и эндотелиальные клетки в лимфатическую и кровеносную системы, могут разноситься с током биологических жидкостей, проникать в различные органы, ткани и клетки при помощи механизмов трансцитоза или непосредственного проникновения через клеточную мембрану. В экспериментах, моделирующих

токсическое воздействие НК на организм животных, было отмечено, что НК вызывают тромбоз, посредством увеличения агрегации тромбоцитов [154], воспаление верхних и нижних дыхательных путей, нейродегенеративные заболевания, инсульты, инфаркт миокарда и т.д. [114, 118, 218]. Следует отметить, что НК обладают способностью проникать не только в органы, ткани и клетки, но и в различные клеточные органеллы, например в митохондрии или ядра клеток, что в свою очередь вызывает серьезные внутренние изменения метаболизма клеток, приводит к повреждению ДНК, мутагенезу и клеточной гибели [21].

Показано, что токсичность КТ непосредственно связана с высвобождением при окислительном воздействии факторов окружающей среды свободных ионов металлов, таких как кадмий, свинец и мышьяк, входящих в состав их ядра. КТ могут связываться с митохондриями, вызывая в них морфологические изменения и нарушение функциональности [133]. Попадание в клетку КТ на основе кадмия и образование свободных ионов кадмия Cd^{2+} приводит к оксидативному стрессу [170, 217].

Недавние исследования показали, что воздействие НК размером порядка 50 нм на легочную ткань приводит к образованию отверстий в клеточной мембране альвеолярного эпителия первого типа, через которые НК проникают в клетки. Это, в свою очередь, вызывает некротическую гибель клеток, о чем свидетельствует высвобождение лактатдегидрогеназы [163]. Кроме того, пассивный внутриклеточный транспорт НК увеличивает текучесть мембран клеток [192]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что образование активных форм кислорода, индуцированное пероксидазным окислением мембранных липидов, ухудшает гибкость мембраны, что ведет к неизбежной клеточной гибели.

Взаимодействие НК с цитоскелетом также может приводить к его повреждению. Так, НК TiO_2 индуцируют конформационные изменения в тубулине и снижают его полимеризацию [121], что приводит к нарушению

внутриклеточного транспорта, процесса клеточного деления и миграции клеток. У клеток линии HUVES повреждение цитоскелета препятствует созреванию координационных адгезивных комплексов, которые связывают цитоскелет с внеклеточным матриксом, что в свою очередь нарушает формирование сосудистой сети [194].

Кроме того, присутствие НК может приводить к нарушениям процессов дифференцировки клеток, синтеза белка, а также к активации провоспалительных генов и синтезу медиаторов воспаления. Отдельно стоит отметить, что традиционные механизмы защиты организма не действуют на НК, так как, например, макрофаги, не узнают частицы размером менее 70 нм, что приводит к накоплению НК в организме. Было показано, что суперпарамагнитные НЧ оксида железа вызывают нарушение или полное ингибирование остеогенной дифференцировки у стволовых клеток, вызывая также активацию синтеза сигнальных молекул, раковых антигенов и т.д. [30, 87]. Кроме того, при взаимодействии НК с клеткой усиливается экспрессия генов, ответственных за образование лизосом [81], нарушается их функционирование [153] и ингибируется синтез белков [146, 149]. Исследование токсичности НК различного состава на клетки эпителия легкого и линии опухолевых клеток человека показало, что НК вызывают повышенный синтез медиаторов воспаления, например, интерлейкина-8 [33]. По данным Park и соавторов, изучавших экспрессию провоспалительных цитокинов на моделях *in vitro* и *in vivo*, наблюдается увеличение экспрессии интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли- α , в ответ на воздействие НК кремния [139].

В результате окисления оболочки НК и воздействия различных ферментов на поверхность НК, происходит их деградация с образованием свободных радикалов. Кроме токсического эффекта от свободных радикалов, выражающегося в окислении и инактивации ферментов, мутагенезе и нарушении химических реакций, приводящих к гибели клетки, деградация НК приводит к изменению или потере их собственной функциональности (например, к потере

магнитного момента, изменению спектра флуоресценции, транспортных и иных функций) [97, 107].

Резюмируя выше сказанное, можно выделить следующие самые распространенные механизмы цитотоксичности НК:

- НК способны приводить к окислительным процессам путем образования активных форм кислорода и иных свободных радикалов;
- НК могут являться причинами повреждения клеточных мембран путем образования отверстий;
- НК повреждают компоненты цитоскелета, нарушая процессы транспорта и деления в клетках;
- НК приводят к нарушению транскрипции, повреждению ДНК и повышенному мутагенезу;
- НК являются причиной повреждения митохондрий и нарушения их метаболизма, что приводит к энергетическому дисбалансу клеток;
- НК нарушают процесс образования лизосом, тем самым препятствуя процессу аутофагии и деградации макромолекул, а также приводя к запуску процесса апоптоза;
- НК являются причиной структурных изменений мембранных белков, нарушают процессы транспорта веществ и межклеточного транспорта;
- НК активируют синтез медиаторов воспаления, нарушая нормальные механизмы работы клеточного метаболизма, а также тканей и органов в целом (Рисунок 1).

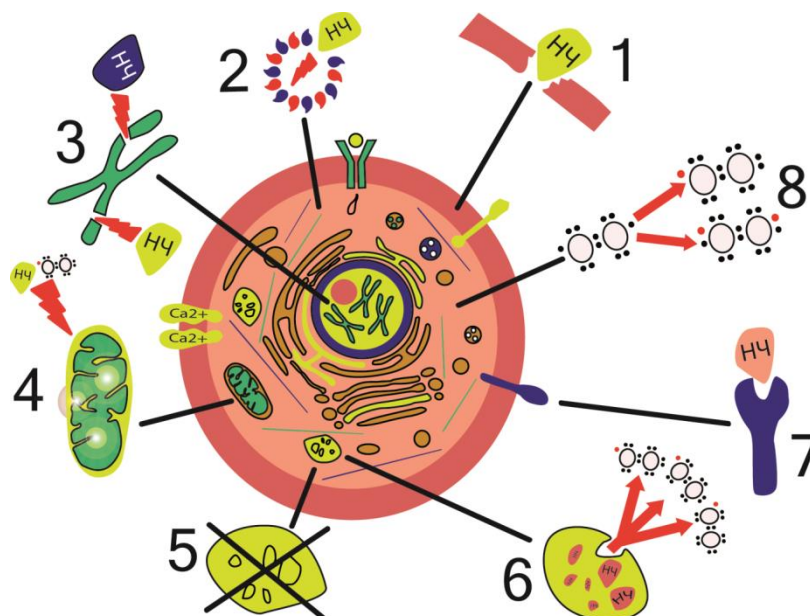


Рисунок 1 – Механизмы клеточного повреждения. (1) Физическое повреждение мембран [68, 163, 216]; (2) Структурные изменения компонентов цитоскелета [121, 194]; (3) Нарушение транскрипции и окислительное повреждение ДНК [167, 174]; (4) Повреждение митохондрий [98, 133]; (5) Нарушение работы лизосом [153]; (6) Генерация активных форм кислорода [174]; (7) Нарушение функций мембранных белков [145]; (8) Синтез факторов и медиаторов воспаления [33, 139]

Несмотря на обширный набор механизмов реализации токсического воздействия НК, необходимо установить и классифицировать вид и характер каждого повреждающего воздействия НК в зависимости от их физико-химических свойств.

1.4 Взаимосвязь физико-химических свойств нанокристаллов и их токсичности

Считается, что токсичность НК зависит от их физико-химических свойств, например, их размера и формы, поверхностного заряда, химического состава ядра и оболочки, стабильности. Какой из этих факторов является наиболее

важным, зависит от каждой конкретной экспериментальной задачи и модели исследования, так что проанализируем влияние каждого фактора в отдельности.

1.4.1 Токсичность и размер нанокристаллов

Размер НК и площадь их поверхности играют очень важную роль и во многом обуславливают уникальный механизм взаимодействия НК с живыми системами. Отличительной особенностью НК является очень большая площадь их удельной поверхности, которая обуславливает высокую реакционную и каталитическую активность. По своим размерам НК сравнимы с размером белковых глобул (2-15 нм), белковых комплексов (несколько десятков нм) диаметром спирали ДНК (2 нм), толщиной клеточной мембраны (7-8 нм), что позволяет им свободно проникать в клетки, и клеточные органеллы. Так, например, Нио и соавторы показали, что НК золота размером до 6 нм эффективно проникают в ядро, в то время как НК большего размера – 10 и 16 нм проникают только через клеточную мембрану и наблюдаются только в цитоплазме. В результате оказывается, что НК, имеющие размер порядка нескольких нанометров более токсичны, чем НК размером более 10 нм, которые уже не проникают внутрь клеточного ядра [71]. На примере НК золота (размер от 0,8 до 15 нм) Рап и соавторы проследили зависимость их токсического воздействия от размера. Было показано, что НК размером 15 нм в 60 раз менее токсичны для фибробластов, эпителиальных клеток, макрофагов и клеток меланомы по сравнению с НК размером 1,4 нм. При этом интересно обратить внимание на то, что НК размером 1,4 нм вызывают некроз клеток в течение 12 часов после внесения в культуру клеток, в то время как НК золота размером 1,2 нм преимущественно вызывают апоптоз [137]. Эти данные могут свидетельствовать не только о способности НК проникать в ядро, но и о соответствии геометрических размеров НК (1,4 нм) размерам большой бороздки ДНК, что позволяет НК эффективно взаимодействовать с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК, и блокировать процесс транскрипции [167, 174].

Кроме того, размер НК во многом определяет то, как НК будут взаимодействовать с транспортными и защитными системами клетки и организма. Это взаимодействие в свою очередь сказывается на кинетике их распространения и накопления в организме. В обзоре Zhang и соавторов приведены теоретические обоснования и множество ссылок на экспериментальные данные, из которых видно, что НК с размером менее 5 нм проникают сквозь клеточные барьеры в основном неспецифическим путем, например, транслокацией, в то время как более крупные частицы проникают путем фагоцитоза, макропиноцитоза, специфического и неспецифического транспорта. Оптимальным размером НК для эндоцитоза считается размер порядка 25 нм, хотя во многом это зависит также от размера и типа клеток [132, 211]. Было отмечено, что в экспериментах *in vivo* НК размером меньше 10 нм (при внутривенном введении) очень быстро распространяются по всем тканям и органам, тогда как НК большего размера (50-250 нм), обнаруживаются преимущественно в печени, селезенке и крови [76]. Это говорит о том, что крупные НК распознаются специфическими защитными системами организма и захватываются системой мононуклеарных фагоцитов которая таким образом препятствует их попаданию в другие ткани.

Большая площадь удельной поверхности позволяет НК эффективно адсорбироваться на поверхности клеток. Так на примере эритроцитов человека и мезопористых НК кремния размером от 100 до 600 нм была изучена гемолитическая активность НК. При этом НК размером 100 нм эффективно адсорбировались на поверхности эритроцитов, не вызывая разрушения или каких-либо морфологических изменений клеток, в то время как НК размером 600 нм деформировали мембрану, проникали внутрь и вызывали гемолиз, т.е. разрушение эритроцитов [216].

1.4.2 Токсичность и форма нанокристаллов

Для НК характерны такие формы как сфера, эллипсоид, цилиндр, лист, куб, стержень, при этом токсичность НК сильно зависит от формы, что было показано для большого количества НК различного размера и химического состава [45, 62, 73, 86]. Так, например, эндоцитоз и фагоцитоз сферических НК происходит проще и быстрее по сравнению с эндоцитозом нанотрубок или нановолокон [27]. Также было показано, что однослойные углеродные нанотрубки могут блокировать кальциевые каналы более эффективно, чем сферические фуллерены [140]. При сравнении воздействия НК гидроксиапатита различных форм (игольчатой, пластинчатой, стержневидной и шарообразной) на клетки линии BEAS-2B, было установлено, что НК пластинчатой и игольчатой формы приводят к гибели большего процента клеток в культуре по сравнению с шарообразными и стержневидными НК [215]. Отчасти это обусловлено возможностью НК игольчатой и пластинчатой формы повреждать клетки и ткани при непосредственном контакте. Интересные данные были получены Ни с соавторами, когда они исследовали повреждение клеток млекопитающих НК оксида графена, которые имеют форму нанолиста. Токсичность данных НК была обусловлена их формой и возможностью физически повреждать мембрану клеток. Однако было показано, что токсичность этих НК снижается с увеличением в среде для культивирования концентрации фетальной сыворотки быка. Это, в свою очередь, обусловлено высокой реакционной способностью НК оксида графена к адсорбированию белков, которые, покрывая поверхность НК, изменяют их форму и частично предотвращают повреждение клеточных мембран [68].

1.4.3 Токсичность и химический состав нанокристаллов

Несмотря на то, что во многом токсичность НК зависит от их размера и формы, нельзя обойти вниманием такие факторы, как влияние химического

состава и кристаллической структуры НК. При сравнении воздействия НК размером около 20 нм на основе диоксида кремния (SiO_2) и оксида цинка (ZnO) на линии клеток фибробластов мыши был выявлен различный уровень токсичности этих НК. НК ZnO вызывали оксидативный стресс, в то время как наночастицы SiO_2 повреждали структуру ДНК [201].

Токсичность полупроводниковых НК, или КТ, также во многом определяется их химическим составом. Наиболее частой причиной возникновения токсического эффекта при взаимодействии КТ с клетками, является высвобождение ионов тяжелых металлов из ядра КТ. Однако этот эффект можно снизить, например, покрывая ядро КТ дополнительной оболочкой используя для синтеза ядра и оболочки КТ нетоксичные соединения [173].

Кроме того, на токсичность НК влияет их кристаллическая структура. Взаимосвязь между кристаллической структурой и токсичностью изучалась на линии клеток бронхиального эпителия человека с использованием НК оксида титана различной кристаллической структуры. Было показано, что НК с кристаллической решеткой рутила (кристалл TiO_2 в форме призмы) вызывают окислительное повреждение ДНК, перекисное окисление липидов и формирование микроядер, что свидетельствует о неправильной сегрегации хромосом во время митоза, в то время как НК с кристаллической решеткой анатаза (кристалл TiO_2 в форме октаэдра) такого же размера были не токсичны [60]. Стоит обратить внимание на то, что НК могут изменять свою кристаллическую структуру в зависимости от окружения. Например, при взаимодействии с водой или другой дисперсионной средой или биологической жидкостью. Так, НК ZnS после контакта с водой перестраивали свою кристаллическую решетку и становились более упорядоченными [208].

1.4.4 Токсичность и поверхностный заряд нанокристаллов

Поверхностный заряд играет важную роль в токсичности НЧ, так как в значительной степени определяет взаимодействия НЧ с биологическими

системами [42, 166]. Высокая токсичность положительно заряженных НЧ объясняется их способностью легко проникать в клетки по сравнению с отрицательно заряженными или нейтральными НЧ. Этот факт обусловлен электростатическим притяжением между отрицательно заряженными гликопротеинами клеточной мембраны и положительно заряженными НЧ. На примере сравнения цитотоксичности отрицательно и положительно заряженных НЧ полистирола на линии клеток HeLa и NIH/3T3, показана более высокая токсичность последних. При этом данный эффект связан не только с большей эффективностью проникновения положительно заряженных НЧ, но и с тем, что благодаря своему заряду НЧ эффективнее связываются с отрицательно заряженной ДНК, вызывая её повреждение, и, как следствие, удлинение фазы G0/G1 клеточного цикла. Отрицательно заряженные НЧ никакого влияния на клеточный цикл не оказывали [112]. Аналогичные результаты наблюдались при изучении положительно и отрицательно заряженных НК золота, при этом положительно заряженные НК поглощались клетками в большей степени и с большей скоростью, чем отрицательно заряженные, и демонстрировали больший токсический эффект [70].

Положительно заряженные НК обладают повышенной способностью к опсонизации, т.е. адсорбции на их поверхности белков крови и биологических жидкостей, в том числе, антител и компонентов комплемента, способствующих фагоцитозу [3]. Адсорбированные белки, так называемая «белковая корона», могут влиять на поверхностные свойства НК. Например, они могут изменять поверхностный заряд, агрегатные свойства или гидродинамический диаметр (ГДД) НК. Кроме того, адсорбция белка на поверхности НК приводит к конформационным изменениям белковой молекулы, что может уменьшать или полностью ингибировать специфическую активность такого белка. В основном, в состав «белковой короны» входят сывороточные белки, такие как альбумин, фибриноген и иммуноглобулины класса G, так как они являются мажорными сывороточными белками крови, а также эффекторные, сигнальные и

функциональные молекулы [58, 116]. Связывание с НК нарушает структуру белков, что приводит к потере их ферментативной активности, нарушению биологических процессов, образованию упорядоченных полимерных структур, например, амилоидных фибрилл [178], вызывая различные заболевания, например амилоидоз и т.д. В опытах *in vitro* было продемонстрировано, что КТ, покрытые гидрофильным полимером, увеличивают скорость образования фибрилл человеческого β 2-микроглобулина, который адсорбируется на поверхности НК, в результате чего происходит локальное повышение концентрации белка, необратимое изменение его конформации и образуются олигомерные комплексы [104].

Хи с соавторами разработали методику изменения заряда НЧ с отрицательного на положительный при помощи различных химических модификаций поверхности НЧ. Так, полимерные НЧ были модифицированы рН чувствительным полимером, благодаря чему, будучи отрицательно заряженными в нейтральной среде - в кислых средах, при рН 5-6, становились положительно заряженными [199]. Эта технология позволяет улучшить поглощение клетками НЧ, обладающих положительным зарядом, что может успешно использоваться для доставки лекарств в опухолевые клетки. Так, анализ цитотоксичности поверхностно-модифицированных НК оксида церия с использованием клеточных линий H9C2, HEK293, A549 и MCF-7, показал, что в зависимости от применения различных полимеров для придания положительного, отрицательного или нейтрального заряда НК, можно получить совершенно разные биологические и токсические эффекты. Так, положительно заряженные и нейтральные НК одинаково проникали во все клетки, в то время как отрицательно заряженные НК накапливались преимущественно в опухолевых клетках [10]. Таким образом, модифицируя заряд НК, можно не только изменить место их локализации и токсичность, но и использовать это свойство для создания эффективных систем доставки химиотерапевтических препаратов в опухоль.

1.4.5 Токсичность и функционализация нанокристаллов

Функционализация поверхности водорастворимых НК применяется для улучшения их биосовместимости и коллоидной стабильности в воде и биологических жидкостях за счет уменьшения их агрегации, повышения времени жизни и т.д. Таким образом, дополнительные лиганды на поверхности НК могут служить инструментом для снижения токсичности НК и для придания им свойств селективного взаимодействия с различными типами клеток и биологическими молекулами. Кроме того, дополнительная функционализация значительно влияет на фармакокинетику, модель распределения и накопления НК в организме [8].

Как было отмечено ранее, токсичность НК в немалой степени связана с образованием свободных радикалов [107, 132, 133, 195]. Однако процесс функционализации НК может значительно смягчить или устранить данный негативный эффект, а также стабилизировать НК, повысить их устойчивость к факторам внешней среды, уменьшить высвобождение токсических веществ или придать им тканеспецифические свойства [144]. Например, Cho с соавторами модифицировали полимерные НК, покрыв их лектинами. Это позволило НК специфически связываться с раковыми клетками, презентирующими на своей поверхности молекулы сиаловых кислот, и придало им тем самым способность специфически маркировать онкологические клетки [31].

Для модификации поверхности НК могут быть использованы как широкая гамма соединений и их производных, например, полиэтиленгликоль (PEG), полигликолевая кислота, полимолочная кислота, липиды, белки, низкомолекулярные соединения. Такое разнообразие позволяет создавать на поверхности НК целые комплексы для изменения их свойств, их специфического транспорта или накопления.

НК, покрытые оболочкой из синтетических полимеров, применяются для доставки антигенов и, тем самым, выступают в роли адъювантов, стимулируя

иммунный ответ. Это свойство позволило получать вакцины к антигенам, против которых развит естественный неспецифический клеточный иммунитет [53].

В отличие от других типов НК функционализация КТ обычно более эффективна при наличии первичной неорганической оболочки, которая создается вокруг ядра КТ на этапе синтеза для улучшения дальнейшей солюбилизации и снижения токсичности водорастворимых КТ, поскольку экранирует их металлическое гидрофобное ядро, состоящее, в основном, из токсичных тяжелых металлов, таких как кадмий, теллур, свинец. Оболочка повышает стабильность ядра КТ, предотвращает ионное выщелачивание, окислительную или фотолитическую деградацию. Это, в свою очередь, приводит к снижению выхода ионов металлов за пределы ядра КТ и уменьшению их токсического воздействия [59, 65, 69].

1.5 Изучение токсичности нанокристаллов

За последние два десятилетия применение наноматериалов достигло значительных масштабов и привело к созданию новой области науки – нанотоксикологии, изучающей потенциальное токсическое воздействие наноматериалов на биологические и экологические системы. Общая цель нанотоксикологии – создание правил синтеза безопасных наноматериалов [40]. Это обуславливает необходимость универсального, системного подхода к исследованию токсических свойств наноматериалов и изучению их влияния на клетки, ткани, органы и организм в целом.

Традиционно существует два подхода к изучению влияния различных веществ на живые системы. Так, токсичность НК можно исследовать в опытах *in vitro* – на модельных клеточных линиях и в опытах *in vivo* – с использованием модельных лабораторных животных. В данном обзоре мы не будем останавливаться на третьем возможном способе контроля токсичности НК, а именно, на компьютерном моделировании, так как пути и механизмы реализации токсичности НК недостаточно изучены для создания релевантной модели,

обеспечивающей высокое качество прогноза последствий взаимодействия НК с живой материей для широкого спектра НК.

У моделей изучения токсичности НК с использованием клеточных культурах или лабораторных животных есть свои плюсы и минусы. Первые позволяют лучше разобраться в молекулярных механизмах токсичности, определить мишени, на которые в первую очередь воздействуют НК, но при этом совершенно не учитывают особенностей распределения, транспорта и накопления НК в различных тканях и органах организма в целом. Также, изучение токсичности НК с использованием лабораторных животных позволяет проследить отдаленные последствия воздействия НК *in vivo*. Однако, литературные данные показывают, что в некоторых частных случаях картина проявления токсичности усложняется до такой степени, что становится невозможным понять, что явилось первоначальной причиной, а что следствием наблюдаемых эффектов.

1.5.1 Изучение цитотоксичности нанокристаллов

Большое количество исследований цитотоксических эффектов НК проводится на культурах первичных клеток, моделирующих различные типы тканей человека и животных. Кроме того, в некоторых случаях, например, при изучении цитотоксического воздействия НК, применяемых в химиотерапии, используются также опухолевые клеточные линии. Тип клеток выбирается в соответствии с потенциальным путем проникновения НК в организм. Это может быть пероральное попадание, например, при проглатывании, трансдермальное попадание, т.е. проникновение через поверхность кожи, ингаляционное – при вдыхании воздуха, или при преднамеренном введении в организм НК путем инъекций. Для исследований токсичности НК при моделировании их перорального проникновения в организм часто используют эпителиальные клетки кишечника (Caco-2, HT29, SW480) (Таблица 1). С помощью этих

клеточных линий изучают кинетику поглощения НК клетками, а также жизнеспособность клеток после попадания в них НК.

НК, использующиеся в качестве носителей лекарственных препаратов, контрастных веществ или при визуализации, вводятся в организм посредством инъекций. Токсичность таких НК изучается на первичных культурах клеток крови. Как правило, исследуются такие параметры как гемолиз, активация тромбоцитов, агрегация тромбоцитов и другие. Кроме первичных культур клеток крови используют клеточные линии HUVES, мезенхимальные стволовые клетки, мононуклеарные клетки крови, различные опухолевые клеточные линии (HeLa, MCF-7, PC3, C4-2, SKBR-3) (Таблица 2).

Токсичность таких НК, которые могут попасть в организм через дыхательные пути, изучают с помощью клеточных линий, моделирующих различные ткани дыхательной системы, например, легочного происхождения (A549, C10), на альвеолярных макрофагах (RAW 264.7), различных эпителиальных клетках и фибробластах (BEAS-2B, NHBE, 16-NBE, SAEC), а также культурах клеток моноцитов человека (THP-1) (Таблица 3).

Исследование токсичности НК при моделировании их трансдермального проникновения в организм чаще всего происходит на клетках кератиноцитов или фибробластов, реже – на клетках сальных желез – себоцитах (Таблица 4).

Таблица 1 – Результаты исследований токсичности нанокристаллов и наночастиц при моделировании перорального проникновения

Тип	Размеры	Концентрация время инкубации	Линия клеток	Метод детекции	Эффекты воздействия выводы	Ссылки
Ag, TiO ₂ , ZnO	Ag–20-30 нм TiO ₂ –21 нм ZnO–20 нм	0.1, 1, 10, 100 мг/мл; 24, 48 часов	Caco-2 SW480	МТТ; ИФА; ЛДГ тест, АФК тест	Гибель клеток (НК ZnO более токсичны). Продукция АФК. Выделение ИЛ-8 (клетки Caco-2 выделяют ИЛ-8 в большем количестве, чем клетки SW480).	[2]
Латексные НЧ	50 и 100 нм	10-1000 мкг/мл; 4 часа	Caco-2 Calu-3	MTS; ЛДГ тест; Измерение ТЭС; Конфокальная микроскопия	Гибель клеток (положительно заряженные НЧ токсичнее). Выход ЛДГ из клеток. Проникновение НЧ в клетки. Транспорт НЧ через эпителиальный слой (от 16 до 24% попавших в монослой клеток микросфер и <5% НЧ транспортировались через монослой)	[16]
CuO сферической (СФФ) и стержнеобразной	СФФ НК (толщина 10±3 нм, длина	5–100 мг/мл; 24, 48, 120 часов	Caco-2 A549 SZ95	MTS; ПЦР; Иммуноблоттинг; ИФА	Снижение жизнеспособности (токсичность СФФ НК	[148]

(СТФ) формы	74±17нм) СТФ НК (диаметр 40±16нм)		N- hTERT		ярче выражена) Экспрессия генов кодирующих синтез провоспалительных цитокинов. Профиль транскриптов отличается в зависимости от типа НК: CD3E для СТФ НК, Ил-1а, ИЛ-9 и CD86 для СФФ НК.	
КТ CdTe	3.5–4.5 нм	1, 0.1, 0.01 мг/л; 24 часа	Caco-2	Флуоресцентная микроскопия; Измерение трансэпителиального сопротивления	Гибель клеток, связанная с проникновением в них КТ. Наблюдается снижение значения трансэпителиального сопротивления при концентрации 0.1 мг/л.	[84]
MgO, ZnO, SiO ₂ , TiO ₂ , технический углерод	MgO–8нм ZnO–10-20нм SiO ₂ –14нм TiO ₂ –<10-300нм технический углерод–14нм	20, 80 мг/см ² ; 24 часа	Caco-2	WST-1; ЛДГ тест; Метод ДНК-комет; Измерение уровня глутатиона (ГТ)	Снижение жизнеспособности клеток. Выход ЛДГ из клеток. Двухнитевой разрыв ДНК и оксидативное повреждение ДНК. Снижению уровня глутатиона.	[50]
Наностержни Ag	Соотношение длины к диаметру 4:1	0.4 нМ; 4 дня	HT29	МТТ; Подсчет количества клеток	Цитотоксичность связана с поверхностно- активными веществами	[4]

					на поверхности наностержней.	
КТ CdSe	1.4–2.5 нм	2–200 пМ; 24 часа	Caco-2	МТТ; Тест на адгезивность культуры клеток	Цитотоксичность наблюдается при концентрации 200 пМ вследствие выхода ионов Cd из ядра КТ.	[191]
МУН, модифицированные СООН группами	1.4 ± 0.1 нм	5–1,000 мкг/мл; 24 часа	Caco-2	MTS; ЛДГ тест; Окрашивание нейтральным красным; Окрашивание трипановым синим	Гибель клеток при концентрации свыше 100 мкг/мл.	[77]
Полистирольные НЧ, модифицированные СООН или NH ₂ группами	20-40 нм	0,3-12 нм; 16 часов	Caco-2	Измерение ТЭС; Конфокальная микроскопия; Каспаза-3 тест; Флуоресцентная микроскопия	Поглощения клетками НЧ эффективнее для НЧ модифицированных СООН. Снижение жизнеспособности клеток (отрицательно заряженные НЧ модифицированные СООН, токсичнее).	[180]
Нанотрубки VO	Диаметр 15–100 нм, длина 500 нм	0.1–0.5 мкг/мл; 4–24 часа	Caco-2	Neutral red тест	Гибель клеток вследствие воздействия нанотрубок.	[159]
Ag,	20±2, 34±3, 61±5, 113±8	2.5-50 мкг/мл, 24 часа	Caco-2	WST-1; Транскриптомный анализ	Все типы НК не повлияли на снижение жизнеспособности выше 20% по сравнению с контрольными	[180]

					клетками. НК индуцировали изменения в экспрессии генов стрессового ответа на окислительный стресс, эндоплазматический стресс и апоптоз.	
--	--	--	--	--	--	--

Таблица 2 – Результаты исследований токсичности нанокристаллов и наночастиц при моделировании внутривенного проникновения и последствий взаимодействия наночастиц с клетками различных органов

Тип	Размеры	Концентрация время инкубации	Линия клеток	Метод детекции	Эффекты воздействия выводы	Ссылки
FeO, немодифицированные и модифицированные полиэтиленоксид (ПЭО) триблок сополимером (ПЭО - COOH-ПЭО)	10 нм,	1-5 мг/мл; 48 часов	PC3 C4-2 HUVEC	МТТ; Конфокальная микроскопия	НК вызвали снижение жизнеспособности у всех типов клеток. Наблюдалось поглощения клетками НК Поверхностно- модифицированные НК токсичнее чем НК без оболочки.	[61]
SiO немодифицированные и модифицированные COOH, NH ₂ , OH	30, 70 нм	1-6000 мкг/мл; 24 часа	HUVEC	МТS; ИФА; ЛДГ тест; Флуоресцентная микроскопия	Немодифицированные НК существенно не влияют на жизнеспособность клеток. Модифицированные НК	[49]

					<p>вызывают гибель клеток в незначительной степени.</p> <p>Состояние клеток (статическое или динамическое) не влияет на жизнеспособность клеток при взаимодействии с НК, но влияет на интернализацию НК (в динамическом состоянии клетки лучше поглощают НК).</p>	
Нанопластины CuS	<p>Длина 59,4 нм, толщина 23,8 нм</p>	<p>1-400 мкг/мл; 24, 48 часов</p>	<p>HUVEC RAW 264.7 KB HeLa</p>	<p>WST-8; Конфокальная микроскопия; Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)</p>	<p>Жизнеспособность клеток HUVEC значительно снижается после инкубации с НК при концентрации выше 100 мкг/мл по сравнению с клетками KB и HeLa.</p> <p>Проникновение НК наблюдалось только в клетках линии RAW 264.7.</p> <p>НК не вызвали значимых изменений в цитоскелете во всех линиях клеток.</p>	[46]
<p>Se модифицированные и немодифицированные полипиридилем Ru(II)</p>	<p>100 нм</p>	<p>1-50 мкг/мл; 12, 24 часа</p>	<p>HUVEC HepG2 SW480 PC3 MCF-7</p>	<p>Иммуноблоттинг; Конфокальная микроскопия; МТТ; Проточная цитометрия</p>	<p>Модифицированные НК Se в 2-6 раз токсичнее для всех линий клеток, чем немодифицированные.</p> <p>Модифицированные НК Se ингибируют пролиферацию, клеточную миграцию и формирования микротрубочек у клеток HUVEC.</p> <p>Модифицированные НК Se</p>	[179]

					эффективно поглощались клетками HUVEC и HepG2.	
Ag	35, <100, 2000–3500 нм	22, 70, 220, 700, 2200 мкг/мл; 3.5 часов	Эритроциты человека	Гемолитический тест	НК лизировали большой процент эритроцитов, по сравнению с частицами микронного размера. Увеличение гемолиза наблюдается при концентрациях 220мкг/мл или выше.	[32]
НЧ гидроксиапатита, немодифицированные и модифицированные индоцианиновым зеленым и Gd	50 нм	50-250 мг/мл; 48 часов	Моно-нуклеарные клетки крови Мезенхимальные стволовые клетки	МТТ; Гемолитический тест; Тест на активацию и агрегацию тромбоцитов; Проточная цитометрия	НЧ не токсичны для стволовых и периферических мононуклеарных клеток крови, не приводят к агрегации и активации тромбоцитов и не вызывают воспалительный или иммунный ответ.	[11]
SiO	100 нм	1-100 мкг/мл; 24, 48 часов	HeLa 3T3	МТТ; Trypan Blue тест; Проточная цитометрия; ЛДГ тест; СЭМ; АФК тест	НК обладают низкой токсичностью (влияют на жизнеспособности клеток выше 20% по сравнению с контрольными клетками только при концентрации 100 мкг/мл). НК не вызывают апоптоз, генерацию АФК и серьезные морфологические изменения клеток при концентрациях <100 мкг/мл.	[196]
КТ CdTe, модифицированные	4 нм	0.1-100 мкг/мл; 24	HUVEC	МТТ; Проточная цитометрия;	КТ цитотоксичны для клеток HUVEC.	[200]

меркаптоянтарной кислотой		часа		АФК тест	КТ вызывает повышение внутриклеточного АФК и активацию апоптоза.	
КТ CdTe/CdSe/ZnSe, модифицированные меркаптоундекановой кислотой (МУК)	19.8±5 нм	1.25-60 мкг/мл; 1, 24 часа	HepG2, SKBR-3 MCF-7	Alamar Blue тест; Флуоресцентная микроскопия; Конфокальная микроскопия	КТ не токсичны для всех линий клеток кроме линии HepG2 (КТ токсичны для клеток HepG2 при концентрации 15 мкг/мл). Морфологические изменения также наблюдаются только у клеток линии HepG2.	[161]

Таблица 3 – Результаты исследований токсичности нанокристаллов и наночастиц, при моделировании их проникновения в организм через дыхательные пути

Тип	Размеры	Концентрация время инкубации	Линия клеток	Метод детекции	Эффекты воздействия выводы	Ссылки
ZnO	288.2 ±2.4 нм 265.7 ±3.6 нм	4, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 мкг/мл; 6, 24 часа	C10	MTS; Флуоресцентная микроскопия; АФК тест	НК вызвали снижение жизнеспособности после 6 и 24 часов инкубации. Оксидативный стресс вследствие высвобождения ионов Zn.	[198]
Cu, CuO, ZnO, TiO ₂ , Ti, Ag, Co, Ni, NiO, ZrO ₂ , ZrO ²⁺ , Y ₂ O ₃ , НК стали, Al ₂ O ₃ , SnO, WC, CeO ₂	<500 нм	1-10000 мкг/мл; 24 часа	A549 THP-1	MTT; Neutral red тест	НК Cu и Zn показали наибольшую токсичность. НК Al, Ti, Ce и Zr оказали на клетки незначительное токсическое воздействие. НК WC не токсичны.	[93]

					Нет взаимосвязи между токсичностью формой, диаметром или площадью поверхности НК.	
CuO	50 нм	1-40 мкг/мл; 24 часа	A549 SAEC	WST-8; СЭМ Проточная цитометрия; Конфокальная микроскопия; Иммуноблоттинг; ДНК-микрочип анализ; ПЦР в реальном времени (ПЦР- PB)	НК высоко токсичны для клеток обеих линий. НК оказывают сильное влияние на клеточный цикл, подавляя гены, отвечающие за пролиферацию. НК вызывают апоптоз у клеток линий A549 SAEC.	[63]
Углеродные нанотрубки (УНТ)	14, 25.7±1.6, 14.84±0.05, 10.40 ±0.32, 84.89±1.9, 165.02± 4.68 нм	5-50 мкг/см ² ; 24 часа	THP-1 Met5a	ИФА; Тгуран Blue тест; АФК тест; Проточная цитометрия	УНТ вызвали снижение жизнеспособности клеток и генерацию АФК. Воздействие УНТ на клетки привело к значительному высвобождению цитокинов острой фазы воспаления (IL-1β, TNFα, IL-6) и хемокинов (IL-8) из клеток THP-1.	[128]
КТ CdSe Модифицированные МУК, меркаптоприоновой кислотой (МПК), аминоундекановой кислотой (АУК), цистеамином (ЦА)	3, 5, 10 нм	0.5, 5, 20, 80, 160 мкг/мл; 22 часа	NHBE	WST-1; ЛДГ тест; ИФА; Флуоресцентная микроскопия	Положительно заряженные КТ (АУК, ЦА) более токсичны, чем отрицательно заряженными КТ (МУК, МПК). Отрицательно заряженные КТ увеличивают экспрессию генов провоспалительных	[130]

					<p>цитокинов, положительные заряженные КТ индуцируют изменения в генах, связанных с митохондриальной функции клеток.</p>	
<p>SiO_2, Fe_3O_4 (немодифицированные и модифицированные олеатом натрия), TiO_2, PLGA НК, модифицированные PLGA-ПЭО</p>	<p>PLGA-ПЭО- 140 нм SiO_2-25, 50 нм TiO_2-21 нм Fe_3O_4-8 нм</p>	<p>0.6-75 мкг/см²; 24, 48 часов</p>	<p>16-НВЕ A549</p>	<p>WST-1; Проточная цитометрия; ПЦР-РВ</p>	<p>НК PLGA и TiO_2 не значительно влияют на жизнеспособность клеток линий 16-НВЕ и A549. Модифицированные НК Fe_3O_4 токсичнее по сравнению с немодифицированными НК PLGA вызывают генерацию АФК, не влияя на клеточный метаболизм, жизнеспособность или уровень продукции цитокинов</p>	<p>[55]</p>
<p>CdSe/ZnS, модифицированные COOH, NH_2</p>	<p>4-10 нм</p>	<p>2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 нМ; 1-3 клеточных цикла</p>	<p>BEAS-2B HFF-1 TK6</p>	<p>Проточная цитометрия; Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ); ИФА; АФК тест; Подсчет времени удвоения клеток; Флуоресцентная микроскопия</p>	<p>Уровень поглощения КТ клетками значительно выше у линий BEAS-2B и TK6 КТ-COOH лучше поглощаются клетками TK6 и HFF-1 клетки более чувствительны к воздействию КТ (высокая токсичность наблюдается при концентрациях выше 15нМ) чем BEAS-2B (высокая токсичность наблюдается при концентрациях выше 20нМ) Наблюдалось минимальное</p>	<p>[120]</p>

					изменение уровня АФК, только, в клетках HFF-1 в присутствии КТ-СООН и клетках ТК6 под воздействием КТ-NH ₂	
КТ InP/ZnS, CdSe/ZnS	InP/ZnS 11.3± 0.6 нм CdSe/ZnS 13.4±0.7нм	1пМ, 10пМ, 100пМ, 1нМ, 5 нМ; 24, 48 часов	A549 SHSY5Y	WST-8; ЛДГ тест; Измерение уровня ГТ; Анализ экспрессии мРНК; TUNEL-тест	КТ CdSe/ZnS повреждают клеточную мембрану, увеличивают уровень экспрессии генов ферментов детоксикации и антиоксидантов, повреждают ДНК и нарушают гомеостаз Ca ²⁺ в клетке. КТ InP/ZnS менее токсичны.	[26]
CeO ₂	15, 25, 30, 45 нм	5, 10, 20, 40 г/мл	BEAS- 2B	МТТ; Измерение уровня ГТ; АФК тест; Каспаза-3 тест; Флуоресцентная микроскопия	НК вызывают гибель клеток по средствам генерации АФК. НК поглощаются клетками и локализуются в перинуклеарном пространстве ядра.	[138]

Таблица 4 – Результаты исследований токсичности нанокристаллов и наночастиц при моделировании трансдермального проникновения в организм

Тип	Размеры	Концентрация время инкубации	Линия клеток	Метод детекции	Эффекты воздействия выводы	Ссылки
НК Ag, модифицированные дигалловой кислотой	Ag-ДК 13, 33, 46 нм Ag 10–65 нм	1–10 мкг/мл; 24 часа	291.03C RAW 264.7	Neutral red тест; Проточная цитометрия;	НК Ag снижают пролиферацию клеток обеих линий. НК вызвали увеличение генерации	[136]

(Ag-ДК), и немодифицированные				ПЭМ; Окраска ДНК 3Н-тимидином Определение митохондриальной активности (JC-1 тест)	АФК у клеток линии RAW 264.7. Клетки линии RAW 264.7 поглощают НК Ag и НК Ag -ДК размером 33, 46 нм и 10-65нм, в то время как клетки 291.03С поглощали только НК Ag-ДК размером 13нм. НК Ag угнетают продукцию ФНО- α клетками RAW 264.7 и увеличивают ее у клеток 291.03С. Наименее токсичны НК Ag-ДК размером 33, 46 нм	
НК Si, модифицированные Al ₂ O ₃ (Si- Al ₂ O ₃), Na (Si-Na)	Si-Al ₂ O ₃ 21 нм Si-Na 30 нм	40-800 мкг/мл; 72 часа, 7 дней	3Т3-L1 WI-38	WST-1; ЛДГ тест; Измерение уровня ГТ	НК Si-Al ₂ O ₃ не токсичны для клеток 3Т3-L1 в отличие от клеток WI-38 (слабое уменьшение жизнеспособности при концентрации от 250мкг/мл). НК Si-Na токсичны как для клеток линий 3Т3-L1 так и WI-38.	[176]
ZnO, модифицированные NH ₂	20 нм	1-50 мкг/мл; 0.5-24 часа	HaCaT SCCE02	МТТ; Иммуноблоттинг; ИФА; ТЭМ; ПЦР-РВ; АФК тест; Флуоресцентная микроскопия	НК снижают жизнеспособность обеих линий при концентрации 10мкг/мл и выше. НК ZnO индуцируют оксидативный стресс активируя MAP-киназные сигнальный пути (ERK, JNK, p38) НК ZnO увеличивают экспрессию Egr-1 и как следствие ФНО- α .	[75]
Многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ)	Диаметр 12 нм	100 мкг/мл	SZ95 ИНК	МТS; ЛДГ тест; ТЭС; Окраска ДНК 3Н-	МУНТ обладают цитотоксичностью только по отношению к клеткам ИНК.	[186]

				тимидином; ПЭМ	МУНТ не влияют на ТЭС, это говорит о том, что плотные контакты клеток эпидермиса не повреждаются при воздействии с МУНТ	
ZnO, TiO ₂	268.1±11.2 414.9±4.5	0.5-10 мкг/мл; 24, 48, 72 часа, 3 месяца	NCTC25 44	MTS; СЭМ; АФК тест; Проточная цитометрия	Инкубация 24-72 часа клеток с НК ZnO вызывает снижение жизнеспособности при концентрации выше 15мкг/мл, Длительная инкубация вызывает изменение морфологии клеток и влияет на клеточный цикл. НК TiO ₂ не токсичны. Токсичность НК связана с высвобождением ионов металлов, индуцирующих окислительный стресс.	[83]
CdSe/CdS, модифицированные PEG	39–40 нм	0.3125-10 нМ; 24, 48 часов	ННЕК	Конфокальная микроскопия; ПЭМ; Проточная цитометрия; Атомно- эмиссионная спектроскопия	Снижение жизнеспособности при концентрации выше 1.25нМ. Увеличение продукции ИЛ-8, ИЛ-6.	[210]
NaYF ₄ , модифицированные различными соединениями	94-550 нм	62.5, 125 мкг/мл; 24 часа	HaCaT Фибро- бласты кожи человека	МТТ; Конфокальная микроскопия; Флуоресцентная микроскопия	Наиболее токсичны для клеток HaCaT НЧ покрытые полиэтиленмином (ПЭИ), полилактид-ко-гликолидом (ПЛГ) и ПЛГ+ декстран сульфат (52, 61, 72% жизнеспособных клеток).	[57]

					НЧ не токсичны для фибробластов. Гидрофильные НЧ наименее токсичны и лучше поглощаются клетками HaCaT	
TiO ₂	124.9 нм	0.008-80 мкг/мл; 6, 24, 48 часов	A431	МТТ; Метод Бредфорда; Проточная цитометрия; Измерение ГТ; Липид пероксидазный тест; Метод ДНК-комет; АФК тест	НЧ оказывают незначительное влияние на жизнеспособность клеток при инкубации в течение 48 часов. НЧ вызывают повреждение ДНК АФК и образование микроядер в клетках.	[169]
Полиамидаминовые дендримеры	4.5, 5.4, 6.7 нм	0.01-21 мкМ; 24 часа, 8 дней	HaCaT SW480	МТТ; Клоногенный тест; Alamar Blue тест; Neutral red тест	Цитотоксичность дендримеров зависит как от величины зета-потенциала, так и от размера и увеличивается линейно с увеличением зета-потенциала и размера.	[126]

1.5.2 Совместно культивируемые клеточные линии и 3D-культуры клеток

Хотя подавляющее большинство исследований токсичности наноматериалов проводятся *in vitro* на монокультурах клеток, в литературе все чаще стали упоминаться два других новых подхода. Первый – совместное культивирования нескольких различных типов клеточных линий, второй – использование 3D-клеточных культур. Появление этих подходов обусловлено необходимостью создания более реалистичных моделей тканей и органов млекопитающих. Например, в опытах по исследованию токсичности НК серебра, для моделирования эпителия кишечника человека применяется совместное культивирование клеточной линии карциномы толстой кишки Caco-2 и суспензионной клеточной линии лимфобластов Raji [24]. При создании модели для исследования токсического эффекта при ингаляционном проникновении НК использовали совместное культивирование трех клеточных линий – эпителиальных клеток легкого, макрофагов крови человека и линии дендритных клеток [25]. Для создания модели, имитирующей кожные покровы, применяют совместное культивирование фибробластов и кератиноцитов [175].

Известно, что клеточный фенотип, а также функции клеток и их метаболические процессы во многом определяются системой сложных межклеточных взаимодействий с другими клетками и пространственным внеклеточным матриксом [1]. Таким образом, для клеток с адгезионным типом роста клеточный монослой весьма сильно по своим свойствам отличается от аналогичных клеток ткани, и модели по изучению токсического воздействия НК на клетки, растущие в монослое, зачастую дают не совсем объективные результаты [95]. На данный момент в литературе встречается несколько работ, в которых токсичность и проникновение НК в клетки изучается на 3D-моделях тканей и органов. Так, применяются 3D-модели на основе полимерных гидрогелей [89] или модели, созданные в специализированных перфузионных камерах, имеющих полупроницаемую мембрану, к которой прикрепляются

клетки [101]. Lee и соавторы с помощью многоклеточных сфероидов, размером порядка 100 мкм, создали 3D-модель печени и провели сравнительное исследование токсичности НК из CdTe и Au на этой модели и клетках печени, растущих в монослое [96]. Результаты исследования токсичности, полученные на 3D-модели, лучше коррелировали с данными полученными в тестах на животных, что говорит о высоком потенциале использования данного подхода для адекватного и высокоинформативного тестирования токсичности НК.

1.5.3 Исследование токсичности нанокристаллов *in vivo*

В настоящее время помимо исследования клеточных многослойных и 3D культур, проводится значительное количество исследований по изучению поведения НК при проникновении их в организм. Поскольку эти исследования направлены на изучение НК в контексте биомедицины, важным вопросом остается токсичность КТ для живого существа. Тем не менее, несмотря на то, что НК имеют огромный потенциал использования, они представляют собой потенциальную опасность для человеческого организма, поскольку показывают различные эффекты в моделях *in vivo* и *in vitro*.

Одними из наиболее широко используемых НК являются НК диоксида титана (TiO_2). В частности, данные НК могут применяться при борьбе с загрязнениями в окружающей среде, в связи с чем исключительно важно было исследовать их токсичность при стопроцентной биодоступности, то есть при их введении животным внутривенно. Такое исследование было проведено Eric Fabian и коллегами [44]. В ходе работы экспериментальным животным (крысам) вводили суспензию НК диоксида титана в концентрации 5 мг/кг, после чего наблюдали за его биораспределением, а также за состоянием животных. Было выяснено, что на протяжении 28 дней животные не показывали никаких признаков недомогания или болезни, не наблюдались воспалительные процессы и другие эффекты токсичности, что может говорить об относительной безопасности использования TiO_2 .

Еще одним типом НК с широким потенциалом использования благодаря своим антимикробным свойствам являются НК серебра. Для исследования их токсичности и биораспределения был проведен эксперимент, в котором CD-1 мышам внутривенно вводили НК серебра различного размера (10, 40 и 100 нм) и покрытые различной оболочкой в концентрации 10 мг/кг. Несмотря на то, что токсические повреждения тканей были обнаружены для каждого типа НК, наименее токсичными оказались частицы большего размера, что, вероятно, связано с их более слабой проникающей способностью [157]. В работе Asare [9] также исследовались серебряные и титановые НК в концентрации 5 мг/кг на предмет их генотоксичности. В ходе эксперимента было показано, что серебряные частицы вызывают разрывы цепей ДНК и окисление пуриновых оснований в исследованных тканях. Схожая ситуация наблюдается и с НК золота [213]. Было показано, что в концентрации 2.2 мг/мл они оказывают токсическое воздействие на организм мыши: потерю веса, снижение гематокрита, снижение количества эритроцитов в крови.

Одним из важнейших направлений использования НЧ является адресная доставка лекарств. Для исследований и разработок в данной области также исключительно важно знать об токсических свойствах НК, так как положительных эффект от их присутствия в организме должен преобладать над отрицательным. В нескольких работах приведены соответствующие исследования. Так, Kwon с коллегами разработали антиоксидантные НЧ из полимерного пролекарства ванилина [92]. Их исследования показали, что данные НЧ не оказывают токсического действия на организм, в частности на печень, в концентрации до 2,5 мг/кг. Похожие результаты были получены и для желатиновых НЧ, модифицированных PEG, которые планируется использовать для адресной доставки натриевой соли ибупрофена [131]. В концентрации 1 мг/кг, необходимой для эффективной доставки, НЧ оказались нетоксичными, что было подтверждено измерением уровня воспалительных цитокинов у исследуемых животных, а также гистологическим анализом их органов.

Одними из многообещающих для медицинских приложений НК являются КТ. Несмотря на то, что КТ имеют потенциал использования в различных биотехнологических приложениях, они представляют потенциальную опасность для человеческого организма, поскольку демонстрируют различные токсические эффекты в моделях *in vitro* и *in vivo* [29, 64, 66, 129, 207].

Чаще всего, для изучения токсического эффекта КТ *in vivo* используют модели лабораторных животных – мышей или крыс [204]. Так, при инъекции кадмиевых КТ в хвостовую вену мышей, уже через 15 минут КТ распределялись по всему организму с последующим накоплением в печени, почках, селезенке, красном костном мозге и лимфоузлах. При этом по прошествии двух лет флуоресценция сохранялась преимущественно в лимфоузлах, тогда как в остальных органах КТ обнаружено не было [48]. Также стоит отметить, что из-за разрушения оболочки КТ, а также изменения их формы, размера и поверхностного заряда КТ, спектр их флуоресценции может сдвигаться в синюю область спектра. Однако данный процесс происходит весьма медленно, так как КТ при их введении оказались нетоксичными в тех дозах, в которых чистые ионы кадмия вызывали бы летальный эффект. Схожие результаты были получены также в работе Yang и его коллег [202]. В исследованиях Zhang и соавторов было показано, что КТ CdTe преимущественно аккумулируются в печени, снижая в ней количество антиоксидантов и вызывая оксидативный стресс в клетках печени [212].

При деградации и распаде ядра КТ CdTe/ZnS ионы кадмия и теллура имеют тенденцию к накоплению в различных органах и тканях. В опытах на мышах, показано, что кадмий преимущественно аккумулируется в печени, почках и селезенке, в то время, как теллур в основном накапливается только в почках [108]. В работе Vallou и его коллег было показано, что кадмий-содержащие КТ, покрытые полимерной оболочкой на основе полиакриловой кислоты или различными модификациями PEG, в течение 4 месяцев не оказывают летального эффекта на экспериментальных мышей и сохраняют свою флуоресценцию [15]. НК CdSe/ZnS также не оказывали детектируемого патологического эффекта на

организм мыши [94], однако, отсутствие информации о патологических эффектах данных НК ещё не говорит, о том, что они полностью безопасны.

Исследование Ну и его коллег показало, что КТ, содержащие свинец, в течение четырех недель не проявили никаких токсических воздействий на мышей, однако причина этого скорее всего кроется в том, что исследуемые КТ были покрыты полиэтиленгликолевой оболочкой [67].

Поскольку одним из факторов токсичности КТ могут служить входящие в их состав тяжелые металлы, некоторые исследовательские группы предложили синтезировать НК, не содержащие в своем составе тяжелых металлов. Например, в работе Pons и его коллег были синтезированы $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ КТ, флуоресцирующие в ближней инфракрасной области спектра, и было высказано предположение, что, благодаря своему составу, они окажутся нетоксичны для лабораторных животных. При сравнении действия $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ КТ и $\text{CdTeSe}/\text{CdZnS}$ КТ на региональные лимфоузлы у мышей было показано, что после инъекций КТ, не содержащих тяжелых металлы, лимфоузлы практически не увеличиваются в размерах, в то время как после инъекции КТ $\text{CdTeSe}/\text{CdZnS}$ в них явно активировался иммунный ответ [151]. Также на мышцах было показано отсутствие токсических эффектов КТ, в которых тяжелые металлы были заменены кремнием [43].

Одна из версий, которая объясняет, почему КТ часто оказываются нетоксичны для организма даже несмотря на содержание в их составе тяжелых металлов, заключается в том, что при попадании КТ в организм они покрываются так называемой «белковой короной», которая экранирует их поверхность и защищает клетки от повреждения [189].

Однако, даже при отсутствии прямых признаков интоксикации у экспериментальных животных, в данный момент до конца не ясно, опасно ли широкое использование КТ в биотехнологических приложениях. В некоторых случаях токсичность КТ на мышцах не выявлялась, поскольку НК были нейтрализованы печенью и накапливались в ней [214], в других – покрытые

фосфолипидной мицеллой КТ показывали значительно сниженную токсичность благодаря своей оболочке [67] (Рисунок 2). Все же, несмотря на обширные исследования токсичности КТ на моделях *in vivo*, вопрос об их применении остается открытым. И в первую очередь это обусловлено тем, что проследить все отдаленные последствия на лабораторных животных порой невозможно, так как продолжительность их жизни составляет всего пару лет, а этого времени бывает недостаточно для полного выведения или деградации НК.

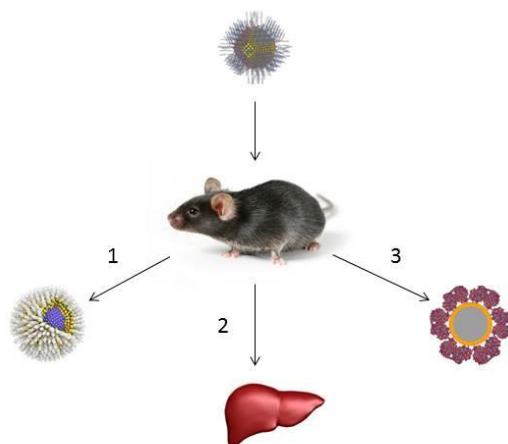


Рисунок 2 – Возможные причины отсутствия токсичности квантовых точек в моделях на животных. (1) Защита оболочки от высвобождения в организм тяжелых металлов [67, 214]; (2) Локализация КТ в печени и последующее выведение их из организма [183, 214]; (3) Защита организма от тяжелых металлов с помощью образования «белковой короны» вокруг поверхности КТ [189, 206]

1.6 Заключение

Одной из центральных проблем широкого применения НК является потенциальная возможность их токсического воздействия на организм человека. При решении этого вопроса необходимо учитывать не только положительные

результаты от использования НК, но и потенциально непредсказуемые и негативные последствия их воздействия на организм человека. Токсичность НК связана с их способностью проникать практически во все клетки, ткани и органы, распространяться в кровеносной и лимфатической системах, взаимодействовать с различными макромолекулами, изменять их структуру, тем самым нарушая нормальное функционирование внутриклеточных процессов и целых органов. Токсичность НК во многом зависит от их физико-химических свойств, таких как форма, размер, заряд и химический состав ядра и оболочки. При этом многие типы НК не распознаются защитными системами клеток и организма, что снижает скорость их деградации и может приводить к значительному накоплению НК в органах и тканях вплоть до высокотоксичных и летальных концентраций. Однако уже сейчас существует ряд подходов, направленных на создание НК со сниженной токсичностью по сравнению с традиционными НК. Современные методы исследования токсичности НК позволяют исследовать различные пути и механизмы реализации токсичности на молекулярном уровне, а также с высокой степенью вероятности предсказывать возможный уровень негативного эффекта на организм в целом.

Таким образом, очевидно, что процесс создания НК со сниженными или отсутствующими негативными свойствами, возможен только при полном и систематическом анализе всех физико-химических и количественных свойств НК, а также при наличии релевантной экспериментальной модели для оценки их биологического воздействия на живые системы.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Для последовательного систематизированного исследования зависимости токсичности флуоресцентных полупроводниковых НК сферической формы от их физико-химических свойств использовали серии синтетических КТ структуры ядро-оболочка, различающихся химическим составом ядра (кадмий-; свинец- или медь-содержащие), а также количеством монослоев защитной неорганической оболочки из сульфида цинка или сульфида кадмия. Поверхностный слой защитной оболочки КТ определял возможность перевода образцов КТ в водную фазу за счет взаимодействия с тиол-содержащими модифицирующими органическими лигандами.

С помощью перевода исходных синтетических КТ в водную фазу и дальнейшей функционализации поверхности водорастворимых КТ с помощью низкомолекулярных производных PEG нами были созданы серии водорастворимых КТ, различающихся не только химическим составом ядра и физическим размером, но также поверхностным зарядом за счет использования для модификации поверхности КТ производных PEG сходного размера, но имеющих различные концевые функциональные группы (-ОН; -COOH или -NH₂). Используемые в работе нормализованные серии КТ, различающиеся по одному параметру, являются удобными модельными объектами изучения влияния физико-химических свойств наноматериалов на их токсические свойства.

2.1.1 Основные использованные наноматериалы, животные, клеточные линии, реактивы и расходные материалы

- Исходные водонерастворимые КТ структуры ядро-оболочка химического состава CdSe/ZnS, CuInS₂/ZnS и PbS/CdS/ZnS были любезно предоставлены для дальнейшей модификации и исследований к.хим.н. П. С. Самохваловым, Лаборатория nano-биоинженерии НИЯУ МИФИ (Москва, Россия). Исходные

водонерастворимые КТ, содержащие в своем составе кадмий-содержащее ядро и многослойную оболочку: CdSe/CdS (8 монослоев (МС) и CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), синтезированные по методике [56], были любезно предоставлены для дальнейшей модификации и исследований д-р. Крисом Гюренц и проф. Николаем Гапоником, лаборатория физической химии Технического Университета Дрездена (Германия).

- Мыши линий BALB/c и CBAxH57BL/6 получены из вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
- Клетки линии фибробластов человека Wi-38, клетки линии аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 (ATCC, США)
- Культуральная среда RPMI 1640, фетальная бычья сыворотка, L-глутамин, пенициллин-стрептомицин, пируват натрия, среда 199 (Thermo Fisher Scientific, США)
- Раствор Версена, раствор Хенкса, физиологический раствор (ПанЭко, Россия)
- Хлороформ, метанол, DL-цистеин, гидроксид натрия, двухосновный и одноосновный фосфаты натрия, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), диметилсульфоксид (DMSO), уксусная кислота, краситель синий Эванса, хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин, таблетированная форма PBS, рекомбинантный инсулин человека, тиофлавин Т (ThT), овальбумин (Merck, США)
- Производные PEG: HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OCH₂-COOH, HS-(CH₂)₁₁-EG₆-NH₂ (ProChimia Surfaces, Польша)
- Стерильные фильтры 0,22 мкм Millex Syringe-driven Filter Unit, центрифужные фильтры Amicon Ultra-15 cut-off 10 кДа, стерильные фильтры 0,1 мкм Whatman Anotop syringe filter, стерильные шприцы объемом 2 мл (Merck, США)
- Пробирки Low-Bind объемом 0,5, 1,5 мл и 2 мл (Eppendorf, Германия)
- Стерильные пробирки объемом 15 и 50 мл (Corning, США)

- Пластик для работы с культурами клеток, боросиликатные слайды Lab-Tek II Chamber Slides (Nalgen Nunc International Corporation, США)
- Одноразовые наконечники для автоматических пипеток различного объема (Gilson, США)
- Колонки PD SpinTrap G-25, PD MiniTrap G-25 (GE Healthcare, США)

2.1.2 Основное использованное оборудование

- Вакуумный концентратор Concentrator Plus (Eppendorf, Германия)
- Ультразвуковая баня Branson 2510EMT (Merck, США)
- Микроцентрифуга Minispin (Eppendorf, Германия)
- Центрифуга с бакет-ротором Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия)
- УФ-спектрофотометр Varian Cary 50 (Agilent Technologies, США)
- Спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США)
- Спектрометр AvaSpec-NIR256-1.7 (Avantes, США)
- Микровесы CPA2P (Sartorius, Германия)
- Весы CPA225D (Sartorius, Германия)
- Шейкер MS 3 basic (IKA, Германия)
- Аспиратор FTA-1 (Biosan, Латвия)
- Прибор для исследования динамического светорассеяния Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания)
- Микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Швейцария)
- Автоматические одноканальные и многоканальные пипетки (Gilson, США)
- Фильтровальные устройства Nalgene серии MF75 объемом 250 мл, 500 мл и 1000 мл (Merck, США)
- Система для получения ультрачистой воды MilliQ Direct-Q 3 (Merck, США)
- Термошейкер Thermomixer C (Eppendorf, Германия)
- CO₂ инкубатор (Thermo Fisher Scientific, США)

- Ламинарный шкаф Purifier class II biosafety cabinet delta series (Labconco, США);
- Инвертированный микроскоп (Leica, Германия)
- Оптический микроскоп (Carl Zeiss, Германия)
- Фотометрический анализатор иммуноферментных реакций Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, США)
- Флуоресцентный микроскоп Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия)
- Спектрофотометрический анализатор Anthos2020 (Biochrome, Великобритания)
- Высокоскоростной атомно-силовой микроскоп, индивидуальной конструкции (Лаборатория исследований в области нанонаук, Университет Реймс Шампань-Арденны, Франция)
- Электронный микроскоп JEM-1400Plus (JEOL, Япония)

2.2 Получение водорастворимых квантовых точек составов CdSe/ZnS, CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), CdSe/CdS (8 МС), CuInS₂/ZnS и PbS/CdS/ZnS

Для получения водорастворимых форм КТ было взвешено по 20 мг каждого вида КТ, навески перенесены в пробирки Эппендорф (2 мл), после чего к навескам КТ было добавлено по 800 мкл хлороформа. Для проведения очистки исходного препарата КТ от органических составляющих пробирку с КТ и хлороформом интенсивно перемешивали. После этого к растворенным в хлороформе КТ было добавлено по 1200 мкл метанола. Пробирки с препаратом мягко перемешивали на шейкере, а затем центрифугировали при комнатной температуре на 14000 об./мин в течение 5 минут. После центрифугирования супернатант удаляли из пробирок, а оставшиеся в осадке КТ снова ресуспензировали в 800 мкл хлороформа. Цикл промывки, включающий растворение КТ в хлороформе, добавление к ним метанола и последующее центрифугирование с удалением осадка, повторяли 3 раза. После третьего центрифугирования осадок КТ, путем интенсивного перемешивания, растворили в 800 мкл хлороформа. Затем готовляли

раствор DL-цистеина в метаноле с концентрацией 10 мг/мл. По 200 мкл полученного раствора DL-цистеина добавляли к раствору каждого типа КТ в хлороформе при постоянном перемешивании. Полученную смесь центрифугировали при комнатной температуре на 14000 об/мин в течение 5 минут. Для удаления не связавшегося DL-цистеина супернатант был удален после центрифугирования. К осадку КТ было добавлено по 1000 мкл метанола и была трижды проведена отмывка КТ от не связавшегося цистеина путем центрифугирования в течение 3 минут при 14000 об/мин, удаления супернатанта и повторного добавления метанола. После проведения последней промывки супернатант был удален, а осадок КТ высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator Plus в течение 2 минут при комнатной температуре для того, чтобы убрать остатки метанола. К сухому остатку КТ было добавлено по 600 мкл воды и по 50 мкл 1М раствора гидроксида натрия. Полученную смесь интенсивно перемешивали для растворения КТ в воде. Для лучшего растворения образцы КТ помещали на ультразвуковую водяную баню на 20 минут. Затем для устранения агрегатов и нерастворенных КТ, растворы КТ центрифугировали при 8000 об/мин при комнатной температуре в течение 10 минут. Полученные после центрифугирования растворы КТ фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм Millex Syringe-driven Filter Unit.

Чтобы рассчитать массовые концентрации препаратов КТ, снимали спектры поглощения растворов КТ составов CdSe/ZnS, CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), CdSe/CdS (8 МС)) и использовали полученные значения оптической плотности в первом экситоне для расчета концентрации КТ с использованием закона Бугера-Ламберта-Бера и с учетом расчетного значения молярной массы КТ и фактора разведения препарата КТ (1):

$$C = \frac{OD \times M \times f}{\varepsilon \times l} \quad (1)$$

где:

C – концентрация КТ

OD – оптическая плотность в первом экситоне

M – молярная масса КТ

f – фактор разведения препарата КТ

ε – коэффициент молярной экстинкции КТ (mol L^{-1}).

l – длина оптического пути (см)

Концентрацию инфракрасных КТ $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ и $\text{PbS}/\text{CdS}/\text{ZnS}$ рассчитывали весовым методом. После финальной очистки КТ в предварительно взвешенные пробирки объемом 0,5 мл Low-bind (Eppendorf, Германия) было добавлено по 35 мкл раствора КТ $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ или раствора КТ $\text{PbS}/\text{CdS}/\text{ZnS}$. Содержимое пробирок высушивалось в концентраторе Concentrator Plus в течение 3 часов при температуре 30°C . По прошествии 3 часов пробирки вместе с КТ снова взвешивались. Масса навески КТ, содержащейся в 35 мкл исходного раствора КТ измерялась путем вычитания начальной массы пустой пробирки из конечной массы пробирки с препаратом КТ после высушивания КТ. Массовая концентрация КТ пересчитывалась на объем 1 мл.

2.3 Модификация поверхности квантовых точек производными полиэтиленгликоля

После определения концентрации КТ в растворе было рассчитано нагрузочное количество органических лигандов на основе тиол-содержащих производных PEG: $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-OH}$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-OCH}_2\text{-COOH}$ и $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-NH}_2$, необходимых для модификации поверхности КТ. Для всех типов КТ использовали модифицирующие смеси лигандов в следующих соотношениях: смесь 70% $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-OH}$ /30% $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_6\text{-OCH}_2\text{-}$

COOH, смесь 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH/30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-NH₂ или 100% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH. После добавления к КТ необходимого количества лигандов рабочие смеси с соответствующими рН (0,1М натрий-фосфатный буфер рН 7,2 в случае использования HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, 0,1М натрий-фосфатный буфер рН 8,0 в случае использования смеси 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH/30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OCH₂-COOH или 0,1М натрий-фосфатный буфер рН 6,6 в случае использования смеси 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH/30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-NH₂ инкубировали при температуре + 4 °С в течение 24 часов.

После завершения инкубации проводили очистку КТ от избытка несвязавшихся лигандов. Для этого растворы КТ помещали в верхний резервуар фильтров Amicon 15 Ultra 10K, после чего центрифугировали фильтры с добавлением 15 мл 0,1М натрий-фосфатного буфера рН 7,2 в случае использования HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, 0,1М натрий-фосфатного буфера рН 8,0 в случае использования смеси 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH/30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OCH₂-COOH или 0,1М натрий-фосфатного буфера рН 6,6 в случае использования смеси 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH/30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-NH₂. Центрифугирование проводили трижды при комнатной температуре в течение 10 минут при 4000 об/мин. Затем предварительно очищенные и сконцентрированные растворы КТ очищали с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонках PD MiniTrap G-25 согласно протоколу производителя. Для этого на предварительно уравновешенные при помощи 0,1 М натрий-фосфатного буфера соответствующего значения рН колонки наносили по 500 мкл раствора КТ. Элюцию проводили 1 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера соответствующего рН. Фракции, содержащие КТ, собирали в отдельную пробирку. После завершения двух циклов очистки КТ путем гель-фильтрационной хроматографии раствор дважды пропускали через фильтры с размером пор 100 нм Whatman Anotop 0,1 μm. Далее оценивали концентрации полученных препаратов для характеристики и дальнейших исследований.

2.4 Оптическая характеристика, определение размеров и зарядов квантовых точек

Спектры поглощения растворов КТ CdSe/ZnS, CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), CdSe/CdS (8 МС)) измеряли с помощью спектрофотометра Cary 60 UV-Vis. Спектры возбуждения и спектры испускания флуоресценции КТ CdSe/ZnS, CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), CdSe/CdS (8 МС)), CuInS₂/ZnS измеряли при помощи спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse. Оптическую характеристику препаратов КТ PbS/CdS/ZnS проводили при помощи спектрометра AvaSpec-NIR256-1.7.

Для каждого образца КТ было проведено измерение размера (гидродинамического диаметра, ГДД) и поверхностного заряда с помощью анализа динамического светорассеяния и электрофоретической подвижности соответственно с использованием прибора Malvern Zetasizer Nano ZS. Каждое измерение проводили не менее пяти раз, и полученные результаты оценивали с помощью стандартных статистических методов анализа.

2.5 Оценка и мониторинг коллоидной стабильности квантовых точек

Оценка коллоидной стабильности КТ проводилась для двух различных сред при двух различных температурах инкубации. Вначале были приготовлены две среды для проведения эксперимента: 0,1 М натрий-фосфатный буфер со значением pH 7,2 и культуральная среда RPMI-1640 Media. После приготовления сред, в каждую из них были добавлены КТ до конечной концентрации 1 мг/мл. Затем все образцы разделили на две части: одну – для инкубации при 37 °С в термошейкере ThermoMixer C, другую – для инкубации при комнатной температуре. Критерием оценки стабильности КТ были значения ГДД, определяемые при помощи анализатора динамического светорассеяния Malvern Zetasizer Nano ZS. Измерение ГДД КТ проводилось каждый день на протяжении 5 дней.

2.6 Оценка цитотоксичности квантовых точек *in vitro*

Анализ цитотоксичности КТ проводился с использованием линии клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 и линии клеток нормальных фибробластов человека Wi-38. Перед началом работы клетки были разморожены в течение 1-2 минут на водяной бане при температуре 37 °С. После разморозки клетки перенесли в пробирки объемом 15 мл с 5 мл среды RPMI-1640. Для удаления криопротектора после перемешивания клетки центрифугировались в течение 5 минут на 1500 об./мин, а затем супернатант аккуратно отбирался из пробирок таким образом, чтобы потеря клеток была минимальной. Затем клетки обеих линий выращивали в культуральных флаконах в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, антибиотика пенициллин-стрептомицин, пирувата натрия и раствора витаминов для полной ростовой среды RPMI-1640 в инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. При формировании клетками монослоя их снимали с культуральных флаконов с помощью раствора Версена. Для этого удаляли культуральную среду, инкубировали клетки с 2 мл раствора Версена в течение 2-5 минут, добавляли в культуральный флакон 5 мл полной ростовой среды и собирали отсоединившиеся от дна культурального флакона клетки в центрифужную пробирку. Клеточную суспензию центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут, затем клеточный осадок ресуспендировали в 5-10 мл полной ростовой среды, клетки подсчитывали в камере Горяева и вносили в новый культуральный флакон по 500 тыс. клеток в 8 мл полной ростовой среды.

Оценка влияние исследуемых КТ на жизнеспособность клеточных культур проводилась с помощью тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) по стандартному протоколу. МТТ в митохондриях жизнеспособных клеток метаболизируется с

образованием кристаллов формазана, имеющих фиолетовую окраску, результаты этой реакции оцениваются фотометрически.

Для подготовки МТТ-теста 0,5 г реагента МТТ растворяли в 100 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,4) до конечной концентрации 5 мг/мл, после чего раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и расфасовывали по пробиркам объемом 4 мл. МТТ-реагент хранили в замороженном виде при -20°C , размораживая необходимое количество раствора перед проведением реакции.

Для постановки МТТ-теста клетки снимали с культурального флакона, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в полной ростовой среде RPMI-1640 и подсчитывали клетки в камере Горяева. Далее клетки культивировали в 96-луночном плоскодонном планшете, добавляя по 7 тыс. клеток в 180 мкл культуральной среды на лунку. В краевые лунки планшета была добавлена ростовая среда без клеток. Планшеты инкубировались при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение ночи для прикрепления клеток ко дну лунок планшета. Затем в лунки с клетками были внесены образцы КТ в концентрациях от 0,2 мг/мл до 0,781 нг/мл по схеме бинарного разведения в трех повторах. После нанесения образцов планшеты инкубировались в течение 24 часов и 48 часов в инкубаторе при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 .

По окончании времени инкубации клеток с КТ планшеты центрифугировались на 1500 об./мин в течение 6 минут, после чего супернатант аккуратно удалялся, а в лунки добавлялась полная ростовая среда RPMI-1640. Центрифугирование с последующим удалением супернатанта и добавлением свежей ростовой клеточной среды проводилось для того, чтобы отмыть клетки от КТ и нивелировать оптический вклад от них при анализе оптической плотности формазана. Далее в каждую экспериментальную лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ (до конечной концентрации 1 мг/мл) и инкубировали 4 часа при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . По прошествии 4 часов в лунках с жизнеспособными клетками

образовывались кристаллы формазана. Затем планшеты центрифугировали при 1500 об./мин в течение 6 минут, после чего удаляли супернатант, а в каждую лунку добавляли по 150 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Далее планшеты помещали в инкубатор на 10 минут, затем 10 минут перемешивали на шейкере для равномерного распределения раствора формазана. Анализировали оптическую плотность раствора формазана в лунках на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций Multiskan EX при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Цитотоксичность (Ц) оценивали в % по формуле (2):

$$\text{Ц}=(1-\text{O}_o/\text{O}_k)*100\%, \quad (2)$$

где O_k – оптическая плотность в контрольных лунках, O_o – оптическая плотность в опытных лунках.

Затем рассчитывали ингибирующую концентрацию КТ, которая приводит к гибели 50% клеток (ИК_{50}).

2.7 Флуоресцентная микроскопия

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 высаживали на отсеки боросиликатных слайдов Lab-Tek II Chamber Slides в концентрации 100 тысяч клеток в объеме 500 мкл клеточной среды RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. После адгезии клеток меняли среду на бессывороточную и, для изучения захвата КТ клетками и внутриклеточного распределения КТ, добавляли в стандартизированных условиях в каждый отсек слайдов КТ различного типа до финальной концентрации ИК_{10} . Для визуализации использовался микроскоп Axio Observer A1. При проведении измерений использовалась камера AxioCam 506, объектив LD A-plan 40x/0.55, фильтр на возбуждение 455-495 нм при длине волны возбуждения 495 нм,

фильтр на эмиссию 505-555 нм при длине волны возбуждения 519 нм. Время экспозиции составило 13,33 мс.

Интенсивность флуоресценции оценивалась при помощи программы ImageJ (Wayne Rasband, США).

2.8 Исследование механизма образования амилоидных фибрилл инсулина при взаимодействии с квантовыми точками

Рекомбинантный инсулин человека переводили в 10 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,2) с использованием колонок PD SpinTrap G-25 и полученный раствор белка фильтровали через шприцевой фильтр Anotop 0,1 мкм. Концентрация инсулина была измерена при помощи метода Брэдфорда, после чего был приготовлен стоковый раствор инсулина концентрацией 10 мг/мл. Для приготовления рабочих смесей для дальнейшего анализа с помощью высокоскоростной АСМ стоковый раствор был разведен до концентрации 2 мг/мл.

Для проведения эксперимента использовали раствор модельных КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в концентрации 3,44 мкМ. В ходе эксперимента инсулин и КТ смешивали в общем объеме 800 мкл в пробирке с низким связыванием белков Low bind в молярном соотношении инсулин к КТ, как 1 к 100. Затем смесь инкубировали на водяной бане в течение 6 часов при 37 °С, а образцы для анализа отбирали через 30 минут, 1, 2, 4 и 6 часов после начала инкубирования. Размеры агрегатов инсулина параллельно проверяли с помощью метода динамического светорассеяния с использованием прибора Zetasizer Nano ZS.

2.9 Тиофлавиновый флуоресцентный тест

Контроль образования амилоидных фибрилл инсулина в присутствии КТ проводили с помощью специфического красителя индукции амилоидообразования ThT. Для проведения контрольных тестов готовили 10 мкМ раствор ThT в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,0. Аликвоты

рабочего раствора инсулина человека или смесей инсулина человека и КТ (по 30 мкл) были добавлены к аликвотам тиофлавина (300 мкл) и далее полученные смеси инкубировали в различных температурных условиях (25С°, 37С° и 50С°) течении суток. Детекцию специфического сигнала ThT проводили на длине волны 482 нм в семи-микрокварцевой кювете с оптическим путем 1 см при длине волны возбуждения 440 нм.

2.10 Атомно-силовая микроскопия

Образование фибрилл инсулина амилоидной структуры в присутствии КТ в физиологических условиях исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии и использованием индивидуально сконструированного высокоскоростного АСМ в лаборатории исследований в области нанонаук, Университете Реймс Шампань-Арденны, Франция. Техническую поддержку проведения измерений оказывал инженер платформы. Для настройки прибора использовали настройки, использованные для оборудования установленного в Исследовательском институте биомолекулярной метрологии (ИИБМ) (Ибараки, Япония) [7]. Эксперименты проводили при комнатной температуре в бесконтактном режиме с использованием силикон-нитридного кантилевера с коэффициентом упругости пружины 0,2 N/m (BL-AC10DS-A2, Olimpus). На наконечник путем наращивания с помощью электронного луча был наложен углерод, который затем затачивался травлением плазмы до 4-5 нм. Амплитуда свободных колебаний кантилевера была настроена на 1-2 нм. Заданная амплитуда составляла 85% от свободной амплитуды для того, чтобы избежать излишнего взаимодействия наконечника и образца. Все измерения проводились в 10 мМ натрий-фосфатном буфере с рН 7,2. Для наблюдений на предварительно очищенную пластину из слюды добавляли 2 мкл образца. После пятиминутной инкубации при комнатной температуре образец промывали буфером. Обработка изображений проводили при помощи программы, разработанной в лаборатории ИИБМ, а также программы ImageJ. Статистическая обработка

результатов проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., США).

2.11 Оценка острой токсичности квантовых точек

Для оценки острой токсичности *in vivo* и определения значений полулетальной дозы (LD_{50}) исследуемых препаратов КТ использовали здоровых мышей самок линии BALB/c, полученных из вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для исследования использовали стандартных животных, имеющих массу в диапазоне 18-22 г. Все животные были здоровы, их содержали в специальных просторных клетках при комнатной температуре (20-23 °C) и относительной влажности 60–65% в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Животные имели круглосуточный свободный доступ к чистой питьевой воде.

Животные были разделены на группы, по 4 мыши в каждой. КТ химического состава $CuInS_2/ZnS$, $PbS/CdS/ZnS$, $CdSe/ZnS$, модифицированные тиол-содержащим лигандом $HS-(CH_2)_{11}-EG_6-OH$, а также препараты КТ химического состава $CdSe/ZnS$ модифицированные смесью 70% $HS-(CH_2)_{11}-EG_6-OH/30\% HS-(CH_2)_{11}-EG_6-OCH_2-COOH$, смесью 70% $HS-(CH_2)_{11}-EG_6-OH/30\% HS-(CH_2)_{11}-EG_6-NH_2$ или 100% $HS-(CH_2)_{11}-EG_6-OH$ в концентрациях в диапазоне от 100 до 300 мг/кг были однократно введены в хвостовую вену мышей. Исследуемые вещества растворяли в стерильном 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2; в качестве контролей использовали стерильный 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2 и стерильные профильтрованные растворы соответствующих модифицирующих лигандов в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2.

День введения препарата принимали за 0 день. В день инъекции за животными наблюдали в течение 6 часов после закола, далее два раза в день. Срок наблюдения за животными составил 15 дней.

Критериями оценки острой токсичности служили: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации и изменения поведенческих реакций. Фиксировали все патологические изменения в поведении и клиническом состоянии животных. Для оценки токсического действия КТ определяли ЛД, представляющие собой количество вещества, вызывающее гибель определенного количества животных, выраженного в процентах.

2.12 Оценка отдаленных последствий инъекции квантовых точек в мышинной модели BALB/c

Для оценки *in vivo* отдаленных последствий инъекций исследуемых препаратов КТ использовали здоровых мышей самок линии BALB/c, полученных из вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для исследования использовали стандартных животных, имеющих массу в диапазоне 18-22 г. Все животные были здоровы, их содержали в специальных просторных клетках при комнатной температуре (20-23 °С) и относительной влажности 60–65% в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Животные имели круглосуточный свободный доступ к чистой питьевой воде.

Животным были однократно заколоты препараты КТ различного химического состава (CdSe/ZnS, CuInS₂/ZnS и PbS/CdS/ZnS), модифицированные одним и тем же производным PEG: HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, то есть обладающие сходными свойствами поверхности. Животные были рассажены в различные клетки в зависимости от введенного им типа КТ и

помечены при помощи ушных надрезов и срезов в зависимости от введенной им дозы КТ: ЛД₂₀, ЛД₃₀, ЛД₄₀, ЛД₅₀. Исследуемые вещества растворяли в стерильном 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2; в качестве контролей использовали стерильный 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,2 и стерильные профильтрованные растворы соответствующих модифицирующих лигандов в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2. День введения препарата принимали за 0 день. В день инъекции за животными наблюдали в течение 6 часов после закола, далее два раза в день. Срок наблюдения за животными составил 30 дней.

На протяжении всего времени оценивались следующие параметры: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации (дыхание, двигательная способность, состояние шерсти, состояние кожных покровов, состояние слизистой глаза), поведенческие реакции и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии животных, умерщвленных в конце опыта.

2.13 Приготовление гистологических образцов тканей

Для приготовления гистологических образцов исследуемых тканей мышей линии BALB/c проводили их умерщвление путем цервикальной дислокации через один месяц после введения им в хвостовую вену исследуемых препаратов КТ различного химического состава (CdSe/ZnS, CuInS₂/ZnS и PbS/CdS/ZnS), модифицированных HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, в дозах ЛД₄₀-ЛД₅₀. Затем из мышей извлекали селезенку, почки, печень, легкие и сердце. Органы животных были помещены в 10% раствор формалина и затем из этих препаратов были подготовлены парафиновые слайды согласно стандартному протоколу, описанному Мена и соавторами [123].

2.14 Окрашивание парафиновых слайдов гематоксилином и эозином

Окрашивание полученных слайдов было проведено по стандартному протоколу, описанному Fischer и соавторами [47].

2.15 Определение массы и клеточности органов иммунной системы

В исследованиях воздействия КТ на иммунную систему использовали мышей самок гибридов СВАхС57BL/6, массой 18-20 г, полученных из вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все животные были здоровы, их содержали в специальных просторных клетках при комнатной температуре (20-23 °С) и относительной влажности 60–65% в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Животные имели круглосуточный свободный доступ к чистой питьевой воде.

На 7-й и 21-й день после введения мышам препарата КТ CdSe/ZnS, модифицированных HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH в дозах ЛД₅ и ЛД₁₀, животных забивали с помощью цервикальной дислокации и извлекали тимус, селезёнку и трубчатые кости. Лимфоидные органы взвешивали и с помощью стеклянного гомогенизатора готовили клеточную взвесь на среде 199 или на растворе Хенкса (рН 7,4). Полученную суспензию фильтровали и дважды отмывали путём центрифугирования. Средой 199 из костей вытесняли и затем гомогенизировали костный мозг. Далее подсчитывали концентрацию ядродержащих клеток (ЯСК) в 3% уксусной кислоте. Результаты выражали в абсолютных единицах числа ЯСК в органе.

2.16 Оценка влияния квантовых точек на клеточный иммунитет в реакции гиперчувствительности замедленного типа

Состояние клеточного иммунитета животных после введения им КТ CdSe/ZnS, модифицированных HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, оценивали по способности мышей СВАхС57BL/6 к индукции реакции

гиперчувствительности замедленного типа к овальбумину. В качестве адьюванта использовали реактив синий Эванса.

После введения препарата КТ в дозах ЛД₅ и ЛД₁₀, мышей линии СВАхС57ВL/6 иммунизировали введением 0,2 мл физиологического раствора, содержащим 100 мкг овальбумина и 250 мкг синего Эванса, с помощью подкожной инъекции в межлопаточную область. Вторую (разрешающую) инъекцию 25 мкг овальбумина в 0,02 мл физиологического раствора проводили на 5 сутки в подушечку задней «опытной» лапы. В «контрольную» лапу вводили 0,02 мл стерильного физиологического раствора. Через 24 часа мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации, удаляли задние лапы и регистрировали результаты реакции путём определения массы «опытной» и «контрольной» лап. Индекс реакции (ИР) для каждого животного определяли по формуле (3):

$$\text{ИР} = (P_{\text{O}} - P_{\text{K}}) / P_{\text{K}} \times 100, \quad (3)$$

где P_{O} – масса стопы «опытной» лапы,

P_{K} – масса стопы «контрольной» лапы.

2.17 Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

Через 24 ч после введения мышам исследуемого препарата КТ CdSe/ZnS, модифицированных HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, в дозах ЛД₅ и ЛД₁₀ оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов животных путем анализа интенсивности захвата макрофагами частиц коллоидной туши, введённой животным внутрибрюшинно в виде 0,05% суспензии в объёме 2 мл. Через 10 мин после введения суспензии брюшную полость промывали 5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Полученные таким образом клетки перитонеального экссудата (КПЭ) трижды отмывали, ресуспендировали в 1-2 мл физиологического раствора, подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток (ЯСК) и процент фагоцитирующих клеток. Далее клетки осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, а

осадок КПЭ лизировали дистиллированной водой. Лизаты КПЭ затем помещали в плоскодонные планшеты и определяли с помощью спектрофотометрического анализатора Anthos 2020 при длине волны равной 620 нм оптическую плотность, отражающую количество туши, поглощённой перитонеальными фагоцитами. Результаты выражали в условных единицах, отражающих оптическую плотность лизата КПЭ соотнесенную с количеством фагоцитирующих клеток.

2.18 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка результатов характеристики физико-химических свойств НК, а также расчеты ингибирующих концентраций НК и летальных доз НК при исследовании их цитотоксичности *in vitro* и токсичности *in vivo* была проведена с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010 и OriginPro (версия 8.5 SR1).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеризация наноматериалов, использованных в работе

Исходные флуоресцентные полупроводниковые НК, или КТ, имеющие различный химический состав и структуру неорганической оболочки, после синтеза изначально растворимы исключительно в органической среде. Таким образом, все использованные в работе наноматериалы после первичной характеристики синтетических образцов переводили в водную фазу и далее проводили функционализацию их поверхности для создания серий стандартизованных биосовместимых препаратов. После чего детально характеризовали отдельные образцы серий с целью их дальнейшего использования для запланированных исследований.

3.1.1 Характеризация синтетических водонерастворимых квантовых точек

Для исследования зависимости токсичности НК от их физико-химических свойств нами были выбраны КТ сферической формы, так как данные флуоресцентные НК являются удобными объектами расширенных многовариантных исследований с точки зрения возможности получения стандартизованных препаратов НК, различающихся химическим составом, размером и поверхностным зарядом. Таким образом, для исследований были приготовлены серии КТ с различным химическим составом ядра, размером и поверхностным зарядом, чтобы оценить вклад и влияние данных свойств НК на их токсичность. Нами выбраны КТ наиболее распространенного химического состава с ядром на основе тяжелых металлов, таких как Cd и Pb, а также КТ с ядром без тяжелых металлов на основе CuInS_2 . Стоит также отметить, что КТ $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ и $\text{PbS}/\text{CdS}/\text{ZnS}$ способны к флуоресценции в ближней ИК области, что делает их весьма перспективными кандидатами для биологической детекции и визуализации *in vivo*, в том числе во время проведения хирургических операций. Все препараты синтетических КТ

имели структуру ядро/оболочка, причем для КТ составов CdS/ZnS, CuInS₂/ZnS, внешняя оболочка ZnS была наращена эпитаксиально и содержала в среднем от одного до трех монослоев (МС) ZnS, а КТ состава PbS/CdS/ZnS имели двойную оболочку из одного МС CdS и 1-3 МС ZnS. Для получения КТ с разным размером в работе также были использованы КТ с более толстыми неорганическими оболочками, такие как КТ состава CdSe/CdS (8 МС) с восьмью МС CdS и КТ CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС) с оболочкой из 6 МС CdS и 3 МС ZnS. Само наращивание внешней неорганической оболочки необходимо для увеличения стабильности КТ и улучшения их оптических свойств. Спектральные свойства водонерастворимых синтетических КТ приведены в таблице 5. Диаметр ядер КТ составов CdSe/ZnS, CdSe/CdS (8 МС), CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), PbS/CdS/ZnS и CuInS₂/ZnS рассчитан исходя из данных просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), при этом толщина одного МС оболочки была взята равной 0,7 нм [205]. Спектры поглощения КТ измеряли при помощи спектрофотометра Cary 60 UV-Vis, для анализа оптических свойств КТ PbS/CdS/ZnS использовали спектрометр AvaSpec-NIR256-1.7. Спектры поглощения КТ, использованных в работе, приведены на рисунке 3.

Таблица 5 – Состав и оптические свойства синтетических водонерастворимых квантовых точек

Тип КТ	$\lambda_{\text{max}} \text{ возб.}, \text{ нм}$	$\lambda_{\text{max}} \text{ фл.}, \text{ нм}$	Диаметр, нм
PbS/CdS/ZnS	1300	1400	8,9
CuInS ₂ /ZnS	550	690	4,5
CdSe/ZnS	570	590	5,5
CdSe/CdS (8 МС)	470	590	8,5
CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС)	450	610	9,2

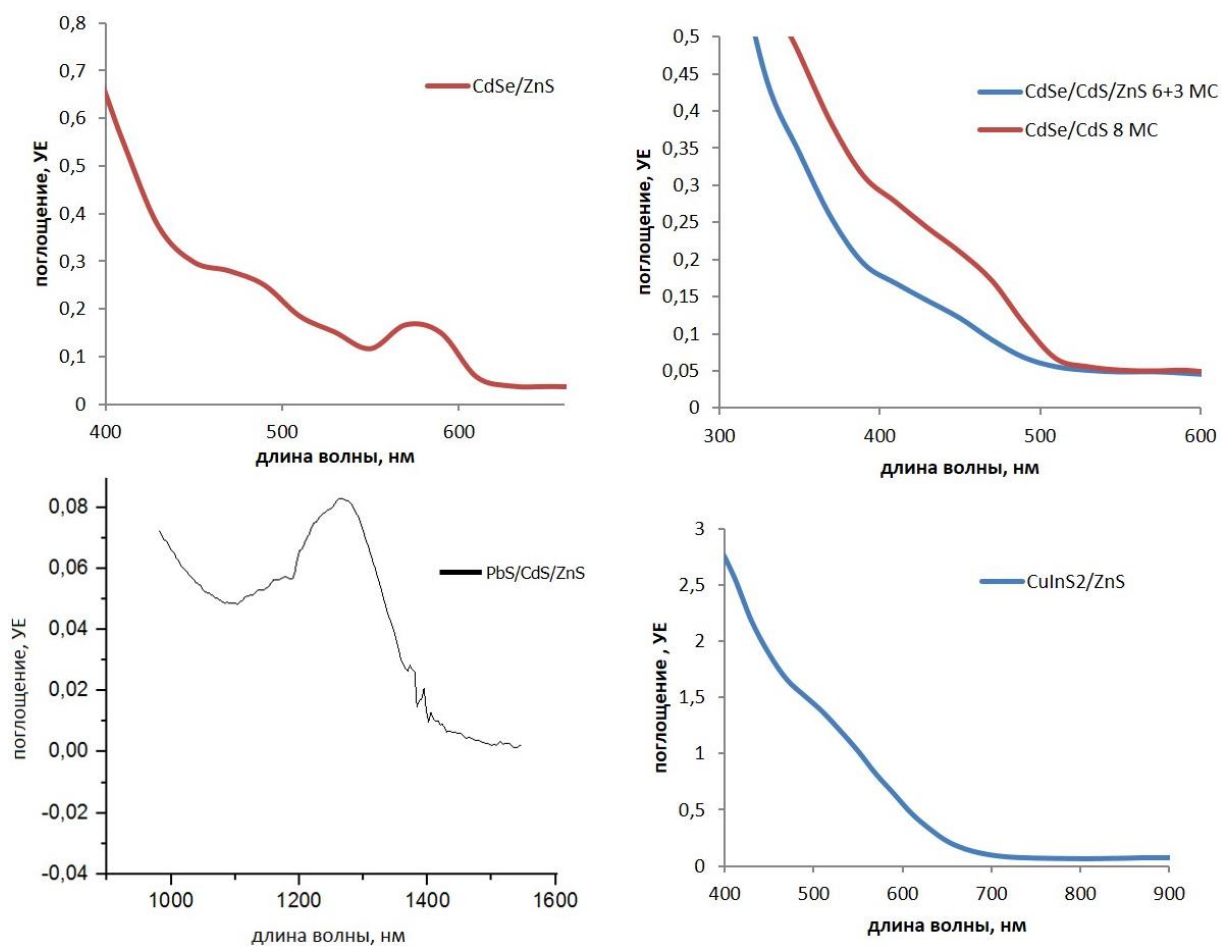


Рисунок 3 – Спектры поглощения синтетических водонерастворимых квантовых точек

Структура КТ была проанализирована с помощью ПЭМ с использованием микроскопа JEM-1400Plus, работающего при 120 кВ платформы Технического Университета Дрездена (Германия), сервисные услуги в анализе образцов оказывал инженер платформы. Образцы ПЭМ готовили путем добавления 10 мкл разбавленного органического раствора КТ на сетку из меди (200 меш) покрытую формваром/углеродом и последующего выпаривания растворителя. ПЭМ показала высокую гомогенность исходных синтетических наноматериалов. Результаты, полученные методом ПЭМ, приведены на рисунке 4.

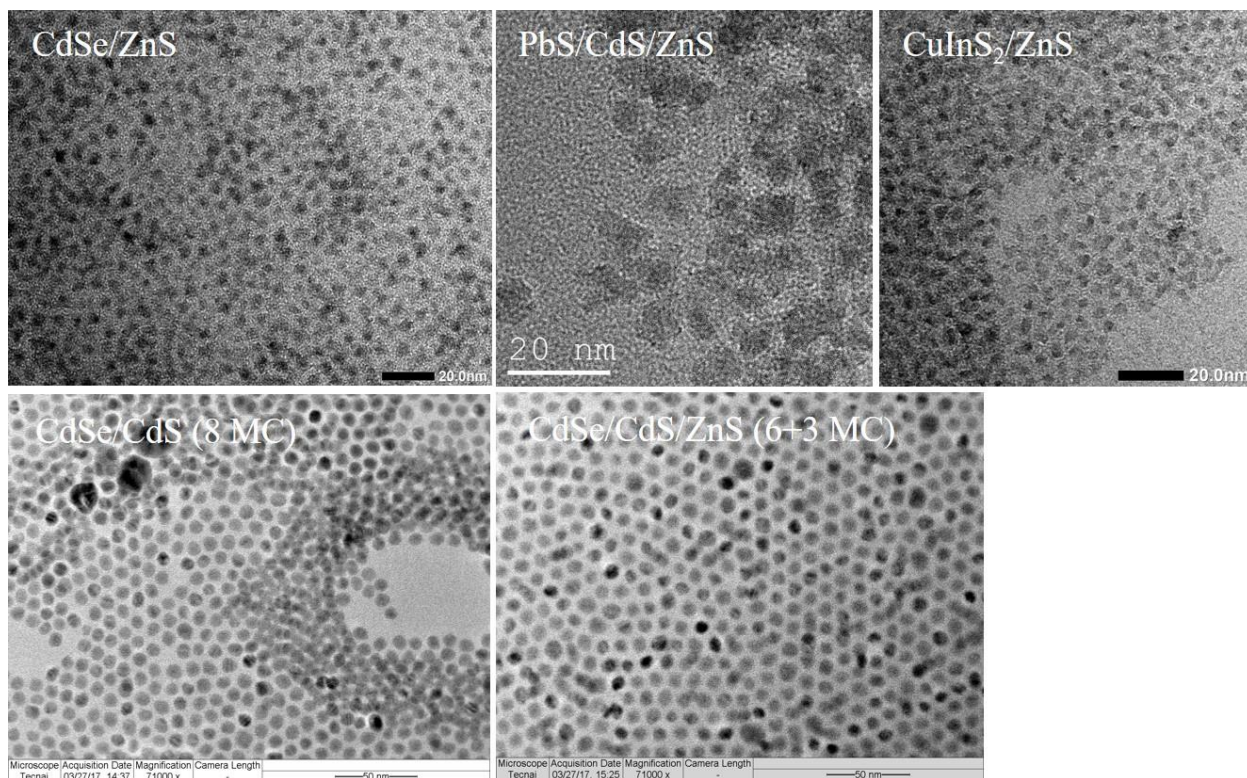


Рисунок 4 – Анализ структуры синтетических КТ с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии

3.1.2 Солюбилизация и характеристика полученных квантовых точек

На первом этапе солюбилизации КТ использовали низкомолекулярный тиол-содержащий лиганд DL-цистеин [188], так как данное соединение позволяет эффективно перевести КТ из органической в водную фазу путем реакции лигандного замещения органических консервантов, адсорбированных на поверхности КТ после синтеза, и обеспечивает коллоидную стабильность препаратов КТ как минимум в течение нескольких дней, что значительно упрощает процесс дальнейшей модификации поверхности КТ. Так как было необходимо получить гомогенные высокостабильные препараты КТ с различным поверхностным зарядом, для дальнейшей модификации поверхности цистенированных КТ использовали низкомолекулярные тиол-содержащие производные PEG. Подобный подход обусловлен хорошей биосовместимостью производных PEG, а также их способностью длительно поддерживать коллоидную стабильность КТ в

биологических средах. Производные PEG содержали на одном конце гидроксильную, карбоксильную или аминогруппу, а на другом конце алифатическую цепь, остов которой состоит из одиннадцати атомов углерода и заканчивается SH-группой для вытеснения молекул цистеина с поверхности КТ: HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH/COOH/NH₂. Гидрофобная алифатическая цепь лиганда при этом создает дополнительную плотную оболочку вокруг КТ, что позволяет сохранять их коллоидную стабильность в течение длительного времени. Данный подход позволил получить прежде всего серию КТ CdSe/ZnS, в которой КТ различаются только зарядом поверхности: КТ с положительным (органическая оболочка состоит из смеси 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH и 30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-NH₂, далее по тексту КТ с этой органической оболочкой для краткости будут называться CdSe/ZnS-PEG-NH₂), слабо отрицательным (в случае использования 100% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, далее по тексту CdSe/ZnS-PEG-OH), и отрицательным (в случае использования 70% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH и 30% HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OCH₂-COOH, далее по тексту CdSe/ZnS-PEG-COOH) поверхностными зарядами. Все остальные типы КТ были модифицированы с помощью производного PEG с концевой гидроксильной группой (далее по тексту она обозначается PEG-OH) для создания серий КТ, различающихся по химическому составу ядра и по размеру. Учитывая, что для характеристики размера КТ, модифицированных производными PEG, не совсем корректно использовать размер полученный суммированием их диаметра и толщины органической оболочки, далее по тексту мы будем под их размером понимать ГДД, определенный методом динамического светорассеяния. Размеры КТ различных типов после их модификации, а также поверхностные заряды всех использованных при проведении данной работы КТ, приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Гидродинамический диаметр и поверхностный заряд использованных в работе 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 МС)-PEG-OH	26,48±0,92	-8,88±1,87
4	CdSe/CdS (8 МС)-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

Стоит отметить, что модификация поверхности КТ существенно повысила их коллоидную стабильность, которая оценивалась 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. Поверхностный заряд и ГДД КТ определяли методом электрофоретической подвижности с использованием эффекта Доплера и методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS соответственно (рисунок 5).

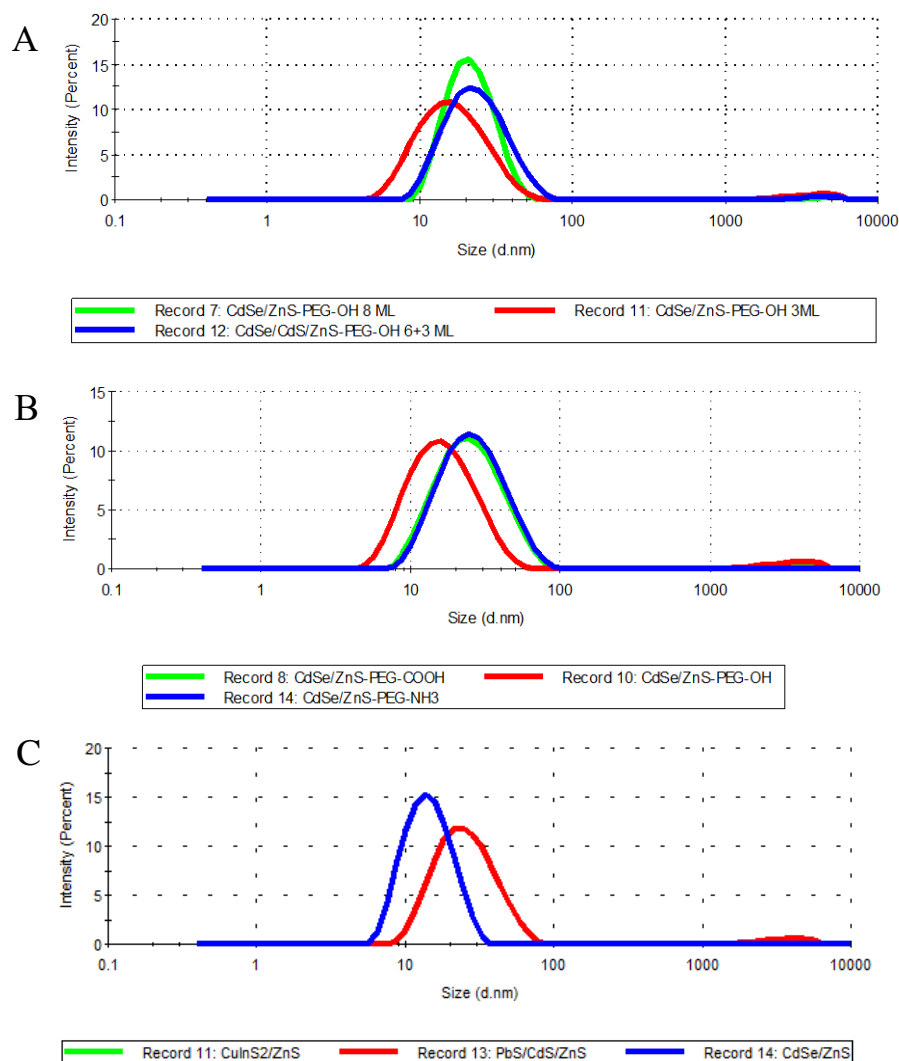


Рисунок 5 – Определение гидродинамического диаметра квантовых точек (КТ) с помощью метода динамического светорассеяния. А – для КТ с различной структурой неорганической оболочки; В – для КТ с различной структурой органической оболочки; С – для КТ- PEG-OH с различной структурой ядра

Спектры флуоресценции препаратов водорастворимых КТ CdSe/ZnS, CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС), CdSe/CdS (8 МС), CuInS₂/ZnS измеренные при помощи спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse, а для препарата водорастворимых КТ состава PbS/CdS/ZnS при помощи спектрометра AvaSpec-NIR256-1.7, представлены на рисунке 6.

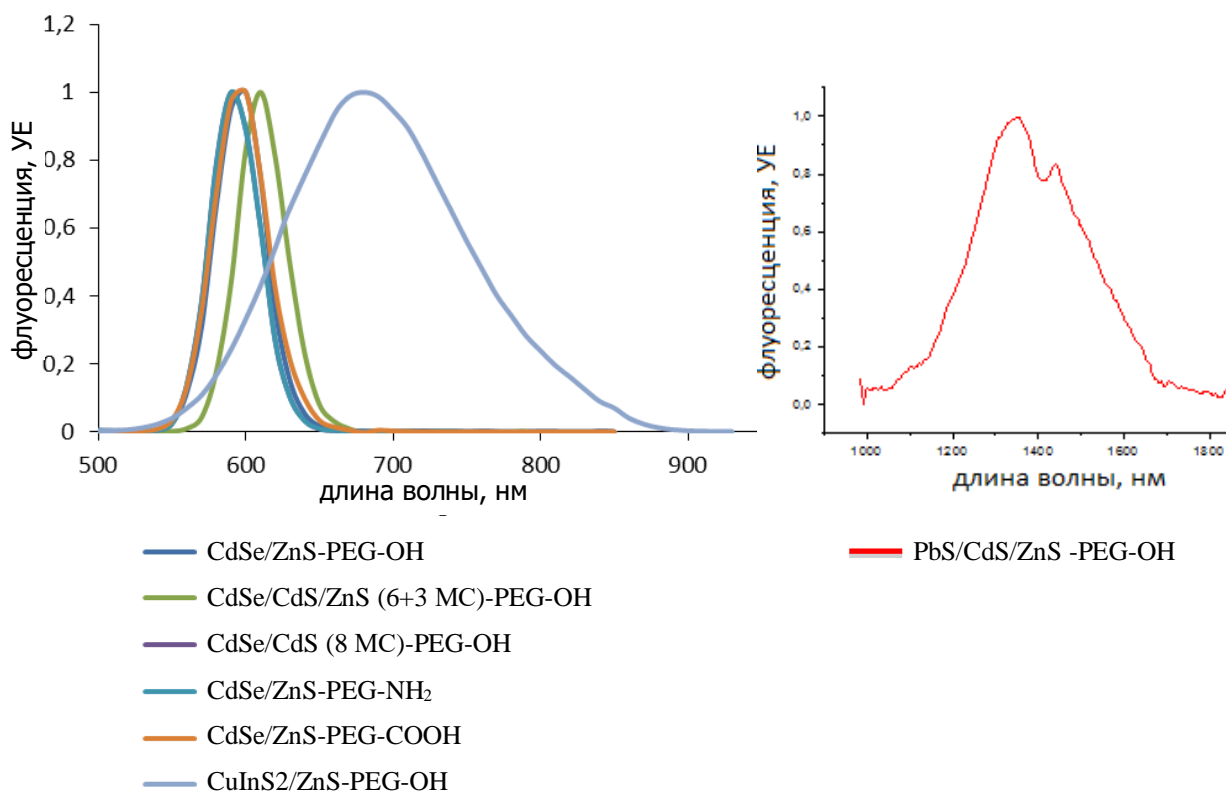


Рисунок 6 – Спектры флуоресценции квантовых точек, модифицированных производными полиэтиленгликоля

Также, стоит отметить, что узкие пики флуоресценции КТ, наряду с небольшим (не более 5%) разбросом размеров КТ, говорят о высокой гомогенности свойств синтезированных КТ. Всего для проведения экспериментальной работы лоты различных препаратов КТ с модифицированной поверхностью готовили 5 раз. При этом детальная характеристика лотов КТ (контроль оптических свойств, измерение ГДД и анализ поверхностного заряда) проводилась для каждой партии КТ и не выявила расхождения в свойствах КТ из различных партий. 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.

3.2 Оценка цитотоксичности квантовых точек *in vitro*

Исследование цитотоксичности КТ на моделях *in vitro* является более простым и дешевым методологическим подходом, чем исследования с использованием лабораторных животных, хотя и в меньшей степени отражают возможные риски, связанные с использованием наноматериалов. Однако несмотря на то, что только *in vivo* модели могут ответить на вопросы о распределении, накоплении и выведении КТ, а также на вопросы их токсичности для систем органов и тканей, изучение токсического воздействия в отношении клеточных линий необходимо для первичного скрининга исследуемых веществ и оценки наличия или отсутствия повреждающего клетки эффекта.

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. Известно, что из-за быстрого роста и, соответственно, более интенсивного метаболизма скорость транспорта веществ в опухолевую клетку выше, чем в нормальную. Кроме того, из-за более интенсивного гликолиза [78] в опухолевых клетках может отличаться значение рН, что будет влиять на стабильность КТ и их поверхностный заряд из-за протонирования или депротонирования лигандов на поверхности КТ. Поверхностный заряд мембраны опухолевых и нормальных клеток также может отличаться за счет того, что мембрана опухолевых клеток содержит больше отрицательно заряженных липидов, и это тоже будет влиять на эффективность взаимодействия КТ с клетками [39].

3.2.1 Зависимость цитотоксичности квантовых точек *in vitro* от их гидродинамического диаметра

Для проведения экспериментов 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 МС)-PEG-OH и препаратов КТ CdSe/CdS (8 МС)-PEG-OH составляло около 26 нм. При этом ζ -потенциал больших по размеру КТ находился в диапазоне от -9 до -11 мВ и его можно считать сходным для исследуемых препаратов КТ, а для препаратов КТ, имеющих диаметр 17 нм, ζ -потенциал составлял – 5 мВ. Зависимость цитотоксичности КТ от их ГДД, исследованная с использованием клеток линий SK-BR-3 и Wi-38 показана на рисунках 7 и 8 соответственно. На основании полученных данных для каждого типа КТ были рассчитаны значения ИК₅₀, которые приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Зависимость ИК₅₀ квантовых точек от их гидродинамического диаметра для клеток линии нормальных фибробластов человека Wi-38 и клеток линии аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3

Время, час	Тип КТ	SK-BR-3		Wi-38	
		ИК ₅₀ , мг/мл	СО*	ИК ₅₀ , мг/мл	СО*
24	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,044	0,025	0,044	0,005
	CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС)- PEG-OH	0,058	0,003	0,108	0,004
	CdSe/CdS (8 МС)-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+3 МС)- PEG-OH	0,046	0,001	0,056	0,009
	CdSe/CdS (8 МС)-PEG-OH	0,035	0,002	0,046	0,002

* - Стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов.

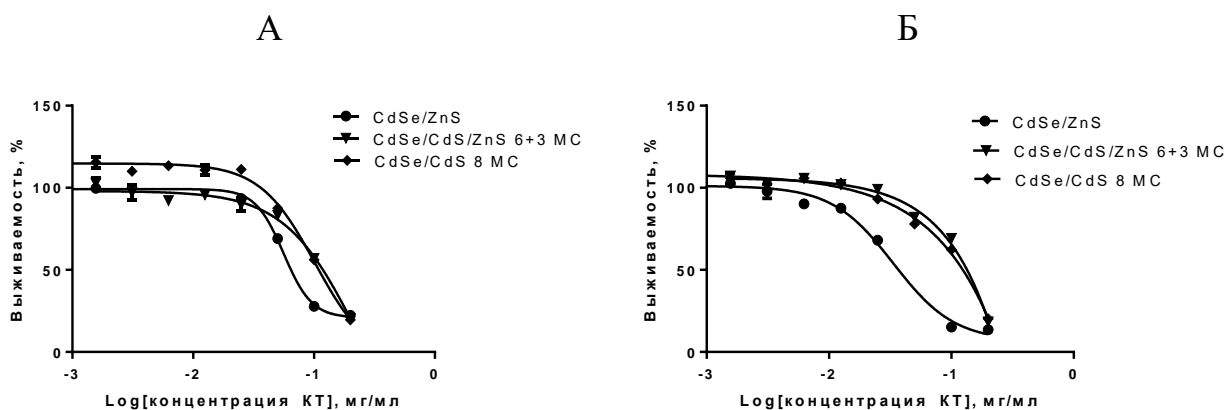


Рисунок 7 – Зависимость выживаемости клеток SK-BR-3 при их взаимодействии с квантовыми точками CdSe/ZnS-PEG-OH, CdSe/CdS/ZnS (6+3 MC)- PEG-OH, CdSe/CdS (8 MC) PEG-OH в течение 24 часов (А) и 48 часов (Б)

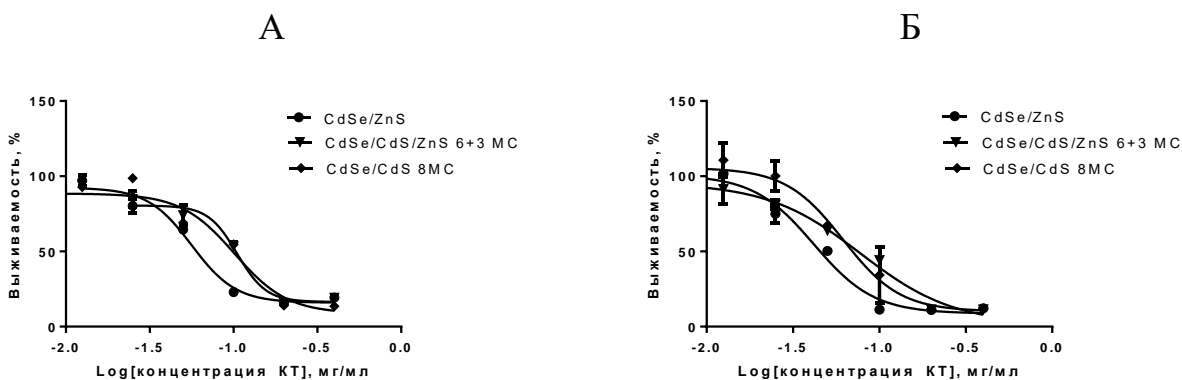


Рисунок 8 – Зависимость выживаемости клеток Wi-38 при их взаимодействии с квантовыми точками CdSe/ZnS-PEG-OH, CdSe/ZnS (6+3 MC)- PEG-OH, CdSe/CdS (8 MC) PEG-OH в течение 24 часов (А) и 48 часов (Б)

Оценка полученных значений ИК₅₀ показывает, что меньшие по размеру CdSe/ZnS-PEG-OH КТ являются более токсичными для любого из тестированных типов клеток, чем большие по размеру КТ. Известно, что при попадании в культуральную среду с клетками КТ могут взаимодействовать с компонентами среды. Образование стабильных комплексов КТ и белков

среды может способствовать активному (рецептор-зависимому) и пассивному транспорту КТ [168]. При этом размер и поверхностные свойства КТ определяют профиль и конформационное состояние белков в составе сложных комплексов, что также влияет на эффективность трансмембранного и внутриклеточного транспорта. КТ проникают в клетку по механизмам фаго- пино- и макропиноцитоза, эффективность которых обратно пропорциональна размеру транспортируемых частиц [185]. При прохождении через мембрану КТ большего размера вероятность необратимого повреждения мембраны выше, чем при прохождении меньших по размеру КТ. Это объясняет тот факт, почему опухолевые клетки более чувствительны к КТ большего размера, так как из-за активного метаболизма транспорт у них работает быстрее, чем у нормальных клеток [54], что вызывает гибель клеток из-за повреждения целостности мембраны. При этом для всех типов клеток, токсичность КТ малого размера выше в силу того, что они лучше проникают в клетку путем неспецифического транспорта, и вызывают гибель клеток в основном за счет окисления клеточных компонентов, а не за счет нарушения целостности клеточной мембраны. Кроме того, более эффективный транспорт КТ малого размера в клетку подтверждается нашими экспериментами по изучению накопления КТ в клетках (раздел 3.2.4), из которого видно, что КТ с ГДД порядка 17 нм быстрее проникают через клеточную мембрану, чем более крупные КТ. Кроме того, стоит отметить, что клетки любого типа более устойчивы к повреждению целостности мембраны, чем к окислительному разрушению клеточных компонентов. При более продолжительном культивировании в течение 48 часов (Рисунки 7Б и 8Б) по сравнению с культивированием в течение 24 часов (Рисунки 7А и 8А) цитотоксичность КТ повышается, а разница в цитотоксичности КТ для опухолевых и нормальных клеток снижается, что может свидетельствовать о внутриклеточном накоплении исследуемых препаратов КТ при длительных инкубациях.

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. Результаты исследования зависимости цитотоксичности КТ от их поверхностного заряда для клеток линий SK-BR-3 и Wi-38 приведены на рисунках 9 и 10, соответственно. На основании полученных данных для каждого типа КТ были рассчитаны значения ИК₅₀, которые приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Зависимость ИК₅₀ квантовых точек от их поверхностного заряда для клеток линии нормальных фибробластов человека Wi-38 и клеток линии аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3

Время, час	Тип КТ	SK-BR-3		Wi-38	
		ИК ₅₀ , мг/мл	CO*	ИК ₅₀ , мг/мл	CO*
24	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,044	0,025	0,044	0,004
	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

* - Стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов.

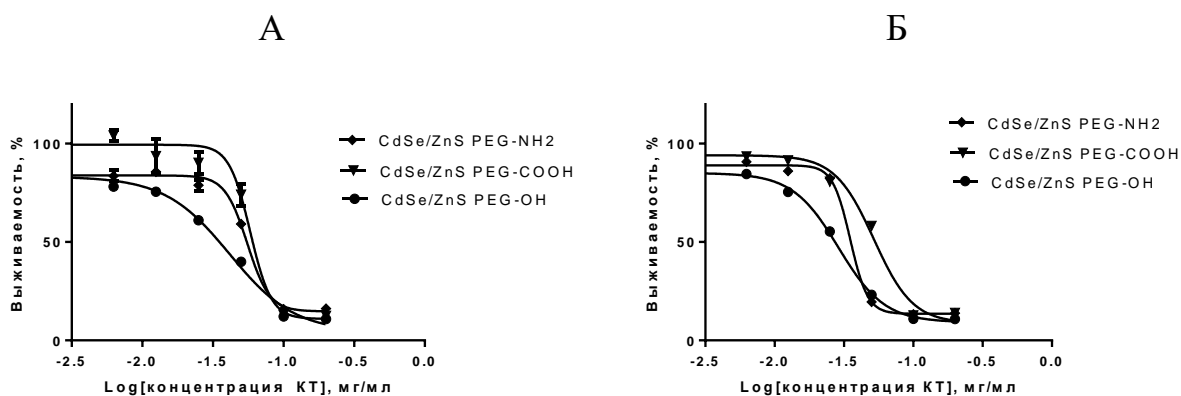


Рисунок 9 - Зависимость выживаемости клеток SK-BR-3 при их взаимодействии с квантовыми точками CdSe/ZnS-PEG-OH, CdSe/ZnS-PEG-COOH, CdSe/ZnS-PEG-NH₂ в течение 24 часов (А) и 48 часов (Б)

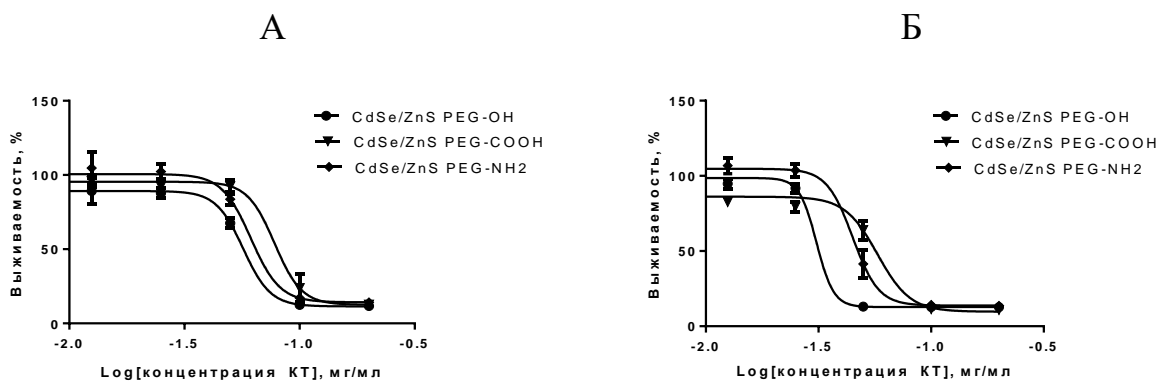


Рисунок 10 – Зависимость выживаемости клеток Wi-38 при их взаимодействии с квантовыми точками CdSe/ZnS-PEG-OH, CdSe/ZnS-PEG-COOH, CdSe/ZnS-PEG-NH₂ в течение 24 часов (А) и 48 часов (Б)

Наиболее токсичными для обоих типов клеток оказались слабо отрицательно заряженные КТ, в то время как отрицательно заряженные КТ были наименее токсичны. Очевидно, что заряд поверхности КТ влияет на эффективность их транспорта через клеточную мембрану, а также на их взаимодействие с клеточными компонентами. Причем физико-химические и реактивные свойства поверхностных лигандов, которыми достигается различный поверхностный заряд, также вносят большой вклад в

эффективность транспорта [65]. Заряд КТ очень индивидуально влияет на их токсичность, так для некоторых типов клеток наблюдается повышенная чувствительность к положительно заряженным КТ [109], а другие наоборот более подвержены воздействию отрицательно заряженных КТ [82]. Наши измерения показали, что наиболее токсичными являются КТ со слабым отрицательным зарядом поверхности, причем как для нормальных, так и для раковых клеток. 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 компонентами клетки. При этом длительная инкубация клеток с КТ в течение 48 часов (рисунки 9Б и 10Б) показывает пропорциональное уменьшение ИК₅₀ для каждого из видов КТ по сравнению с аналогичными значениями ИК₅₀ при инкубации в течении 24 часов (рисунки 9А и 10А), 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 цитотоксичности КТ от их химического состава исследовали с использованием серии КТ структуры ядро/оболочка с различным химическим составом ядра и оболочкой из ZnS. Поверхность всех типов, исследуемых КТ была функционализирована PEG-OH. Были исследованы КТ с ядром на основе тяжелых металлов (Cd и Pb), а также с ядром состава CuInS₂. Поверхностный заряд всех исследованных препаратов КТ имел слабо-отрицательные значения и находился в диапазоне от -6 до -10 мВ, то есть был сходным в пределах погрешности измерений. При этом ГДД препаратов КТ, имеющих ядра на основе Cu и Cd практически совпадал и был равен 16 нм, а ГДД препаратов КТ с ядром на основе Pb был вдвое больше и составлял 32 нм.

Результаты исследования зависимости цитотоксичности КТ от химического состава их ядра для клеток линий SK-BR-3 и Wi-38 показаны на рисунках 11 и 12 соответственно. На основании полученных данных для каждого типа КТ были рассчитаны значения ИК₅₀, которые приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Зависимость ИК₅₀ квантовых точек от химического состава их ядра для клеток линии нормальных фибробластов человека Wi-38 и клеток линии аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3

Время, час	Использованные КТ	SK-BR-3		Wi-38	
		ИК ₅₀ , мг/мл	CO*	ИК ₅₀ , мг/мл	CO
24	CdSe/ZnS-PEG-OH	0,044	0,025	0,044	0,003
	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, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов

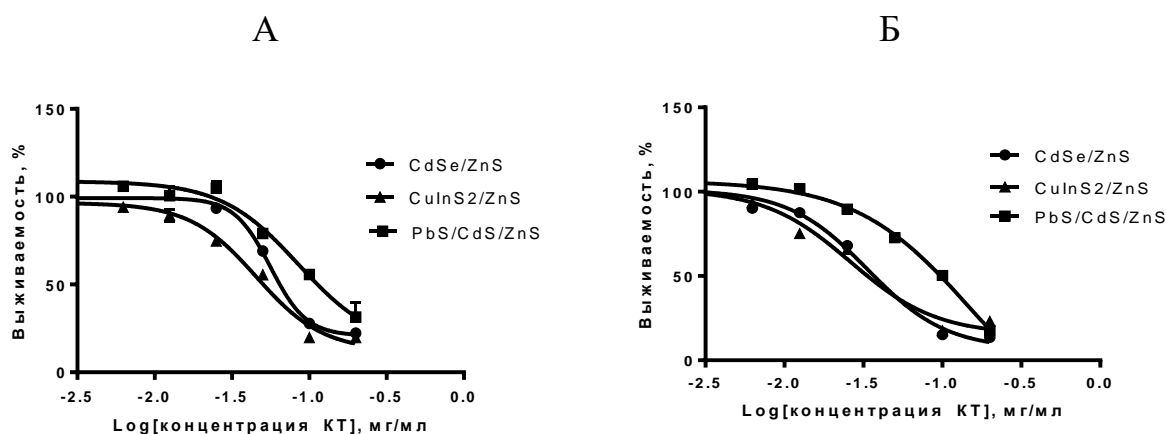


Рисунок 11 – Зависимость выживаемости клеток SK-BR-3 при их взаимодействии с квантовыми точками CdSe/ZnS, PbS/CdS/ZnS, CuInS₂/ZnS в течение 24 часов (А) и 48 часов (Б)

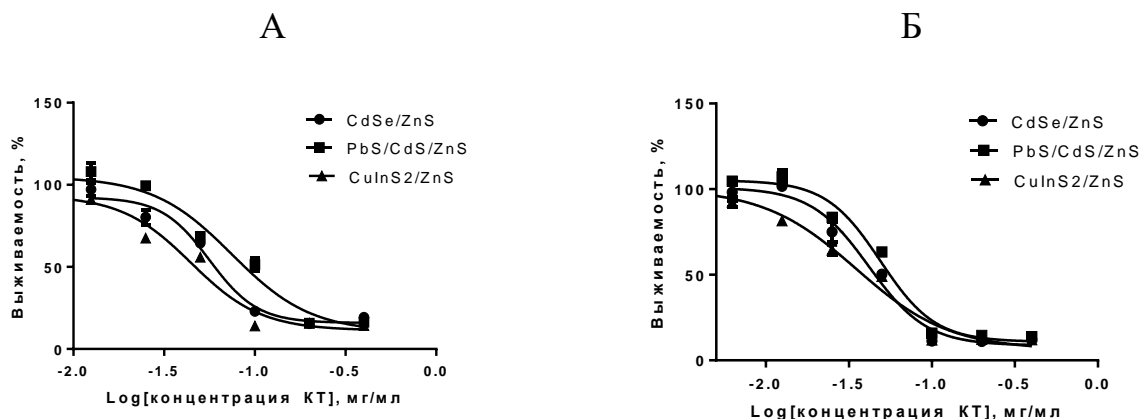


Рисунок 12 – Зависимость выживаемости клеток Wi-38 при их взаимодействии с квантовыми точками CdSe/ZnS, PbS/CdS/ZnS, CuInS₂/ZnS в течение 24 часов (А) и 48 часов (Б)

Как показывают результаты, приведенные в таблице 9 и на рисунках 11 и 12, 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 [158]. 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 (рисунки 11А, 11Б, 12А, 12Б). Цитотоксичность препаратов КТ с ядром на основе Pb и оболочками из CdS и ZnS, спустя 24 часов инкубации ниже, чем у двух других типов, исследованных КТ, что может быть обусловлено существенно большим ГДД КТ этого типа. При этом выявлено, что после 48 часов инкубации значение ИК₅₀ свинцовых КТ для опухолевых клеток становится сравнимым с ИК₅₀ кадмиевых и медных КТ, тогда как

значение IK_{50} свинцовых КТ для клеток с нормальным метаболизмом остается намного более высоким по сравнению с двумя другими типами исследованных КТ. Данные результаты могут свидетельствовать о более высокой скорости трансмембранного транспорта КТ большого размера опухолевыми клетками. Из полученных данных можно сделать вывод, что при исследовании зависимости цитотоксичности КТ сходного размера от химического состава их ядра, разница практически не наблюдается, что обусловлено тем, что в условиях *in vitro* культивирования не создаются условия для деградации КТ. Таким образом, различие цитотоксических эффектов КТ, в большей степени, обусловлено различием размеров, исследованных КТ.

3.2.4 Оценка взаимодействия квантовых точек с клетками *in vitro*

Для изучения проникновения и накопления препаратов КТ в клетки были выбраны КТ с одинаковым химическим составом, но отличающиеся по своему ГДД и поверхностному заряду: CdSe/CdS/ZnS (6+3 МС)-PEG-OH, CdSe/CdS (8 МС)-PEG-OH, CdSe/ZnS-PEG-OH, CdSe/ZnS-PEG-COOH, CdSe/ZnS-PEG-NH₂. Исследования проводились на клетках линии аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, так как опухолевые клетки обладают большей скоростью внутриклеточного транспорта. Клетки исследовали через 24, 48 и 72 часа после добавления препаратов КТ различного типа. На рисунке 13 представлена диаграмма накопления КТ внутри клеток, построенная по расчету интегральной интенсивности флуоресценции, нормированной на количество клеток. Полученные результаты показывают, что положительно заряженные КТ, несмотря на их больший ГДД, эффективнее всего проникают через клеточную мембрану уже через 24 часа после инкубации с клетками. Это обусловлено тем, что положительно заряженные КТ лучше проникают через отрицательно заряженную клеточную мембрану, а также могут проходить через ядерную мембрану и эффективно взаимодействовать с отрицательно заряженным

сахаро-фосфатным остовом ДНК. При этом показано, что спустя 48 и 72 часа инкубации клеток в присутствии КТ наиболее эффективно в клетку проникают КТ с меньшим ГДД, что снова подтверждает вывод о том, что наибольшей цитотоксичностью для клеток *in vitro* обладают положительно заряженные КТ с малым ГДД.

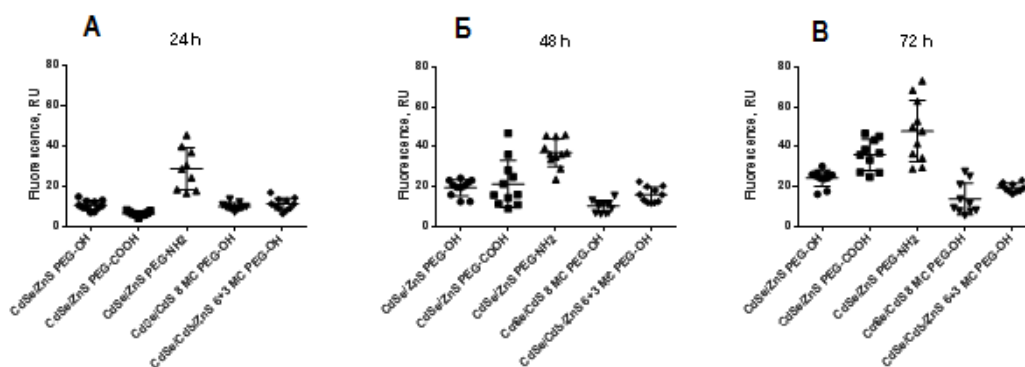


Рисунок 13 – Зависимость интенсивности флуоресценции клеток SK-BR-3, инкубированных с квантовыми точками различных размеров и зарядов в течение 24 (А), 48 (Б) и 72 (В) часов

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

КТ могут использоваться не только для биологической визуализации, но и выступать в качестве лекарственных препаратов, например, в фотодинамической терапии [165] или для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера или рассеянный склероз [113]. Так Xiao и соавторы [197] в своей работе приводят данные о том, что КТ состава CdTe, покрытые N-ацетил-L-цистеином, ингибируют процесс фибрилляции β -амилоидного пептида, что может использоваться для терапии болезни Альцгеймера. Изучение научной литературы показало, что в зависимости от типа и структуры белка, соотношения количества белков и КТ, условий культивирования, а также физико-химических свойств КТ они могут оказывать совершенно различное воздействие на процесс образования амилоидных белковых структур - от его индукции, до ингибирования

данного процесса [104, 119]. Таким образом, безопасность применения НК в биотехнологических приложениях, а также безопасность использования НК для создания фармацевтических препаратов можно тестировать даже на молекулярном уровне, например, по оценке индукции ими процесса образования амилоидных агрегатов целевых белков.

Инсулин человека является удобным модельным объектом для исследования протеопатий различного рода, а так как он участвует во многих биологических процессах, то изучение образования патологических амилоидных структур инсулина может помочь понять молекулярный эффект проявления токсичности КТ в опытах *in vivo*. Известно, что *in vivo* токсичность амилоидных агрегатов препаратов инсулина может проявляться в снижении эффективности терапии диабета второго типа или вызывать расстройства других органов, а также приводить к генерации свободных форм кислорода, морфологическим изменениям, снижать жизнеспособность клеток и приводить к апоптозу [80]. В работе Okamura и соавторов [135] было показано, что у больных диабетом второго типа, в местах введения инсулина образовывались амилоидные фибриллы, что значительно снижало эффективность инсулиновой терапии, а некоторых случаях вообще приводило к потере чувствительности к инъекциям инсулина.

В нашей предыдущей работе [178] было показано, что КТ состава CdSe/ZnS-PEG-OH индуцируют образование амилоидных фибрилл и метастабильных агрегатов рекомбинантного инсулина человека. Данные по изменению структуры инсулина в присутствии КТ были получены с помощью метода циркулярного дихроизма, чувствительному к образованию β -складчатых листов в структуре белковых молекул, а также с использованием специфичного для амилоидных структур красителя ThT. Было показано, что в течение 24 часов инкубации реакционных смесей инсулина и КТ происходит образование амилоидных фибрилл с преимущественно β -складчатой структурой. Поскольку образование амилоидных структур инсулина вследствие его взаимодействия с КТ

является проявлением молекулярной токсичности КТ, в диссертационной работе нами были исследованы динамика и механизм этого процесса.

На первом этапе работы были проведены контрольные эксперименты по изучению кинетики образования фибрилл инсулина с помощью флуоресцентного красителя ThT при различных температурах в натрий-фосфатном буфере (рН 7,2), при этом в реакционные смеси содержали 2 мг/мл рекомбинантного инсулина человека и 3,44 мкМ препарата КТ CdSe/ZnS-PEG-OH (Рисунок 14). Из полученных данных видно, что с повышением температуры процесс амилоидизации инсулина происходит более интенсивно. Следует заметить, что процесс образования амилоидных структур инсулина в физиологических условиях происходит исключительно в присутствии КТ данного типа, тогда как чистый инсулин может претерпевать конформационные изменения подобного рода исключительно при низких значениях рН [134].

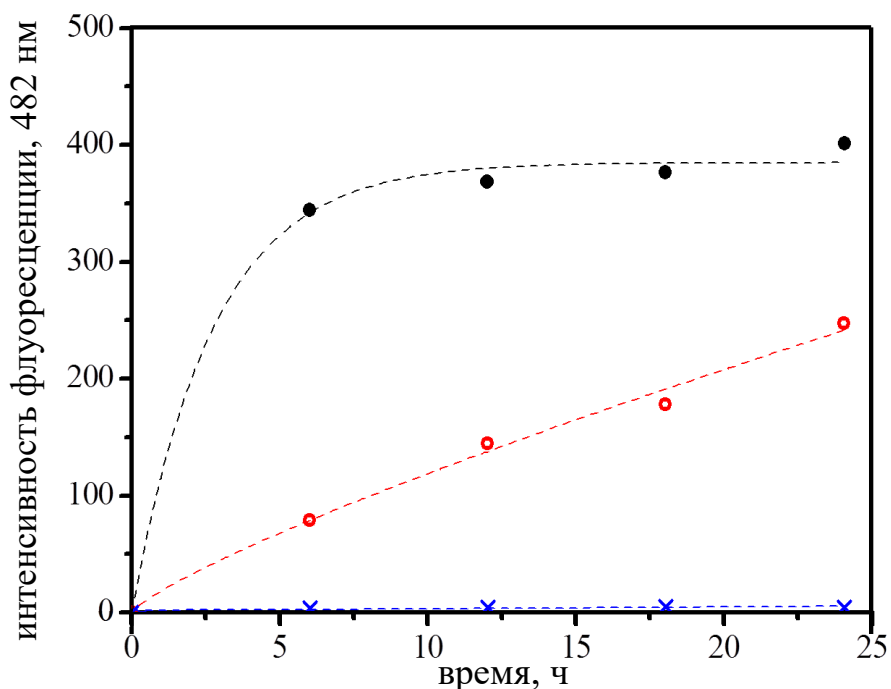


Рисунок 14 – Кинетика образования амилоидных структур инсулина в присутствии квантовых точек с помощью флуоресцентного красителя тиофлавина Т при температуре 50 °C (черная кривая), 37 °C (красная кривая) и 25 °C (синяя кривая)

Так как ThT является высокоспецифичным флуоресцентным красителем для детекции наличия амилоидных структур и позволяет оценить только факт их наличия, оценку динамики их роста и размер изучали с помощью метода динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS. Для этого реакционную смесь инсулин/КТ инкубировали при pH 7.0 и температуре 37 °C. В результате было показано, что в течение 6 часов происходит изменение ГДД смеси инсулина/КТ с $12,56 \pm 0,14$ нм до 3787 ± 141 нм. Кроме того, при инкубации инсулина с КТ с отличающимся поверхностным зарядом (CdS/ZnS-PEG-COOH и CdS/ZnS-PEG-NH₂) значительного изменения ГДД, и, как следствие, образование амилоидных структур инсулина, обнаружено не было в соответствии с ранее полученными данными.

После проведения контрольных экспериментов, подтверждающих образование амилоидных структур инсулина в присутствии КТ в данных экспериментальных условиях, нами был проведен анализ структурных особенностей и кинетики образования амилоидных фибрилл при помощи высокоскоростной АСМ. Преимущество данного метода заключается в том, что он позволяет наблюдать за процессом образования фибрилл и наблюдать их структурные изменения в определенные временные промежутки, а использование полуконтактного режима сканирования позволяет детально исследовать процесс амилоидизации и дать новое понимание механизму образования фибрилл и их топологии. На рисунке 15 представлены изображения, полученные при помощи АСМ, из которых видно, что в контрольных образцах при условии отсутствия КТ, а именно: в растворе инсулина в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,2) (рисунок 15 а, d) и смеси инсулина и лиганда-модификатора поверхности КТ в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,2) (рисунок 15 b, e) не образуется фибрилл или агрегатов белка, из чего можно сделать вывод, что образование амилоидных фибрилл инсулина происходит именно вследствие взаимодействия белка с

КТ. Отдельно исследованный контрольный препарат КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в 10мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,2) в отсутствие инсулина также не образует агрегатов (рисунок 15 с, f) за все время наблюдения. Кроме того, нами было показано, что контрольная инкубация КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в 10мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,2) при температуре 37 °С не приводит к агрегации КТ, что говорит о высокой коллоидной стабильности препаратов КТ, используемых для исследования. При увеличении времени инкубации контрольных препаратов до 6 часов были получены идентичные результаты.

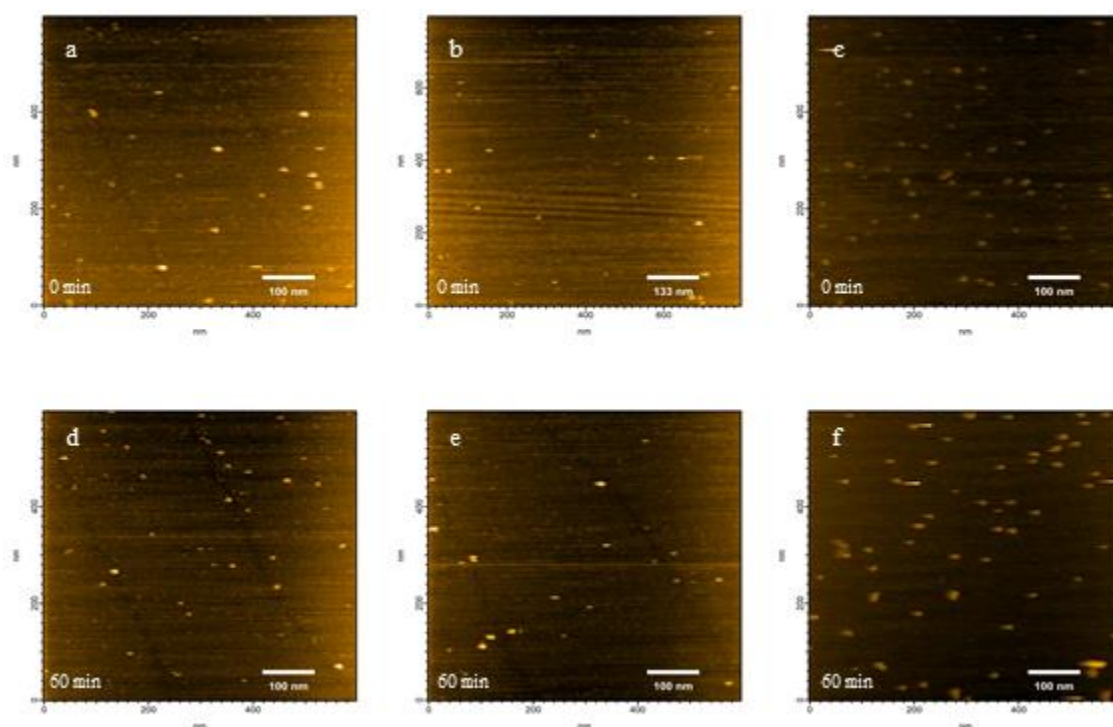


Рисунок 15 – Исследование контрольных препаратов с помощью атомно-силовой микроскопии. а, d – молекулы инсулина в буфере в момент времени 0 и 60 минут соответственно; b, e – молекулы инсулина в буфере с PEG в момент времени 0 и 60 минут соответственно; c, f – КТ CdSe/ZnS-S-PEG-OH в буфере в момент времени 0 и 60 минут соответственно.

Результаты исследования процесса индукции и кинетики роста амилоидных фибрилл инсулина с помощью АСМ при инкубации реакционной смеси инсулин/КТ показаны на рисунке 16. В начальный момент времени и спустя 30 минут после начала совместной инкубации

инсулина и КТ в экспериментальном образце процесса фибрилляции не наблюдалось, при этом инсулин оставался в форме мономеров размером $18,4 \pm 4,6$ нм (рисунок 16 а, б). Отсутствие роста на начальном этапе хорошо согласуется с процессом роста фибрилл белков [152] и в нашем случае скорее всего соответствует процессу, когда инсулин претерпевает структурные изменения при взаимодействии с поверхностью КТ и образованию центров роста фибрилл. Через час после начала инкубации мономеров инсулина с КТ отмечается начало процесса формирования протофибрилл инсулина длиной $22,4 \pm 4,5$ нм (рисунок 16 с), а ещё через час отмечается существенное увеличение протофибрилл инсулина в размерах до $51,7 \pm 9,0$ нм (рисунок 16 d). Исходя из полученных результатов можно сделать предположение о том, что взаимодействие молекул инсулина с поверхностью КТ индуцирует конформационную нестабильность молекулы белка, что вероятно приводит к необратимым переходам α -спиралей в β -складчатые структуры, то есть к типичным конформационным превращениям, ведущим к образованию амилоидных агрегатов. Такие конформационные изменения могут приводить к тому, что на поверхности комплексов КТ/инсулин появляются экспонированные участки, богатые β -складчатыми структурами, которые начинают взаимодействовать с другими молекулами инсулина с образованием протофибрилл. На рисунках 16с и 16d хорошо видны не только растущие протофибриллы инсулина, но и небольшие сферические частицы, состоящие из нескольких десятков молекул инсулина. В течение последующих двух часов процесс амилоидизации продолжался, и размер фибрилл увеличился до $133,6 \pm 17,6$ нм (рисунок 16 е), что свидетельствует о высокой скорости процесса их образования. За последние два часа наблюдения в рабочем образце, содержащем смесь КТ CdSe/ZnS-S-PEG-OH и инсулина отмечается образование крупных фибрилл, финальную длину которых измерить с помощью АСМ затруднительно вследствие их сворачивания в довольно крупные структуры (рисунок 16 f).

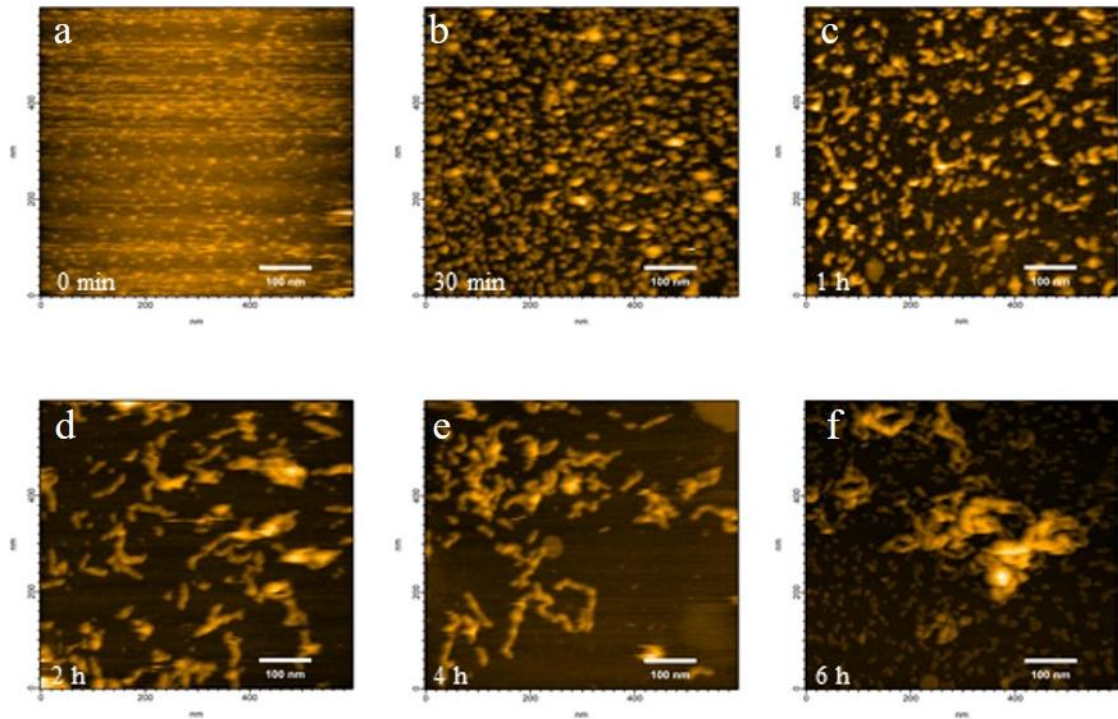


Рисунок 16 – Исследование динамики процесса образования амилоидных фибрилл инсулина в физиологических условиях в присутствии квантовых точек CdSe/ZnS-PEG-OH с помощью атомно-силовой микроскопии

Стоит отметить, что в первые 4 часа процесс образования амилоидных протофибрилл инсулина и увеличения их длины носит экспоненциальный характер (Рисунок 17), однако после 4 часов инкубирования процесс начинает происходить более стремительно, что может быть объяснено взаимодействием протофибрилл между собой с образованием более сложных по своей структуре амилоидных фибрилл.

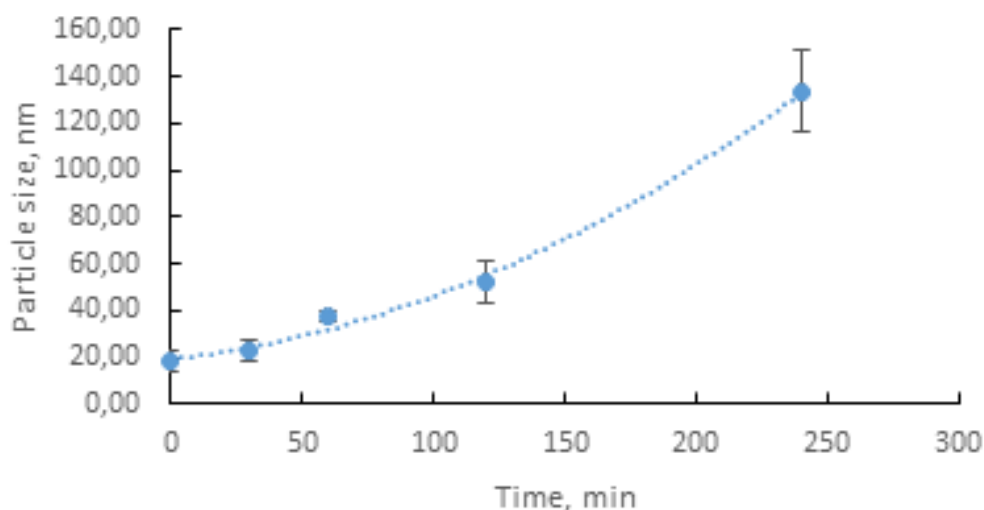


Рисунок 17 – Кинетика роста размеров амилоидных фибрилл инсулина при его инкубации с КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в течение первых 4 часов

Литературные данные показывают, что процесс образования амилоидных структур включает в себя несколько стадий [99]: первичное возникновение центра индукции образования фибрилл, олигомеризацию, образование протофибрилл и непосредственно образование амилоидных фибрилл. На данный момент известно, что взаимодействие НК с некоторыми белками способно вызывать ускорение процесса образования амилоидных структур [104] или, напротив, его ингибирование [100]. Данный эффект воздействия НК на конформацию белков в растворе зависит как от структурных особенностей белка, так и от физико-химических свойств НК, которые определяют механизм взаимодействия белка с НК [34, 100].

Как правило, НК с гидрофобной поверхностью вызывают агрегацию и образование фибрилл [12]. Это происходит из-за абсорбции белковых молекул на поверхности НК, что инициирует образование олигомеров белковых молекул и дальнейшее образование протофибрилл. Это согласуется с данными [91], которые демонстрируют, что карбоновые точки с гидрофобным покрытием также могут вызывать образование амилоидных

структур инсулина. В работе [187] было показано, что КТ CdSe/ZnS, покрытые дигидролипоевой кислотой, индуцируют образование агрегатов амилоидной природы из человеческого сывороточного альбумина, что происходит вследствие встраивания КТ в структуру образующихся фибрилл.

Анализируя полученные экспериментальные данные, можно сделать предположение, что инициацию процесса фибрилляции инсулина могут вызвать не только искусственно синтезированные НК, но и природные нанобъекты, как, например, частички пыли или не до конца растворенные кристаллы химических соединений. Кроме того, этот процесс может индуцироваться при биотехнологическом получении рекомбинантного инсулина, например, на стадии его хроматографической очистки в «downstream» процессе или на этапе производства жидких готовых лекарственных форм инсулина. Тестирование подобных препаратов после выпуска партии с помощью метода динамического светорассеяния или их исследование с помощью ThT позволит детектировать наличие амилоидных структур инсулина в препаратах, что актуально с точки зрения производства и выпуска эффективных лекарственных средств, а также снижения вероятности образования амилоидных фибрилл инсулина после его введения пациенту и образования резистентности к данному виду терапии.

Проведенные нами эксперименты по изучению динамики образования амилоидных структур инсулина в присутствии НК с определенными физико-химическими свойствами показывают, что НК могут проявлять молекулярную токсичность в отношении белков, конформационно стабильных в физиологических условиях, являясь центром инициации образования патологических структур белка. Таким образом, в дальнейшем видится актуальным выяснение основных белковых мишеней, фибриллообразование которых индуцируют НК, и разработка НК со сниженной токсичностью, оказывающих минимальный эффект на белковые молекулы при создании гибридных конструкций в биотехнологических приложениях.

3.4 Оценка токсичности квантовых точек *in vivo*

Так как исследования *in vitro* не могут учитывать распределение и накопление КТ в различных органах и тканях, а также не могут моделировать биологические условия, которые вызывают разрушение и деградацию КТ, то наиболее точные результаты по реальному токсическому воздействию КТ на организм можно получить только в исследованиях *in vivo*. В рамках диссертационной работы нами были определены значения ЛД₅₀ для различных типов КТ, оценена физиологическая реакция лабораторных животных на инъекции препаратов КТ, а также оценено токсическое воздействие КТ на различные органы животных. Подобные эксперименты могут способствовать усовершенствованию стандартов тестирования безопасности биотехнологических продуктов на основе НК.

3.4.1 Оценка острой токсичности квантовых точек *in vivo*

Препараты КТ вводились мышам линии BALB/c в хвостовую вену, после чего в течение суток после введения препаратов КТ тщательно следили за состоянием животных и далее наблюдали за животными на протяжении 15 дней.

Токсичность КТ *in vivo* изучалась для препаратов КТ с различным химическим составом ядра (рисунок 18) и для препаратов КТ с различным поверхностным зарядом (рисунок 19). Исходя из полученных результатов, были рассчитаны значения ЛД₅₀ для всех типов исследованных препаратов КТ (таблица 10).

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 хорошо согласуется с нашими данными по исследованию цитотоксичности *in vitro*. Кроме того, КТ с ядром на основе CuInS₂, также обладают низкой токсичностью по

сравнению с КТ, ядро которых содержит тяжелые металлы. Разница 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.

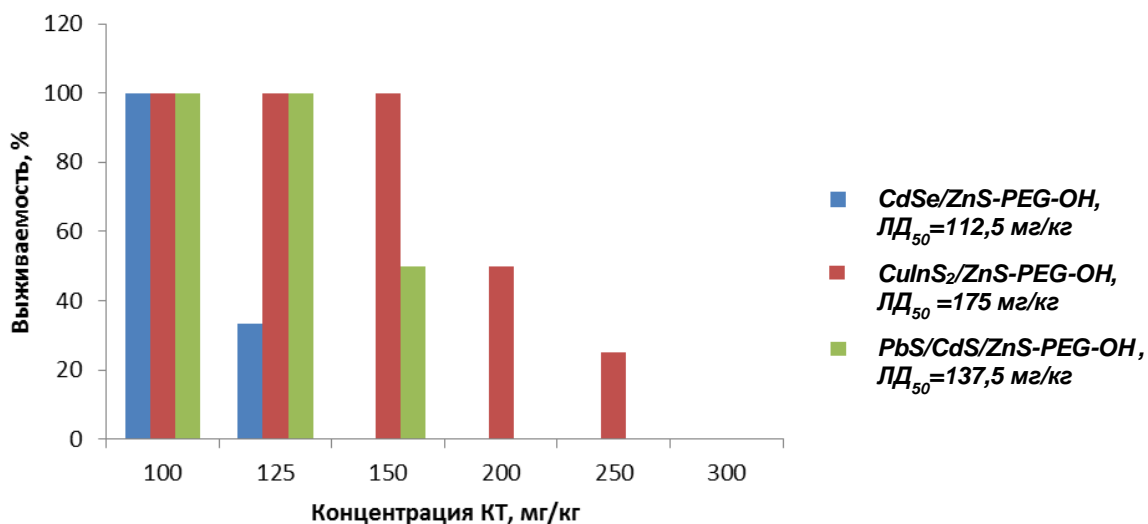


Рисунок 18 – Выживаемость мышей линии BALB/c в зависимости от химического состава ядра и концентрации квантовых точек

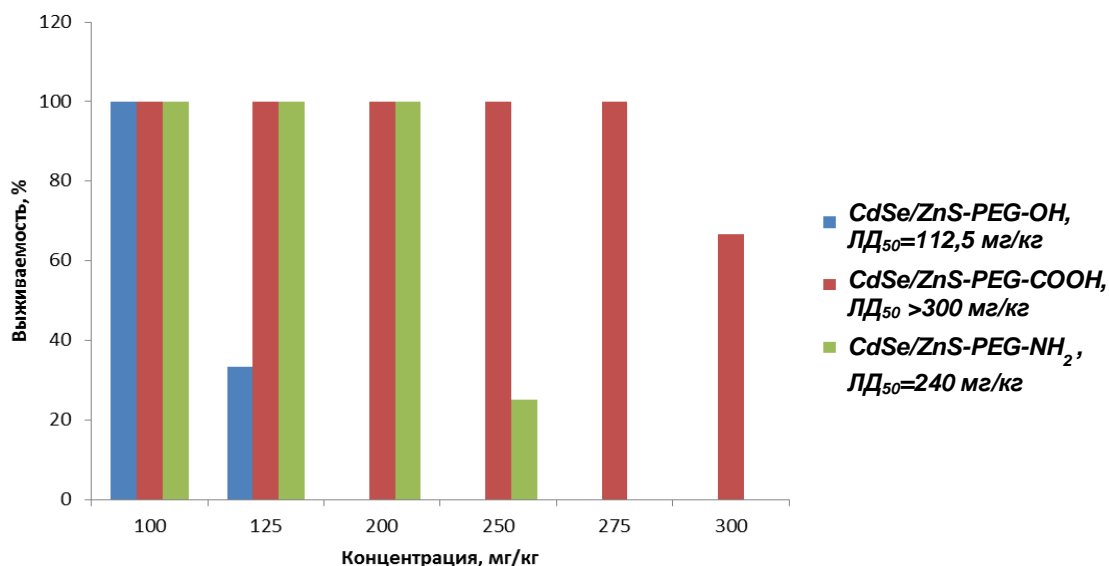


Рисунок 19 – Выживаемость мышей BALB/c в зависимости от заряда и концентрации квантовых точек

Таблица 10 – 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

Кроме того, в опытах по определению ЛД₅₀ КТ было обнаружено, что внутривенные инъекции КТ различного химического состава вызывают различную реакцию у животных. Так, при введении животным КТ CdSe/ZnS и PbS/CdS/ZnS наблюдалось учащение дыхания и сердцебиения, парез конечностей, судорожные рвотные движения и спазмирование хвостовой вены. По прошествии нескольких часов выжившие животные полностью восстанавливались. При введении CuInS₂/ZnS животные в течение 5-10 минут чувствовали себя хорошо, после чего наступал парез конечностей, учащенное поверхностное дыхание и общий паралич. Такие преходящие нарушения могут свидетельствовать об образовании метастабильных агрегатов КТ в крови животных, которые с течением времени резорбируются вследствие опсонизации, адсорбируются не оказывая значительного влияния на физиологию животных, либо, в острых ситуациях, могут приводить к смерти экспериментальных животных. В литературе существуют данные о том, что КТ могут вызывать тромбоз сосудов легких, чем можно объяснить влияние КТ на состояние животных [51]. Механизм действия КТ на образование тромбов на данный момент не известен, однако в вышеупомянутой работе предполагается, что КТ обладают способностью активировать каскад свертывания крови. Другое внешнее проявление действия КТ на организм в случае с КТ CuInS₂/ZnS позволяет предположить, что данные КТ имеют иной механизм токсического действия, вероятно, связанный с их составом, в который входит медь, не являющаяся тяжелым металлом в отличие от свинца и кадмия [151].

Кроме того, стоит отметить, что поверхностный заряд КТ также влияет на их токсичность. Так, наиболее токсичными оказались КТ со слабо-

отрицательным поверхностным зарядом, а наименее токсичны – отрицательно заряженные КТ, что полностью коррелирует с установленной зависимостью для *in vitro* модели. В данном случае наблюдаемый эффект скорее всего обусловлен различием в распределении и накоплении КТ в организме мышей и различиями во взаимодействиях с компонентами биологических жидкостей организма животного. Так, негативно заряженные КТ могут быстро накапливаться в лимфатических узлах [162], а нейтрально заряженные КТ меньше подвержены электростатическому воздействию с белками, что снижает эффективность образования белковой «короны» и ускоряет их деградацию [110].

3.4.2 Оценка отдаленных последствий инъекции квантовых точек *in vivo*

Ввиду того, что функционализированные органическими лигандами КТ обладают высокой стабильностью и могут сохранять свои люминесцентные свойства на протяжении нескольких месяцев, а также имеют склонность к накоплению в селезенке и печени, актуальным является изучение отдаленных последствий однократного введения препаратов КТ. Для этого с использованием мышей линии BALB/c были проведены эксперименты по анализу отдаленных последствий однократного введения препаратов КТ CdSe/ZnS-PEG-OH, CuInS₂/ZnS-PEG-OH, PbS/CdS/ZnS-PEG-OH, различающихся химическим составом ядра. Данные эксперименты могут позволить оценить вероятность токсических эффектов НК, имеющих различную химическую структуру вследствие возможного накопления и деградации НК.

3.4.2.1 Оценка физиологической реакции мышей линии BALB/c на введение квантовых точек

В ходе экспериментов нами была оценена физиологическая составляющая реакции мышей линии BALB/c во времени после однократного введения им препаратов КТ различного химического состава. Результаты оценки физиологических параметров животных приведены в таблице 11.

Токсический эффект КТ наблюдался уже спустя несколько минут после введения животным исследуемых препаратов. Он заключался в нарушении двигательной активности, парезе конечностей, обездвиживании, судорожных движениях, рвотных рефлексах. Стоит отметить, что негативные эффекты на физиологическом уровне после введения КТ проявляются даже в низких дозах (LD_{20}). Проявление воздействия для КТ на основе тяжелых металлов (ядра структуры PbS и CdSe) наступает быстрее чем для КТ, имеющих ядро $CuInS_2$. Время необходимое для реабилитации животных в проведенных экспериментах составляло около 2-3 часов и практически не зависило от дозы КТ, что возможно объясняется тем, что КТ могут быстро выводиться из циркуляции и депонироваться в различных органах мыши, вероятно, преимущественно в селезенке или печени [19, 88]. Тем не менее, стоит отметить, что тяжесть первичной реакции нарастала с увеличением дозы, что говорит о том, что в организме существует множество мишеней, которые по-разному реагируют на различные концентрации КТ.

Таблица 11 – Изучение физиологических проявлений у животных при введении им препаратов квантовых точек различного химического состава

№	КТ	Доза,	Состояние (1-плохое, 5-отличное)	Начало изменения состояния	Двигательная активность	Состояние шерсти, кожных и слизистых покровов	Дыхательная активность	Нормализация состояния
1	Буфер	0	5	Чувствуют себя отлично				
2	PEG-OH	0	5	Чувствуют себя отлично				
3	CdSe/ZnS- PEG-OH	ЛД ₂₀	3	Животные в угнетенном состоянии спустя 2-3 минуты после инъекции, состояние напоминает агонию.	Парез конечностей, лежат бездвижно	Сохнут глаза, ершится шерсть	Угнетена	Через час-два приходят в себя и начинают двигаться и умываться
4		ЛД ₃₀	3	Животные в угнетенном состоянии спустя 2-3 минуты после инъекции.	Рвотные рефлексы.	Сохнут глаза, ершится шерсть	Угнетена	Нормализация состояния заняла приблизительно 3 часа
5		ЛД ₄₀	1	Очень тяжелое состояние наступило сразу после инъекции	Рвотные рефлексы парез конечностей.	Сохнут глаза, ершится шерсть	Замедленное и надрывное дыхание	Тяжелое состояние сохранялось в течение 3 часа
6		ЛД ₅₀	1	Очень тяжелое состояние наступило сразу после инъекции	Рвотные рефлексы парез конечностей.	Сохнут глаза, ершится шерсть	Замедленное и надрывное дыхание	Тяжелое состояние сохранялось в течение 3 часа
7	CuInS ₂ / ZnS-PEG- OH	ЛД ₂₀	3	Тяжелое состояние наступает через 5-10 минут после инъекции	Парез конечностей	Сохнут глаза, ершится шерсть	Учащенное дыхание	Мыши приходили в себя на протяжении около 2.5 часа
8		ЛД ₃₀	3	Тяжелое состояние наступает через 5-10 минут после инъекции	Парез конечностей	Сохнут глаза, ершится шерсть	Учащенное дыхание	Мыши приходили в себя на протяжении около 2.5 часа
9		ЛД ₄₀	2	Состояние через 2-3 мин тяжелое, рвотные	Рвотные рефлексы парез	Сохнут глаза, ершится шерсть	Замедленно е и надрывное	Животные приходят в себя на

				движения	конечностей.		дыхание	протяжении 2,5-3 часа
10	PbS/ZnS-PEG-OH	ЛД ₂₀	4	Состояние всех животных через 2-3 минуты оценивается как плохое, но удовлетворительное относительно остальных групп.	Двигательная активность практически не нарушена, легкий парез конечностей	Ершится шерсть	Практически не нарушена, слегка учащенное дыхание	Нормализация состояния занимает около 2,5 – 3 часа.
11		ЛД ₄₀	3	Состояние тяжелое через 5-10 мин	Рвотные рефлексы парез конечностей.	Сохнут глаза, ершится шерсть	Угнетена	Нормализация состояния занимает около 2,5 – 3 часа
12		ЛД ₅₀	2	Состояние очень тяжелое сразу после инъекции.	Рвотные рефлексы парез конечностей.	Сохнут глаза, ершится шерсть	Замедленное и надрывное дыхание	Нормализация состояния занимает около 2,5 – 3 часа

На протяжении всего наблюдаемого времени кратковременных токсических эффектов КТ нарушений в жизнедеятельности мышей не наблюдалось. В случаях, когда животным была введена высокая доза КТ, наблюдалось изъязвление в месте инъекции препаратов КТ в хвостовую вену, которое заживало в течение двух недель.

3.4.2.2 Анализ гистологических изменений в тканях и органах мышей линии BALB/c после введения квантовых точек

Анализ токсического воздействия на органы экспериментальных животных проводили для препаратов КТ составов $\text{CuInS}_2/\text{ZnS-PEG-OH}$, $\text{PbS/CdS/ZnS-PEG-OH}$ и CdSe/ZnS-PEG-OH путем анализа внешнего вида внутренних органов, а также исследования гистологических образцов селезенки, почек, печени, легких и сердца мышей линии BALB/c через 1 месяц после введения им препаратов КТ. На рисунках 20, 21 и 22 представлены фотографии органов экспериментальных животных, в сравнении с органами контрольных животных, которым вводили стерильный 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.2 или стерильный препарат лиганда в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.2, использованный для модификации поверхности всех типов исследуемых КТ. Все фотографии были сделаны сразу после извлечения органов из мышей. В результате визуального наблюдения можно отметить увеличение селезенки у экспериментальных мышей, что соответствует литературным данным, свидетельствующим о том, что НК после инъекций преимущественно накапливаются в селезенке [19]. При этом изменение размеров было одинаковым для всех исследованных типов КТ.

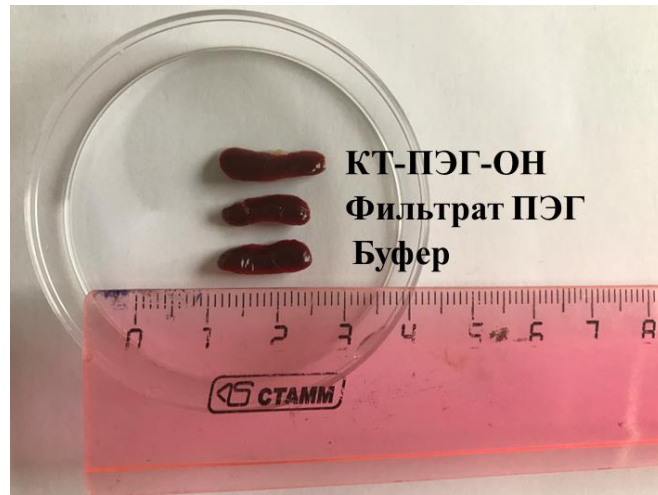


Рисунок 20 – Селезенка мышей через месяц после инъекции квантовых точек

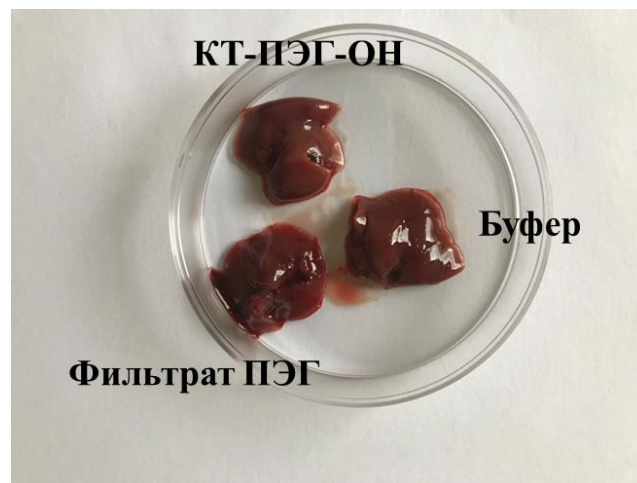


Рисунок 21 – Печень мышей через месяц после инъекции квантовых точек



Рисунок 22 – Почка мышей через месяц после инъекции квантовых точек

Результаты гистологических исследований приведены в таблице 12. Всего было проанализировано 204 гистологических слайда. В контрольных образцах патологических изменения не выявлено. В экспериментальных образцах для всех типов КТ были выявлены 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 видимо обусловлено преимущественным накоплением и деградацией КТ в селезенке и в печени (рисунок 23) и реактивного воспалительного процесса в легких (рисунок 24).

Таблица 12 – Наблюдаемые гистологические изменения в органах мышей

Орган	CuInS ₂ /ZnS-PEG-ОН	PbS/CdS/ZnS-PEG-ОН	CdSe/ZnS-PEG-ОН
Селезенка	Признаки воспаления	Признаки воспаления	Признаки воспаления
Почки	Геморрагия, лизис, некроз, расширение сосудов	Небольшие зоны лизиса, геморрагия	Небольшие зоны лизиса, геморрагия
Печень	Некроз, небольшие зоны воспаления, периферические зоны лизиса, неоднородность ткани	Некроз, небольшие зоны воспаления, периферические зоны лизиса	Небольшие участки воспаления зоны лизиса, некроз периферические зоны лизиса
Легкие	3/4 клеточного покрытия бронхов состоит из воспалительных клеток, массивные зоны воспаления	Зоны уплотнений, зоны воспалений, зоны геморрагии	1/3 клеточного покрытия бронхов состоит из воспалительных клеток, массивные зоны воспаления
Сердце	Без особенностей	Без особенностей	Без особенностей

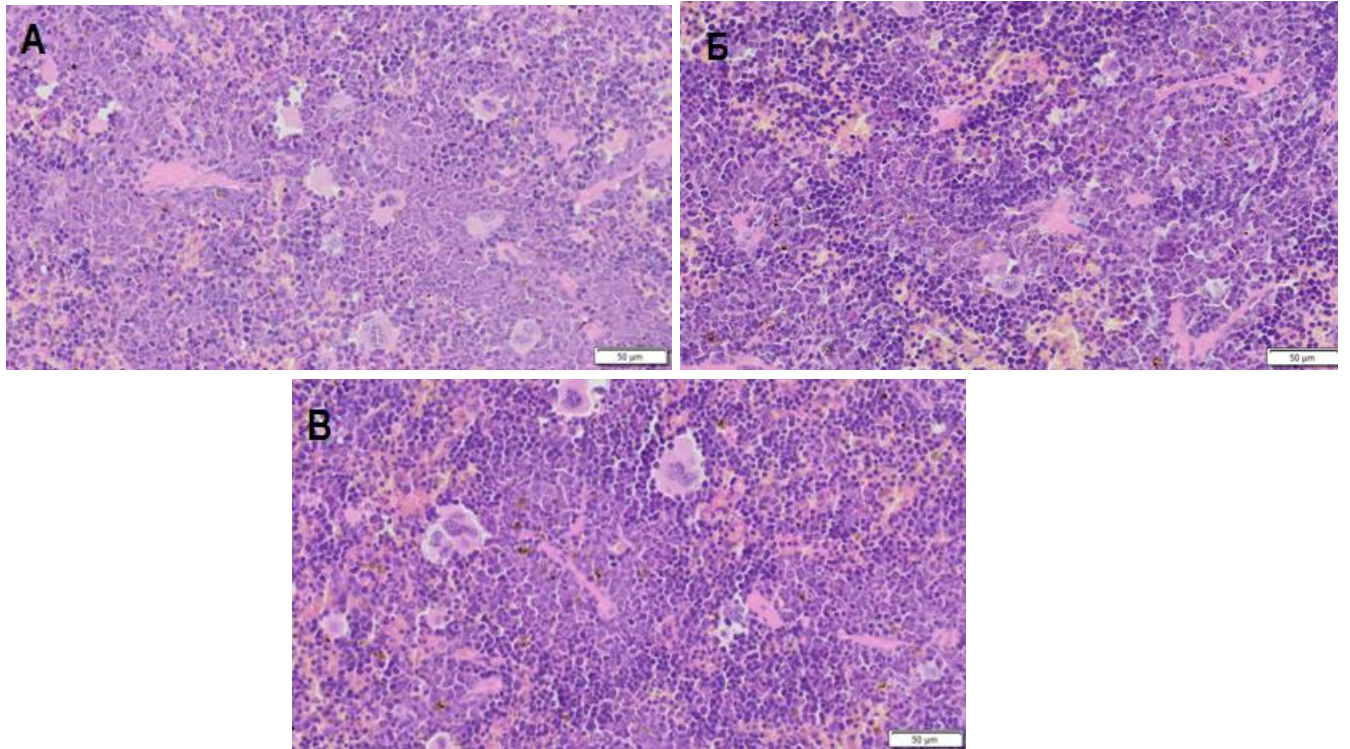


Рисунок 23 – Исследование гистологических препаратов тканей селезенки лабораторных животных после инъекций: А – препарата КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в концентрации ЛД₅₀; Б - препарата КТ CuInS₂/ZnS-PEG-OH в концентрации ЛД₄₀; В - препарата КТ PbS/CdS/ZnS-PEG-OH в концентрации ЛД₅₀

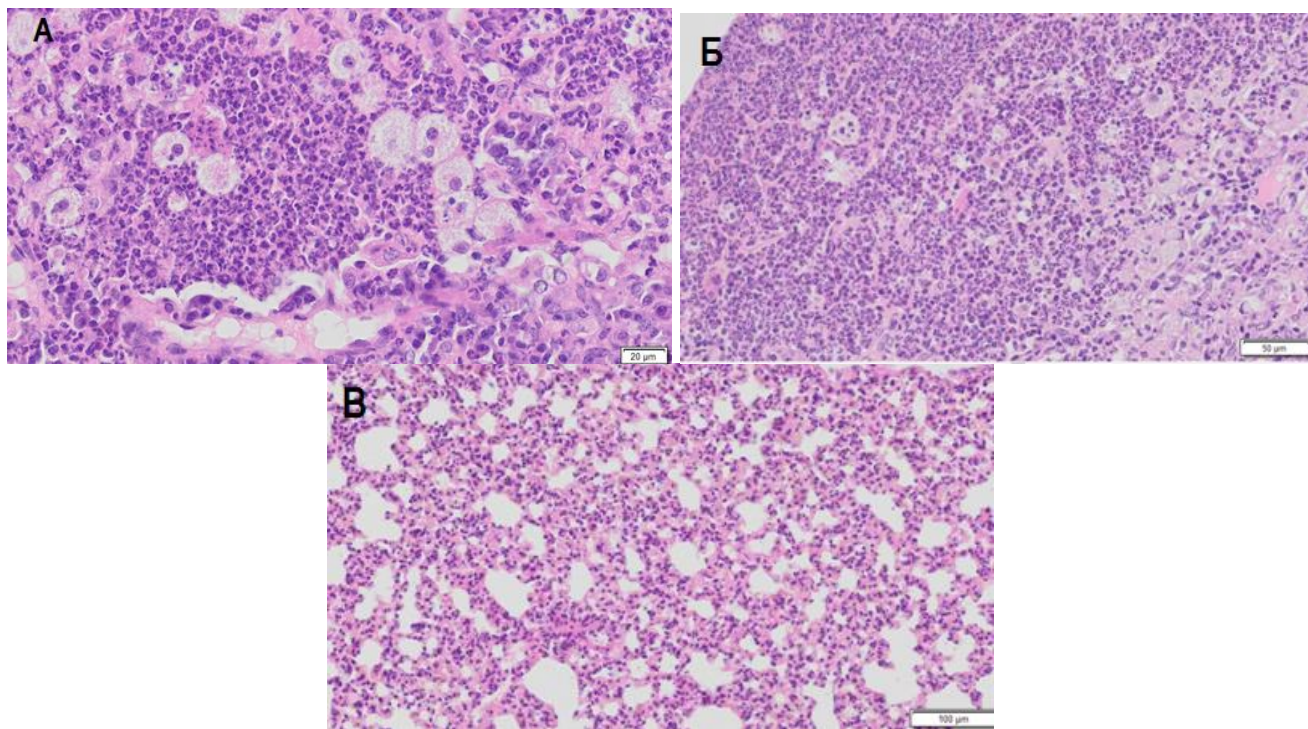


Рисунок 24 – Исследование гистологических препаратов тканей легкого после инъекций: А – препарата КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в дозе ЛД₅₀; Б – препарата КТ CuInS₂/ZnS-PEG-OH в в дозе ЛД₄₀; В -препарата КТ PbS/CdS/ZnS-PEG-OH в дозе ЛД₅₀

Из полученных результатов можно сделать вывод, что все исследуемые КТ вызывают гистологические изменения в тканях органов-мишеней, которые, как правило, связаны с локальным воспалением, а также образованием областей некроза. Самые интенсивные зоны воспаления наблюдаются на срезах легкого, где особенно массивные воспалительные изменения сопровождаются миграцией макрофагов. Наиболее протяженные зоны воспалительных изменений характерны для срезов легкого мышей после инъекций КТ CuInS₂/ZnS-PEG-OH, несмотря на то, что эксперименты по исследованию острой токсичности показали, что данные КТ наименее токсичны по сравнению с препаратами кадмий-содержащих и свинец-содержащих КТ. Стоит отметить, что в работе Yaghini и соавторов было показано, что КТ CuInS₂/ZnS не вызывают гистологических изменений в тканях печени, селезенки, почек и легких, однако в данной работе использовали КТ в концентрации в два раза меньшей по сравнению с концентрацией КТ, использованной нами, из чего можно сделать вывод, что доза КТ CuInS₂/ZnS

является критическим параметром для возникновения отдаленных реакций в органах-мишенях экспериментальных животных.

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

Ввиду высокой токсичности и широкого распространения кадмий-содержащих наноматериалов в современных промышленных материалах, в также в связи с тем, что значение ЛД₅₀ для данного типа КТ было наиболее низким и изменения в тканях лабораторных животных наблюдались даже при самых низких инъекционных дозах, нами было проанализировано влияние низких доз данных КТ на состояние иммунной системы мышей CBAxС57BL/6. Исследования проводили после однократного внутривенного введения препаратов КТ состава CdSe/ZnS PEG-OH в дозах ЛД₅ и ЛД₁₀. Результаты этих экспериментов могут дать дополнительные данные по токсичности КТ не только на органном уровне, но и на организменном уровне, а также могут позволить предугадать отдаленные негативные последствия и оценить безопасность присутствия следов кадмий-содержащих НК в базовых наноматериалах.

3.5.1 Анализ влияния квантовых точек на состояние органов иммунной системы

Анализ иммунотоксичности КТ проводился на селезенке, тимусе и красном костном мозге мышей линии CBAxС57BL/6. Выбор органов был обусловлен тем, что тимус является одним из самых чувствительных к иммунотоксинам органом, кроме того в нем происходит созревание, дифференцировка и «иммунологическая сортировка» Т-клеток. Селезенка выбрана по причине того, что в ней происходит превращение моноцитов в макрофаги – клетки, предназначенные для инактивации токсичных для организма компонентов. А красный костный мозг выбран по той причине, что он является органом гемопоэза и иммунопоэза и состоит из клеток-предшественников лимфоцитарного, моноцитарного и мегакариоцитарного ряда.

Полученные результаты показали, что введение препаратов КТ состава CdSe/ZnS PEG-OH вызывает незначительное увеличение массы селезенки и значительное снижение её клеточности на седьмой день после введения КТ (рисунок 25). При этом, согласно нашим наблюдениям, на 21 день после инъекции селезенка была все еще несколько увеличена в размерах, однако её клеточность полностью восстановилась (рисунок 26), что говорит об обратимом действии КТ после однократной инъекции.

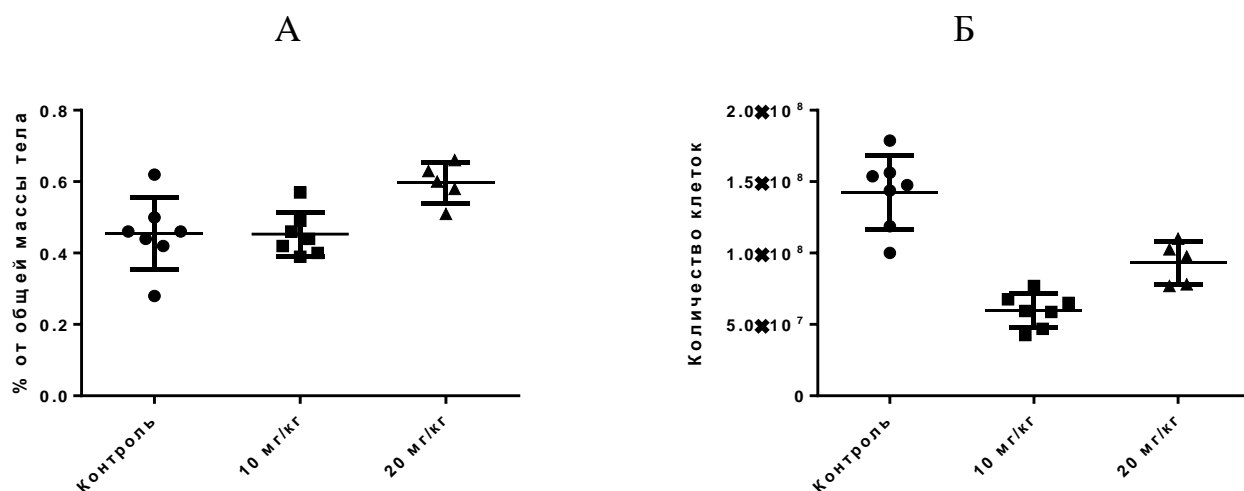


Рисунок 25 – Масса селезенки относительно общей массы тела (А) и количество клеток селезенки (Б) мышей спустя 7 дней после инъекции квантовых точек

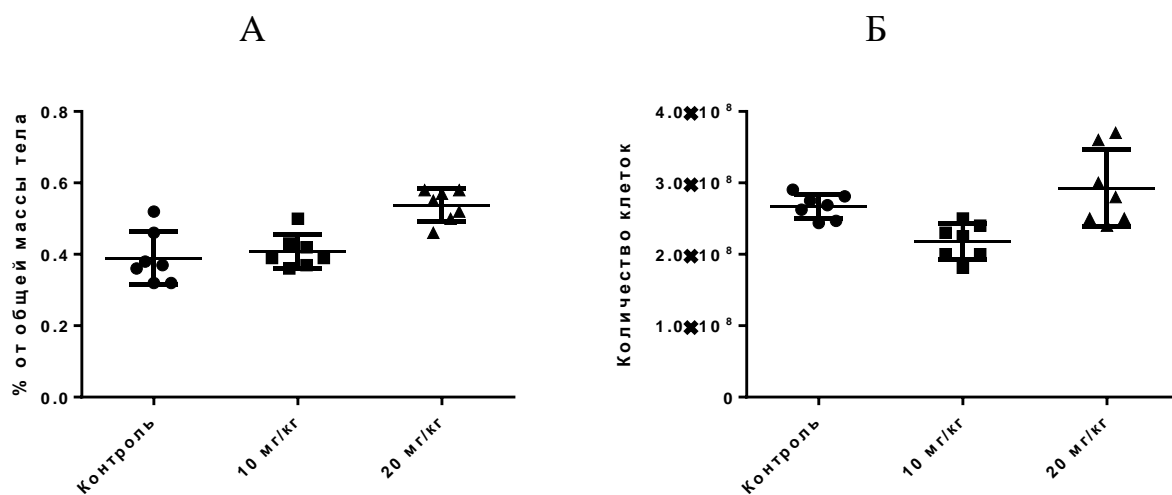


Рисунок 26 – Масса селезенки относительно общей массы тела (А) и количество клеток селезенки (Б) мышей спустя 21 день после инъекции квантовых точек

Масса тимуса под воздействием КТ практически не изменяется, однако наблюдается значительное снижение его клеточности на 7 день после введения КТ, что может быть вызвано токсическим действием КТ на Т-лимфоциты, макрофаги тимуса или стромальные клетки (рисунок 27). Через 21 день клеточность тимуса также восстанавливается (рисунок 28).

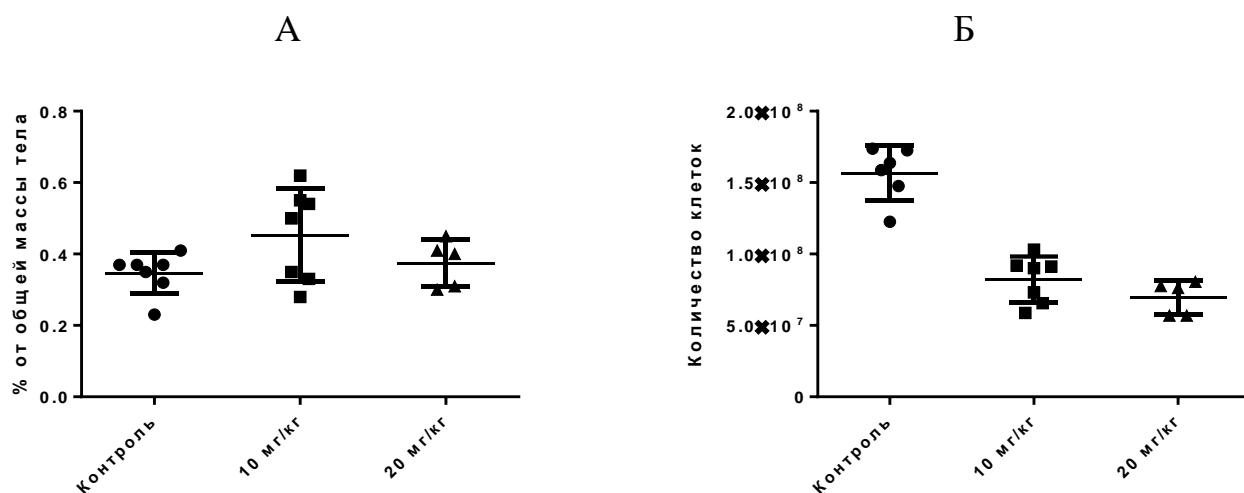


Рисунок 27 – Масса тимуса относительно общей массы тела (А) и количество клеток тимуса (Б) мышей спустя 7 дней после инъекции квантовых точек

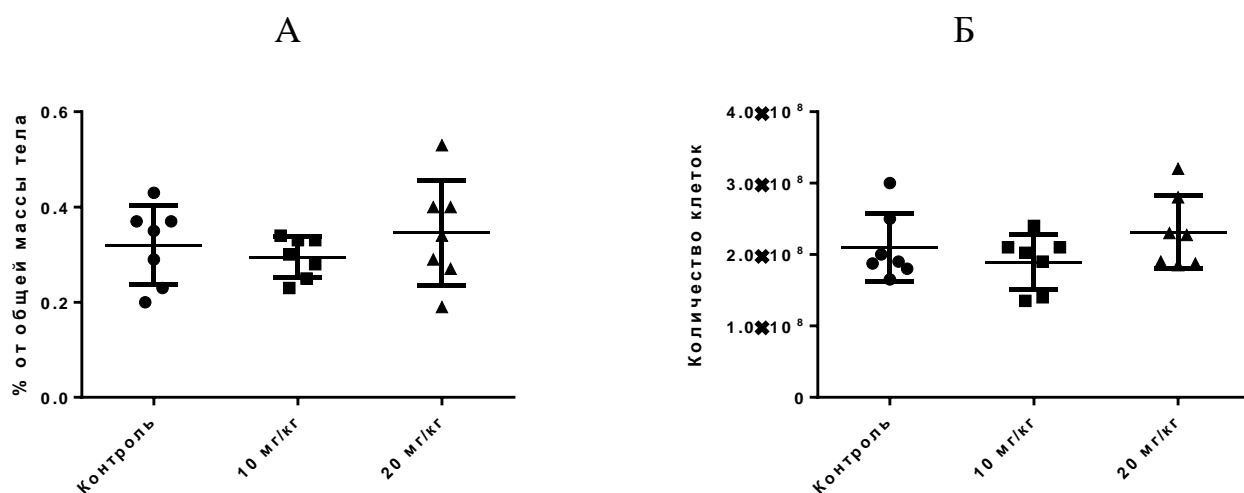


Рисунок 28 – Масса тимуса относительно общей массы тела (А) и количество клеток тимуса (Б) мышей спустя 21 день после инъекции квантовых точек

Клеточность костного мозга не изменяется относительно контрольной группы спустя 7 дней после введения КТ (рисунок 29), что свидетельствует о том, что на коротком промежутке времени КТ не влияют на гемопоэтические функции костного мозга. Однако по прошествии 21 дня наблюдается снижение клеточности костного мозга на 20%, что говорит об угнетении гемопоэтической функции костного мозга с течением времени. Это может быть объяснено тем, что сразу после введения КТ в основном накапливаются в печени, селезенке и почках, а их количество в костном мозге на 2-3 порядка меньше [111], и в него КТ попадают значительно позднее.

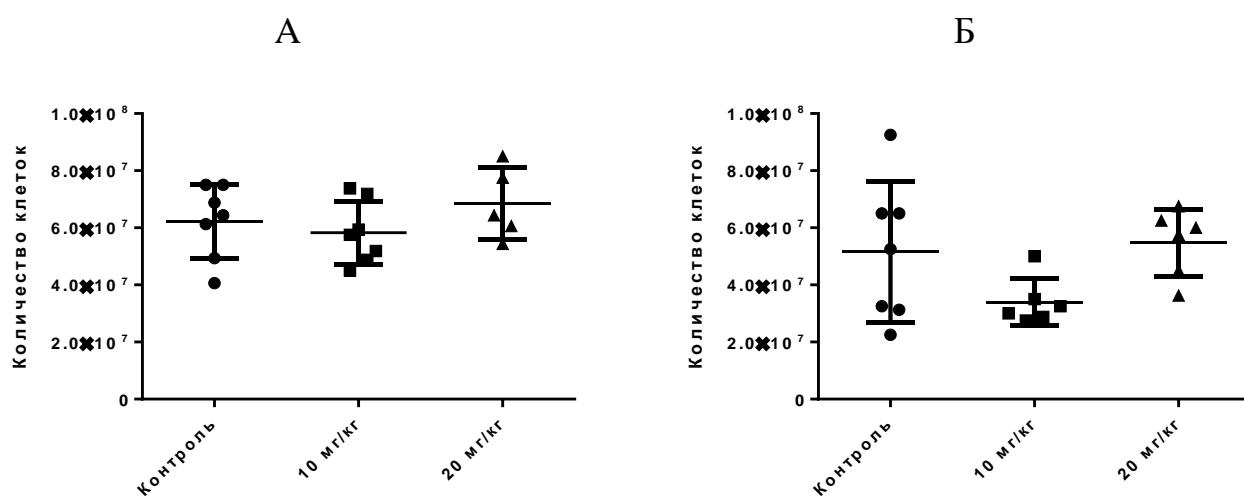


Рисунок 29 – Количество клеток костного мозга мышей, спустя 7 дней после инъекции квантовых точек (А) и 21 день (Б)

3.5.2 Анализ влияния квантовых точек на клеточный иммунитет

Так как наши исследования по определению иммунотоксичности КТ на органы иммунной системы показали снижение клеточности селезенки и тимуса, нами также были проведены эксперименты по анализу интенсивности иммунного ответа мышей после инъекций препаратов КТ CdSe/ZnS-PEG-OH в дозах ЛД₅ и ЛД₁₀.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа является одной из форм клеточного иммунного ответа. Она выражается в развитии воспалительной реакции при попадании в организм возбудителя и позволяет оценить активность

макрофагов и лимфоцитов. Для исследований использовались мыши CBAxС57BL/6. Иммунный ответ оценивался по массе лап мышей из контрольной и опытных групп, которая пропорциональна интенсивности воспаления. Данные по индексу реакции, который оценивался как относительное изменение массы экспериментальной лапы относительно контрольной лапы, приведены на рисунке 30.

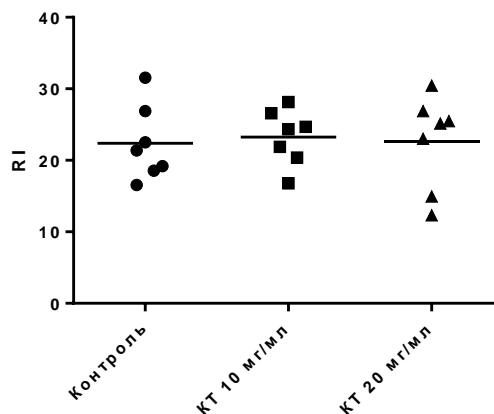


Рисунок 30 – Индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа при введении экспериментальным животным препаратов квантовых точек различной концентрации

В результате было обнаружено, что введение КТ никак не влияет на угнетение иммунного ответа в течение 5 дней после введения КТ.

Для более детального изучения этого факта нами было проведено определение фагоцитарного индекса клеток перитонеального экссудата, содержащего моноциты, макрофаги и другие клетки мезотелия. В результате было показано, что введение КТ также не оказывает влияние на активность клеток иммунной системы (рисунок 31). Изучение литературных источников подтвердило полученные нами результаты. Так Lin и соавторы [103] при исследовании иммунного ответа на линии мышинных макрофагов показали, что КТ состава CdSe/ZnS снижают жизнеспособность макрофагов, но не вызывают изменения их активности.

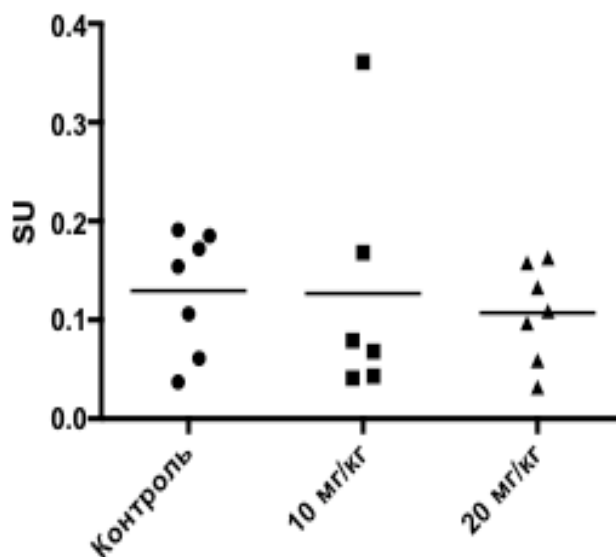


Рисунок 31 – Фагоцитарный индекс после воздействия различных концентраций квантовых точек CdSe/ZnS PEG-OH на мышей в течение суток

Таким образом, иммунотоксическое воздействие КТ направлено главным образом против органов, вырабатывающих иммунные клетки, что в долгосрочной перспективе снижает иммунитет экспериментальных животных, так как нами было показано, что количество клеток красного костного мозга снижается спустя три недели после введения КТ. Снижение иммунитета в краткосрочный период не наблюдается, так как 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 НК, 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе разработан подход к созданию коллекций потенциально биосовместимых НК с варьирующимися параметрами внутри отдельных серий. В качестве модельных нанообъектов были выбраны полупроводниковые флуоресцентные НК сферической формы, однако принцип создания таких коллекций в перспективе может быть использован для любых наноматериалов с целью контроля их свойств и тестирования безопасности их использования в биотехнологических приложениях.

Системный анализ зависимости цитотоксичности *in vitro* НК, характеризующихся различным химическим составом, размером и поверхностным зарядом, а также анализ их токсичности *in vivo* позволил выявить корреляции и различия между результатами исследований *in vitro* и *in vivo*. Очевидно, что *in vitro* модели не могут давать полностью релевантные результаты по токсичности наноматериалов, однако часть экспериментов можно выполнять с использованием различных клеточных моделей для широкого первоначального скрининга для большого количества наноматериалов, и такие исследования несомненно дополняют исследования токсичности *in vivo*. Кроме того, исследования закономерностей поведения наноматериалов *in vitro* могут принести новые знания о механизмах и способах реализации токсических эффектов наноматериалов, что несомненно поможет повысить контроль качества исходного материала для создания безопасных гибридных нанобиоматериалов, а также для использования этих материалов в биотехнологических разработках.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

Автор выражает благодарность научному руководителю д. мед. наук А.В. Сухановой за помощь в планировании экспериментов и критическую оценку полученных результатов и заведующему Лаборатории нано-биоинженерии НИЯУ МИФИ д. хим. наук, профессору И.Р. Набиеву за помощь в реализации данной работы.

Автор благодарит к. хим. наук П.С. Самохвалова, Лаборатория нано-биоинженерии НИЯУ МИФИ, а также др. Крису Гюренц и профессору Николаю Гапонику, лаборатория физической химии Технического Университета Дрездена (Германия) за предоставление образцов синтетических НК для работы.

Автор выражает благодарность сотрудникам Университета Реймс Шампань-Арденны (Франция) за техническую помощь при использовании уникального высокоскоростного атомного-силового микроскопа, а также благодарность инженерному сопровождению платформы электронной микроскопии Технического Университета Дрездена (Германия).

Автор благодарит всех коллег лаборатории нано-биоинженерии НИЯУ МИФИ за ежедневную поддержку.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ	атомно-силовая микроскопия
АУК	аминоундекановая кислота
АФК	активные формы кислорода
ГДД	гидродинамический диаметр
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	ингибирующая концентрация
ИР	индекс реакции
ИФА	иммуноферментный анализ
КПЭ	клетки перитонеального экссудата
КТ	квантовые точки
ЛД	летальная доза
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
МПК	меркаптоприоновая кислота
МРТ	магнитно-резонансная томография
МС	монослой
МТТ	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
МУНТ	многослойные углеродные нанотрубки
НК	нанокристаллы
НЧ	наночастицы
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
ПЭО	полиэтиленоксид
СТФ	стержнеобразная форма
СФФ	сферическая форма
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ЦА	цистеамин
УНТ	углеродные нанотрубки
ЯСК	ядросодержащие клетки

PEG	полиэтиленгликоль
ThT	тиофлавин Т

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension // *Nature*. – 2003. – Т. 424, № 6951. – С. 870-2.
2. Abbott Chalew T. E., Schwab K. J. Toxicity of commercially available engineered nanoparticles to Caco-2 and SW480 human intestinal epithelial cells // *Cell Biology and Toxicology*. – 2013. – Т. 29, № 2. – С. 101-16.
3. Alexis F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles // *Molecular pharmaceutics*. – 2008. – Т. 5, № 4. – С. 505-515.
4. Alkilany A. M. et al. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects // *Small*. – 2009. – Т. 5, № 6. – С. 701-8.
5. Altinoglu E. I., Adair J. H. Near infrared imaging with nanoparticles // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2010. – Т. 2, № 5. – С. 461-77.
6. Amini S. M., Gilaki M., Karchani M. Safety of nanotechnology in food industries // *Electronic Physician*. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 962-968.
7. Ando T. et al. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Т. 98, № 22. – С. 12468-72.
8. Arami H. et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Т. 44, № 23. – С. 8576-8607.
9. Asare N. et al. Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium dioxide nanoparticles in mice // *Nanotoxicology*. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 312-21.
10. Asati A. et al. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles // *ACS Nano*. – 2010. – Т. 4, № 9. – С. 5321-31.
11. Ashokan A. et al. Development and haematotoxicological evaluation of doped hydroxyapatite based multimodal nanocontrast agent for near-infrared, magnetic resonance and X-ray contrast imaging // *Nanotoxicology*. – 2012. – Т. 6, № 6. – С. 652-66.

12. Auer S., Trovato A., Vendruscolo M. A condensation-ordering mechanism in nanoparticle-catalyzed peptide aggregation // *PLoS Computational Biology*. – 2009. – T. 5, № 8. – C. e1000458.
13. Baetke S. C., Lammers T., Kiessling F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer // *British Journal of Radiology*. – 2015. – T. 88, № 1054. – C. 20150207.
14. Ballottin D. et al. Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas* // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – T. 75. – C. 582-589.
15. Ballou B. et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice // *Bioconjugate Chemistry*. – 2004. – T. 15, № 1. – C. 79-86.
16. Bannunah A. M. et al. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge // *Molecular Pharmaceutics*. – 2014. – T. 11, № 12. – C. 4363-73.
17. Baptista P. V. et al. Nanoparticles in molecular diagnostics // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2011. – T. 104. – C. 427-88.
18. Barenholz Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – T. 160, № 2. – C. 117-34.
19. Bargheer D. et al. The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. – 2015. – T. 6. – C. 111-123.
20. Bartlett D. W. et al. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – T. 104, № 39. – C. 15549-15554.
21. Barua S., Mitragotri S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects // *Nano today*. – 2014. – T. 9, № 2. – C. 223-243.

22. Bejarano J. et al. Nanoparticles for diagnosis and therapy of atherosclerosis and myocardial infarction: evolution toward prospective theranostic approaches // *Theranostics*. – 2018. – T. 8, № 17. – C. 4710-4732.
23. Bobo D. et al. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date // *Pharmaceutical Research*. – 2016. – T. 33, № 10. – C. 2373-87.
24. Bouwmeester H. et al. Characterization of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Coculture Model // *ACS Nano*. – 2011. – T. 5, № 5. – C. 4091-4103.
25. Brandenberger C. et al. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2010. – T. 242, № 1. – C. 56-65.
26. Brunetti V. et al. InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment // *Nanoscale*. – 2013. – T. 5, № 1. – C. 307-17.
27. Champion J. A., Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – T. 103, № 13. – C. 4930-4934.
28. Chen H.-S. et al. Quantum Dots and Nanoparticles in Light Emitting Diodes, Displays, and Optoelectronic Devices // *Journal of Nanomaterials*. – 2015. – T. 2015. – C. 1-2.
29. Chen N. et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots // *Biomaterials*. – 2012. – T. 33, № 5. – C. 1238-44.
30. Chen Y. C. et al. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2010. – T. 245, № 2. – C. 272-9.
31. Cho J. et al. Lectin-Tagged Fluorescent Polymeric Nanoparticles for Targeting of Sialic Acid on Living Cells // *Biomacromolecules*. – 2014. – T. 15, № 6. – C. 2012-2018.

32. Choi J. et al. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles // *Toxicological Sciences*. – 2011. – T. 123, № 1. – C. 133-43.
33. Choi S. J., Oh J. M., Choy J. H. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2009. – T. 103, № 3. – C. 463-71.
34. Colvin V. L., Kulinowski K. M. Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – T. 104, № 21. – C. 8679-8680.
35. Connor E. E. et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity // *Small*. – 2005. – T. 1, № 3. – C. 325-7.
36. Cordeiro M. et al. Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care // *Diagnostics*. – 2016. – T. 6, № 4. – C. 43.
37. Davis, M. E., Chen, Z. G., Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2008. – T. 7, – C. 771-782.
38. De Jong W. H., Borm P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards // *International journal of nanomedicine*. – 2008. – T. 3, № 2. – C. 133-149.
39. Dobrzyńska I., Skrzydlewska E., Figaszewski Z. A. Changes in electric properties of human breast cancer cells // *The Journal of membrane biology*. – 2013. – T. 246, № 2. – C. 161-166.
40. Donaldson K. et al. Nanotoxicology // *Occupational and Environmental Medicine*. – 2004. – T. 61, № 9. – C. 727-8.
41. Eby D. M., Luckarift H. R., Johnson G. R. Hybrid antimicrobial enzyme and silver nanoparticle coatings for medical instruments // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2009. – T. 1, № 7. – C. 1553-60.
42. El Badawy A. M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles // *Environmental Science and Technology*. – 2011. – T. 45, № 1. – C. 283-7.
43. Erogbogbo F. et al. In vivo targeted cancer imaging, sentinel lymph node mapping and multi-channel imaging with biocompatible silicon nanocrystals // *ACS Nano*. – 2011. – T. 5, № 1. – C. 413-23.

44. Fabian E. et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats // *Archives of Toxicology*. – 2008. – T. 82, № 3. – C. 151-7.
45. Favi P. M. et al. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2015. – T. 103, № 11. – C. 3449-3462.
46. Feng W. et al. In vitro and in vivo toxicity studies of copper sulfide nanoplates for potential photothermal applications // *Nanomedicine*. – 2015. – T. 11, № 4. – C. 901-12.
47. Fischer A. H. et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2008. – T. 2008. – C. pdb.prot4986.
48. Fitzpatrick J. A. et al. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo // *Nano Letters*. – 2009. – T. 9, № 7. – C. 2736-41.
49. Freese C. et al. In vitro investigation of silica nanoparticle uptake into human endothelial cells under physiological cyclic stretch // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2014. – T. 11, № 1. – C. 68.
50. Gerloff K. et al. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells // *Nanotoxicology*. – 2009. – T. 3, № 4. – C. 355-364.
51. Geys J. et al. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge // *Environmental health perspectives*. – 2008. – T. 116, № 12. – C. 1607-1613.
52. Granqvist C. G. et al. Far-Infrared Absorption in Ultrafine Al Particles // *Physical Review Letters*. – 1976. – T. 37, № 10. – C. 625-629.
53. Gregory A. E., Titball R., Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2013. – T. 3. – C. 13.
54. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting // *Methods in Molecular Biology*. – 2010. – T. 624. – C. 25-37.
55. Guadagnini R. et al. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests // *Nanotoxicology*. – 2015. – T. 9 Suppl 1. – C. 13-24.

56. Guhrenz C. et al. Transfer of Inorganic-Capped Nanocrystals into Aqueous Media // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2017. – T. 8, № 22. – C. 5573-5578.
57. Guller A. E. et al. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells // *Nano Research*. – 2015. – T. 8, № 5. – C. 1546-1562.
58. Gunawan C. et al. Nanoparticle–protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – T. 2, № 15. – C. 2060-2083.
59. Guo G. et al. Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification // *Materials Letters*. – 2007. – T. 61, № 8. – C. 1641-1644.
60. Gurr J. R. et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells // *Toxicology*. – 2005. – T. 213, № 1-2. – C. 66-73.
61. Hafeli U. O. et al. Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery // *Molecular Pharmaceutics*. – 2009. – T. 6, № 5. – C. 1417-28.
62. Hamilton R. F. et al. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2009. – T. 6, № 1. – C. 35.
63. Hanagata N. et al. Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis // *American Chemical Society Nano*. – 2011. – T. 5, № 12. – C. 9326-38.
64. Haque M. M. et al. Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice // *Journal of Applied Toxicology*. – 2013. – T. 33, № 9. – C. 940-50.
65. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors // *Environmental health perspectives*. – 2006. – T. 114, № 2. – C. 165-172.
66. Hauck T. S. et al. In vivo quantum-dot toxicity assessment // *Small*. – 2010. – T. 6, № 1. – C. 138-44.

67. Hu R. et al. PEGylated Phospholipid Micelle-Encapsulated Near-Infrared PbS Quantum Dots for in vitro and in vivo Bioimaging // *Theranostics*. – 2012. – T. 2, № 7. – C. 723-33.
68. Hu W. et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide // *ACS Nano*. – 2011. – T. 5, № 5. – C. 3693-700.
69. Huang J. et al. Casein-Coated Iron Oxide Nanoparticles for High MRI Contrast Enhancement and Efficient Cell Targeting // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2013. – T. 5, № 11. – C. 4632-4639.
70. Hühn D. et al. Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge // *ACS Nano*. – 2013. – T. 7, № 4. – C. 3253-3263.
71. Huo S. et al. Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry // *ACS Nano*. – 2014. – T. 8, № 6. – C. 5852-62.
72. Iqbal M. A. et al. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery // *Journal of Drug Targeting*. – 2012. – T. 20, № 10. – C. 813-30.
73. Ispas C. et al. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish // *Environmental science and technology*. – 2009. – T. 43, № 16. – C. 6349-6356.
74. Jain A. et al. Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2018. – T. 58, № 2. – C. 297-317.
75. Jeong S. H. et al. ZnO nanoparticles induce TNF-alpha expression via ROS-ERK-Egr-1 pathway in human keratinocytes // *Journal of Dermatological Science*. – 2013. – T. 72, № 3. – C. 263-73.
76. Jong W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. // *Biomaterials* –2008. – T. 29. – C. 1912-9.
77. Jos A. et al. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2 // *Toxicology in Vitro*. – 2009. – T. 23, № 8. – C. 1491-6.

78. Kanamala M. et al. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review // *Biomaterials*. – 2016. – T. 85. – C. 152-67.
79. Kang S. et al. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! // *Langmuir*. – 2008. – T. 24, № 13. – C. 6409-13.
80. Katebi B. et al. Protective effects of silibinin on insulin amyloid fibrillation, cytotoxicity and mitochondrial membrane damage // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – T. 659. – C. 22-32.
81. Kedziorek D. A. et al. Gene expression profiling reveals early cellular responses to intracellular magnetic labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 2010. – T. 63, № 4. – C. 1031-43.
82. King-Heiden T. C. et al. Quantum Dot Nanotoxicity Assessment Using the Zebrafish Embryo // *Environmental Science and Technology*. – 2009. – T. 43, № 5. – C. 1605-1611.
83. Kocbek P. et al. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles // *Small*. – 2010. – T. 6, № 17. – C. 1908-17.
84. Koeneman B. A. et al. Experimental approach for an in vitro toxicity assay with non-aggregated quantum dots // *Toxicology in Vitro*. – 2009. – T. 23, № 5. – C. 955-62.
85. Kokura S. et al. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics // *Nanomedicine*. – 2010. – T. 6, № 4. – C. 570-4.
86. Kong B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles // *Nanomedicine*. – 2011. – T. 6, № 5. – C. 929-941.
87. Kostura L. et al. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis // *Nuclear Magnetic Resonance NMR in Biomedicine*. – 2004. – T. 17, № 7. – C. 513-7.
88. Krejčířová L., Lauschová I., Čížek P. Distribution of Heavy Metals in the Liver of Foetuses and Female Mice after Oral Administration during Pregnancy - a Histochemical Study // *Acta Veterinaria Brunensis*. – 2010. – T. 79. – C. 225-231.
89. Kuhn S. J., Hallahan D. E., Giorgio T. D. Characterization of superparamagnetic nanoparticle interactions with extracellular matrix in an in vitro system // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2006. – T. 34, № 1. – C. 51-8.

90. Kumar V., Sharma N., Maitra S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles // *International Nano Letters*. – 2017. – T. 7, № 4. – C. 243-256.
91. Kuruvilla S. J. et al. Dihydrolipoic Acid Conjugated Carbon Dots Accelerate Human Insulin Fibrillation // *Journal of Parkinson's disease and Alzheimer's disease*. – 2015. – T. 2, № 1. – C. 7.
92. Kwon J. et al. Inflammation-responsive antioxidant nanoparticles based on a polymeric prodrug of vanillin // *Biomacromolecules*. – 2013. – T. 14, № 5. – C. 1618-26.
93. Lanone S. et al. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2009. – T. 6. – C. 14.
94. Larson D. R. et al. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo // *Science*. – 2003. – T. 300, № 5624. – C. 1434-6.
95. Lee J., Cuddihy M. J., Kotov N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2008. – T. 14, № 1. – C. 61-86.
96. Lee J. et al. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture // *Small*. – 2009. – T. 5, № 10. – C. 1213-21.
97. Levy M. et al. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties // *Nanotechnology*. – 2010. – T. 21, № 39. – C. 395103.
98. Li J. et al. Mitochondria as target of Quantum dots toxicity // *Journal of Hazardous Materials*. – 2011. – T. 194. – C. 440-444.
99. Li S., Leblanc R. M. Aggregation of Insulin at the Interface // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – T. 118, № 5. – C. 1181-1188.
100. Li S. et al. Nontoxic Carbon Dots Potently Inhibit Human Insulin Fibrillation // *Chemistry of Materials*. – 2015. – T. 27, № 5. – C. 1764-1771.
101. Li X. J. et al. Microfluidic 3D cell culture: potential application for tissue-based bioassays // *Bioanalysis*. – 2012. – T. 4, № 12. – C. 1509-1525.
102. Liechty W. B. et al. Polymers for drug delivery systems // *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. – 2010. – T. 1. – C. 149-173.

103. Lin G. et al. Cytotoxicity and immune response of CdSe/ZnS Quantum dots towards a murine macrophage cell line // RSC Advances. – 2014. – T. 4, № 11. – C. 5792-5797.
104. Linse S. et al. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104, № 21. – C. 8691.
105. Liu F. et al. Parallel comparative studies on toxicity of quantum dots synthesized and surface engineered with different methods in vitro and in vivo // International journal of nanomedicine. – 2017. – T. 12. – C. 5135-5148.
106. Liu H., Jin X., Ding B. Application of nanotechnology in petroleum exploration and development // Petroleum Exploration and Development. – 2016. – T. 43, № 6. – C. 1107-1115.
107. Liu J. et al. Degradation Products from Consumer Nanocomposites: A Case Study on Quantum Dot Lighting // Environmental Science and Technology. – 2012. – T. 46, № 6. – C. 3220-3227.
108. Liu N. et al. Degradation of aqueous synthesized CdTe/ZnS quantum dots in mice: differential blood kinetics and biodistribution of cadmium and tellurium // Particle and Fibre Toxicology. – 2013. – T. 10. – C. 37.
109. Liu Q. et al. Role of surface charge in determining the biological effects of CdSe/ZnS quantum dots // International Journal of Nanomedicine. – 2015. – T. 10. – C. 7073-88.
110. Liu W. et al. Compact cysteine-coated CdSe(ZnCdS) quantum dots for in vivo applications // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – T. 129, № 47. – C. 14530-14531.
111. Liu W. et al. CdSe quantum dot (QD)-induced morphological and functional impairments to liver in mice // PLoS One. – 2011. – T. 6, № 9. – C. e24406.
112. Liu Y. et al. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes // Biomaterials. – 2011. – T. 32, № 32. – C. 8291-303.
113. Lu L. et al. Inhibition of Beta-Amyloid Fibrillation by Luminescent Iridium(III) Complex Probes // Scientific Reports. – 2015. – T. 5. – C. 14619.

114. Lucchini R. G. et al. Neurological impacts from inhalation of pollutants and the nose-brain connection // *Neurotoxicology*. – 2012. – T. 33, № 4. – C. 838-41.
115. Lucky S. S., Soo K. C., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy // *Chemical Reviews*. – 2015. – T. 115, № 4. – C. 1990-2042.
116. Lundqvist M. et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105, № 38. – C. 14265-70.
117. Ma P., Mumper R. J. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review // *Journal of nanomedicine and nanotechnology*. – 2013. – T. 4, № 2. – C. 1000164-1000164.
118. Madl A. K. et al. Nanoparticles, lung injury, and the role of oxidant stress // *Annual review of physiology*. – 2014. – T. 76. – C. 447-465.
119. Mahmoudi M. et al. Protein fibrillation and nanoparticle interactions: opportunities and challenges // *Nanoscale*. – 2013. – T. 5, № 7. – C. 2570-2588.
120. Manshian B. B. et al. Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints // *Toxicological Sciences*. – 2015. – T. 144, № 2. – C. 246-58.
121. Mao Z. et al. Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics // *Nanoscale*. – 2015. – T. 7, № 18. – C. 8466-75.
122. Medintz I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // *Nature Materials*. – 2005. – T. 4, № 6. – C. 435-46.
123. Mena M. et al. Development and validation of a protocol for optimizing the use of paraffin blocks in molecular epidemiological studies: The example from the HPV-AHEAD study // *PLoS One*. – 2017. – T. 12, № 10. – C. e0184520.
124. Mornet S. et al. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy // *Journal of Materials Chemistry*. – 2004. – T. 14, № 14. – C. 2161-2175.
125. Muguruma H., Matsui Y., Shibayama Y. Carbon Nanotube-Plasma Polymer-Based Amperometric Biosensors: Enzyme-Friendly Platform for Ultrasensitive Glucose Detection // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2007. – T. 46. – C. 6078-6082.

126. Mukherjee S. P., Davoren M., Byrne H. J. In vitro mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers - towards quantitative structure activity relationships // *Toxicology in Vitro*. – 2010. – T. 24, № 1. – C. 169-77.
127. Murphy C. J. Optical sensing with quantum dots // *Analytical Chemistry*. – 2002. – T. 74, № 19. – C. 520a-526a.
128. Murphy F. A. et al. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2012. – T. 9. – C. 8.
129. Nagy A. et al. Functionalization-dependent induction of cellular survival pathways by CdSe quantum dots in primary normal human bronchial epithelial cells // *ACS Nano*. – 2013. – T. 7, № 10. – C. 8397-411.
130. Nagy A. et al. Comprehensive analysis of the effects of CdSe quantum dot size, surface charge, and functionalization on primary human lung cells // *ACS Nano*. – 2012. – T. 6, № 6. – C. 4748-62.
131. Narayanan D. et al. Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: an in vitro and in vivo analysis // *Nanomedicine*. – 2013. – T. 9, № 6. – C. 818-28.
132. Nel A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel // *Science*. – 2006. – T. 311, № 5761. – C. 622-7.
133. Nguyen K. C. et al. Mitochondrial Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dot Nanoparticles in Mammalian Hepatocytes // *Toxicological Sciences*. – 2015. – T. 146, № 1. – C. 31-42.
134. Nielsen L. et al. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism // *Biochemistry*. – 2001. – T. 40, № 20. – C. 6036-46.
135. Okamura S. et al. Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a patient with type 2 diabetes // *Diabetes Care*. – 2013. – T. 36, № 12. – C. e200.

136. Orłowski P. et al. Assessment of in vitro cellular responses of monocytes and keratinocytes to tannic acid modified silver nanoparticles // *Toxicology in Vitro*. – 2013. – T. 27, № 6. – C. 1798-808.
137. Pan Y. et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // *Small*. – 2007. – T. 3, № 11. – C. 1941-9.
138. Park E. J. et al. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells // *Toxicology*. – 2008. – T. 245, № 1-2. – C. 90-100.
139. Park E. J., Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro // *Toxicology Letters*. – 2009. – T. 184, № 1. – C. 18-25.
140. Park K. H. et al. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278, № 50. – C. 50212-6.
141. Parnia F. et al. Overview of Nanoparticle Coating of Dental Implants for Enhanced Osseointegration and Antimicrobial Purposes // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – T. 20, № 0. – C. 148-160.
142. Peckys D. B., de Jonge N. Visualizing Gold Nanoparticle Uptake in Live Cells with Liquid Scanning Transmission Electron Microscopy // *Nano Letters*. – 2011. – T. 11, № 4. – C. 1733-1738.
143. Pelaz B. et al. Diverse Applications of Nanomedicine // *ACS Nano*. – 2017. – T. 11, № 3. – C. 2313-2381.
144. Peng L. et al. Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells // *Biomaterials*. – 2013. – T. 34, № 37. – C. 9545-58.
145. Peuschel H. et al. c-Src-mediated activation of Erk1/2 is a reaction of epithelial cells to carbon nanoparticle treatment and may be a target for a molecular preventive strategy // *Biological Chemistry*. – 2010. – T. 391, № 11. – C. 1327-32.
146. Peynshaert K. et al. Exploiting Intrinsic Nanoparticle Toxicity: The Pros and Cons of Nanoparticle-Induced Autophagy in Biomedical Research // *Chemical Reviews*. – 2014. – T. 114, № 15. – C. 7581-7609.

147. Phillips E. et al. Clinical translation of an ultras-small inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe // *Science Translational Medicine*. – 2014. – T. 6, № 260. – C. 260ra149.
148. Piret J. P. et al. Differential toxicity of copper (II) oxide nanoparticles of similar hydrodynamic diameter on human differentiated intestinal Caco-2 cell monolayers is correlated in part to copper release and shape // *Nanotoxicology*. – 2012. – T. 6, № 7. – C. 789-803.
149. Poirier M. et al. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates // *Journal of Applied Toxicology*. – 2014. – T. 34, № 4. – C. 404-12.
150. Ponmani S., Nagarajan R., Sangwai J. Applications of Nanotechnology for Upstream Oil and Gas Industry // *Journal of Nano Research*. – 2013. – T. 24. – C. 7-15.
151. Pons T. et al. Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity // *ACS Nano*. – 2010. – T. 4, № 5. – C. 2531-8.
152. Powers E. T., Powers D. L. Mechanisms of Protein Fibril Formation: Nucleated Polymerization with Competing Off-Pathway Aggregation // *Biophysical Journal*. – 2008. – T. 94, № 2. – C. 379-391.
153. Puppi J. et al. Use of a clinically approved iron oxide MRI contrast agent to label human hepatocytes // *Cell Transplantation*. – 2011. – T. 20, № 6. – C. 963-75.
154. Radomski A. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis // *British Journal of Pharmacology*. – 2005. – T. 146, № 6. – C. 882-93.
155. Raj S. et al. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges // *Journal of pharmacy and bioallied sciences*. – 2012. – T. 4, № 3. – C. 186-193.
156. Ray P. C., Yu H., Fu P. P. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs // *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis and ecotoxicology reviews*. – 2009. – T. 27, № 1. – C. 1-35.

157. Recordati C. et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2016. – T. 13. – C. 12.
158. Reiss P. et al. Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials // *Chemical Reviews*. – 2016. – T. 116, № 18. – C. 10731-10819.
159. Rhoads L. S. et al. Cytotoxicity of nanostructured vanadium oxide on human cells in vitro // *Toxicology in Vitro*. – 2010. – T. 24, № 1. – C. 292-6.
160. Rizvi S. A. A., Saleh A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2018. – T. 26, № 1. – C. 64-70.
161. Rizvi S. B. et al. Near-infrared quantum dots for HER2 localization and imaging of cancer cells // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. – T. 9. – C. 1323-37.
162. Robe A. et al. Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice // *BMC Cancer*. – 2008. – T. 8. – C. 111.
163. Ruenraroengsak P. et al. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles // *Nanotoxicology*. – 2012. – T. 6, № 1. – C. 94-108.
164. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine // *J Nanobiotechnology*. – 2004. – T. 2, № 1. – C. 3.
165. Samia A. C. S., Chen X., Burda C. Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – T. 125, № 51. – C. 15736-15737.
166. Schaeublin N. M. et al. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity // *Nanoscale*. – 2011. – T. 3, № 2. – C. 410-20.
167. Schmid G. The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters // *Chemical Society Reviews*. – 2008. – T. 37, № 9. – C. 1909-30.
168. Shang L., Nienhaus K., Nienhaus G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2014. – T. 12, № 1. – C. 5.

169. Shukla R. K. et al. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells // *Toxicology in Vitro*. – 2011. – T. 25, № 1. – C. 231-41.
170. Singh B. R. et al. Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems // *Scientific reports*. – 2015. – T. 5. – C. 13719-13719.
171. Singh S. et al. Applications of Nanotechnology in Agricultural and their Role in Disease Management // *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2015. – T. 5. – C. 1-5.
172. Sivasubramanian M., Chuang Y. C., Lo L.-W. Evolution of Nanoparticle-Mediated Photodynamic Therapy: From Superficial to Deep-Seated Cancers // *Molecules*. – 2019. – T. 24, № 3. – C. 520.
173. Soenen S. J. et al. (Intra)cellular stability of inorganic nanoparticles: effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications // *Chemical Reviews*. – 2015. – T. 115, № 5. – C. 2109-35.
174. Soenen S. J. et al. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation // *Nano Today*. – 2011. – T. 6, № 5. – C. 446-465.
175. Sriram G., Bigliardi P. L., Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro // *European Journal of Cell Biology*. – 2015. – T. 94, № 11. – C. 483-512.
176. Stepnik M. et al. Cytotoxic effects in 3T3-L1 mouse and WI-38 human fibroblasts following 72 hour and 7 day exposures to commercial silica nanoparticles // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2012. – T. 263, № 1. – C. 89-101.
177. Sufian M. M. et al. Safety issues associated with the use of nanoparticles in human body // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2017. – T. 19. – C. 67-72.
178. Sukhanova A. et al. Quantum dots induce charge-specific amyloid-like fibrillation of insulin at physiological conditions // *Nanosystems in Engineering and Medicine*. – 2012. – T. 8548.

179. Sun D. et al. The effects of luminescent ruthenium(II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling // *Biomaterials*. – 2013. – T. 34, № 1. – C. 171-80.
180. Thubagere A., Reinhard B. M. Nanoparticle-induced apoptosis propagates through hydrogen-peroxide-mediated bystander killing: insights from a human intestinal epithelium in vitro model // *ACS Nano*. – 2010. – T. 4, № 7. – C. 3611-22.
181. Tilmaciu C.-M., Morris M. C. Carbon nanotube biosensors // *Frontiers in chemistry*. – 2015. – T. 3. – C. 59-59.
182. Timur S. et al. Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes // *Electrochemistry Communications*. – 2007. – T. 9, № 7. – C. 1810-1815.
183. Tsoi K. M. et al. Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies // *Accounts of Chemical Research*. – 2013. – T. 46, № 3. – C. 662-71.
184. Valizadeh A. et al. Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity // *Nanoscale research letters*. – 2012. – T. 7, № 1. – C. 480-480.
185. Van Lehn R. C. et al. Effect of Particle Diameter and Surface Composition on the Spontaneous Fusion of Monolayer-Protected Gold Nanoparticles with Lipid Bilayers // *Nano Letters*. – 2013. – T. 13, № 9. – C. 4060-4067.
186. Vankoningsloo S. et al. Cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in three skin cellular models: effects of sonication, dispersive agents and corneous layer of reconstructed epidermis // *Nanotoxicology*. – 2010. – T. 4, № 1. – C. 84-97.
187. Vannoy C. H., Leblanc R. M. Effects of DHLA-capped CdSe/ZnS quantum dots on the fibrillation of human serum albumin // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – T. 114, № 33. – C. 10881-8.
188. Vokhmintcev K. et al. Two-stage ZnS Shell Coating on the CuInS₂ Quantum Dots for Their Effective Solubilization // *KnE Energy*. – 2018. – T. 3. – C. 535.
189. Wang F. et al. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes // *Nanomedicine*. – 2013. – T. 9, № 8. – C. 1159-68.

190. Wang L.-W. et al. Quantum dots-based tissue and in vivo imaging in breast cancer researches: current status and future perspectives // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2015. – T. 151, № 1. – C. 7-17.
191. Wang L. et al. Toxicity of CdSe Nanoparticles in Caco-2 Cell Cultures // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2008. – T. 6, № 1. – C. 11.
192. Wang T. et al. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry // *ACS Nano*. – 2012. – T. 6, № 2. – C. 1251-9.
193. Wolfram J. et al. Safety of Nanoparticles in Medicine // *Current drug targets*. – 2015. – T. 16, № 14. – C. 1671-1681.
194. Wu X. et al. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells // *International Journal of Nanomedicine*. – 2010. – T. 5. – C. 385-99.
195. Xia T., Li N., Nel A. E. Potential health impact of nanoparticles // *Annual Review of Public Health*. – 2009. – T. 30. – C. 137-50.
196. Xia Y. et al. In vitro cytotoxicity of fluorescent silica nanoparticles hybridized with aggregation-induced emission luminogens for living cell imaging // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – T. 14, № 1. – C. 1080-92.
197. Xiao L. et al. Inhibition of beta 1-40 amyloid fibrillation with N-acetyl-L-cysteine capped quantum dots // *Biomaterials*. – 2010. – T. 31, № 1. – C. 91-8.
198. Xie Y. et al. Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air-liquid interface // *Toxicological Sciences*. – 2012. – T. 125, № 2. – C. 450-61.
199. Xu P. et al. Targeted charge-reversal nanoparticles for nuclear drug delivery // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2007. – T. 46, № 26. – C. 4999-5002.
200. Yan M. et al. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots // *Toxicology*. – 2011. – T. 282, № 3. – C. 94-103.
201. Yang H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition // *Journal of Applied Toxicology*. – 2009. – T. 29, № 1. – C. 69-78.

202. Yang R. S. et al. Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment // *Environmental Health Perspectives*. – 2007. – T. 115, № 9. – C. 1339-43.
203. Yang Z. et al. Mixed-quantum-dot solar cells // *Nature Communications*. – 2017. – T. 8, № 1. – C. 1325.
204. Yong K. T. et al. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies // *Chemical Society Reviews*. – 2013. – T. 42, № 3. – C. 1236-50.
205. Yu W. W. et al. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals // *Chemistry of Materials*. – 2003. – T. 15, № 14. – C. 2854-2860.
206. Zanganeh S. et al. Protein corona: Opportunities and challenges // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2016. – T. 75. – C. 143-7.
207. Zhan Q., Tang M. Research advances on apoptosis caused by quantum dots // *Biological Trace Element Research*. – 2014. – T. 161, № 1. – C. 3-12.
208. Zhang H. et al. Water-driven structure transformation in nanoparticles at room temperature // *Nature*. – 2003. – T. 424, № 6952. – C. 1025-9.
209. Zhang J. et al. Creating new fluorescent probes for cell biology // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2002. – T. 3, № 12. – C. 906-18.
210. Zhang L. W. et al. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2008. – T. 228, № 2. – C. 200-11.
211. Zhang S., Gao H., Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis // *ACS Nano*. – 2015. – T. 9, № 9. – C. 8655-8671.
212. Zhang T. et al. Liver Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dots (CdTe QDs) Due to Oxidative Stress in Vitro and in Vivo // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – T. 16, № 10. – C. 23279-99.
213. Zhang X. D. et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes // *International Journal of Nanomedicine*. – 2010. – T. 5. – C. 771-81.

214. Zhang Y. et al. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag₂S near-infrared quantum dots in mice // *Biomaterials*. – 2013. – Т. 34, № 14. – С. 3639-46.
215. Zhao X. et al. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent // *Archives of Toxicology*. – 2013. – Т. 87, № 6. – С. 1037-52.
216. Zhao Y. et al. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects // *ACS Nano*. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 1366-75.
217. Zheng X. et al. Cytotoxicity of cadmium-containing quantum dots based on a study using a microfluidic chip // *Nanotechnology*. – 2012. – Т. 23, № 5. – С. 055102.
218. Zhu M. T. et al. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment // *Toxicological Sciences*. – 2009. – Т. 107, № 2. – С. 342-51.
219. Екимов А. И. [и др.]. Квантовый размерный эффект в трёхмерных микрокристаллах полупроводников // *Письма в Журнал Экспериментальной и Теоретической Физики*. – 1981. – Т. 34. – С. 363-366.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Публикации в научных изданиях**

1. **Bozrova, S.**, Baryshnikova, M.A., Nabiev, I., Sukhanova, A. Semiconductor quantum dot toxicity in a mouse *in vivo* model // Journal of Physics: Conference Series. – 2017. – 784, 012013.
2. **Bozrova S.V.**, Baryshnikova M.A., Sokolova, Z.A., Nabiev, I.R., Sukhanova, A.V. In vitro cytotoxicity of CdSe/ZnS quantum dots and their interaction with biological systems // Knowledge E Energy and Physics. – 2018. – 58–63.
3. Sukhanova A., **Bozrova S.**, Sokolov P., Berestovoy M.; Karaulov A., Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties // Nanoscale Research Letters. – 2018. – P.13-44.
4. Ramos-Gomes, F., Bode, J., Sukhanova, A., **Bozrova, S.V.**, Saccomano, M., Mitkovski, M., Krueger, J.E., Wege, A.K., Stuehmer, W., Samokhvalov, P.S., Baty, D., Chames, P., Nabiev, I., Alves, F. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots // Nature: Scientific Reports. – 2018. – 8 (4595).
5. Nifontova, G.O., Baryshnikova M.B., **Bozrova S.V.**, Sokolova, Z.A., Nabiev, I.R., Sukhanova, A.V. Cytotoxicity of polyelectrolyte microcapsules encoded with semiconductor nanocrystals // Knowledge E Energy and Physics. – 2018. – 299–304.
6. Zvaigzne, M.A., Martynov, I.L., Voronin, V.S., **Bozrova, S.V.**, Vokhminceva, K.V., Goncharov, S.A., Dovzhenko, D.S., Korenkova, A.V., Samokhvalov, P.S., Nabiev, I.R., Chistyakov, A.A. Fine-tuning of silica coating procedure for preparation of biocompatible and bright PbS/SiO₂ QDs // Knowledge E Energy and Physics. – 2018. – 578–582.
7. Sukhanova, A., Poly, S., **Bozrova, S.**, Lambert, E., Ewald, E., Molinari, M., Karaulov, A.V., and Nabiev, I. Nanoparticles with a specific size and surface charge promote disruption of the secondary structure and amyloid-like fibrillation of human insulin under physiological conditions // Frontiers in Chemistry. - 2019. - doi: 10.3389/fchem.2019.00480

Патент на изобретение

Соколов П., Суханова А., **Бозрова С.**, Набиев И. Способ биологической визуализации // Патент РФ RU №2639125, регистрация в Государственном реестре изобретений РФ 19 декабря 2017.

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. – 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. – 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. – 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. – 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. –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. – 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. – 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. – 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. – P. 28.