

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Национальный исследовательский университет ИТМО»

*На правах рукописи*

**Фахардо Анна Фабиовна**

**Регуляция жизнеспособности клеток млекопитающих  
в условиях воздействия наноструктур**

03.01.04 - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук

Виноградов В.В.

Научный консультант:

Доктор медицинских наук

Штиль А.А.

Санкт-Петербург – 2020

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Биомедицинские аспекты применения современных нанотехнологий в терапии и диагностике .....	12
1.2 Биохимические изменения и цитотоксичность, обусловленные воздействием оксидов гафния, циркония, титана, магнетита, алюминия, тантала .....	15
1.3. Токсичность оксидов, циркония, титана, магнетита, алюминия, тантала in vivo .....	16
1.4 Медицинские задачи, решаемые с использованием НЧ .....	18
1.4.1 Увеличение эффективности радиотерапии с использованием радиосенсибилизаторов на основе НЧ оксидов металлов .....	18
1.4.2 Методы тераностики с использованием НЧ .....	24
1.4.3 Адресная доставка лекарственных средств с использованием НЧ .....	28
1.5 Технологии миРНК, CRISPR-Cas9, дезоксирибозимы как инструменты регуляции экспрессии генов .....	32
1.6 Проблема доставки генно-терапевтических конструкций в клетки. Доставка с помощью наночастиц .....	34
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	47
3.1 Физико- химические свойства непокрытых НЧ .....	47
3.2 Метаболическая активность клеток в присутствии непокрытых НЧ .....	51
3.3 Острая токсичность непокрытых НЧ .....	53
3.3.1 Поведенческие характеристики и токсикометрия .....	53
3.3.2 Данные аутопсии .....	55
3.3.3 Микроскопия .....	56

3.4	Изменение эффективности конъюгативного переноса плазмид мультирезистентности .....	58
3.5	Изменения компонентов врожденного иммунитета в присутствии НЧ.....	60
3.6	Метаболические изменения клеток в присутствии соединений на основе магнетита.....	63
3.6.1	Метаболическая активность клеток в присутствии стабильного золя магнетита.....	63
3.6.2	Метаболическая активность клеток в присутствии магнитных фотонных кристаллов (МФК).....	64
3.6.3	Метаболическая активность клеток в присутствии геля магнетита и магнитных наноконтейнеров .....	65
3.7	Влияние оксигидроксида алюминия на метаболическую активность клеток..	69
3.8	Изменения метаболической активности клеток в присутствии НЧ оксидов гафния, циркония и тантала .....	74
3.8.1	Влияние немодифицированного оксида гафния и оксида гафния, допированного 5% Lu + 5% Eu на метаболическую активность здоровых клеток	74
3.8.2	Влияние немодифицированных НЧ оксидов гафния и циркония, а также допированных иттербием (Yb) и эрбием (Er), на метаболическую активность неопухолевых и трансформированных клеток .....	77
3.8.3	Исследование радиосенсибилизации клеток с помощью НЧ оксидов тантала и гафния.....	79
3.9	Поведение ДНК- наноструктур в культурах клеток человека .....	81
3.9.1	Подбор оптимальных условий трансфекции.....	82
3.9.2	Влияние сложности организации ДНК конструкций на эффективность доставки в клетки .....	85
3.9.3	Исследование токсичности различных ДНК конструкций в культурах клеток человека.....	86

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	93
ВЫВОДЫ .....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Биомедицинские аспекты развития нанотехнологий приобрели решающее значение при практическом использовании наноингредиентов в медицине и фармацевтике. Исследованы многочисленные наноструктуры, однако на фармацевтическом рынке по-прежнему мало препаратов на их основе. Одной из основных проблем использования наноструктур в медицинских целях является их биосовместимость, токсичность, а также эффективность доставки. Открытие новых биологических приложений нанопрепаратов [113; 173] обосновывает необходимость исследования влияния наноформы на эффективность применения в новых областях и возможные токсические проявления.

Подходы к решению биомедицинских задач с помощью наноструктур можно разделить на два основных направления. В первом случае используют наночастицы (НЧ) на основе, как правило, металлов или оксидов металлов. При этом действие на ткани и клетки зачастую является неселективным, поэтому данные объекты нуждаются в дальнейшей модификации. Во втором подходе, более селективном, используют наноконструкции органического происхождения, зачастую представляющие собой ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, для доставки и терапии. Используя ковалентную модификацию, гибридизацию нуклеиновых кислот, биотин-авидиновое взаимодействие и интеркаляцию в ДНК-дуплекс, возможно эффективно загружать функциональные молекулы в ДНК-наноструктуры для доставки в клетки [98].

Систематическое изучение биомедицинских аспектов использования оксидов металлов требует изучения их токсикологических характеристик. Существующие исследования токсичности таких систем [38; 58; 77; 99; 169] не учитывают методы синтеза металлооксидных композиций и особенности формирования их поверхностного слоя, что затрудняет сопоставление данных, полученных в различных исследованиях. Аналогичная ситуация наблюдается и в области ДНК- и РНК- нанотехнологий: существует большое количество разрозненных данных о токсичности конструкций, однако мало внимания уделено

исследованию влияния последовательного усложнения структуры на метаболизм клеток и общую токсичность.

Наиболее распространенными металлооксидными системами для создания лекарственных наноформуляций являются оксиды железа, титана, алюминия, гафния, циркония и тантала. Важен выбор методов синтеза, позволяющих получать в воспроизводимых условиях наночастицы с размером 10-20 нм [42]. Таким образом, актуально исследование изменений метаболической активности клеток, а также общетоксического действия НЧ, полученных при близких условиях синтеза и обладающих сходными физико-химическими характеристиками. Токсикологические исследования свойств НЧ целесообразно также проводить после их модификации для определенных практических применений: адресной доставки лекарственных средств, использования в качестве адъювантов [33; 90; 115] и радиосенсибилизаторов [36; 93; 120; 122; 199].

Развитие технологий редактирования генома открывает новое направление молекулярной медицины, использующей в качестве инструмента миРНК, антисмысловые РНК и систему CRISPR-Cas9, обладающие определенными функциями [3; 73; 144]. Наибольшим потенциалом обладают молекулы, которым можно не только придать одну терапевтическую функцию, но и создать на их основе многофакторные «умные» системы. Для этих целей перспективны ДНК-наноконструкции на основе дезоксирибозимов, для которых критическими параметрами являются эффективность доставки, стабильность внутри клеток, а также токсикологические характеристики [78; 86; 96; 118], как требования к персонализированной медицине.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время опубликованы работы, посвященные влиянию наноструктур на метаболизм и выживаемость клеток. Изучена зависимость токсичности от размера и формы НЧ и эффективность проникновения в ткани. Например, известно, что токсикологические характеристики биосовместимых НЧ золота [23] снижаются при формировании наноструктуры в форме стержня, однако это приводит к менее эффективному проникновению в клетки млекопитающих [172]. Недостаточное

внимание уделено влиянию материала, из которого синтезированы наноструктуры, на метаболическую активность клеток, а также общую токсичность при единообразии физико-химических характеристик НЧ. Подобный пробел в данных исследованиях существует и для ДНК-наноконструкций: отсутствуют сопоставимые данные о влиянии последовательного усложнения наноструктуры на биохимические и токсикологические характеристики.

Функционализация известных лекарственных средств неорганическими НЧ приводит к появлению новых актуальных свойств препаратов. Описано пролонгирование действия лекарственных форм, заключённых в матрицы неорганических НЧ [12; 83; 182], а также адресная доставка лекарственных форм к мишени воздействия [197] при придании неорганическим наночастицам магнитных свойств [121]. Например, созданы эффективные способы комбинирования химиотерапии и радиотерапии с помощью мезопористых НЧ оксида танталла, загруженных доксорубицином [30]. ДНК-наноконструкции также могут служить для доставки лекарственных средств [98] и в качестве самостоятельных препаратов, которые можно модифицировать для различных применений [180]. На первоначальной стадии модификаций важным представляется изучение биосовместимости этих наноструктур.

**Целью диссертационной работы** являлись исследования регуляции жизнеспособности клеток млекопитающих, включая изменения метаболической активности (активности дегидрогеназ митохондрий), маркеров апоптоза/некроза, генерации активных форм кислорода, при воздействии новых наноструктур на основе НЧ оксидов металлов и ДНК.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. В культуре клеток и *in vivo* исследовать молекулярные механизмы ответа на воздействия НЧ оксидов металлов, синтезированных унифицированным методом;
2. Исследовать параметры отдельных компонентов врожденного иммунитета при действии НЧ оксидов металлов;

3. Изучить влияние на метаболическую активность новых наноструктур на основе НЧ оксидов металлов;
4. Исследовать радиосенсибилизирующий потенциал НЧ оксидов гафния и тантала;
5. Провести анализ эффективности доставки и токсичности ДНК-наноконструкций различного размера и структуры.

### **Научная новизна работы**

Впервые проведена сравнительная оценка метаболической активности клеток млекопитающих в присутствии НЧ, предназначенных для клинического применения, а также оценка их токсичности на уровне организма. Установлено, что НЧ оксидов железа, титана и тантала не вызывают значимых изменений метаболической активности клеток в концентрациях, позволяющих сохранить стабильность зольей, не индуцируют гибель клеток и не вызывают симптомы токсичности у мышей при внутрижелудочном введении дозы 3 г/кг. Впервые охарактеризовано влияние новых НЧ для адресной доставки лекарств, а также имеющих потенциал радиосенсибилизаторов, на метаболическую активность клеток. Систематически исследована эффективность доставки и токсичность ДНК-наноконструкций различной сложности. Усложнение организации ДНК-наноконструкции не ухудшает эффективность доставки в клетку и не увеличивает цитотоксичность.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Работа представляет собой комплекс фундаментальных и прикладных исследований регуляции жизнеспособности, а также отдельных биохимических процессов на клеточном и организменном уровнях при действии различных нанобиоматериалов.

Проведена сравнительная оценка токсичности в системах *in vitro* и *in vivo* непокрытых НЧ оксидов металлов, перспективных для биомедицинских исследований. Эти исследования создают фундаментальные представления о применении их производных в качестве носителей лекарств или

фармакологических субстанций. Результаты оценки влияния НЧ оксидов гафния и циркония, допированных редкоземельными ионами, на метаболическую активность клеток, будут использованы для разработки противоопухолевых радиосенсибилизаторов.

Результаты оценки эффективности внутриклеточной доставки, стабильности и токсичности ДНК-наноструктур различной сложности являются важными для использования в медицинских ДНК-нанотехнологиях.

**Методология и методы исследования.** В работе использовали неопухолевые и трансформированные перевиваемые клеточные линии человека и мышей линии Balb/c. Для оценки взаимодействия наноструктурированных материалов с клетками и влияния на метаболическую активность и выживаемость использовали цитологические, биохимические и молекулярно-биологические методы. Подробное описание методов исследования представлено в разделе «Материалы и методы».

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Метаболическая активность клеток (определяемая по активности дегидрогеназ) не подвергается значительным изменениям при воздействии немодифицированных НЧ  $AlOOH$ ,  $TiO_2$ ,  $Fe_3O_4$ ,  $ZrO_2$ ,  $HfO_2$ ,  $Ta_2O_5$  в концентрациях, не нарушающих биосовместимые коллоидные свойства среды. НЧ  $AlOOH$ ,  $TiO_2$ ,  $Fe_3O_4$ ,  $HfO_2$ ,  $Ta_2O_5$  относятся к IV классу безопасности веществ по результатам определения острой токсичности у лабораторных мышей. НЧ оксида циркония вызывают гибель животных при внутрижелудочном введении 3 г/кг.

2. НЧ  $Fe_3O_4$ ,  $AlOOH$ ,  $TiO_2$  вызывают статистически значимое увеличение экспрессии гена, кодирующего рецептор врожденного иммунитета TLR-6. НЧ  $AlOOH$  вызывают также индукцию экспрессии гена TLR-4.

3. Магнетитовые наноконтейнеры не вызывают формирования активных форм кислорода и угнетения метаболической активности клеток. Наночастицы бемита более токсичны по сравнению с алюминиевыми ксерогелевыми

наноконтейнерами. Последние хорошо проникают в клетки и могут быть перспективны в качестве системы доставки лекарств.

4. Метаболическая активность клеток не претерпевает значительных изменений при воздействии немодифицированных и допированных НЧ  $\text{HfO}_2$  (<0.5 мг/мл). При допировании  $\text{HfO}_2$  тербием и иттербием увеличение доли лантаноидов ведет к подавлению метаболической активности клеток и индукции гибели клеток. При сравнении радиосенсибилизации НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ , последний оказывал более сильное подавляющее действие на колониобразование клеток.

5. Метаболическая активность клеток не подвергается значительным изменениям при воздействии ДНК-наноконструкций, состоящих из комплементарных цепей ДНК-олигонуклеотидов с присоединенным дезоксирибозимом, катализирующим РНК. Усложнение структуры ДНК-конструкции не увеличивает ее токсичность и эффективность доставки в клетки.

6. Усложнение уровня организации наноструктур на основе оксидов металлов и ДНК- наноконструкций, рассмотренных в данном исследовании, не приводит к увеличению их токсического действия на изученные биологические системы.

### **Степень достоверности и апробация материалов диссертации**

Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также статистической обработкой данных.

Материалы диссертационного исследования были представлены на 7 конференциях: «Конгресс молодых ученых» (Санкт- Петербург, 2017 г.); Фундаментальная наука и клиническая медицина: 20-я Международная медико-биологическая конференция молодых ученых (Санкт-Петербург, 2017 г.); X Международная конференция молодых ученых "МЕНДЕЛЕЕВ-2017" (Санкт-Петербург, 2017); 1-я международная школа-конференция "Умные наносистемы для трансляционной медицины" (Санкт- Петербург, 2017 г.); Научно-учебно-

методическая конференция Университета ИТМО (Санкт-Петербург, 2018 и 2019 г.); XXVII Зимняя научная школа для молодых ученых «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 12 статей в источниках, индексируемых в международных базах данных Scopus/Web of Science и 1 глава в монографии, получен 1 патент на изобретение.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, описания результатов исследования, заключения, обсуждения полученных результатов, списка обозначений и сокращений, а также списка использованных источников. Текст диссертации изложен на 122 печатных страницах, проиллюстрирован 31 рисунком, 10 таблицами. Список литературы содержит 199 литературных источников, из них 4 отечественных и 195 иностранных. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075-15-2019-1896)

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Биомедицинские аспекты применения современных нанотехнологий в терапии и диагностике

Нанотехнологии - основа быстро развивающихся новых диагностических и терапевтических подходов во многих областях биологии и медицины. Пожалуй, наиболее активно используемым для биомедицинских применений классом НЧ являются металлические НЧ. Поэтому, данная работа сфокусирована на изучении различных биохимических процессов в культурах клеток человека, таких как метаболическая активность, уровень активных форм кислорода, индукция апоптоза/некроза в присутствии НЧ оксидов металлов, как необходимая составляющая изучения их потенциала для биомедицины.

Нанотоксикология занимается исследованием взаимодействия наноструктур с биологическими системами, изучая связь между физическими и химическими свойствами, а именно химией поверхности, составом, размером, формой и агрегацией с индукцией биологических ответов, обусловленных токсичностью. Согласно Кирхнеру и др., существует три возможных пути, по которым наночастицы могут оказывать воздействие на организм. Возможно высвобождение в окружающие ткани металла с токсическими свойствами, используемого в синтезе наноматериала. Другой путь – прикрепление НЧ к поверхности клеточных мембран с непредсказуемыми эффектами. Кроме того, разные формы частиц одной и той же элементной природы могут отличаться по уровню влияния на организм: например, карбоновые нанотрубки обладают большим токсическим эффектом, чем уголь и графит [169].

При изготовлении средств личной гигиены широко используются НЧ оксида алюминия. Был показан антимикробный эффект НЧ оксида алюминия на модели *Escherichia coli* [150]. Для других НЧ, имеющих положительный заряд поверхности, таких как НЧ оксидов цинка, церия и кобальта, также было показано их токсическое действие на грамм- отрицательные бактерии. Подобный эффект, возможно, обусловлен электростатическим взаимодействием за счет разных зарядов, так как большая часть грамм- отрицательных бактерий имеют

отрицательный заряд на поверхности клетки при рН, близком к нейтральному [56; 123]. Наночастицы бемита широко используется, в том числе, в качестве иммуноадьюванта, одобренного FDA [100].

Для таких областей, как магнитно-резонансная томография (МРТ), адресная доставка лекарств и генов, терапии онкологических заболеваний магнитной гипертермией, тканевой инженерии, мониторинга и разделения клеток используют магнитные наночастицы (МНЧ). Они представляют собой передовой инструмент, поскольку могут одновременно быть функционализированы и управляться внешним магнитным полем. Интеграция вместе терапевтических и диагностических задач (то есть, тераностика) привела к появлению таких методов, как МРТ-управляемая заместительная терапия или МРТ-визуализация доставки, основанной на наличии специфических маркерных генов [160]. НЧ магнетита были одобрены в качестве контрастного вещества и лекарственного средства против анемии – Ферумокситола [13; 109].

При производстве средств личной гигиены, таких как солнцезащитные средства, косметические средства, зубная паста и т. д. часто используются НЧ диоксида титана и оксида цинка [129; 163]. Кроме того, серебряные НЧ все чаще используются в качестве антимикробных добавок в моющих средствах, упаковке для пищевых продуктов и текстиле. Оксид циркония широко используется в качестве имплантатов [6; 165]. Рыночная стоимость продукции, связанной с нанотехнологиями, в 2011–2015 гг. составила около 100 миллиардов долларов США в год [169].

Одним из наиболее часто используемых подходов к лечению онкологических заболеваний является радиотерапия, однако большой проблемой является действие излучения на здоровые ткани. По этой причине высокой актуальностью обладают разработки радиосенсибилизаторов, позволяющих локально сконцентрировать и усилить эффект от облучения. Оксид гафния находится на терминальных стадиях клинических испытаний [18]. Оксид тантала также обладает потенциалом в качестве радиосенсибилизатора [22; 167], который может оказывать двойное действие, обеспечивая радиосенсибилизирующий

эффект, а также является самостоятельным лекарственным средством [30] и его токсичность оказалась ниже, чем используемые в настоящее время материалы.

Важным аспектом является потенциальное токсическое действие лекарственных средств, содержащих различные модификации наноматериалов, которые уже находятся на стадии клинических испытаний или одобрены FDA, или имеют большие шансы вскоре перейти в стадию клинических испытаний, так как имеют перспективные химические, физические и биологические характеристики. Вышесказанное явилось предпосылкой для рассмотрения в данной работе влияния на биохимические процессы в клетках млекопитающих нескольких групп металлооксидных систем. Первый класс - контрастные вещества на основе магнетита - наиболее перспективное в этой области соединение, состоящее из НЧ. Вторая группа – системы, которые обладают потенциалом для использования в производстве вакцин – наиболее часто используемым адъювантом является бемит. Третья группа - оксиды металлов, используемых для изготовления имплантатов. В этой группе наиболее распространенными являются диоксид титана и диоксид циркония. Четвертая группа, активно развивающаяся в настоящее время и особенно важная для настоящего исследования – радиосенсибилизаторы [119]. Препарат на основе НЧ оксида гафния в настоящее время находится на последних стадиях клинических испытаний, и существует много опубликованных исследований радиосенсибилизаторов на основе оксида тантала. На данный момент клинических исследований безопасности и эффективности оксида тантала еще не было проведено, однако учитывая, что данные НЧ обладают перспективными физическими свойствами, обусловленными более высоким атомным номером и низкой токсичностью, целесообразно рассмотреть его также в этом исследовании.

НЧ благородных металлов используют для фототермической терапии, которая является менее инвазивной техникой и имеет перспективы для лечения онкологических заболеваний. В данной методике задействуют лазер с длинами волн 650 - 900нм, которые способны проникать в ткани, и оптически поглощающие НЧ, способные преобразовывать оптическое излучение в

тепловую энергию, вызывающую фототермическую абляцию в пикосекундном диапазоне [35]. Для данных целей используют наноструктуры золота различных форм, такие как Au-нанораковины [94; 106; 107], Au-наноконтейнеры [28; 162; 193] и сферические Au НЧ [71] – все они также продемонстрировали эффективное фототермическое разрушение раковых клеток и тканей. Модифицированные ПЭГ Au-НЧ (силика / ядро Au / оболочка НЧ), введенные внутривенно мышам с опухолями, показали пассивное накопление в опухолевой ткани вследствие высокой васкуляризации и более рыхлой ткани сосудов опухоли. Быстрый нагрев Au-нанораковины при облучении лазером с ближним инфракрасным излучением позволил достичь эффективной фототермической абляции опухоли у мыши [55]. Также, Au НЧ используются в качестве средств доставки противоопухолевых лекарств, таких как лекарства на основе паклитаксела или платины (Pt-) (например, цисплатин, оксалиплатин и т. д.) [35].

1.2 Биохимические изменения и цитотоксичность, обусловленные воздействием оксидов гафния, циркония, титана, магнетита, алюминия, тантала

У НЧ оксида железа множество применений – от контрастных агентов для МРТ до противоопухолевой гипертермии и магнитно-контролируемой доставки лекарств. В многочисленных исследованиях золь было показано отсутствие цитотоксичности магнетита для культивируемых клеток человека [181]. НЧ оксида алюминия вызывали незначительный цитотоксический эффект (> 90% жизнеспособности) для линий рака мочевого пузыря ВJ и лейкоза L929 только в концентрациях до 400 мкг/мл [147]. Напротив, другие исследователи показали довольно сильные антипролиферативные и цитотоксические эффекты частиц оксида алюминия размером 0,43 мкм и 2,81 мкм на макрофагах J774.2 при концентрациях выше 0,025 мг / мл [133]. Инкубация макрофагов с частицами оксида алюминия вызывает продукцию фактора некроза опухоли (ФНО- альфа), активацию каспазы-3 и поли(АДФ-рибозы)-полимеразы (ПАРП) и в конечной стадии фрагментацию ДНК, как терминальную стадию апоптоза, при соотношении более 125 частиц оксида алюминия на одну клетку. Алюминий

используется для создания у животных модели болезни Альцгеймера, так как есть данные о повышении содержания алюминия в мозговой ткани пациентов [126; 139].

Сообщалось, что оксид тантала оказывает лишь незначительное влияние на жизнеспособность клеток даже при очень высокой дозе (2,4 мг / мл) [131].

Известно использование НЧ оксида гафния для повышения дозы в лучевой терапии, причем эти материалы не показали токсичности в культуре клеток и *in vivo* в отсутствие облучения [111]. Ранее было показано, что НЧ оксида гафния безопасны для человеческих клеток HaCaT даже при 2000 мг / л [49]. Оксид гафния, допированный редкоземельными элементами, нетоксичен и может быть использован для создания тераностических композиций [53]. НЧ диоксида циркония, допированные тербием ( $ZrO_2-Tb$ ) были инертными для клеточной линии фибробластов ФЛЭЧ при концентрациях до 540 мкг / мл [104]. Однако 30 м.д. НЧ  $ZrO_2$  снижали жизнеспособность клеток MSTO и 3T3 фибробластов на 50% [23]. В то же время широкое использование диоксида циркония в зубном протезировании предполагает, что эти материалы не токсичны.

Было обнаружено, что жизнеспособность клеток зависит от дозы и времени воздействия НЧ диоксида титана ( $TiO_2$ ). В соответствии с результатами МТТ теста цитотоксическое действие НЧ  $TiO_2$  после 48 часов инкубации было довольно слабым для клеток эпидермиса человека (A431) [169].

Несмотря на разнообразие данных о токсичности НЧ, отсутствуют сведения о систематических исследованиях НЧ, синтезированных одним методом с использованием соответствующих прекурсоров, для оценки токсического влияния частиц без покрытия.

### 1.3. Токсичность оксидов, циркония, титана, магнетита, алюминия, тантала *in vivo*

НЧ имеют различную афинность к клеткам и тканям в системах *in vitro* и *in vivo*, при этом чаще всего накапливаются в клетках макрофагального типа (фагоцитирующих клетках крови и гистиоцитах) и ретикулоэндотелиальных

клетках. При этом в тканях печени, селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, почек наблюдается разный уровень накопления [31; 38; 95]. Важной характеристикой НЧ, влияющей на скорость почечного клиренса и избегание распознавания иммунной системой, является размер, изменением которого можно достичь увеличения времени циркуляции и биодоступности для терапевтических целей. «Например, гидрофильные НЧ размером от 10 до 100 нм достаточно малы, чтобы вызвать более медленную активацию системы мононуклеарных фагоцитов, но достаточно велики, чтобы избежать фильтрации почками» [54]. Известно, что НЧ могут вызывать как стимуляцию, так и подавление иммунного ответа, при этом направление его развития зависит от химии поверхности. Зависимость биосовместимости НЧ от их растворимости, размера и формы, а также модификаций поверхности довольно хорошо изучена [38].

Информация о токсичности оксида титана противоречива [99]. Не было обнаружено острой токсичности у мышей после перорального введения НЧ  $\text{TiO}_2$  размером 25 нм, 80 нм и 155 нм при дозе 5 г / кг. Тем не менее, авторы наблюдали изменения в уровне АЛТ, АСТ, ЛДГ; патологические изменения в печени, выраженные дегенеративными изменениями вокруг центральной вены и некрозом гепатоцитов. Также в экспериментальных группах обнаруживались признаки нефротоксического действия в виде повышенного уровня азота мочевины крови и морфологических изменений почек. Значительные изменения в уровне ЛДГ и альфа- гидроксibuтират дегидрогеназы (ГБДГ) в сыворотке крови после введения НЧ диоксида титана размером 25 и 80 нм говорят о повреждениях миокарда. Что касается распределения в тканях, то исследуемые НЧ накапливались в основном в печени, селезенке и почках.[158; 186]. Внутрибрюшинные инъекции 1944 мг / кг и 2592 мг / кг суспензий  $\text{TiO}_2$  были летальными [29]. При остром ингаляционном введении НЧ  $\text{TiO}_2$  размером 2-5 нм мышам в дозах 0,77 мг/м<sup>3</sup> и 7,22 мг/м<sup>3</sup>, у животных наблюдался умеренный воспалительный ответ в легких, выраженный повышенным количеством макрофагов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа [57; 169]. В исследовании Вонга и коллег было показано, что даже при внутрижелудочном введении такой высокой дозы как 5 г/кг, через две недели

после введения частицы  $\text{TiO}_2$  не продемонстрировали острой токсичности, гибели животных не было зафиксировано. Тем не менее, у мышей- самок наблюдались высокие массовые коэффициенты печени в группах, которым вводили НЧ размером 25 и 80 нм. Изменения биохимических параметров сыворотки (АЛТ/ АСТ, ЛДГ) и морфологические изменения печени показали, что повреждение органа было вызвано воздействием частиц  $\text{TiO}_2$  разного размера. Кроме того, в экспериментальных группах наблюдалась нефротоксичность, выражавшаяся в повышении уровня азота мочевины крови и патологических изменениях почек. Тем не менее, не было обнаружено патологических изменений в сердце, легких, яичках и тканях селезенки. Изучение биораспределения показало, что  $\text{TiO}_2$  в основном задерживается в тканях печени, селезенки, почек и легких, что указывает на то, что частицы  $\text{TiO}_2$  могут проникать в другие ткани и органы после всасывания в желудочно-кишечном тракте [186].

При исследовании *in vivo* токсичности оксида тантала, никаких побочных эффектов не было зарегистрировано после однократного введения крысам 840 мг / кг НЧ, используемых для рентгеновской компьютерной томографии [131].

## 1.4 Медицинские задачи, решаемые с использованием НЧ

### 1.4.1 Увеличение эффективности радиотерапии с использованием радиосенсибилизаторов на основе НЧ оксидов металлов

Радиационная сенсibilизация – это процесс повышения восприимчивости опухолевых тканей к повреждению, вызываемому ионизирующим излучением. Радиосенсибилизаторы усиливают эффективность лучевой терапии. За последние несколько лет значительно возрос интерес к использованию химических соединений для усиления радиотерапевтического воздействия, особенно с использованием НЧ на основе металлов (главным образом, золота) [67]. Высокая локальная концентрация металлических частиц может способствовать селективному рассеиванию и / или поглощению гамма- и рентгеновского излучения высокой энергии. Это позволяет более избирательно концентрировать

излучение в клеточных компонентах опухолевых тканей, обеспечивая более локализованное и консолидированное повреждение.

Радиосенсибилизаторы также обеспечивают улучшение эффективности взаимодействия с фотонами этих излучений [26; 137]. Фотоэлектронное рассеяние при воздействии гамма-излучения на поверхность металлов также считается механизмом повышения активности. Сочетание описанных явлений приводит к снижению терапевтической дозы облучения и минимизации повреждения здоровой ткани. Использование радиосенсибилизаторов на основе наноматериалов носит название усовершенствованной рентгеновской терапии наночастицами или NEXТ [145]. В середине 70х годов XX века были проведены первые исследования, демонстрирующие усиленное радиационное повреждение хромосомной ДНК, при которых у пациентов, проходящих йодную ангиографию, было обнаружено токсическое действие на лимфоциты [5]. Исследования *in vitro*, проведенные в тот же период, также показали аналогичное усиление цитотоксического действия радиации в присутствии йода [114]. Это привело к разработке концепции, согласно которой материал с высоким  $Z$  (атомным номером) при накоплении в клетках приводит к более высокой эффективности радиационного повреждения клеток. В отдельных исследованиях [66] было продемонстрировано, что в клетках, выращенных на золотой пленке, происходит многократное и значительное увеличение дозы при облучении. В других исследованиях опухолевые клетки после инкубации с НЧ золота размером  $\sim 3$  мкм, показали значительное снижение выживаемости после облучения [67]. Однако, большой размер НЧ затруднял их равномерное распределение в тканях солидных опухолей *in vivo*. Таким образом, в дальнейших исследованиях НЧ золота меньшего размера были значительно оптимизированы и использованы для экспериментального лечения различных форм рака.

Механизм действия радиосенсибилизаторов заключается в следующем. Наиболее подходящими для лучевой терапии рака является ионизирующая радиация – рентгеновские лучи (Х-лучи). При действии на атом металла ионизирующего излучения возможна эмиссия различного вида частиц: фотонов,

фотоэлектронов, комптоновских электронов, Оже-электронов и флуоресцентных фотонов (Рис.1). Ионизирующее излучение выбивает из атома электрон с кинетической энергией, эквивалентной разности энергии излучения и энергии связи электрона в атоме. Эта энергия определяет дальность повреждающего действия электрона в ткани. Фотоэлектрический эффект определяют как  $(Z / E)^3$ , где  $E$  - энергия входящего фотона, а  $Z$  – атомный номер молекулы-мишени. Электроны Оже и флуоресцентные фотоны формируются, когда вакансии, образованные выбитыми электронами, занимают электроны вышележащих электронных уровней, и происходит высвобождение энергии. Рентгеновские фотоны имеют низкую энергию, но более широкий диапазон распространения в ткани. Оже-электроны имеют гораздо более короткий диапазон распространения, но могут генерировать более высокую плотность ионизации в локализованной области. Результаты взаимодействия рентгеновских лучей с НЧ с высоким  $Z$  обобщены на рисунке 1 [93].

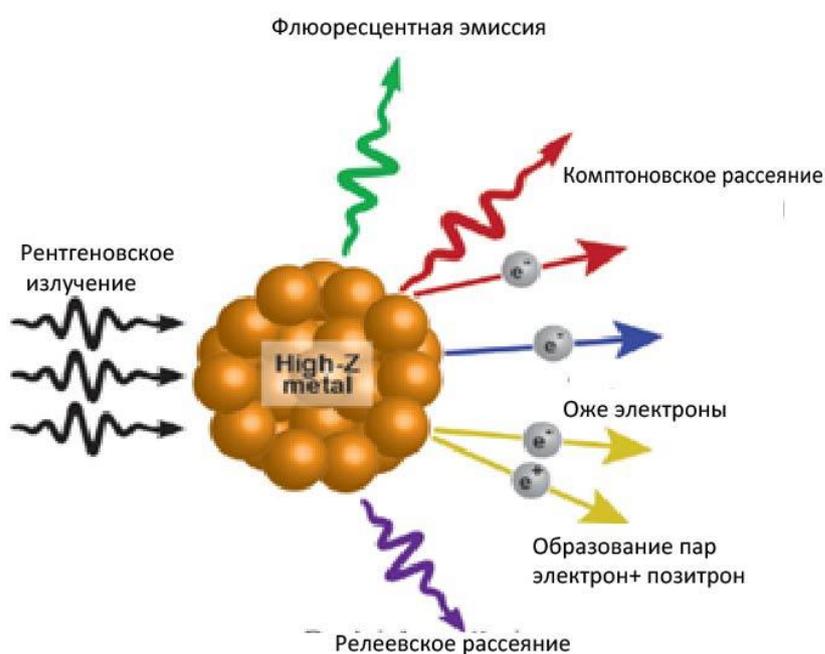


Рисунок 1 – Схема взаимодействия рентгеновских лучей с атомами НЧ элементов с высокими атомными номерами [93]

Одними из наиболее распространенных частиц, используемых в качестве радиосенсибилизаторов, являются НЧ золота, материала с высоким  $Z$  ( $Z = 79$ ),

инертного к тканевым взаимодействиям, и обладающие высокой биосовместимостью. Также золотые НЧ усиливают эффект радиации в большом радиусе в зоне локализации, что избавляет от необходимости доставлять частицы во все клетки опухоли. Сенсибилизация возможна по трем путям: физическому, описанному выше, химическому и биологическому. Химический путь осуществляется за счет интеркаляции золотых НЧ в цепи молекул ДНК и сенсибилизации к воздействию ионизирующего излучения, а также за счет каталитической активности НЧ. Последняя осуществляется путем катализа золотыми НЧ радикальных реакций, в результате чего увеличивается продукция АФК, и наступает оксидативный стресс. Биологический путь радиосенсибилизации осуществляется за счет нарушения клеточного цикла, оксидативного стресса, а также замедления процессов репарации ДНК [66].

НЧ эффективно попадают в системный кровоток и циркулируют достаточно долго для обеспечения терапевтического эффекта. Физико-химические свойства золота позволяют осуществлять визуализацию, что значительно облегчает фармакокинетические исследования. Золотые НЧ возможно синтезировать различных размеров и форм, а также функционализировать антителами, чтобы достичь наилучшего эффекта при доставке к опухоли. [93]

Соединения гадолиния были идентифицированы как еще одна новая группа радиосенсибилизаторов, которые также легко визуализировать *in vivo* с помощью магнитно-резонансной томографии. Известно, что при действии на атомы гадолиния гидратированных электронов образуются долгоживущие катионы пи-радикалов. Эффективность гадолиния как радиосенсибилизатора была подтверждена при исследовании *in vitro* на клетках HT-29 и на модели мышечной карциномы молочной железы [196]. Гадолиниевая нейтронзахватная терапия (НКТ) – терапевтическая стратегия лечения рака, в которой используется реакция «гадолиний-нейтронного захвата», вызванная тепловым нейтронным облучением. Реакция приводит к эмиссии гамма-лучей большой дальности, электронов внутренней конверсии, рентгеновских лучей и Оже-электронов с большой общей кинетической энергией. Эффективность метода оценена при использовании НЧ

хитозана, нагруженных гадолинием-157. Препарат вводили внутривенно мышам с подкожной меланомой и проводили тепловое нейтронное облучение. Лучший терапевтический ответ показан на мышах, которым были введены НЧ, по сравнению с мышами, которым вводили только раствор гадолиния [174]. Недавно проведено подробное исследование на клетках плоскоклеточной карциномы головы и шеи с использованием НЧ на основе гадолиния размером 5 нм. Частицы состояли из ядра оксида гадолиния, оболочки из полисилоксана и были функционализированы диэтилентриаминпентауксусной кислотой. Обнаружено, что состав обладает эффективными радиосенсибилизирующими свойствами *in vitro* при энергии 660 кэВ [122; 149].

Также показано, что диоксид титана может быть использован для усиления цитотоксического действия на опухолевые клетки посредством фотокатализа [168]. Механизм заключается в генерации активных форм кислорода (АФК) при фотовозбуждении УФ-излучением. Метод менее эффективен для опухолей, глубоко расположенных в тканях, из-за ограниченности проникновения УФ-лучей. Для повышения чувствительности тканей к рентгеновскому излучению сформированы НЧ титана, содержащие гадолиний другие редкоземельные металлы. Активация этих НЧ рентгеновскими лучами способствовала образованию АФК, что привело к усилению эффектов фотосенсибилизации *in vivo* [176]. Удлиненные органические НЧ интернализуются клеткой эффективнее, чем НЧ сферической формы аналогичного объема из-за более эффективных поливалентных катионных взаимодействий НЧ с плазматической мембраной благодаря большей площади поверхности. Это послужило основанием для разработки нанотрубок из диоксида титана, радиосенсибилизирующее действие которых испытано на модели глиобластомы [58]. Показано, что нанотрубки  $\text{TiO}_2$  являются эффективными радиосенсибилизаторами в клетках линий SNB-19 и U87MG, усиливая повреждение ДНК [120]. Различные методы использовались для усиления радиосенсибилизирующего действия НЧ  $\text{TiO}_2$ , например, покрытие красителем [17] или введение в состав композиции интеркалирующего химиотерапевтического препарата доксорубицина [70]. Было показано, что УФ-

облучение НЧ  $\text{TiO}_2$  перед добавлением в культуральную среду (пре-фотоактивация) усиливает цитотоксические эффекты в клетках НерG2, индуцируя двухцепочечные разрывы ДНК. Воздействие УФ-излучения сообщает частицам энергию, достаточную для возбуждения электронов и их перехода из валентной зоны в зону проводимости, что приводит к образованию высокоактивных электронно-дырочных пар, способствуя генерации в клетках, содержащих НЧ, токсичных АФК [140].

НЧ серебра также обладают радиосенсибилизирующими свойствами, подобными наблюдавшимся для НЧ золота [110]. Механизм радиосенсибилизирующего действия НЧ серебра аналогичен описанному выше действию атомов с высоким порядковым номером ( $Z$ ). Синтез НЧ серебра более экономичен в сравнении с НЧ золота, однако они уступают последним по показателю биосовместимости ( $\text{IC}_{50} = 350 \pm 3.14$  мкг/л) [36]. НЧ серебра использовали отдельно [199] или в комбинации с другими оксидами металлов, например  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , для лучевой терапии. Также была исследована возможность использования в качестве радиосенсибилизаторов НЧ серебра, имеющих разнообразную форму. На модели клеток немелкоклеточного рака легких человека лучшую радиосенсибилизирующую активность проявили треугольные НЧ серебра, покрытые хитозаном. Сравнение проводили с НЧ золота, покрытыми ПЭГ [14]. На клеточных линиях глиомы было показано, что противораковые свойства НЧ серебра с несколькими разными покрытиями обладают аддитивностью при сочетании с ИК-излучением [194].

Перспективу использования в радиотерапии имеет оксид гафния ( $\text{HfO}_2$ ), обладающий фотолуминесцентными свойствами [21]. НЧ  $\text{HfO}_2$  могут вызывать термическое повреждение клеток при облучении. Это послужило основанием для изучения радиосенсибилизирующих свойств НЧ  $\text{HfO}_2$  в клетках НСТ116 *in vitro* и на моделях мышей с ксенографтами *in vivo*. Исследования показали хорошую биосовместимость, биораспределение, а также значительную радиосенсибилизацию с использованием этих НЧ [111]. Радиосенсибилизирующее действие препарата NBTXR3 на основе НЧ оксида

гафния не влияет на конкретные сигнальные пути на этапе физических процессов, происходящих при взаимодействии излучения с НЧ, поэтому препарат универсален, что позволяет использовать его для разных типов опухолей. Кроме того, введение NBTXR3 непосредственно в опухоль также позволяет контролировать локализацию, повышает биодоступность и ограничивает воздействие на ткани, как показано в клинических исследованиях. Таким образом, NBTXR3 можно использовать для лечения отдельных солидных опухолей, включая метастазирующие [20].

#### 1.4.2 Методы тераностики с использованием НЧ

##### *МНЧ для тераностических платформ*

Тераностика (объединение терапевтического и диагностического подходов) направлена на развитие персонализированной медицины [134]. Магнитные наночастицы (МНЧ) представляют собой особенно хорошо подходящий для этого инструмент, благодаря возможности функционализации и направляемости внешним магнитным полем. Создание новых дизайнов сфокусировано на сложных многослойных МНЧ для разработки систем контролируемой доставки. Функционализированные МНЧ использовали для неинвазивной визуализации трансгенной экспрессии с помощью магниторезонансного изображения. В данной модели монокристаллические МНЧ, покрытые декстраном, были модифицированы трансферином, что позволяло отслеживать экспрессию трансферинового рецептора [190]. С помощью МНЧ осуществлена МРТ - управляемая терапевтическая замена клеток [24], МРТ-диагностика и операции с использованием единого состава МНЧ [87; 88].

Терапевтические применения МНЧ возможны для проведения магнитной гипертермии, доставки лекарственных препаратов, а также доставки генов в генной и тканевой инженерии. МНЧ могут быть использованы для диагностической визуализации или в качестве платформы для создания биосенсоров.

### *Магнитная гипертермия*

Гипертермия – метод лечения опухолей, основанный на локальном нагревании очага выше 43 °С в течение 30-60 минут [135]. МНЧ могут генерировать тепловое воздействие в переменных магнитных полях из-за потерь энергии при прохождении петли магнитного гистерезиса [72]. Обеспечение различной степени нагрева зависит от намагниченности конкретных МНЧ и параметров магнитного поля [60]. Селективность к опухолям была значительно улучшена благодаря использованию силановых покрытий [81; 82] и функционализации МНЧ. Например, при конъюгации МНЧ с антителами к антигенам раковых клеток, улучшалась селективность поглощения МНЧ опухолями при гипертермической терапии [76]. Магнитную гипертермию с применением магнитных катионных липосом использовали в комбинированном подходе с генной терапией TNF- $\alpha$ , запускаемой стресс-индуцируемым промотором gadd153. Это приводило к резкому прекращению роста опухоли. В модели мышей Nude магнитные катионные липосомы индуцировали гибель клеток в большей части опухолей при нагреве в переменном магнитном поле. Тепловой шок вызывало повышение уровня экспрессии TNF- $\alpha$  под контролем стресс-индуцируемого промотора, что позволяло локализовать воздействие [75].

### *Магнитно-резонансная томография (МРТ)*

МРТ с использованием МНЧ основана на превосходных суперпарамагнитных свойствах МНЧ оксидов железа [76]. Несколько покрытых декстраном составов МНЧ одобрены для клинического использования в качестве контрастных средств для МРТ: ферумоксиды, ферумокстран и ферукарботран [11]. Результативность использования МНЧ с декстрановым покрытием, конъюгированных с трансферрином, для МРТ-диагностики значительно превосходит другие неинвазивные методы выявления метастазов в лимфатических узлах из солидных опухолей и гистологически положительных лимфатических узлов за пределами обычного поля резекции [69]. Применение МНЧ для определения границ первичных опухолей и выявления метастазов, для визуализации ангиогенеза и картирования сосудов в первичных опухолях, для

отслеживания клеток иммунной системы (моноцитов, макрофагов, Т-клеток) имеет перспективы применения в клинической практике [11; 117]. Макрофаг-специфичные протоколы мечения МНЧ используют для визуализации очагов воспаления (при ревматоидном артрите), атеросклероза, рассеянного склероза [11; 46; 117]. FITC-конъюгированные МНЧ использовали в хирургии для определения границ глиомы как до операции, на основе метода МРТ, так и во время операции, благодаря использованию флуоресцентной метки [87; 88]. Это особенно ценно, поскольку определить границы инфильтративной опухоли при радикальном иссечении затруднительно.

Ряд исследований демонстрирует огромный потенциал молекулярной МРТ с использованием МНЧ для комбинированной визуализации и доставки лекарственного средства / гена. Например, монокристаллические МНЧ оксида железа (ядро 3 нм), стерически защищенные слоем низкомолекулярного декстрана и ковалентно конъюгированные с холо-трансферрином, способствуют сверхэкспрессии сконструированного рецептора трансферрина для селективной визуализации опухолей *in vivo* с помощью МРТ в режиме реального времени при исключительно высоком пространственном разрешении [190].

#### *Биосепарация и биосенсоры*

Модифицированные стрептавидином магнитные шарики используют для сортировки клеток, включая стволовые клетки [116], субпопуляций нейронов [179] и др. [61; 117]. Магнитные микросферы, конъюгированные с моноклональными антителами, могут быть использованы для сорбции из крови полипептидных медиаторов и антител при системном воспалении и аутоиммунных заболеваниях [189].

Принципы магнитной биосепарации на основе МНЧ применены к интегративным биосенсорным технологиям. Например, сверхчувствительные био-штрих-коды могут обнаруживать белковые аналиты «сэндвич»-методом, что показано на примере простатспецифического антигена. Для этого сконструирована система, состоящая из конъюгированных с микрочастицами антител и НЧ, меченных ДНК, специфичной для белкового антигена и

присоединенных антител. Последние способны образовывать «сэндвич» с целевым антигеном, связанным микрочастицами. Предел чувствительности данного метода составляет 30 атто-моль [124].

#### *Адресная доставка лекарств*

Разработка систем адресной доставки является сложной и важной для медицины задачей. Принципы магнитного нацеливания препаратов, конъюгированных с МНЧ, были применены экспериментально и прошли клинические испытания в терапии онкологических заболеваний [45]. При внутривенном введении МНЧ, внешнее магнитное поле используется для концентрирования МНЧ в конкретной точке локализации патологии. Эта процедура достаточно хорошо переносится онкологическими больными [45; 135]. Системы доставки лекарств и генов на основе МНЧ могут преодолеть почти непреодолимое препятствие при лечении неврологических заболеваний: доставку через гематоэнцефалический барьер, что было показано на примере антидепрессанта amitriptyline [148; 155]. Однако, возможность потенциальной эмболии капилляров агрегатами МНЧ и большие расстояния между локализацией патологии и внешним магнитным полем представляют собой проблему [45; 61]. При рассмотрении химического состава поверхности МНЧ для доставки лекарств предпочтительным является сохранение гидрофильности и обеспечение размера не более 100 нм вместе с покрытием для предотвращения быстрого клиренса макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы. При изучении влияния покрытия НЧ на длительность их циркуляции в кровотоке было показано, что наилучшим защитным эффектом обладает модификация поверхности гидрофильными и подвижными полимерами, такими как полиэтиленгликоль, полиакриламид, поливинилпирролидон и другими [59; 175]. Таким образом, критериями, позволяющими обеспечить максимальное время полужизни МНЧ в плазме крови являются размер, нейтральность и гидрофильность поверхности НЧ. Например, для НЧ, обладающих гидродинамическим диаметром меньше 40 нм, покрытых гидрофильной оболочкой из декстрана, время полужизни в плазме крови составило 20 часов, что превышает таковое без покрытия [46; 191].

### *Магнитная трансфекция*

МНЧ, функционализированные ДНК-векторами могут быть использованы как эффективные системы генной трансфекции под действием внешнего магнитного поля (магнитофекция, МФ). Процедура позволяет увеличить эффективность доставки векторов, сократить длительность доставки генов, продлить тропизм аденовирусных векторов и скомпенсировать низкий титр вируса [154]. Прямое сравнение современных МНЧ с магнитным поликатионом, покрытым полиэтиленгликолем (для стандартной трансфекции) продемонстрировало значительное повышение эффективности трансфекции как для невирусных, так и для вирусных векторов в пермиссивных и непермиссивных клетках [154]. В эндотелиальных клетках HUVEC МФ увеличивала эффективность репортера люциферазы в 360 раз по сравнению с другими конвенциональными методами [92] и эффективную доставку антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo* и *in vitro* [91].

### *Определение железа и хелатотерапия*

Избыток железа связан с нейродегенеративными заболеваниями – рассеянный склероз, атаксия Фридрейха, болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [40]. Передовые технологии обнаружения наноразмерного железа в нейронных тканях, такие как магнитометрия со сверхпроводящим квантовым интерференционным устройством (SQUID), нашли применение в качестве диагностической стратегии при идентификации отложений оксида железа в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [63] и нейроферритинопатией [64]. Для экспериментальной терапии МНЧ могут быть использованы в качестве хелаторов железа при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях. Эффективность данного подхода показана в моделях *in vitro* [101].

#### 1.4.3 Адресная доставка лекарственных средств с использованием НЧ

Традиционные системы доставки имеют такие проблемы, как плохая растворимость в воде, недостаточная биодоступность при внесосудистом пути

введения, офтаргетные эффекты на органы и ткани, низкий терапевтический индекс, которые можно преодолеть с использованием нанотерапевтических препаратов, внедряющихся в клиническую практику. Особенно актуально использование НЧ для адресной доставки в лечении онкологических заболеваний, так как химиотерапевтические препараты обладают высокой токсичностью, и очень важно минимизировать действие на здоровые ткани. Изменение размера и поверхностных характеристик НЧ позволяет увеличить их время циркуляции в кровотоке. Учитывая некоторые патофизиологические особенности опухолей, такие как повышенная васкуляризация, микроокружение опухоли, увеличенная проницаемость клеточных мембран, возможно использование НЧ для доставки активных фармацевтических субстанций к опухолям. Для достижения активного нацеливания НЧ на раковые клетки, возможно осуществление модификации поверхности определенными лигандами или антителами, что увеличивает специфичность действия терапевтических НЧ.

Другой проблемой противоопухолевой терапии является возникновение устойчивости к лекарственным средствам, препятствующее эффективности как мишень-специфичных, так и обычных химиотерапевтических средств. Устойчивость может быть преодолена или, по крайней мере, уменьшена с помощью НЧ. Было высказано предположение, что с помощью НЧ возможно преодолеть Р- гликопротеин опосредованную резистентность опухолевых клеток. Один из вероятных механизмов заключается в том, что НЧ могут избежать распознавания Р- гликопротеиновой помпой из-за попадания внутрь клетки через эндосомы, что в конечном итоге приводит к высокой внутриклеточной концентрации лекарства [68]. Стратегии преодоления лекарственной устойчивости с использованием лигандов, особенно нацеленных на рецептор, также имеют хорошие перспективы, так как данные лиганды обычно доставляются в клетку через рецептор- опосредованный эндоцитоз. Например, полимерные рН- чувствительные мицеллы, содержащие доксорубин и нацеленные на фолатный рецептор [97] и НЧ, конъюгированные с трансферрином, содержащие паклетаксел [152], обладали большим ингибирующим эффектом на

резистентные к лекарствам клетки MCF-7 и ксенографты по сравнению с не таргетированными аналогами. Таким образом, НЧ являются перспективным инструментом для адресной доставки и увеличения эффективности действия уже существующих лекарственных препаратов [32]. Рассмотрим основные классы НЧ, которые возможно использовать для данных целей.

#### *Магнитные наночастицы (МНЧ)*

Важность адресной доставки лекарственных средств заключается в целевой доставке действующего вещества непосредственно в место локализации патологии, таким образом, минимизируя возможное побочное действие на здоровые ткани и органы. МНЧ исследуют уже более 30 лет в качестве средства для адресной доставки, так как они обладают рядом преимуществ: (i) возможность концентрирования в заданном месте с помощью магнитного поля, (ii) поверхность НЧ может быть относительно легко покрыта различными оболочками и функционализована [34].

Одним из главных недостатков противоопухолевой химиотерапии являются побочные эффекты, связанные с неспецифическим токсическим действием на здоровые ткани [39]. МНЧ могут быть использованы в терапии рака как в качестве самостоятельного лекарственного средства для гипертермии опухоли, так и в качестве матрицы для адресной доставки противоопухолевого агента и его концентрации в заданном месте с помощью магнитного поля [48; 138].

Другим направлением использования МНЧ является адресная доставка генно-терапевтических конструкций, что подробно обсуждено в Главе 1.6 обзора. МНЧ хорошо себя зарекомендовали в качестве носителей активаторов фибриногена, таких как урокиназа и стрептокиназа, обладающих коротким периодом полужизни в крови, что делает особенно важной быструю направленную доставку лекарств непосредственно в место локализации тромба [16; 171].

#### *НЧ мезопористого диоксида кремния (НМДК)*

НМДК широко используют в качестве реагента для доставки, поскольку диоксид кремния обладает благоприятными химическими свойствами, термической стабильностью и биосовместимостью. Уникальная мезопористая структура кремнезема облегчает эффективную загрузку лекарств и их последующее контролируемое высвобождение из матрицы. Свойства мезопористого вещества, включая размер пор, высокую загрузку лекарственного средства и пористость, а также свойства поверхности, могут быть изменены в зависимости от реактивов, используемых для синтеза НМДК. Активная поверхность позволяет проводить функционализацию и связывать терапевтические молекулы.

Данный тип НЧ широко используют для диагностики, адресной доставки лекарств, биосенсоров, для внутриклеточной доставки и других биомедицинских применений [15]. Непокрытые НМДК захватываются макрофагами и другими клетками иммунной системы, что является основанием для их применений в МРТ и мониторинге клеток иммунной системы. Покрытая ПЭГом НМДК дольше циркулирует в кровотоке и, соответственно, лучше подходит для доставки лекарств. НМДК размером 360 нм, покрытые ПЭГ, через 30 минут после внутривенного введения, почти не обнаруживаются в тканях печени и селезенки, что свидетельствует о том, что из-за модификации поверхности частиц они скорее всего хуже распознаются фагоцитами печени и селезенки [65]. Функционализированные фолиевой кислотой НЧ позволяют осуществлять специфическое нацеливание только на опухолевые клетки и также являются инструментом для адресной доставки [108].

В обычные НМДК может быть загружена доза терапевтического лекарственного средства 200-300 мг (максимально около 600 мг) / 1 г НМДК [177]. Таким образом НМДК очень привлекательны для адресной доставки лекарств.

## 1.5 Технологии миРНК, CRISPR-Cas9, дезоксирибозимы как инструменты регуляции экспрессии генов

РНК-интерференция подавляет экспрессию генов посредством коротких интерферирующих 21–23-нуклеотидных двухцепочечных сегментов РНК (миРНК), которые управляют деградацией мРНК специфичным для последовательности образом. Эффективность миРНК была показана для лечения таких тяжелых заболеваний, как ВИЧ. миРНК ингибировали выработку вируса, блокируя либо мРНК клеточного рецептора ВИЧ-1 CD4, либо вирусного структурного белка Gag [130]. Исследовано применение миРНК и для других вирусных заболеваний: для гепатита С [161], вируса папилломы человека в клетках рака шейки матки [79].

Очевидно, одной из наиболее изученных областей применения РНК-интерференции (РНКи) является терапия онкологических заболеваний. В работе Брумелкампа и коллег с помощью РНК-интерференции специфически ингибировали мутантный онкогенный белок Ras, не затрагивая Ras дикого типа [105]. Считается, что стоимость лечения миРНК будет сопоставима с большинством существующих методов лечения, основанных на использовании белковых молекул, таких как антитела. Доклинические исследования показали ингибирование роста и выживаемости опухолевых клеток с помощью РНКи-опосредованного подавления онкогенов или генов, способствующих жизнеобеспечению опухоли, включая ростовые и ангиогенные факторы или их рецепторы (фактор роста эндотелия сосудов, рецептор эпидермального фактора роста), теломераза (hTR, hTERT), вирусные онкогены (вирус папилломы, типы Е6 и Е7) или химерный онкоген Vcr-Abl. Разные исследователи сообщают об активности *in vivo* и потенциале РНКи для подавления роста опухоли. Они включают внутриопухолевую инъекцию малых РНК, образующих шпильки - аденовирусной векторной конструкции, нацеленной на подавление регулятора клеточного цикла, вызывающего ингибирование роста трансплантата мелкоклеточной опухоли легкого у мышей. Далее следует системное введение миРНК, нацеленной на карциноэмбриональную антигенную молекулу клеточной

адгезии (SEACAM6), у мышей с подкожными трансплантатами аденокарциномы поджелудочной железы. Прямая инъекция плазмидного вектора, экспрессирующего миРНК, образующие шпильки, нацеленные на мРНК матриксной металлопротеиназы ММП-9 и катепсина, показала эффективность при установленной глиобластоме [37].

#### *Рибозимы и дезоксирибозимы*

Рибозимы открыты в 1970-х годах, открытие трансактивирующего рибозима типа hammerhead привело к их исследованию для терапевтических применений, включая лечение вирусных инфекций и рака. Помимо каталитической активности и связывания с РНК, рибозимы типа hammerhead могут вызывать РНК-зависимую деградацию целевой двухцепочечной РНК (дцРНК)[37].

Была показана каталитическая активность дезоксирибозима 10-23 против мРНК TGF- $\beta$  связанного ростового фактора дифференцировки, который связан с развитием прогрессии заболевания и резистентности к терапии в раках груди, простаты, яичников [195]. Также были разработаны дезоксирибозимы для регуляции экспрессии онкогена bcr-abl [192]. Дезоксирибозимы, нацеленные на мРНК рецептора тирозин киназы Flt-1, а также ВИЧ, прошли первые стадии клинических испытаний [156].

#### *CRISPR-Cas9*

Нуклеазы специфического действия широко используются в качестве инструментов для редактирования генома. Успех инструмента редактирования генома CRISPR / Cas9 основан на легкости конструирования направляющей РНК, которая нацеливает рестриктазу Cas9 на целевой локус ДНК, а также высокой специфичности и эффективности разрывов ДНК, генерируемых CRISPR / Cas9. Несколько исследований недавно использовали CRISPR / Cas9 для успешной модуляции вызывающих болезнь аллелей на животных моделях и *ex vivo* в соматических и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, что вселяет надежду на применение технологии редактирования генома для терапевтических целей [153].

Инъектирование компонентов CRISPR / Cas9 в зиготу или на ранних стадиях эмбрионального развития позволяет редактировать геном всех клеток организма. Данный подход позволяет исправлять мутации, вызывающие тяжелые заболевания [185]. В настоящий момент уже описаны экспериментальные подходы лечения таких заболеваний, как наследственная тирозинемия I типа, обусловленная дефицитом фермента фумарилацетоацетат гидролазы; инфекция вирусного гепатита В;  $\beta$ - таласемия, вызванная мутациями в гене  $\beta$ -гемоглобина; вируса иммунодефицита человека и других патологий.

Была описана стратегия доставки плазмид Cas9-sgPlk-1 (CP) многофункциональной платформой для терапии опухолей. CP сконденсировали на модифицированных пептидом TAT наночастицах Au (AuNPs / CP, ACP) посредством электростатических взаимодействий и покрыли липидами (DOTAP, DOPE, холестерин, PEG2000-DSPE), чтоб получить комплекс Cas9-sgPlk-1 с золотыми НЧ, покрытый липидами. Данный комплекс проникает внутрь клеток и высвобождает Cas9-sgPlk-1 в результате термических эффектов, возникающих при воздействии лазера на золотые НЧ. Cas9-sgPlk-1 может проникать в ядра с помощью TAT, обеспечивая эффективный нокаут целевого гена (Plk-1) опухоли (меланомы) и ингибирование опухоли *in vitro* и *in vivo* [187].

## 1.6 Проблема доставки генно-терапевтических конструкций в клетки. Доставка с помощью наночастиц

В последние годы антисмысловая и генная терапия были предметом интенсивных исследований из-за больших перспектив на пути к персонализированной медицине [15]. Преимущества генной терапии реализуются только в том случае, если можно преодолеть ограничения, связанные с недостаточной эффективностью и специфичностью доставки генно-терапевтических конструкций [19].

Для доставки синтетических миРНК в культуры клеток традиционно используют реагенты на основе липосом. Среди невирусных методов доставки

наиболее часто используемыми в терапевтических подходах являются системы на основе катионных липидов [161]. Однако, опубликовано не большое количество исследований, подтверждающих эффективность данного подхода для доставки ДНК- и РНК- конструкций *in vivo* [151]. При доставке миРНК также важным является вопрос накопления в здоровых тканях и, как следствие, возможных побочных эффектов. Поэтому создание систем адресной доставки миРНК будет улучшать перспективы их применения в клинической практике. Аналогичная задача существует и для доставки векторов экспрессии [161].

Существует несколько перспектив использования магнитофекции в будущем. Для применения *in vitro* тремя важными характеристиками магнитофекции являются: (i) резко пониженная векторная доза; (ii) значительно сокращенное время инкубации, необходимое для достижения высокой эффективности трансфекции / трансдукции; и (iii) возможность доставки гена в другие непермиссивные клетки [20].

Было показано, что дезоксирибозим 10-23 может быть эффективно доставлен в клетку с помощью золотых НЧ. Авторы показали, что дезоксирибозим, присоединенный к НЧ, более устойчив к воздействию нуклеаз, а также что возможно осуществлять контролируемое высвобождение олигонуклеотидов с поверхности НЧ при воздействии лазера с длиной волны 532 нм, воздействие которого селективно расщепляет связь тиоловой группы с золотом [195].

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Реактивы*

Изопропоксид алюминия  $\geq 99\%$ , изопропоксид титана  $\geq 99\%$ , тетрагидрат хлорида железа (II)  $\geq 98,5\%$ , гексагидрат хлорида железа (III)  $\geq 99\%$ , пропоксид циркония (IV) в растворе 1-пропанола (70%) , гафний (IV) н-бутоксид (99%, чистота исключает 1% Zr), этоксид тантала (V) (99,98%), тиазолил синий тетразолий бромид (МТТ порошок) были получены из компании Sigma-Aldrich. Диметилсульфоксид (ДМСО) был от фирмы VWR. Таблетки для получения фосфатного буферного раствора (PBS) были приобретены у Gibco. Деионизированная вода от Elix Essential 3UV, Millipore. Набор для анализа мертвых клеток Мьюз (аннексин V-FluoProbes488 / 7-аминоактиномицин) был приобретен в Merck.

### *Оборудование*

В работе использовано следующее оборудование. Система очистки воды Milli-Q Academic, микропланшетный спектрофотометр Tecan Infinite F50, CO<sub>2</sub> инкубатор Sanyo MCO-18AC, лабораторная охлаждаемая центрифуга Eppendorf 5810 R, ультразвуковая баня УЗУМИ-05, магнитная мешалка ИКА, термостатируемый шейкер BioSan.

Флюоресценцию регистрировали на спектрофлюориметре Cary Eclipse. «Размер частиц и величину дзета-потенциала измеряли методом динамического рассеяния света на приборе Photocor EPM/Photocor Compact Z» [47]. НЧ визуализировали на трансмиссионном электронном микроскопе HRTEM Jem 2010 Jeol, Japan, образцы клеток исследовали с помощью микроскопа инвертированного биологического МИБ-Р (ЛОМО, Россия). Для исследований проточной цитофлюориметрии использовали приборы CytoFLEX (Beckman Coulter), ACEA NovoCyte и Muse (Merck).

### *Синтез золь непорытых НЧ*

Стабильные 2 мас. % гидрозоли получали с помощью ультразвуковой коллоидизации. Для этих целей 3,3 г порошка изопропоксида алюминия, 3,9 мл изопропоксида титана, 3,7 мл пропоксида циркония (IV) в растворе 1-пропанола,

1,8 мл н-бутоксид гафния (IV) или 0,59 мл этоксида тантала (V) соответственно смешивали в 50 мл деионизированной воды с последующим нагреванием до 85 °С и перемешиванием при 500 об / мин в течение 15 мин. Полученные суспензии обрабатывали ультразвуком (260 Вт, 60 Гц) и одновременно перемешивали в течение 160 мин. Полученные золи хранились в пластиковых флаконах при комнатной температуре. Чистый гидрозоль магнетита получали ультразвуком из тетрагидрата хлорида железа (II) и гексагидрата хлорида железа (III), как описано в статье [43]. Массовая доля НЧ (средний размер 10 нм) в полученном золе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> составляла 2 мас. %.

### ***Характеризация частиц***

«Кристаллическая фаза и кристалличность образцов изучались методом рентгеновской дифракции (дифрактометр Rigaku SmartLab 3 в Инженерном центре Санкт-Петербургского государственного технологического института (Технического университета)) с использованием излучения Cu Ka ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ). Образцы сканировали вдоль  $2\theta$  в диапазоне 5-80 ° при 0,5 град / мин» [47]. Для рентгеноструктурного анализа образцы высушивали при 120 °С в течение 4 часов. Образцы для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (HRTEM Jem 2010 Jeol, Japan) были получены путем сушки капли золя на медной сетке. Размер частиц с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС) и дзета-потенциал в коллоидных растворах измеряли на Photocor EPM / Photocor Compact Z [47].

### ***Клеточные линии***

Для экспериментов были использованы фибробласты эмбриона легкого человека (ФЛЭЧ), мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК), клетки карциномы шейки матки (линия HeLa), приобретенные в ООО “Биолот” (Россия), постнатальные фибробласты человека (ПФЧ), клетки карциномы легкого A549 и клетки хронической миелогенной лейкемии K-562, любезно предоставленные коллегами из Института канцерогенеза (Москва). Клетки ФЛЭЧ, ПФЧ и HeLa, A549 культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), инкубация

проводилась при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере. Клетки K-562 культивировали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Gibco) и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), инкубация проводилась при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере. Клетки МСК культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с низким содержанием глюкозы, 1 г/л (Биолот, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, ThermoFisher) и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). Использовали следующие условия инкубации: 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере. В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

### ***MTT тест***

Для исследования влияния на метаболическую активность (и косвенного определения цитотоксического действия) непокрытых и допированных НЧ, а также ДНК цепей был использован МТТ- тест. Количество выживших клеток определяется непрямом методом путем оценки оптической плотности раствора восстановленного МТТ (3- (4,5-диметил-2-тиазолил) -2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромида) красителя НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазами. МТТ – желтый водорастворимый тетразолиевый краситель, восстанавливаемый живыми клетками в нерастворимый формазан; развитие фиолетового окрашивания служит эффективным и удобным маркером количества выживших клеток. Количество формазана, растворенного в ДМСО, измеряется с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 570 нм.

Клетки линий МСК, ПФЧ, ФЛЭЧ, А549, К562 и HeLa рассеивали в лунки 96-луночного планшета (Eppendorf) в количестве  $5 \times 10^3 - 10^4$ , инкубировали 24 ч при 37° С, 5% CO<sub>2</sub>, в увлажненной атмосфере. Суспензии исследуемых соединений готовили серийными разведениями из исходных зольей НЧ в культуральной среде. Диапазон концентраций в экспериментах выбирали исходя из максимальной концентрации НЧ, образующей стабильный золь, при этом НЧ должны составлять не более 0,5% объема культуральной среды. В качестве отрицательного контроля использовали клетки без препарата. «Клетки обрабатывали соединениями 24 ч или 72 ч. После завершения инкубации среду с частицами отбрасывали,

добавляли 200 мкл раствора МТТ (0,5 мг / мл) в PBS в каждую лунку на 1,5 ч при 37 ° С, 5% CO<sub>2</sub>. Затем аспирировали раствор МТТ, гранулы формазана растворяли в 200 мкл ДМСО и центрифугировали при 12000 об / мин в течение 5 мин для осаждения наночастиц. Оптическую плотность супернатанта измеряли при 570 нм на спектрофотометре Tecan Infinite 50. Жизнеспособность клеток рассчитывалась как процент оптической плотности в лунках с НЧ, нормированной к оптической плотности необработанных клеток (100%)» [47].

### ***Олигонуклеотиды***

Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе, приведены в таблице 1.

Таблица 1– Олигонуклеотиды, использованные в работе.

<b>Название</b>	<b>Последовательность</b>
<b>1</b>	<b>2</b>
Dz-F sub-FAM	5’-/FAM/- TTTTTTTTCCAGGGAGGCTAGCTACAACGAGAGGAAAC
AF_GFP-1	5’-/FAM/- GTCATCTCGTCGCCAAGTCGAGTCGTCTACAGTTGATCTTC C
AF-T2_F_sub	5’-GAGATGACGGTCATGTCTCTACGATCAGCTCGACTTGGC GACtttttttCCAGGGAGGCT AGCTACAACGAGAGGAAAC
AF_F_sub-3	5’- TAGACGACGCATACAGTCCCTGGAAGGTCGGAAGATCAAC TG
AF_GFP-4	5’- GACCTTCCAGGGACTGTATGCGCTGATCGTAGAGACATGA CC
AF-F sub-5	TCGCCGAGTCGAGCTGATCGTAGAGACATGACCGCGATCT C

Продолжение таблицы 1

TLR-4 F	GCTCTGCCTTCACTACAGGGACT
TLR-4 R	CTGGGACACCACGACAATAACC
TLR-6 F	TGGGCTAACATTAGAGCCGC
TLR-6 R	GGCATGAGGATAATGGAGGCA
B2M F	GATGAGTATGCCTGCCGTGT
B2M R	TGCGGCATCTTCAAACCTCC

### ***Трансфекция ДНК цепей***

Клетки HeLa были засеяны в 24-луночный планшет по  $6 \cdot 10^4$  клеток/лунка и инкубировались в течение 24 часов для прикрепления, клетки K562 в эквивалентном количестве помещали в лунки непосредственно перед трансфекцией. Комплексы ДНК цепей с Липофектаминоном 2000 вносили согласно стандартному протоколу Invitrogene в среду без антибиотиков, доводя до нужной концентрации ДНК цепей: 1,5 мкл Липофектамина 2000 смешивали с 25 мкл Opti-MEM, необходимый для каждой лунки объем ДНК- олигонуклеотидов смешивали с 25 мкл среды Opti-MEM, и соединяли раствор с раствором с липосомами. Инкубировали 5 минут при комнатной температуре, затем по каплям добавляли образовавшиеся комплексы в лунки с клетками.

### ***Проточная цитофлуориметрия***

Эффективность трансфекции ДНК цепей оценивали с использованием проточной цитофлуориметрии. Для определения эффективности трансфекции ДНК цепей в клетках использовали ДНК цепи, конъюгированные с FAM (флуоресцеина амидитом). Клетки HeLa были рассеяны в 24-луночные планшеты ( $6 \cdot 10^4$  клеток в лунке, 1 мл культуральной среды) и оставлены на 24 ч для прикрепления и распластывания, клетки линии K-562 подсчитывали непосредственно перед трансфекцией. Клетки трансфецировали свободными ДНК цепями- FAM, в комплексах с Lipofectamine2000 и липосомами. Затем после инкубации в течение 5 ч заменяли среду и оставляли на 24-72 ч, после чего открепляли клетки раствором Версена и переносили в PBS. Полученную

суспензию (10000 флуоресцентных “событий”) анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), измеряя флуоресценцию FAM в клетках относительно контрольного фона при возбуждении лазером 488 нм в канале FITC (525/40 нм).

***Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени (ОТ-qПЦР)***

Тотальную РНК выделяли с гуанидин-фенол-хлороформной экстракцией с помощью реактивов Extract RNA (Евроген, Россия), хлороформа (Acros), пропанола-2, этанола (Химмед). Осадок клеток растворяли в 0,8 мл Extract RNA, через 3 минуты добавляли 160 мкл хлороформа и тщательно перемешивали. Через 5-7 минут смесь центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Водную фазу отбирали и переносили в пробирку с 500 мкл изопропанола, инкубировали 10 мин со встряхиванием, затем центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Надосадок отбирали, к осадку добавляли 500 мкл 70% этанола и центрифугировали при 12 000 об/мин 5 мин. Этанол отбирали и осадок РНК растворяли в 20 мкл воды без РНКаз. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия).

Для проведения обратной транскрипции брали 2 мкг тотальной РНК и использовали протокол компании Евроген (Россия; обратная транскриптаза MMLV). Объем раствора РНК, содержащий 2 мкл, смешивали с 1 мкл праймера oligo dT (100μМ) и доводили общий объем водой без нуклеаз до 9 мкл. Инкубировали 5 мин при 70 °С, затем помещали в лед. В каждый эппендорф добавляли по 11 мкл реакционной смеси, содержащей 5x буфер, dNTP, DTT и ривертазу. Обратную транскрипцию проводили при следующих условиях: 25 °-10 мин, 42°- 50 мин, 70°- 10 мин, 10°-10 сек.

Анализ экспрессии генов проводили с использованием набора qPCRmix- HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия) и праймеров (последовательности приведены в таблице 1) в соответствии с протоколом производителя. Готовили смесь из 5 мкл 5x qPCR, 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймера, 16 мкл воды без нуклеаз (объемы приведены в расчете на одну пробу). В каждую пробирку добавляли по

23 мкл смеси и 2 мкл кДНК, полученной на предыдущем этапе. ПЦР приводили при следующих условиях: цикл 1(1 повтор):94° -3 мин, 60°- 40 сек, 72°- 40 сек. Цикл 2 (28 повторов): 94°-10 сек, 60°-10сек, 72°-20сек. Цикл 3 (1 повтор):72°-3 мин. Цикл 4(хранение)-10°.

Для нормализации экспрессии использовали праймеры для детекции гена домашнего хозяйства бета-2- микроглобулина. Для количественного определения экспрессии использовали метод  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , принимая за единицу нормализованный уровень экспрессии гена интереса в необработанных образцах и рассчитывая относительные изменения для образцов, обработанных НЧ. Для ПЦР использовали три биологические реплики, по три технических повтора.

### ***Определение апоптоза (тест с аннексином V - FITC и 7AAD)***

Клетки HeLa в логарифмической фазе роста высевали ( $6 \times 10^4$  на лунку) в 24-луночные планшеты. Через 16 ч вносили НЧ на 24 ч, ресуспендируя в культуральной среде (конечная концентрация 200 мкг / мл). Через 24 ч 100 мкл взвеси клеток в PBS смешивали с 100 мкл реагента Muse™ Annexin V в 1,5 мл микроцентрифужных пробирках и инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре. Транслокация фосфатидилсерина на внешний листок плазматической мембраны является признаком раннего апоптоза и детектируется с помощью белка аннексина V, конъюгированного с FITC (флюоресцеин изотиоционатом), в то же время 7AAD (7- аминоактиномицин D) проникает только через поврежденную мембрану (некроз) и связывается с ДНК, что является признаком позднего апоптоза или некроза. Результаты получали с использованием анализатора клеток Muse™ (Merck Millipore). Рассматривали 4 популяции клеток:

- жизнеспособные клетки, не подвергающиеся апоптозу: аннексин V (-), 7-AAD (-);
- ранние апоптотические клетки: аннексин V (+), 7-AAD (-);
- апоптотические и некротизированные клетки: аннексин V (+), 7-AAD (+);
- некроз: аннексин V (-), 7-AAD (+)

### ***Облучение культур клеток***

Клетки рассеивали в логарифмической фазе роста в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> и оставляли на сутки для прикрепления и распластывания. Через сутки в часть флаконов вносили возможные радиомодификаторы: НЧ оксида гафния и тантала в концентрации 250 мкг/мл для линии клеток НСТ116. По одному флакону клеток для каждой запланированной дозы облучения оставляли без радиомодификаторов. Через 24 часа после внесения частиц клетки облучали рентгеновским излучением с максимальной энергией фотонов в спектре 200 кэВ в дозах 0,5-10 Гр.

Через два часа после облучения клетки со всех облученных флаконов открепляли 0,05% раствором трипсина для создания моноклеточной суспензии, подсчитывали при помощи камеры Горяева и рассаживали на чашки диаметром 10 см для дальнейших экспериментов.

### ***Анализ способности к колониеобразованию***

Выживаемость клеток после облучения, в том числе в присутствии радиомодификаторов, исследовали методом клоногенного анализа. Клоногенный анализ (оценка способности клеток к колониеобразованию) является классическим способом оценки выживаемости облученных опухолевых клеток. Метод основан на способности опухолевых клеток к неограниченному росту, образованию колоний и восстановлению роста культуры из одной клетки. Клоногенный анализ проводился на линии клеток НСТ116.

Облученные клетки подсчитывали и методом последовательных десятикратных разведений рассаживали на чашки Петри диаметром 10 см в количестве 500 клеток на чашку, при объеме среды 20 мл на чашку.

Чашки с клетками инкубировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере 14 дней. После этого среду аккуратно убирали, клетки фиксировали ледяным метанолом (5 мл на чашку) и инкубировали в метаноле при температуре +40 °С в течении 10 мин. Затем убирали метанол, фиксированные колонии в течении 10 мин окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового (5 мл

на чашку), трижды промывали дистиллированной водой для уменьшения фона красителя и подсчитывали окрашенные колонии визуально.

Число колоний в контрольных чашках, не подвергавшихся облучению, принималось за 100%, относительно него вычислялся процент колониеобразования в остальных чашках эксперимента.

### ***Окрашивание активных форм кислорода (АФК)***

Диацетат 2', 7'-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFDA) использовали для окрашивания АФК в клетках IMR-32 (нейробластома человека). В культуральную среду (DMEM с 10% бычьей сыворотки) добавляли исследуемые соединения. Первую лунку использовали в качестве отрицательного контроля (не добавляли НЧ). Вторую лунку обрабатывали 10 мкл МНК (исходная концентрация 10 мг / мл). Две дополнительные лунки были использованы в качестве положительного контроля и были обработаны разными концентрациями  $H_2O_2$  (конечные концентрации 0,03% и 0,15% соответственно). На следующем этапе клетки инкубировали с токсикантами в течение 4 часов. Затем питательная среда была удалена, и лунки промывали 3 раза предварительно нагретым PBS (рН 7,3, 10 мМ). Сток DCFDA был приготовлен в безводном диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мМ и хранился в темноте плотно закрытым. Рабочий раствор готовили растворением 1 мкл стокового раствора в 1 мл PBS и сразу использовали. 100 мкл этого раствора добавляли к 900 мкл PBS в каждую лунку (конечная концентрация DCFDA 1 мкМ). Клетки инкубировали с DCFDA в течение 15 мин (37 °С, 5%  $CO_2$ ). Затем PBS удаляли, лунки промывали 3 раза свежим PBS и помещали клетки обратно в питательную среду и инкубировали в течение 10 минут. Окрашенные клетки визуализировали с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа МИБ-Р (Ломо Микросистемы, Россия). Сравнивали количество окрашенных клеток в эксперименте (инкубированных с МНК) и в контрольных лунках.

### ***Животные***

Самцов мышей Balb / c (4–5 недель, 20–22 г) содержали в виварии Национального медицинского исследовательского центра им. Н.Н.Блохина.

Животные получали свободный доступ к питьевой воде и стандартным диетическим гранулам *ad libitum*. Условия содержания: температура  $22 \pm 2$  °С, относительная влажность воздуха  $55 \pm 10\%$ , стандартная смена освещения день/ночь по 12 ч. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Этического комитета Центра.

### ***Острая токсичность: экспериментальный дизайн***

Мышей случайным образом разделили на группы (контрольная и шесть экспериментальных групп) по 4 животных в группе. 4 % золи  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  (неразбавленными) вводили через желудочный зонд несколько раз в течение 8 ч в объеме 1.5-1.8 мл, содержащем суммарную дозу 3 г / кг массы тела животного. Контрольная группа получала деионизированную воду в равном объеме. Поскольку все животные, которым вводили 3 г / кг  $\text{ZrO}_2$ , погибли, были исследованы также дозы 500 мг / кг и 2000 мг / кг для расчета значений  $\text{LD}_{50}$ . Масса тела, состояние волосяного покрова, пищевое и общее поведение контролировались ежедневно до 14 дней; после этого интервала времени мышей выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. Печень, почки, селезенка, мозг, сердце, тимус, яичко, легкие с трахеей исследовали макроскопически и взвешивали. Относительную массу отдельных органов рассчитывали как отношение массы органа к массе животного.

### ***Гистопатологическая оценка***

Образцы тканей обрабатывали стандартными методами, принятыми для световой микроскопии: проводили фиксацию, дегидратацию, приготовление срезов, окрашивание гематоксилин-эозином (Г&Э) и окрашивание крезильным фиолетовым (окрашивание по Нисслю). Образцы были кодированы для “слепого” исследования.

### ***Статистика***

Каждый эксперимент на культуре клеток проводился в трех повторностях. Данные представлены в виде средней величины  $\pm$  стандартная ошибка среднего (СОШ). Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни (Statistica Software). Статистическая

значимость рассматривалась при  $p < 0,05$ .  $LD_{50}$  рассчитывали с использованием пробит-теста [50].

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и результаты, включенные в главы 3.1- 3.4 опубликованы в статье [47].

#### 3.1 Физико- химические свойства непокрытых НЧ

Техника ультразвуковой обработки делает возможным получение водных золей НЧ с почти нейтральным рН (6,9-7,2), приемлемым для биомедицинских применений. В ходе синтеза (условия описаны в разделе 2 «Материалы и методы») происходит формирование слабо кристаллизованных НЧ (рис. 2А).

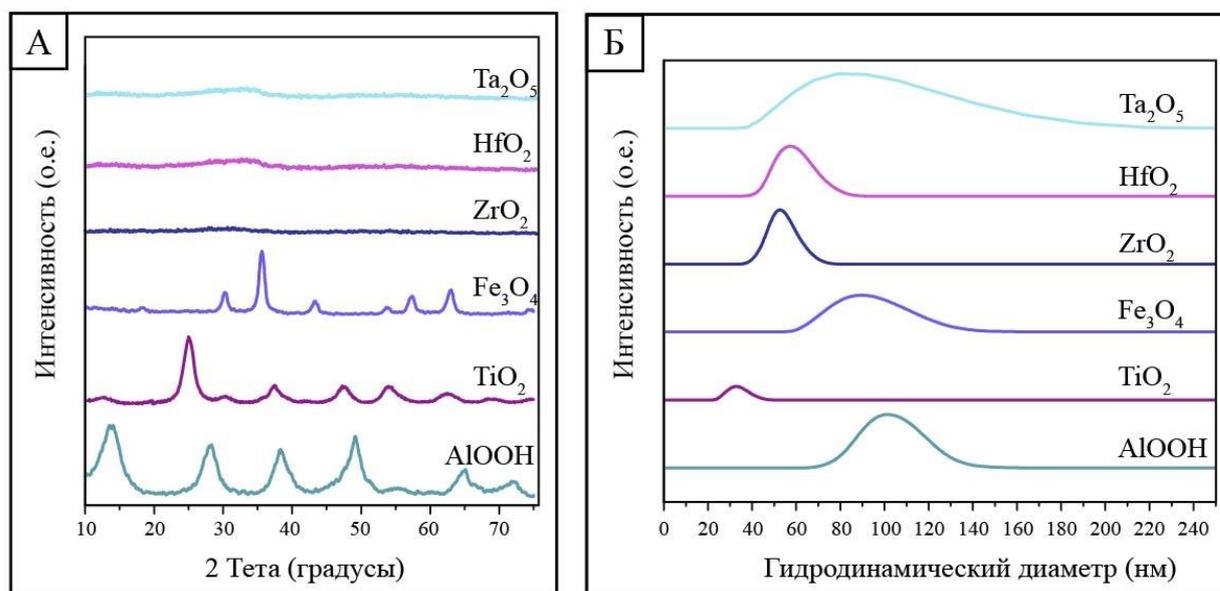


Рисунок 2 – А) Рентгенограммы; Б) Распределение частиц по размерам в золях, определенное с помощью ДРС.

На рисунке 2Б представлены гидродинамические распределения размеров частиц в золях. Все золи имели мономодальное распределение. Гидродинамический размер варьировался от 25 до 130 нм. Распределение частиц по размерам, определенное методом просвечивающей электронной микроскопии, продемонстрировало меньшие размеры частиц по сравнению с результатами ДРС, что можно объяснить различными физическими основами методов: ПЭМ – это измерение размера частиц по микрофотографии, ДРС основано на измерении интенсивности рассеянного света. Распределение частиц по размерам, определенное с помощью ПЭМ, было узким (2-10 нм).

Результаты анализа НЧ методом просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 3) показали, что оксигидроксид алюминия (бемит), диоксид титана (анатаз) и оксид железа (магнетит) обладали наилучшей кристаллической структурой с размерами кристаллитов 6, 12 и 10 нм соответственно. В случае слабокристаллизованных НЧ диоксидов циркония и гафния в отражениях моноклинных фаз наблюдали широкие гало. НЧ  $Ta_2O_5$  имели ромбическую модификацию.

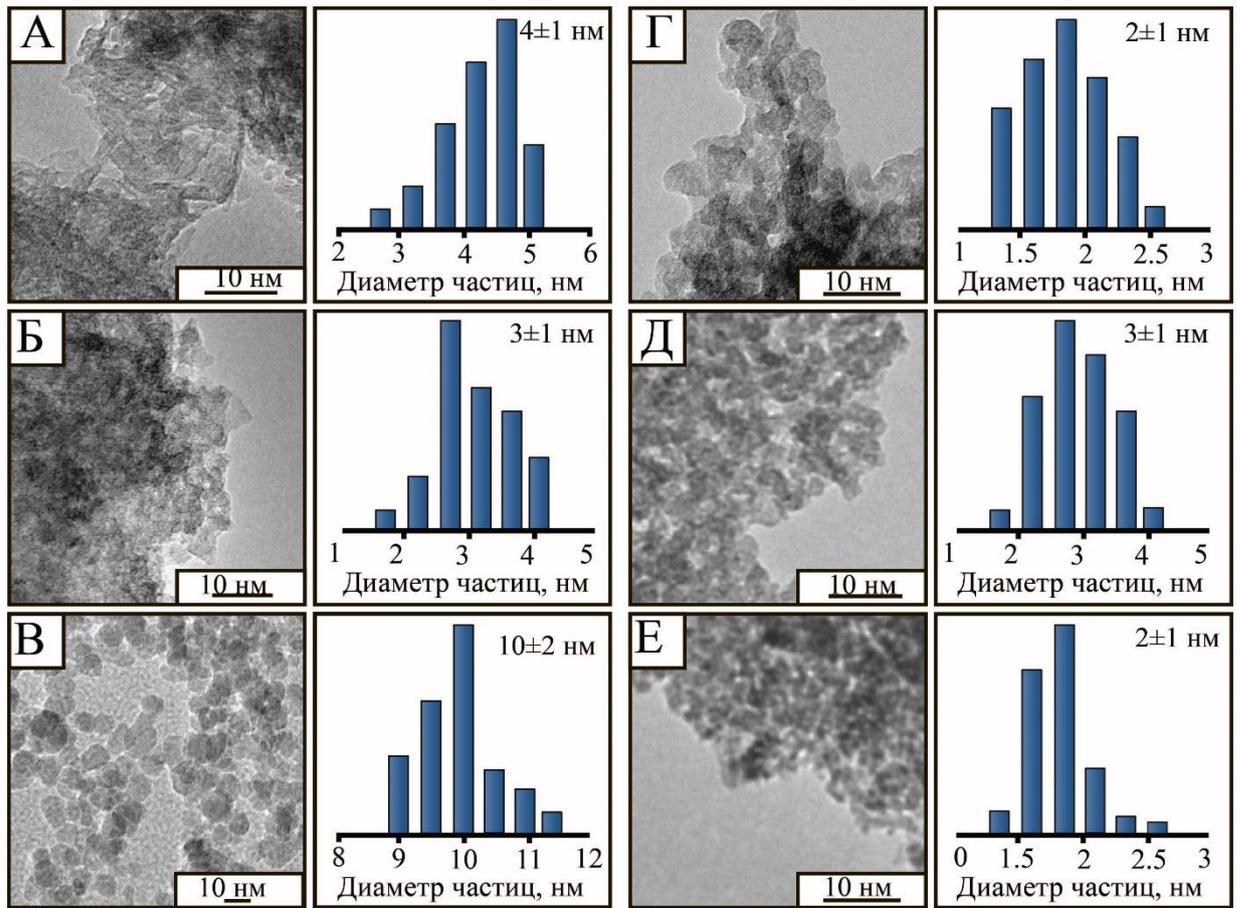


Рисунок 3 – Изображения ПЭМ и распределение частиц по размерам НЧ А) AlOOH, Б) TiO<sub>2</sub>, В) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Г) ZrO<sub>2</sub>, Д) HfO<sub>2</sub>, Е) Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Размер частиц: 2-10 нм.

В таблице 2 приведены значения гидродинамических диаметров и дзета-потенциалов поверхности НЧ в дистиллированной воде. Все синтезированные частицы находились в диапазоне от 30 нм до 100 нм. Только НЧ Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> имели отрицательный ζ-потенциал в водной среде при нейтральном значении pH. Следует отметить, что величина дзета-потенциала характеризует условное

разделение слабо заряженных и сильно заряженных поверхностей, при этом значение дзета- потенциала принимается по модулю. Чем выше электрокинетический потенциал, тем более устойчив коллоид.

Таблица 2 – Гидродинамический размер и дзета-потенциал поверхности НЧ.

Образец	Гидродинамический диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ	S <sub>БЭТ</sub> , м <sup>2</sup> /г
AlOОН	90 ± 3	42.0 ± 1.0	170
TiO <sub>2</sub>	33 ± 3	7.2 ± 0.3	146
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	60 ± 3	30.0 ± 1.2	120
ZrO <sub>2</sub>	52 ± 3	13.8 ± 1.3	167
HfO <sub>2</sub>	56 ± 3	19.2 ± 1.0	115
Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	88 ± 3	-23 ± 0.5	92

Анализ текстурных свойств, проведенный с помощью низкотемпературной физической адсорбции азота, показал, что все синтезированные НЧ имели отчетливую пористую структуру с высокой удельной площадью поверхности (рисунок 4). Расчет значений проведен по изотермам адсорбции-десорбции азота НЧ оксидов металлов и подтверждает наличие в исследованных образцах большого количества пор.

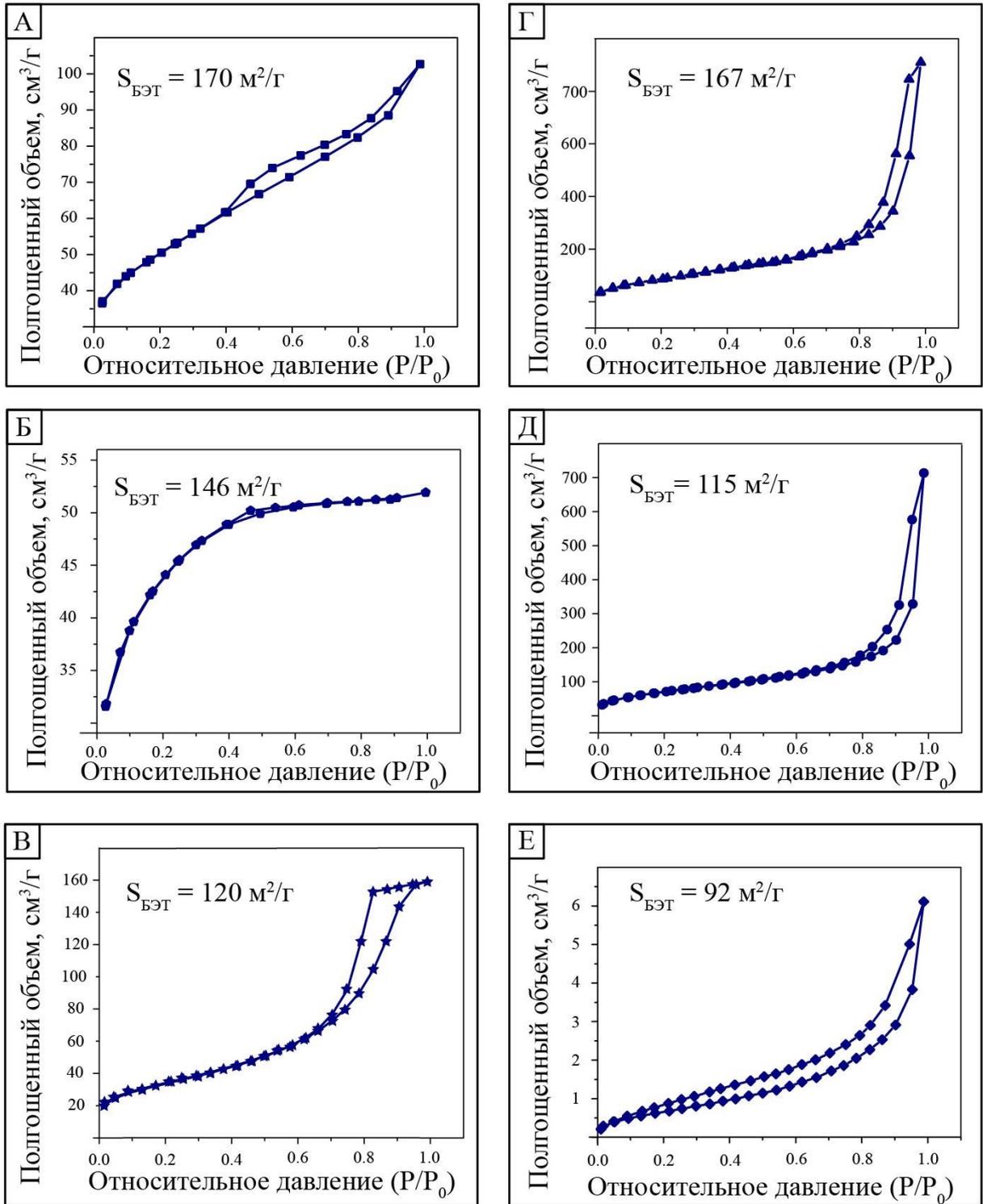


Рисунок 4 – Характеристика образцов методом низкотемпературной физической сорбции. Изотермы адсорбции-десорбции азота НЧ: А)  $\text{AlOOH}$ , Б)  $\text{TiO}_2$ , В)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Г)  $\text{ZrO}_2$ , Д)  $\text{HfO}_2$ , Е)  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ .

### 3.2 Метаболическая активность клеток в присутствии непокрытых НЧ

Изучение уровня метаболической активности клеток после инкубации с синтезированными НЧ проводили с использованием МТТ-теста, являющегося также косвенной мерой жизнеспособности клеток. «Клетки ПФЧ и HeLa инкубировали в течение 72 ч с 13-200 мкг / мл золей  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  с последующими измерениями уровня метаболической активности» [47]. Была выбрана максимальная концентрация золей 200 мкг / мл из-за ограничения растворимости НЧ в культуральной среде. Воздействия на клетки каждого из тестируемых образцов не вызвали значительного снижения конверсии МТТ (рисунок 5). Даже через 72 часа инкубации с 200 мкг / мл НЧ  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  метаболическая активность клеток в ПФЧ или клетках HeLa составляла 67% от уровня контрольных образцов. Тем не менее, непокрытые НЧ оказались более токсичными, чем НЧ  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ , покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ), обеспечивающим лучшую биосовместимость [132]. Что касается НЧ магнетита, цитотоксичность, выражающаяся в подавлении метаболической активности клеток, была также более выраженной, чем для других соединений магнетита [7; 9]. НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ , и  $\text{AlOOH}$  не вызывали цитотоксичности.

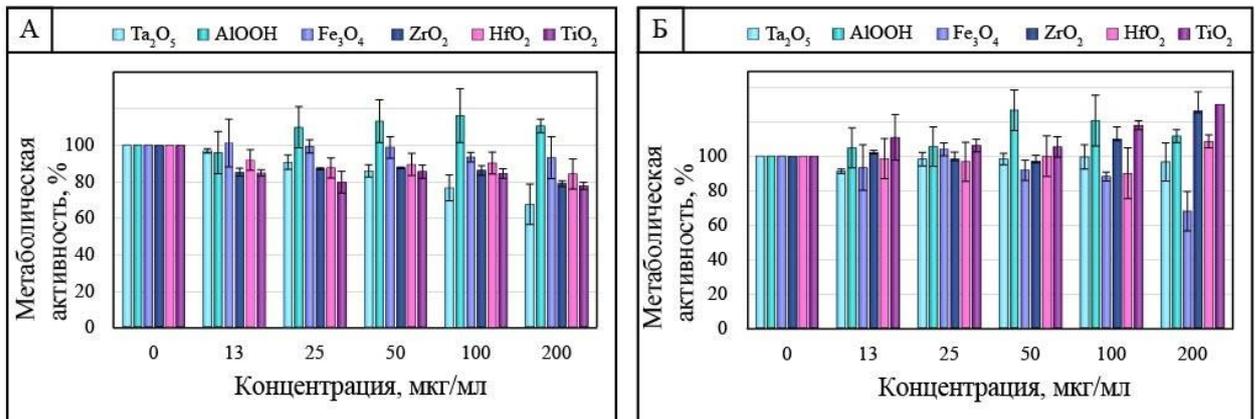


Рисунок 5 – Метаболическая активность клеток после 72-часового воздействия НЧ  $\text{AlOOH}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  (МТТ- тест) А) HeLa; Б) ПФЧ. Показаны средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Для независимой оценки отсутствия цитотоксичности НЧ оксидов металлов, апоптотическую или некротическую гибель клеток оценивали с

использованием окрашивания Annexin V-FluoProbes488 / 7AAD с последующей проточной цитометрией. Этот анализ позволяет различать живые, ранние / поздние апоптотические и некротические клетки. Не было обнаружено значительного снижения процента живых клеток HeLa после 24-часового воздействия НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  (200 мкг / мл каждого) (рисунок 6). Количество ранних / поздних апоптотических клеток существенно не отличалась по сравнению с необработанными клетками; максимальный процент ранних апоптотических клеток, обработанных НЧ  $\text{AlOOH}$  и НЧ  $\text{TiO}_2$ , составлял 2,1% и 6,9% соответственно. Вместе с результатами МТТ-анализа эти данные показали, что биохимические процессы в культивируемых клетках не были подвержены значительному влиянию солей НЧ  $\text{AlOOH}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

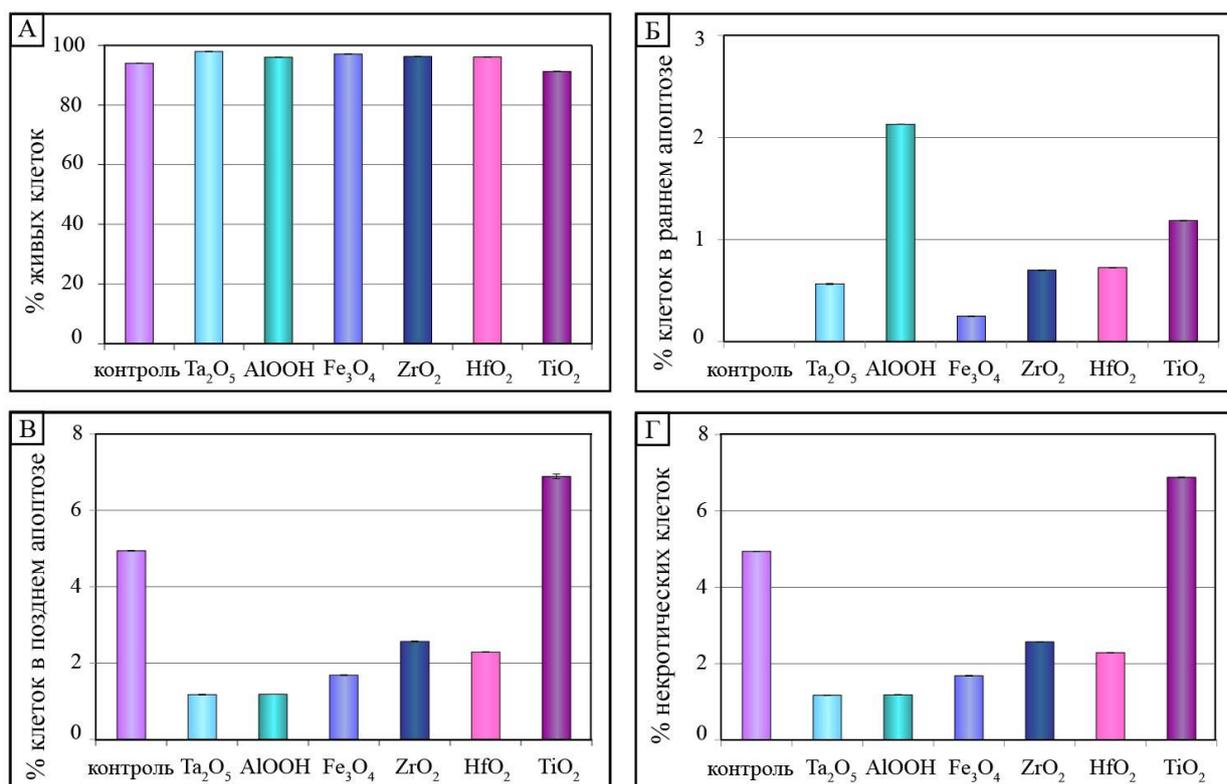


Рисунок 6 – Жизнеспособность клеток HeLa, обработанных золями  $\text{AlOOH}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в течение 24 часов. (А) Процент живых клеток (аннексин V-FluoProbes488- / 7-AAD-). (Б) Ранние апоптотические клетки (аннексин V-FluoProbes488 + / 7-AAD-). (В) Поздние апоптотические клетки

(аннексин V-FluoProbes488 + / 7-AAD +). (Г) Некротические клетки (аннексин V-FluoProbes488 + / 7-AAD +). Показаны средние значения и ошибки среднего трех независимых экспериментов. Планки погрешностей не отображаются, если они были ниже предела разрешения изображения.

### 3.3 Острая токсичность непокрытых НЧ

#### 3.3.1 Поведенческие характеристики и токсикометрия

Исследования острой токсичности золей НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$ , проводили на мышах при внутрижелудочном введении. Все изученные соединения, кроме НЧ оксида циркония, не были токсичными при 3 г / кг, в то время как введение оксида циркония в этой дозе вызвало гибель всех животных в группе. Данные токсикометрии приведены в таблице 3. Поскольку после введения 3 г/кг  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  в течение 14 дней гибели не наблюдалось, эти материалы могут быть определены как нетоксичные в соответствии с рекомендациями ОЭСР –  $\text{LD}_{50} > 3000$  мг / кг.

Таблица 3 – Токсикометрия 4 % золей  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$ .

НЧ	$\text{LD}_{50}$ (мг/кг)	Погибло/всего	Класс токсичности (ОЭСР)
$\text{Ta}_2\text{O}_5$	>3000	0/4	Не токсично (Класс V)
$\text{AlOOH}$	>3000	0/4	Не токсично (Класс V)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	>3000	0/4	Не токсично (Класс V)
$\text{ZrO}_2$	2277.8	4/4 (3000 мг/кг)	Низко токсично (Класс IV)
		1/4 (2000 мг/кг)	
		0/4 (1000 мг/кг)	
$\text{HfO}_2$	>3000	0/4	Не токсично (Класс V)
$\text{TiO}_2$	>3000	0/4	Не токсично (Класс V)

Расчетная  $\text{LD}_{50}$  для  $\text{ZrO}_2$  составила 2277,8 мг / кг, поэтому эти НЧ были классифицированы как малотоксичные. После введения 2000 г / кг золя НЧ  $\text{ZrO}_2$  в течение первых 2-5 минут у мышей отмечали атаксию; через 9-12 минут

наблюдала единичные судороги с последующей гиподинамией, боковое положение сохранялось в течение 2 часов. После второго введения все животные находились в боковом положении в течение 4-7 мин с периодическими судорогами. Тем не менее, через 24 ч после инъекций общее состояние выживших животных, их внешний вид, подвижность, потребление корма и волосяной покров не отличались от контрольной группы. Никаких нарушений поведения не было зарегистрировано в течение как минимум 2 недель после введения.

После первичного введения мышам золя НЧ  $TiO_2$  никаких изменений в поведении не наблюдали. Через два часа после второго введения (общая доза 2 г/кг) наблюдали тремор и гиподинамию. Через 5 мин после третьего введения тремор сопровождался атаксией, гиподинамией и периодическими судорогами. Через 24 часа общее состояние животных нормализовалось. В течение 2х недель после введения никаких нарушений не выявлено.

При введении золя НЧ  $HfO_2$  через 2-5 мин у мышей наблюдали атаксию, у некоторых животных была одышка и небольшой тремор. Мыши оставались в состоянии гиподинамии в течение 40 мин, затем их состояние возвращалось к норме. После последующих введений наблюдали более выраженные проявления интоксикации. Адинамия и боковое позиционирование продолжались до 45 мин. Тем не менее, через 24 часа общее состояние выживших животных, их внешний вид, подвижность, отношение к пище и состояние волосяного покрова не отличались от контрольной группы. Никаких внешних поведенческих отклонений не наблюдали в течение 2 недель после введения. Общее состояние животных после внутрижелудочного введения зольей НЧ  $Ta_2O_5$ ,  $Fe_3O_4$  и  $AlOOH$ , их поведение, подвижность, потребление корма и состояние шерстяного покрова не отличались от контрольной когорты на протяжении 14 суток. Во всех экспериментальных и контрольных группах отмечено снижение массы тела только в течение первых 24 ч. Постепенно масса тела животных восстанавливалась (Таблица 4). При внутрижелудочном введении зольей НЧ показатели массы тела не отличались статистически значимым образом от полученных для контрольной группы значений.

Таблица 4 – Масса мышей после внутрижелудочного введения 4 % золь НЧ  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$ ,  $HfO_2$ ,  $Ta_2O_5$ ,  $Fe_3O_4$  и  $AlOOH$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  СОШ.

Время после введения	Контроль	$Ta_2O_5$ 3 г/кг	$AlOOH$ 3 г/кг	$Fe_3O_4$ 3 г/кг	$ZrO_2$ 2 г/кг	$HfO_2$ 3 г/кг	$TiO_2$ 3 г/кг
0 часов	19.8 $\pm$ 0.5	20.0 $\pm$ 0.4	19.8 $\pm$ 0.9	20.8 $\pm$ 0.8	20.0 $\pm$ 0.9	20.8 $\pm$ 0.5	19.8 $\pm$ 0.5
24 часа	19.3 $\pm$ 0.8	19.8 $\pm$ 0.5	18.3 $\pm$ 0.9	20.3 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 0.9	20.8 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 0.5
7 дней	21.7 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.3	22.1 $\pm$ 0.7	22.5 $\pm$ 0.9	21.6 $\pm$ 1.0	22.9 $\pm$ 0.7	21.1 $\pm$ 0.3
14 дней	22.1 $\pm$ 0.4	23.0 $\pm$ 0.6	22.6 $\pm$ 0.7	23.0 $\pm$ 0.7	22.6 $\pm$ 1.0	22.8 $\pm$ 0.7	21.2 $\pm$ 0.3

\* Статистически значимые отличия от контрольной группы:  $P < 0.05$

### 3.3.2 Данные аутопсии

По данным вскрытия и макроскопического исследования внутренних органов различий между группами животных, получавшими золи НЧ, и животными контрольной группы не наблюдали. Не было обнаружено каких-либо различий между экспериментальными и контрольными группами в морфологии мозга, почек, сердца, легких, яичек, тимуса, желудка, печени и селезенки. Относительная масса органов представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Относительная масса органов (мг/г массы тела) после введения 4 % золь НЧ  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$ ,  $HfO_2$ ,  $Ta_2O_5$ ,  $Fe_3O_4$  и  $AlOOH$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  СОШ.

Орган	Контроль	$Ta_2O_5$ 3 г/кг	$AlOOH$ 3 г/кг	$Fe_3O_4$ 3 г/кг	$ZrO_2$ 2 г/кг	$HfO_2$ 3 г/кг	$TiO_2$ 3 г/кг
Сердце	4.61 $\pm$ 0.30	4.63 $\pm$ 0.19	5.15 $\pm$ 0.16	4.84 $\pm$ 0.12	4.98 $\pm$ 0.18	5.02 $\pm$ 0.18	4.92 $\pm$ 0.13
Легкие	9.63 $\pm$ 0.42	12.23 $\pm$ 0.72	10.32 $\pm$ 0.88	9.07 $\pm$ 1.00	8.33 $\pm$ 0.88	12.79 $\pm$ 0.72	10.16 $\pm$ 1.31
Тимус	1.81 $\pm$ 0.18	1.76 $\pm$ 0.09	1.99 $\pm$ 0.09	1.78 $\pm$ 0.13	1.50 $\pm$ 0.14	1.89 $\pm$ 0.14	2.47 $\pm$ 0.28
Печень	55.39 $\pm$ 0.99	52.19 $\pm$ 1.47	51.90 $\pm$ 0.47*	53.18 $\pm$ 1.89	45.30 $\pm$ 1.98*	52.67 $\pm$ 0.55	47.03 $\pm$ 1.91*
Селезенка	4.87 $\pm$ 0.21	4.95 $\pm$ 0.27	4.16 $\pm$ 0.12*	4.26 $\pm$ 0.25	3.47 $\pm$ 0.18*	4.35 $\pm$ 0.11	4.61 $\pm$ 0.33
Почка (левая)	6.42 $\pm$ 0.36	6.62 $\pm$ 0.21	6.61 $\pm$ 0.13	7.03 $\pm$ 0.33	6.67 $\pm$ 0.18	6.95 $\pm$ 0.23	6.54 $\pm$ 0.22
Головной мозг	18.12 $\pm$ 0.19	18.50 $\pm$ 0.39	13.75 $\pm$ 4.36	18.21 $\pm$ 0.40	18.64 $\pm$ 0.53	18.16 $\pm$ 0.53	19.11 $\pm$ 0.11*

## Продолжение таблицы 5

Яички	7.03±0.18	7.02±0.06	6.70±0.50	7.53±0.07	6.29±0.46	7.49±0.10	6.80±0.26
* Статистически значимые отличия от контрольной группы. P<0.05							

Не было выявлено никаких статистически значимых изменений в массовых коэффициентах внутренних органов мышей, которым были введены НЧ  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Наблюдалось значительное снижение массовых коэффициентов печени и селезенки у мышей после введения НЧ  $\text{ZrO}_2$  и  $\text{AlOOH}$ . Учитывая гибель животных при введении высоких доз  $\text{ZrO}_2$ , изменения внутренних органов дополняют общую картину интоксикации. Что касается результатов, полученных при анализе массовых коэффициентов органов после введения НЧ оксигидроксида алюминия, они позволяют предположить, что несмотря на отсутствие внешних токсических проявлений интоксикации, соединение в высоких дозах все же обладает небольшим токсическим эффектом, выраженном в снижении массовых коэффициентов печени и селезенки. У животных, которым были введены НЧ  $\text{TiO}_2$ , наблюдалось снижение массового коэффициента печени, и обнаруживалась гипертрофия головного мозга.

### 3.3.3 Микроскопия

Микроструктура органов животных после введения 4% зелей НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  не отличалась от контрольной когорты, за исключением группы, получившей  $\text{ZrO}_2$  в дозах 2000 мг/ кг и 3000 мг/ кг. Тимус, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, мозг, яички мышей после внутрижелудочного введения зелей НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$ , имели нормальную морфологию. Фотографии не представлены, так как являются гистологической нормой.

Тимус, печень, селезенка, почки, ткани яичек животных после введения НЧ  $\text{ZrO}_2$  были без существенных изменений. В микроперепаратах миокарда у животных, умерших после введения  $\text{ZrO}_2$ , окрашивание миокарда неравномерно из-за наличия контрактур кардиомиоцитов - небольшие участки ретракции кардиомиоцитов окрашены в более насыщенный цвет (черная стрелка-

треугольник), при этом соседние участки кардиомиоцитов бледнее (черная стрелка). Деформация мышц миокарда вероятнее всего вызвала нарушения сердечного ритма. Кроме того, слабое кровоснабжение чередуется с очагами венозного полнокровия и эритростаза (рисунок 7-А-С). В ткани легкого наблюдались диффузное полнокровие и эритростаз, без признаков тромбоза сосудов. Частичный альвеолярный коллапс был обнаружен в паренхиме. Альвеолярные перегородки были утолщены из-за отека. Многочисленные эритроциты в альвеолярном просвете указывали на повышенную проницаемость гематоэнцефалического барьера. Значительных изменений не наблюдались в бронхах (рисунок 7-Д). В мозге гибель нейронов сопровождалась микроглиальной реакцией, коллапсом мелких сосудов и перичеллюлярным отеком (рисунок 7- F, G). Большие сосуды содержали скопления эритроцитов. Эти гистологические признаки позволили предположить, что смерть животных была острой из-за значительного снижения функции сердца, по-видимому, связанного с аритмией, которая привела к отеку легких и ишемии головного мозга.

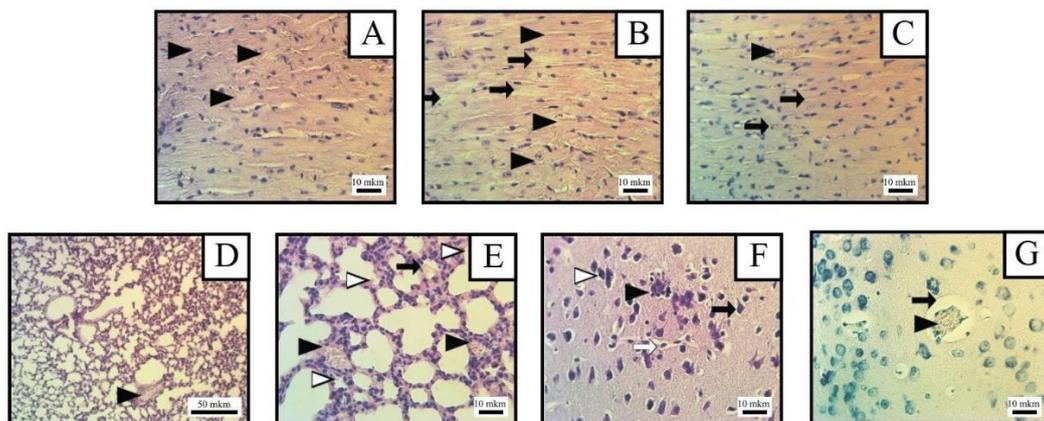


Рисунок 7 – А-С: Миокард. Г&Э окрашивание. А) Контрактуры показаны черными стрелками-треугольниками; (40х) В) Контрактуры. Слипание эритроцитов в капиллярах (черная стрелка). В коронарных сосудах признаков тромбоза не наблюдается. В некоторых кардиомиоцитах исчезновение поперечной исчерченности указывает на гипоксические изменения (черная стрелка-треугольник) (40х). С) Венозное полнокровие (черная стрелка-треугольник), слипание эритроцитов (черная стрелка) (40х). D, E: легкие. Г&Э

окрашивание. Отек паренхимы (правый верхний угол). Венозный застой показан черной стрелкой-треугольником (40x). Е) Легочная паренхима. Межалвеолярные сосуды с выраженным полнокровием (черная стрелка-треугольник). Плазма (черная стрелка) и эритроциты (белая стрелка-треугольник) в альвеолярном просвете. Утолщение альвеолярных перегородок (белая стрелка) (40x). F: кора головного мозга прецентральной извилины мозга. Г&Э окрашивание. Активация микроглии (черная стрелка). Перипеллюлярный отек (черная стрелка). Мертвая клетка или разрушенный сосуд (белая стрелка) (40x). G) То же, что F, окрашивание по Нислю. Слипание эритроцитов в вене (черная стрелка). Периваскулярный отек (черная стрелка) (40x).

#### 3.4 Изменение эффективности конъюгативного переноса плазмид мультирезистентности

Ранее было показано, что некоторые НЧ оксидов металлов повышали эффективность обмена ДНК между бактериями [146; 188]. Это, в свою очередь, может способствовать передаче генов устойчивости к антибиотикам и формированию мультирезистентных штаммов. Подобный эффект нежелателен для наноматериалов. В связи с этим было проанализировано влияние НЧ на перенос ДНК между бактериями на модели конъюгативного переноса плазмид, несущих гены устойчивости к антибиотикам. Для анализа использовали штаммы *E. coli*, содержащие индивидуальные кассеты устойчивости. После инкубации двух штаммов, один из которых имел кассету резистентности к стрептомицину, другой – к тетрациклину, в совместной культуре с НЧ рост трансконъюгантов фиксировали на среде, содержащей два антибиотика (тетрациклин и стрептомицин) (рисунок 8,9). Штамм-реципиент, первоначально несущий кассету устойчивости к тетрациклину TcR на хромосоме, приобретает кассету устойчивости к стрептомицину, расположенную на плазмиде pKNG 101 SmR. В результате этого обмена бактерии становятся устойчивыми к двум антибиотикам.

Как показано на рисунке 9, все протестированные НЧ, кроме бемита, не оказывали значительного влияния на перенос плазмиды между штаммами *E. coli*.

Однако, НЧ бемита значительно повысили эффективность переноса. Подобные результаты были показаны ранее для переноса плазмиды RP4 под действием НЧ оксида алюминия ( $Al_2O_3$ ) [146]. Незначительное влияние НЧ магнетита согласуется с предыдущими данными [146]. Оксиды тантала, гафния, циркония и титана не только не повышали эффективность переноса плазмиды, но даже снижали её.

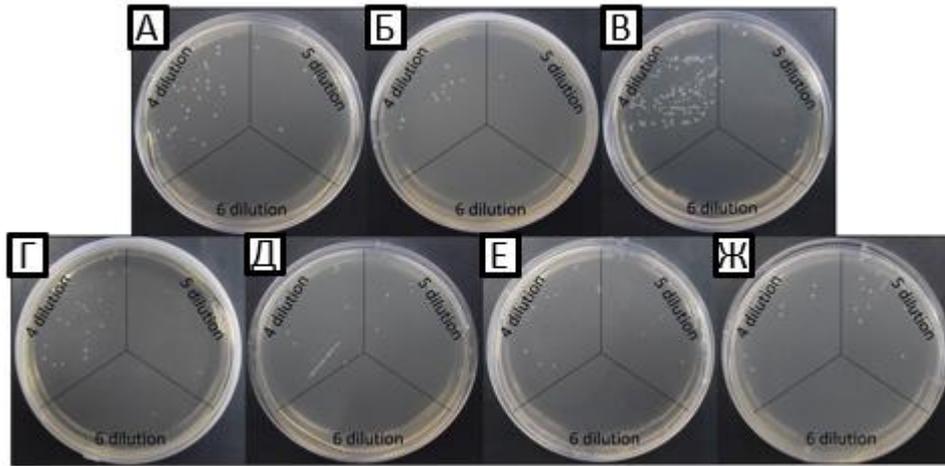


Рисунок 8 – Рост транскоњугантов *E.coli*, полученных путем горизонтального переноса генов. (А) без НЧ, (Б)  $Ta_2O_5$ , (В)  $AlOOH$ , (Г)  $Fe_3O_4$ , (Д)  $ZrO_2$ , (Е)  $HfO_2$ , (Ж)  $TiO_2$ . В результате конъюгативного переноса плазмиды pKNG SmR из штамма cc118 был получен транскоњугативный штамм Nova Blue TcR pKNG 101 SmR с двумя кассетами устойчивости: тетрациклином (TcR) и стрептомицином (SmR).

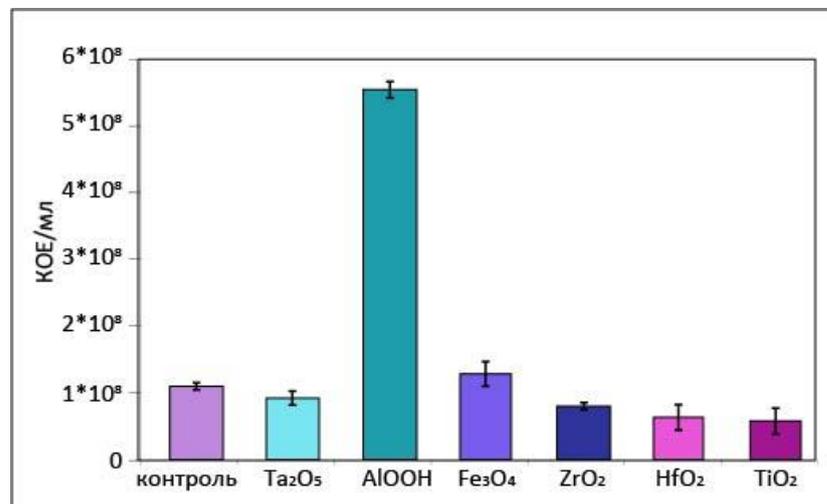


Рисунок 9 – Влияние НЧ на перенос плазмиды между штаммами *E.coli* Nova Blue TcR и cc118, несущими pKNG SmR. Показаны средние значения трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение.

Таким образом, НЧ бемита могут оказывать отрицательное воздействие, поскольку способствуют образованию мультирезистентных бактерий. Этот эффект может быть связан с механизмами, подобными НЧ оксида алюминия, показанными ранее [146]. Возможно, это вызвано повреждением клеточной стенки в результате окислительного стресса под действием НЧ, в результате которого повышается эффективность проникновения ДНК в клетку. С другой стороны, повышение количества образующихся транскоъюгатов может быть связано с повышенной экспрессией конъюгативных факторов, что ранее было показано в отношении НЧ оксида алюминия. Другие протестированные оксиды по результатам исследования являются безопасными (рисунок 9).

### 3.5 Изменения компонентов врожденного иммунитета в присутствии НЧ

Материалы и результаты главы опубликованы в статье [183].

Другим важным параметром оценки безопасности наноматериалов является их взаимодействие с иммунной системой. Известно, что в первую очередь на появление НЧ в организме реагирует врожденный иммунитет, в частности многие НЧ при попадании в кровь поглощаются макрофагами [20]. В данной части работы изучены НЧ  $Fe_3O_4$ ,  $TiO_2$  и  $AlOOH$ , предполагаемые для системного введения. Для изучения влияния исследуемых НЧ на компоненты врожденного иммунитета, первоначально потребовалось подобрать субтоксические дозы соответствующих НЧ, не вызывающие значительной токсичности для культур клеток. НЧ  $Fe_3O_4$ ,  $TiO_2$  и  $AlOOH$  не оказывали цитотоксического воздействия на моноцитарные клетки человека (линия ТНР-1) в диапазоне концентраций 0,234-30 мкг / мл в течение 72 ч непрерывного воздействия. Уровень выживаемости клеток не опускался ниже 80%. Никаких морфологических признаков гибели обнаружено

не было, что указывает на то, что даже максимальные концентрации, использованные в эксперименте, являются приемлемыми (рисунок 10).

В целом результаты анализа цитотоксичности НЧ оксидов металлов согласуются с ранее опубликованными результатами [61,62]. На основании результатов оценки цитотоксичности, были рассчитаны оптимальные концентрации НЧ, для исследования влияния НЧ на экспрессию TLR-4 и 6.

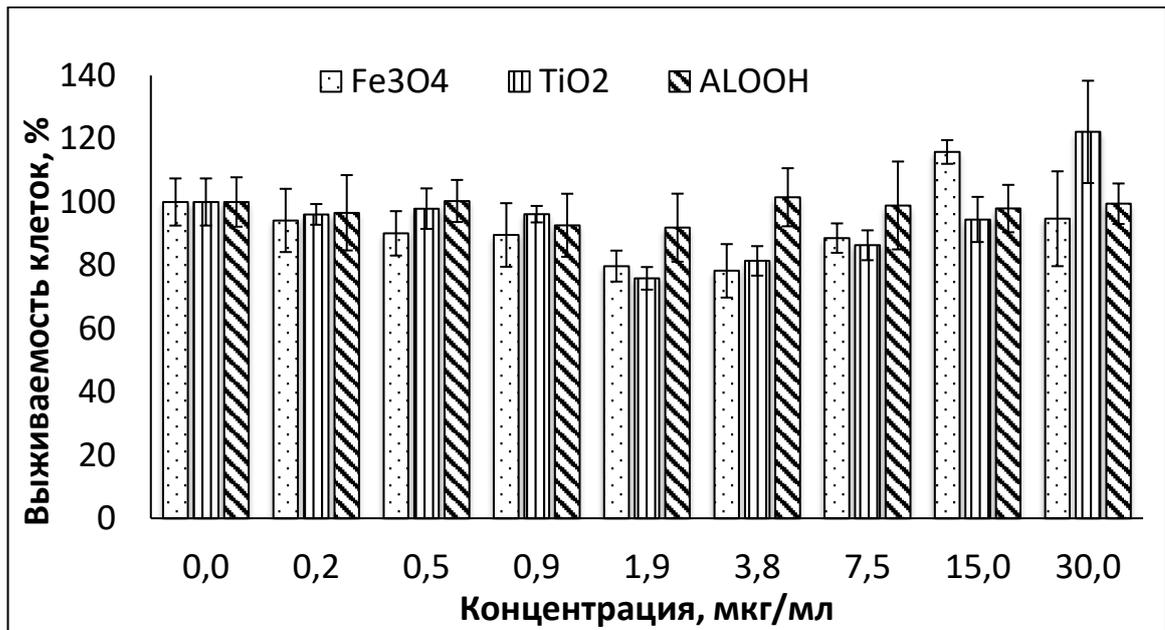


Рисунок 10 – Цитотоксичность НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, AlOOH, TiO<sub>2</sub> после 72 ч воздействия на клетки моноцитов THP-1

Задачей данной части работы было продемонстрировать ответ иммунной системы; в частности, уровень активации Toll-подобных рецепторов, вызванный воздействием НЧ. Исследованные НЧ обладают высоким терапевтическим потенциалом, и могут быть использованы для создания новых подходов к лечению бактериальных и грибковых инфекций посредством дополнительной стимуляции иммунной системы [74; 103; 184]. Toll-подобные рецепторы присутствуют в большинстве типов клеток и являются частью сигнальных путей, которые отвечают на различные соединения, в частности на липополисахарид из бактериальной клеточной стенки [85; 178]. Они вызывают активацию клеточных механизмов, которые приводят к повышению активности Т- и В-клеток, а также макрофагов, что и обеспечивает иммунный ответ.

Для оценки влияния НЧ на мРНК TLR 4 и -6 в моноцитах THP-1, использовали концентрации, при которых жизнеспособность клеток составляла не менее 80% в МТТ-тесте. Соответствующие значения для этих уровней жизнеспособности были следующими: 30 мкг / мл для  $Fe_3O_4$  и  $AlOOH$ , 25 мкг / мл для  $TiO_2$ . Клетки инкубировали с этими НЧ или с 1 мкг / мл ЛПС в качестве положительного индуктора TLR-ответа в течение 24 часов.

Все исследованные НЧ в разной степени увеличивали экспрессию TLR (рисунок 11), но в любом случае максимальная индукция была сопоставима с таковой после воздействия ЛПС. Наибольшую индукцию TLR-4 наблюдали под влиянием НЧ  $AlOOH$ , при воздействии которых экспрессия увеличивалась в 1,6 раза. Следует отметить, что уровень TLR-4 после инкубации с  $AlOOH$  был сопоставим с уровнем ЛПС. НЧ  $TiO_2$  увеличивали экспрессию менее значительно: в 1,1 раз. НЧ  $Fe_3O_4$  не влияли на экспрессию TLR-4.

Экспрессия TLR-6 наиболее индуцирована также НЧ  $AlOOH$  (в 1,6 раза). НЧ  $TiO_2$  повышали индукцию экспрессии в 1,5 раза. Наименьший сравнительный эффект проявляли НЧ  $Fe_3O_4$ , которые увеличили экспрессию в 1,4 раза. Таким образом, наиболее мощным индуктором TLR являются НЧ  $AlOOH$ . НЧ  $TiO_2$  также стимулируют экспрессию обоих исследованных TLR, но в меньшей степени. Наиболее низкий эффект обнаружен для НЧ  $Fe_3O_4$ .

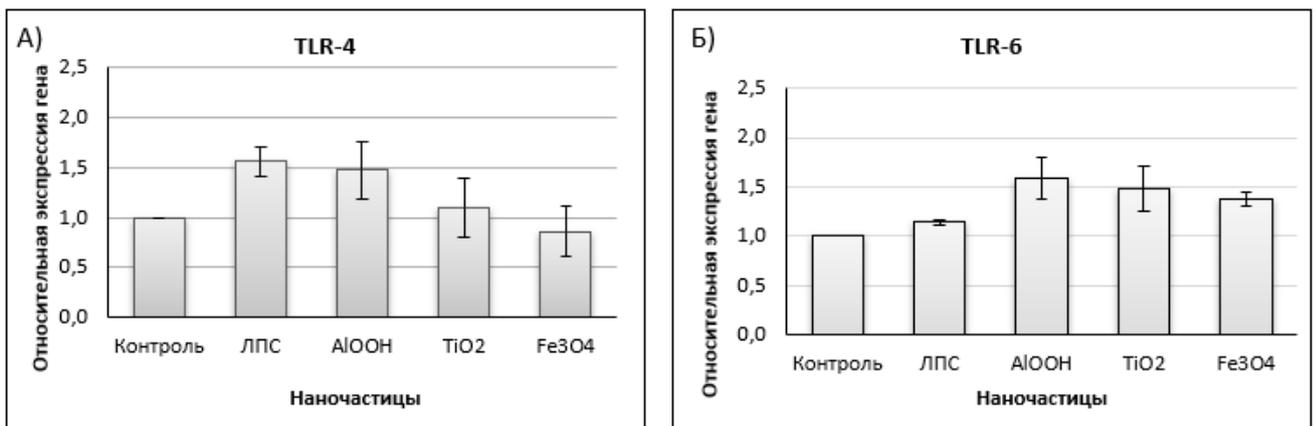


Рисунок 11 – Относительная экспрессия генов TLR-4 (А) и TLR-6 (Б) в клетках THP-1 после 24-часового воздействия НЧ или ЛПС. Показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

### 3.6 Метаболические изменения клеток в присутствии соединений на основе магнетита

Материалы и результаты главы опубликованы в статьях [7–9; 157] и монографии [44].

Ранее опубликованы сведения о негативном влиянии НЧ магнетита, покрытых трехблочными сополимерами, на жизнеспособность клеток даже в дозах ниже 1 мг / мл из-за токсического воздействия полимеров [62]. В других исследованиях сообщалось, что НЧ оксида железа (II, III) индуцируют зависимость от концентрации цитотоксичность, возникающую при дозах выше 2500 мкг / мл [170]. Токсичные эффекты суперпарамагнитных НЧ оксида железа были невелики при концентрациях до 20 мМ [112]. Воздействие супермагнитных НЧ при концентрации 200 мкг / мл снижает жизнеспособность клеток до 55% [125]. Таким образом, важной является оценка влияния соединений на основе магнетита на метаболическую активность культур клеток.

#### 3.6.1 Метаболическая активность клеток в присутствии стабильного золя магнетита

Результаты исследований метаболической активности клеток в присутствии НЧ магнетита представлены на диаграмме (рисунок 12). Выбор максимальной концентрации обусловлен концентрацией НЧ оксида железа в стабильном золе. НЧ магнетита в диапазоне концентраций 12,5-200 мкг / мл не проявляют цитотоксического действия на клетки линий HeLa и ФЛЭЧ после 72-часового воздействия. Метаболическая активность клеток составляла 80,8% от контрольных значений (для клеток ФЛЭЧ) и 87,6% (для клеток HeLa), что указывает на то, что НЧ магнетита не вызвали значительной гибели клеток.

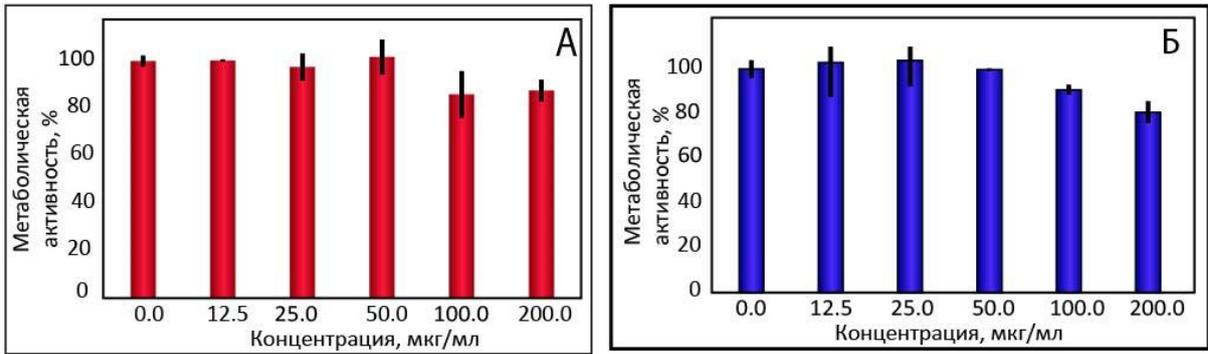


Рисунок 12 – Влияние магнетита на выживаемость (А) клеток HeLa и (Б) ФЛЭЧ после 72 часов воздействия

### 3.6.2 Метаболическая активность клеток в присутствии магнитных фотонных кристаллов (МФК)

Для синтеза МФК размером 80 нм использовались реагенты, одобренные для парентерального введения [10; 27], что позволяет предположить, что данные НЧ будут обладать минимальным действием на метаболическую активность клеток. На рисунке 13 показано, что в исследованном диапазоне 47-750 мкг / мл МФК вызывали незначительное снижение метаболической активности в клетках ФЛЭЧ или HeLa после 72-часовой непрерывной экспозиции (время, достаточное для 3х удвоений культуры). К 72 часам наибольшее снижение метаболической активности составляло только 13% для клеток ФЛЭЧ и 24% для клеток HeLa, соответственно (рисунок 13). Морфологические признаки гибели клеток не наблюдались, что указывает на то, что даже при максимальных испытанных концентрациях МФК не оказывали токсического действия. Через 24 ч замедление роста клеток было еще менее выражено. Важно отметить, что исследованные материалы оказались менее токсичны для клеток человека, в сравнении с ранее опубликованными данными для аналогичных структур [102]. Возможно, наблюдаемый эффект связан с использованием в процессе синтеза НЧ глицерола вместо токсичного этиленгликоля. При воздействии эквивалентной дозы (188 мкг / мл по сравнению с 200 мкг / мл) в течение 72 ч выживаемость клеток ФЛЭЧ и HeLa составляла 91 и 97% соответственно, что превышало ранее полученные

значения [102], несмотря на 6 -кратное увеличение инкубационного периода, что доказывает превосходную биосовместимость исследованных МФК.

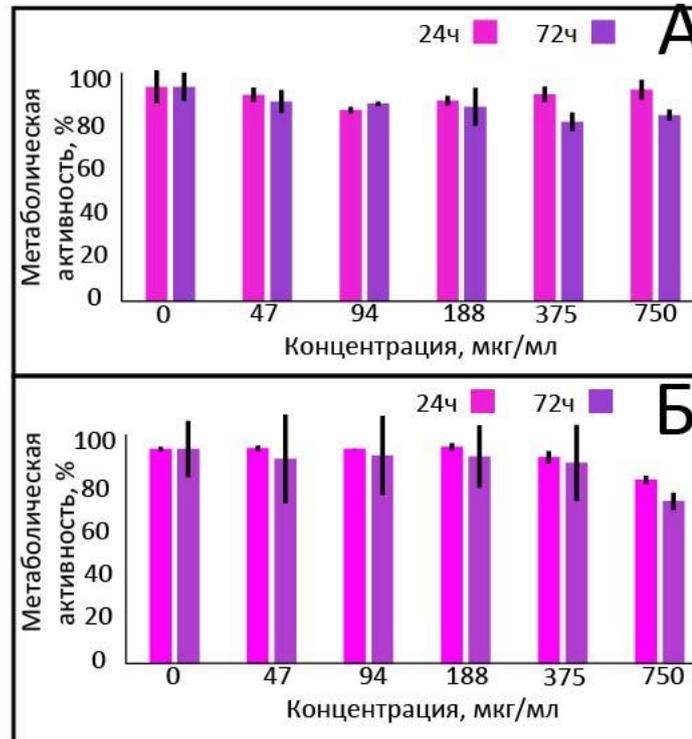


Рисунок 13 – Метаболическая активность клеток ФЛЭЧ (А) и клеток HeLa (Б) после 24 и 72 часов воздействия МФК

### 3.6.3 Метаболическая активность клеток в присутствии геля магнетита и магнитных наноконтейнеров

Гидрогель магнетита уникален тем, что обладает высокой площадью поверхности и большой сорбционной емкостью, в связи с чем предполагается его применение в биомедицине. Была изучена метаболическая активность клеток в присутствии геля магнетита. После 72-часовой экспозиции соединения (17-270 мкг / мл) мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и HeLa не продемонстрировали какого-либо значительного снижения метаболической активности (рисунок 14 А и Б). К 72 ч наибольшее снижение конверсии маркера ингибирования метаболической активности клеток МТТ, составляло 8% для клеток МСК и 18% для клеток HeLa, соответственно. Морфологические признаки

гибели клеток не наблюдались, что свидетельствует о биосовместимости геля магнетита даже при максимальных испытанных концентрациях. При оценке цитотоксичности гель магнетита проявляет эффект аналогичный полученному для НЧ магнетита при равных дозах (раздел 3.7.1).

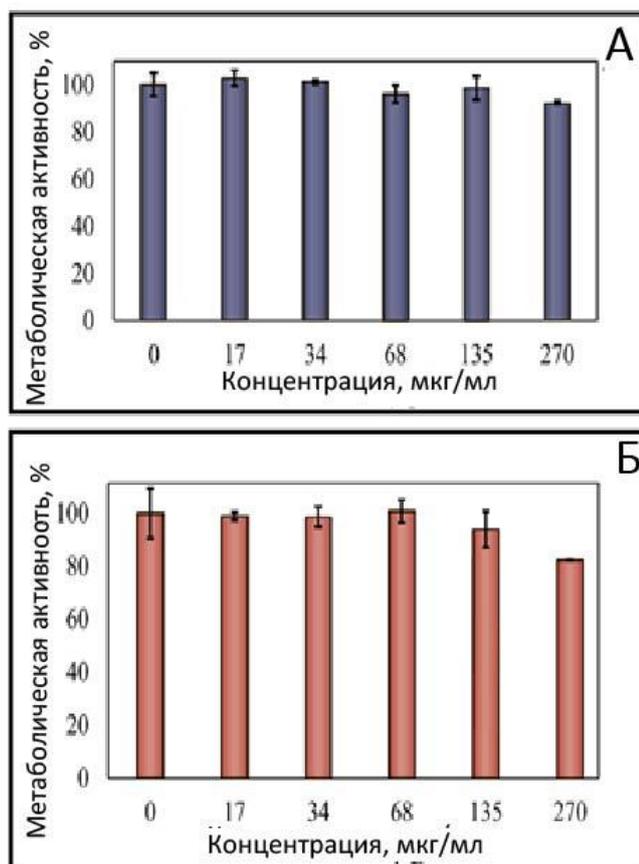


Рисунок 14 – Метаболическая активность клеток МСК (А) и HeLa (Б) после инкубации с гелем магнетита в течение 72 часов

В медицинской практике не теряет своей актуальности вопрос адресной доставки лекарственных средств. Это явилось основанием для изучения влияния на метаболическую активность культур клеток магнитных наноконтейнеров (МНК), полученных из гидрогеля методом микроэмульсионного синтеза. Количественный анализ воздействия, приведенный на диаграммах, показывает незначительное снижение метаболической активности клеток через 72 часа инкубации с МНК в концентрациях 16- 260 мкг / мл (рисунок 15). Полученные результаты подтверждают, что цитотоксичность МНК сравнима с таковой для НЧ магнетита при воздействии эквивалентных доз.

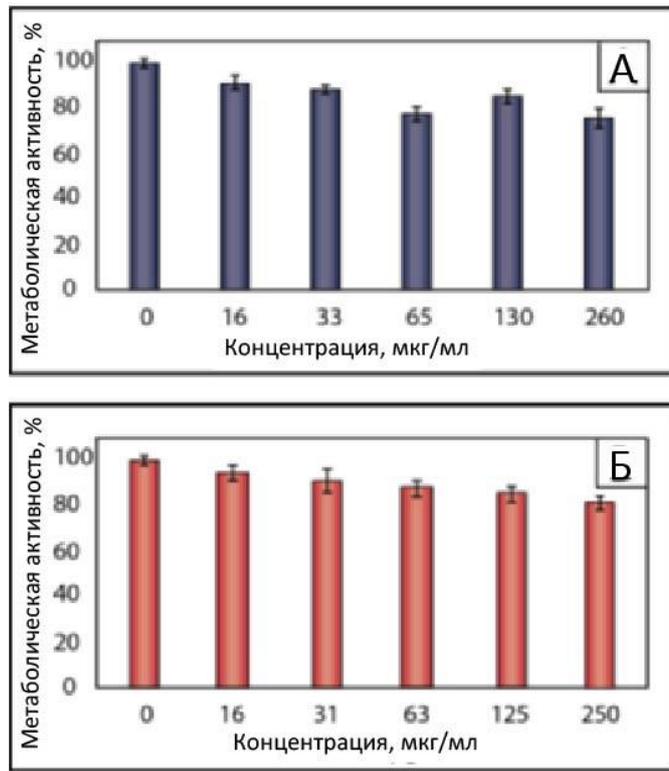


Рисунок 15 – Влияние МНК на метаболическую активность HeLa (А) и ПФЧ (Б) (72 часа инкубации).

Известно, что НЧ способны индуцировать оксидативный стресс в клетках, что приводит к токсическим эффектам и гибели [25], поэтому была также изучена динамика содержания активных форм кислорода (АФК) в клетках после инкубации с МНК. Клетки окрашивали не флуоресцирующим красителем диацетатом 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCFDA), от молекул которого при окислении происходит отщепление диацетата и переход во флуоресцентную форму. После инкубации клеток линии IMR-32 с 250 мкг/мл МФК не было зафиксировано генерации активных форм кислорода (рисунок 16, а-с). В качестве позитивного контроля использовали перекись кислорода, вызывающую активное разгорание зеленой флуоресценции, свидетельствующее об образовании АФК и, как следствие, расщепление DCFDA.

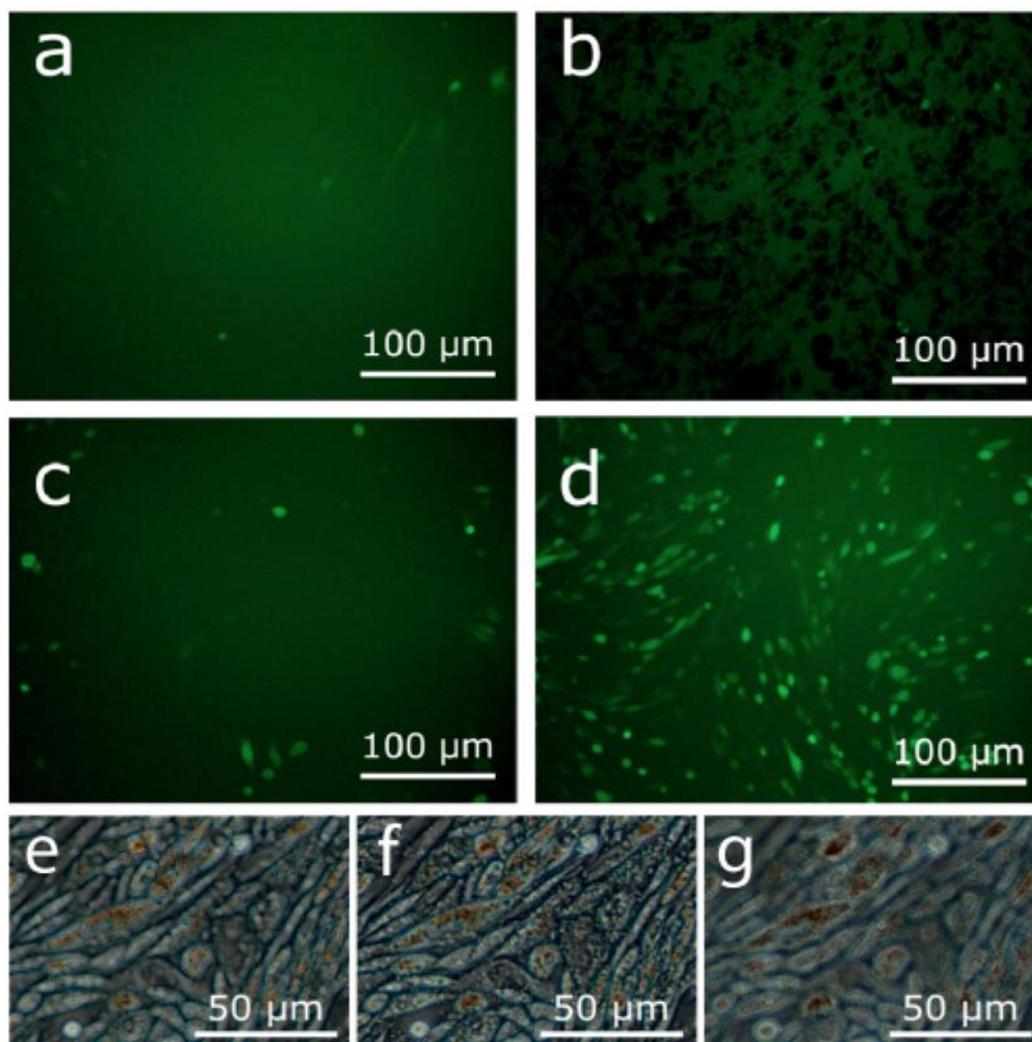


Рисунок 16 – Образование АФК в клетках IMR-32 (а) Отрицательный контроль, (б) МНК в концентрации 250 мкг / мл (черные участки на изображении – агрегаты МНК), (с)  $H_2O_2$  в концентрации 0,03%, и (д)  $H_2O_2$  в концентрации 0,15%. (е – г) Фазово-контрастные изображения клеток IMR-32 после 4 ч инкубации с МНК в концентрации 250 мкг / мл. Коричневые области представляют собой агрегаты МНК, фотографии сделаны на разном фокусном расстоянии, концентрируясь соответственно на мембране и цитоплазме клеток

При наблюдении клеток IMR-32 методом фазово-контрастной микроскопии после 24 часов инкубации с МНК и нескольких отмывок физиологическим раствором, было зафиксировано значительное накопление контейнеров в цитоплазме клеток (рисунок 16, е-г), при этом данный факт никак не влиял на скорость их пролиферации и морфологические особенности. Данный факт подтверждает возможность использования исследуемых объектов для адресной

доставки, благодаря их эффективному проникновению в клетку при минимальном влиянии на клеточный метаболизм.

### 3.7 Влияние оксигидроксида алюминия на метаболическую активность клеток

Материалы и результаты главы опубликованы в статье [166].

Действие НЧ оксигидроксида алюминия (бемита) на метаболическую активность клеток было изучено на линиях HeLa и A549. В эксперименте использовали две формы НЧ бемита: 10% алюминиевые ксерогелевые наноконтейнеры (АКН) и порошок матрикса НЧ. Соединения растворяли непосредственно в культуральной среде и добавляли к культуре клеток. Оценка цитотоксического действия спустя 72 часа показала, что 10 % АКН не оказывали влияния на метаболическую активность клеток. В то же время матрикс НЧ вызывал снижение метаболической активности клеток на 35% при воздействии доз, превышающих 125 мкг/мл (рисунок 17).

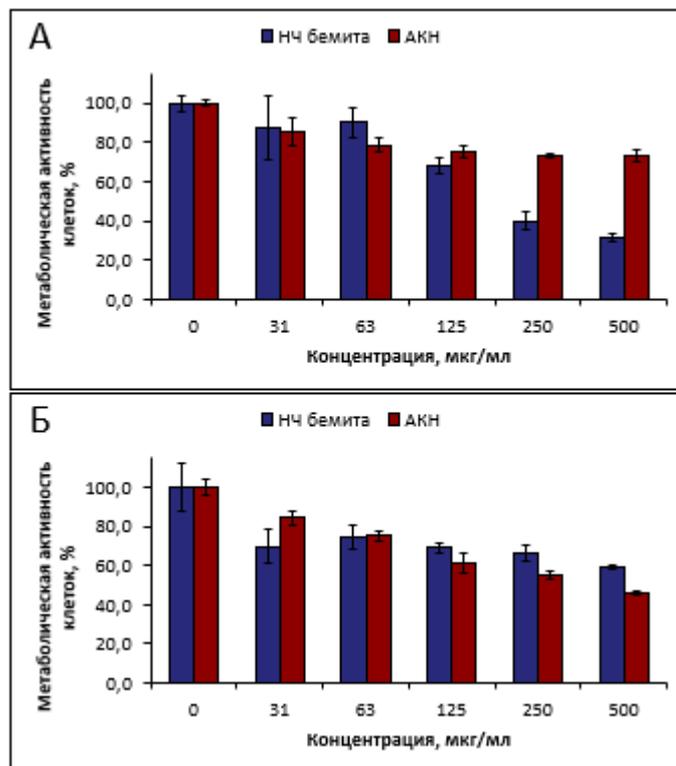


Рисунок 17 – Метаболическая активность клеток линии (А) HeLa и (Б) A549 после обработки АКН и НЧ бемита в течение 72 часов. На гистограмме показаны средние значения 3 измерений  $\pm$  стандартное отклонение

Для оценки биосовместимости АКН и НЧ бемита, клетки HeLa и A549 обрабатывали различными концентрациями образцов (31-500 мкг / мл) в течение 72 часов, а затем проводили анализ МТТ. На рисунке 17 показано, что в низких концентрациях (31 мкг / мл и 63 мкг / мл) метаболическая активность идентична для обеих клеточных линий HeLa и A549, и существует незначительная разница в эффектах воздействия между АКН и НЧ бемита. Для линии клеток HeLa не наблюдали выраженной дозозависимой цитотоксичности АКН в диапазоне от 63 мкг / мл до 500 мкг / мл. Вместе с тем, НЧ бемита в концентрациях от 125 мкг / мл до 500 мкг / мл вызывали значительное снижение выживаемости клеток. Непокрытые НЧ (размером 5-8 нм, рисунок 17 а) были гораздо более токсичными для клеток HeLa по сравнению с АКН в высоких концентрациях. В концентрациях 250 мкг / мл и 500 мкг / мл разница в уровне метаболической активности была статистически значима.

Для клеточной линии A549 наблюдали корреляцию цитотоксичности между АКН и НЧ бемита в концентрациях от 63 мкг / мл до 500 мкг / мл. Согласно полученным данным, НЧ бемита имели эффект, приблизительно равный АКН для клеток A549 в концентрациях от 63 мкг / мл до 250 мкг / мл. В концентрации 500 мкг / мл разница статистически значима.

Различные линии клеток по-разному реагировали на НЧ и АКН, что может быть обусловлено различиями в метаболизме клеток и экспрессии генов в двух наблюдаемых клеточных линиях.

Для оценки влияния НЧ бемита не только на метаболический статус культур клеток, а именно активность НАДФ-Н-зависимых оксидаз, с помощью проточной цитометрии на клеточной линии A549, которая показала более высокую чувствительность в результате МТТ-теста, была оценена непосредственно выживаемость после инкубации с частицами. Клетки инкубировали с различными концентрациями НЧ бемита (рисунок 18А), чистыми

АКН (рисунок 18Б) и бычьим сывороточным альбумином, энтрапированным в АКН (БСА@ АКН) (рис. 18В). Определение цитотоксичности БСА@ АКН представляло интерес в связи с перспективой использования в качестве адъюванта вакцин. Как модель белкового иммуногена был выбран БСА, присоединенный к АКН.

«Соединения инкубировали с клеточной линией А549 в следующих концентрациях: 16 мкг/мл (Д 1), 32 мкг/мл (Д 2), 65 мкг/мл (Д 3), 130 мкг/мл (Д 4)» [166]. После окончания инкубации было проведено окрашивание пропидия йодидом (PI), как описано в разделе «Материалы и методы». PI способен проникать только через поврежденные клеточные мембраны, поэтому интенсивность флуоресценции пропидия йодида коррелирует с количеством мертвых клеток в образцах. Все эффекты цитотоксичности в последующих экспериментах были описаны относительно контрольных данных, которые показаны серой кривой на всех графиках. Наложение гистограмм для всех трех наборов (Д 1- Д 4) НЧ не показывает значительного различия PI-флуоресценции. Отсутствует смещение гистограммы вдоль оси X от отрицательной области, соответствующей контрольным клеткам, в положительную область, где должны находиться флуоресцирующие клетки, что свидетельствует об отсутствии прямого цитотоксического действия частиц. Однако зависимое от дозы изменение значения регистрируемых событий для АКН и особенно для немодифицированных НЧ бемита указывает на уменьшение абсолютного количества клеток в анализируемых образцах после 72 часов инкубации с НЧ.

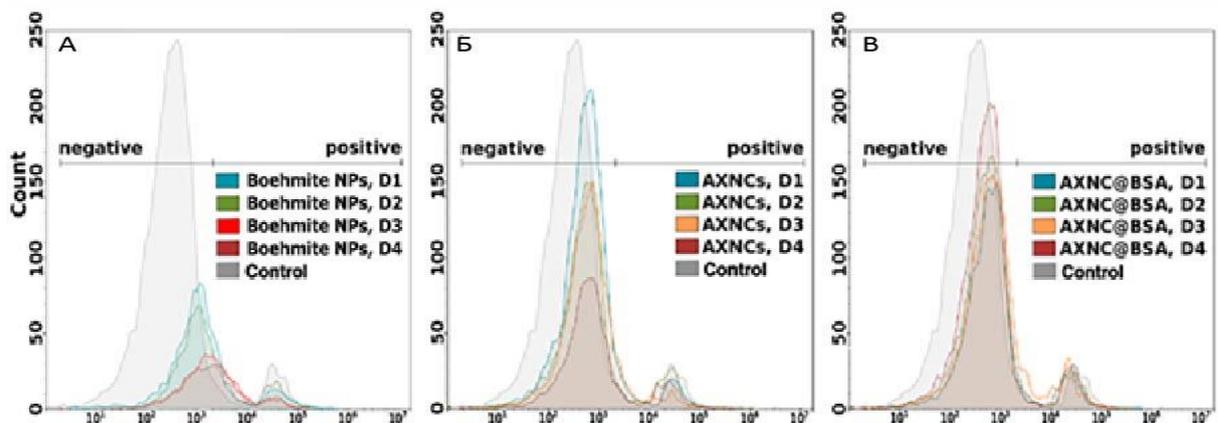


Рисунок 18 – Интенсивность флуоресценции в канале пропидия иодида, отражающая количество мертвых клеток после инкубации клеток A549 с различными концентрациями АКН и НЧ бемита. А) НЧ бемита Б) АКН В) БСА@АКН. Флуоресценция пропидия иодида представлена в логарифмической шкале, гейтирование произведено по уровню аутофлуоресценции неокрашенных клеток.

Наибольший процент PI-позитивных клеток и, соответственно, токсичность, наблюдались после инкубации клеток линии A549 с НЧ бемита – 45% клеток. Для АКН и БСА@АКН мы наблюдали сходную цитотоксичность в концентрациях D2 и D3. В концентрации D4 БСА@АКН обнаружено снижение цитотоксичности. Это может быть связано с образованием аддитивных агрегатов между БСА@АКН, которые не могут проникать в клетки. В то же время цитотоксичность АКН в концентрации D4 увеличилась по сравнению с более низкими концентрациями, как и ожидалось. Расхождение между результатами МТТ и данными проточной цитофлуориметрии может быть обусловлено различием в выборе анализируемых показателей цитотоксического влияния. МТТ-анализ выявил снижение активности НАДФН-зависимых оксидоредуктазных ферментов митохондрий, а окраска пропидия йодидом позволяет определить количество клеток с пермеабиллизированной наружной мембраной в анализируемой пробе.

На следующем этапе исследована эффективность проникновения потенциальных носителей лекарств – АКН - в клетки. Для этого клетки A549 инкубировали в течение 72 часов в присутствии АКН, конъюгированных с родамином В (RdV @ АКН). Эффективность конъюгации оценивали методом флуоресцентной микроскопии (рисунок 19А). Для оценки проникновения флуоресцентно-меченных наноконтейнеров в клетки использовали проточную цитометрию. Гейтирование проводили по уровню аутофлуоресценции неокрашенных клеток линии A549, и принимали его за гейт R-, уровень флуоресценции, превышающий данное пороговое значение, принимали за R+.

Полученные результаты дозозависимого проникновения RdB @ АКН в клетки A549 представлены на рисунке 19. С увеличением дозы наноконтейнеров происходит повышение флуоресценции (рисунок 19 Б), что свидетельствует о проникновении RdB @АКН внутрь клеток. После инкубации с RdB@АКН в концентрации 16,25 мкг/мл только 13,5% клеток имеют флуоресцентную метку, но уже при концентрации 130 мкг/мл количество флуоресцентных клеток достигает 60% (рисунок 19 В).

Эти данные демонстрируют высокий потенциал АКН в качестве средства доставки для исследуемой клеточной линии A549. Косвенно дозозависимое проникновение частиц в клетки A549 подтверждается повышенной скоростью оседания клеток после инкубации с большими дозами RdB @ АКН, что свидетельствует об увеличении массы клеток. В процессе измерения клеток на проточном цитометре в планшете клетки очень быстро оседали на дно по сравнению с контрольными клетками, и без постоянного механического перемешивания измерение становилось невозможным, особенно при высоких концентрациях АКН.

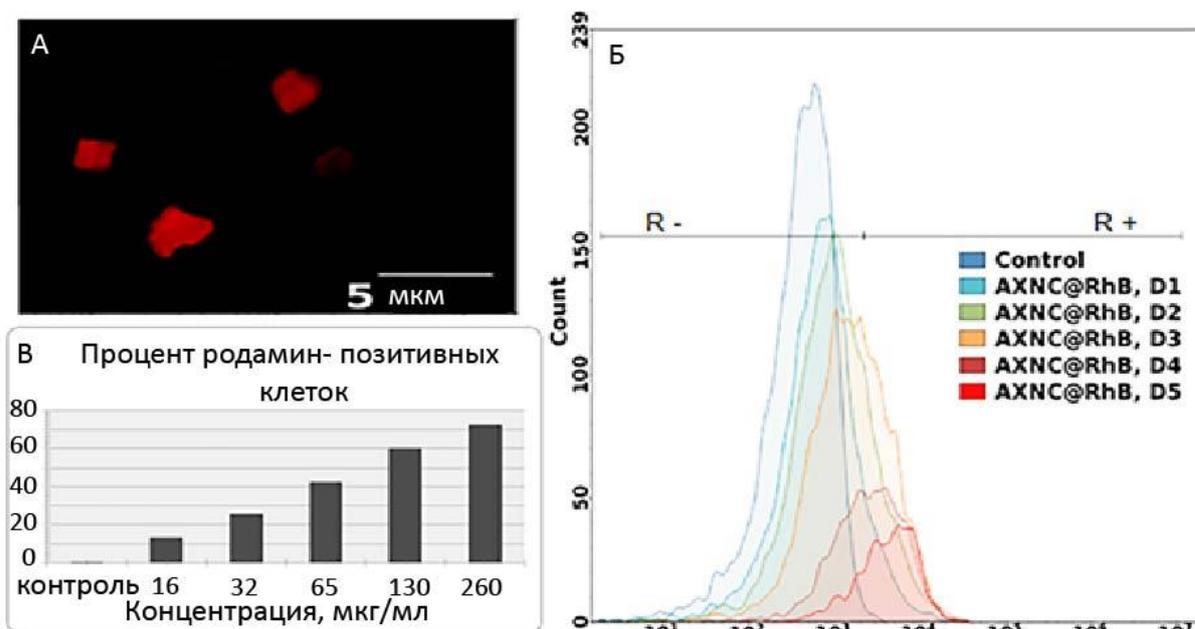


Рисунок 19 – Дозозависимое проникновение RdB @ АКН в клетки A549: А - Родамин В, энтрапированный в ксерогель оксида алюминия, флуоресцентная микроскопия, Б - интенсивность флуоресценции клеток после 72-часовой

инкубации с различной концентрацией RdB @ АКН (D1-D5), В – гистограмма флуоресценции клеток после инкубации с различными концентрациями НЧ. Гейт RdB-неокрашенные клетки [R-] или RdB-окрашенные клетки [R +] использовали для анализа проникновения НЧ в клетки. Относительная флуоресценция представлена в логарифмической шкале.

3.8 Изменения метаболической активности клеток в присутствии НЧ оксидов гафния, циркония и тантала

Материалы и результаты главы опубликованы в статьях [51; 89; 136].

Следующая глава данного исследования посвящена изучению влияния НЧ неорганических соединений, имеющих перспективы использования в качестве радиосенсибилизаторов, на метаболическую активность клеток. Очевидно, что радиосенсибилизирующие агенты не должны оказывать токсического действия на клетки, в то время как под воздействием рентгеновского излучения должно происходить образование активных форм кислорода, убивающих раковые клетки в месте накопления НЧ. Планируемое использование НЧ для тераностики потребовало их модификации для визуализации места накопления. С этой целью проведено допирование изучаемой группы НЧ редкоземельными ионами европия и лютеция. В последующих разделах представлено сравнение влияния на метаболическую активность клеток немодифицированных и допированных НЧ. Для немодифицированных НЧ также исследована их радиосенсибилизирующая активность.

3.8.1 Влияние немодифицированного оксида гафния и оксида гафния, допированного 5 % Lu + 5 % Eu на метаболическую активность здоровых клеток

Результаты МТТ-теста показали, что воздействие немодифицированных НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$  в течение 24 часов приводило к дозозависимому снижению метаболической активности клеток ФЛЭЧ и демонстрировало цитотоксический эффект в дозе 2 мг/мл ( $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$ ) и 0.5 мг/мл (чистый  $\text{HfO}_2$ ) (рис. 20).

В то же время МСК были менее чувствительны к воздействию НЧ в концентрациях ниже 0.5 мг/мл и более чувствительны в концентрациях больше 2 мг/мл, о чем свидетельствовало снижение метаболической активности клеток до 70.4% и 54.5 % после воздействия НЧ  $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$  и  $\text{HfO}_2$  соответственно (рисунок 21).

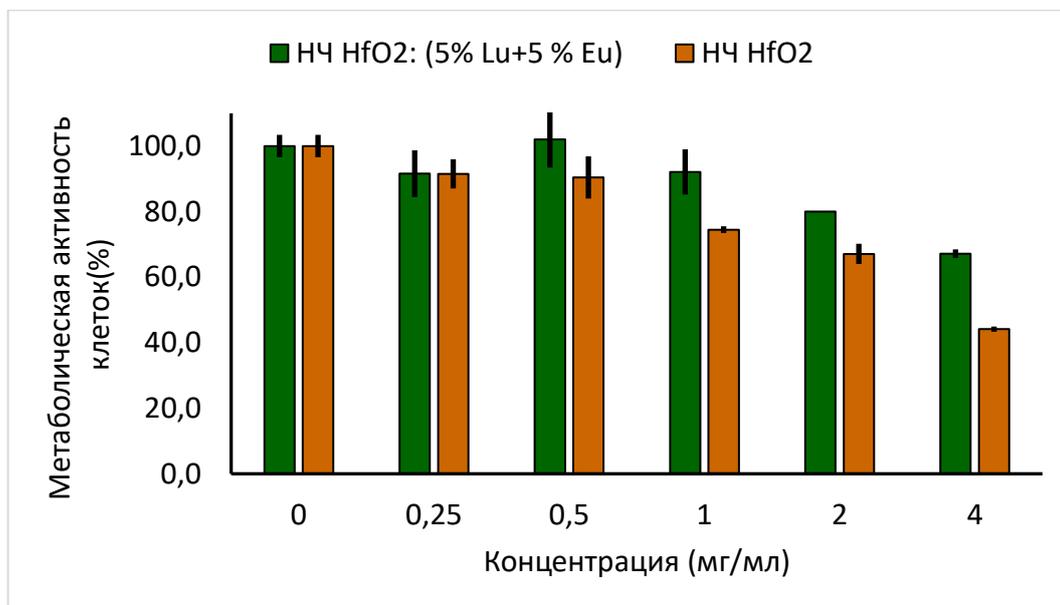


Рисунок 20 – Метаболическая активность ФЛЭЧ после 24 часов воздействия НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$

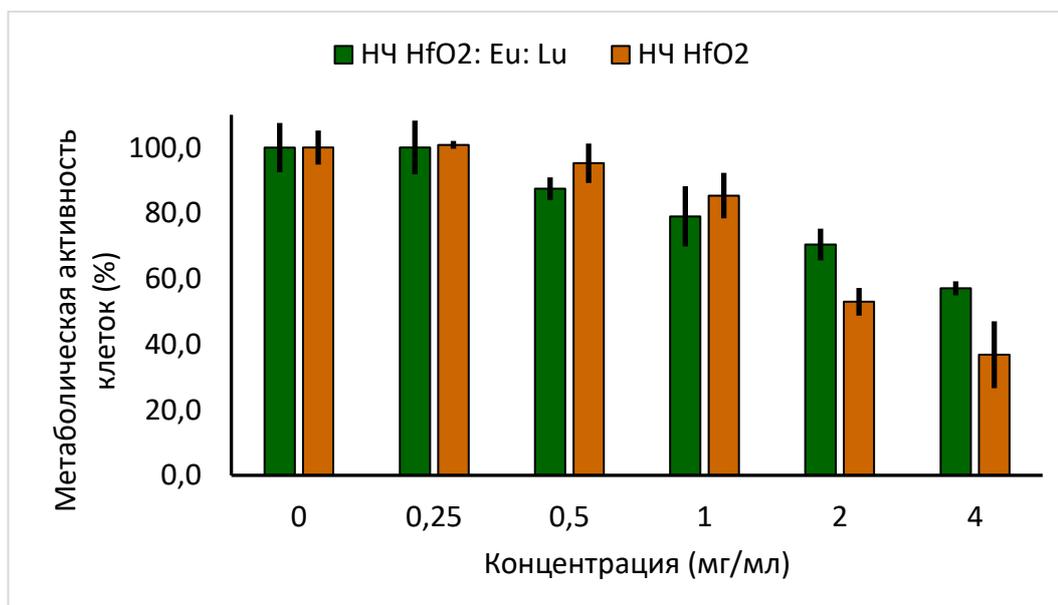


Рисунок 21 – Метаболическая активность МСК после 24 часов воздействия НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$

В то же время, после 72 часов инкубации ни одно из исследуемых соединений не проявляло цитотоксического эффекта на ФЛЭЧ (рисунок 22). При изучении воздействия на МСК в течение 72 часов была выявлена тенденция, коррелирующая с результатами 24- часового исследования. В дозах, превышающих 2 мг/мл, цитотоксический эффект после воздействия наночастиц  $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$  и  $\text{HfO}_2$  проявлялся снижением метаболической активности до 59,3 % и 35,3 % соответственно (рисунок 23).

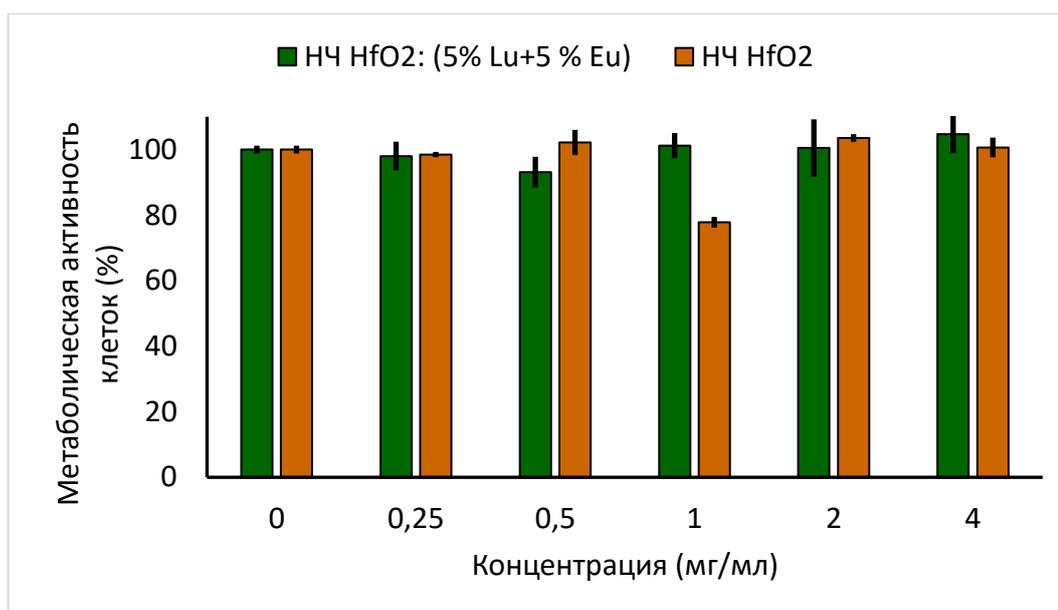


Рисунок 22 – Метаболическая активность ФЛЭЧ после 72 ч воздействия НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$ .

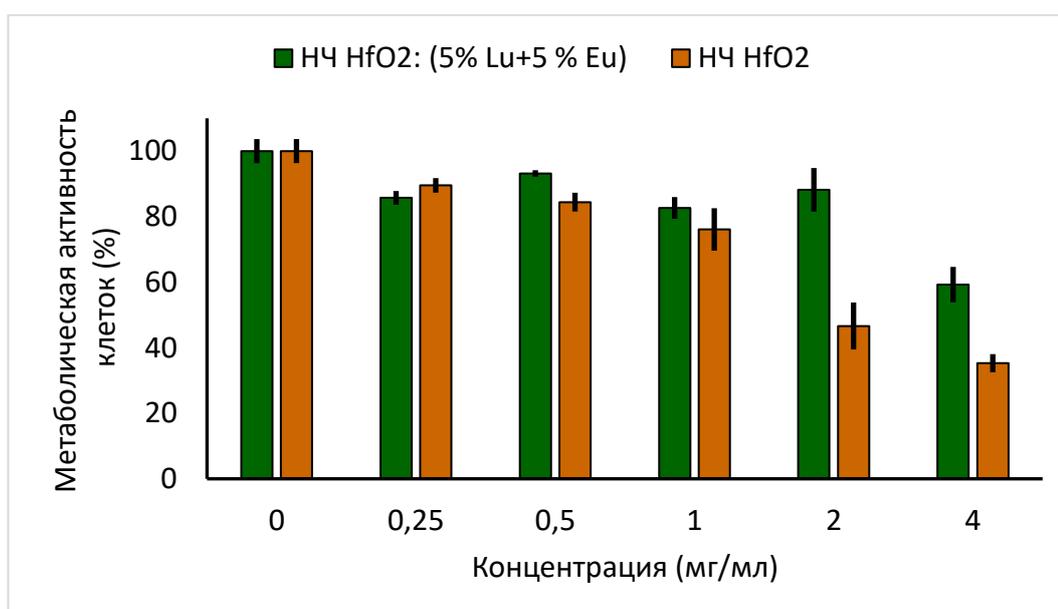


Рисунок 23 – Метаболическая активность МСК после 72 часов воздействия НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{HfO}_2$ :(5 mol % Lu + 5 mol % Eu)

Таким образом, воздействие в течение 24 и 72 часов немодифицированных и допированных НЧ  $\text{HfO}_2$  в дозах, меньших, чем 0.5 мг/мл, не приводило к токсическим эффектам. В больших концентрациях цитотоксичность постепенно возрастала; также стоит отметить, что допированные НЧ  $\text{HfO}_2$  демонстрировали меньшую токсичность, чем немодифицированные НЧ  $\text{HfO}_2$ , что свидетельствует о том, что лютеций и европий прочно энтрапированы в кристаллическую решетку  $\text{HfO}_2$ : высвобождение не происходит.

3.8.2 Влияние немодифицированных НЧ оксидов гафния и циркония, а также допированных иттербием (Yb) и эрбием (Er), на метаболическую активность неопухолевых и трансформированных клеток

Для сравнительного анализа биологических эффектов НЧ изучено влияние НЧ на метаболическую активность здоровых и трансформированных клеток. Наряду с НЧ оксида гафния исследован оксид циркония, который также обладает высоким атомным номером (Z). Это позволило предположить, что оксид циркония также может являться радиосенсибилизатором. Для визуализации НЧ проведено допирование лантаноидами: иттербием (Yb) и эрбием (Er), являющимися апковерсионными флуорофорами [2; 143]. Максимум длины волны эмиссии этих лантаноидов находится в диапазоне более коротких длин волн по сравнению с максимумом возбуждения. Для ряда областей применения излучение флуорофора на меньшей длине волны по сравнению с возбуждающей длиной волны может являться преимуществом.

Для исследования биосовместимости немодифицированных и допированных НЧ оксидов гафния и циркония на клетки воздействовали различными концентрациями НЧ и исследовали метаболическую активность клеток с помощью МТТ теста.

На рисунке 24 (А, Б) показано, что в диапазоне концентраций 31-500 мкг/мл (выбранном в соответствии с результатами предыдущих экспериментов, где показано, что НЧ оксида гафния не токсичны при концентрациях меньше 500 мкг/мл), немодифицированные НЧ оксида гафния не оказывали цитотоксического действия на клетки HeLa и ФЛЭЧ после воздействия в течение 72 часов. Для допированных НЧ, было зафиксировано снижение метаболической активности клеток, зависящее от концентрации и процентного содержания допированных НЧ, вплоть до 63 % и 52 % у клеток HeLa и ФЛЭЧ соответственно. В то же время НЧ оксида циркония были менее токсичны, чем НЧ оксида гафния, было зафиксировано незначительное снижение метаболической активности—меньше чем на 25% у клеток HeLa и 10% у ФЛЭЧ, соответственно, после 72 часов воздействия (рисунок 25 (А,Б)). Влияние на метаболическую активность клеток было практически одинаково у клеток, подвергшихся воздействию немодифицированных и допированных образцов.

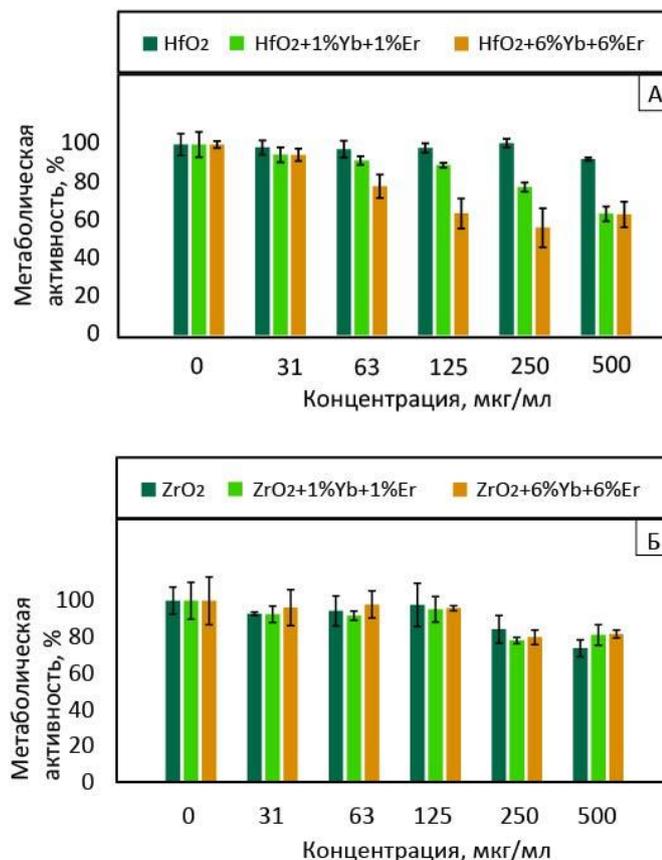


Рисунок 24– Метаболическая активность клеток HeLa после 72 ч воздействия немодифицированных и допированных НЧ HfO<sub>2</sub> (А) и чистых и допированных НЧ ZrO<sub>2</sub> (Б)

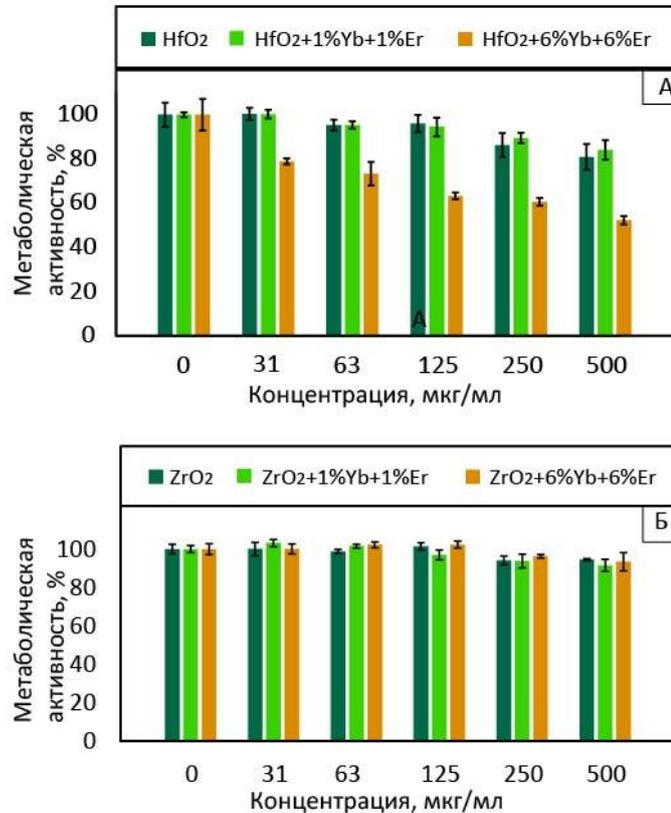


Рисунок 25 – Метаболическая активность ФЛЭЧ после 72 ч воздействия немодифицированных и допированных НЧ HfO<sub>2</sub> (А) и чистых и допированных НЧ ZrO<sub>2</sub> (Б)

### 3.8.3 Исследование радиосенсибилизации клеток с помощью НЧ оксидов тантала и гафния

Для исследования радиосенсибилизации клеток наночастицами были выбраны оксид тантала и оксид гафния, как показавшие наилучшие эффекты в расчетах, произведенных коллегами- физиками [159]. По результатам наших исследований, приведенных в данной работе, эти НЧ имеют наименьшую токсичность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Клетки инкубировали с 250 мкг/мл НЧ (доза выбрана как максимально возможная в соответствии со стабильностью НЧ в культуральной среде) в течение 24 часов, затем облучали различными дозами рентгеновского излучения и рассаживали для изучения способности к

колониообразованию (таблица 6). Из приведенных результатов видно, что НЧ оксида тантала снижают способность клеток НСТ-116 образовывать колонии после облучения дозой 2 Гр, близкой к  $IC_{50}$ . НЧ оксида гафния также влияют на количество образованных колоний, однако в меньшей степени.

Таблица 6 – Количество колоний клеток НСТ-116 после облучения различными дозами рентгеновского излучения в присутствии НЧ оксида тантала и гафния, нормализованное по контрольным значениям

Доза, Гр	Контроль	НЧ TaO <sub>2</sub> (250 мкг/мл)	НЧ HfO <sub>2</sub> (250 мкг/мл)
0	100	100	100
1	68	69	60
2	40	20	34
4	4	5	5
6	0	0,2	0,2

### 3.9 Поведение ДНК- наноструктур в культурах клеток человека

Результаты главы послужили основой для исследований, опубликованных в статьях [127; 128].

Другим перспективным направлением использования нанотехнологий в биомедицине является генная терапия, использующая в качестве инструментов миРНК, CRISPR- Cas9, антисмысловые РНК, дезоксирибозимы. Наиболее интересными представляются те инструменты, которые можно сделать многофункциональными, придать, например, помимо функции расщепления целевой РНК, также специфичность действия только в определенных клетках.

Для исследований был выбран дезоксирибозим 10-23, обладающий каталитической активностью в отношении мРНК (нулеотидная последовательность представлена в разделе Материалы и методы). Для изучения эффективности доставки, а также токсичности была выбрана последовательность, направленная на расщепление искусственной последовательности F субстрата – модельной РНК, модифицированной на одном конце флуорофором FAM, а на другом конце тушителем флуоресценции. Подобная конструкция позволяет оценить каталитическую активность дезоксирибозима, а также ДНК-наноконструкций, содержащих дезоксирибозим, путем измерения флуоресценции, появляющейся как следствие отдаления в пространстве FAM и тушителя флуоресценции.

Для исследования влияния различных ДНК конструкций на жизнеспособность клеток, а также зависимости эффективности доставки от сложности конструкции, в клетки линии HeLa и K-562 трансфецировали дезоксирибозим и ДНК-наноконструкции различного размера и сложности структуры, содержащие такой же дезоксирибозим (представлены на рисунке 26). Присоединение дезоксирибозима к тайлам позволяет стабилизировать конструкцию, сделать ее более устойчивой к воздействию эндогенных нуклеаз клетки, а также дает возможность дальнейшей модификации и усложнения для обеспечения многофункциональности действия.

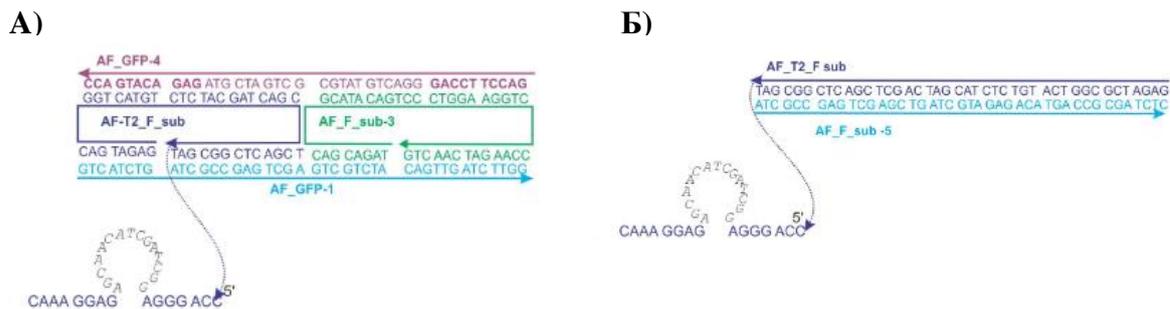


Рисунок 26 – Дизайн ДНК наноконструкций, трансфицированных в культуры клеток А) «Тяжелый» дизайн, состоящий из четырех олигонуклеотидных цепей Б) «Легкий» дизайн, состоящий из двух олигонуклеотидных цепей

### 3.9.1 Подбор оптимальных условий трансфекции

Для доставки ДНК-конструкций в клетку традиционно используют липофектамин 2000. В соответствии с рекомендациями производителя возможно использование разных объемов трансфицирующего агента, поэтому в качестве первого шага тестировали различные объемы липофектамина 2000 для выявления оптимума соотношения эффективности доставки/токсичности. В начале тестировали токсичность различных объемов реагента после 24 ч инкубации.

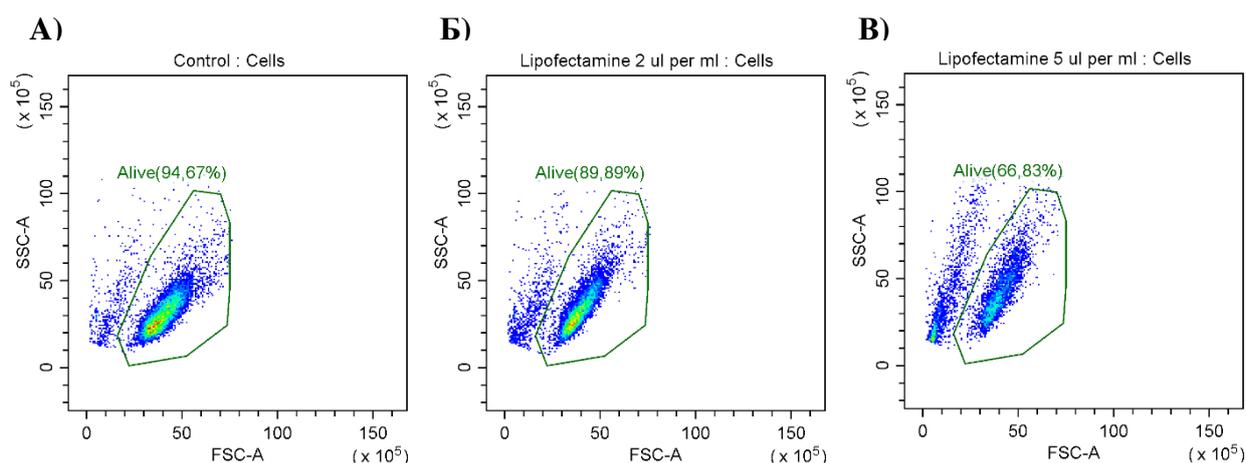


Рисунок 27 – Точечный график распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию после трансфекции клеток линии К-562 различными объемами липофектамина (производилась трансфекция дезоксирибозима ДЗ F sub) А. Популяция контрольных клеток, 94,67 % выживаемости (гейтирование зеленым цветом). Б. График распределения клеток после трансфекции 2 мкл/мл

липофектамина 2000 (минимальным рекомендованным объемом) и 100 нМ ДЗ F sub показывает 89,89 % жизнеспособных клеток. В. Клетки K562 после трансфекции максимальным рекомендованным объемом липофектамина 2000 (5 мкл/мл) и 100 нМ ДЗ показали 66,83 % жизнеспособных клеток.

Выживаемость клеток линий K562 и HeLa при использовании различных объемов липофектамина 2000 представлена в таблице 7. Выживаемость клеток K-562 остается на достаточно высоком уровне 85-98 % при использовании 2 и 3 мкл липофектамина 2000. Снижение жизнеспособности клеток линии HeLa также происходит при объеме липофектамина, превышающем 3 мкл/мл. Исходя из представленных данных, оптимальная с точки зрения токсичности концентрация трансфецирующего агента – 3 мкл/мл.

Таблица 7 – Выживаемость клеток суспензионной и адгезионной клеточных линий K562 и HeLa после 24 ч трансфекции липофектамином 2000.

Концентрация липофектамина 2000, мкл/мл	Выживаемость клеток линии K562, %	Выживаемость клеток линии HeLa, %
0	94	95
2	89	95
3	85	89
4	77	85
5	64	82

Затем была исследована эффективность трансфекции при использовании различных объемов липофектамина 2000 после 24 ч инкубации. Оценка производилась путем трансфекции 100 нм олигонуклеотида ДЗ, меченного флуорофором FAM (Дз FAM). Увеличение флуоресценции клеток в канале FITC, детектируемой на проточном цитофлуориметре, служило показателем эффективности трансфекции. В качестве контроля, принимаемого как базовый уровень аутофлуоресценции, служил образец липофектамина 2000 без ДЗ FAM.

Наложение гистограмм флуоресценции различных проб представлено на рисунке 28.

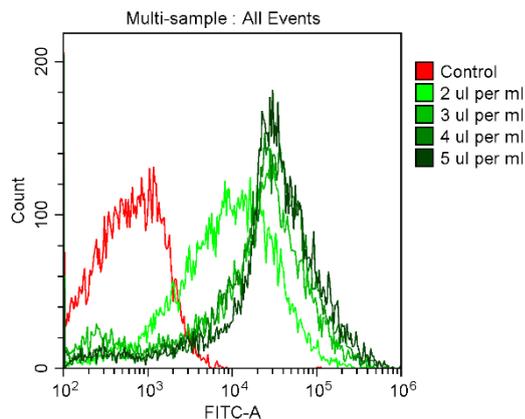


Рисунок 28 – Гистограммы флуоресценции клеток линии K562 при трансфекции различными концентрациями липофектамина 2000.

Процент клеток в FAM+ гейте представлен в таблице 8. Максимальный уровень трансфекции (количество трансфецированных клеток) достигается при использовании 4 мкл/мл липофектамина, далее увеличения процента трансфецированных клеток в исследуемом диапазоне концентраций не наблюдается. Однако при этой концентрации отмечено небольшое снижение жизнеспособности клеток, поэтому для дальнейших экспериментов выбрана концентрация 3 мкл/мл.

Таблица 8 – Зависимость эффективности трансфекции Дз FAM от концентрации липофектамина 2000.

Концентрация липофектамина 2000	Процент FAM позитивных клеток K-562	Процент FAM позитивных клеток HeLa
2 мкл/мл	66	68
3 мкл/мл	78	87
4 мкл/мл	87	91
5 мкл/мл	86	91

### 3.9.2 Влияние сложности организации ДНК конструкций на эффективность доставки в клетки

Важной характеристикой поведения ДНК- конструкций в культурах клеток, является предел насыщения. Для исследования данного критерия клетки K562 и HeLa трансфецировали возрастающими концентрациями Дз FAM и «тяжелого» дизайна ДНК-наноконструкции, затем оценивали процент светящихся клеток после 24 ч инкубации (рисунок 29). В таблице 9 представлены данные, отражающие процент флуоресцирующих клеток.

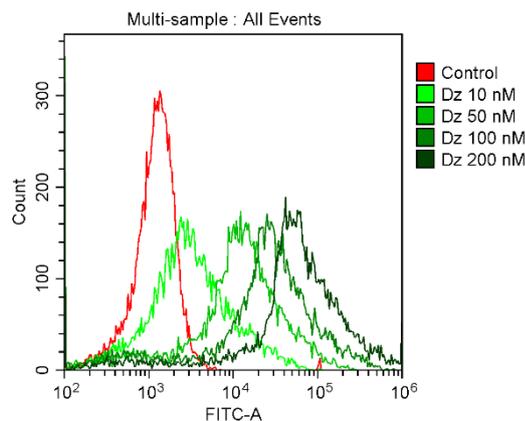


Рисунок 29 – Соотношение между флуоресцентным сигналом и концентрацией трансфецированного дезоксирибозима

Таблица 9 – Зависимость эффективности трансфекции DZ FAM и тяжелого дизайна ДНК- конструкции от концентрации олигонуклеотида.

Концентрация олигонуклеотидов, нМ	Процент FAM позитивных клеток Линия K-562		Процент FAM позитивных клеток Линия HeLa	
	ДЗ	«Тяжелый» дизайн ДНК-конструкции	ДЗ	«Тяжелый» дизайн ДНК-конструкции
10	31	37	60	58
50	76	73	89	89
100	83	84	92	90
200	90	90	91	90

Для линии HeLa предел насыщения наступает при концентрации 100 нМ, трансфекция 200 нМ ДЗ FAM и «тяжелого» дизайна ДНК- наноконструкции не приводит к повышению количества флуоресцирующих клеток. В то же время для линии K562 увеличение процента флуоресцирующих клеток происходит вплоть до 200 нм. Значительной разницы между эффективностью трансфекции дезоксирибозима и «тяжелого» дизайна ДНК-наноконструкции не наблюдалось, что свидетельствует о том, что усложнение организации и увеличение молярной массы трансфецируемого агента не ухудшают доставку (таблица 9).

### 3.9.3 Исследование токсичности различных ДНК конструкций в культурах клеток человека

Жизнеспособность клеток при введении ДНК –конструкций различного дизайна позволяет оценить степень токсичности вводимых компонентов. В клетки линии HeLa и K-562 трансфецировали дезоксирибозим и ДНК-наноконструкции различного размера и сложности структуры, содержащие такой же дезоксирибозим, и проводили оценку жизнеспособности после 24 ч инкубации путем окраски клеток пропидия иодидом.

Полученные результаты представлены в таблице 10 и на рисунке 30. Уровень жизнеспособности клеток свидетельствует о более высокой чувствительности клеток K562 к воздействию ДНК наноконструкций по сравнению с HeLa. По мере увеличения концентрации и сложности конструкций, токсичность возрастает, однако 100 нм можно считать относительно безвредной концентрацией для всех типов конструкций.

Таблица 10 – Зависимость количества живых клеток от концентрации и сложности ДНК конструкций

Концентрация ДЗ FAM, нМ	Дезоксирибозим		«Легкий» дизайн ДНК-конструкции		«Тяжелый» дизайн ДНК-конструкции	
	К-562	HeLa	К-562	HeLa	К-562	HeLa
0 (контроль)	94.23	94.83	93.45	91.02	94.12	90.85
10	84.68	90.25	84.73	89.43	85.44	88.18
50	83.43	87.36	82.86	87.15	82.79	87.84
100	81.38	86.61	79.99	84.10	76.62	82.61
200	80.80	76.80	78.17	80.59	71.35	79.87

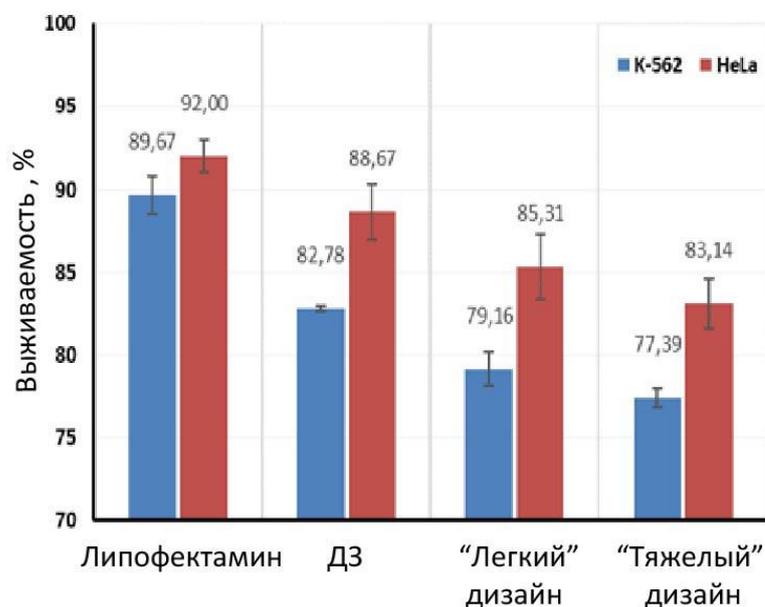


Рисунок 30 – Сравнение цитотоксичности дезоксирибозима и «легкой» и «тяжелой» ДНК-наноконструкции после 24 часов инкубации. Представленные данные являются средним значением трех независимых экспериментов.

Таким образом, сложность ДНК-конструкции не оказывает существенного влияния на исследованный процесс, трансфекция «тяжелого» дизайна незначительно ухудшает выживаемость клеток в сравнении с «легкой» формой (таблица 10).

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основное содержание исследования - анализ изменений метаболической активности культивируемых клеток млекопитающих при действии непокрытых НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$ . Установлено, что все указанные НЧ не оказывали значительного угнетающего действия на метаболическую активность клеток. Индукции апоптотической или некротической гибели клеток не выявлено.

При изучении острой токсичности НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  при внутрижелудочном введении 3 г/кг НЧ  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  проявили себя как абсолютно безопасные, в то время как после введения НЧ  $\text{TiO}_2$  и  $\text{HfO}_2$  наблюдались проявления интоксикации, которые были обратимы в течение первых суток, а НЧ  $\text{AlOOH}$  вызывали снижение массовых коэффициентов печени и селезенки. Что касается безопасности НЧ  $\text{ZrO}_2$ , то их введение в дозе 3 г/кг вызывало наиболее серьезные проявления интоксикации с последующей гибелью всех животных в группе. При гистологическом исследовании внутренних органов выявлены патологические изменения в миокарде, легких и головном мозге, подробно описанные в главе II.

Известно, что соединения циркония обладают способностью селективно связывать ионы калия, мимикрируя под физиологические калиевые каналы. Это реализовано в препарате Локерма (циркония циклосиликат), применяемого перорально при гиперкалиемии [142; 198]. При исследовании этого препарата были отмечены изменения со стороны работы проводящей системы сердца в виде увеличения интервала QT, что при пероральном введении препарата не имело клинических проявлений [14].

Зафиксированные морфологические изменения миокарда – контрактурные повреждения, заключающиеся в стойких тотальных или очаговых сокращениях миофибрилл с временной или окончательной потерей сократительной способности кардиомиоцитов [4] могут быть вызваны нарушениями электролитного обмена и, в частности, перегрузки клеток кальцием [1]. Как

известно, поступление кальция в клетки проводящей системы сердца осуществляется в период длительной медленной диастолической деполяризации посредством потенциал-зависимых медленных кальциевых каналов. Удлинение периода длительной медленной диастолической деполяризации (МДД) приведет к росту внутриклеточной концентрации кальция и запуску вышеописанных патологических изменений.

Удлинение периода МДД, в свою очередь, может осуществляться по следующему механизму. Как показано в литературе, соединения циркония могут вызывать гипокалиемию при введении в желудочно-кишечный тракт, что вызовет гипокалиемию и снижение уровня внеклеточного калия в проводящей системе сердца, которое приведет к выходу внутриклеточного калия из клетки и, как следствие, гиперполяризации мембран кардиомиоцитов. Последнее, в свою очередь, вызовет, во-первых, рост внутриклеточного кальция и формирование описанных в данном исследовании морфологических изменений и, во-вторых, снижение возбудимости волокон Пуркинье и увеличение интервала QT [84]. Нарастание этих изменений приведет к постепенному падению сократительной функции миокарда, появлению эктопических наджелудочковых и желудочковых комплексов с развитием фибрилляции желудочков [141]. Снижение гемодинамической функции миокарда левого желудочка [41] ведет к перераспределению крови, т.к. миокард не успевает эффективно проводить кровь в малом круге кровообращения.

Нарушение гемодинамики, нарастающая гипоксемия компенсируются на первых этапах ростом анаэробных процессов окисления глюкозы, что приводит к сдвигу рН тканей в кислую сторону и накоплению недоокисленных продуктов распада. Этот процесс протекает параллельно с ростом гидростатического давления в сосудах легких и ведет к выходу жидкой части крови за пределы сосудистого русла в интерстиций и развитию отека альвеолярных перегородок легких, которое сопровождается активацией рецепторного аппарата и характерным «кашлем» животных, зарегистрированным в эксперименте. Также вышеописанные изменения респираторного отдела легких были обнаружены на

микропрепаратах погибших животных. Развивающаяся тканевая гипоксия тканей коры больших полушарий головного мозга может вызвать активацию нейроглиальных клеток и гибель нейронов, зафиксированных в эксперименте. Предполагаемый механизм токсического действия НЧ  $ZrO_2$  представлен на рисунке 31.

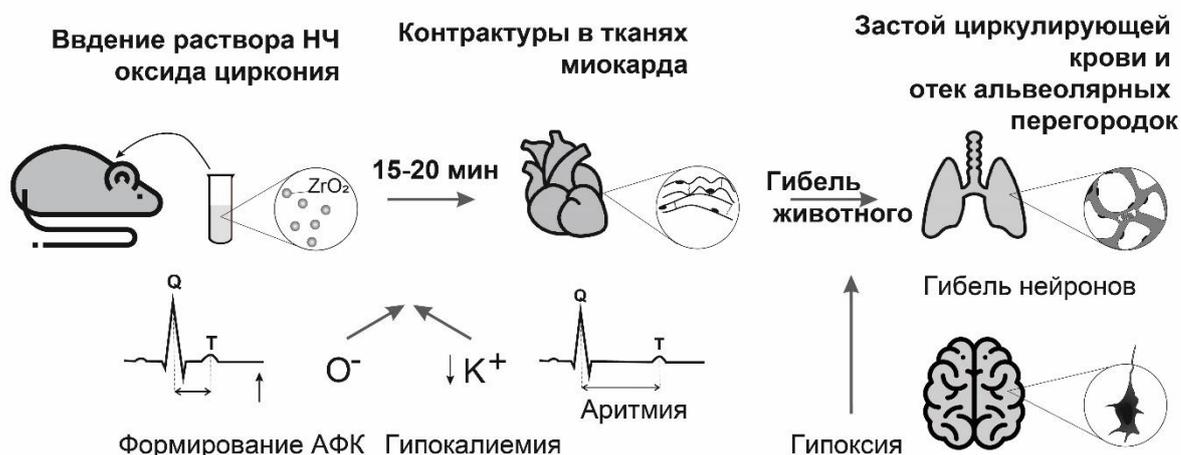


Рисунок 31 – Механизм токсического действия НЧ  $ZrO_2$

При изучении влияния НЧ, предполагаемых для системного введения в организм, на отдельные компоненты врожденного иммунитета НЧ  $AlOOH$  были определены как наиболее мощные индукторы экспрессии TLR-4 и 6. Для некоторых исследованных НЧ стимуляция иммунного ответа, включая стимуляцию, опосредованную TLR, изучена ранее [52; 164]. В ряде случаев полученные нами результаты экспрессии TLR были немного ниже, чем ранее опубликованные данные. В работе [80] показано, что магнетитовые НЧ специфически индуцируют аутофагию макрофагов посредством активации TLR-4. В наших исследованиях подобный эффект НЧ  $Fe_3O_4$  не обнаружен; более того данные НЧ были определены как наиболее инертные в отношении исследованных компонентов врожденного иммунитета. Такое несоответствие может быть связано с особенностями синтеза НЧ, влияющими на их токсичность и иммуногенность, а также с особенностями выбранных для исследований биологических моделей. В

связи с этим особенно важно проводить систематическое исследование группы НЧ, охарактеризованных и синтезированных в одинаковых условиях.

Изучение метаболической активности клеток в присутствии различных модификаций НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – магнитных фотонных кристаллов, геля магнетита, а также магнитных наноконтейнеров (МНК) – показало, что все изученные материалы практически не оказывают влияния на выживаемость клеток. Для МНК также показано, что они значительно накапливаются в цитоплазме клеток через 24 часа, но при этом не индуцируют АФК, что могло бы являться негативным фактором при использовании для адресной доставки.

Различные модификации НЧ  $\text{AlOOH}$  могут быть перспективны в доставке вакцин, совмещая в себе свойства носителя и, вероятно, адьюванта. Изучение метаболической активности клеток линий HeLa и A549 в присутствии НЧ бемита и алюминиевых клерогелевых наноконтейнеров (АКН) выявило дозозависимое снижение метаболической активности, при этом действие АКН было меньше для линии HeLa и больше для линии A549, что, вероятно, связано с различиями в метаболизме клеточных линий. Исследование количества живых и мертвых клеток при окраске пропидия иодидом после воздействия НЧ бемита также выявило дозозависимое увеличение количества мертвых клеток, однако при инкубации с БСА@АКН наибольшая доза вызывала меньший эффект, что, видимо, вызвано образованием белковых агрегатов, размер которых затрудняет их фагоцитоз и, как следствие, уменьшает токсичность. При этом АКН практически не вызывали увеличения количества клеток в пропидий-позитивной популяции, а при энтрапировании в них флуоресцентного родамина В успешно доставляли его внутрь клеток, что говорит о перспективности данных наноструктур для терапевтических применений.

Расхождение между результатами МТТ и данными проточной цитофлуориметрии может быть обусловлено различием в выборе анализируемых показателей цитотоксичности. МТТ-анализ выявил снижение активности НАДФН-зависимых оксидоредуктазных ферментов митохондрий, а окраска

пропидия иодидом позволяет определить количество клеток с пермеабелизированной плазматической мембраной.

Исследование метаболической активности в присутствии НЧ  $\text{HfO}_2$  и  $\text{ZrO}_2$ , допированных апконверсионными лантаноидами для визуализации показало снижение количества жизнеспособных клеток при увеличении процентного содержания Er и Yb в  $\text{HfO}_2$ ; подобная тенденция отсутствовала для  $\text{ZrO}_2$ . Вероятно, сами по себе лантаноиды токсичны, однако внутри кристаллической решетки  $\text{ZrO}_2$  они относительно безвредны, наряду с самой платформой. В данных экспериментах вновь подтверждено отсутствие цитотоксического действия наноструктур на основе НЧ  $\text{ZrO}_2$ , вызывавшего гибель животных при системном введении, что подтверждает нашу гипотезу о том, что механизм токсического действия реализуется за счет связывания ионов калия, концентрация которых критична для кардиомиоцитов, при этом подобного эффекта не наблюдается в культуре опухолевых клеток HeLa, не обладающих свойствами возбудимости и проводимости.

Изучение радиосенсибилизирующего потенциала показало, что НЧ  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  при облучении дозой 2 Гр вызывают более значительное уменьшение в количестве образованных клетками колоний после облучения по сравнению с НЧ  $\text{HfO}_2$ . Однако, последние также снижают данный показатель в сравнении с контрольными клетками.

ДНК наноструктуры являются материалом с большими перспективами в области биомедицинских нанотехнологий. Они могут быть использованы и в качестве самостоятельного терапевтического агента, и в качестве платформы для доставки существующих лекарственных средств. Однако, учитывая, что данная система относительно нова, она нуждается в детальном и систематическом изучении [98]. В диссертационной работе показано, что усложнение уровня организации и размера ДНК-наноконструкций не приводило к увеличению токсичности или ухудшению доставки, что является важным результатом для ДНК-нанотехнологий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что метаболическая активность клеток, выбранных в качестве моделей для исследования токсичности НЧ, не претерпевает существенных изменений при контакте с непокрытыми НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$ . Это создает возможность использования изученных НЧ для различных биомедицинских применений. Ни один из исходных 2% золей  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  не был токсичным для ПФЧ и опухолевых клеток HeLa в диапазоне концентраций 13-200 мкг / мл. Выбор концентраций определялся растворимостью НЧ в культуральных средах. НЧ не вызывали апоптоз или некроз в клетках HeLa. *In vivo* 4% золи  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{AlOOH}$  (суммарная доза 3 г / кг) не вызывали значительных признаков токсичности в течение продолжительного времени, что позволяет предположить, что эти материалы перспективны для дальнейших модификаций и использования для доставки лекарств и терапии. В то же время, НЧ  $\text{TiO}_2$  и  $\text{HfO}_2$  вызывали временные токсические эффекты, которые были обратимыми в течение 24 часов. Наиболее токсичными оказались НЧ золя  $\text{ZrO}_2$ : 100% животных погибли после введения дозы 3 г / кг. Расчетная величина  $\text{LD}_{50}$  для  $\text{ZrO}_2$  составила 2277,816 мг / кг. НЧ  $\text{ZrO}_2$  вызывали контрактурные повреждения миокарда, потерю сократительной способности сердца. Нарушение гемодинамики приводит к росту гидростатического давления в легких, выходу жидкой части крови за пределы сосудистого русла в интерстиций и отеку легких. Развивающаяся гипоксия тканей коры больших полушарий головного мозга в последствие вызывает активацию нейроглиальных клеток и гибель нейронов, что в конечном итоге приводит к гибели животных.

При исследовании влияния непокрытых НЧ на перенос плазмид, несущих гены резистентности к антибиотикам, между разными штаммами бактерий было показано, что НЧ бемита ( $\text{AlOOH}$ ) являются потенциально опасным агентом, тогда как магнетит и другие оксиды металлов были довольно безопасными. НЧ  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  не способствуют появлению мультирезистентных бактерий, что дополнительно подтверждает биобезопасность этих НЧ.

Таким образом, исследования воздействия на метаболические процессы в культурах клеток млекопитающих и бактерий НЧ шести оксидов металлов, полученных в идентичных условиях, показали отсутствие заметного влияния. Ни одни из НЧ не оказали сильного влияния на метаболическую активность культивируемых клеток млекопитающих, как незлокачественных, так и злокачественных, не вызывали индукцию процессов апоптоза и некроза. НЧ  $ZrO_2$  были токсичны для мышей, в то время как НЧ  $AlOOH$  значительно влияли на перенос плазмиды между штаммами *E.coli*. Эти результаты подтверждают дифференциальную применимость металлооксидных НЧ в различных ситуациях и служат основанием для их дальнейших модификаций для различных применений.

При исследовании влияния НЧ  $Fe_3O_4$ ,  $AlOOH$ ,  $TiO_2$ ,  $Ag_2O$ ,  $CuO$ ,  $ZnO$  на компоненты врожденного иммунитета, такие как экспрессия Толл-подобных рецепторов 4 и 6, было показано, что НЧ  $AlOOH$  вызывают увеличение экспрессии TLR-4 и TLR-6, в то время как все остальные исследованные частицы увеличивают экспрессию только лишь TLR-6. Однако следует отметить, что выявленный эффект не был биологически значимым.

Исследование метаболической активности клеток при воздействии в течение 24 и 72 часов немодифицированных и допированных европием и лютецием НЧ оксида гафния в дозах, меньших чем 0.5 мг/мл, не выявило значительных изменений в здоровых клетках (ФЛЭЧ и МСК), что позволяет сделать заключение об относительной безопасности данных частиц для организма. В больших концентрациях угнетение метаболической активности постепенно возрастало; также стоит отметить, что допированные НЧ оксида гафния демонстрировали меньшее влияние, чем немодифицированные НЧ оксида гафния, что свидетельствует о том, что редкоземельные элементы прочно энтрапированы в кристаллическую решетку и высвобождение не происходит. Что касается влияния НЧ оксидов гафния и циркония, допированных апконверсионными лантаноидами, на метаболическую активность клеток, было установлено, что немодифицированные НЧ обладают меньшим токсическим

действием, чем допированные. Степень угнетения активности НАДФ-Н зависимых оксидоредуктаз дозозависимо снижалась с увеличением процента тербия и иттербия в НЧ. При этом значительных отличий в реакции здоровых и трансформированных клеток зафиксировано не было.

При тестировании радиосенсибилизирующей активности НЧ гафния и тантала, было показано, что тантал сильнее увеличивает чувствительность раковых клеток к рентгеновскому излучению, особенно при воздействии дозы 2 Гр. В то же время НЧ оксида гафния тоже уменьшали количество образованных колоний клеток после облучения, но в меньшей степени.

При исследовании метаболической активности клеток в присутствии различных производных НЧ магнетита, таких как гель магнетита, магнитные наноконтейнеры, магнитные фотонные кристаллы, значительного влияния материалов выявлено не было, что свидетельствует об их безопасности и перспективе применения для магнитоуправляемой адресной доставки лекарственных средств.

В работе приведена сравнительная характеристика влияния на метаболическую активность НЧ бемита и алюминиевых ксерогелевых наноконтейнеров. Непокрытые НЧ бемита оказались намного токсичнее для раковых клеток по сравнению с наноконтейнерами и снижали метаболическую активность клеток. Так как данные материалы были исследованы в свете перспективы их использования в качестве адьювантов вакцин, была изучена также их проникающая способность с помощью сшивки с родамином. В результате было показано, что контейнеры хорошо проникают в клетки предположительно посредством фагоцитоза.

В результате изучения эффективности доставки и токсичности различных ДНК-наноконструкций, было показано, что сложные конструкции, содержащие дезоксирибозимы, трансфецируются с одинаковой эффективностью по сравнению с чистыми дезоксирибозимами. Для линии HeLa предел насыщения наступает при концентрации 100 нм, в то время как для K562 – при 200 нм, что, вероятно, является следствием того, что у суспензионных клеток большая площадь

мембраны доступна для трансфекции. При сравнении различных дизайнов выявлено, что токсичность возрастает по мере усложнения организации конструкции, однако разница в выживаемости клеток после инкубации с дезоксирибозимом и «тяжелым» дизайном составляет всего порядка 5%. Суспензионные клетки K562 более чувствительны по сравнению с адгезионными клетками линии HeLa и демонстрируют большее снижение жизнеспособности при воздействии максимальных доз ДНК- наноконструкций.

Таким образом, были выявлены общие тенденции при анализе токсичности, а также эффективности доставки различных наноструктур в сравнении с элементарными компонентами в виде непокрытых НЧ или дезоксирибозимов, входящих в их состав. Большая часть изученных модификаций НЧ в виде допирования лантаноидами, создания магнитных и бемитовых наноконтейнеров для конкретных биомедицинских применений или прикрепление дезоксирибозимов к двух- и четырехцепочечному основанию из комплементарных цепей ДНК не приводила к увеличению токсичности по сравнению с элементарными компонентами. Также модификации, обладающие более высоким уровнем сложности, по-прежнему хорошо доставлялись внутрь клеток, что свидетельствует о сохранении терапевтического потенциала.

Результаты работы были опубликованы в 13 научных статьях, индексируемых в базах Scopus и Web of science, 1 главе монографии и 1 патенте РФ, доложены на 5 конференциях.

## ВЫВОДЫ

1. Метаболическая активность культивируемых клеток, определяемая по активности дегидрогеназ, не подавляется при воздействии НЧ оксидов металлов  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с немодифицированной поверхностью; также они не оказывают токсического действия на организм мыши в концентрациях, позволяющих получить биосовместимую суспензию. НЧ  $\text{ZrO}_2$  проявляют токсичность для мышей в высоких дозах ( $\text{LD}_{50}$  2277,8 мг/кг) из-за повреждений миокарда и развития отека легких и гипоксии головного мозга.
2. Экспрессия гена, кодирующего рецептор врожденного иммунитета TLR-6 в клетках линии ТНР-1, регулируется воздействием НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{AlOOH}$ ,  $\text{TiO}_2$  – исследованные концентрации вызывают статистически значимое увеличение экспрессии в 1,4-1,6 раз. НЧ  $\text{AlOOH}$  также индуцируют экспрессию TLR-4 (увеличение в 1,5 раза по сравнению с контролем).
3. Модификации НЧ магнетита – гель магнетита и магнетитовые наноконтейнеры – не вызывают выраженной токсичности по сравнению с немодифицированными НЧ магнетита, что свидетельствует об их применимости в качестве биосовместимых носителей для доставки лекарств.
4. Метаболическая активность культур клеток статистически значимо сильнее угнетается НЧ  $\text{AlOOH}$  по сравнению с алюминиевыми ксерогелевыми наноконтейнерами (АКН). На модели родамин@АКН показано, что последние могут проникать в клетки, что перспективно для разработки вакцин, упакованных в адьювантный материал.
5. Метаболическая активность клеток не претерпевает значительных изменений при воздействии немодифицированных и допированных НЧ оксида гафния (<0.5 мг/мл). Допированные Eu и Lu НЧ  $\text{HfO}_2$  меньше влияют на метаболическую активность по сравнению с недопированными частицами. Допирование  $\text{ZrO}_2$  тербием и иттербием не увеличивает цитотоксичность.
6. ДНК-наноконструкции на основе дезоксирибозимов доставляются в культуры клеток человека и практически нетоксичны. Усложнение организации и увеличение количества нуклеотидов в конструкции не ухудшают доставку и не

увеличивают токсичность, что важно для развития терапевтических ДНК-нанотехнологий.

7. Определяющим фактором токсичности наноструктур, рассмотренных в исследовании, являются их химический состав и свойства поверхности, а не сложность организации, что доказано отсутствием токсического действия при усложнении уровня организации наноструктур – допировании лантаноидами, формировании наноконтейнеров из отдельных НЧ или создании ДНК-наноконструкций из нескольких комплементарных цепей, содержащих дезоксирибозим.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АКН – алюминиевые ксерогелевые наноконтейнеры

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГБДГ – гидроксibuтират дегидрогеназа

ДЗ – дезоксирибозим

ДРС – динамическое рассеяние света

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛПС – липополисахарид

МНЧ – магнитные наночастицы

МФ – магнетофекция

МФК – магнитные фотонные кристаллы

НМДК – наночастицы мезопористого диоксида кремния

НЧ – наночастицы

ПАРП – поли(АДФ-рибоза)-полимераза

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СОШ – стандартная ошибка среднего

УФ – ультрафиолет

ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека

ФНО-альфа – фактор некроза опухоли альфа

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПФЧ – постнатальные фибробласты человека

FAM – флуоресцеина амидит

FITC – флуоресцеинизоционат

7AAD – 7-аминоактиномицин D

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меерсон Ф.З. Защита сердца от ишемических повреждений: роль стресс-лимитирующих систем и стабилизации структур миокарда / Ф.З. Меерсон // Российский кардиологический журнал. – 2001. – Т. 0. – № 5. – С. 49-59.
2. Поминова Д.В. Ап-конверсионное преобразование лазерного излучения кристаллическими биомаркерами, содержащими ионы  $Yb^{3+}$  - $Er^{3+}$ : дис.канд. физ.-мат. наук:01.04.21 / Д.В. Поминова. – 2017.
3. Ребриков Д.В. Редактирование генома человека / Д.В. Ребриков // Вестник РГМУ. – 2016. – Т. 3. – С. 4-14.
4. Смирнов В.П. Патоморфология кардиомиоцитов при внезапной кардиальной смерти / В.П. Смирнов, И.А. Панышева // 1. – Медицина, вызовы сегодняшнего дня. Материалы III Международной Конференции, 2016. – С. 43-46.
5. Adams F.H. Effect of radiation and contrast media on chromosomes. Preliminary report / F.H. Adams, A. Norman, R.S. Mello, D. Bass // Radiology. – 1977. – Т. 124. – № 3. – С. 823-826.
6. Akagawa Y. Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing / Y. Akagawa, Y. Ichikawa, H. Nikai, H. Tsuru // The Journal of Prosthetic Dentistry. – 1993. – Т. 69. – № 6. – С. 599-604.
7. Anastasova E.I. A pure magnetite hydrogel: Synthesis, properties and possible applications / E.I. Anastasova, V. Ivanovski, A.F. Fakhardo, A.I. Lepeshkin, S. Omar, A.S. Drozdov, V.V. Vinogradov // Soft Matter. – 2017. – Т. 13. – № 45.
8. Anastasova E.I. Magnetite Nanocontainers: Toward Injectable Highly Magnetic Materials for Targeted Drug Delivery / E.I. Anastasova, A.Y. Prilepskii, A.F. Fakhardo, A.S. Drozdov, V.V. Vinogradov // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2018. – Т. 10. – № 36.
9. Andreeva Y.I. The controllable destabilization route for synthesis of low cytotoxic magnetic nanospheres with photonic response / Y.I. Andreeva, A.S. Drozdov, A.F. Fakhardo, N.A. Cheplagin, A.A. Shtil, V. V. Vinogradov // Scientific Reports. – 2017. –

Т. 7. – № 1.

10. Anticoagulant Sodium Citrate 4% w/v Solution, USP | FDA [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/anticoagulant-sodium-citrate-4-wv-solution-usp> (дата обращения: 30.01.2020).

11. Arbab A.S. Cellular magnetic resonance imaging: Current status and future prospects Antiangiogenic therapy and vascular mimicry View project Cellular magnetic resonance imaging: current status and future prospects / A.S. Arbab, W. Liu, J.A. Frank // *Expert Rev. Med. Devices.* – 2006. – Т. 3. – № 4. – С. 427-439.

12. Arruebo M. Drug delivery from structured porous inorganic materials / M. Arruebo // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* – 2012. – Т. 4. – № 1. – С. 16-30.

13. Bashir M.R. Emerging applications for ferumoxytol as a contrast agent in MRI / M.R. Bashir, L. Bhatti, D. Marin, R.C. Nelson // *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* – 2015. – Т. 41. – № 4. – С. 884-898.

14. Beccari M. V. Clinical utility of patiromer, sodium zirconium cyclosilicate, and sodium polystyrene sulfonate for the treatment of hyperkalemia: An evidence-based review / M. V. Beccari, C.J. Meaney // *Core Evidence.* – 2017. – Т. 12. – С. 11-24.

15. Bharti C. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review / C. Bharti, N. Gulati, U. Nagaich, A. Pal // *International Journal of Pharmaceutical Investigation.* – 2015. – Т. 5. – № 3. – С. 124.

16. Bi F. Chemical conjugation of urokinase to magnetic nanoparticles for targeted thrombolysis / F. Bi, J. Zhang, Y. Su, Y.C. Tang, J.N. Liu // *Biomaterials.* – 2009. – Т. 30. – № 28. – С. 5125-5130.

17. Blatnik J. Dye surface coating enables visible light activation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles leading to degradation of neighboring biological structures / J. Blatnik, L. Luebke, S. Simonet, M. Nelson, R. Price, R. Leek, L. Zeng, A. Wu, E. Brown // *Microscopy and Microanalysis.* – 2012. – Т. 18. – С. 134-142.

18. Bobo D. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date / D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam, K.J. Thurecht, S.R.

Corrie // *Pharmaceutical Research*. – 2016. – T. 33. – № 10. – C. 2373-2387.

19. Boca S.C. Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy / S.C. Boca, M. Potara, A.M. Gabudean, A. Juhem, P.L. Baldeck, S. Astilean // *Cancer Letters*. – 2011. – T. 311. – № 2. – C. 131-140.

20. Bonvalot S. NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc): a multicentre, phase 2–3, randomised, controlled trial / S. Bonvalot, P.L. Rutkowski, J. Thariat, S. Carrère, A. Ducassou, M.P. Sunyach, P. Agoston, A. Hong, A. Mervoyer, M. Rastrelli, V. Moreno, R.K. Li, B. Tiangco, A.C. Herraéz, A. Gronchi, L. Mangel, T. Sy-Ortin, ... Z. Papai // *The Lancet Oncology*. – 2019. – T. 20. – № 8. – C. 1148-1159.

21. Brezesinski T. Self-assembly and crystallization behavior of mesoporous, crystalline HfO<sub>2</sub> thin films: A model system for the generation of mesostructured transition-metal oxides / T. Brezesinski, B. Smarsly, K.I. Iimura, D. Grosso, C. Boissière, H. Amenitsch, M. Antonietti, C. Sanchez // *Small*. – 2005. – T. 1. – № 8-9. – C. 889-898.

22. Brown R. High-Z Nanostructured Ceramics in Radiotherapy: First Evidence of Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Induced Dose Enhancement on Radioresistant Cancer Cells in an MV Photon Field / R. Brown, M. Tehei, S. Oktaria, A. Briggs, C. Stewart, K. Konstantinov, A. Rosenfeld, S. Corde, M. Lerch // *Particle & Particle Systems Characterization*. – 2014. – T. 31. – № 4. – C. 500-505.

23. Brunner T.J. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles : Comparison to Asbestos , Silica , and the Effect of Particle Solubility † / T.J. Brunner, P. Wick, A. Bruinink. – 2006. – T. 40. – № 14. – C. 4374-4381.

24. Bulte J.W.M. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells / J.W.M. Bulte, T. Douglas, B. Witwer, S.C. Zhang, E. Strable, B.K. Lewis, H. Zywicke, B. Miller, P. Van Gelderen, B.M. Moskowitz, I.D. Duncan, J.A. Frank // *Nature Biotechnology*. – 2001. – T. 19. – № 12. – C. 1141-1147.

25. Burello E. A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles / E. Burello, A.P. Worth // *Nanotoxicology*. – 2011. – T. 5. – № 2. –

C. 228-235.

26. Carter J.D. Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures / J.D. Carter, N.N. Cheng, Y. Qu, G.D. Suarez, T. Guo // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2007. – Т. 111. – № 40. – С. 11622-11625.

27. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=176.210&SearchTerm=glycerin> (дата обращения: 30.01.2020).

28. Chen J. Immuno Gold Nanocages with Tailored Optical Properties for Targeted Photothermal Destruction of Cancer Cells / J. Chen, D. Wang, J. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z.-Y. Li, H. Zhang, Y. Xia, X. Li // *Nano Letters*. – 2007. – Т. 7. – № 5. – С. 1318-1322.

29. Chen J. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection / J. Chen, X. Dong, J. Zhao, G. Tang // *Journal of Applied Toxicology*. – 2009. – Т. 29. – № 4. – С. 330-337.

30. Chen Y. Drug-Loaded Mesoporous Tantalum Oxide Nanoparticles for Enhanced Synergetic Chemoradiotherapy with Reduced Systemic Toxicity / Y. Chen, G. Song, Z. Dong, X. Yi, Y. Chao, C. Liang, K. Yang, L. Cheng, Z. Liu // *Small*. – 2017. – Т. 13. – № 8. – С. 1602869.

31. Chen Y.S. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles / Y.S. Chen, Y.C. Hung, I. Liao, G.S. Huang // *Nanoscale Research Letters*. – 2009. – Т. 4. – № 8. – С. 858-864.

32. Cho K. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer / K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D.M. Shin // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Т. 14. – № 5. – С. 1310-1316.

33. Cho W.S. Adjuvanticity and toxicity of cobalt oxide nanoparticles as an alternative vaccine adjuvant / W.S. Cho, K. Dart, D.J. Nowakowska, X. Zheng, K. Donaldson, S.E.M. Howie // *Nanomedicine*. – 2012. – Т. 7. – № 10. – С. 1495-1505.

34. Chomoucka J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering / J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek // *Pharmacological Research*. – 2010. – Т. 62. – № 2. – С. 144-149.

35. Conde J. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer / J. Conde, G. Doria, P. Baptista // *Journal of Drug Delivery*. – 2012. – T. 2012. – C. 1-12.
36. Coulter J.A. Radiosensitising nanoparticles as novel cancer therapeutics - Pipe dream or realistic prospect? / J.A. Coulter, W.B. Hyland, J. Nicol, F.J. Currell // *Clinical Oncology*. – 2013. – T. 25. – № 10. – C. 593-603.
37. Devi G.R. siRNA-based approaches in cancer therapy / G.R. Devi // *Cancer Gene Therapy*. – 2006. – T. 13. – № 9. – C. 819-829.
38. Dobrovolskaia M.A. Immunological properties of engineered nanomaterials / M.A. Dobrovolskaia, S.E. McNeil // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – T. 2. – № 8. – C. 469-478.
39. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery / J. Dobson // *Drug Development Research*. – 2006. – T. 67. – № 1. – C. 55-60.
40. Doraiswamy P. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders / P. Doraiswamy, A.F.-T.L. Neurology, undefined 2004 // [thelancet.com](http://thelancet.com).
41. Dori G. Transition from sinus rhythm to atrial fibrillation - A mechanism inducing or delaying pulmonary congestion and edema / G. Dori // *Medical Hypotheses*. – 2015. – T. 84. – № 1. – C. 40-43.
42. Douglas S.J. Nanoparticles in drug delivery. / S.J. Douglas, S.S. Davis, L. Illum // *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. – 1987. – T. 3. – № 3. – C. 233-61.
43. Drozdov A.S. Leach-proof magnetic thrombolytic nanoparticles and coatings of enhanced activity / A.S. Drozdov, V. V. Vinogradov, I.P. Dudanov, V. V. Vinogradov // *Scientific Reports*. – 2016. – T. 6.
44. Drozdov A.S. Sol-gel composites based on alumina and ferria for cardiovascular diseases treatment / A.S. Drozdov, A.F. Fakhardo, V. V. Vinogradov // *Biocompatible Hybrid Oxide Nanoparticles for Human Health*. – Elsevier, 2019. – C. 149-179.
45. Duguet E. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine / E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet, J.M. Devoisselle // *Nanomedicine*. – 2006. – T. 1. – № 2. – C. 157-168.
46. Dunning M.D. Superparamagnetic iron oxide-labeled schwann cells and olfactory ensheathing cells can be traced in vivo by magnetic resonance imaging and retain

functional properties after transplantation into the CNS / M.D. Dunning, A. Lakatos, L. Loizou, M. Kettunen, C. Ffrench-Constant, K.M. Brindle, R.J.M. Franklin // *Journal of Neuroscience*. – 2004. – T. 24. – № 44. – C. 9799-9810.

47. Fakhardo A.F. Toxicity Patterns of Clinically Relevant Metal Oxide Nanoparticles / A.F. Fakhardo, E.I. Anastasova, S.R. Gabdullina, A.S. Solovyeva, V.B. Saparova, V. V. Chrishtop, E.D. Koshevaya, E.F. Krivoshapkina, P. V. Krivoshapkin, G.O. Kiselev, P.A. Kalikina, E.I. Koshel, A.A. Shtil, V. V. Vinogradov // *ACS Applied Bio Materials*. – 2019. – T. 2. – № 10. – C. 4427-4435.

48. Fernández-Pacheco R. Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants / R. Fernández-Pacheco, C. Marquina, J. Gabriel Valdivia, M. Gutiérrez, M. Soledad Romero, R. Cornudella, A. Laborda, A. Vilorio, T. Higuera, A. García, J.A.G. de Jalón, M. Ricardo Ibarra // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2007. – T. 311. – № 1 SPEC. ISS. – C. 318-322.

49. Field J.A. Cytotoxicity and physicochemical properties of hafnium oxide nanoparticles / J.A. Field, A. Luna-Velasco, S.A. Boitano, F. Shadman, B.D. Ratner, C. Barnes, R. Sierra-Alvarez // *Chemosphere*. – 2011. – T. 84. – № 10. – C. 1401-1407.

50. FINNEY D.J. Statistical Aspects of Monitoring for Dangers in Drug Therapy) / D.J. FINNEY // *Methods of Information in Medicine*. – 1971. – T. 10. – № 01. – C. 1-8.

51. Furasova A.D. Synthesis of a rare-earth doped hafnia hydrosol: Towards injectable luminescent nanocolloids / A.D. Furasova, A.F. Fakhardo, V.A. Milichko, E. Tervoort, M. Niederberger, V.V. Vinogradov // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2017. – T. 154.

52. Gatti A. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles Enriched sera protein profiling for detection of non-small cell lung cancer biomarkers View project / A. Gatti [и др.]. – 2014.

53. Gerken L.R.H. Lanthanide-Doped Hafnia Nanoparticles for Multimodal Theranostics: Tailoring the Physicochemical Properties and Interactions with Biological Entities / L.R.H. Gerken, K. Keevend, Y. Zhang, F.H.L. Starsich, C. Eberhardt, G. Panzarasa, M.T. Matter, A. Wichser, A. Boss, A. Neels, I.K. Herrmann // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2019. – T. 11. – № 1. – C. 437-448.

54. Gil P.R. Composite Nanoparticles Take Aim at Cancer / P.R. Gil, W.J. Parak // ACS Nano. – 2008. – T. 2. – № 11. – C. 2200-2205.
55. Gobin A.M. Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy / A.M. Gobin, M.H. Lee, N.J. Halas, W.D. James, R.A. Drezek, J.L. West // Nano Letters. – 2007. – T. 7. – № 7. – C. 1929-1934.
56. Gottenbos B. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria / B. Gottenbos // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – T. 48. – № 1. – C. 7-13.
57. Grassian V.H. Inhalation exposure study of Titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm / V.H. Grassian, P.T. O'Shaughnessy, A. Adamcakova-Dodd, J.M. Pettibone, P.S. Thorne // Environmental Health Perspectives. – 2007. – T. 115. – № 3. – C. 397-402.
58. Gratton S.E.A. The effect of particle design on cellular internalization pathways / S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – T. 105. – № 33. – C. 11613-11618.
59. Gupta A. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles / A. Gupta, M.G.- Biomaterials, undefined 2005 // Elsevier.
60. Gupta A. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications / A. Gupta, M.G.- biomaterials, undefined 2005 // Elsevier.
61. Gupta A.K. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications / A.K. Gupta, R.R. Naregalkar, V.D. Vaidya, M. Gupta // Nanomedicine. – 2007. – T. 2. – № 1. – C. 23-39.
62. Häfeli U.O. Cell Uptake and *in Vitro* Toxicity of Magnetic Nanoparticles Suitable for Drug Delivery / U.O. Häfeli, J.S. Riffle, L. Harris-Shekhawat, A. Carmichael-Baranauskas, F. Mark, J.P. Dailey, D. Bardenstein // Molecular Pharmaceutics. – 2009. – T. 6. – № 5. – C. 1417-1428.
63. Hautot D. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue / D. Hautot, Q.A. Pankhurst, N. Khan, J. Dobson // Proceedings of

- the Royal Society B: Biological Sciences. – 2003. – T. 270. – № SUPPL. 1.
64. Hautot D. Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients / D. Hautot, Q.A. Pankhurst, C.M. Morris, A. Curtis, J. Burn, J. Dobson // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. – 2007. – T. 1772. – № 1. – C. 21-25.
65. He Q. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation / Q. He, Z. Zhang, F. Gao, Y. Li, J. Shi // *Small*. – 2011. – T. 7. – № 2. – C. 271-280.
66. Her S. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements / S. Her, D.A. Jaffray, C. Allen // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2017. – T. 109. – C. 84-101.
67. Herold D.M. Gold microspheres: A selective technique for producing biologically effective dose enhancement / D.M. Herold, I.J. Das, C.C. Stobbe, R. V. Iyer, J.D. Chapman // *International Journal of Radiation Biology*. – 2000. – T. 76. – № 10. – C. 1357-1364.
68. Ho-Lun W. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system / W. Ho-Lun, R. Bendayan, A.M. Rauth, Y.X. Hui, K. Babakhanian, Y.W. Xiao // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – T. 317. – № 3. – C. 1372-1381.
69. Högemann D. Improvement of MRI Probes To Allow Efficient Detection of Gene Expression / D. Högemann, L. Josephson, R. Weissleder, J.P. Basilion // *Bioconjugate Chemistry*. – 2000. – T. 11. – № 6. – C. 941-946.
70. Hong C. In-vitro cell tests using doxorubicin-loaded polymeric TiO<sub>2</sub> nanotubes used for cancer photothermotherapy / C. Hong, S. An, M. Son, S.S. Hong, D.H. Lee, C. Lee // *Anti-Cancer Drugs*. – 2012. – T. 23. – № 5. – C. 553-560.
71. Huang X. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles / X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed // *Lasers in Medical Science*. – 2008. – T. 23. – № 3. – C. 217-228.
72. Huber D. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles / D. Huber //

Small. – 2005. – Т. 1. – № 5. – С. 482-501.

73. Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance - National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, National Academy of Medicine, National Academy of Sciences, Committee on Human Gene Editing: Scientific, Medical, and Ethical Considerations - Google Книги [Электронный ресурс]. – URL: [https://books.google.ru/books?hl=ru&lr=&id=qecvDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=genome+editing+medicine&ots=l6ijf0EEDj&sig=o7hkscNn8fapGyD1EqQkaG3HRmw&redir\\_esc=y#v=onepage&q=genome editing medicine&f=false](https://books.google.ru/books?hl=ru&lr=&id=qecvDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=genome+editing+medicine&ots=l6ijf0EEDj&sig=o7hkscNn8fapGyD1EqQkaG3HRmw&redir_esc=y#v=onepage&q=genome%20editing%20medicine&f=false) (дата обращения: 28.01.2020).

74. Ilinskaya A.N. Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Properties of Engineered Nanomaterials / A.N. Ilinskaya, M.A. Dobrovolskaia. – 2016. – С. 139-163.

75. Ito A. Heat-inducible TNF-gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy. Т. 8 / А. Ito [и др.]. – 2001. – 649-654 с.

76. Ito A. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles / A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T.K.-J. of bioscience and, undefined 2005 // Elsevier.

77. JENG H.A. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells / H.A. JENG, J. SWANSON // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2006. – Т. 41. – № 12. – С. 2699-2711.

78. Jiang D. DNA nanomaterials for preclinical imaging and drug delivery / D. Jiang, C.G. England, W. Cai // Journal of Controlled Release. – 2016. – Т. 239. – С. 27-38.

79. Jiang M. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference / M. Jiang, J. Milner // Oncogene. – 2002. – Т. 21. – № 39. – С. 6041-6048.

80. Jin R. Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling / R. Jin, L. Liu, W. Zhu, D. Li, L. Yang, J. Duan, Z. Cai, Y. Nie, Y. Zhang, Q. Gong, B. Song, L. Wen, J.M. Anderson, H. Ai // Biomaterials. – 2019. – Т. 203. – С. 23-30.

81. Jordan A. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro / A.

- Jordan, R. Scholz, P. Wust, ... H.S.-J. of M., undefined 1999 // Elsevier.
82. Jordan A. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia / A. Jordan, P. Wust, H. Fähhlin, W. John, A. Hinz, R. Felix // *International Journal of Hyperthermia*. – 1993. – T. 9. – № 1. – C. 51-68.
83. Kapoor S. Influence of surface chemistry of mesoporous alumina with wide pore distribution on controlled drug release / S. Kapoor, R. Hegde, A.J. Bhattacharyya // *Journal of Controlled Release*. – 2009. – T. 140. – № 1. – C. 34-39.
84. Karmakar S. Hypokalemia: A potent risk for QTc prolongation in clarithromycin treated rats / S. Karmakar, A. Padman, N. Swamy Mane, T. Sen // *European Journal of Pharmacology*. – 2013. – T. 709. – № 1-3. – C. 80-84.
85. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nature Immunology*. – 2010. – T. 11. – № 5. – C. 373-384.
86. Keum J.W. Enhanced resistance of DNA nanostructures to enzymatic digestion / J.W. Keum, H. Bermudez // *Chemical Communications*. – 2009. – № 45. – C. 7036-7038.
87. Kircher M. Intracellular magnetic labeling with CLIO-Tat for efficient in vivo tracking of cytotoxic T cells by MR imaging / M. Kircher, J. Allport, ... M.Z.-, undefined 2002 // 820 JORIE BLVD, OAK BROOK, IL ....
88. Kircher M.F. In Vivo High Resolution Three-Dimensional Imaging of Antigen-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Trafficking to Tumors / M.F. Kircher, J.R. Allport, E.E. Graves, V. Love, L. Josephson, A.H. Lichtman, R. Weissleder // *Cancer Research*. – 2003. – T. 63. – № 20.
89. Kiseleva A. Optically Active Hybrid Materials Based on Natural Spider Silk / A. Kiseleva, G. Kiselev, V. Kessler, G. Seisenbaeva, D. Gets, V. Rumyantseva, T. Lyalina, A. Fakhardo, P. Krivoschapkin, E. Krivoschapkina // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2019. – T. 11. – № 26. – C. 22962-22972.
90. Kreuter J. Nanoparticles as adjuvants for vaccines. / J. Kreuter // *Pharmaceutical biotechnology*. – 1995. – T. 6. – C. 463-472.

91. Krötz F. Magnetofection - A highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo / F. Krötz, C. de Wit, H.Y. Sohn, S. Zahler, T. Gloe, U. Pohl, C. Plank // *Molecular Therapy*. – 2003. – T. 7. – № 5 I. – C. 700-710.
92. Krötz F. Magnetofection Potentiates Gene Delivery to Cultured Endothelial Cells / F. Krötz, H.-Y. Sohn, T. Gloe, C. Plank, U. Pohl // *Journal of Vascular Research*. – 2003. – T. 40. – № 5. – C. 425-434.
93. Kwatra D. Nanoparticles in radiation therapy a summary of various / D. Kwatra, A. Venugopal, S. Anant // *Translational Cancer Research*. – 2013. – T. 2. – № 4. – C. 330-342.
94. Lal S. Nanoshell-Enabled Photothermal Cancer Therapy: Impending Clinical Impact / S. Lal, S.E. Clare, N.J. Halas // *Accounts of Chemical Research*. – 2008. – T. 41. – № 12. – C. 1842-1851.
95. Lasagna-Reeves C. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice / C. Lasagna-Reeves, D. Gonzalez-Romero, M.A. Barria, I. Olmedo, A. Clos, V.M. Sadagopa Ramanujam, A. Urayama, L. Vergara, M.J. Kogan, C. Soto // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – T. 393. – № 4. – C. 649-655.
96. Lee D.S. Cellular processing and destinies of artificial DNA nanostructures / D.S. Lee, H. Qian, C.Y. Tay, D.T. Leong // *Chemical Society Reviews*. – 2016. – T. 45. – № 15. – C. 4199-4225.
97. Lee E.S. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor / E.S. Lee, K. Na, Y.H. Bae // *Journal of Controlled Release*. – 2005. – T. 103. – № 2. – C. 405-418.
98. Li J. Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures / J. Li, C. Fan, H. Pei, J. Shi, Q. Huang // *Advanced Materials*. – 2013. – T. 25. – № 32. – C. 4386-4396.
99. Limo M.J. Interactions between Metal Oxides and Biomolecules: from Fundamental Understanding to Applications / M.J. Limo, A. Sola-Rabada, E. Boix, V. Thota, Z.C. Westcott, V. Puddu, C.C. Perry // *Chemical Reviews*. – 2018. – T. 118. – № 22. – C. 11118-11193.

100. Lindblad E.B. Aluminium compounds for use in vaccines / E.B. Lindblad // *Immunology and Cell Biology*. – 2004. – T. 82. – № 5. – C. 497-505.
101. Liu G. Nanoparticle iron chelators: A new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance / G. Liu, P. Men, P.L.R. Harris, R.K. Rolston, G. Perry, M.A. Smith // *Neuroscience Letters*. – 2006. – T. 406. – № 3. – C. 189-193.
102. Liu J. Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups / J. Liu, Z. Sun, Y. Deng, Y. Zou, C. Li, X. Guo, L. Xiong, Y. Gao, F. Li, D. Zhao // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2009. – T. 48. – № 32. – C. 5875-5879.
103. Liu X. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions / X. Liu, Y. Xue, T. Ding, J. Sun // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2012. – T. 9.
104. Liu Y. Amine-Functionalized Lanthanide-Doped Zirconia Nanoparticles: Optical Spectroscopy, Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Biodetection, and Targeted Imaging / Y. Liu, S. Zhou, D. Tu, Z. Chen, M. Huang, H. Zhu, X. Chen. – 2012.
105. Lois C. Retroviruses as tools to study the immune system / C. Lois, Y. Refaeli, X.F. Qin, L. Van Parijs // *Current Opinion in Immunology*. – 2001. – T. 13. – № 4. – C. 496-504.
106. Loo C. Gold nanoshell bioconjugates for molecular imaging in living cells / C. Loo, L. Hirsch, M.-H. Lee, E. Chang, J. West, N. Halas, R. Drezek // *Optics Letters*. – 2005. – T. 30. – № 9. – C. 1012.
107. Loo C. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy / C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek // *Nano Letters*. – 2005. – T. 5. – № 4. – C. 709-711.
108. Lu J. In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: Enhanced efficacy by folate modification / J. Lu, Z. Li, J.I. Zink, F. Tamanoi // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2012. – T. 8. – № 2. – C. 212-220.

109. Lu M. FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease / M. Lu, M.H. Cohen, D. Rieves, R. Pazdur // *American Journal of Hematology*. – 2010. – T. 85. – № 5. – C. NA-NA.
110. Ma J. Nanoparticle surface and nanocore properties determine the effect on radiosensitivity of cancer cells upon ionizing radiation treatment / J. Ma, R. Xu, J. Sun, D. Zhao, J. Tong, X. Sun // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2013. – T. 13. – C. 1472-1475.
111. Maggiorella L. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles / L. Maggiorella, G. Barouch, C. Devaux, A. Pottier, E. Deutsch, J. Bourhis, E. Borghi, L. Levy // *Future Oncology*. – 2012. – T. 8. – № 9. – C. 1167-1181.
112. Mahmoudi M. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles / M. Mahmoudi, A. Simchi, A.S. Milani, P. Stroeve // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2009. – T. 336. – № 2. – C. 510-518.
113. Marcato P.D. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems / P.D. Marcato, N. Durán // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2008. – T. 8. – № 5. – C. 2216-2229.
114. Matsudaira H. Iodine Contrast Medium Sensitizes Cultured Mammalian Cells to X Rays but Not to  $\gamma$  Rays Iodine Contrast Medium Sensitizes Cultured Mammalian Cells to X Rays but Not to  $\gamma$  Rays / H. Matsudaira, A.M. Ueno, I. Furuno // *Radiation Research*. – 1980. – T. 84. – № 1. – C. 144.
115. Matsumura M. Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice / M. Matsumura, M. Nagata, K. Nakamura, M. Kawai, T. Baba, K. Yamaki, S. Yoshino // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 2010. – T. 32. – № 1. – C. 56-62.
116. Maxwell D.J. Fluorophore-Conjugated Iron Oxide Nanoparticle Labeling and Analysis of Engrafting Human Hematopoietic Stem Cells / D.J. Maxwell, J. Bonde, D.A. Hess, S.A. Hohm, R. Lahey, P. Zhou, M.H. Creer, D. Piwnica-Worms, J.A. Nolta // *Stem Cells*. – 2008. – T. 26. – № 2. – C. 517-524.
117. McCarthy J.R. Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles / J.R. McCarthy, K.A. Kelly, E.Y. Sun, R. Weissleder // *Nanomedicine*. – 2007. – T. 2. – № 2.

– C. 153-167.

118. Mei Q. Stability of DNA origami nanoarrays in cell lysate / Q. Mei, X. Wei, F. Su, Y. Liu, C. Youngbull, R. Johnson, S. Lindsay, H. Yan, D. Meldrum // *Nano Letters*. – 2011. – T. 11. – № 4. – C. 1477-1482.

119. Min Y. Clinical Translation of Nanomedicine / Y. Min, J.M. Caster, M.J. Eblan, A.Z. Wang // *Chemical Reviews*. – 2015. – T. 115. – № 19. – C. 11147-11190.

120. Mirjolet C. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept / C. Mirjolet, A.L. Papa, G. Créhange, O. Raguin, C. Seignez, C. Paul, G. Truc, P. Maingon, N. Millot // *Radiotherapy and Oncology*. – 2013. – T. 108. – № 1. – C. 136-142.

121. Mou X. Applications of magnetic nanoparticles in targeted drug delivery system / X. Mou, Z. Ali, S. Li, N. He // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2015. – T. 15. – № 1. – C. 54-62.

122. Mowat P. In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells / P. Mowat, A. Mignot, W. Rima, F. Lux, O. Tillement, C. Roulin, M. Dutreix, D. Bechet, S. Huger, L. Humbert, M. Barberi-Heyob, M.T. Aloy, E. Armandy, C. Rodriguez-Lafrasse, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2011. – T. 11. – C. 7833-7839.

123. Mukherjee A. Antimicrobial activity of aluminium oxide nanoparticles for potential clinical applications / A. Mukherjee [и др.].

124. Nam J.M. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins / J.M. Nam, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin // *Science*. – 2003. – T. 301. – № 5641. – C. 1884-1886.

125. Naqvi S. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress / S. Naqvi, M. Samim, M.Z. Abdin, F.J. Ahmed, A.N. Maitra, C.K. Prashant, A.K. Dinda // *International Journal of Nanomedicine*. – 2010. – T. 5. – № 1. – C. 983-989.

126. Nayak P. Aluminum: Impacts and Disease / P. Nayak // *Environmental Research*. – 2002. – T. 89. – № 2. – C. 101-115.

127. Nedorezova D.D. Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy /

D.D. Nedorezova, A.F. Fakhardo, T.A. Molden, D.M. Kolpashchikov // *ChemBioChem*. – 2020. – T. 21. – № 5. – C. 607-611.

128. Nedorezova D.D. Towards DNA Nanomachines for Cancer Treatment: Achieving Selective and Efficient Cleavage of Folded RNA / D.D. Nedorezova, A.F. Fakhardo, D. V. Nemirich, E.A. Bryushkova, D.M. Kolpashchikov // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2019. – T. 58. – № 14. – C. 4654-4658.

129. Newman M.D. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens / M.D. Newman, M. Stotland, J.I. Ellis // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2009. – T. 61. – № 4. – C. 685-692.

130. Novina C.D. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection / C.D. Novina, M.F. Murray, D.M. Dykxhoorn, P.J. Beresford, J. Riess, S.K. Lee, R.G. Collman, J. Lieberman, P. Shankar, P.A. Sharp // *Nature Medicine*. – 2002. – T. 8. – № 7. – C. 681-686.

131. Oh M.H. Large-Scale Synthesis of Bioinert Tantalum Oxide Nanoparticles for X-ray Computed Tomography Imaging and Bimodal Image-Guided Sentinel Lymph Node Mapping / M.H. Oh, N. Lee, H. Kim, S.P. Park, Y. Piao, J. Lee, S.W. Jun, W.K. Moon, S.H. Choi, T. Hyeon // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – T. 133. – № 14. – C. 5508-5515.

132. Oh M.H. Large-Scale Synthesis of Bioinert Tantalum Oxide Nanoparticles for X-ray Computed Tomography Imaging and Bimodal Image-Guided Sentinel Lymph Node Mapping / M.H. Oh, N. Lee, H. Kim, S.P. Park, Y. Piao, J. Lee, S.W. Jun, W.K. Moon, S.H. Choi, T. Hyeon // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – T. 133. – № 14. – C. 5508-5515.

133. Olivier V. Comparative particle-induced cytotoxicity toward macrophages and fibroblasts / V. Olivier, J.L. Duval, M. Hindié, P. Pouletaut, M.D. Nagel // *Cell Biology and Toxicology*. – 2003. – T. 19. – № 3. – C. 145-159.

134. Ozdemir V. Shifting emphasis from pharmacogenomics to theragnostics / V. Ozdemir, B. Williams-Jones, S.J. Glatt, M.T. Tsuang, J.B. Lohr, C. Reist // *Nature Biotechnology*. – 2006. – T. 24. – № 8. – C. 942-946.

135. Pankhurst Q.A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q.A.

- Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2003. – T. 36. – № 13.
136. Paramonova A. Synthesis of upconversion zirconia nanoparticles for bioimaging / A. Paramonova, G. Kiselev, A. Fakhardo, P. Krivoschapkin, E. Krivoshapkina // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – Institute of Physics Publishing, 2019. – T. 525. – C. 012028.
137. Park Y.-S. X-ray absorption of gold nanoparticles with thin silica shell. / Y.-S. Park, L.M. Liz-Marzán, A. Kasuya, Y. Kobayashi, D. Nagao, M. Konno, S. Mamykin, A. Dmytruk, M. Takeda, N. Ohuchi // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. – 2006. – T. 6. – № 11. – C. 3503-6.
138. Peng X.H. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy / X.H. Peng, X. Qian, H. Mao, A.Y. Wang, Z.G. Chen, S. Nie, D.M. Shin // *International Journal of Nanomedicine*. – 2008. – T. 3. – № 3. – C. 311-321.
139. Perl D.P. Relationship of aluminum to Alzheimer's disease. / D.P. Perl // *Environmental Health Perspectives*. – 1985. – T. 63. – C. 149-153.
140. Petković J. Pre-irradiation of anatase TiO<sub>2</sub> particles with UV enhances their cytotoxic and genotoxic potential in human hepatoma HepG2 cells / J. Petković, T. Küzma, K. Rade, S. Novak, M. Filipič // *Journal of Hazardous Materials*. – 2011. – T. 196. – C. 145-152.
141. Pezhouman A. Molecular Basis of Hypokalemia-Induced Ventricular Fibrillation. / A. Pezhouman, N. Singh, Z. Song, M. Nivala, A. Eskandari, H. Cao, A. Bapat, C.Y. Ko, T. Nguyen, Z. Qu, H.S. Karagueuzian, J.N. Weiss // *Circulation*. – 2015. – T. 132. – № 16. – C. 1528-1537.
142. Pitt B. Effect of patiromer on reducing serum potassium and preventing recurrent hyperkalaemia in patients with heart failure and chronic kidney disease on RAAS inhibitors / B. Pitt, G.L. Bakris, D.A. Bushinsky, D. Garza, M.R. Mayo, Y. Stasiv, H. Christ-Schmidt, L. Berman, M.R. Weir // *European Journal of Heart Failure*. – 2015. – T. 17. – № 10. – C. 1057-1065.
143. Pollack S.A. Upconversion-pumped infrared erbium laser / S.A. Pollack, D.B. Chang, N.L. Moise // *Journal of Applied Physics*. – 1986. – T. 60. – № 12. – C. 4077-

4086.

144. Porteus M.H. Towards a new era in medicine: Therapeutic genome editing / M.H. Porteus // *Genome Biology*. – 2015. – T. 16. – № 1.

145. Praetorius N. Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy / N. Praetorius, T. Mandal // *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. – 2008. – T. 1. – № 1. – C. 37-51.

146. Qiu Z. Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera / Z. Qiu, Y. Yu, Z. Chen, M. Jin, D. Yang, Z. Zhao, J. Wang, Z. Shen, X. Wang, D. Qian, A. Huang, B. Zhang, J.W. Li // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – T. 109. – № 13. – C. 4944-4949.

147. Radziun E. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells / E. Radziun, J. Dudkiewicz Wilczyńska, I. Ksiazek, K. Nowak, E.L. Anuszevska, A. Kunicki, A. Olszyna, T. Zabkowski // *Toxicology in Vitro*. – 2011. – T. 25. – № 8. – C. 1694-1700.

148. reviews J.K.-A. drug delivery. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs / J.K.-A. drug delivery reviews, undefined 2001 // Elsevier.

149. Rima W. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles / W. Rima, L. Sancey, M.T. Aloy, E. Armandy, G.B. Alcantara, T. Epicier, A. Malchère, L. Joly-Pottuz, P. Mowat, F. Lux, O. Tillement, B. Burdin, A. Rivoire, C. Boulé, I. Anselme-Bertrand, J. Pourchez, M. Cottier, ... P. Perriat // *Biomaterials*. – 2013. – T. 34. – № 1. – C. 181-195.

150. Sadiq I.M. Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles / I.M. Sadiq, B. Chowdhury, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2009. – T. 5. – № 3. – C. 282-286.

151. Safinya C.R. Structures of lipid-DNA complexes: Supramolecular assembly and gene delivery / C.R. Safinya // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2001. – T. 11. – № 4. – C. 440-448.

152. Sahoo S.K. Enhanced Antiproliferative Activity of Transferrin-Conjugated Paclitaxel-Loaded Nanoparticles Is Mediated via Sustained Intracellular Drug Retention

- / S.K. Sahoo, V. Labhasetwar // *Molecular Pharmaceutics*. – 2005. – T. 2. – № 5. – C. 373-383.
153. Savić N. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing / N. Savić, G. Schwank // *Translational Research*. – 2016. – T. 168. – C. 15-21.
154. Scherer F. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo / F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, B. Gänsbacher, C. Plank // *Gene Therapy*. – 2002. – T. 9. – № 2. – C. 102-109.
155. Schroeder U. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier / U. Schroeder // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – American Chemical Society, 1998. – T. 87. – C. 1305-1307.
156. Schubert S. Ribozyme- and Deoxyribozyme-Strategies for Medical Applications / S. Schubert, J. Kurreck // *Current Drug Targets*. – 2005. – T. 5. – № 8. – C. 667-681.
157. Shabanova E.M. Thrombin@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for use as a hemostatic agent in internal bleeding / E.M. Shabanova, A.S. Drozdov, A.F. Fakhardo, I.P. Dudanov, M.S. Kovalchuk, V. V. Vinogradov // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8. – № 1.
158. Shi H. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data / H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2013. – T. 10. – № 1.
159. Shiryayeva E.S. Hafnium Oxide as a Nanoradiosensitizer under X-ray Irradiation of Aqueous Organic Systems: A Model Study Using the Spin-Trapping Technique and Monte Carlo Simulations / E.S. Shiryayeva, I.A. Baranova, G.O. Kiselev, V.N. Morozov, A. V. Belousov, A.A. Sherstiuk, M.A. Kolyvanova, P. V. Krivoschapkin, V.I. Feldman // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2019. – T. 123. – № 45. – C. 27375-27384.
160. Shubayev V.I. Magnetic nanoparticles for theragnostics / V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2009. – T. 61. – № 6. – C. 467-477.
161. Sioud M. Therapeutic siRNAs / M. Sioud // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2004. – T. 25. – № 1. – C. 22-28.
162. Skrabalak S.E. Gold nanocages for cancer detection and treatment / S.E.

Skrabalak, L. Au, X. Lu, X. Li, Y. Xia // *Nanomedicine*. – 2007. – Т. 2. – № 5. – С. 657-668.

163. Smijs T.G. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness / T.G. Smijs, S. Pavel // *Nanotechnology, Science and Applications*. – 2011. – Т. 4. – № 1. – С. 95-112.

164. Smith D.M. Applications of nanotechnology for immunology / D.M. Smith, J.K. Simon, J.R. Baker // *Nature Reviews Immunology*. – 2013. – Т. 13. – № 8. – С. 592-605.

165. Sollazzo V. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo / V. Sollazzo, F. Pezzetti, A. Scarano, A. Piattelli, C.A. Bignozzi, L. Massari, G. Brunelli, F. Carinci // *Dental Materials*. – 2008. – Т. 24. – № 3. – С. 357-361.

166. Solovev Y. V. Sol-gel derived boehmite nanostructures is a versatile nanoplatform for biomedical applications / Y. V. Solovev, A.Y. Prilepskii, E.F. Krivoshapkina, A.F. Fakhardo, E.A. Bryushkova, P.A. Kalikina, E.I. Koshel, V. V. Vinogradov // *Scientific Reports*. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 1176.

167. Song G. Catalase-Loaded TaOx Nanoshells as Bio-Nanoreactors Combining High-Z Element and Enzyme Delivery for Enhancing Radiotherapy / G. Song, Y. Chen, C. Liang, X. Yi, J. Liu, X. Sun, S. Shen, K. Yang, Z. Liu // *Advanced Materials*. – 2016. – Т. 28. – № 33. – С. 7143-7148.

168. Sotter E. Niobium-doped titania nanopowders for GAS sensor applications Active control of Surface Potential in Nanostructures View project Development of a Think Film Sensor to Detect traces of O2 in CO2 View project NIOBIUM-DOPED TITANIA NANOPOWDERS FOR GAS SENSOR APPLICATIONS. Т. 7 / E. Sotter [и др.]. – 2005. – 1395-1398 с.

169. Srivastava V. Critical Review on the Toxicity of Some Widely Used Engineered Nanoparticles / V. Srivastava, D. Gusain, Y.C. Sharma // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2015. – Т. 54. – № 24. – С. 6209-6233.

170. Szalay B. Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments / B. Szalay, E. Tátrai, G. Nyírő, T. Vezér, G. Dura // *Journal of Applied Toxicology*. – 2012. – Т. 32. – № 6. – С. 446-453.

171. Tadayon A. Delivery of tissue plasminogen activator and streptokinase magnetic nanoparticles to target vascular diseases / A. Tadayon, R. Jamshidi, A. Esmaeili // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2015. – T. 495. – № 1. – C. 428-438.
172. Tarantola M. Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells / M. Tarantola, A. Pietuch, D. Schneider, J. Rother, E. Sunnick, C. Rosman, S. Pierrat, C. Sönnichsen, J. Wegener, A. Janshoff // *Nanotoxicology*. – 2011. – T. 5. – № 2. – C. 254-268.
173. Timmermans J. Ethics and Nanopharmacy: Value Sensitive Design of New Drugs / J. Timmermans, Y. Zhao, J. van den Hoven // *NanoEthics*. – 2011. – T. 5. – № 3. – C. 269-283.
174. Tokumitsu H. Gadolinium neutron-capture therapy using novel gadopentetic acid-chitosan complex nanoparticles: in vivo growth suppression of experimental melanoma solid tumor. / H. Tokumitsu, J. Hiratsuka, Y. Sakurai, T. Kobayashi, H. Ichikawa, Y. Fukumori // *Cancer letters*. – 2000. – T. 150. – № 2. – C. 177-82.
175. Torchilin V. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? / V. Torchilin, V.T.-A. drug delivery reviews, undefined 1995 // Elsevier.
176. Townley H.E. In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles / H.E. Townley, J. Kim, P.J. Dobson // *Nanoscale*. – 2012. – T. 4. – № 16. – C. 5043-5050.
177. Trewyn B.G. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release / B.G. Trewyn, I.I. Slowing, S. Giri, H.T. Chen, V.S.Y. Lin // *Accounts of Chemical Research*. – 2007. – T. 40. – № 9. – C. 846-853.
178. Trinchieri G. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence / G. Trinchieri, A. Sher // *Nature Reviews Immunology*. – 2007. – T. 7. – № 3. – C. 179-190.
179. Tucker B. A procedure for selecting and culturing subpopulations of neurons from rat dorsal root ganglia using magnetic beads / B. Tucker, M. Rahimtula, K.M.-B. research protocols, undefined 2005 // Elsevier.
180. Udomprasert A. DNA origami applications in cancer therapy / A. Udomprasert, T.

Kangsamaksin // *Cancer Science*. – 2017. – T. 108. – № 8. – C. 1535-1543.

181. Valdiglesias V. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity / V. Valdiglesias, G. Kiliç, C. Costa, N. Fernández-Bertólez, E. Pásaro, J.P. Teixeira, B. Laffon // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. – 2015. – T. 56. – № 2. – C. 125-148.

182. Vallet-Regí M. Mesoporous Materials for Drug Delivery / M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2007. – T. 46. – № 40. – C. 7548-7558.

183. Vasilichin V.A. Effects of Metal Oxide Nanoparticles on Toll-Like Receptor mRNAs in Human Monocytes / V.A. Vasilichin, S.A. Tsymbal, A.F. Fakhardo, E.I. Anastasova, A.S. Marchenko, A.A. Shtil, V. V. Vinogradov, E.I. Koshel // *Nanomaterials*. – 2020. – T. 10. – № 1. – C. 127.

184. Walkey C.D. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake / C.D. Walkey, J.B. Olsen, H. Guo, A. Emili, W.C.W. Chan // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – T. 134. – № 4. – C. 2139-2147.

185. Wang H. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering / H. Wang, H. Yang, C.S. Shivalila, M.M. Dawlaty, A.W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch // *Cell*. – 2013. – T. 153. – № 4. – C. 910-918.

186. Wang J. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration / J. Wang, G. Zhou, C. Chen, H. Yu, T. Wang, Y. Ma, G. Jia, Y. Gao, B. Li, J. Sun, Y. Li, F. Jiao, Y. Zhao, Z. Chai // *Toxicology Letters*. – 2007. – T. 168. – № 2. – C. 176-185.

187. Wang P. Thermo-triggered Release of CRISPR-Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy / P. Wang, L. Zhang, W. Zheng, L. Cong, Z. Guo, Y. Xie, L. Wang, R. Tang, Q. Feng, Y. Hamada, K. Gonda, Z. Hu, X. Wu, X. Jiang // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2018. – T. 57. – № 6. – C. 1491-1496.

188. Wang X. Bacterial exposure to ZnO nanoparticles facilitates horizontal transfer of

- antibiotic resistance genes / X. Wang, F. Yang, J. Zhao, Y. Xu, D. Mao, X. Zhu, Y. Luo, P.J.J. Alvarez // *NanoImpact*. – 2018. – T. 10. – C. 61-67.
189. Weber C. Specific Blood Purification by Means of Antibody-Conjugated Magnetic Microspheres / C. Weber, D. Falkenhagen // *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. – Springer US, 1997. – C. 371-378.
190. Weissleder R. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression / R. Weissleder, A. Moore, U. Mahmood, R. Bhorade, H. Benveniste, E.A. Chiocca, J.P. Basilion // *Nature Medicine*. – 2000. – T. 6. – № 3. – C. 351-354.
191. Weissleder R. MR lymphography: Study of a high-efficiency lymphotropic agent / R. Weissleder, J.F. Heautot, B.K. Schaffer, N. Nossiff, M.I. Papisov, A. Bogdanov, T.J. Brady // *Radiology*. – 1994. – T. 191. – № 1. – C. 225-230.
192. Wu Y. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes) / Y. Wu, L. Yu, R. McMahon, J.J. Rossi, S.J. Forman, D.S. Snyder // *Human Gene Therapy*. – 1999. – T. 10. – № 17. – C. 2847-2857.
193. Xia Y. Gold Nanocages: From Synthesis to Theranostic Applications / Y. Xia, W. Li, C.M. Cobley, J. Chen, X. Xia, Q. Zhang, M. Yang, E.C. Cho, P.K. Brown // *Accounts of Chemical Research*. – 2011. – T. 44. – № 10. – C. 914-924.
194. Xu R. Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells / R. Xu, J. Ma, X. Sun, Z. Chen, X. Jiang, Z. Guo, L. Huang, Y. Li, M. Wang, C. Wang, J. Liu, X. Fan, J. Gu, X. Chen, Y. Zhang, N. Gu // *Cell Research*. – 2009. – T. 19. – № 8. – C. 1031-1034.
195. Yehl K. Catalytic Deoxyribozyme-Modified Nanoparticles for RNAi-Independent Gene Regulation / K. Yehl, J.P. Joshi, B.L. Greene, R.B. Dyer, R. Nahta, K. Salaita // *ACS Nano*. – 2012. – T. 6. – № 10. – C. 9150-9157.
196. Young S.W. Gadolinium (III) texaphyrin: A tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI / S.W. Young, F. Qing, A. Harriman, J.L. Sessler, W.C. Dow, T.D. Mody, G.W. Hemmi, Y. Hao, R.A. Miller // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – T. 93. – № 13. – C. 6610-6615.
197. Zaitseva E.A. «NANOZYME» technology in Moscow university. achievements and development perspectives [Электронный ресурс]. – URL:

<http://chem.msu.su/eng/journals/vmgu/164/abs001.html> (дата обращения: 28.01.2020).

198. Zannad F. New approaches to hyperkalemia in patients with indications for renin angiotensin aldosterone inhibitors: Considerations for trial design and regulatory approval / F. Zannad, P. Rossignol, W.G. Stough, M. Epstein, M. De Los Angeles Alonso Garcia, G.L. Bakris, J. Butler, M. Kosiborod, L. Berman, A. Mebazaa, H.S. Rasmussen, L.M. Ruilope, N. Stockbridge, A. Thompson, J. Wittes, B. Pitt // *International Journal of Cardiology*. – 2016. – Т. 216. – С. 46-51.

199. Zheng Q. The role and mechanisms of nanoparticles to enhance radiosensitivity in hepatocellular cell / Q. Zheng, H. Yang, J. Wei, J. long Tong, Y. qian Shu // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2013. – Т. 67. – № 7. – С. 569-575.