ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ПОЗМОГОВА Татьяна Николаевна

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЗНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, ДОПИРОВАННЫХ КЛАСТЕРНЫМ КОМПЛЕКСОМ МОЛИБДЕНА, В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

1.5.22 – Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор

Шестопалова Лидия Владимировна

Новосибирск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 6

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Характеристика материалов на основе аморфного диоксида кремния и их биологических эффектов 13

1.1. Физико-химическая и биологическая характеристика аморфного диоксида кремния 13

1.2 Биосовместимость частиц на основе $ASiO_2$ 19

1.2.1. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на респираторную систему 20

1.2.2. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на нервную систему 22

1.2.3. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на пищеварительную систему 23

1.2.4. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на кровеносную систему 25

1.3. Применение частиц на основе аморфного диоксида кремния в биологии и медицине 27

1.3.1. Применение частиц ASiO2 для доставки лекарств и терапии 27

1.3.2. Применение частиц ASiO2 для биовизуализации и диагностики 30

1.4. Галогенидные октаэдрические кластерные комплексы молибдена 31

1.5. Частицы диоксида кремния, включающие в состав кластерные комплексы 33

Глава 2. Материалы и методы исследования 36

2.1. Ведение культуры клеток: 36

2.2. Получение кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$ 36

2.3. Получение кластерного комплекса молибдена $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ .. 36

2.4. Исследование люминесценции кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$ 37

2.5. Исследование размеров агрегатов частиц в растворе кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$ ... 37

2.6. Исследование изменения спектра эмиссии раствора комплекса молибдена $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ 37

2.7. Исследование токсичности кластерного комплекса $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$ на клетках линий MRC-5 и Hep-2. 38

2.8. Исследование токсичности кластерного комплекса $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ на клетках Hep-2. 38

2.9. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности кластерного комплекса $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$ на клетках линии Hep-2 39

2.10. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности кластерного комплекса $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ на клетках линии Hep-2 39

2.11. Синтез частиц аморфного диоксида кремния с кластерным комплексом молибдена $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$ в составе 39

2.12. Функционализация поверхности полученных микрочастиц группами 3-глицидилоксипропилатриметоксилана 40

2.13. Конъюгация функционализированных микрочастиц диоксида кремния с GFP 41

2.14. Исследование цитотоксичности нано- и микрочастиц с помощью МТТ-теста 41

2.15. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности микро- и наночастиц диоксида кремния, допированных кластерным комплексом молибдена 42

2.16. Исследование кинетики накопления полученных соединений *in vitro* с использованием проточной цитометрии. 42

2.17. Исследование кинетики выведения полученных соединений *из клеток* с использованием проточной цитометрии. 43

2.18. Изучение проникновения в клетки микрочастиц с помощью флуоресцентной микроскопии 43

2.19. Изучение внутриклеточной локализации наночастиц с помощью конфокальной микроскопии 44

2.20. Исследование проникновения частиц в клетки Hep-2 *in vitro* при помощи просвечивающей электронной микроскопии 44

2.21. Определение уровня генерации активных форм кислорода в клетках после инкубации с наночастицами $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ и облучения 46

2.22. Статистическая обработка результатов 46

Глава 3. Изучение биологических эффектов разноразмерных частиц диоксида кремния, допированных кластерным комплексом молибдена, на культуре клеток. Результаты и их обсуждение 47

3.1 Исследование раствора кластерных комплексов молибдена 47

3.1.1. Исследование биологических эффектов кластерного комплекса молибдена с карбоксилированными внешним лигандами 47

3.1.1.1. Люминесценция и оценка стабильности кластерного комплекса 1 в фосфатном буфере. 48

3.1.1.2. Исследование токсичности кластерного комплекса (1) на клетках линий MRC-5 и Hep-2. 49

3.1.1.3. Исследование фотоиндуцированной токсичности кластерного комплекса 1 на клетках линии Hep-2. 50

3.1.2. Исследование биологических эффектов кластерного комплекса молибдена с диметилсульфоксидными внешним лигандами 51

3.1.2.1. Исследование спектра эмиссии кластерного комплекса (2) при инкубации в питательной среде 52

3.1.2.2. Изучение цитотоксичности свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Hep-2 53

3.1.2.3. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Hep-2 54

3.2. Оценка зависимости биологических эффектов частиц от их диаметра и массовой доли кластерного комплекса молибдена в их составе 56

3.2.1. Сравнение цитотоксичности частиц диаметром 50±2 и 500±33 нм, содержащих различные концентрации кластера молибдена. 56

3.2.2. Изучение кинетики клеточного накопления и выведения частиц.. 59

3.2.3. Исследование фотодинамической активности полученных частиц 64

3.3. Исследование микрочастиц в качестве агентов доставки 67

3.3.1. Оценка эффективности функционализации микрочастиц глицидиловыми группами. 67

3.3.2. Оценка локализации микрочастиц в клетках линии Hep-2 с помощью флуоресцентной микроскопии 69

3.2.3. Электронно-микроскопическое изучение локализации микрочастиц в клетках линии Hep-2 71

3.3. Исследование наночастиц в качестве фотосенсибилизатора. 79

3.3.1. Исследование фотоиндуцированной токсичности наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ методом двойного окрашивания 79

3.3.2. Оценка внутриклеточной локализации наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ с помощью конфокальной микроскопии 83

3.3.3. Электронно-микроскопическое картирование наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$. 85

3.3.4. Оценка продукции клетками активных форм кислорода до и после облучения 86

Глава 4. Обсуждение результатов 90

4.1. Оценка свойств кластерных комплексов молибдена в растворе и их биологические эффекты. 90

4.2. Поиск оптимального способа применения частиц диоксида кремния с диаметром 50 и 500 нм, включающих в состав матрицы кластерный комплекс молибдена 92

4.3. Оценка эффективности микрочастиц в роли агентов-переносчиков..... 100

4.4. Оценка эффективности наночастиц в качестве фотосенсибилизаторов 104

Заключение 109

Выводы 111

Список сокращений 113

Список литературы 114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время развивается большое количество методов лечения рака, однако все используемые в клинике методы имеют те или иные недостатки, ограничивающие их эффективность и область применения. Одними из наиболее перспективных методов противоопухолевой терапии на данный момент являются фотодинамическая терапия и доставка цитостатических препаратов в клетки опухоли. Для повышения эффективности этих направлений терапии ведется постоянная разработка новых методов и материалов.

Цельные и пористые частицы диоксида кремния становятся достаточно популярным объектом исследования в различных областях биологии и медицины благодаря своей высокой инертности, биосовместимости и большой площади поверхности (Cui, 2020; He, 2011). Высокий интерес для исследователей представляет и возможность модификации поверхности данных частиц, которая позволяет менять такие параметры, как гидрофильность, чувствительность к pH и температуре и таргетность (Zhang, 2020). Сами по себе частицы диоксида кремния не обладают эффектами люминесцентных агентов или фотосенсибилизаторов – они являются инертным каркасом и могут проявлять различные свойства в зависимости от молекул, включаемых в их матрицу. В качестве таких молекул можно использовать октаэдрические кластерные комплексы молибдена, обладающие люминесцентными и фотодинамическими свойствами.

Потенциал применения допированных кластерным комплексом частиц может быть очень широким, но для изучения перспектив их использования в биологии и медицине необходим анализ их биологических эффектов. Актуальность данной работы заключается в том, чтобы понять, как поменяется жизнеспособность и активность клеток после инкубации с изучаемыми частицами. Особый интерес представляет изучение реакции клеток на частицы различного диаметра, поскольку зависимость биологических эффектов частиц от их диаметра исследована на данный момент недостаточно подробно. Оценка этих базовых параметров позволит судить о возможности использования полученных частиц для решения задач биомедицины.

Степень разработанности темы исследования. Частицы диоксида кремния были успешно использованы для доставки нуклеиновых кислот,

белков, агентов для визуализации сосудов и очагов опухолей и препаратов против различных типов заболеваний (Huang, 2019; Meka, 2018). Для данного типа частиц оценена клеточная и системная токсичность, а также биологические эффекты при различных способах доставки в организм (Flood-Garibay, 2021). Преобладающее число работ направлено на изучение наноразмерных частиц кремния, поскольку они более широко используются в различных отраслях биологии, медицины и производства. Микрочастицы диоксида кремния с диаметром более 300 нм остаются недостаточно изученными, а работы, проводящие сравнение биологических эффектов частиц аморфного диоксида кремния ($ASiO_2$) различных размеров и форм, малочисленны и противоречивы (Yuan 2010; He, 2011; Liu, 2012)

Несмотря на то, что в состав кремниевых частиц ранее включались различные молекулы – такие, как золото или серебро – возможности включения в кремниевую матрицу кластерных комплексов тяжелых металлов уделено на данный момент небольшое внимание. Ранее была показана способность кластерных комплексов молибдена к люминесценции и фотоиндуцированной токсичности (Vorotnikova, 2019). Эти особенности свидетельствуют о том, что как сами кластерные комплексы, так и материалы, включающие их в свой состав, могут найти применение в качестве биологических меток, агентов для доставки препаратов в клетки и фотосенсибилизаторов. Тем не менее, данные комплексы ранее не были включены в состав кремниевых частиц, а также не было показано, сохраняются ли их свойства при таком включении.

Таким образом, данная работа направлена на установление зависимости биологических эффектов кремниевых частиц различного диаметра от включения в их состав кластерного комплекса молибдена и оценку поведения кластерных комплексов молибдена при включении в кремниевую матрицу. В соответствии с этим были определены цель и задачи исследования.

Цель исследования. Охарактеризовать биологические эффекты частиц диоксида кремния различного диаметра, допированных кластерным комплексом молибдена, в культуре клеток.

Задачи исследования:

1. Определить биологические эффекты кластерных комплексов молибдена в растворе на культуре клеток Hep-2 и MRC-5.

2. Оценить жизнеспособность клеток после инкубации с частицами

диоксида кремния различного диаметра и с различной долей кластерного комплекса молибдена в составе кремниевой матрицы в нормальных условиях и после облучения.

3. Изучить особенности проникновения, локализации и накопления в клетках частиц диоксида кремния различного диаметра.

4. Оценить и сравнить эффективность применения наночастиц и микрочастиц диоксида кремния, допированных октаэдрическим кластерным комплексом молибдена, в качестве фотосенсибилизаторов и агентов для доставки белков в клетки.

Научная новизна. В данной работе получены и описаны частицы диоксида кремния, допированные октаэдрическим кластерным комплексом молибдена ($\{Mo_6I_8\}@SiO_2$). Впервые установлено, что жизнеспособность клеток при инкубации с растворами частиц не зависит от концентрации кластерного комплекса молибдена в составе кремниеврй матрицы частиц.

Впервые проведено изучение и сравнение таких биологических эффектов, как кинетика накопления и выведения из клетки, фотоиндуцированная токсичность и локализация частиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ различного диаметра в клетке. Показано, что меньший диаметр частиц способствует большей скорости их накопления в клетке и выведения из клетки. Кроме того, для частиц большего диаметра показана локализация в эндосомах, лизосомах и мультивезикулярных тельцах, тогда как для наночастиц наблюдалось свободное распределение в цитоплазме.

Впервые проведена оценка возможности практического применения полученных частиц в качестве агентов доставки белков в клетку и фотосенсибилизаторов. Продемонстрировано, что биологические эффекты частиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ зависят от их диаметра. Для кластерных комплексов молибдена в виде раствора изучена стабильность в фосфатном буфере и в культуральной среде, а также исследована цитотоксичность и фотодинамическая активность.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Показано, что токсичность частиц диоксида кремния не зависит от концентрации кластерного комплекса молибдена в составе их матрицы. Продемонстрировано, что частицы диоксида кремния с одинаковым содержанием кластерного комплекса молибдена, но отличающимся в 10 раз диаметром, проявляют различные

биологические эффекты. Для микрочастиц диоксида кремния, включающих в свой состав кластерный комплекс молибдена, практически не проводились исследования биологической активности – таким образом, полученные в ходе работы данные вносят вклад в изучение биоматериалов.

Для наночастиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ выявлена высокая эффективность в качестве фотосенсибилизатора. Показана способность микрочастиц $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ доставлять в клетку белок GFP, не утрачивая при этом люминесцентных свойств. Эти результаты свидетельствуют о большом потенциале применения изученных комплексов в биологии и медицине.

Методология и методы исследования. Дизайн эксперимента и разнообразие используемых методов позволяют обеспечить достижение поставленных задач и получить адекватные результаты. В работе были использованы методы МТТ-теста, двойного окрашивания, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии для оценки цитотоксичности и внутриклеточного проникновения, электронно-микроскопическое исследование, а также проведен статистический анализ полученных результатов. Для определения фотодинамической активности изучаемых соединений было проведено облучение клеток после инкубации с исследуемыми веществами видимым светом и рентгеном. Для лучшего понимания поведения кластерных комплексов молибдена в растворе были сняты их спектры эмиссии и оценены размеры образуемых в растворе частиц методом светового рассеяния. С помощью красителя 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (DCF) была изучена интенсивность генерации клетками синглетного кислорода после инкубации с наночастицами и облучения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Инкубация клеток линии Hep-2 с кластерными комплексами молибдена $Na_2[Mo_6I_8$(2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]ацетат)6] и $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ с последующим облучением вызывает фотоиндуцированную гибель клеток. Жизнеспособность клеток значительно меняется в зависимости от времени выдержки растворов кластерных комплексов, что является следствием быстрого гидролиза комплексов и затрудняет изучение их эффектов на биологических объектах.

2. После инкубации клеток линии Hep-2 с частицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ диаметром 50 нм в отсутствие света их выживаемость остается без изменений, тогда

как активация наночастиц светом приводит к фотоиндуцированной гибели клеток. Инкубация клеток Hep-2 с частицами диаметром 500 нм, напротив, снижает жизнеспособность клеток в отсутствие света, и не вызывает фотоиндуцированной токсичности. Таким образом, биологические эффекты допированных кластерным комплексом молибдена $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$ частиц диоксида кремния зависят от их диаметра.

3. Накопление в клетках Hep-2 частиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ диаметром 50 нм достигает максимума через 4 ч инкубации, тогда как для захвата частиц диаметром 500 нм клеткам требуется 8 ч. Время полного выведения обоих типов частиц из цитоплазмы клеток составляет более чем 24 ч. Микрочастицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ локализуются поодиночке в эндосомах, лизосомах и микровезикулярных тельцах, тогда как наночастицы образуют скопления в цитоплазме.

4. Клетки линии Hep-2 приобретают свойство активно поглощать GFP в составе конъюгата с микрочастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, что обусловлено способностью микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ эффективно доставлять GFP внутрь клетки.

Степень достоверности результатов диссертации. В работе использованы современные методы клеточной биологии (проточная цитометрия, двойное окрашивание, конфокальная микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия), обработка количественных данных проведена статистическими методами. Методы, использованные в работе, соответствуют поставленным целям и задачам. Исследования выполнены с достаточным для полноценного статистического анализа количеством повторов с использованием современного сертифицированного оборудования. Сформулированные в ходе работы выводы и научные положения вытекают из результатов работы и основаны на результатах собственных исследований.

Апробация результатов. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на XII международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (2016, Новосибирск), международной конференции «42nd International Conference on Coordination Chemistry» (2016, Брест, Франция), международной конференции «VI-thInternational Workshop of Transition Meta lClusters» (2018, Тюбинген), V молодежной конференции по молекулярной и

клеточной биологии института цитологии РАН (2016, Санкт-Петербург), XXVII международной конференции «International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry» (2019, Смоленица, Словакия), конференции «SIBIRCON 2019 – International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences» (2019, Новосибирск), научном съезде «BIOMATERIALS FOR CELL AND DRUG DELIVERY 2019» (2019, Манчестер), заседании совместного кафедр физиологии и цитологии и генетики Факультета естественных наук НГУ и лабораторий Института неорганической химии СО РАН (2022, Новосибирск).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 статьи – в журналах, входящих в в международные базы данных (Web of Sciences, Scopus) и системы цитирования:

1. Vorotnikov Y.A., **PozmogovaT.N.**, Solovieva A.O. et al. Luminescent silica mesoparticles for protein transduction // **Materials Science and Engineering C. – 2019. – Vol. 96. – P. 530–538.**
2. Kirakci K., **Pozmogova T.N.**, Protasevich A.Y. A water-soluble octahedral molybdenum cluster complex as a potential agent for X-ray induced photodynamic therapy // **Biomaterials Science. – 2021. – Vol. 9 (8). – P. 2893–2902.**
3. Pronina E.V., **Pozmogova T.N.,** Vorotnikov Y.A., Ivanov A.A., Shestopalov M.A. The role of hydrolysis in biological effects of molybdenum cluster with DMSO ligands // **Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2022. – Vol. 27. – P. 111–119.**
4. **Pozmogova T.N.**, Vorotnikov Y.A., Solovieva A.O. et al. Luminescent silica microparticles as new detectable agents for protein transduction // BIOMATERIALS FOR CELL AND DRUG DELIVERY 2019. – Манчестер, 2019.
5. Vorotnikov Y.A., **Pozmogova T.N.**, Solovieva A.O. et al. Octahedral molybdenum cluster doped silica particles – New materials for biomedical applications // VIth International Workshop of Transition Metal Clusters. – Тюбинген, 2018.
6. **Позмогова Т.Н,** Евсюкова В.С, Иванов А.А. и др. Comparison of intravenous toxicity of hexaniobium cluster complex and its conjugate with gamma-cyclodextrin // SIBIRCON 2019 - International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences. – Новосибирск, 2019.
7. Соловьева А.О., **Позмогова Т.Н.**, Красильникова А.А., Воротников Ю.А., Авроров П.А., Повещенко А.Ф., Шестопалов М.А. Кластерные комплексы молибдена, заключенные в кремниевые наночастицы, как перспективные агенты для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям. Материалы XII международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной

лимфологии. – Новосибирск, 2016. – С. 235-237.

8. Соловьева А.О., **Позмогова Т.Н.**, Красильникова А.А., Воротников Ю.А., Шестопалов М.А. Внутриклеточное распределение, фототоксичность и селективность накопления в опухолевых клетках кластерных комплексов молибдена, включенных в кремниевые наночастицы и их конъюгатов с антителами // V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН. – Санкт-Петербург, 2016

9. Solovieva A.O., **Pozmogova T.N.**, Vorotnikov Y.A., Trifonova K.E., Poveshchenko A.F., Shestopalov M.A. Evaluation the tumor specificity of a herceptin-conjugated {Mo6I8}@SiO2 nanoparticles in vitro» // 42nd International Conference on Coordination Chemistry. – Brest (France), 2016. – P. 430.

10. Vorotnikov Y.A., **Pozmogova T.N.**, Solovieva A.O., Shestopalov M.A. Luminescent cluster-doped silica particles: surface modification and biological applications // Book of Abstracts – XXVII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry. – Smolenice, Slovakia, 2019. – P. 116.

Личный вклад автора. Все биологические исследования выполнены и проанализированы автором лично.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ АМОРФНОГО ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ

1.1. Физико-химическая и биологическая характеристика аморфного диоксида кремния

Диоксид кремния – это доступный и простой в получении материал, обладающий высокой прочностью и устойчивостью в широком диапазоне условий. В настоящее время наиболее активно изучаются материалы на основе аморфного диоксида кремния ($ASiO_2$) – некристаллической формы диоксида кремния (Fruijtier-Pölloth, 2012). Ряд свойств аморфного диоксида кремния выгодно отличают его от других материалов, использующихся для создания нанокомпозитов (Fruijtier-Pölloth, 2012). Это:

1. Поверхность $ASiO_2$ гидрофильна, что может использоваться в доставке гидрофобных и слабо растворимых материалов в биологии и медицине (Trzeciak, 2021, 2020; Zhang, 2010). К примеру, частицы на основе аморфного диоксида кремния успешно использовались в доставке нерастворимого препарата клофазимина и слабо растворимых карбамазепима (Thomas, 2010, Ambrogi, 2008, 2013, Speybroeck, 2009, Wu, 2012), целекоксиба (Eren, 2016), фенофибрата (Hong, 2016, Bouledjouidja, 2016), даназола (Chen, 2018), флурбипрофена (Kerkhofs, 2015, Trzeciak, 2020), ибупрофена (Malfait, 2019, Shen, 2010, Trzeciak, 2020) и диазепама (Speybroeck, 2009).

2. $ASiO_2$ обладает высокой химической стабильностью, термической устойчивостью и инертностью.

3. Для многих структур на основе $ASiO_2$ отмечается способность к биодеградации, что снижает риск долгосрочного накопления этих материалов в клетках и в тканях организма (Kim, 2023, Hukins, 2008, Gongalsky, 2020, Hadipour Moghaddam, 2019; Choi, 2019; Croissant, 2017). Способность к биодеградации также позволяет конструировать материалы, высвобождающие лекарственный препарат постепенно, по мере деградации кремниевой матрицы (Park, 2015, Fukushima, 2011). Так, были получены наночастицы диоксида кремния, способные к постепенному высвобождению доксорубицина (Wang,

2022, Li, 2020). Сочетание способности к биодеградации с указанной выше способностью материалов на основе $ASiO_2$ транспортировать гидрофобные соединения позволило получить модели постепенного внутриклеточного высвобождения гидрофобных молекул в процессе биодеградации кремниевой матрицы-транспортера (von Haartman, 2016).

4. Частицы, получаемые на основе $ASiO_2$, демонстрируют высокую коллоидную стабильность. Эта стабильность обусловлена высоким электростатическим отталкиванием, так как поверхность аморфного диоксида кремния при нейтральных или щелочных pH заряжена отрицательно. Кроме того, его поверхность имеет более низкую силу ван-дер-ваальсовых взаимодействий, нежели оксиды металлов (Ullmann, 2003, Walter, 2013).

5. $ASiO_2$ не поглощает свет и не влияет на магнитные поля, что делает его прозрачным для света и магнетизма. Это говорит о том, что вещества с разными свойствами при включении в матрицу диоксида кремния способны сохранять свои оптические и/или магнитные свойства. В литературе описаны частицы диоксида кремния, допированные дикетонатами европия (Ma, 2017, Kim, 2021), кластерным комплексом марганца (Turquet, 2021), ионами тулия и иттербия (Halubek-Gluchowska, 2021), оксидом цинка (Olszowska, 2020). Допанты в этих частицах сохраняли свои оптические и магнитные свойства после включения в состав кремниевой матрицы.

6. Способы получения и модификации $ASiO_2$ хорошо развиты и относительно просты (Spataru, 2016, Douroumis, 2013, Rastegari, 2021, Zhang, 2019).

Эти характеристики, а также возможность получать и модифицировать разнообразные конструкты на основе кремниевой матрицы, привлекли к диоксиду кремния внимание многих исследовательских групп.

В настоящее время диоксид кремния применяется в пищевой промышленности в качестве вспомогательного вещества (пищевая добавка E551) (Ullmann, 2003), входит в состав зубных паст и фармацевтических препаратов, в которых выполняет роль стабилизатора и загустителя (Чуйко, 2003). Благодаря его светоотражающим свойствам, диоксид кремния часто добавляют в пудры и другие косметические продукты (Barel, 2014). Материалы на основе диоксида кремния отличаются высокой биосовместимостью – полулетальная доза при пероральном употреблении диоксида кремния составляет 5 г/кг, что позволяет отнести данное вещество к нетоксичным.

Матрицы на основе $ASiO_2$ привлекли внимание многих исследовательских групп как основа для создания биосовместимых материалов, которые можно применить в биологии и медицине. Авторы отмечают легкость получения и модификации данного материала – к примеру, простейшие частицы из $ASiO_2$ получаются путем самосборки в аммиачном растворе (Cui, 2020). К преимуществам диоксида кремния также относят разнообразие получаемых с его помощью текстур (Fijneman, 2020; Derylo-Marczewska, 2008; Bouchoucha, 2016) и сохранение высокой биосовместимости при различных путях введения (He, 2011). В настоящий момент синтезируются и изучаются кремниевые материалы различных форм и размеров – нано- и микрочастицы (Zhang, 2020), кремниевые стержни (Zhang, 2019), нанопленки на основе диоксида кремния (Ribeiro, 2014, Zhang, 2018) и так далее.

В 2001 году группой под руководством Vallet-Regi диоксид кремния был впервые описан в качестве эффективного агента для доставки биологически активных веществ в клетку (Vallet-Regi, 2001). В работе Vallet-Regi частицы диоксида кремния с порами различного диаметра были успешно нагружены ибупрофеном, при этом массовая доля ибупрофена от общей массы частиц составила 30%, что является показателем высокой эффективности для транспортера (Ruiz-González, 2021, Manzano, 2021, Tella, 2022). После выхода данной работы научное сообщество начало активное исследование различных частиц на основе $ASiO_2$ в роли внутриклеточных доставщиков лекарственных препаратов. Один из плюсов такого способа доставки заключается в значительном увеличении гидрофильности транспортируемых веществ.

Многие высокоактивные препараты в настоящее время обладают крайне плохой растворимостью в воде. Нерастворимые в воде лекарственные средства стали серьезной проблемой в разработке терапевтических препаратов, и масштабы этой проблемы растут с каждым годом, поскольку в настоящее время около 90% новых тестируемых лекарств классифицируются как плохо растворимые в воде (Maleki, 2017). Существуют различные подходы к преодолению плохой растворимости в воде и низкой скорости растворения в водной среде, однако каждый из них имеет свои недостатки и определенные ограничения. Так, при модификации формулы непосредственно терапевтического вещества велика вероятность снижения его эффективности. Использование различных носителей на основе $ASiO_2$ привело к значительному

увеличению водорастворимости веществ в водных растворах в результате высокой диспергируемости частиц на основе аморфного диоксида кремния (Riikonen, 2018).

Высокая эффективность данного подхода была показана в экспериментах с флавоноидом растительного происхождения апигенином. Апигенин имеет высокий потенциал для лечения таких заболеваний, как шизофрения, депрессия, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона благодаря своим нейрогенным свойствам (Salehi, 2019). Кроме того, для данного вещества, как и для других флавоноидов, была выявлена высокая противоопухолевая эффективность в экспериментах *in vitro* на клетках рака легких человека A549, меланомы мыши B16F10, рака молочной железы человека MCF-7, рака печени человека HepG2 и клетках колоректального рака мыши CT26 (Dobrzynska, 2020, dePace, 2013, Tan, 2012, Xu, 2015, Wu, 2016). Заключение апигенина в кремниевый носитель позволило увеличить его биодоступность и повысить растворимость, повысив, таким образом терапевтическую эффективность данного вещества (Huang, 2019).

Еще один пример успешного использования $ASiO_2$ в доставке – эксперименты по доставке вориностата. Вориностат является мощным ингибитором гистондеацетилаз класса I, который одобрен для лечения кожной Т-клеточной лимфомы. Этот препарат является одним из самых эффективных терапевтических агентов для системной терапии стойкой, прогрессирующей или рецидивирующей лимфомы (Takeuchi, 2020, Jing, 2018, Sekeres, 2017). Недостатки данного вещества заключаются в его низкой растворимости в воде и низкой проницаемости, что снижает его клинический потенциал, особенно при пероральном приеме.

В работе группы исследователей под руководством Meka вориностат включался в мезопористые кремниевые наночастицы, поверхность которых была различным образом модифицирована, после чего авторами работы оценивалась гидрофильность частиц с вориностатом и их проникновение в клетки колоректального рака человека Caco-2. В данной работе было показано, что при заключении вориностата в матрицу диоксида кремния растворимость вориностата увеличивается в 4,3 раза, а проникновение данного вещества в клетки опухоли возрастает в 3,8 раз с пропорциональным увеличением противоопухолевой ингибирующей активности (Meka, 2018).

Помимо перечисленных выше преимуществ, доставка препаратов с использованием диоксида кремния позволяет создавать системы контролируемого высвобождения терапевтического агента. Контролируемое высвобождение лекарств через реакцию на изменение pH является одним из наиболее перспективных и активно используемых, поскольку изменение pH в более кислую сторону почти всегда происходит при интернализации частиц в раковые клетки. Используя пористые частицы диоксида кремния, можно нагрузить поры частицы терапевтическим препаратом, при этом связи между терапевтическим веществом и поверхностью частицы зависят от уровня pH. Для этих целей часто используют эфирные, иминные или ацетальные связи (Gisbert-Garzarán, 2017, Lungu, 2016, Fan, 2019). Подобные pH-чувствительные частицы на основе кремния были получены и исследованы на линиях клеток карциномы шейки матки человека HeLa (Muhammad, 2011, Tang, 2011, Jafari, 2019), карциномы полости рта человека KB-31 (Yang, 2014), карциномы печени человека HepG2 (Hakeem, 2018), рака груди человека MDA-MB-231 (Santha Moorthy, 2017), и клетках B-клеточной лимфомы (Zhou, 2017).

$ASiO_2$ может использоваться не только в доставке терапевтических препаратов, но и в качестве носителя рентгеноконтрастных и люминесцентных агентов. Благодаря тому, что диоксид кремния минимально поглощает свет и не влияет на магнитные поля, его поверхность можно модифицировать допантами, которые будут сохранять свои оптические или магнитные свойства. На основе диоксида кремния были получены магнитные наночастицы, способные активироваться переменным магнитным полем с выделением большого количества тепла. Термическая терапия приобретает большую популярность в современном лечении рака благодаря минимальной инвазивности. Кроме того, была установлена большая чувствительность к высоким температурам у опухолевых клеток по сравнению со здоровыми. Гипертермическое лечение рака основано на применении тепла к опухолевым тканям, которое направлено на ингибирование клеточной пролиферации, регуляцию и индуцирование апоптоза.

Магнитная гипертермия — это процедура, в которой магнитные наночастицы используются для индуцирования локального нагрева до 42-46°C внутри опухолевых клеток непосредственно после проникновения в них магнитных частиц. Наночастицы диоксида кремния исследовались во многих

работах как агенты для магнитной гипертермии. Так, в одном из исследований наночастицы диоксида кремния были конъюгированы с наночастицами маггемита, что придало получившимся наносферам высокую растворимость и биосовместимость в сочетании со способностью нагреваться в переменном магнитном поле. Получившееся вещество показало высокую противоопухолевую эффективность на таких клетках, как A549 (клетки рака легких человека), HepG2 (клетки рака печени человека) и Saos-2 (клетки остеокарциномы) (Martín-Saavedra, 2010).

Магнитные нано- и микрочастицы на основе кремния были успешно протестированы на клетках линии HeLa (Yu, 2016), остеобластных клетках MC3T3-E1 (Zhang, 2013), клетках рака груди 4T1 (Yao, 2017). Некоторые исследовательские группы используют описанную выше способность диоксида кремния к внутриклеточной доставке лекарств в сочетании со свойствами магнитных частиц. К примеру, были получены магнитные кремниевые наночастицы, нагруженные доксорубицином. При нагревании в переменном магнитном поле такие частицы высвобождали транспортируемый ими доксорубицин, усиливая гипотермическую терапию химотерапией (Chen, 2019). Возможность такого комплексного подхода обеспечивается многообразием функций и свойств диоксида кремния.

Оптическая прозрачность диоксида кремния позволяет использовать его и в качестве доставщика контрастных агентов. В оптической визуализации флуоресцентные контрастные вещества обычно возбуждаются излучением в видимой или инфракрасной области спектра, и излучается свет с более низкой энергией, чем падающий свет. Несмотря на все эти исключительные диагностические возможности, оптическая визуализация страдает от нескольких ограничений, включая слабое отношение сигнал/шум из-за автофлуоресценции тканей, низкое проникновение и фотообесцвечивание. Использование кремниевых наноматериалов в доставке контрастных веществ позволяет значительно повысить квантовый выход, фотостабильность, биосовместимость, гидрофильность и точность обнаружения флуоресцентных сигналов.

В работе научной группы под руководством Lee мезопористые наночастицы SiO_2 были модифицированы триметиламмониевыми группами для адсорбции флуоресцентного красителя индоцианинового зеленого за счет электростатического притяжения. В печени наркотизированной крысы наблюда-

лась стабильная и сильная флуоресценция контрастного вещества. Снижение агрегации и повышенную яркость флуоресценции авторы объясняют распределением молекул красителя в мезопористых наночастицах с очень высокой площадью поверхности, что обеспечивает более однородное и концентрированное свечение (Lee, 2009). Данная идея получила своё развитие в более поздних работах других научных групп.

Помеченные флуоресцентным контрастным веществом кремниевые частицы были конъюгированы с аргинин-глицин-аспарагиновой кислотой, которая взаимодействует с $\alpha_v\beta_3$-рецепторами на поверхности опухолевых клеток и активно захватывается опухолевыми клетками печени Hep-G2 по пути клатрин-зависимого эндоцитоза (Liao, 2014). Таргетированные флуоресцентные наночастицы $ASiO_2$ также были изучены *in vivo*. Мышам линии BALB/c имплантировали опухолевые клетки печени Hep-G2, после чего мышам внутривенно вводились растворы таргетированных флуоресцентных наночастиц диоксида кремния. Во время оперативного удаления опухолевых узлов наночастицы, накопившиеся в опухолях, ярко подсвечивали область опухолевого очага, обеспечивая более быстрое и точное удаление опухолевой ткани. Более того, авторы данного исследования смогли отследить образование метастазов у нескольких мышей благодаря накоплению в них ярко флуоресцирующих частиц (Zeng, 2016).

В отличие от популярных ранее материалов на основе углерода, материалы на основе кремния в меньшей степени накапливаются в тканях организма, а также способны к биодеградации. Связи Si-Si и Si-O слабее, чем соответствующие связи C-C и C-O. Благодаря этой особенности, кремниевые частицы имеют более высокие шансы полностью вывестись из организма даже в случае задержки в тканях организма (Teo, 2007, Okamoto, 2011).

1.2 Биосовместимость частиц на основе $ASiO_2$

Поскольку материалы меньшего размера имеют повышенное отношение поверхности к объему и более высокую поверхностную реактивность (Murugadoss, 2017), даже случайное попадание наночастиц $ASiO_2$ в организм при дыхании, приеме пищи и прикосновении может вызвать токсические эффекты. Частицы $ASiO_2$ могут распространяться через систему кровообращения в различные ткани человеческого тела. К настоящему моменту биосовме-

стимость частиц $ASiO_2$ была тщательно изучена *in vitro* и *in vivo*. В следующих разделах кратко описываются токсическое влияние разноразмерных частиц диоксида кремния на ткани и органы различных систем организма.

1.2.1. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на респираторную систему

Оценка токсичности частиц $ASiO_2$ была проведена *in vitro* для клеток бронхиального эпителия легких человека. Lag и соавторы (Låg, 2018) изучили провоспалительный ответ, вызванный 10- и 50-нм частицами диоксида кремния в концентрациях от 25 до 100 мкг/мл в двух типах эпителиальных клеток бронхов человека (BEAS-2B и HBEC3-KT), и обнаружили, что меньшие по диаметру частицы более интенсивно индуцируют секрецию цитокинов CXCL8 и IL-6 по сравнению с более крупными частицами за счет фосфорилирования p38, TACE-опосредованного высвобождения TGF-α и активации ядерного фактора kappa-B (NF-κB). Между двумя исследованными линиями клеток значительных отличий в эффекте изученных частиц диоксида кремния авторами отмечено не было. Авторы объясняют более выраженный эффект от наночастиц меньшего размера их более эффективным проникновением в клетку, которое, в свою очередь, вызвано высокой агломерацией частиц с меньшим диаметром и образованием конгломератов, которые целиком поглощались клеткой.

Группа под руководством Petrache Voicu (Petrache Voicu, 2015) сообщает, что 7-нм частицы диоксида кремния в концентрации 62,5 мкг/мл вызывали окислительный стресс в клетках фибробластов легких человека (MRC-5) после инкубации в течение 24, 48 и 72 часов. Кроме того, после инкубации с наночастицами в клетках были снижены уровни экспрессии p53, MDM2 и Bcl-2. Refsnes и соавторы (Refsnes, 2019) подтвердили, что высокая концентрация (200 мкг/мл) 50-нм частиц диоксида кремния индуцирует образование активных форм кислорода (АФК) в клетках бронхов человека BEAS-2B. Анализ данных микрочипов был использован для изучения изменений в уровнях экспрессии генов, вызванных наночастицами диоксида кремния (Guo, 2017). Клетки бронхов человека BEAS-2B непрерывно инкубировали в присутствии 60-нм наночастиц диоксида кремния в концентрации 5 мкг/мл в течение 40 пассажей и выявили повреждения ДНК, являющиеся результатом злокачественной трансформации системы передачи сигналов p53. Аналогично, Li и соавт. (Li, 2019) изучили влияние размера частиц $ASiO_2$ размером 41, 61 и 206

нм на профили экспрессии генов в клетках BEAS-2B и обнаружили, что экспрессия генов, участвующих в иммунной и воспалительной реакции клеток, возрастает по мере уменьшения размера наночастиц.

В связи с высокими концентрациями наночастиц диоксида кремния в воздухе промышленных городов и накоплением их в альвеолярных макрофагах, действие данного типа частиц на макрофаги изучено достаточно обширно (Nakayama, 2018). Клетки макрофагов мыши (RAW 264.7) использовали для оценки воздействия частиц диоксида кремния размером 3 и 50 нм в концентрациях от 30 до 400 мкг/мл (Inoue, 2021). В данной работе было показано повышение уровней АФК при эндоцитозе макрофагами обоих типов частиц. В другой работе на этой же линии клеток был показан апоптоз легочных макрофагов после инкубации с частицами диоксида кремния диаметром 5-15 нм в концентрации 150 мкг/мл в течение 24 часов (Chen, 2019).

Ряд работ также выполнен на линии легочных макрофагов крысы NR8383. В работе под руководством Schremmer цитотоксичность наночастиц диоксида кремния диаметром 15 нм коррелировала с хемотаксическим ответом, который, в свою очередь, соответствовал повышенной транскрипции провоспалительных хемокинов (CCL4, CXCL1, CXCL3 и TNF-α) (Schremmer, 2016, Grossgarten, 2018). Научной группой под руководством Kersting (Kersting, 2020) была изучена токсичность частиц диоксида кремния пяти различных форм и размеров. В субтоксическом диапазоне концентраций (100 мкг/мл) все пять типов наночастиц индуцировали экспрессию различных цитокинов, но оказывали лишь слабое провоспалительное действие. В диапазоне размеров 60-600 нм ни размер, ни форма не были выявлены как значимые параметры, влияющие на биологические эффекты частиц диоксида кремния в клетках при субтоксических концентрациях.

В ходе экспериментов *in vivo* наночастицы диоксида кремния вводили непосредственно в легочную ткань (Rabolli, 2014), интратрахеально (Grossgarten, 2018, Wang, 2017), интраназально (Ko, 2018, 2020, Park, 2015) и внутривенно (Yukina, 2020).Анализ бронхо-альвеолярной жидкости после введения частиц $ASiO_2$ диаметром 1600 и 12 нм в легочную ткань мышей в дозе 2,5 мг/мышь показал повышение уровней цитокинов IL-1α и IL-1β (Rabolli, 2014). Интратрахеальное введение частиц диоксида кремния диаметром 5-15 нм вызывало воспаление дыхательных путей и повышение секреции респира-

торного мукуса (Ko, 2018). Внутривенное введение частиц $ASiO_2$ диаметром 12 нм в концентрации 2 мг/мл и объеме 1 мл крысам Вистар привело к дистрофии соединительной ткани интерстиция дыхательных путей (Yukina, 2020).

1.2.2. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на нервную систему

Центральная нервная система (ЦНС) особенно восприимчива к окислительному стрессу, вызванному АФК (Zhou, 2016). Малые размеры наночастиц диоксида кремния часто позволяют частицам проходить через гемато-энцефалический барьер (Xue, 2013) или достигать ЦНС через эпителий носа (Izak-Nau, 2014). Эффекты частиц диоксида кремния диаметром 50 нм были изучены *in vitro* на различных типах нейронов, нервных стволовых клетках, астроцитах и клетках микроглии (Izak-Nau, 2014). Было продемонстрировано, что, хотя наночастицы прочно прилипают к поверхности клеток, внутриклеточная интернализация зависит от типа нервной клетки. Нервные стволовые клетки и астроциты поглощали частицы, в то время как в нейроны частицы диоксида кремния не проникали. Ким и др. показали, что 20-нм частицы диоксида кремния вызывали фрагментацию ДНК в клетках глиобластомы человека U373MG посредством активации каспазы-3 и последующего апоптоза (Kim, 2014).

Рыбки Данио, геном которых был полностью секвенирован и близок по гомологии к геному человека, были использованы для изучения токсичности наночастиц $ASiO_2$ *in vivo* (Pham, 2016). Частицы диоксида кремния индуцировали зависящее от концентрации увеличение нейротоксичности, смертности и пороков развития у рыбок Данио, причем 15-нм частицы проявляли большую нейротоксичность, чем 50-нм частицы (Xue, 2013). Выдерживание икры рыбок Данио в суспензии частиц диоксида кремния диаметром 20, 50 и 80 нм в концентрации 200 мг/л показало, что частицы не вызывают значительных нарушений в развитии мальков, однако воздействуют на нервную систему, угнетая фотомоторную реакцию рыбок (Pham, 2016). Это может говорить о недоразвитии нейронов заднего мозга в период инкубации икры с частицами. Воздействие наночастиц диоксида кремния диаметром 62 нм в концентрациях 6 и 12 г/л подавляло регуляцию генов, связанных с нервной функцией (Gabrd, Chrna3 и Npy8br), указывая на то, что наночастицы диоксида кремния индуцируют нейротоксичность, влияя на сигнальный путь нейроактивного взаимодействия лиганд–рецептор (Wei, 2020).

К нейротоксичности также относят и влияние изучаемого вещества на органы зрения. В первичных эпителиальных клетках роговицы человека (hCECs) 30- и 40-нм наночастицы диоксида кремния повреждали клеточную мембрану, снижали жизнеспособность клеток и вызывали нарушение работы митохондрий (Sun, 2018), приводя к сильному повреждению роговицы *in vivo*. Однако в другом исследовании 50-, 100- и 150-нм частицы диоксида кремния не показали значительной цитотоксичности в hCECs после инкубации в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл (Park, 2016). Для частиц мезопористого диоксида кремния диаметром 15 мкм с порами 10 нм, была показана низкая токсичность для тканей глаза. Авторы данного исследования показали, что эти частицы достаточно безопасны для использования в качестве систем внутриглазной доставки лекарств как в эндотелиальные клетки пупочной вены человека, так и в глаз кролика *in vivo* путем введения в стекловидное тело (Sun, 2020).

1.2.3. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на пищеварительную систему

Токсичность частиц $ASiO_2$ для печени была изучена *in vitro* с использованием различных клеточных линий. В клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 15-нм частицы диоксида кремния индуцировали генерацию АФК, снижение уровня глутатиона (Chatterjee, 2018), окислительный стресс и апоптоз, связанный с активацией p53, Bax/Bcl-2 и каспазы-3 (Ahmad, 2012). Токсичность 20-нм частиц диоксида кремния в нормальных клетках печени человека (HL-7702) и нормальных клетках печени крысы BRL-3A была связана с теми же тремя путями активации апоптоза (p53, Bax/Bcl-2 и каспаза-3) и опосредована окислительным стрессом (Zuo, 2016). Исследования на клетках Купфера (Liu, 2012), которые являются резидентными макрофагами в печени, показали повреждение клеток после инкубации с частицами диоксида кремния диаметром 30-50 нм в концентрации 600-800 мкг/мл, вызванное окислительным стрессом в результате высвобождения биоактивных веществ, таких как фактор некроза опухоли-α и NO (Sun, 2013). В клетках печени человека L02 60-нм наночастицы диоксида кремния в концентрациях 25 и 50 мкг/мл увеличивали высвобождение воспалительных цитокинов (IL1β, IL6, IL8 и TNF-α) через TLR5-сигнальный путь (Duan, 2018). Было обнаружено, что одновременная инкубация клеток с раствором наночастиц диоксида кремния и раствором кадмия повышает токсичность, вызываемую кадмием в клетках

HepG2, способствуя поглощению Cd клетками из-за сильной адсорбции Cd на поверхностях частиц (Ahamed, 2020).

Токсичность частиц диоксида кремния *in vivo* оценивали с использованием различных путей введения, основными из которых являются пероральный (Chatterjee, 2018, Azouz, 2021) и внутрибрюшинный (Nemmar, 2016, Mahmoud, 2019). Было обнаружено, что частицы почти любого диаметра вызывают патологические изменения печени у экспериментальных животных, которые могут быть выражены фиброзом (Park, 2020); повышенным уровнем интерлейкина-1 (Nemmar, 2016), АФК, NO (Mahmoud, 2019), аспартатаминотрансферазы (Azouz, 2021) в ткани печени; перекисным окислением липидов; повышением уровня холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови (Duan, 2018).

Эпителий желудочно-кишечного тракта представляет собой селективный барьер (Guo, 2018), который позволяет необходимым питательным веществам и электролитам поступать в кровоток. Перорально вводимые частицы диоксида кремния могут перемещаться из желудочно-кишечного тракта в кровь и накапливаться в печени и селезенке (Gehrke, 2012). Эпителиальные клетки кишечника человека HT-29 и клетки аденокарциномы толстой кишки человека Caco-2 являются типичными клетками, используемыми для моделирования влияния изучаемых веществ на желудочно-кишечный тракт *in vitro*.

В клетках HT-29 100-нм частицы диоксида кремния в концентрациях 10, 50 и 150 мкг/мл проявляли дозозависимую цитотоксичность и генотоксичность. Данные эффекты были связаны с вмешательством в сигнальные пути MAPK/ERK1/2 и Nrf2/ARE (Gehrke, 2012). В другой работе инкубация клеток Caco-2 и эпителиальных клеток желудка человека GES-1 с частицами диоксида кремния диаметром 200 и 400 нм в концентрации 100 мкг/мл вызвала только остановку клеточного цикла и ингибирование роста, однако частицы не вызывали апоптоза или некроза (Yang, 2014). В работах, исследующих влияние 100-нм частиц диоксида кремния на клетки линии Caco-2, не было показано их цитотоксичности в дозах 50 мкг/мл и 128 мкг/мл (Hempt, 2020, Murugadoss, 2020).

Модель, состоящая из культуры Caco-2 и мукус-продуцирующих клеток человека HT29-MTX, предназначенная для имитации эпителия желудочно-кишечного тракта (Lozoya-Agullo, 2017), использовалась для изучения острой и

хронической токсичности наночастиц диоксида кремния диаметром 30 нм в высоких концентрациях (1-30 мг/мл). Наночастицы приводили к повышению активности щелочной фосфатазы кишечника, снижению барьерной функции кишечного эпителия, нарушению актинового цитоскелета клеток с последующими изменениям в плотных контактах (*zonula occludens*) эпителия кишечника (Cornu, 2020).

Для оценки токсичности частиц *in vivo* в желудочно-кишечном тракте суспензию частиц чаще всего вводят перорально (Yu, 2021) или внутривенно, (Liu, 2013). Deng et al. изучали непрерывное внутрижелудочное введение 70-нм пористых частиц диоксида кремния мышам в течение 2 недель и наблюдали повышение уровней фактора некроза опухоли-α в сыворотке наряду со значительной инфильтрацией лейкоцитов в слизистых оболочках кишечника. Гистопатологические срезы показали повреждение кишечника, включающее ингибирование экспрессии белков аутофагии (LC3-II и Beclin1) наряду с воздействием на различные метаболические пути, включая метаболизм пиримидина и пуриновый метаболизм (Deng, 2021). Однако Cabellos и соавт. обнаружили, что кратковременное пероральное введение (5 дней подряд) 200-нм частиц диоксида кремния в дозе 100 мг/кг не приводило к патологическим изменениям в организме мыши (Cabellos, 2020).

Ученые под руководством Ogawa создали модель колита у мышей с использованием декстрансульфата натрия. Мышам с колитом перорально вводились растворы 10- и 30-нм частиц диоксида кремния в дозе 3 мг/кг/день в течение 12 недель. Авторами было показано, что сами по себе наночастицы диоксида кремния не вызывали патологических изменений в тканях кишечника, однако усугубляли воспаление кишечника у мышей с колитом, активируя формирование инфламмасом NLRP3 (Ogawa, 2021).

1.2.4. Обзор токсического влияния частиц диоксида кремния на кровеносную систему

Кровеносная система включает в себя кровеносные сосуды, лимфатическую систему и сердечный аппарат. Частицы, которые попадают в организм человека различными путями введения, неизбежно попадают в систему кровообращения и распределяются по различным органам. Для изучения токсичности частиц диоксида кремния *in vitro* используются различные линии эндотелиальных клеток человека. Много работ проведено на эндотелиальных

клетках пупочной вены человека HUVECs. Обработка HUVECs 310-нм частицами диоксида кремния приводила к зависящему от концентрации снижению активности митохондрий и нарушению целостности митохондриальных мембран (Blechinger, 2013), в то время как 60-нм частицы в концентрации 500 и 100 мкг/мл индуцировали цитотоксичность (Guo, 2015) через окислительный стресс, приводя к митохондриальной дисфункции, окислительно-восстановительному дисбалансу и перекисному окислению липидов через активацию митоген-активируемой протеинкиназы и Nrf2 (Guo, 2016). Также было обнаружено, что частицы диоксида кремния увеличивают количество белков LC3 и p62, что приводит к аутофагии, (Guo, 2016 2018, Wang, 2018). Согласно методу ДНК-комет (comet assay) в HUVECs 10-нм частицы диоксида кремния вызывали более серьезные повреждения ДНК, чем 25-, 50- и 100-нм частицы диоксида кремния (Zhou, 2019).

Исследования на эндотелиальных клетках аорты человека (HAEC) показали, что частицы диоксида кремния диаметром 100 нм проявляют цитотоксичность, индуцируя образование ядерных включений и белковых агрегатов внутри клеток (Hadipour, 2019). В кардиомиоцитах крысы H9c2 60-нм частицы диоксида кремния проявляли токсичность в концентрациях 100 и 200 мкг/мл, связанную с окислительным стрессом и митохондриальным путем апоптоза (Cui, 2020). Исследователи группы под руководством Lozano извлекли сердце крысы и, после установления спонтанного сокращения *in vitro*, перфузировали его 3-нм N-SiNPs в концентрации 93 мкг/мл в течение 30 мин. Исследованные частицы влияли на функцию сердца, повышая проницаемость мембран митохондрий (Lozano, 2020).

In vivo наночастицы диоксида кремния малого диаметра могут проходить через альвеолярно-капиллярный барьер в системный кровоток при инратрахеальном введении (Du, 2013). При введении таким образом 30-, 60- и 90-нм частицы диоксида кремния крысам приводили к повышению в крови уровней цитокинов наряду с заметным повышением уровней молекулы адгезии клеток сосудов-l и молекулы межклеточной адгезии-l, тем самым вызывая эндотелиальную дисфункцию (Du, 2013). При интратрахеальном введении частиц диоксида кремния в концентрации 25 мкг/мл иногда отмечается воспаление и сократительная дисфункция миокарда (Feng, 2020), а в дозе 10 мг/кг – апоптоз кардиомиоцитов митохондриальным путем (Du, 2018). При внутри-

венном введении частиц диоксида кремния было обнаружено снижение уровня белков p-Erk1/2 и p-p38 MAPK (Duan, 2017) и индукция аутофагической активности в эндотелиальных клетках и перицитах с последующим ингибированием ангиогенеза (Duan, 2014). Напротив, Chan et al. обнаружили, что однократное внутривенное введение частиц диоксида кремния диаметром 148 нм в дозах 1, 2, 5, 10, 100, 200 и 300 мг/кг не оказывало какого-либо определенного токсического эффекта на мышей (Chan, 2017). Mendez et al. вводили мышам 500-нм частицы диоксида кремния в дозах 10 и 20 мг/кг.Анализ морфологии сердца не показал острой или хронической токсичности спустя 10 недель после введения (Mendez, 2017).

1.3. Применение частиц на основе аморфного диоксида кремния в биологии и медицине

1.3.1. Применение частиц ASiO2 для доставки лекарств и терапии

Благодаря своим гидрофильным свойствам, частицы диоксида кремния могут быть использованы для создания аэрозоля на водной основе (Li, 2015) для введения лекарств путем ингаляции. В модели воспаления дыхательных путей мыши (Gulin-Sarfraz, 2019) частицы диоксида кремния диаметром 200 и 1000 нм были нагружены дексаметазоном и для этих частиц была показана возможность эффективной доставки дексаметазона путем ингаляции. Van et al. разработали функционализированные авидином пористые частицы диоксида кремния диаметром 106 нм в качестве универсальных биосовместимых носителей лекарств и показали их эффективность на мышах линии BALB/c (van Rijt, 2016).

Fischer и соавторы разработали наноструктурированную цилиндрическую систему доставки лекарств, состоящую из пористого диоксида кремния, загруженного отрицательно заряженной РНК-олигонуклеотидоми куркумином (Fischer, 2021). Эта система обеспечивала транспортировку этих слаборастворимых веществ к альвеолярным макрофагам для последующего подавления воспаления. Для лечения острого респираторного воспаления, вызванного митохондриальной дисфункцией, Wang et al. разработали пористые частицы диоксида кремния диаметром 55 нм, нагруженные селеном. Антиоксидантные свойства этих частиц вызывали снижение уровней АФК в легочной ткани (Wang, 2020).

Частицы диоксида кремния диаметром 109 нм были загружены фолиевой кислотой и мирицетином, что позволило использовать эти частицы для

лечения немелкоклеточной карциномы легкого (Song, 2020). Противораковые препараты доксорубицин и циклоспорин были упакованы в фотолюминесцентные мезопористые частицы диоксида кремния. Данные частицы были успешно использованы для доставки лекарств в клетки аденокарциномы альвеолярного эпителия человека A549 и клетки фибробластов легких человека HEL-299 (Chen, 2019).

Самой большой проблемой для лекарств, предназначенных для терапии нервной системы, является преодоление гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Только липофильные молекулы с низкой массой могут пересекать ГЭБ (Song, 2017). Именно поэтому особенно полезно то, что размеры частиц диоксида кремния можно легко регулировать, а их поверхность – модифицировать. Mo и др. (Mo, 2016) подтвердили, что уменьшение размера частиц диоксида кремния является эффективной стратегией для получения транспортеров, которые могут пересекать ГЭБ. Bouchoucha и соавт. (Bouchoucha, 2017) синтезировали пористые частицы диоксида кремния диаметром 50 нм, конъюгированные с антителом к рецептору трансферрина Ri7 с полиэтиленгликолевым (PEG) линкером, в то время как Song и соавт. (Song, 2017) сообщили о модифицированных PEG частицах диаметром 25 нм, присоединенных к лактоферрину.

Глиобластома является наиболее распространенным типом злокачественного рака головного мозга. Для обеспечения таргетности противоопухолевого препарата, Shen и соавт. изготовили мезопористые частицы диоксида кремния диаметром 200 нм, покрытые полимолочной кислотой и конъюгированные с рецептором липопротеинов низкой плотности. При загрузке ресвератролом частицы эффективно пересекали гематоэнцефалический барьер, смоделированный культурами эндотелиальных клеток мозга крысы RBECs и клеток микроглии крысы HAPI (Shen, 2018).

Недавно были синтезированы комбинированные наночастицы на основе диоксида кремния, покрытые слоем липидов, и сочетающие в себе преимущества липосом и наночастиц. Zhu и соавт. конъюгировали LRP-специфичный лиганд angiopep-2 на липидное покрытие кремниевых частиц, что повысило биосовместимость полученного конструкта по сравнению с его составными частями (Zhu, 2021). В другом исследовании подобные частицы диоксида кремния диаметром 80 нм нагрузили берберином и показали эффективность его транспортировки частицами через ГЭБ мышей.

Частицы диоксида кремния применялись и для пероральной доставки препаратов. Частицы размером более 7 нм накапливаются главным образом в печени. Клетки печени могут удалять инородные тела путем частичного или полного ферментативного разложения или выведения с желчью. На данный момент большинством авторов частицы диоксида кремния диаметром 10-100 нм признаны безопасными носителями для пероральной доставки лекарств (Tüncel, 2021). Полые частицы диоксида кремния были предложены как модель для лечения жировой болезни печени. Боран аммиака, инкапсулированный в эти частицы, высвобождался в желудке при снижении pH, косвенно снижал содержание жира в гепатоцитах и влиял на метаболизм липидов в печени (Jin, 2021).

Частицы кремния также можно использовать для терапии гепатокарциномы. Zhang и соавт. сконструировали частицы диоксида кремния, покрытые полиамидоамин-аптамером, для двойного контролируемого высвобождения плазмиды (CRISPR/Cas9) и лекарственного средства (сорафениб), что привело к одновременному запуску процессов редактирования генов и ингибирования роста опухоли (Zhang, 2020). Доставщики на основе диоксида кремния могут преодолевать многочисленные желудочно-кишечные барьеры и препятствия, включая значительные изменения pH и слой слизистой оболочки (Wang, 2018), и высвобождать лекарства в фиксированной точке.

Многие желудочно-кишечные заболевания сосредоточены в кишечнике и включают колит, кишечные микробные нарушения и рак толстой кишки, поэтому важно доставить препарат до кишечника неповрежденным. Чтобы уменьшить высвобождение лекарств в кислой среде желудка, Juere et al. (Juère, 2020) конъюгировали реагирующий на pH белок, β-лактоглобулин, с поверхностью кремниевых частиц. Gao и соавт. модифицировали частицы диоксида кремния дезоксихолевой кислотой и покрыли поверхность сульфобетаином 12, предотвращая попадание частиц в лизосомы и увеличивая всасывание лекарственного средства во всех сегментах кишечника (Gao, 2021).

При лечении ишемии и воспаления миокарда частицы диоксида кремния способны повышать биодоступность загруженного в них куркумина и способствовать достижению кардиопротекторного эффекта (Yadav, 2019). Farooq и соавт. разработали покрытые титаном пористые частицы диоксида кремния, загруженные нитропруссидом натрия для доставки лекарств, и отметили увеличение проникновения нитропруссида натрия в сосуды (Farooq, 2018).

1.3.2. Применение частиц ASiO2 для биовизуализации и диагностики

Функционализированные флуоресцентные частицы диоксида кремния достаточно широко изучены. Как говорилось выше в главе 1.1., оптическая прозрачность диоксида кремния позволяет включить в состав частиц любую люминесцентную/магнитную/рентгеноконтрастную метку без искажения свойств включаемой метки. К примеру, частицы диоксида кремния диаметром 50 нм как с ковалентно связанным, так и с физически встроенным в состав матрицы кремния родамином 101 были успешно использованы для визуализации клеток опухоли шейки матки HeLa. При этом у авторов данной работы успешно получилось дополнительно функционализировать поверхность этих частиц фолиевой кислотой (Prieto-Montero, 2020).

Были разработаны чувствительные к АФК частицы диоксида кремния, содержащие комплекс гадолиния (Gd)-DOTA, благодаря которому данные частицы проявляли усиленный сигнал на МРТ (Dening, 2016). Однако, поскольку контрастные вещества на основе Gd могут быть токсичными, в качестве замены изучался оксид железа (Fe@FeOx), который также был успешно включен в состав кремниевой матрицы (Mathieu, 2019).

В ультразвуковой диагностике были применены газонаполненные железосодержащие частицы диоксида кремния диаметром 500 нм, меченые $^{111}In^{3+}$, поверхность которых была покрыта β-циклодекстрином. При внутриопухолевом введении полученные частицы позволяли четко визуализировать границы опухоли (Liberman, 2013). Для магнитного контрастирования были получены частицы диоксида кремния, включающие в свой состав атомы Gd^{3+}. Эти частицы были способны улучшать контрастность МРТ (He, 2020). Аналогичным образом, Tsou с соавторами включил два лантанидных металла (Eu^{3+} с функцией флуоресцентной визуализации и Gd^{3+} с функцией магнитной визуализации) в матрицу диоксида кремния и получил частицы, которые могут быть детектированы различными методами (Tsou, 2021).

Для визуализации бактерий были использованы частицы диоксида кремния, меченые метиленовым синим и функционализированные глюкозой M-SNP, которые продемонстрировали сильную и долгоживущую флуоресценцию (Kirla, 2020).

1.4. Галогенидные октаэдрические кластерные комплексы молибдена

Октаэдрические галогенидные кластерные комплексы молибдена с общей формулой [{Mo_6X_8}L_6] (X – Cl, Br или I; L – органический или неорганический внешний лиганд) в общем случае представляют собой октаэдр из атомов молибдена, вписанный в куб из атомов галогена таким образом, что каждый атом галогена находится над треугольной гранью октаэдра (Sheldon, 1962).

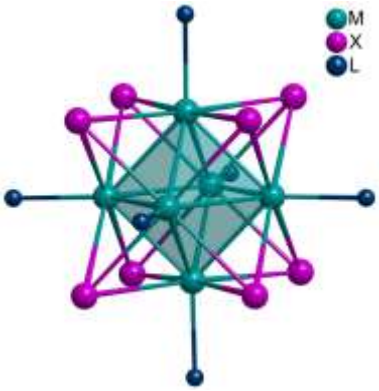

Рис. 1. Строение кластерного комплекса [{M_6X_8}L_6]^n. (X – внутренний лиганд, Cl, Br или I; L – органический или неорганический внешний лиганд).

Такая система, а именно {Mo_6X_8}$^{4+}$, получила название кластерного ядра и является основой данных соединений. Каждый атом молибдена дополнительно координирован шестью терминальными или "внешними" лигандами, которые могут быть как органической, так и неорганической природы. Внешние лиганды вносят огромный вклад в свойства кластерных комплексов, а относительная легкость их замещения позволяет достаточно свободно получать или усиливать требуемые характеристики. Кластерные комплексы известны благодаря большому количеству интересных для практики свойств, например, выдающимся люминесцентным характеристикам, высокой рентгеновской контрастности за счет наличия большого количества атомов тяжелых элементов, способностью к генерации синглетного кислорода и т.д.

Одно из основных свойств, которое проявляют галогенидные кластерные комплексы молибдена – это яркая люминесценция в видимой и ближней инфракрасной областях спектра (550-1000 нм) при возбуждении светом с длиной волны 250-500 нм с временами жизни до нескольких сотен микросекунд, что позволяет относить их к фосфоресцентным люминофорам. Квантовый выход люминесценции иногда достигает почти 80%. Кластерные комплексы характе-

ризуются достаточно широким спектром эмиссии. Долгое время химия кластерных соединений с ядром $\{Mo_6I_8\}^{4+}$ была в тени, потому что для исходных кластерных соединений $[\{Mo_6X_8\}X_6]^{2-}$, где X = Cl, Br или I показатели люминесценции падают при переходе вниз по группе галогенов. Однако, при замещении галогенидных лигандов, зачастую максимальные показатели люминесценции наблюдаются у кластерных комплексов молибдена именно с ядром $\{Mo_6I_8\}^{4+}$. Люминесцентные характеристики кластерных комплексов изучены достаточно полно и на сегодняшний день выявлено большое количество закономерностей. О механизме люминесценции говорить сложно ввиду наличия многоядерной системы, но исследователи сходятся во мнении, что основной вклад в люминесценцию вносит именно кластерное ядро (Vorotnikova, 2019).

Еще одно свойство, которым обладают октаэдрические кластерные комплексы молибдена – это их способность к генерации активных форм кислорода при возбуждении светом. Эта особенность позволяет выделять октаэдрические кластерные комплексы не только как потенциальных агентов для люминесценции, но и как фотосенсибилизаторов. При использовании кластерных комплексов молибдена в фотодинамической терапии была показана их противоопухолевая эффективность (Brandhonneur, 2018, Brandhonneur, 2020, Dollo, 2020), антибактериальный (Vorotnikova, 2019) и противовирусный эффекты (Rojas-Mancilla, 2017).

Локально сконцентрированные атомы тяжелого металла позволяют октаэдрическим кластерным комплексам молибдена поглощать рентгеновские лучи. Это свойство открывает еще одну потенциальную область применения данных веществ – в роли рентгеноконтрастных диагностических препаратов. Для кластерных комплексов молибдена и рения были получены многообещающие результаты при их введении в сосудистое русло животных (Krasilnikova, 2015, 2017). Тем не менее, работы по использованию кластерных комплексов молибдена в области рентгеноконтрастной диагностики на данный момент единичны, и данный аспект их применения остается практически неизученным.

Несмотря на очевидные перспективы применения кластерных комплексов молибдена в различных областях биологии и медицины, они также обладают рядом недостатков и ограничений. Большинство кластерных комплексов молибдена обладают низкой гидролитической устойчивостью, в особенности при контакте с воздухом, что значительно ограничивает возможности их

использования в чистом виде (Riehl, 2016). Для преодоления этих препятствий в данной работе кластерные комплексы молибдена были включены в состав частиц диоксида кремния. Предполагается, что полученные таким образом частицы будут сочетать в себе люминесцентные, рентгеноконтрастные и фотоактивные свойства кластерного комплекса молибдена, сохраняя при этом стабильность, растворимость и способность к модификации кремниевой матрицы.

1.5. Частицы диоксида кремния, включающие в состав кластерные комплексы

Впервые частицы на основе аморфного диоксида кремния и кластерных комплексов были получены в 2008, с кластерным комплексом молибдена состава $Cs_2[\{Mo_6X_8\}X_6]$ (X = Cl, Br или I). Для данных частиц было показано сочетание свойств кластерного комплекса (люминесценция) и аморфного диоксида кремния (гидрофильность) (Grasset, 2008, 2009). Способы получения подобных материалов включают метод Штобера и микроэмульсионный метод. Оба подхода основаны на гидролизе алкоксисиланов, чаще всего тетраэтоксисилана (ТЭОС) – $Si(OEt)_4$. Методом Штобера проще всего получать частицы с диаметром выше 100 нм. Он заключается в аммиачном гидролизе тетраэтоксисилана в смеси воды и этанола. В случае включения в матрицу получаемых частиц каких-либо допантов, их добавляют непосредственно в смесь растворителей вместе с ТЭОС. В микроэмульсионном методе используемый растворитель не смешивается с водой, а в качестве каркаса для получаемых частиц используется поверхностно-активное вещество (ПАВ). ТЭОС после гидролиза включается в мицеллы, образованные ПАВ. В зависимости от выбора ПАВ и соотношения компонентов синтеза можно регулировать размер получаемых частиц.

Биологические свойства частиц, включающих в свой состав октаэдрические кластерные комплексы, начали изучаться с 2013 года. В работе Aubert частицы диоксида кремния диаметром 45 нм допировались кластерным комплексом $Cs_2[\{Mo_6Br_8\}Br_6]$ (Aubert, 2013). Токсичность частиц была исследована на клеточных линиях карциномы толстого кишечника человека Caco-2 и легочных фибробластов человека MRC-5. Авторами работы была отмечена низкая токсичность полученных ими веществ. В более поздних работах были изучены частицы диоксида кремния, обладающие более яркой люми-

несценцией за счет включения в состав другого кластерного комплекса - $Cs_2[\{Mo_6I_8\}(C_2F_5COO)_6]$ (Pellen-Mussi, 2018). Полученные в данной работе частицы также были изучены на нескольких клеточных линиях – клетках рака легкого человека A549 и мышиных фибробластах L929. Кроме того, изучение проводилось как на 2D, так и на 3D клеточных моделях. В данной работе также была показана низкая цитотоксичность частиц диоксида кремния, допированных кластерным комплексом молибдена – в максимальной исследованной концентрации 100 мкг/мл жизнеспособность клеток всё еще составляла 80-90%.

Частицы диоксида кремния, допированные кластерным комплексом молибдена, которые изучаются в данной работе, обладают диаметром 500±33 нм (микрочастицы) и 50±2 нм (наночастицы). Механизм присоединения кластерного комплекса молибдена к матрице диоксида кремния может происходить двумя способами:

1. Образованием водородных связей с группами -Si-OH. Поскольку октаэдрические комплексы молибдена нестабильны в водной среде, в процессе синтеза частиц происходит гидролиз комплекса $[\{Mo_6X_8\}X_6]$, что приводит к замещению всех внешних лигандов X на OH^- и H_2O, с образованием осадков, которые описываются общей формулой $[\{Mo_6X_8\}(H_2O)_2(OH)_4]\cdot zH_2O$. Эти аква-гидроксокомплексы способны к образованию водородных связей с диоксидом кремния.

2. Образованием ковалентных связей Si-O-Mo. Данный способ включения комплексов был ранее описан в литературе (Aubert, 2013) и происходит в результате замещения внешних лигандов комплекса на группы $-Si-O^-$.

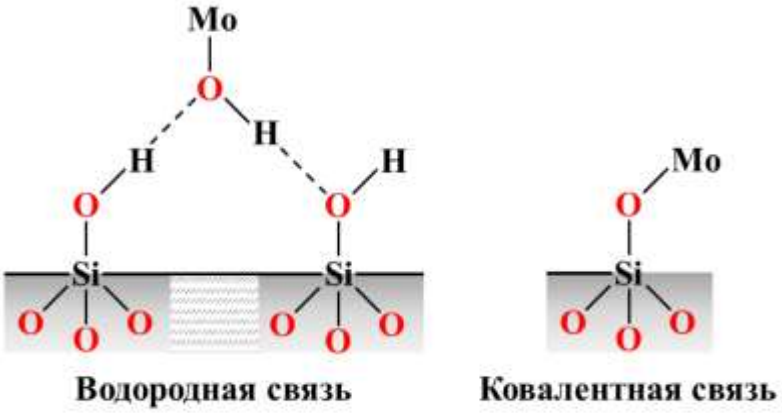

Рис. 2. Возможные механизмы включения кластерного комплекса молибдена в матрицу диоксида кремния.

Таким образом, анализ имеющейся современной литературы позволяет заключить, что наноразмерные частицы аморфного диоксида кремния являются популярным объектом исследований. Однако, микрочастицам кремния, как и зависимости биологических эффектов частиц от их диаметра, на данный момент уделяется очень мало внимания. Кроме того, несмотря на возможную высокую практическую значимость, включение кластерных комплексов тяжелых металлов в состав матрицы кремниевых частиц практически не проводилось. Эксперименты, проведенные в ходе данной работы, нацелены на изучение эффектов частиц диоксида кремния, допированных кластерным комплексом молибдена, в клеточной культуре, а также определить влияние размера частиц на эти эффекты. В связи с этим была определена цель и сформулированы задачи данного исследования.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Ведение культуры клеток

В работе использовались клеточные линии Hep-2 и MRC-5, полученные из банка клеточных лийик ФГУН ГНЦ «Вектор». Клетки линии MRC-5 (коллекционный шифр «Вектор» 112) – это фибробласты легкого эмбриона человека. В данной работе использовались пассажи фибробластов в диапазоне от 45 до 50. Линия клеток Hep-2 (коллекционный шифр «Вектор» 128) представляет собой карциному гортани, дериват линии клеток HeLa.

Клетки выращивали в среде Eagle MEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 200 мМ L-глютамина, 20 мкг/мл гентамицина в CO_2 инкубаторе при 37°С. Плотность посадки составляла (0,5-1)x10^6 клеток в 1 мл, кратность рассева 1:3, клетки пересевали каждые 3 – 4 сут. Для пересева культур клеток в качестве диспергента применяли 0,25%-ный раствор трипсина (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) и 0,02%-ный раствор версена (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в соотношении 1:2.

2.2. Получение кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$

Смесь $Na_2[Mo_6I_8(OMe)_6]$ (200 мг, 110 мкмоль) и 2-[2-(2- метокси-этокси)этокси]уксусной кислоты (118 мг, 660 мкмоль) в 5 мл абсолютного этанола нагревали в течение 18 ч при 80 °С. После охлаждения добавляли 40 мл диэтилового эфира и полученный осадок растворяли в 5 мл дихлорметана и фильтровали. Затем к полученному раствору добавляли 40 мл диэтилового эфира и полученный осадок дважды промывали 40 мл диэтилового эфира с получением 268 мг оранжевого порошка после сушки при пониженном давлении.

2.3. Получение кластерного комплекса молибдена $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$

$(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$ 300 мг (0,122 ммоль) растворяли в 3 мл DMSO, помещали в стеклянную ампулу, запаивали и выдерживали при 100°С в течение 48 ч. Далее раствор прикапывали к ацетону (150 мл) при интенсивном перемешивании, оранжевый осадок отделяли от раствора путём центрифугирования (6000 g в течение 3 минут), промывали ацетоном несколько раз. Полученный порошок сушили на воздухе при комнатной температуре. Выход составил 274 мг (97 %).

2.4. Исследование люминесценции кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$

Люминесцентные свойства были изучены на спектрометре Fluorolog 3, оснащенном охлаждаемым модулем детектирования фотонов TBX-05-C (Horiba Jobin Yvon) и фотоумножителем Hamamatsu H10330-45. Измерение проводили как в бескислородной среде, так и в насыщенных кислородом водных растворах с концентрацией, при которой поглощение на длине волны возбуждения (400 нм) было ниже 0,1. Этот же прибор использовали для измерения времени жизни люминесценции с использованием возбуждения на длине волны 390 нм (SpectraLED-390, Horiba Scientific). Кривые затухания были аппроксимированы экспоненциальными функциями с помощью программного обеспечения DAS6 (v. 6.8, Horiba Jobin Yvon). Абсолютные квантовые выходы фотолюминесценции измеряли на спектрометре Quantaurus QY C11347-1 (Hamamatsu).

2.5. Исследование размеров агрегатов частиц в растворе кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$

Распределение агрегатов частиц комплекса по размерам и соответствующие дзета-потенциалы определяли методом динамического рассеяния света (DLS) с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) для кластера, растворенного в фосфатном буфере. Кластер находился в растворе 4 ч, 1 день и 3 дня, на каждой из временных точек проводилось измерение размера частиц в растворе.

2.6. Исследование изменения спектра эмиссии раствора комплекса молибдена $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$

Абсолютный квантовый выход, время жизни люминесценции, профили спектров эмиссии и возбуждения, определяли с помощью спектрофлуориметра Fluoromax-4, оснащенного дуговой Xe-лампой мощностью 150 Вт, фотоумножителем R928P, интегрирующей сферой Quanta-φ и монохроматорами возбуждения и эмиссии с двойной решеткой. Порошкообразный образец комплекса 1 помещали в нелюминесцентные кварцевые кюветы. Для измерения люминесценции в водном растворе поглощение устанавливали на уровне <0,1 при длине волны возбуждения (355 нм).

2.7. Исследование токсичности кластерного комплекса $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})этокси]ацетата)_6]$ на клетках линий MRC-5 и Hep-2

Клетки Hep-2 и MRC-5 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку, инкубировали в течение 24 ч при 37ºС в увлажненной атмосфере, содержащей 5% двуокиси углерода (стандартные условия). Далее к клеткам добавляли раствор кластерного комплекса молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})этокси]ацетата)_6]$ в диапазоне концентраций от 0,016 до 8 мМ, двойные разведения и культивировали клетки в течение 48 ч при стандартных условиях. В качестве контроля использовались клетки Hep-2 и MRC-5 с питательной средой без добавления растворов кластерного комплекса. Затем в каждую лунку добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ-реагент) в конечной концентрации 250 мкг/мл, инкубировали клетки в течение 4 ч, далее среду отбирали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO). После растворения кристаллов формазана (через 5 – 10 мин) определяли значения оптической плотности субстрата в лунках с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific) при длине волны 492 нм. Процент жизнеспособных опухолевых клеток вычислялся по формуле: (оптическая плотность раствора опыта/оптическая плотность раствора контроля) х 100%.

2.8. Исследование токсичности кластерного комплекса $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ на клетках Hep-2

Клетки Hep-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку, инкубировали в течение 24 ч при 37ºС в увлажненной атмосфере, содержащей 5% двуокиси углерода (стандартные условия). Далее к клеткам добавляли растворы свежего и выдержанного в течение 4 сут кластерного комплекса молибдена $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ в широком диапазоне концентраций (от 0,003 до 1,29 мМ, двойные разведения) и совместно культивировали в течение 2, 5, 10 и 24 часов при стандартных условиях культивирования. В качестве контроля использовались лунки с клетками Hep-2 с питательной средой без добавления растворов кластерного комплекса. По окончании инкубации жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста по методике, описанной выше.

2.9. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности кластерного комплекса $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$ на клетках линии Hep-2

Клетки Hep-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку, и инкубировали в течение 24 часов в стандартных условиях. После этого питательная среда в лунках была заменена на свежую, содержащую кластерный комплекс $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетата})_6]$ в концентрации 0,08 мМ. Клетки совместно инкубировались с растворами в течение 1, 4, 8 и 24 ч, после чего проводилось облучение клеток галогеновой лампой мощностью 500 Вт ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 30 мин, с общей полученной дозой облучения 20 Дж/см^2. В качестве контроля использовались клетки, инкубированные с исследуемыми веществами в тех же условиях, но не подвергшиеся облучению, а также клетки, инкубировавшиеся в чистой культуральной среде. После облучения выживаемость клеток измерялась с помощью МТТ-теста по методике, описанной выше.

2.10. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности кластерного комплекса $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ на клетках линии Hep-2

Клетки Hep-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку, и инкубировали в течение 24 часов в стандартных условиях. После этого среду в лунках заменяли на свежую, содержащую свежий и выдержанный кластерный комплекс $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ в концентрации от 0,02 до 0,08 мМ для свежего раствора и от 0,02 до 0,65 мМ для выдержанного раствора. Клетки совместно инкубировались с комплексом в течение 10 и 24 ч, после чего проводилось облучение клеток галогеновой лампой мощностью 500 Вт ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 30 мин, с общей полученной дозой облучения 20 Дж/см^2. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные с исследуемыми веществами в тех же условиях, но не подвергшиеся облучению, а также клетки, инкубировавшиеся в чистой культуральной среде. После облучения выживаемость клеток измерялась с помощью МТТ-теста по методике, описанной выше.

2.11. Синтез частиц аморфного диоксида кремния с кластерным комплексом молибдена $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$ в составе

К 6 мл раствора ацетона, содержащего 1,35 мг кластерного комплекса $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$, добавили 0,5 мл тетраэтилортосиликата, 0,75 мл воды и

0,5 мл 25%-го раствора аммиака были добавлены в пробирку. Растворы закрыли и оставили на 12 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Полученный в результате осадок желтого цвета отцентрифугировали при 7000 g 10 мин, промыли 5 раз ацетоном и 5 раз дистиллированной водой, и высушили при температуре 60°С. Частицы, не помеченные кластерным комплексом, получали по той же методике, но без добавления кластерного комплекса.

Для получения наноразмерных частиц использовали ту же методику, заменив ацетон на гептан с добавлением поверхностно-активного вещества brijL4. Определение диаметра полученных частиц было сделано с использованием электронного микроскопа Libra 120 (Zeiss, Германия). Средний размер полученных частиц составил 50±2 и 500±33 нм. По данной методике были получены микрочастицы, содержащие различные доли кластерного комплекса. Частицы $\{Mo_6I_8\}^{0,001}@SiO_2$ включали1 мг, а частицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ – 10 мг кластерного комплекса на 1 г кремния.

Форму и размер полученных частиц оценивали с помощтью трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 3).

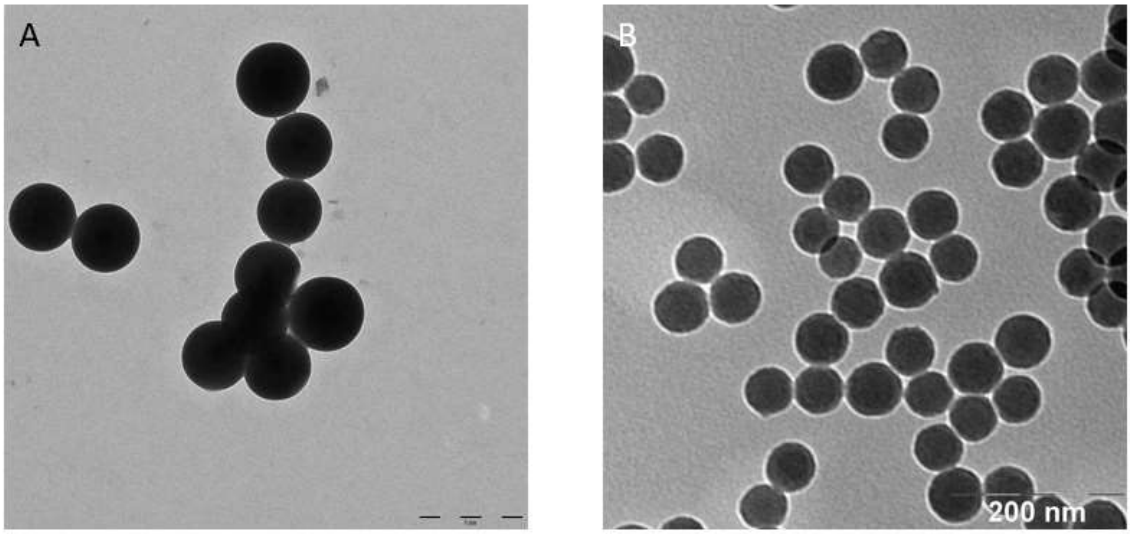

Рис. 3. Микрочастицы (А) и наночастицы (В), допированные кластерным комплексом молибдена $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$.

2.12. Функционализация поверхности полученных микрочастиц группами 3-глицидилоксипропилатриметоксилана

50 мг сухого порошка микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ диспергировали в 2,5 мл гексана на ультразвуковой установке в течение 30 мин. К полученному раствору были добавлены 7,5 мкл Et_3N и 0,05 мл 3-глицидилоксипропила-

триметоксилана. Получившаяся в результате смесь нагревалась при температуре 55°С в течение 3,5 часов при медленном помешивании. Полученные функционализированные микрочастицы были отцентрифугированы на 7000 g в течение 10 минут, 5 раз промыты гексаном, 5 раз промыты ацетоном и высушены в стандартных условиях.

2.13. Конъюгация функционализированных микрочастиц диоксида кремния с GFP

10 мг микрочастиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$, функционализированных глицидильными группами, дважды промыли 5 мл 0,1 М раствора NaCl и ресуспендировали в 1 мл фосфатного буфера при pH = 10. 30 мкл GFP в концентрации 10 мг/млбыли добавлены к суспензии микрочастиц и медленно перемешивались в течении 24 ч. Полученная суспензия была промыта в 5 мл 0,1 М раствора NaCl и ресуспендирована в 2 мл раствора Тритона с дистиллированной водой (соотношение Тритона к воде 0,014 мл на 20 мл). Итоговая концентрация полученного конъюгата составила 10 мг/мл. Для микрочастиц, не функционализированных глицидильными группами, была повторена эта же методика конъюгации.

Оценка растворов полученных микрочастиц проводилась с помощью проточного цитометра Cytoflex. Для активации кластерного комплекса использовалась длина волны 375 нм, для активации GFP – длина волны 488 нм. Для детекции микрочастиц с молибденом использовался фильтр 690/50 нм, для детекции GFP –530/25 нм.

2.14. Исследование цитотоксичности нано- и микрочастиц с помощью МТТ-теста

Цитотоксичность исследуемых соединений оценивали с помощью МТТ-теста, позволяющего выявить количество жизнеспособных клеток по изменению оптической плотности раствора.

Клетки Hep-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку, инкубировали в течение 24 часов при 37ºС в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 (стандартные условия). Далее в планшеты вносили растворы синтезированных нано- и микрочастиц с различным соотношением кластерного комплекса молибдена – от 1% до 0,05%. в широком диапазоне концентраций (от 0,01 мг/мл до 1,5 мг/мл,

двойные разведения) и совместно культивировали в течение 48 ч при стандартных условиях культивирования. В качестве контроля использовали клетки Hep-2, инкубированные в отсутствие частиц. По окончании инкубации жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста по методике, описанной выше.

2.15. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности микро- и наночастиц диоксида кремния, допированных кластерным комплексом молибдена

Клетки Hep-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку и инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. После этого питательная среда в лунках была заменена на свежую, содержащую частицы $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ в диапазоне концентраций от 0,018 до 0,15 мг/мл. Клетки совместно инкубировали с растворами в течение 24 ч, после чего проводили облучение клеток галогеновой лампой мощностью 500 Вт ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 30 мин, с общей полученной дозой облучения 20 Дж/см^2. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные с исследуемыми веществами в тех же условиях, но не подвергшиеся облучению, а также клетки, инкубировавшиеся в чистой культуральной среде. После облучения выживаемость клеток измеряли с помощью МТТ-теста по методике, описанной выше.

Для наночастиц также была проведена дополнительная оценка фотоиндуцированной токсичности по методике двойного окрашивания. Облученные клетки окрашивали Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин при 37°C и PI (от англ. Propidiumiodide, Пропидиум иодид) (Sigma-Aldrich) в течение 10 мин при 37°C. Для автоматической флуоресцентной визуализации клеток использовали IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) с увеличением ×100. Полученные изображения были использованы для анализа живых, апоптотических и мертвых клеток среди всей популяции с использованием программного обеспечения IN Cell Investigator (GE Healthcare, UK).

2.16. Исследование кинетики накопления полученных соединений *in vitro* с использованием проточной цитометрии

Клетки Hep-2 были рассажены в 6-луночные планшеты в количестве 1×10^6 клеток/лунку. После этого к клеткам были добавлены растворы

микрочастиц и наночастиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ до концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировались с добавленными растворами частиц в течение 15 мин, 30 мин, 2 ч, 4 ч, 8 и 16 ч, после чего клетки были промыты и сняты с культурального планшета с помощью трипсина. Суспензия клеток центрифугировалась на 1000 g в течение 3 мин. С клеток убирали супернатант, а полученный осадок ресуспендировался в 300 мкл фосфатного буфера с 10% сыворотки. Полученную суспензию клеток исследовали с использованием проточного цитометра Cytoflex. Для детекции интенсивности люминесценции проникших в клетку частиц использовался фильтр 690/50 нм.

2.17. Исследование кинетики выведения полученных соединений из клеток с использованием проточной цитометрии

Клетки Hep-2 были рассажены в 6-луночные планшеты в количестве 1×10^6 клеток/лунку. После этого к клеткам были добавлены растворы микрочастиц и наночастиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ до концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировали с добавленными растворами частиц в течение 24 ч, после чего клетки промывали каждый час, а культуральная среда в клетках заменялась на чистую, не содержащую частиц. Клетки продолжали инкубировать таким образом в течение 15 мин, 30 мин, 2 ч, 4 ч, 8, 16 и 24 ч, после чего трижды промывали фосфатным буфером, чтобы удалить все не проникшие в клетки и выведенные из клеток частицы из раствора. Затем клетки были сняты трипсином, и проанализированы по методике, описанной в разделе 2.16.

2.18. Изучение проникновения в клетки микрочастиц с помощью флуоресцентной микроскопии

Клетки Hep-2 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности посадки 7 тысяч клеток/лунку, инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. После этого к клеткам были добавлены растворы микрочастиц без GFP ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$) до концентрации 0,1 мг/мл, микрочастиц с GFP ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$-GFP) до концентрации 0,02 мг/мл и раствор GFP в среде EMEM до концентрации 20 мкг/мл. Данные концентрации были выбраны, поскольку в предварительном исследовании цитотоксичности растворов они были показаны безопасными для клеток. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в чистой питательной среде.

Клетки инкубировали с растворами исследуемых веществ в течение 16 ч, а затем среда, содержащая растворы веществ, была удалена, клетки были трижды промыты раствором фосфатного буфера и зафиксированы 4% раствором параформальдегида. Ядра клеток были прокрашены раствором голубого флуоресцентного красителя Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific), цитоскелет был прокрашен желтым красителем AlexaFluor™ 532 Phalloidin (Sigma-Aldrich). Данные красители были подобраны таким образом, чтобы не пересекаться по области флуоресценции ни с GFP, ни с микрочастицами, мечеными кластерным комплексом. Окрашенные клетки изучались на приборе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США), спектры возбуждения и эмиссии для частиц ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$), красителя Hoechst 33342, красителя Phalloidin и белка GFP были 375/700, 375/488, 531/554 и 488/530 нм, соответственно.

2.19. Изучение внутриклеточной локализации наночастиц с помощью конфокальной микроскопии

Клетки Hep-2 рассевали на стерильные стекла диаметром 5 мм, положенные на дно 48-луночного планшета, при плотности посадки 10^4 клеток/лунку. После 24 ч инкубации к клеткам был добавлен раствор наночастиц ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$) в концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировались с раствором частиц в течение 16 часов, а затем среда, содержащая частицы, была удалена, клетки были трижды промыты раствором фосфатного буфера и зафиксированы 4% раствором параформальдегида. Ядра клеток были прокрашены раствором голубого флуоресцентного красителя Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific), цитоскелет был прокрашен желтым красителем AlexaFluor™ 532 Phalloidin (Sigma-Aldrich). Зафиксированные стекла снимались на лазерный сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 NLO в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦИГ СО РАН. Спектры возбуждения и эмиссии для частиц ({Mo6I8}0.01@SiO2), красителя Hoechst 33342, красителя Phalloidin и белка GFP были 375/700, 375/488, 531/554 и 488/530 нм, соответственно.

2.20. Исследование проникновения частиц в клетки Hep-2 *in vitro* при помощи просвечивающей электронной микроскопии

Клетки культуры Hep-2 высевали на культуральные матрасы площадью 25 $см^2$ при плотности посадки 70 тыс. кл./мл в 10 мл среды и инкубировали в

течение 24 ч. По истечении этого времени среду заменяли на новую, содержащую раствор микрочастиц или наночастиц ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$) в концентрации 0,1 мг/мл, в которой клетки инкубировали еще 24 ч. В качестве контроля использовались клетки Hep-2, инкубированные в чистой среде.

Далее работу проводили согласно протоколу пробоподготовки клеточных культур к исследованию на ПЭМ (Schrand A.M., 2010). По окончании инкубации культуру клеток снимали с помощью трипсина (1 мл на культуральный матрас), который инактивировали 2 мл среды с 10% сыворотки, переносили в пластиковые капсулы (BEEM) объемом 1 мл таким образом, чтобы в каждой капсуле оказывалось примерно по 1×10^6 клеток и центрифугировали (1000 g, 5 мин). Полученные осадки фиксировали раствором 2,5% глутаральдегида в течение 2 ч. Фиксированные осадки трижды промывали фосфатным буфером (PBS) (pH = 7,4) по 10 мин и дополнительно фиксировали 1% раствором OsO_4 в течение 1 ч. Затем осадки промывали PBS 5 раз по 10 мин и дистиллированной водой 2 раза по 10 мин. Затем последовательно проводили по спиртам восходящей концентрации (50, 70, 90 и 100%) по 5 – 15 мин в каждом (в 70% спирте образцы находились в течение ночи). Далее образцы помещали в ацетон на 15 мин, после чего осадки на 3 ч оставляли в пропиточной смеси (смесь ацетона с заливочной смесью, состоящей из эпоксидных смол, в соотношении 1:1).

Для приготовления заливочной смеси смешивали 3 мл Araldite M (Fluka, Швейцария), 5 мл Epon 812 (Fluka, Швейцария) и 11 мл DDSA (Fluka, Швейцария). Далее образцы помещали в заливочную смесь с добавлением катализатора (DMP 30 (Fluka, Швейцария), 100 мкл на 5 мл смолы). Для полимеризации образцы выдерживали 3 ч при 30°C, 3 ч при 42°C и 2 сут при 60°C. На ультрамикротоме Leica EM UC7 с использованием стеклянного ножа были сделаны ультратонкие срезы толщиной 70 нм. После этого образцы с микрочастицами были контрастированы уранилацетатом и цитратом свинца. Образцы с наночастицами не контрастировались, поскольку использование элементного картирования не допускает высокого контрастирования срезов. Ультратонкие срезы изучали при помощи ПЭМ Libra 120 (Zeiss, Германия) на напряжении 120 кВ, документировали при помощи цифровой камеры и программного обеспечения iTEM версия 5.2 (Jeol, Япония).

Элементный анализ проводили при помощи омега-фильтра и специального программного обеспечения по методике трех окон, описанных в

литературе (Brydson 2001). Для микрочастиц был проведен подсчет клеток, содержащих частицы в различных клеточных структурах. Общее количество подсчитанных клеток составило 166 штук.

2.21. Определение уровня генерации активных форм кислорода в клетках после инкубации с наночастицами $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ и облучения

Клетки Hep-2 были рассажены в 6-луночные планшеты в количестве 1×10^6 клеток/мл. После этого к клеткам были добавлены растворы кластер-содержащих наночастиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ в концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировались с частицами в стандартных условиях в течение 24 ч. В качестве положительного контроля в данном эксперименте использовались клетки, инкубированные с раствором радахлорина в концентрации 0,0025 мг/мл и 100 мкМ раствор перекиси водорода.

В качестве отрицательного контроля выступали клетки, инкубированные в чистой питательной среде. Все группы клеток были поделены на клетки, которые облучались галогенной лампой мощностью 500 ВТ ($\lambda\geq400$ нм) в течение 30 мин и клетки, которые держали в темноте. Перед облучением к клеткам был добавлен краситель 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (Sigma-Aldrich) в концентрации 10 μМ в HEPES-буфере с последующей инкубацией в темноте в течение 30 минут. Затем были получены изображения клеток с помощью клеточного сканера IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) на увеличении 200x. Интенсивность зеленой флуоресценции клеток была подсчитана с использованием INCell Investigator software (GEHealthcare, UK).

2.22. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием U-критерия Манна-Уитни, порог статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Для обсчета данных использовалась программа Statistica 10 Enterprise, StatSoft.

Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ РАЗНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, ДОПИРОВАННЫХ КЛАСТЕРНЫМ КОМПЛЕКСОМ МОЛИБДЕНА, НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование раствора кластерных комплексов молибдена

3.1.1. Исследование биологических эффектов кластерного комплекса молибдена с карбоксилированными внешним лигандами

Кластерные комплексы на основе молибдена способны к яркой люминесценции в красном и ближнем ИК диапазонах спектра (550-1000 нм) при возбуждении светом с длиной волны 250-500 нм со значениями времен жизни до нескольких сотен микросекунд и квантовым выходом люминесценции до 80%. Кроме того, при возбуждении светом они способны к генерации синглетного кислорода, что позволяет использовать их не только в качестве люминесцентных агентов, но и в качестве фотосенсибилизаторов. Одним из основных препятствий в изучении биологических эффектов кластерных комплексов молибдена является их низкая стабильность в водной среде. В данной работе был получен кластерный комплекс $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$ (1), включающий функциональные группы окиси этилена в свои внешние лиганды (см. рис 4). Ранее было показано, что модификация веществ подобными молекулами увеличивает их растворимость (Turecek, 2016), поэтому подобная структура кластерного комплекса молибдена могла бы повысить его стабильность в растворе.

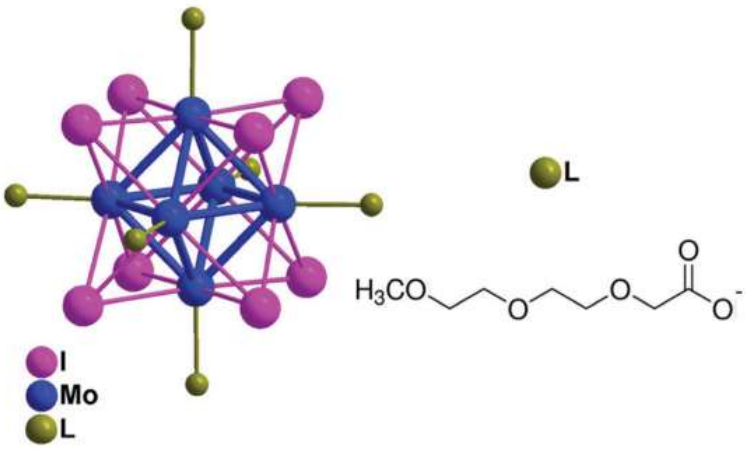

Рис 4. Кластерный комплекс $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$, L- внешний лиганд.

3.1.1.1. Люминесценция и оценка стабильности кластерного комплекса (1) в фосфатном буфере.

Для того, чтобы оценить способность комплекса (1) к генерации синглетного кислорода в водной среде, было проведено сравнение люминесцентных свойств раствора кластерного комплекса (1) в фосфатном буфере, насыщенном аргоном, и обычном, кислородсодержащем фосфатном буфере. Как можно видеть на рисунке 5А, кластерный комплекс (1) в бескислородной среде (I) демонстрирует значительно более высокую интенсивность люминесценции в сравнении с кластерным комплексом (1) после его контакта с кислородом (II), что подтверждает тушение люминесценции за счет образования $^1O_2$.

Большинство комплексов молибдена склонны к гидролизу в присутствии воды путем замещения апикальных лигандов на OH^- или H_2O с образованием соответствующих слабо растворимых аква/гидроксокомплексов. Этот процесс влияет на фотофизические и биологические свойства комплексов, и его кинетика может сильно различаться в зависимости от природы апикальных лигандов. Чтобы оценить эти эффекты, мы проследили изменение люминесцентных свойств комплекса (1) в растворе PBS в течение 3 дней. Старение растворов комплекса (1) в PBS приводило к красному смещению максимума люминесценции до 715 нм (рис. 5В), что обычно наблюдается при гидролизе данных комплексов.

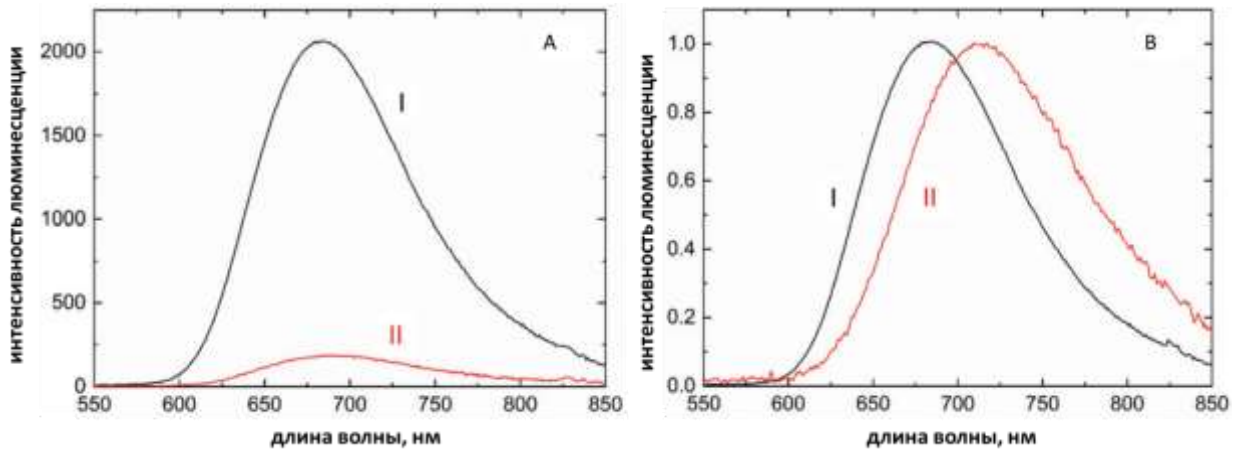

Рис. 5. А. Интенсивность люминесценции кластерного комплекса (1) в PBS, насыщенном аргоном (I) и PBS, содержащем кислород (II). В. Свежий раствор кластерного комплекса 1(I) и раствор, выдержанный в течение 3 дней (II).

Помимо интенсивности люминесценции, методом светового рассеяния также был определен размер частиц кластера (1), растворенного в фосфатном буфере. Кластер находился в растворе 4 ч, 1 день и 3 дня, на каждой из временных точек проводилось измерение размера частиц в растворе. В свежем растворе средний размер частиц составляет 3,3 нм, что соответствует размеру мономера кластерного комплекса (1). На рисунке 6 показано, что уже через 4 ч нахождения кластерного комплекса (1) в растворе размер конгломератов увеличивается и, спустя сутки, составляет 230 нм, а к третьим суткам достигает 980 нм.

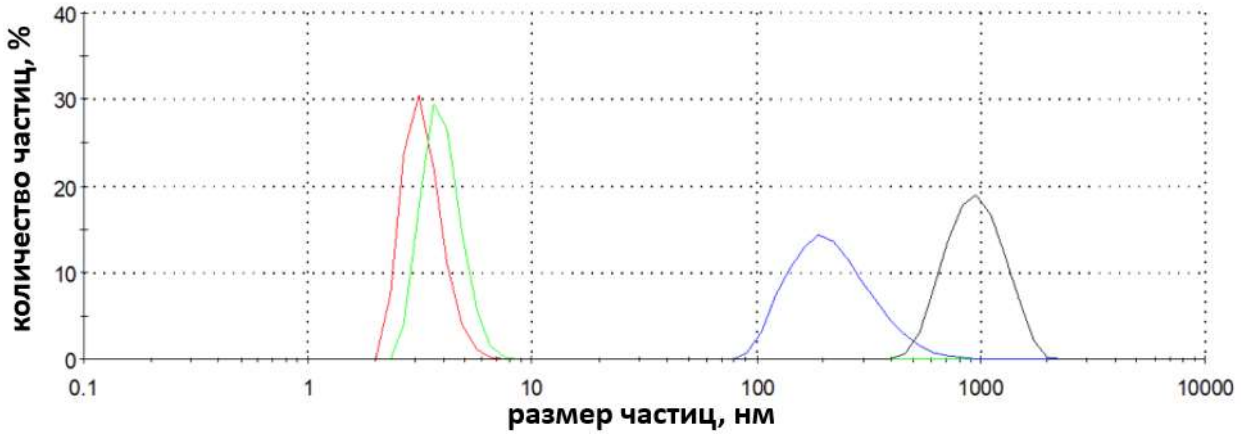

Рис. 6. Изменение размера частиц кластерного комплекса (1) в растворе PBS, красный – свежий раствор, зеленый – раствор спустя 4 часа после разведения, синий – раствор спустя 24 ч после разведения, черный – раствор спустя 3 дня после разведения.

Как снижение интенсивности люминесценции, так и образование агломератов кластерного комплекса (1) в растворе свидетельствует о гидролизе комплекса в водной среде с образованием частиц слабо растворимых аква-гидрокосо комплексов.

3.1.1.2. Исследование токсичности кластерного комплекса (1) на клетках линий MRC-5 и Hep-2.

Токсичность кластерного комплекса (1) изучали на клетках фибробластов человека MRC-5 и клетках рака гортани человека Hep-2. Раствор кластерного комплекса (1) был добавлен к клеткам в концентрациях от 0,016 до 8 мМ, и после инкубации в течение 72 часов проводилась оценка токсичности кластерного комплекса с помощью МТТ-теста (рис. 7). Полученные значения IC50 для Hep-2 составили 0,36 ± 0,06 мМ, а для MRC-5 0,42 ± 0,06 мМ. Тем не менее, поскольку ошибка МТТ-теста может достигать 10%, точек с достоверными отличиями между токсичностью на фибробластах и токсичностью на

опухолевых клетках обнаружено не было. Поскольку дальнейшие эксперименты были направлены на исследование противоопухолевой активности кластерного комплекса, в них использованы опухолевые клетки Hep-2.

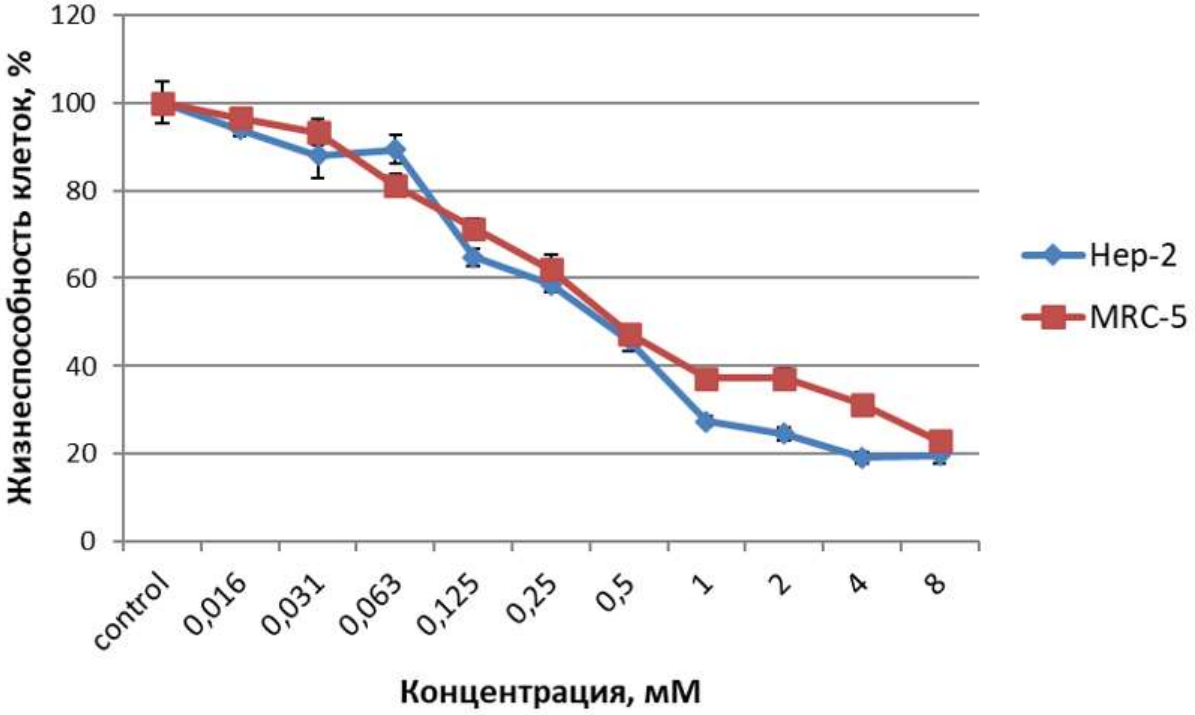

Рис. 7. Цитотоксичность кластерного комплекса (1) на клетках линий MRC-5 и Hep-2. Измерение проводили в 2 различных экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

3.1.1.3. Исследование фотоиндуцированной токсичности кластерного комплекса (1) на клетках линии Hep-2.

Было проведено исследование фотоиндуцированной токсичности кластерного комплекса (1) после облучения лампой в течение получаса. Клетки Hep-2 инкубировали с раствором кластерного комплекса в концентрации 0,08 мМ в течение 1, 4, 8 и 24 ч, после чего проводили облучение клеток и оценка их жизнеспособности с помощью МТТ-теста. Данная концентрация была выбрана, поскольку она является максимальной нетоксичной концентрацией для кластера (1). Небольшой фототоксический эффект был достигнут спустя 4 и 8 ч инкубации, однако ниже 70% жизнеспособность клеток не опустилась. Вероятнее всего, для более высокой концентрации кластерного комплекса (1) эффект облучения был бы ощутимее, однако высокая темновая токсичность данного вещества не позволяет использование концентрации выше 0,08 мМ.

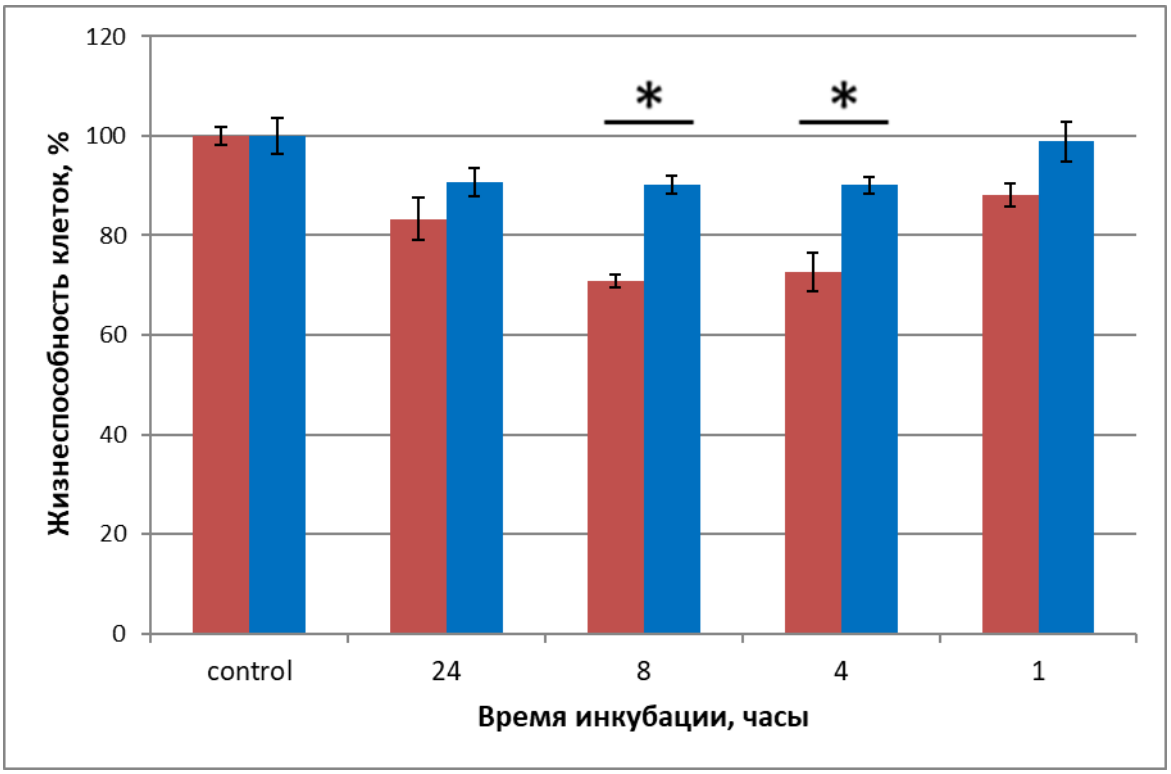

Рис 8. Фотоиндуцированная токсичность кластерного комплекса (1) в концентрации 0,08 мМ на клетках линии Hep-2. Голубым цветом показана жизнеспособность клеток в отсутствие облучения, красным – после облучения.

Для комплекса (1) была показана незначительная способность к фотоиндуцированной цитотоксичности (рис. 8), однако высокая токсичность данного вещества для клеток значительно ограничивает возможности и эффективность его применения. Кроме того, крайне низкая стабильность данного вещества в водной среде также может влиять на его биологические эффекты.

3.1.2. Исследование биологических эффектов кластерного комплекса молибдена с диметилсульфоксидными внешним лигандами

Поскольку предыдущая попытка стабилизации кластерного комплекса молибдена была неудачной, внешний лиганд кластерного комплекса был заменен на группу DMSO, в результате чего был получен кластерный комплекс 2 с общей формулой $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ (см. рис. 9).

Поскольку данный комплекс водорастворим, это вызвало надежду на его более высокую стабильность в водных растворах. Для наибольшего приближения к условиям биологического эксперимента, была изучена стабильность раствора кластерного комплекса (2) в культуральной питательной среде. Кроме того, были изучены биологические эффекты как для свежеприготов-

ленного раствора, так и для раствора, выдержанного в течение 4 дней. Такой подход позволил оценить, влияет ли гидролиз кластерного комплекса (2) на его биологические эффекты.

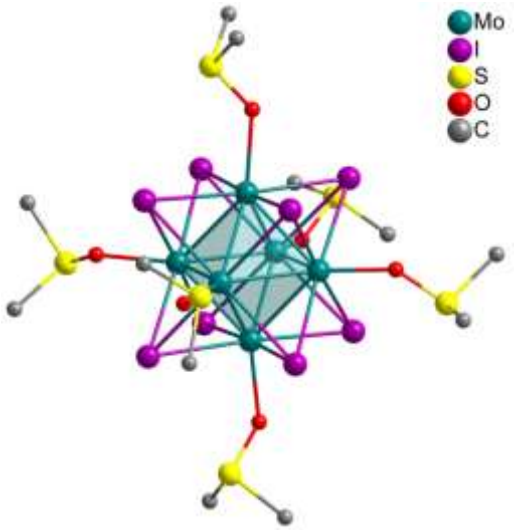

Рис 9. Строение кластерного катиона $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6]^{4+}$.

3.1.2.1. Исследование спектра эмиссии кластерного комплекса (2) при инкубации в питательной среде

Для оценки стабильности кластерного комплекса (2) данный раствор выдержали в питательной среде без индикатора, записывая спектр эмиссии кластера в растворе в течение суток.

Как видно на рис 10, в культуральной среде наблюдается уменьшение интенсивности люминесценции кластера наряду с батохромным сдвигом максимума эмиссии с 645 до 705 нм. Такое поведение соответствует постепенному гидролизу комплекса. Элементный анализ методом энергодисперсионной спектроскопии (ЭДС) осадка комплекса из питательной среды подтвердил сохранение кластерного ядра (Mo:I = 6:8.1) и показал отсутствие серы, фосфора, хлора, углерода или азота Это свидетельствует о полной замене лигандов DMSO, но при этом атомы молибдена в ядре кластера не связываются с различными органическими соединениями, содержащимися в культуральной среде, и не образуются нерастворимые соли кластера с неорганическими ионами.

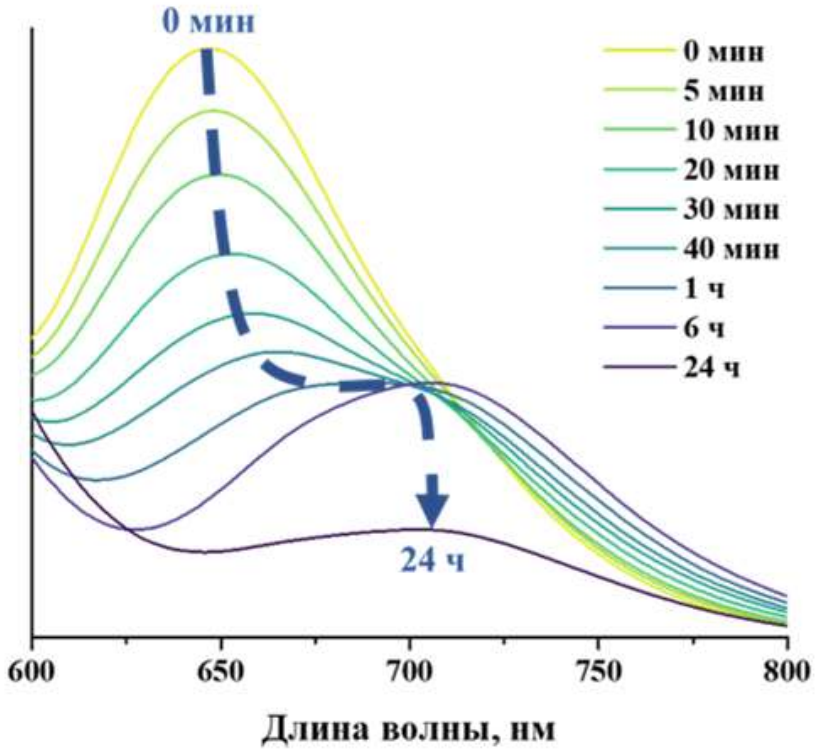

Рис 10. Динамика изменения спектра эмиссии раствора комплекса (2) в питательной среде в течение суток.

Таким образом, ЭДС дополнительно подтверждает протекание гидролиза комплекса в культуральной среде. Можно заключить, что полной стабильности модификация кластера группами DMSO не дает. Для более глубокого понимания того, влияет ли гидролиз кластерного комплекса на его биологические эффекты, были проведены сравнительные исследования свежеприготовленного и выдержанного в водном растворе в течение 4 сут кластерного комплекса (2).

3.1.2.2. Изучение цитотоксичности свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Hep-2

Клетки линии Hep-2 были проинкубированы с выдержанным в течение 4 сут и свежим растворами кластерного комплекса (2) (рис. 11). Выдержанный кластер, являющийся более гидролизованным, проявляет более низкую токсичность на клетках, тогда как свежий кластерный комплекс (2) обладает значительно более высокой цитотоксичностью (см. табл. 1).

По-видимому, токсичность свежего раствора кластерного комплекса (2) обусловлена именно нахождением исходного комплекса в негидролизованной форме в виде мономера, в то время как гидролиз комплекса и его осаждение в виде агломератов снижает токсический эффект кластера на клетки.

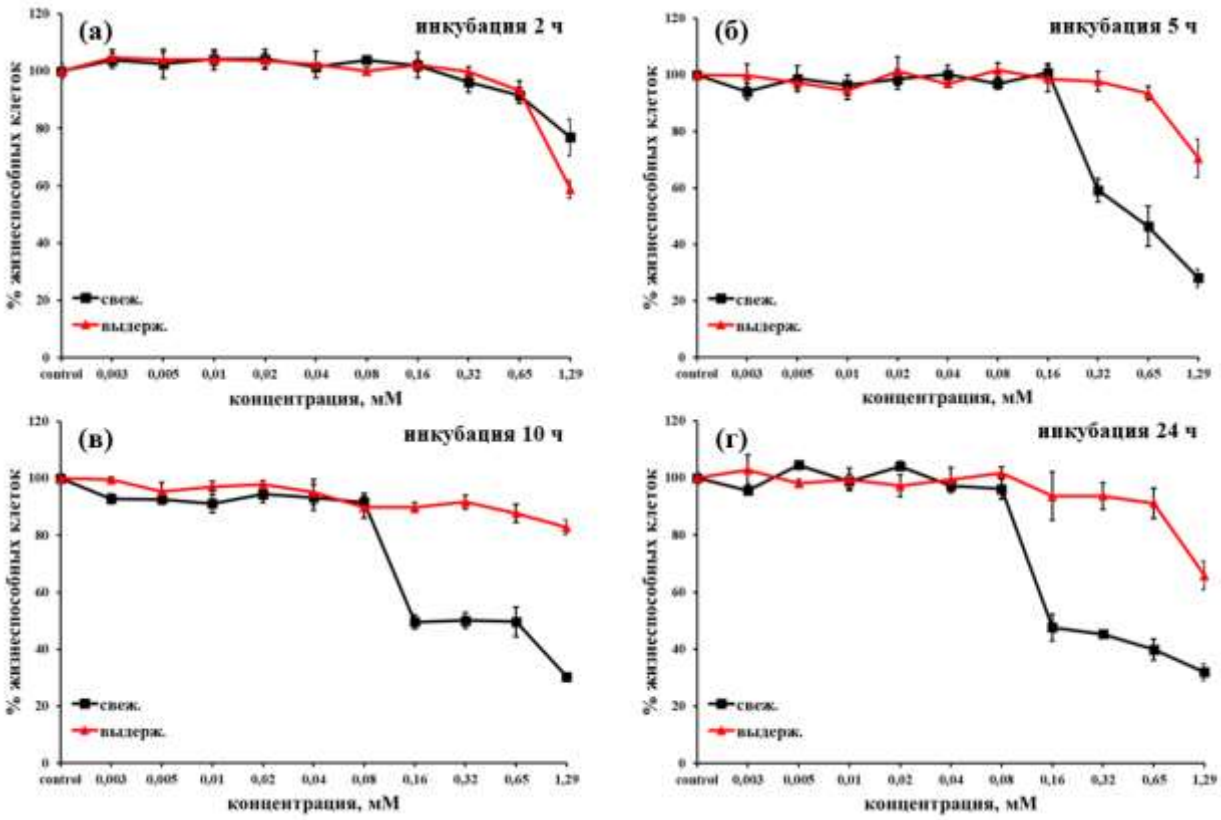

Рис 11. Изучение жизнеспособности клеток линии Hep-2 после инкубации со свежим (черный) и выдержанным в течение 4 сут (красный) кластерным комплексом (2). Время инкубации веществ с клетками составляло 2 ч (а), 5 ч (б), 10 ч (в) и 24 ч (г). Измерение проводили в 2 независимых экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

Таблица 1. Полуингибирующие концентрации свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Hep-2 при различном времени инкубации

Образец/время инкубации	**IC_{50}, мМ**			
	2 ч	**5 ч**	**10 ч**	**24 ч**
Свеж.	>1,29	0,47±0,04	0,20±0,01	0,19±0,02
Выдерж.	>1,29	>1,29	>1,29	>1,29

3.1.2.3. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Hep-2

Поскольку выдержанный кластерный комплекс обладает более низкой токсичностью, его фототоксичность была изучена в более широком диапазоне концентраций – от 0,02 до 0,65 мМ, тогда как для свежего кластерного комплекса (2) максимальная нетоксичная концентрация составила 0,08 мМ, как и

для комплекса (1). Фотоиндуцированная токсичность была изучена как для свежего, так и для выдержанного кластерного комплекса (2) после инкубации с клетками Hep-2 в течение 10 и 24 часов.

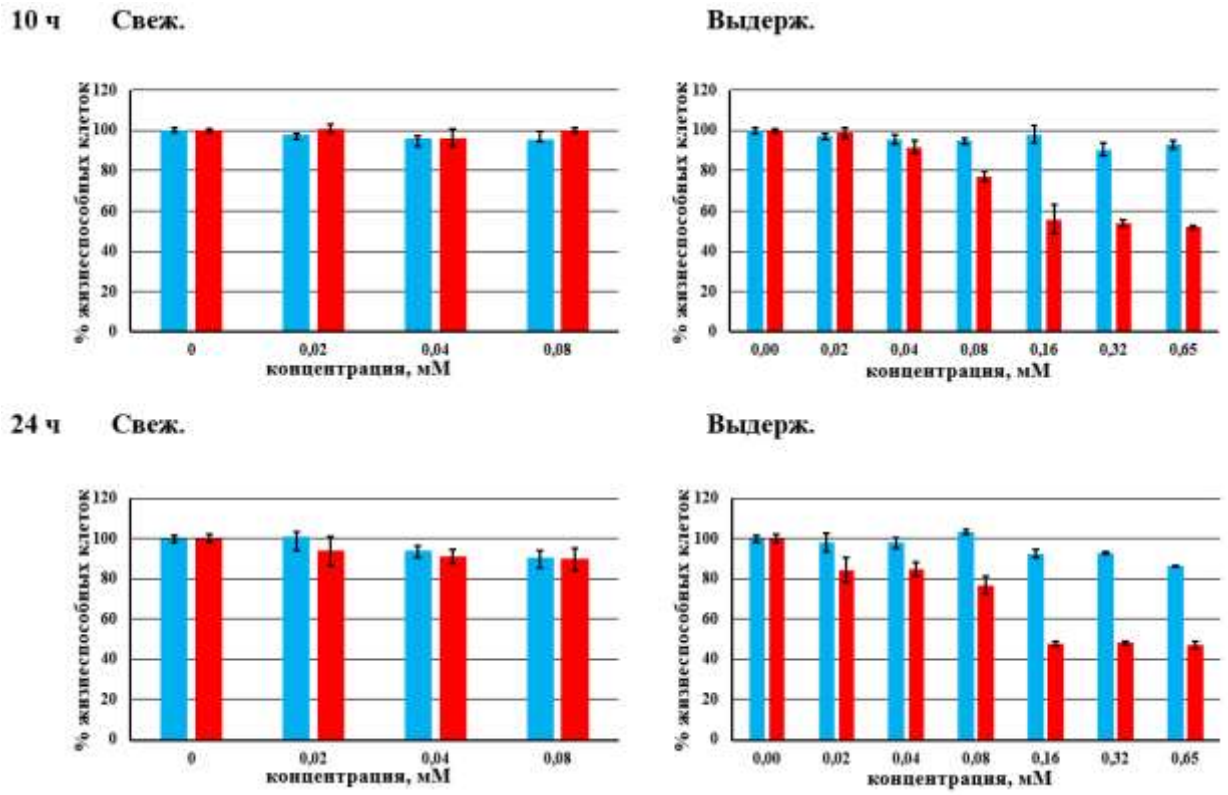

Рис 12. Фотоиндуцированная токсичность свежего и выдержанного кластерного комплекса (2) на клетках линии Hep-2. Голубым цветом показана жизнеспособность клеток в отсутствие облучения, красным – после облучения. Измерение проводили в 2 различных экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

Выдержанный кластерный комплекс показал умеренную фотоиндуцированную токсичность со снижением жизнеспособности клеток до 47-50% (рис. 12). Свежеприготовленный раствор не проявил фотоиндуцированной токсичности в исследованном диапазоне концентраций.

Несмотря на то, что кластерный комплекс 2 показал более высокую фотоактивность по сравнению с комплексом 1, изучение данного кластерного комплекса в чистом виде всё еще представляет проблему. Гидролизованные формы данного комплекса образуют плотный осадок на клетках, не позволяющий изучить накопление вещества в клетках или его локализацию в них. Перспектива использования настолько малостабильного соединения на животной модели также достаточно сомнительная. Таким образом, стабилизация

кластерного комплекса молибдена путем изменения его внешних лигандов не показала должной эффективности. В дальнейшей работе кластерный комплекс молибдена (2) был стабилизирован путем включения его в стабильную матрицу диоксида кремния с последующим получением частиц диаметром 50±2 и 500±33 нм.

3.2. Оценка зависимости биологических эффектов частиц от их диаметра и массовой доли кластерного комплекса молибдена в их составе

3.2.1. Сравнение цитотоксичности частиц диаметром 50±2 и 500±33 нм, содержащих различные концентрации кластера молибдена.

Для того чтобы понять, влияет ли концентрация кластерного комплекса молибдена в составе матрицы диоксида кремния на токсические свойства микрочастиц, были синтезированы микрочастицы одинакового диаметра – 500±33 нм, но включающие в себя различные количества кластерного комплекса. Частицы $\{Mo_6I_8\}^{0,001}@SiO_2$ включали 1 мг, а частицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ - 10 мг кластерного комплекса на 1 г кремния. В качестве негативного контроля использовались частицы кремния SiO_2, не имеющие в составе кластерный комплекс молибдена.

После добавления к клеткам растворов микрочастиц SiO_2, $\{Mo_6I_8\}^{0,001}@SiO_2$ и $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, результаты МТТ-теста не выявили достоверных отличий в токсичности между тремя группами (Рис. 13). При самых высоких концентрациях цитотоксичность микрочастиц без кластерного комплекса была на 3-5% ниже по сравнению с микрочастицами, включающими в состав матрицы кластерный комплекс, однако эти отличия нельзя считать достоверными. Микрочастицы с различной концентрацией кластерного комплекса в кремниевой матрице $\{Mo_6I_8\}^{0,001}@SiO_2$ и $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ не проявили статистически достоверных отличий в цитотоксичности ни в одной из исследованных концентраций. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что концентрация кластерного комплекса в составе микрочастиц кремния не влияет на их токсичность.

Для дальнейшей работы использовались микрочастицы с максимальной концентрацией кластерного комплекса – 10 мг кластерного комплекса молибдена на 1 г кремния.

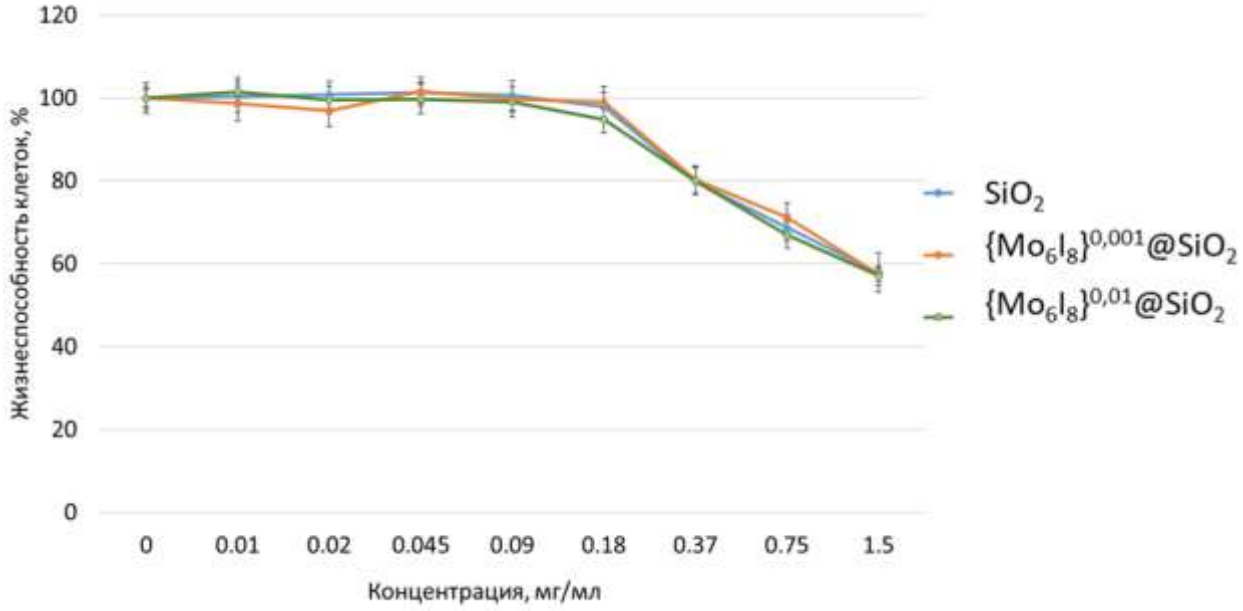

Рис. 13. Сравнение цитотоксического эффекта микрочастиц диаметром 500 нм с разной долей кластерного комплекса в составе кремниевой матрицы. МТТ тест на клетках линии Hep-2 после инкубации с растворами микрочастиц в течение 24 ч. Измерение проводили в 2 различных экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

Аналогичный эксперимент был проведен и для наночастиц диоксида кремния. Были получены наночастицы с диаметром 50±2 нм, включающие в себя разное количество кластерного комплекса. Наночастицы с различными концентрациями кластерного комплекса в матрице (1 и 10 мг/кг), а также наночастицы без кластерного комплекса в составе матрицы инкубировались с клетками линии Hep-2 в течение 24 ч, затем определяли долю жизнеспособных клеток с помощью МТТ-теста (рис. 14).

Для наночастиц результаты эксперимента были схожими – зависимости токсичности частиц от концентрации кластерного комплекса в их составе выявлено не было. Таким образом, в этих двух экспериментах были оценены две возможные корреляции биологических эффектов частиц от их физико-химических параметров – зависимость токсичности частиц от массовой доли кластерного комплекса в их составе и зависимость токсичности от диаметра частиц.

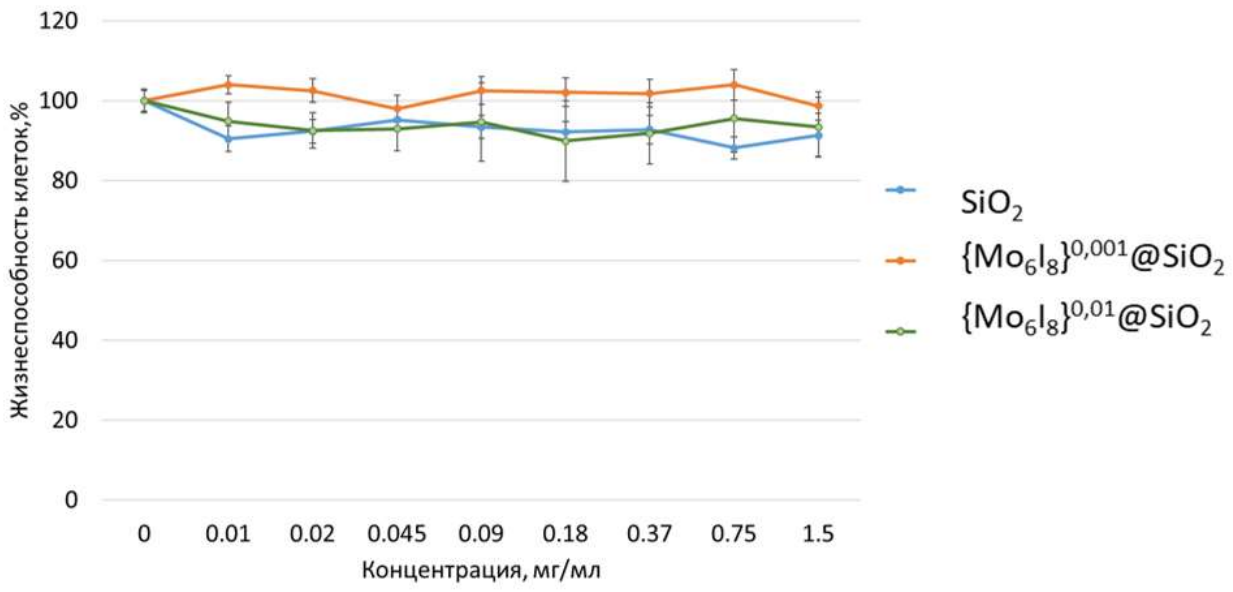

Рис. 14. Сравнение токсического эффекта наночастиц диаметром 50 нм с разной долей кластерного комплекса в составе кремниевой матрицы. МТТ-тест на клетках линии Hep-2 после инкубации с растворами наночастиц в течение 24 ч. Измерение проводили в 2 различных экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

Полуингибирующие концентрации (IC50), представленные в табл. 2, для частиц схожего диаметра значительно не отличались. Этот результат позволил нам заключить, что кластеры молибдена не проявляют значительной токсичности, находясь в составе частиц диоксида кремния, и для дальнейшей работы использовались частицы с максимальной долей кластерного комплекса. Также этот результат подтверждает, что включение кластерного комплекса в состав кремниевой матрицы действительно позволяет избежать его токсических эффектов, наблюдаемых нами для растворов кластерных комплексов (1) и (2), увеличивая при этом стабильность вещества.

Полученные результаты свидетельствуют также о том, что и наночастицы без кластерного комплекса, и наночастицы с содержанием кластерного комплекса проявляют меньшую токсичность на клетках по сравнению с микрочастицами. Поскольку в литературных данных часто отмечается высокая токсичность для наноразмерных частиц как *in vitro*, так и *in vivo*, полученный результат является значимым, т.к. именно высокая токсичность для клеток и животных является основным фактором, препятствующим более частому биомедицинскому применению наночастиц. Высокая биосовместимость наночастиц кремния, включающих в свой состав кластерные комплексы молибдена,

значительно расширяет диапазон их потенциального применения. Так, низкая токсичность при отсутствии облучения является одним из принципиально важных параметров для фотосенсибилизаторов, используемых в фотодинамической терапии.

Таблица 2. Значения полуингибирующих концентраций для микро- и наночастиц с различной долей кластерного комплекса молибдена.

	SiO_2	**$\{Mo_6I_8\}^n@SiO_2$**	
		n = 0,01	n = 0,001
микрочастицы	1,687±0,05	1,734 ± 0,07	1,755 ± 0,05
наночастицы	>1,5	>1,5	>1,5

3.2.2. Изучение кинетики клеточного накопления и выведения частиц

Поскольку кластерный комплекс молибдена, а также конъюгат данного комплекса с кремниевой матрицей, обладает люминесцентной активностью, проникновение меченых молибденом частиц в клетки можно отслеживать с помощью проточной цитометрии. Для определения временных параметров внутриклеточного проникновения частиц, клетки линии Hep-2 инкубировались с нетоксичными концентрациями раствора нано- и микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$. Время инкубации составило 15 мин, 30 мин, 2 ч, 4 ч, 8 и 16 ч, после чего клетки были промыты и изучены с помощью проточной цитометрии.

Клеточный дебрис и мелкие частицы отсекались путем выделения нормальной популяции клеток на двойной диаграмме прямого/бокового светорассеивания (рис. 15). В популяции клеток, инкубированных с микрочастицами продолжительное время (8-16 часов), количество мелких частиц было повышено даже после тщательной отмывки клеток фосфатным буфером (рис. 16). Поскольку мелкие частицы в данном случае также частично проявляют люминесценцию (рис. 17, B), можно предположить, что это остаточные количества микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$. Выделение популяции P1 позволяет нам избежать ложноположительного сигнала от этих частиц при подсчете люминесцирующих клеток.

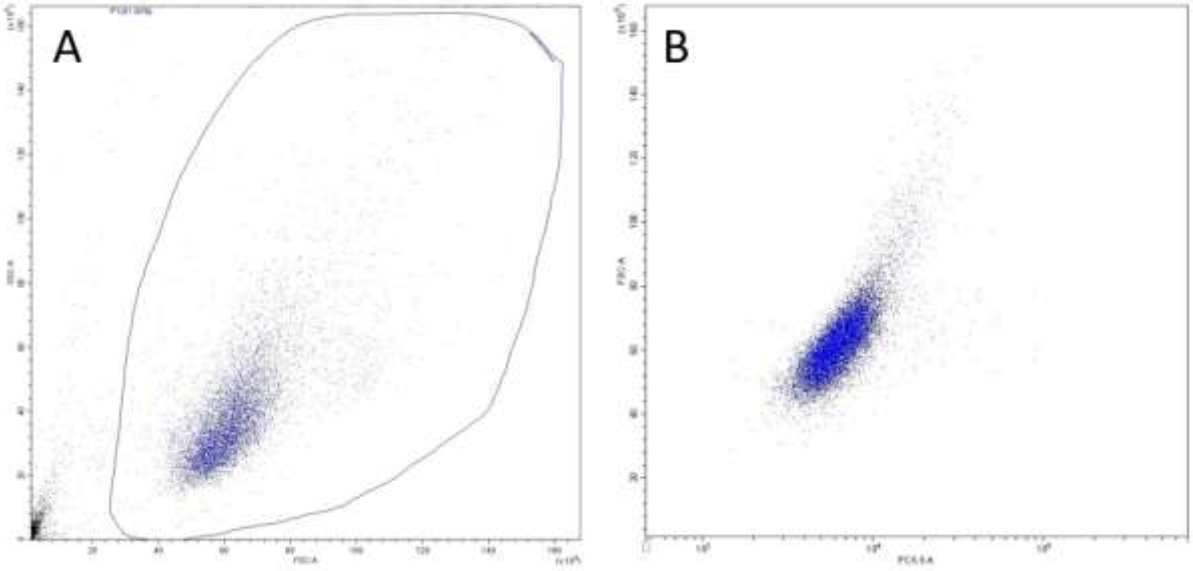

Рис. 15. Клетки линии Hep-2. Контрольная точка. A – двойная диаграмма прямого/бокового светорассеивания, синим выделена нормальная популяция клеток P1. B – двойная диаграмма прямого светорассеивания/люминесценции, детектированной с использованием фильтра 690/50 нм. На диаграмме представлена популяция P1.

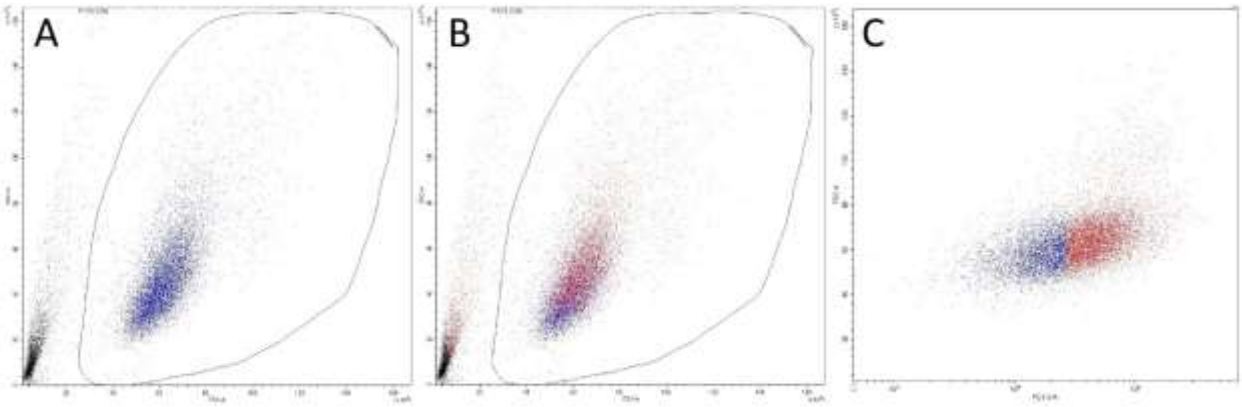

Рис. 16. Клетки линии Hep-2. 8 ч инкубации с микрочастицами диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$. A – двойная диаграмма прямого/бокового светорассеивания, синим выделена нормальная популяция клеток P1, B – двойная диаграмма прямого/бокового светорассеивания, синим выделена нормальная популяция клеток P1. Популяция люминесцирующих клеток (красная) выведена на передний план, C – двойная диаграмма прямого светорассеивания/люминесценции, детектированной с использованием фильтра 690/50 нм. На диаграмме представлена популяция P1. Популяция люминесцирующих клеток (красная) выведена на передний план.

Как можно видеть на рис. 16, C, люминесценция в выделенной популяции P1 учитывается только для клеток, частицы в данном диапазоне отсечены. Гейтирование для определения популяции люминесцирующих клеток проводилось с использованием гистограммы интенсивности люминесценции клеток, детектированной с использованием фильтра 690/50 нм (рис. 17). За положительный сигнал считались события, превышающие интенсивность

контроля. Для избежания ложноположительного сигнала от свободных частиц, гейтирование проводилось для популяции P1.

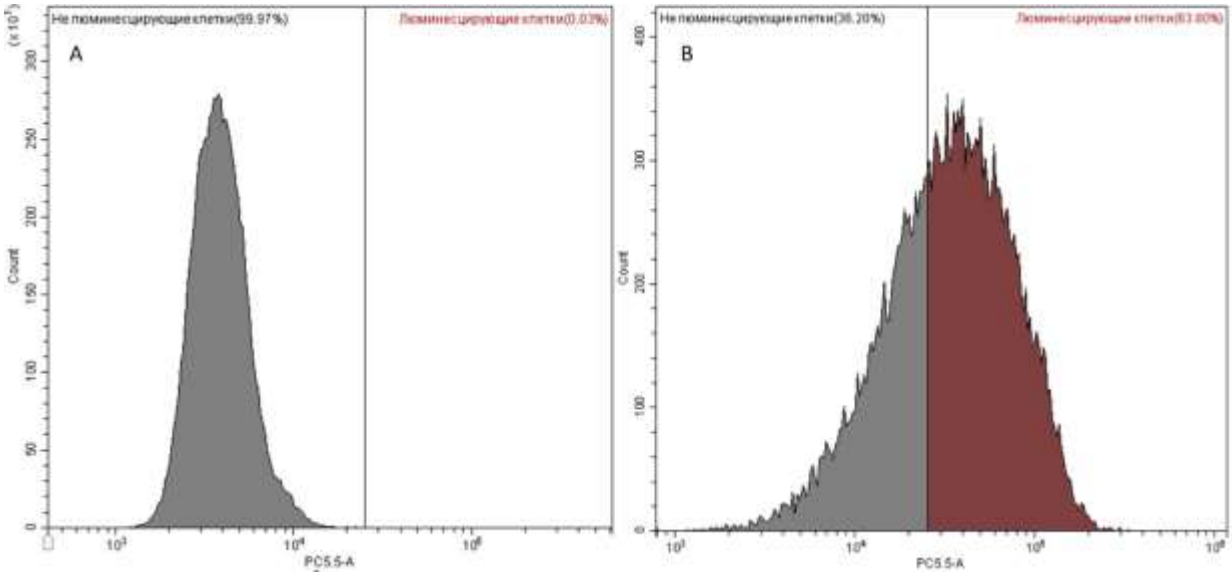

Рис. 17. Определение популяции люминесцирующих клеток. Гистограмма интенсивности клеточной люминесценции, детектированной с использованием фильтра 690/50 нм. A – контрольные клетки, B – клетки линии Hep-2, 8 ч инкубировавшиеся с микрочастицами диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$. Гистограммы построены для популяции P1 (рис. 15, 16).

На рис. 18 – 20 приведены доли клеток, включающих в себя частицы, в зависимости от времени инкубации (в процентах). Через полчаса и 4 ч инкубации в накоплении частиц наблюдались статистически значимые отличия ($p<0,05$). По сравнению с микрочастицами наночастицы быстрее выходили на плато накопления, составляющее для обоих типов частиц 62 – 65% клеток. Более интенсивное поглощение клетками наночастиц по сравнению с микрочастицами описано в литературе.

Многие авторы при сравнении способов доставки частиц в клетку указывают, что микрочастицы используют лишь 2 пути проникновения в клетку – макропиноцитоз и клатрин-зависимый эндоцитоз. При этом для наночастиц диаметром меньше 80 нм выявлены 3 возможных пути клеточного поглощения – макропиноцитоз, клатрин-зависимый эндоцитоз и поглощение через кавеолы (Zhang, 2010; Li, 2015; Flood-Garibay, 2021). Возможно, именно этот дополнительный способ проникновения позволяет наночастицам быстрее накапливаться в клетке.

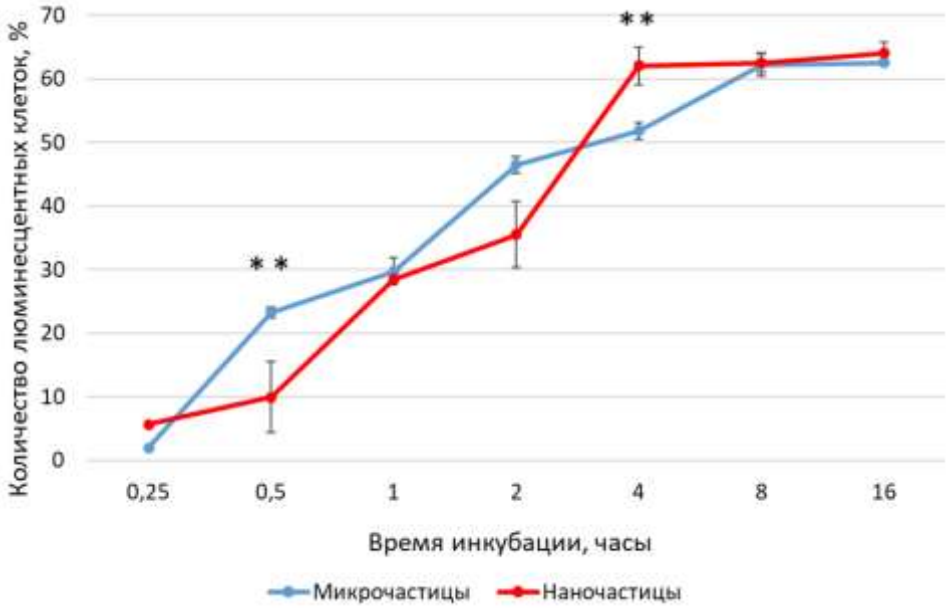

Рис. 18. Скорость накопления частиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ диаметром 50 (синий) и 500 (красный) нм в клетках линии Hep-2, в зависимости от времени инкубации. **p<0.05.

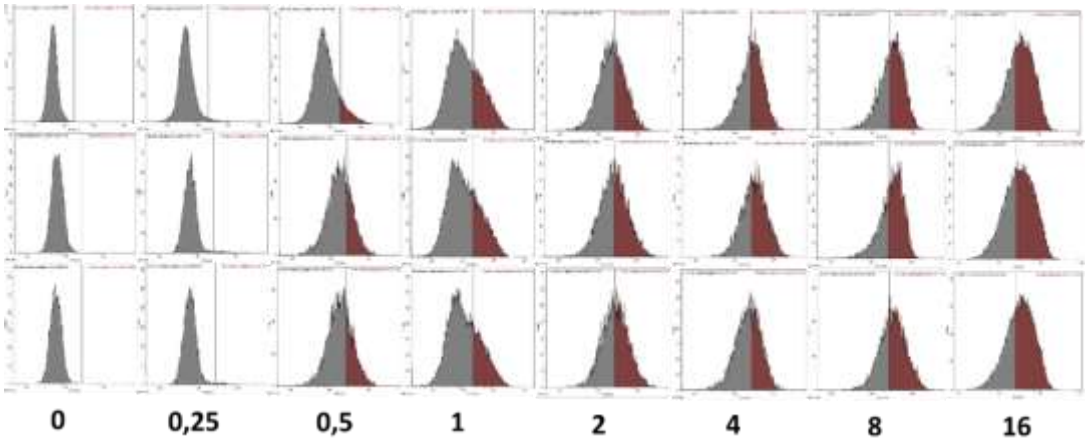

Рис. 19. Гистограммы поглощения микрочастиц клетками Hep-2. Проточная цитометрия. Время инкубации клеток с микрочастицами от 0 до 16 часов, по 3 повтора на каждую временную точку.

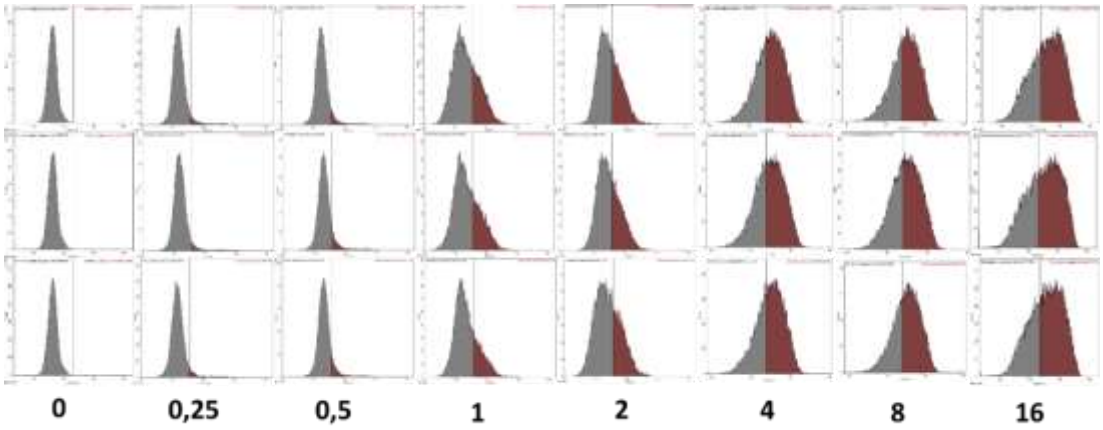

Рис. 20. Гистограммы поглощения наночастиц клетками Hep-2. Проточная цитометрия. Время инкубации клеток с наночастицами от 0 до 16 ч, по 3 повтора на каждую временную точку.

Помимо скорости накопления частиц в клетках, была исследована также скорость их выведения из клеток (рис. 21 – 23). Клетки, инкубированные с микро- и наночастицами в течение 24 ч, были помещены в чистую культуральную среду, которая менялась каждый час. Через 15 мин, 30 мин, 2 ч, 4 ч, 8, 16 и 24 ч часть клеток была отобрана и зафиксирована для дальнейшего изучения на проточном цитофотометре. Из рисунка видно, что достоверные отличия в скорости выведения частиц из различных групп клеток ($p<0,05$) наблюдались в интервалах от получаса до 4 часов инкубации. Очевидно, что выведение микрочастиц из клеток происходит медленнее по сравнению с наночастицами.

В отличие от клеточного накопления, выведение частиц из клеток менее подробно описано в литературе. Тем не менее, некоторые авторы отмечают, что после попадания в клетку наночастицы более плотно концентрируются в лизосомах по сравнению с микрочастицами (Seydoux, 2014). Поскольку экзоцитоз, опосредованный лизосомами, является одним из основных механизмов выведения частиц из клетки, более быстрый метаболизм для наночастиц может быть объяснен их более обильным накоплением в лизосомах.

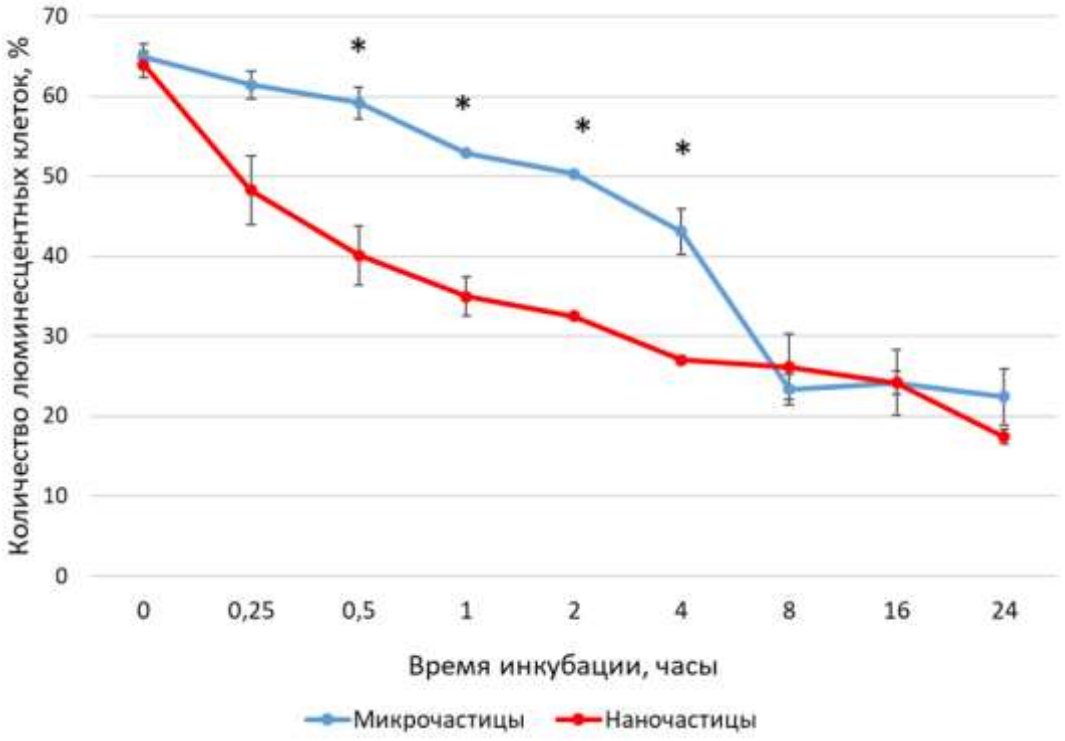

Рис. 21. Скорость выведения частиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$ диаметром 50 (синий) и 500 (красный) нм из клеток линии Hep-2 после 24 часов инкубации. *$p<0.005$.

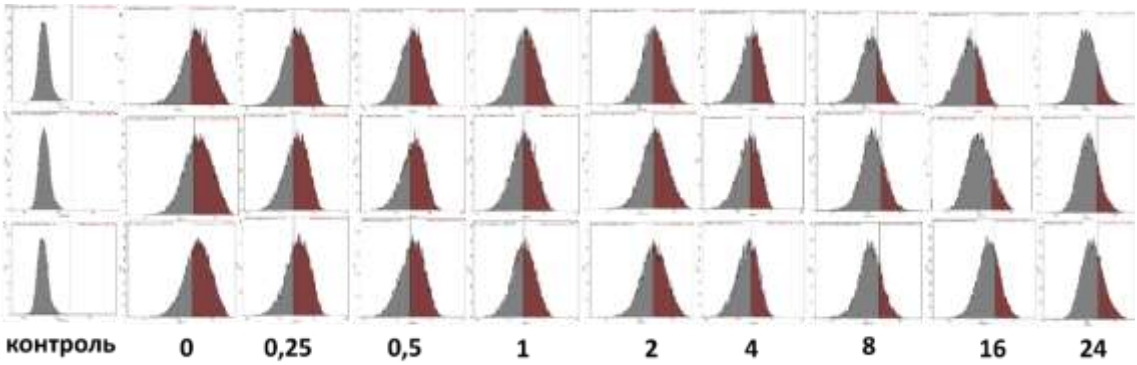

Рис. 22. Гистограммы выведения микрочастиц клетками Hep-2 после предварительной инкубации с частицами в течение 24 часов. Проточная цитометрия. Время инкубации клеток в среде, не содержащей частицы, от 0 до 24 часов, по 3 повтора на каждую временную точку.

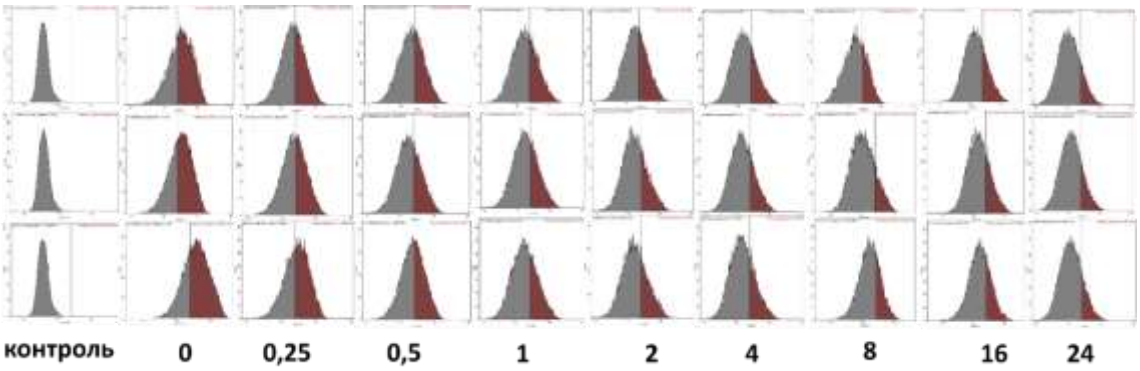

Рис. 23. Гистограммы выведения наночастиц клетками Hep-2 после предварительной инкубации с частицами в течение 24 часов. Проточная цитометрия. Время инкубации клеток в среде, не содержащей частицы, от 0 до 24 часов, по 3 повтора на каждую временную точку.

3.2.3. Исследование фотодинамической активности полученных частиц. Для того, чтобы проверить, сохраняют ли кластерные комплексы молибдена свои фотодинамические свойства при включении в состав частиц, была проведена инкубация клеток линии Hep-2 с микро- и наночастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ в нетоксичных концентрациях, с последующим облучением. Также в обоих экспериментах были исследованы клетки, инкубированные с частицами SiO_2, не содержащими в своем составе кластерный комплекс молибдена.

Результаты данного эксперимента показали, что даже в максимальных дозах микрочастицы с кластерным комплексом молибдена проявляли незначительную фототоксичность по сравнению с немодифицированными микрочастицами. Ни в одной из исследованных концентраций микрочастиц жизнеспособность облученных лампой клеток, инкубированных с микрочастицами без кластерного комплекса, не отличалась от жизнеспособности клеток, инкубированных с частицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$. Во всех концентрациях микрочастиц

выживаемость клеток составляла более 80% (рис. 24). Такие значения выживаемости в МТТ-тесте считаются показателем низкой токсичности исследуемых соединений. В отличие от микрочастиц, наночастицы в максимальных концентрациях выявили высокую фотоиндуцированную токсичность (рис. 25). Достоверные отличия между группами SiO_2 и $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ после облучения были выявлены начиная с концентрации наночастиц 0,0375 мг/мл ($p<0,05$).

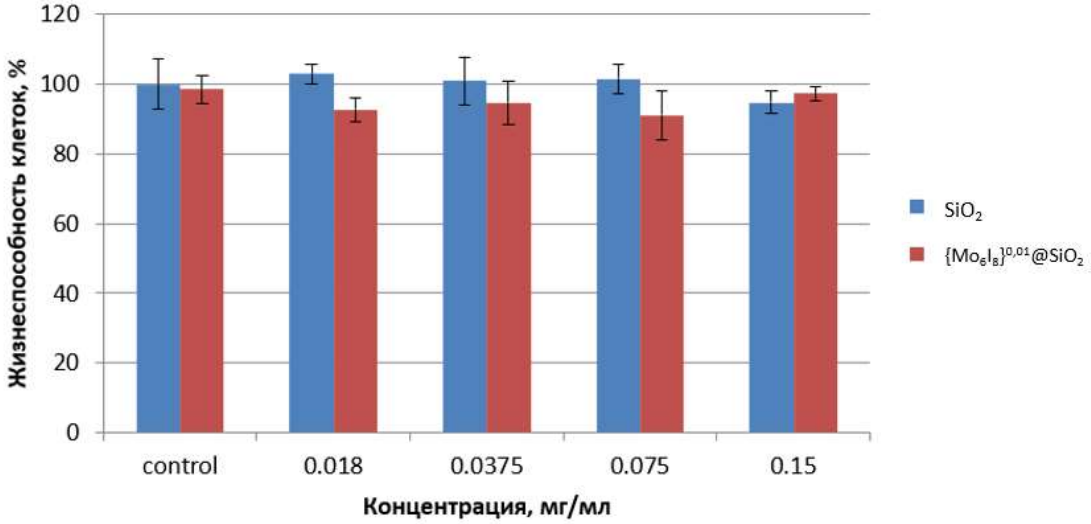

Рис. 24. Изменение жизнеспособности клеток линии Hep-2, инкубированных с микрочастицами диоксида кремния без кластерного комплекса и микрочастицами диоксида кремния, содержащими кластерный комплекс молибдена $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, в результате облучения галогенной лампой в течение 30 мин. Измерение проводили в 2 различных экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

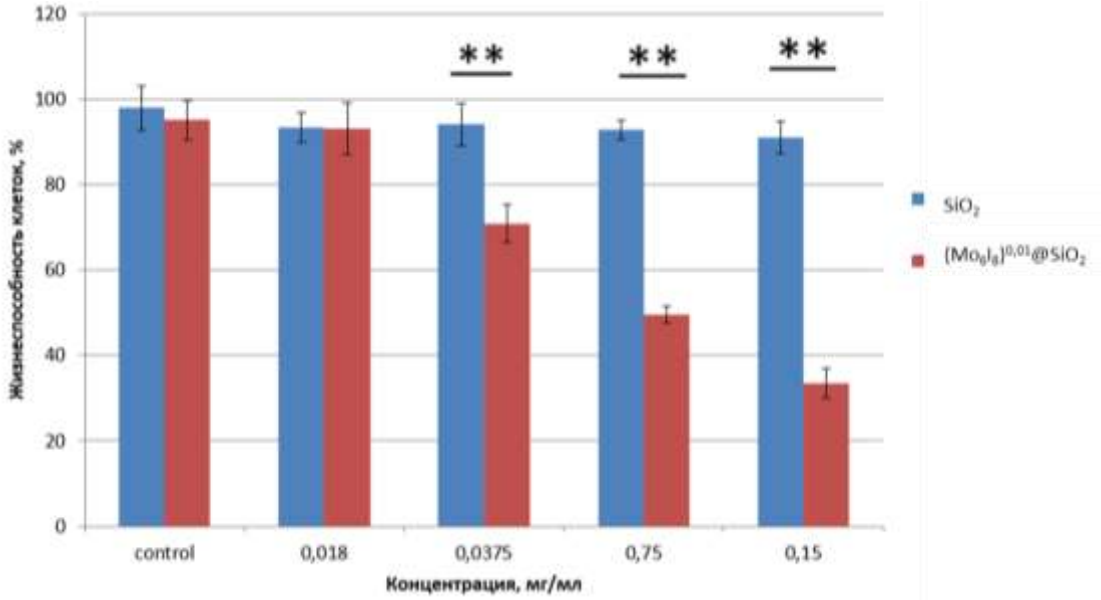

Рис. 25. Изменение жизнеспособности клеток линии Hep-2, инкубированных с наночастицами диоксида кремния без кластерного комплекса и наночастицами диоксида кремния, содержащими кластерный комплекс молибдена $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, в результате облучения галогенной лампой в течение 30 мин. $p<0.05$. Измерение проводили в 2 различных экспериментах с количеством повторов по 4 в каждом.

Клетки, инкубированные с кластер-содержащими наночастицами, проявляли заметное снижение жизнеспособности – в группе клеток, инкубированных с наночастицами в концентрации 0,15 мг/мл, доля выживших после облучения клеток составила всего 32%. В то же время клетки, инкубировавшиеся с не содержащими кластерный комплекс наночастицами в этой же концентрации, сохранили высокую жизнеспособность на уровне выше 80%. Это говорит о том, что высокая фототоксичность наночастиц обусловлена именно наличием кластерного комплекса молибдена в их матрице.

Данный эксперимент показал значительные отличия в фототоксичности между микро- и наночастицами диоксида кремния, несущими кластерный комплекс молибдена в составе кремниевой матрицы. Несмотря на то, что доля кластерного комплекса была одинаковой для обоих типов частиц – 10 мг кластерного комплекса на 1 г кремния – наночастицы оказались значительно более эффективны в элиминации клеток Hep-2 при облучении, тогда как микрочастицы не проявили фототоксичности даже в максимальной концентрации. Возможно, такой эффект связан с большей абсолютной площадью поверхности наночастиц по сравнению с данным показателем у микрочастиц того же объема. При активации светом наночастицы воздействуют на большее пространство внутри клетки, проявляя, таким образом, высокий цитотоксический эффект.

Еще одна причина для высокой фотоиндуцированной токсичности наночастиц – это их уже отмеченная выше способность формировать агрегации внутри лизосом. Авторы, исследовавшие применение наночастиц в качестве фотосенсибилизаторов, отмечают, что при активации светом такие наночастицы способны вызывать утечку лизосомального материала (Godin, 2010, 2011; Serda, 2010; Wang, 2018). Кроме того, в некоторых работах отмечается снижение митохондриального потенциала при поглощении клеткой достаточно высокого объема наночастиц (Napierska, 2009, 2012; Dong, 2020).

Опираясь на полученные ранее данные о низкой темновой токсичности наночастиц, мы можем утверждать, что само по себе влияние наночастиц на митохондриальный потенциал не приводит к снижению жизнеспособности клеток, поскольку активность митохондрий является решающим фактором в МТТ-тесте, и её изменение было бы заметно в полученных результатах. Тем не менее, после облучения и выделения высоких концентраций активных форм

кислорода, именно сниженный митохондриальный потенциал может быть дополнительным фактором, ведущим к массовой гибели клеток.

Результаты, полученные при исследовании фотоиндуцированой цитотоксичности, выявили два перспективных пути применения изучаемых веществ. Поскольку микрочастицы при активации светом не проявляют цитотоксичности даже в максимальных изученных дозах, их наиболее перспективным применением может стать отслеживаемая доставка веществ в клетку. Микрочастицы эмитируют яркое долгоживущее излучение в красной области спектра, что может помочь в локализации частиц и доставляемых ими веществ внутри клетки.

Чтобы проверить эффективность микрочастиц в качестве отслеживаемых доставщиков, их поверхность была модифицирована глицидильными группами и, далее, связана с зеленым флуоресцирующим белком – GFP. Выбор данного белка обусловлен его свойством проявлять яркую эмиссию в зеленом спектре, которая позволила бы отследить в клетке одновременно GFP и несущие его на своей поверхности микрочастицы.

Таким образом, дальнейшие эксперименты с микрочастицами были направлены на отслеживание их локализации в клетке и оценку их эффективности в качестве доставщиков белков.

Вследствие того, что наночастицы продемонстрировали значительную цитотоксичность за счёт активации светом имеющегося в их составе кластерного комплекса, можно было ожидать их наибольшую эффективность в качестве фотоиндуцированных противоопухолевых агентов. Поэтому, дальнейшее исследование наночастиц было направлено на оценку их фототоксичности и накопления в клетках.

3.3. Исследование микрочастиц в качестве агентов доставки

3.3.1. Оценка эффективности функционализации микрочастиц глицидиловыми группами.

Для улучшения связывания переносимых белков с поверхностью микрочастиц была проведена обработка поверхности микрочастиц глицидиловыми группами по методике, описанной в главе "Материалы и методы исследования". Функционализация неорганических поверхностей глицидиловыми группами – это достаточно широко используемый в настоящее время подход

(Cabrera, 2020, Vismara, 2009, Heinen, 2017). Хотя для диоксида кремния и показана способность связываться с белковыми молекулами за счёт нековалентных связей (Lundqvist, 2004, Meissner, 2015), эти связи могут стать неустойчивыми после продолжительного нахождения частиц в растворе или при изменениях pH.

Нам важно было оценить эффективность микрочастиц в качестве доставщиков лекарств, в том числе, и в опухолевые очаги – следовательно, нужно было учесть сниженный pH опухолевых тканей. Для повышения стабильности связи поверхности микрочастиц с транспортируемым белком была проведена модификация их поверхности группами (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана.

После функционализации была проведена конъюгация с GFP функционализированных и нефункционлизированных микрочастиц. В качестве отрицательного контроля использовали микрочастицы, не конъюгированные с GFP.

Методом проточной цитометрии была выявлена значительная разница интенсивности зеленой флуоресценции в полученных растворах микрочастиц (рис. 26). Эти данные позволили заключить, что функционализация поверхности обеспечивает значительно более эффективное связывание транспортируемого белка с поверхностью микрочастиц. Интенсивность красной люминесценции микрочастиц с включенным в их состав кластерным комплексом молибдена оставалась одинаковой для всех трех растворов. Это говорит о том, что функционализация поверхности частиц не меняет свойств кластерного комплекса молибдена в составе кремниевой матрицы.

Данный эксперимент показывает, что модификация поверхности микрочастиц позволяет менять их физико-химические свойства, оставляя при этом возможность детектировать частицы в клетках за счет их люминесценции. Важность этой особенности микрочастиц проявляется не только в возможности значительно увеличить их эффективность как агентов доставки. Модификация поверхности позволяет менять такие свойства частиц, как заряд, гидрофильность или чувствительность к pH.

Использование подобных модификаций позволит настраивать параметры микрочастиц для каждого конкретного применения, значительно расширяя диапазон тканей и органов, в которые может производиться успешная

доставка лекарств данными частицами. Кроме того, модификация поверхности позволяет прикреплять к частицам антитела, обеспечивая адресность частиц для определенной группы клеток в организме. Многие авторы сходятся в том, что именно адресная доставка в будущем позволит максимально снизить побочное действие химиотерапии и оставить здоровые ткани организма интактными.

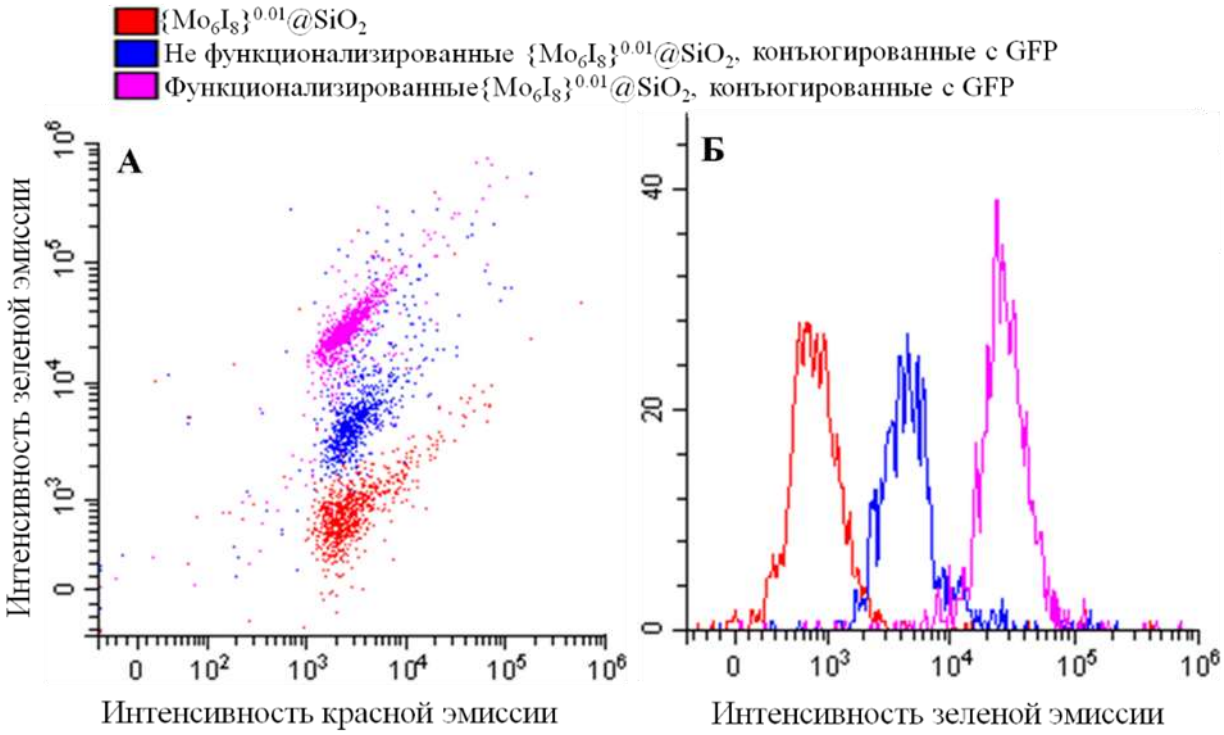

Рис. 26. Сравнение интенсивности эмиссии микрочастиц в красном и зеленом спектре. Красный – микрочастицы, меченые молибденовым кластерным комплексом, не конъюгированные с GFP, синий – микрочастицы с нефункционализированной поверхностью, конъюгированные с GFP, розовый – микрочастицы с функционализированной поверхностью, конъюгированные с GFP.

3.3.2. Оценка локализации микрочастиц в клетках линии Hep-2 с помощью флуоресцентной микроскопии

Хотя проведенная ранее проточная цитометрия показала высокую степень проникновения микрочастиц в клетки, некоторые аспекты их внутриклеточной локализации всё еще нуждались в дополнительной оценке. Так, для понимания эффективности микрочастиц как агентов-переносчиков необходимо показать, что переносимый ими белок действительно заходит в клетку вместе с частицами, а не задерживается на её мембране. Еще один важный параметр

для оценки работы частиц в качестве доставщиков – это сохранение ими связи с переносимыми соединениями внутри клетки. Прочность связи частиц с переносимым ими веществом может настраиваться с помощью модификации поверхности частиц.

В зависимости от желаемых эффектов и действия на клетку переносимого частицами вещества можно сделать связи между переносимыми молекулами и частицей чувствительными к pH или температуре, чтобы доставленные в клетку препараты отщеплялись от носителя внутри клетки. С другой стороны, в некоторых случаях может быть необходимо более длительное удержание доставленного в клетку препарата внутри клетки, чтобы пролонгировать его действие и увеличить эффективность. Для этих целей логичнее, наоборот, максимально замедлить открепление переносимых препаратов от поверхности частицы.

Как известно из проведенного ранее исследования кинетики накопления и выведения частиц, микрочастицы способны долго оставаться внутри клетки, не выводясь до конца даже через 24 ч после достижения максимальной внутриклеточной концентрации. Кроме того, модификация поверхности частиц группами (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана значительно повышает эффективность их связывания с переносимым белком. Эти два фактора позволяют предположить, что полученные в данной работе микрочастицы диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ могут использоваться не только для доставки биологических молекул в клетку, но и для пролонгированного удержания этих молекул внутри клетки.

Для проверки этого предположения необходимо оценить, проникает ли доставляемый частицами белок внутрь клетки вместе с частицами и остается ли он связанным с поверхностью частицы после проникновения. Для решения этих вопросов была проведена инкубация клеток линии Hep-2 с раствором функционализированных микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, конъюгированных с GFP. После инкубации и фиксации клетки окрашивались флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific) и AlexaFluor™ 532 Phalloidin (Sigma-Aldrich) и изображения получали с помощью системы клеточного скрининга IN Cell Analyzer (GE Healthcare, USA). Hoechst окрашивает ядра клеток в голубой цвет, а Phalloidin окрашивает цитоскелет в желтый цвет. Данная окраска позволила получить более подробную информацию о локали-

зации веществ внутри клетки, не пересекаясь при этом по спектру эмиссии ни с GFP, ни с мечеными кластерным комплексом микрочастицами. Для того, чтобы оценить проникновение белка GFP в клетки без помощи доставщиков, отдельно посаженные клетки были инкубированы с раствором GFP. Кроме того, для дополнительного контроля, еще одна группа клеток была инкубирована с микрочастицами, мечеными кластерным комплексом молибдена, но не конъюгированными с GFP.

Полученные результаты показали, что микрочастицы сами по себе проникают в клетки в достаточно большом количестве, тогда как GFP без прикрепления к микрочастицам не способен проникать в клетки. На изображениях клеток после инкубации с $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, конъюгированными с GFP, отчетливо видна и красная эмиссия, излучаемая люминесцентными микрочастицами, и зеленая эмиссия, проявляемая белком GFP (рис. 27).

Эти результаты подтверждают, что микрочастицы действительно способны эффективно доставлять биологические молекулы в клетку. Об этом факте свидетельствует совмещенная локализация микрочастиц и переносимого ими белка GFP внутри клетки.

3.2.3. Электронно-микроскопическое изучение локализации микрочастиц в клетках линии Hep-2.

Электронно-микроскопическое изучение локализации микрочастиц внутри клетки позволяет понять, связываются ли частицы с какими-либо органеллами после попадания в клетку и предположить возможный путь метаболизма частиц внутри клетки.

Клетки линии Hep-2, инкубированные с раствором микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$, были исследованы с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Контрольные изображения были получены для клеток, инкубировавшихся в отсутствие частиц (рис. 28). На электронограммах видны микрочастицы, поглощаемые клеткой с помощью длинных выростов мембраны (рис. 29 – 31). Частицы поглощаются вместе с окружающей их каплей культуральной среды, о чем свидетельствует электронносветлое пространство вокруг плотной частицы в везикуле. Это подтверждает известные из литературы данные о том, что наиболее вероятным механизмом эндоцитоза для микрочастиц является макропиноцитоз.

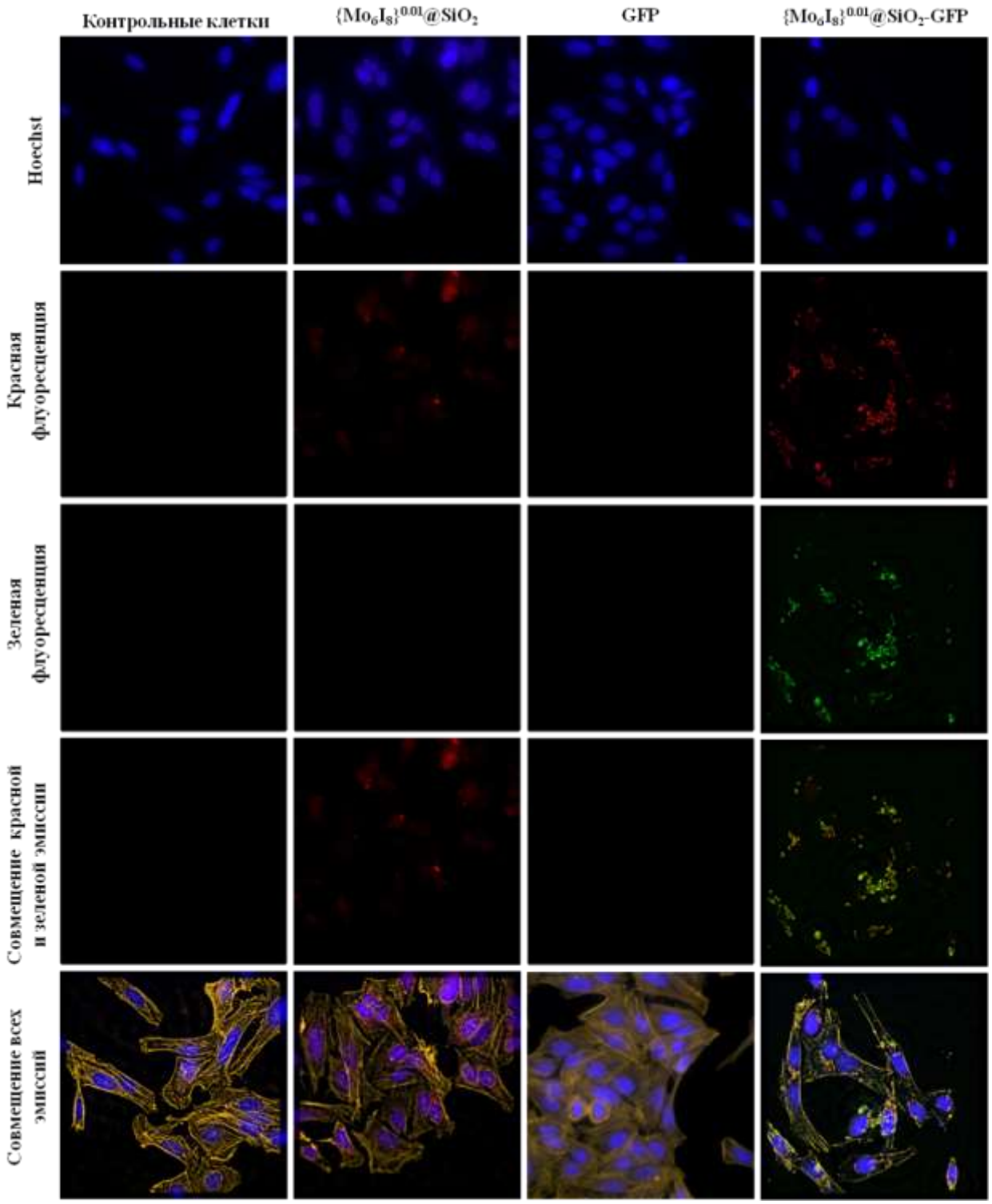

Рис. 27. Проникающая способность микрочастиц диоксида кремния диаметром 500 нм различного состава(микрочастиц без GFP ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}$@SiO_2), функционализированных микрочастиц с GFP ($\{Mo_6I_8\}^{0.01}$@SiO_2-GFP) и раствора GFP) в клетки линии Hep-2. Окраска Hoechst 33342 и AlexaFluor™ 532 Phalloidin.

Частицы, находящиеся внутри клеток, чаще всего локализованы в одномембранных везикулах, а также в структурах, которые могут быть идентифи-

цированы как ранние эндосомы (Рис 32) или мультивезикулярные тельца. В мультивезикулярных тельцах частицы встречаются наиболее часто – почти в половине случаев от общего количества клеток, включающих частицы (рис. 33 – 36, рис. 42). Этот результат не является неожиданным, так как в среднем поглощенные вещества больше времени находятся в клетке именно в составе в мультивезикулярных телец по сравнению с ранними эндосомами.

Интересная особенность была замечена в случае локализации частиц в лизосомах. Почти во всех случаях лизосомы, включающие микрочастицы, содержат также и миелиновые тельца – структуры, образующиеся из старых участков клеточной мембраны (рис. 37 – 40). Миелиновые тельца могут отправляться на переработку, а могут накапливаться в клетке вместе с липофусцином в структуре, называемой резидуальным, или остаточным, телом. В одном из случаев удалось найти в клетке частицу, по-видимому, транспортируемую лизосомой к резидуальному телу (рис. 41).

Если микрочастицы не перевариваются клеткой, а складируются в резидуальных телах, это может послужить объяснением длительному времени выведения микрочастиц из клетки. Для целей доставки биологически активных молекул расположение частиц в резидуальном теле может сказаться положительно – длительная задержка частиц внутри клетки позволит обеспечить постепенное выведение транспортируемого частицей препарата.

Из общего числа исследованных клеток 26% не включали частицы, 32% содержали частицы в мультивезикулярных телах, 21% - в лизосомах, 13% - в ранних эндосомах, и 8% - в поздних эндосомах (рис. 42).

Также следует отметить, что на электронограммах, сделанных при малом увеличении, не было отмечено налипания частиц на поверхность клеток. Это позволяет утверждать с большей уверенностью, что данные, полученные на проточной цитометрии, показывают именно проникновение частиц внутрь клеток.

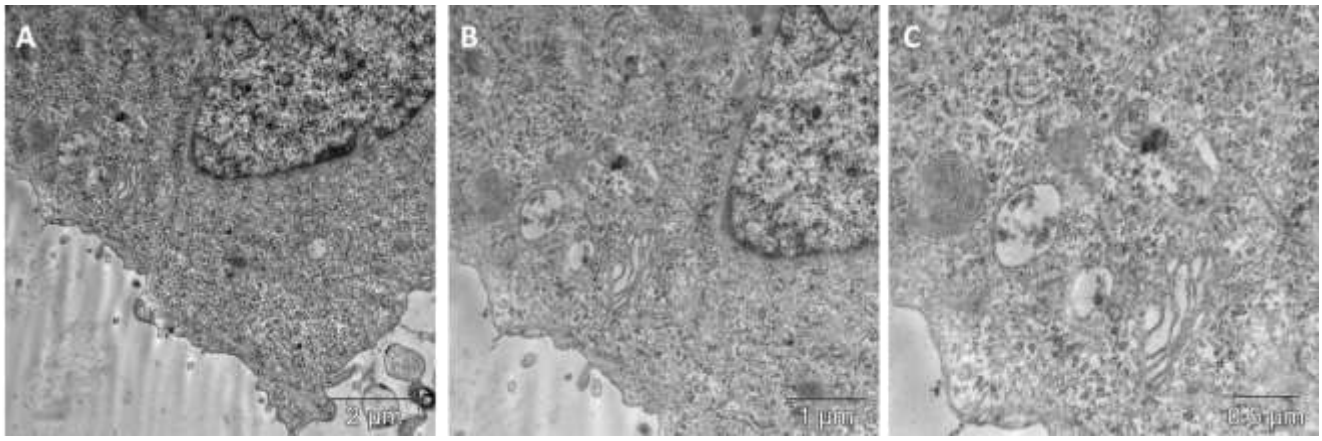

Рис 28. Контрольные клетки линии Hep-2. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C).

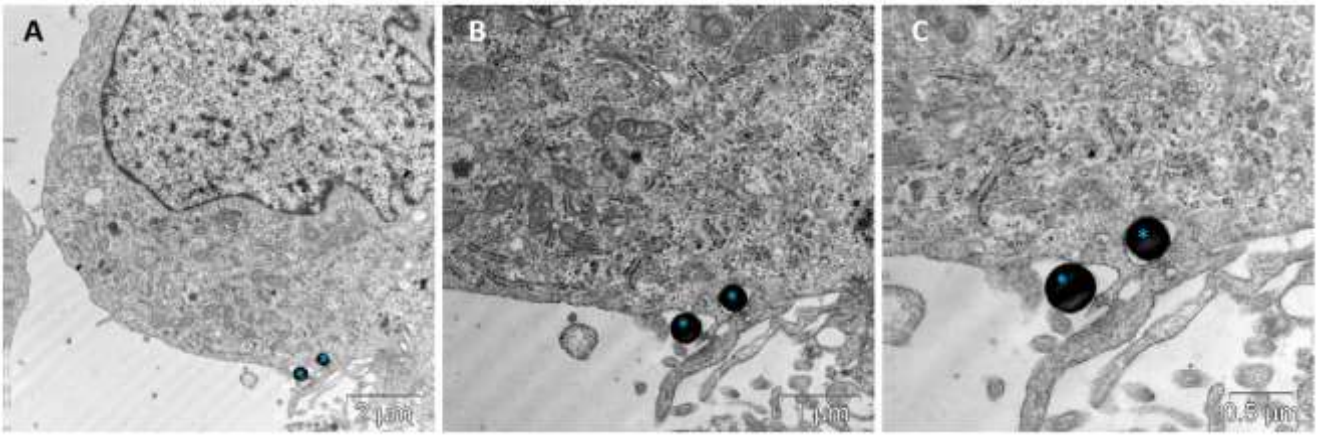

Рис 29. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Виден захват частиц клеткой по механизму макропиноцитоза. Голубой звездочкой показаны частицы.

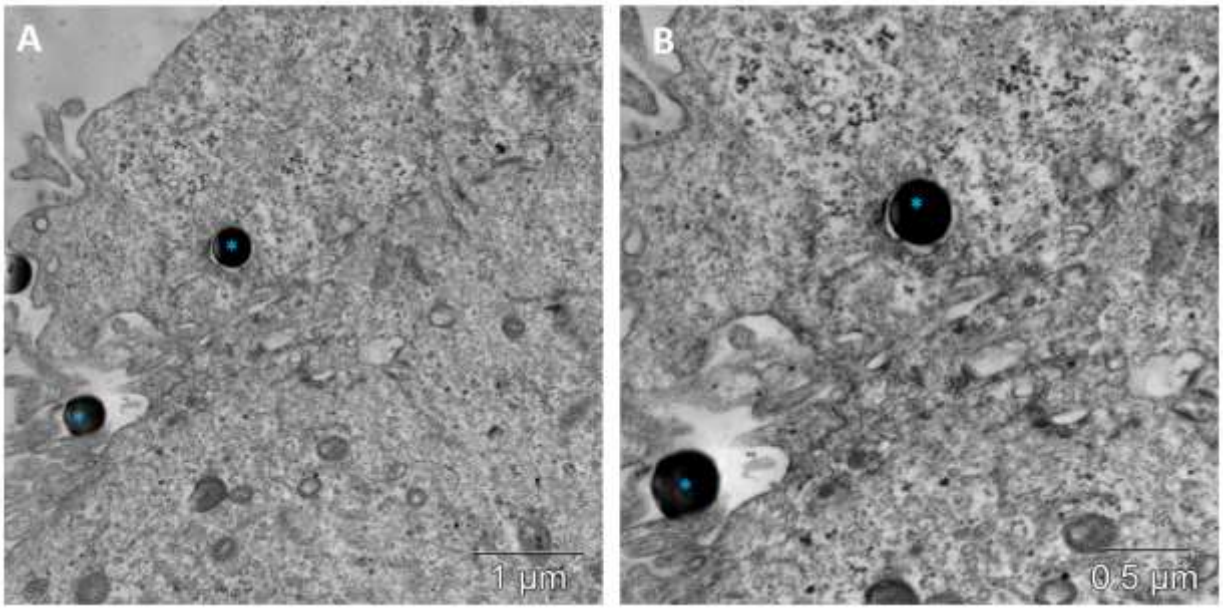

Рис 30. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 25 000 (A) и 40 000 (B). Виден захват частиц клеткой по механизму макропиноцитоза. Голубой звездочкой показаны частицы.

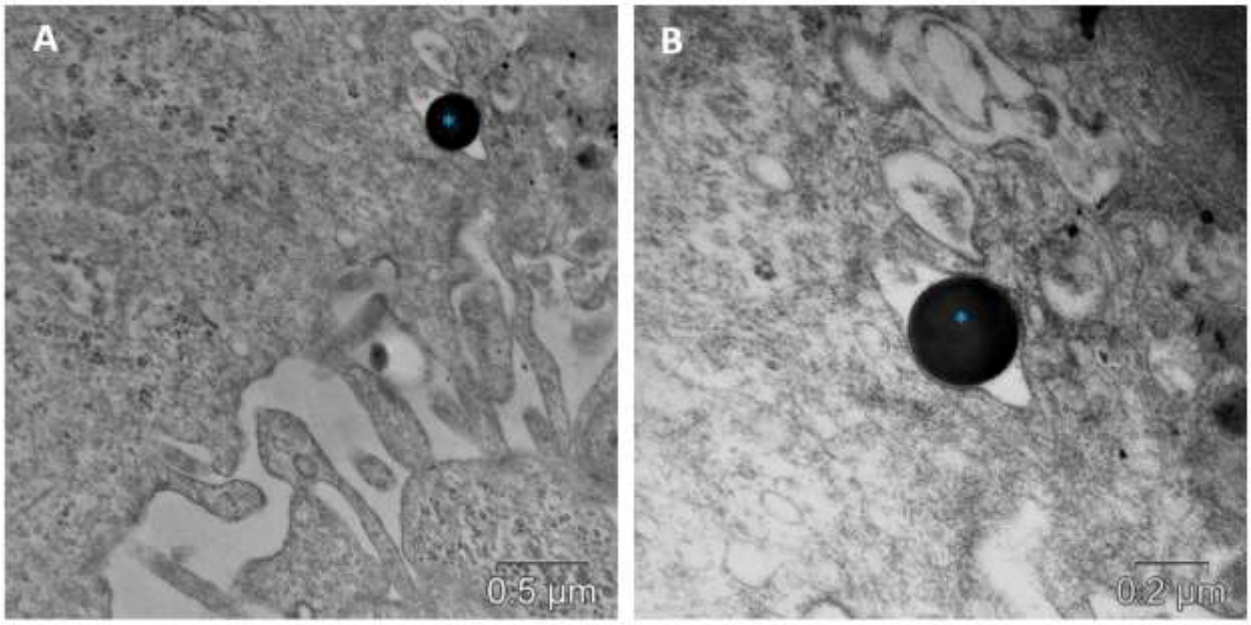

Рис 31. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 40 000 (A) и 60 000 (B). Виден захват частиц клеткой по механизму макропиноцитоза. Голубой звездочкой показана частица.

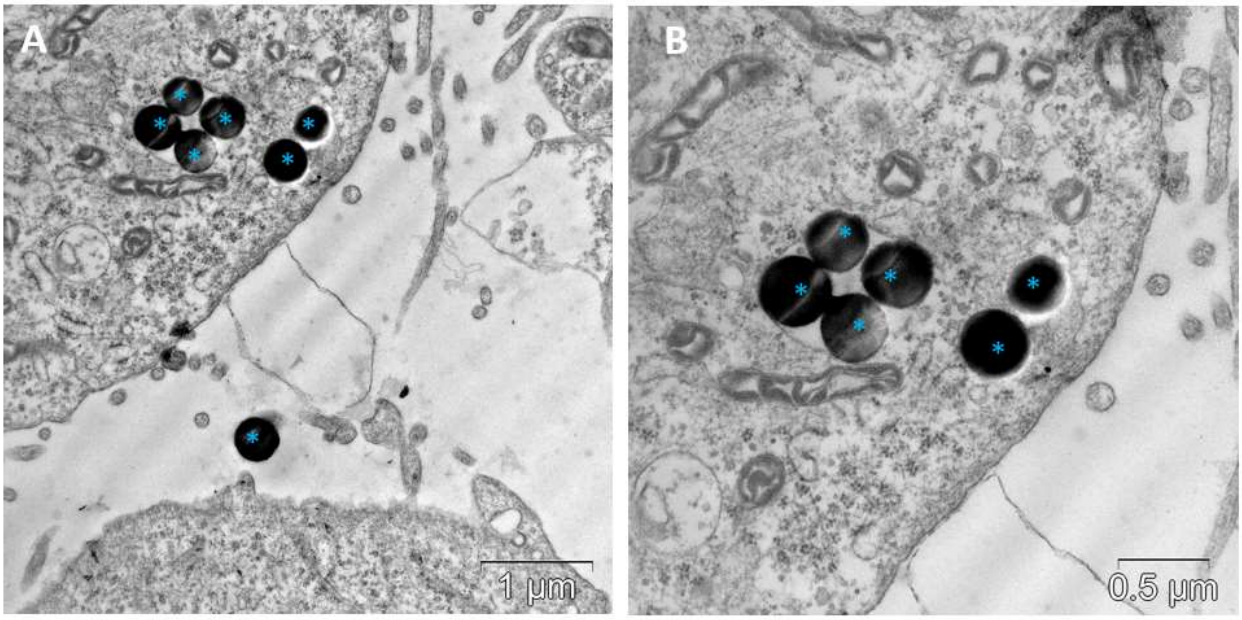

Рис 32. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 25 000 (A) и 40 000 (B). Видно скопление микрочастиц в ранней эндосоме. Голубой звездочкой показаны частицы.

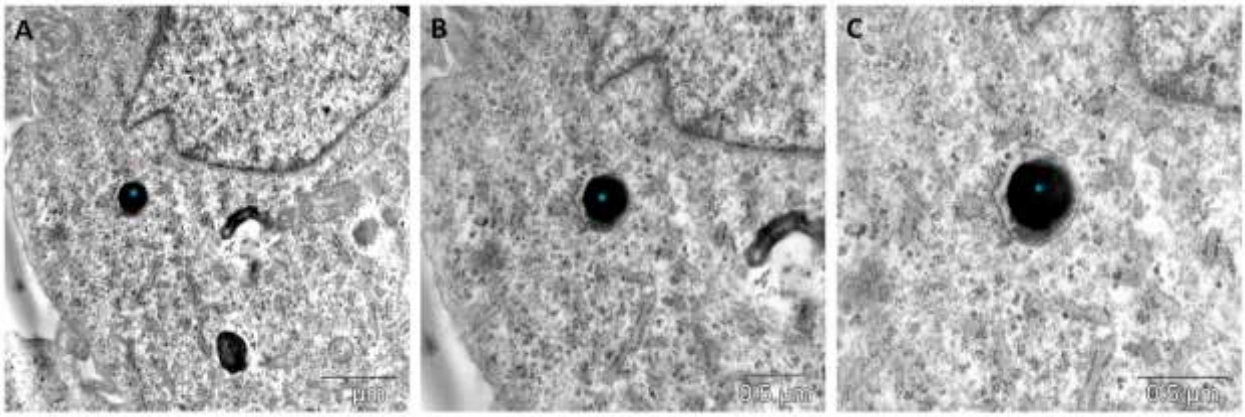

Рис 33. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Видна микрочастица в мультивезикулярном тельце. Голубой звездочкой показана частица.

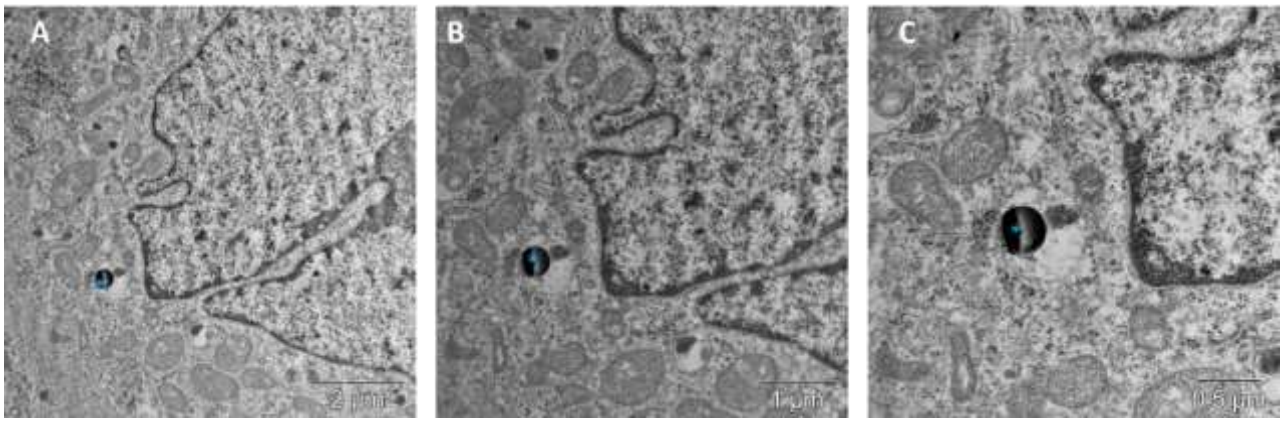

Рис 34. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Видна микрочастица в мультивезикулярном тельце. Голубой звездочкой показана частица.

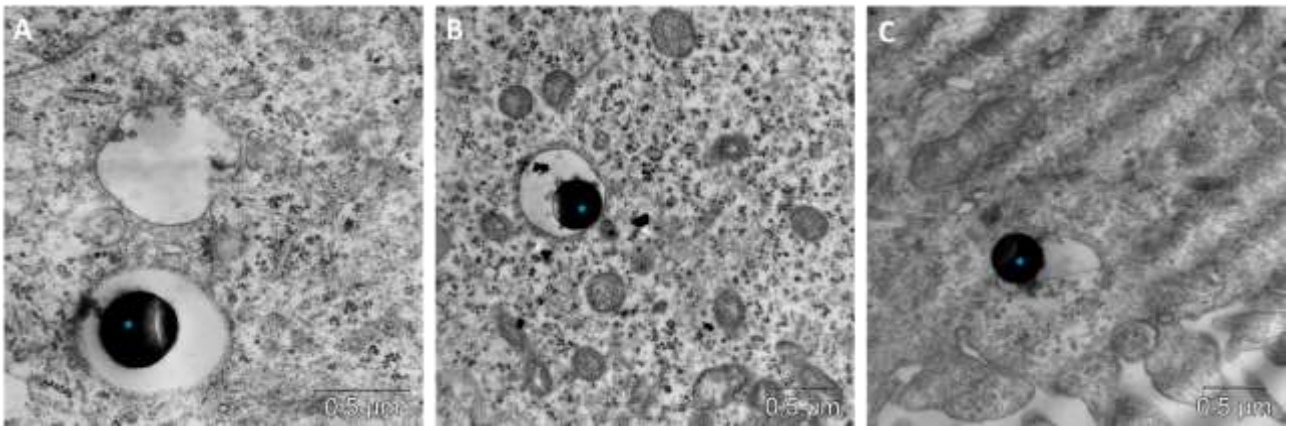

Рис 35. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 60 000 (A) и 40 000 (B, C). Частицы расположены в мультивезикулярных тельцах. Голубой звездочкой показана частица.

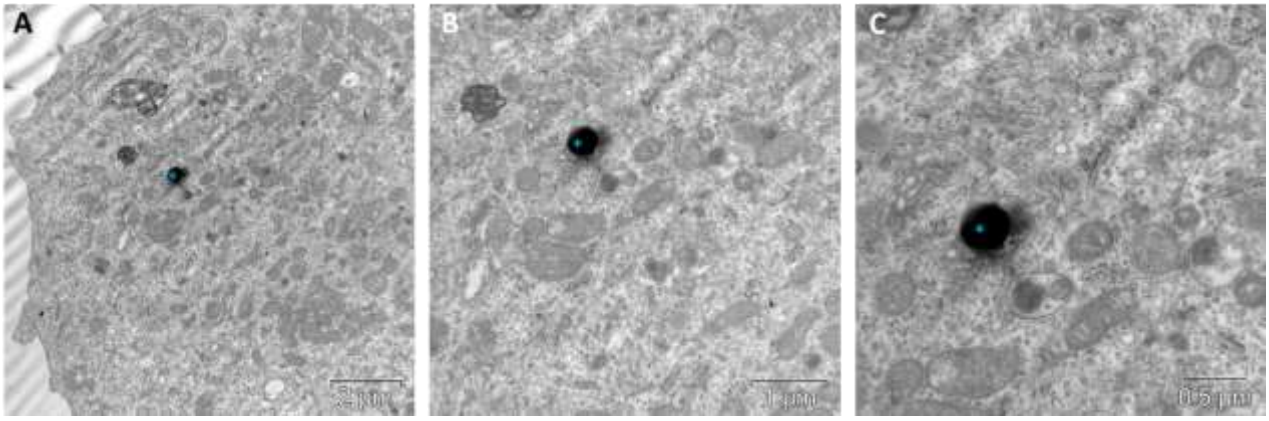

Рис 36. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Видна частица в поздней эндосоме. Голубой звездочкой показана частица.

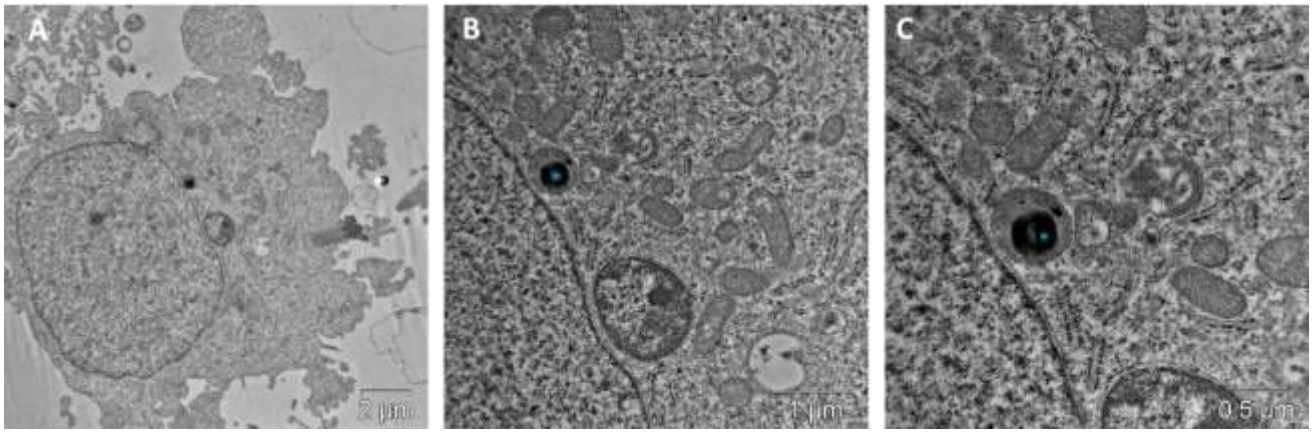

Рис 37. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 8 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Видна частица в лизосоме. Голубой звездочкой показана частица.

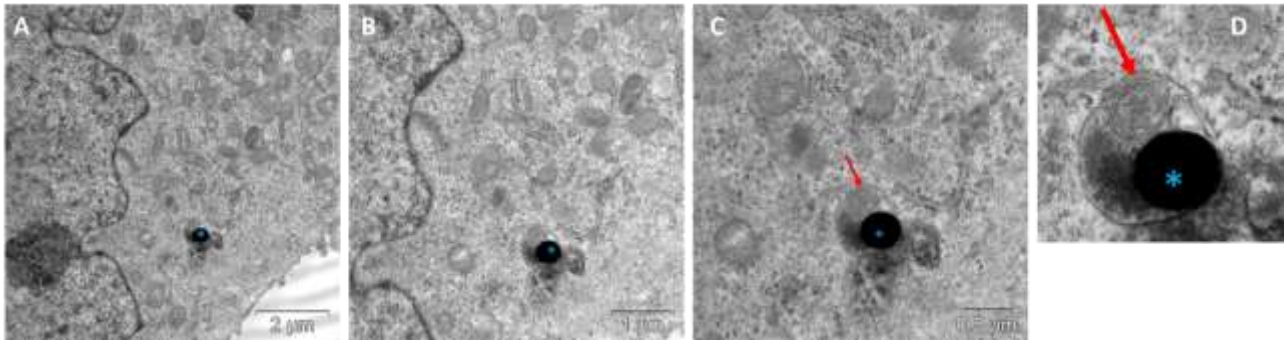

Рис 38. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C), D – приближенное изображение. Видна частица в лизосоме или поздней эндосоме. Красной стрелкой показано миелиновое тельце. Голубой звездочкой показана частица.

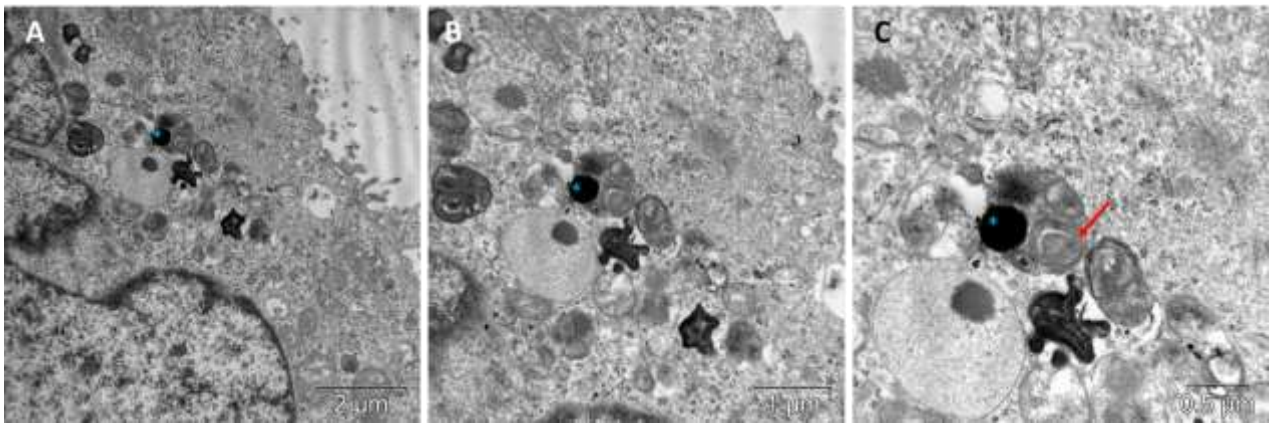

Рис 39. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Видна частица в лизосоме. Красной стрелкой показано миелиновое тельце. Голубой звездочкой показана частица.

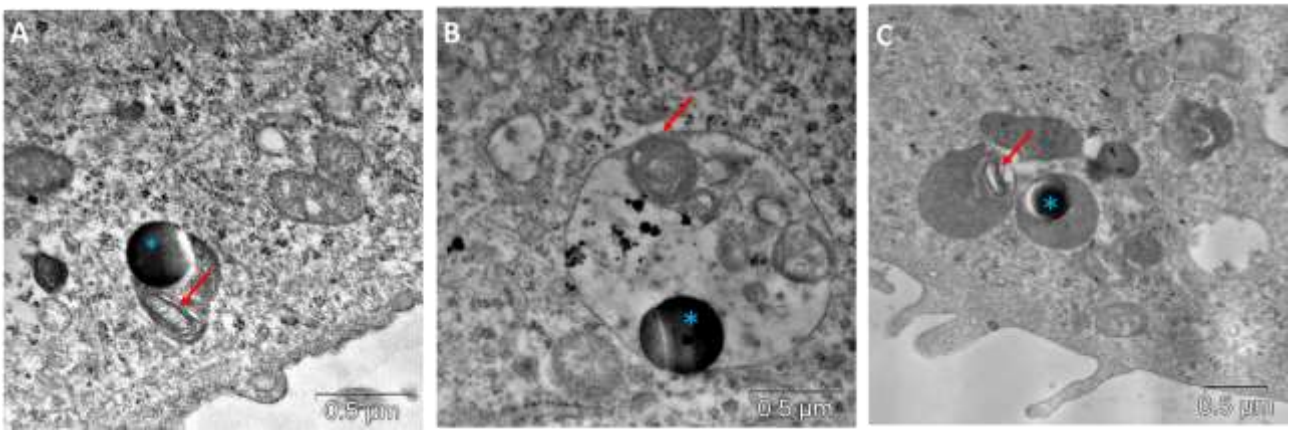

Рис 40. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 60 000 (A, B) и 40 000 (C). Частицы расположены в мультивезикулярном тельце (B) или в лизосомах (A, C). Красной стрелкой отмечены миелиновые тельца. Голубой звездочкой показана частица.

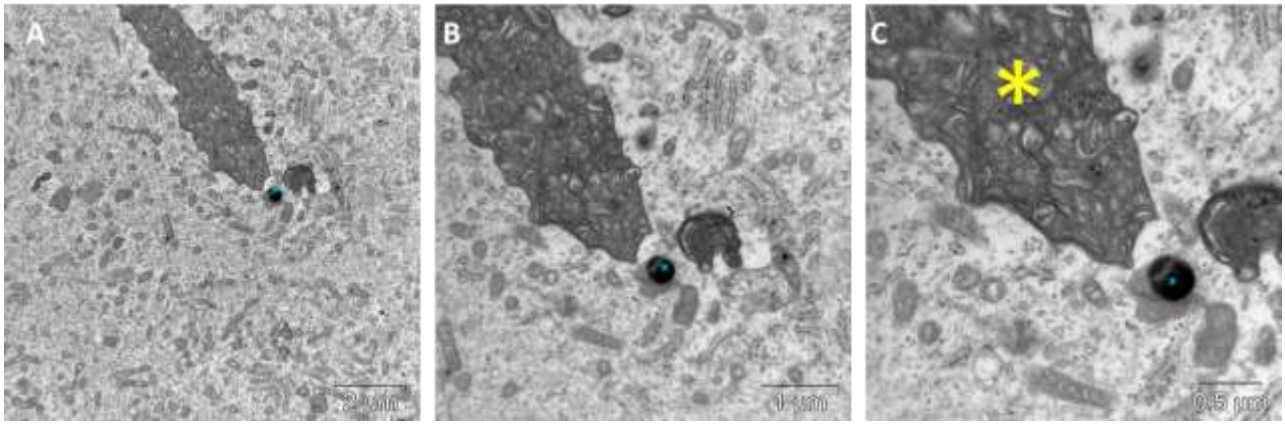

Рис 41. Клетки линии Hep-2 после инкубации с микрочастицами. Электронограммы. Увеличение 12 000 (A), 25 000 (B) и 40 000 (C). Видна частица в лизосоме. Желтой звездочкой показано резидуальное тельце. Голубой звездочкой показана частица.

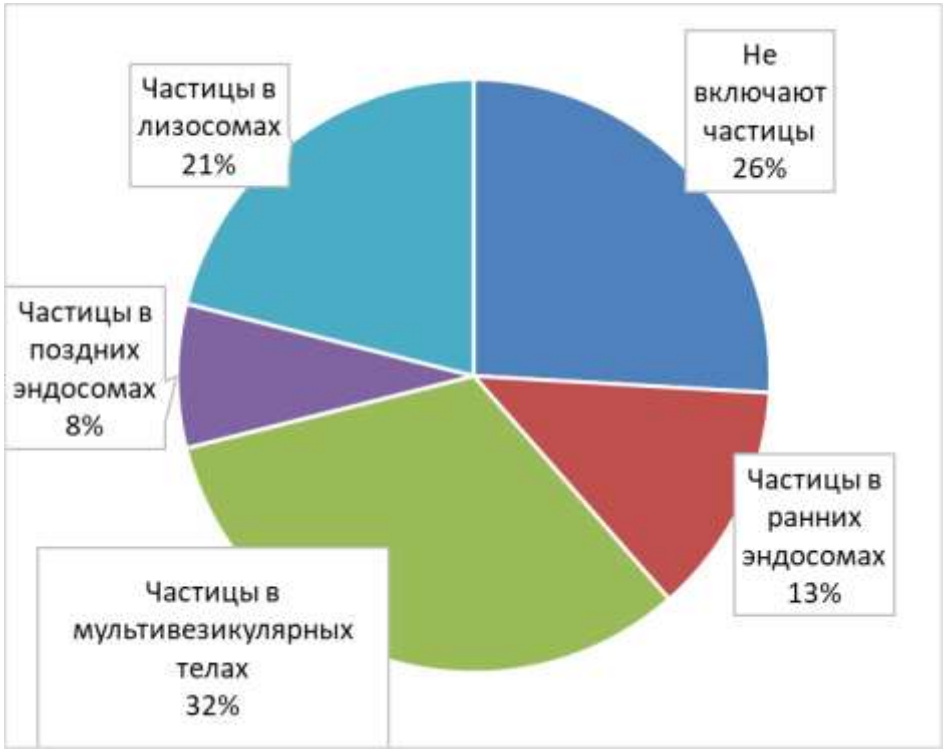

Рис. 42. Доля клеток Hep-2 (в %), включающих микрочастицы в различных клеточных структурах. Общее количество подсчитанных клеток составило 166 штук.

3.3. Исследование наночастиц в качестве фотосенсибилизатора

3.3.1. Исследование фотоиндуцированной токсичности наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ методом двойного окрашивания

Хотя МТТ-тест является наиболее популярным способом оценки клеточной токсичности веществ, для проверки фотоиндуцированной токсичности его может быть недостаточно. Принцип МТТ-теста заключается в том, что МТТ-реагент поглощается клеткой, превращается в формазан благодаря активности клеточных митохондрий, и полученный таким образом формазан считается показателем клеточной жизнеспособности. В случае, если добавленное к клеткам вещество может каким-либо образом снижать метаболическую активность клетки, замедление выработки формазана может произойти даже без клеточной гибели. Поскольку из литературных данных известна способность наночастиц снижать митохондриальный потенциал, требовалась проверка фототоксичности наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ еще одним методом.

Для более точной оценки элиминации опухолевых клеток было проведено дополнительное исследование с использованием двойного окрашивания клеточными красителями йодидом пропидия и Hoechst 33342 (Thermo Fisher

scientific). Йодид пропидия может проникнуть в клетку только после частичного повреждения её мембраны, поэтому данный краситель окрашивает только погибшие клетки. Йодид пропидия обладает эмиссией при длине волны 630-650 нм. Hoechst 33342 окрашивает ДНК живых клеток и проявляет эмиссию на длине волны 450-470 нм. Таким образом, данный метод позволяет получить одновременное окрашивание с непересекающейся эмиссией как погибших, так и живых клеток, инкубированных в среде с препаратом и, в дальнейшем, подвергшихся облучению.

Клетки Hep-2, проинкубированные в 96-луночном планшете с растворами кластерсодержащих наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ и наночастиц, не включающих кластерный комплекс, в диапазоне концентраций от 0 до 0,15 мг/мл, были разделены на 2 группы. Половина лунок с клетками была облучена галогенной лампой в течение 30 мин, вторая половина оставлена без облучения. После этого клетки были окрашены йодидом пропидия и Hoechst 33342. С помощью клеточного сканера IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) были получены снимки клеток и подсчитан процент погибших клеток, окрашенных йодидом пропидия, и живых клеток, окрашенных Hoechst 33342 (рис. 43).

Как видно на рисунке 44, клетки, инкубированные с частицами, не включающими кластерный комплекс молибдена, после облучения сохраняют жизнеспособность даже в наиболее высоких концентрациях добавленных частиц. Число погибших клеток не превышает 20%, что коррелирует с результатами, полученными нами в МТТ-тесте. После облучения клеток, инкубированных с кластерсодержащими частицами, число погибших клеток в концентрациях 0,375, 0,75 и 0,15 мг/мл начинает пропорционально расти, как можно увидеть на рис. 45. В группе клеток, инкубированных с кластерсодержащими наночастицами в концентрации 0,15 мг/мл, после облучения погибло выше 65% клеток. (рис. 45). Это является ярким свидетельством того, что наночастицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, действительно, вызывают элиминацию клеток после облучения.

Метод двойного окрашивания позволяет также определять количество апоптотических клеток, поскольку при конденсации хроматина эти клетки начинают проявлять более яркую люминесценцию при окрашивании Hoechst (рис. 46). После инкубации с наночастицами и последующего облучения

клетки не уходят в апоптоз, и, вероятнее всего, погибают механизмом некроза. Хотя в некоторых случаях активные формы кислорода могут выступать в качестве сигнальных молекул и запускать механизм апоптоза в клетке (Redza-Dutordoir, 2016), некроз всё еще остается наиболее распространенным механизмом клеточной гибели при фотодинамической терапии, поэтому данный результат был ожидаем.

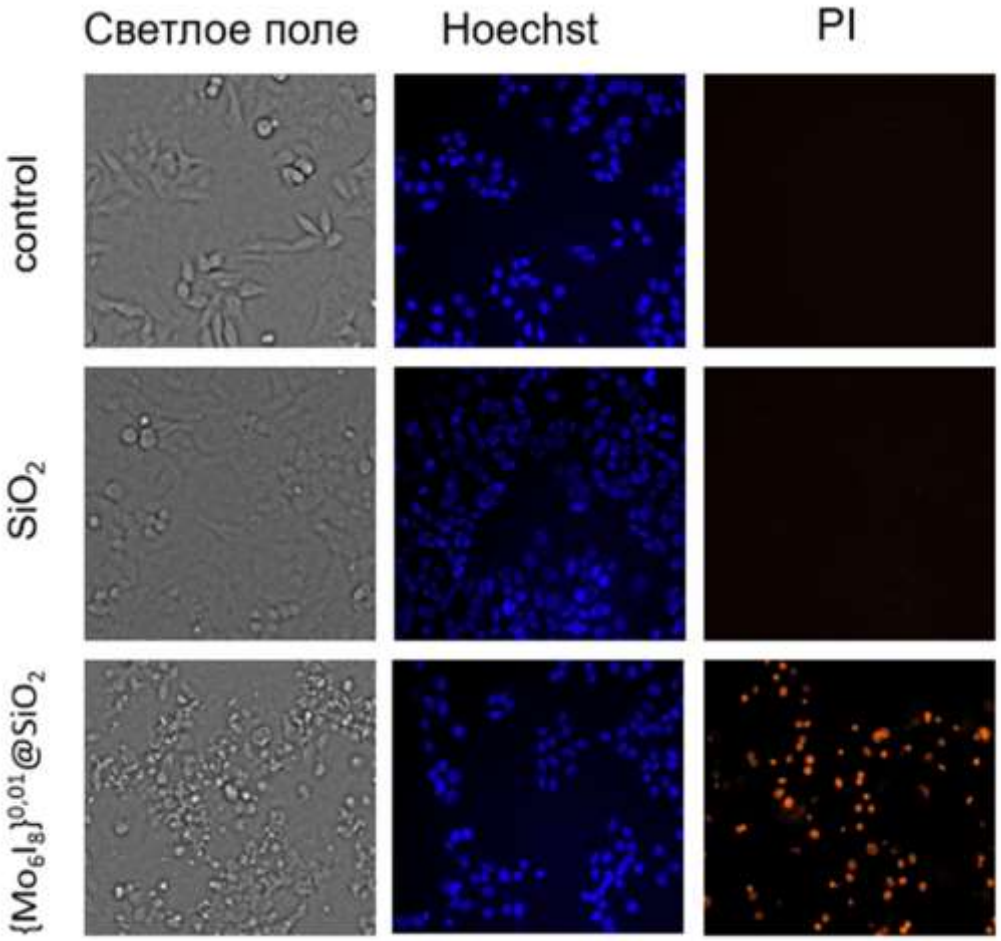

Рис. 43. Изображения, полученные с помощью IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США). Живые клетки окрашены Hoechst 33342 (голубой), погибшие клетки окрашены йодидом пропидия (красный). Контрольные клетки Hep-2 инкубировались в чистой питательной среде (поле control), клетки на поле SiO_2 инкубировались с наночастицами, не включающими кластерный комплекс молибдена в концентрации 0,15 мг/мл, клетки на поле $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ инкубировались с наночастицами, включающими кластерный комплекс молибдена, в концентрации частиц 0,15 мг/мл. Изображения получены после облучения клеток галогенной лампой.

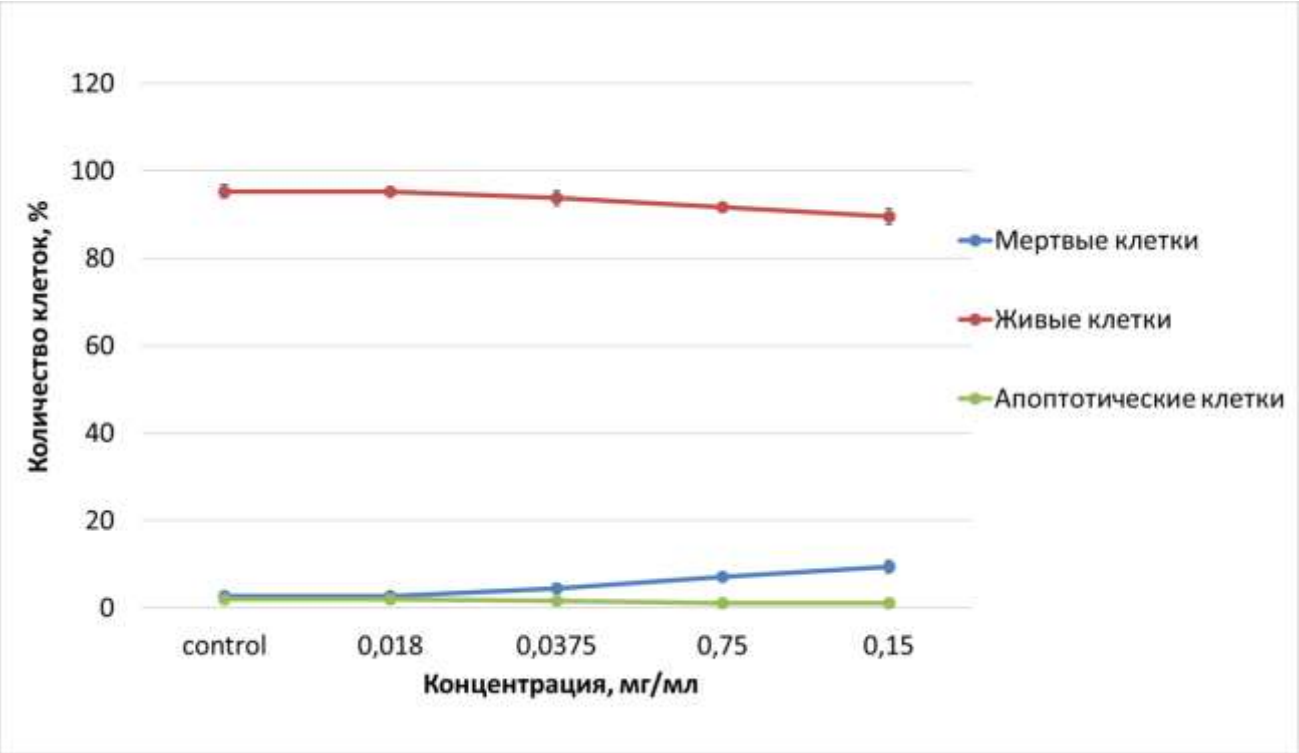

Рис. 44. Изменение жизнеспособности клеток линии Hep-2 после 24 часов инкубации с различными концентрациями не содержащих кластер наночастиц диоксида кремния SiO_2 и облучения галогенной лампой в течение 30 минут. Окрашивание йодидом пропидия и Hoechst.

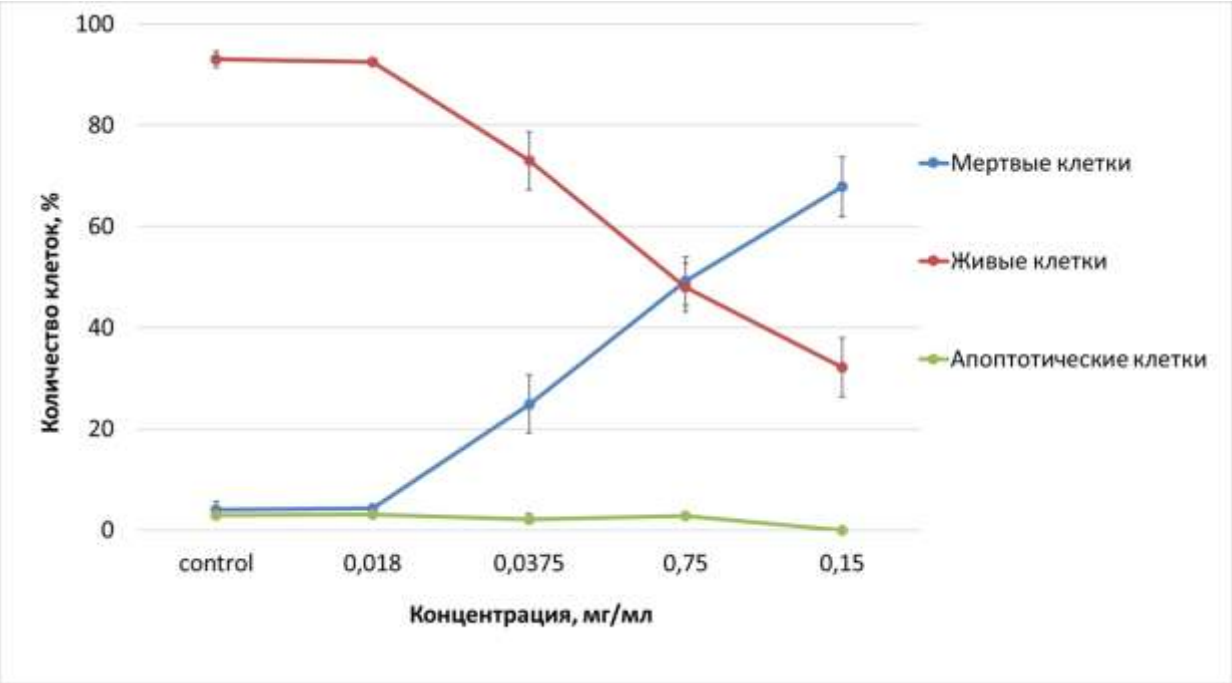

Рис. 45. Изменение жизнеспособности клеток линии Hep-2 после 24 ч инкубации с различными концентрациями кластерсодержащих наночастиц диоксида кремния $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ и облучения галогенной лампой в течение 30 мин. Окрашивание йодидом пропидия и Hoechst.

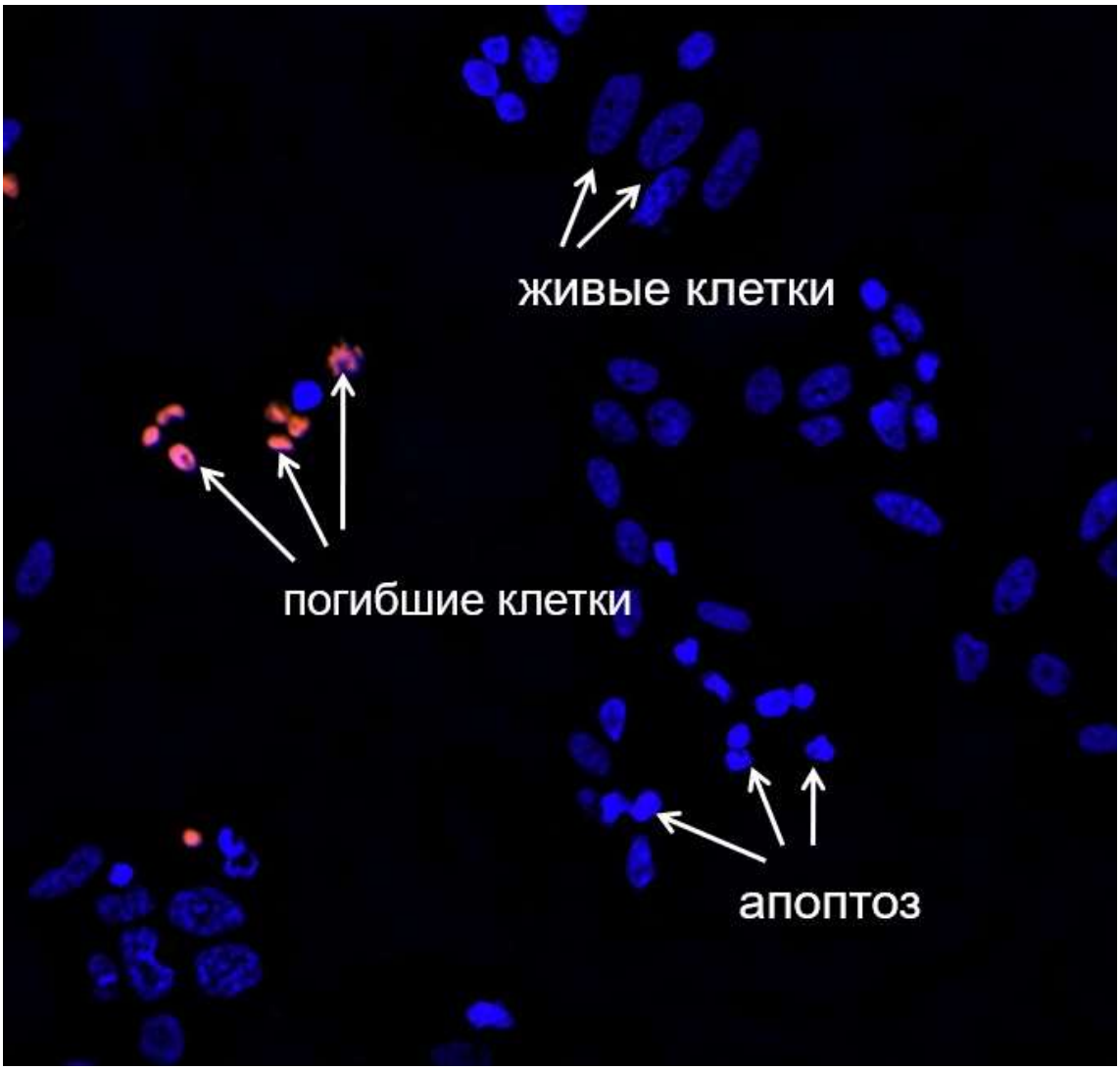

Рис. 46. Отличия в окраске клеток при анализе с помощью метода двойного окрашивания. Изображение получено с помощью IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

3.3.2. Оценка внутриклеточной локализации наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ с помощью конфокальной микроскопии

Для понимания эффективности потенциального фотосенсибилизатора важно знать его положение внутри клетки. При работе с наночастицами необходимо выявить, образуют ли они внутри клетки агломерации, или диффузно распределены в цитоплазме, поскольку это может иметь значение для механизма их внутриклеточной токсичности. И тот, и другой вариант распределения может иметь свои плюсы. Диффузное распределение в клеточной цитоплазме может облегчить проникновение наночастиц в клеточное ядро. Для наночастиц диаметром меньше 70 нм была показана способность проходить через ядерные поры (Jaganathan, 2012). В случае, если полученные в данной

работе наночастицы действительно окажутся способны к проникновению в ядро опухолевых клеток, к их фотодинамической эффективности может добавиться и генотоксичность.

С другой стороны, скапливание наночастиц в виде агломератов внутри клетки может обеспечить локальное выделение высоких концентраций активных форм кислорода. Такое внутриклеточное расположение позволило бы наночастицам вызывать повреждение митохондриальных мембран и утечку ферментов из лизосом. Подобное действие на опухолевые клетки уже описано для некоторых типов наночастиц. Авторы этих работ отмечают, что скопления наночастиц внутри клетки способно приводить к запуску апоптоза путем активации каспаз 3 и 9 (Napierska, 2009; Dong, 2020). Итак, от распределения наночастиц внутри клетки может значительно зависеть механизм их внутриклеточной токсичности, поэтому этот параметр было важно исследовать в данной работе. Кроме того, метод флуоресцентной микроскопии может позволить оценить, насколько хорошо наночастицы определяются внутри клетки.

Клетки Hep-2 были проинкубированы с наночастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$. После инкубации и фиксации клетки окрашивались флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific) и AlexaFluor™ 532 Phalloidin (Sigma-Aldrich). Hoechst окрашивает ядра клеток в голубой цвет, а Phalloidin окрашивает цитоскелет в желтый цвет. Полученные изображения позволяют легко локализовать наночастицы в клетке благодаря люминесцентным свойствам кластерных комплексов молибдена в составе их матрицы (рис. 47). В результате данного анализа было выявлено, что наночастицы в цитоплазме клеток, преимущественно, образуют скопления. Агломераты наночастиц располагаются в клеточной цитоплазме, не заходя в ядро клетки – это согласуется с литературными данными, показывающими, что для проникновения в клеточное ядро частицы должны быть распределены в клетке диффузно. Исходя из наблюдаемой на флуоресцентном микроскопе картины, можно предположить, что фотоиндуцированная токсичность наночастиц обусловлена не их воздействием на клеточное ядро, а высвобождением высоких концентраций активных форм кислорода в цитоплазме.

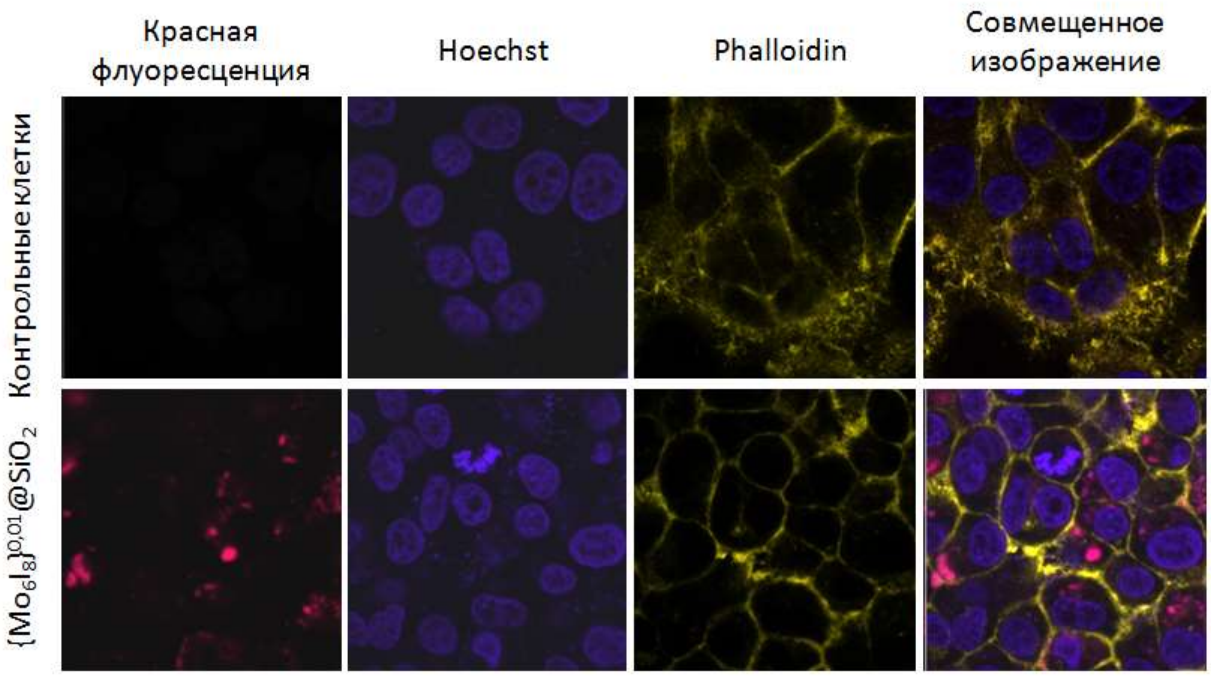

Рис. 47. Локализация наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ внутри клеток Hep-2. Окраска Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific) и Alexa Fluor™ 532 Phalloidin (Sigma-Aldrich).

3.3.3. Электронно-микроскопическое картирование наночастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$.

Поскольку изображения, полученные на флуоресцентном микроскопе, позволяют лишь приблизительно судить о локализации наночастиц внутри клетки, был проведен более точный анализ их распределения в цитоплазме с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Так как наночастицы могут походить на внутриклеточные структуры благодаря своему малому диаметру (например, на гранулы гликогена), их локализация в клетке проводилась с использованием элементного картирования. Элементное картирование проводили на ультратонких срезах клеточной культуры Hep-2, проинкубированной с наночастицами. Этот метод позволяет находить заданный элемент и точно определить его расположение на участке препарата. Для минимизации возможного фона при элементном картировании ультратонкие срезы слабо контрастировались при изготовлении. В данном эксперименте картирование проводилось по молибдену.

Результаты электронно-микроскопического элементного анализа подтверждают данные, полученные на флуоресцентном микроскопе. Наночастицы после попадания в клетку собираются в группы внутри цитоплазмы.

Большая часть наночастиц располагаются в цитоплазме в свободном виде, лишь редкие группы собираются внутри эндосом (рис. 48). Поскольку данный метод не позволяет высокого контрастирования ультратонких срезов, сложно судить о конкретных клеточных структурах, с которыми могли бы взаимодействовать наночастицы. Опираясь на полученные данные, можно подтвердить картину, наблюдаемую на флуоресцентной микроскопии – наночастицы действительно не проникают в клеточное ядро.

Неспособность наночастиц пересекать ядерную мембрану говорит в пользу их безопасности для клеток в отсутствие облучения. Их поведение в клетке, наблюдаемое с помощью флуоресцентного микроскопа и трансмиссионной электронной микроскопии, совпадает с поведением, описанным для некоторых других типов наночастиц. После попадания в клетку частицы образуют скопления либо в эндосомах и лизосомах, либо непосредственно в цитоплазме. Поскольку наночастицы практически не перемещаются внутри клетки поодиночке, у них нет возможности проникнуть в клеточное ядро и вызвать какие-либо изменения в структуре ДНК или затормозить клеточный цикл, как это было описано для некоторых других наночастиц (Durnev, 2010; Waters, 2009; Ji, 2021).

Таким образом, в отсутствие облучения наночастицы не представляют для клетки опасности, как это было показано в эксперименте по исследованию темновой токсичности наночастиц. Полученные в данной работе наночастицы становятся токсичными для клеток только при активации светом. Если при проведении фотодинамической терапии часть наночастиц попадет в клетки здоровых тканей, можно предполагать, что эти ткани не будут значительно повреждены, поскольку облучение будет сконцентрировано лишь на опухолевых тканях.

3.3.4. Оценка продукции клетками активных форм кислорода до и после облучения

Для оценки механизма токсического действия наночастиц при облучении, клетки линии Hep-2 были проинкубированы с раствором частиц и с красителем 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетатом (DCF) (Sigma-Aldrich). Данный краситель проникает в клетки и в состоянии покоя не выявляет способности к люминесценции.

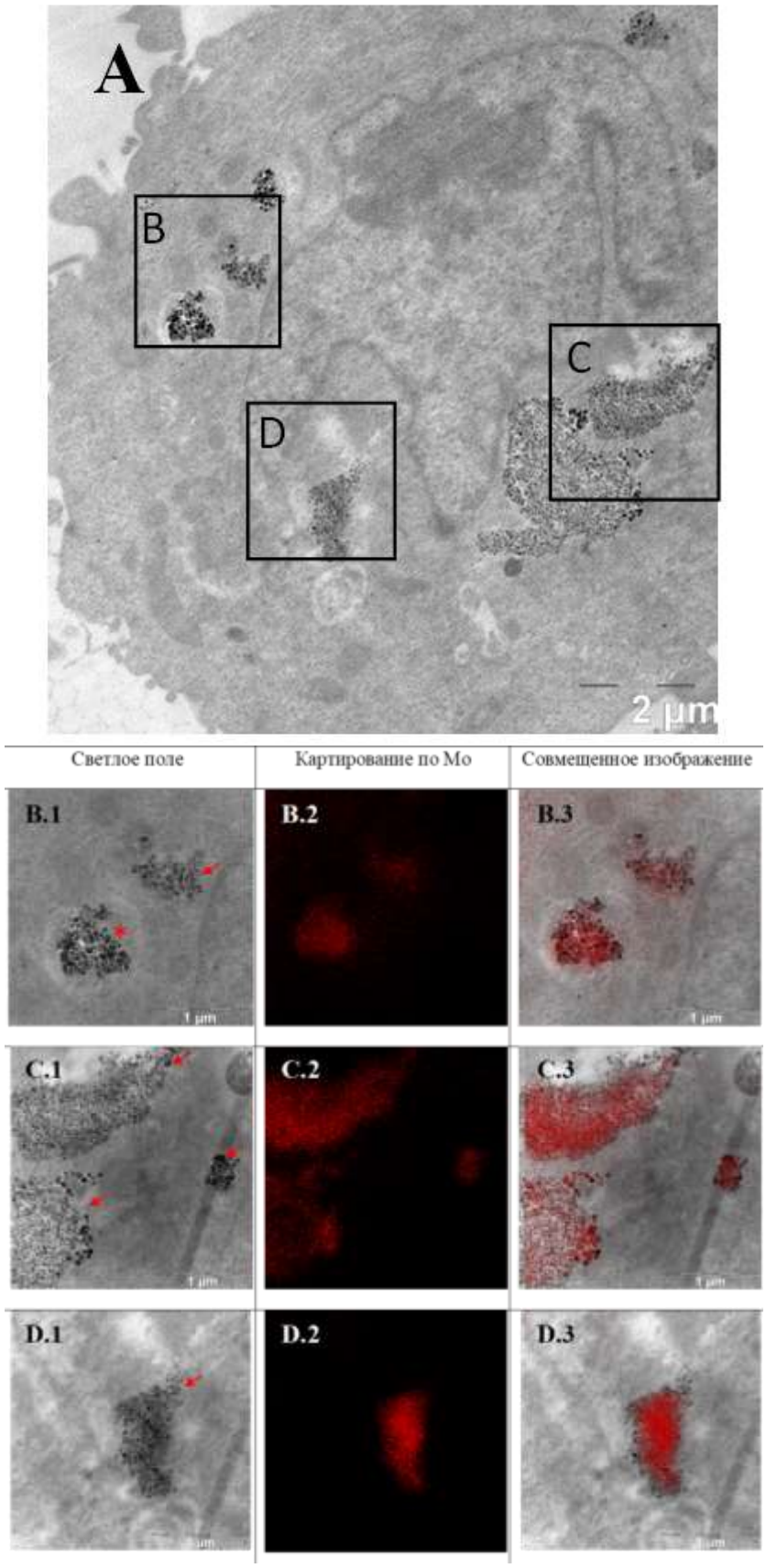

Рис. 48. Локализация наночастиц в цитоплазме клеток Hep-2. A – клетка с отмеченными полями локализации наночастиц. B, C, D – изображения фрагментов клеток с конгломератами наночастиц в цитоплазме, полученные элементным картированием по Mo. Стрелками отмечены свободные наночастицы в цитоплазме, звездочкой – наночастицы в эндосоме.

Как только в клетке начинают образовываться избыточные количества активных форм кислорода (ROS), краситель DCF активируется и начинает проявлять яркую люминесценцию в спектре 520 нм. Интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации ROS в клетке. Таким образом, в данном эксперименте была измерена интенсивность люминесценции клеток до и после облучения, что позволило нам судить, включает ли механизм фотоиндуцированной токсичности наночастиц выделение ROS.

В качестве положительного контроля были использованы клетки, инкубированные с перекисью, в качестве отрицательного – клетки, инкубированные в чистой среде. Третья группа клеток была инкубирована с радахлорином. Поскольку радахлорин является зарегистрированным и используемым в клинике фотосенсибилизатором, он был использован в качестве сравнения и ориентира.

Общая интенсивность флуоресценции в описанных группах клеток до и после облучения представлена на рис. 50. Как и предполагалось, клетки, инкубированные с перекисью, проявляют наиболее высокую интенсивность люминесценции как до, так и после облучения. Клетки, инкубированные с радахлорином, проявляют крайне низкую люминесценцию до облучения и высокую – после. Это говорит о том, что радахлорин, действительно, был активирован светом и может использоваться как референсный образец для наночастиц. Как видно из результатов, представленных на рис. 49 и 50, клетки, инкубированные с наночастицами, производят количество активных форм кислорода, практически идентичное клеткам, инкубированным с радахлорином. Уровень ROS, выделяемый внутри клеток после их облучения, очень схож для наночастиц и радахлорина. В группе клеток, инкубировавшихся с радахлорином, и клеток, инкубировавшихся с наночастицами, показаны достоверные отличия в уровне ROS между клетками до облучения и клетками после облучения ($p<0,005$). Небольшая разница в люминесценции до облучения между клетками, инкубированными с наночастицами, и контрольными клетками, говорит о том, что даже в нетоксичной концентрации наночастицы оказывают небольшой оксидативный стресс на клетки. Это может быть связано с поверхностным натяжением малых по диаметру частиц, которое иногда может оказывать активирующий эффект на митохондриальные мембраны (Gao, 2021).

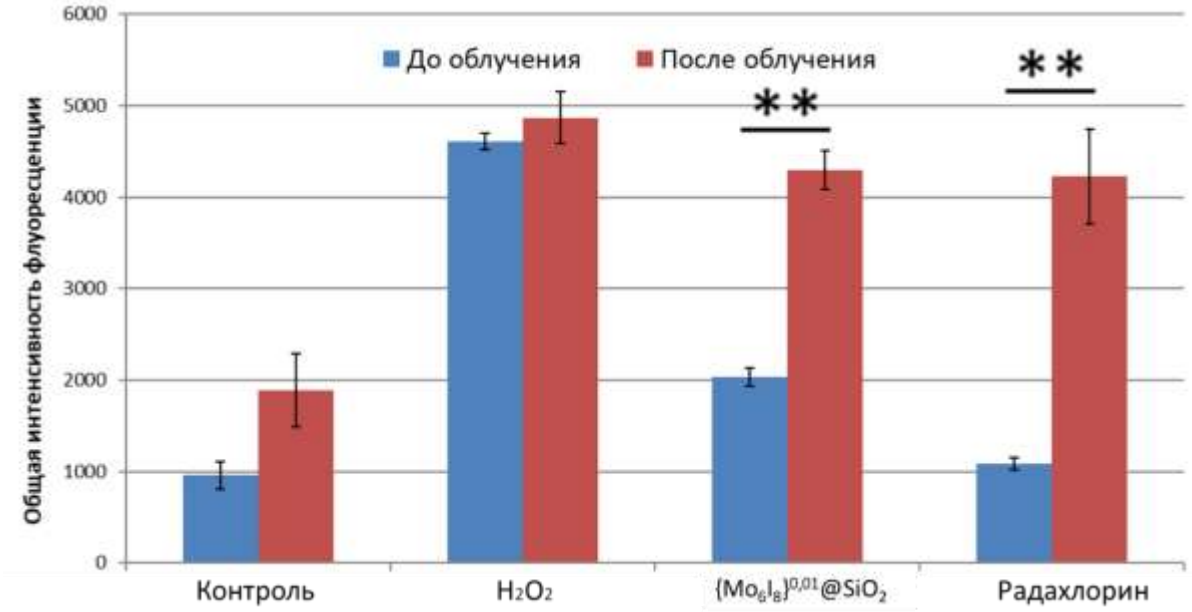

Рис. 49. Интенсивность люминесценции внутриклеточного красителя 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich) до и после облучения клеток Hep-2.

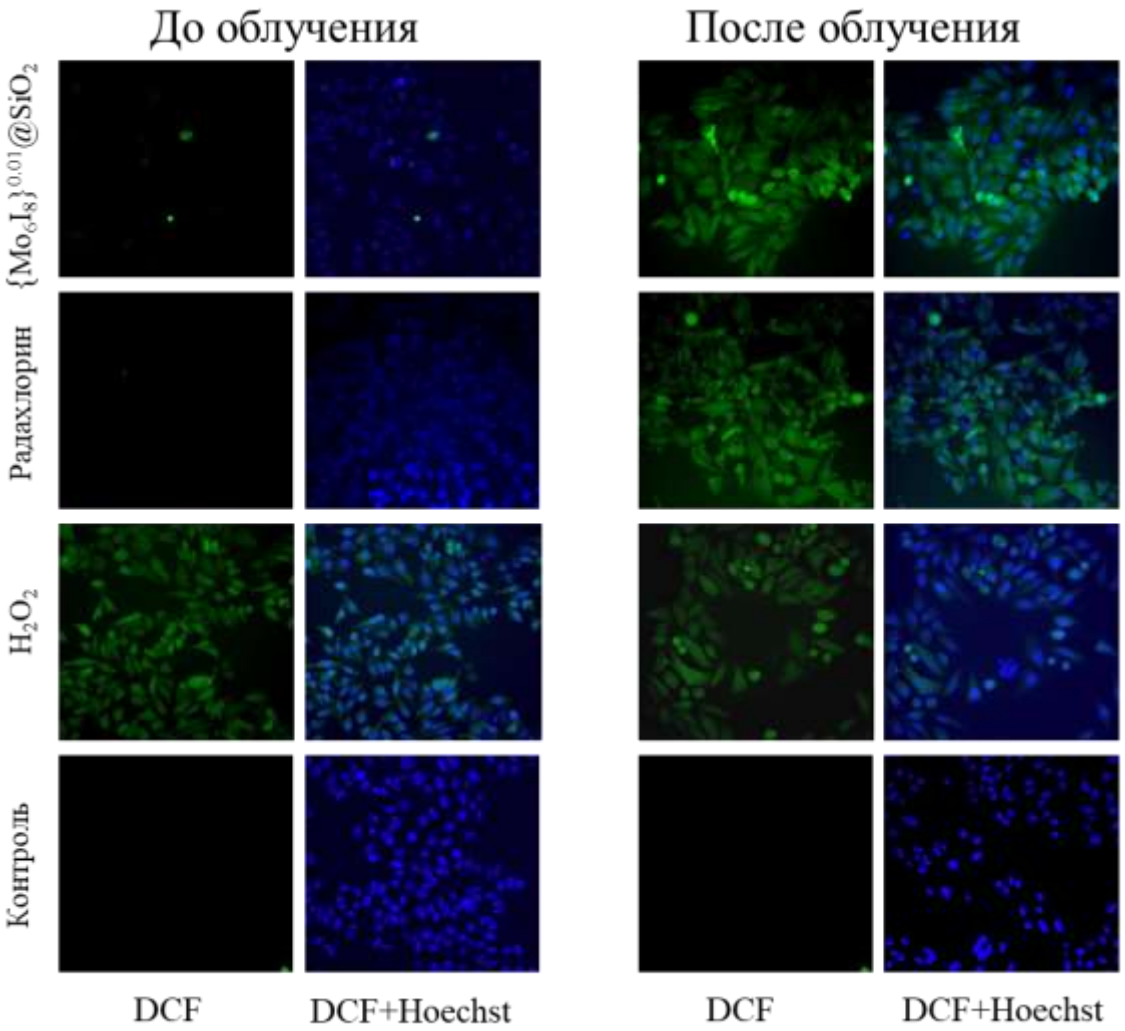

Рис. 50. Люминесценция красителя 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich) в клетках линии Hep-2 до и после облучения. Ядра клеток окрашены Hoechst 33342.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Оценка свойств кластерных комплексов молибдена в растворе и их биологические эффекты. Октаэдрические кластерные комплексы молибдена являются перспективными соединениями для использования в качестве фотосенсибилизаторов и люминесцентных агентов благодаря своей способности проявлять яркую долгоживущую люминесценцию в красном спектре и генерировать синглетный кислород при активации светом (Fedorenko, 2020, Evtushok, 2017). Тем не менее, изучение данных веществ на биологических объектах практически не проводится из-за крайне низкой стабильности данных кластерных комплексов в водной среде и при контакте с воздухом. В данной работе была предпринята попытка увеличить стабильность йодидных кластерных комплексов молибдена путем включения в их состав более стабильных внешних лигандов. Структура октаэдрических кластерных комплексов позволяет достаточно просто заменить внешний лиганд, оставив при этом кластерное ядро и внутренний лиганд неизменными (см. рис. 1). В данной работе внутренний лиганд кластерного комплекса оставался неизменным – I – а внешние лиганды менялись с целью подобрать наиболее стабильный.

Кластерный комплекс (1), $Na_2[Mo_6I_8$(2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]ацетат$)_6]$, показал крайне низкую стабильность – метод светового рассеивания продемонстрировал, что уже через 4 часа нахождения в водном растворе данное вещество начинает гидролизоваться и образовывать агломераты. Для данного соединения была показана незначительная фотоиндуцированная токсичность на опухолевых клетках Hep-2, однако его высокая темновая токсичность не позволяет использовать данное вещество в более эффективных концентрациях. Кроме того, такая высокая скорость гидролиза предполагает, что после суток инкубации в питательной среде кластерный комплекс уже в значительной степени гидролизован, и на момент облучения клеток рентгеном или лампой в клетках остается лишь незначительное количество не гидролизованных форм кластерного комплекса. Это также могло повлиять на такую низкую эффективность данного соединения в качестве фотосенсибилизатора.

Вторая попытка стабилизировать кластерный комплекс молибдена заключалась в замене внешних лигандов на группы диметилсульфоксида

(ДМСО) с получением кластерного комплекса (2) – $[\{M_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$. Это соединение показало более высокую стабильность по сравнению с кластерным комплексом (1), однако всё еще подвергалось значительному гидролизу в водной и питательной среде. В ходе изучения биологических эффектов кластерного комплекса (2) возник вопрос – влияет ли гидролиз комплекса на его биологические эффекты? С целью более детального изучения этого вопроса были проведены эксперименты для свежего, только что растворенного кластерного комплекса (2), и для кластерного комплекса (2), который выдержали в растворе 4 суток. Данные вещества показали отличия в цитотоксичности – свежий кластерный комплекс характеризовался более высокой цитотоксичностью по сравнению с выдержанным раствором. Вероятно, такие отличия можно объяснить различными процессами, начинающими происходить с комплексами после их добавления в питательную среду и начала инкубации с клетками.

В случае выдержанного раствора кластерный комплекс уже преодолел стадию замещения терминальных лигандов, в то время как для свежего раствора это замещение начинается непосредственно в момент добавления к клеткам. Фотоиндуцированная токсичность была показана только для выдержанного раствора, однако мы не можем говорить, что он является более фототоксичным по сравнению со свежим раствором. Фотоиндуцированная токсичность у выдержанного раствора проявлялась только в высоких концентрациях, которые для свежего раствора не использовались из-за их токсичности, поэтому объективно сравнить фотоиндуцированную токсичность этих соединений мы не можем.

Кластерные комплексы молибдена в виде раствора проявляют некоторые многообещающие биологические эффекты – такие, как тенденция к фотоиндуцированной токсичности для кластерного комплекса (1) или снижение жизнеспособности опухолевых клеток при облучении после инкубации с выдержанным кластерным комплексом (2) в концентрациях от 0,16 до 0,65 мМ. Тем не менее, низкая стабильность этих соединений всё еще сильно ограничивает полное раскрытие их потенциала. Для наиболее эффективной стабилизации кластерных комплексов молибдена было проведено их включение в матрицу аморфного диоксида кремния с получением частиц диаметром 50±2 и 500±33 нм.

4.2. Поиск оптимального способа применения частиц диоксида кремния с диаметром 50 и 500 нм, включающих в состав матрицы кластерный комплекс молибдена. В данной работе были впервые получены нано- и микрочастицы диоксида кремния, включающие в состав своей матрицы кластерный комплекс молибдена. Такие структуры могут быть применены в широком диапазоне научных и медицинских областей. Обсуждаются три наиболее вероятных области применения для полученных частиц, в которых их потенциал может раскрыться наиболее эффективно – это использование в качестве рентгеноконтрастных препаратов, фотодинамическая терапия и агенты для доставки биологически активных молекул.

Наличие в составе кластерного комплекса молибдена атомов тяжелых элементов (Mo) предполагает способность этих соединений эффективно поглощать рентгеновское излучение. Нашей исследовательской группой ранее была показана значительная рентгеноконтрастность кластерного комплекса молибдена (Krasilnikova, 2015, 2017). Частицы, включающие рентгеноконтрастный кластерный комплекс, могут стать более эффективной альтернативой для широко применяющихся в настоящее время в клинике рентгеноконтрастных соединений на основе йода и гадолиния. Необходимость в поиске альтернатив применяемым в настоящий момент в клинике рентгеноконтрастным веществам вызвана наличием у йодных и гадолиниевых соединений значительных побочных эффектов, таких как тиреотоксикоз, аллергические реакции и нефропатия.

В настоящее время растворы наночастиц металлов активно тестируются как потенциальные агенты для рентгеноконтрастной диагностики. К примеру, частицы золота, обладающие высоким коэффициентом поглощения, были успешно протестированы в нескольких работах как удачные агенты для введения в кровеносную систему мыши (Hainfeld, 2006). Также высокую ретгеноконтрастность демонстрируют магнитные наночастицы (Vuong, 2017). Хотя обычно в роли потенциальных рентгеноконтрастеров выступают наноразмерные частицы, в некоторых работах для этой цели изучались и микрочастицы. Так, в работе с клиноптилолитовыми частицами было проведено сравнение рентгеноконтрастности микро- и наночастиц, модифицированных барием. Оба типа частиц показали высокую стабильность и контрастность (Hosseini, 2020). Еще один параметр, которым должны обладать потенциальные агенты

для рентгеноконтрастной диагностики – низкая способность к накоплению в клетках. При введении в сосудистую систему препарат должен проходить по сосудам, не задерживаясь в органах и тканях организма, и быстро выводиться через мочевыделительную или пищеварительную систему. Таким образом, нам необходимо было оценить токсичность изучаемых частиц и кинетику их накопления в клетках для того, чтобы сделать вывод об их потенциале в качестве рентгеноконтрастирующих препаратов.

Еще одно свойство, которым обладает кластерный комплекс молибдена – это его способность активироваться видимым светом и генерировать активные формы кислорода (Fedorenko, 2020, Evtushok, 2017). Это позволяет отнести частицы, включающие данный комплекс в состав своей матрицы, к потенциальным фотосенсибилизаторам. Фотодинамическая терапия – область терапии опухолей, которая с каждым годом используется всё интенсивнее (Nyokong, 2012, Liang, 2020). Несмотря на значительный прогресс, сделанный за последние десятилетия в области разработки новых эффективных агентов для данного типа терапии, используемые сейчас вещества всё еще обладают рядом недостатков. Среди таковых можно перечислить низкую селективность, токсичность для здоровых клеток и слишком быстрое выведение из клеток (Rkein, 2014). Значительные трудности в поиске препаратов с оптимальными параметрами заключаются в том, что молекулы фотосенсибилизаторов редко поддаются модификации. Это ограничивает возможности исследователей изменять физико-химические свойства перспективных фотосенсибилизаторов и подгонять их под клинические нужды. По этой причине сейчас происходит постепенный переход от использования простых молекул фотосенсибилизатора к так называемым «каркасным» конструкциям, когда активная молекула включается в состав более крупной структуры – к примеру, микро- или наночастицы. Использование частиц в фотодинамической терапии активно изучается в последние годы. Рядом авторов был выведен список параметров, которым должны обладать эффективные фотосенсибилизирующие агенты (Zhang, 2020). В отсутствие света такие агенты должны обладать минимальной токсичностью, тогда как при активации светом, напротив, должны проявлять способность к активной элиминации клеток. Кроме того, необходимо, чтобы частицы хорошо проникали в клетки и задерживались в них на время, достаточное для проведения облучения. Использование кремниевых частиц в качестве

носителей фотоактивных препаратов уже предлагалось ранее (Borzęcka, 2016), однако исследование частиц диоксида кремния, включающих в свой состав кластерный комплекс молибдена, в данной работе было проведено впервые.

Наконец, яркая и долгоживущая люминесценция кластерного комплекса молибдена позволяет легко локализовать его в клетке. Полученные нами частицы поглощают ультрафиолетовые и видимые волны длиной до 550 нм и излучают в области 600–830 нм с максимумом излучения при ~ 700 нм (Fedorenko, 2020, Evtushok, 2017). Это дает нам основание предположить, что молибден-содержащие частицы могут применяться как биосовместимые маркеры или отслеживаемые агенты для доставки в клетку биологически активных веществ. Многие молекулы, которые бывает необходимо поместить в клетку в научно-исследовательских целях или в ходе терапии, неспособны пересекать клеточную мембрану самостоятельно. В случае же самостоятельного пересечения мембраны большинство из них подвергаются быстрому расщеплению лизосомальными ферментами до того, как успевают оказать желаемый эффект на клетку (Yu, 2020). Для преодоления этих трудностей ведется поиск транспортных агентов, способных проникать в клетки на достаточно продолжительное время и не проявляющих значительной токсичности ни в темноте, ни при активации светом. В случае выполнения этих условий частицы оксида кремния могут эффективно выполнять роль доставщиков. Кластерная метка, включенная в их матрицу, позволит с легкостью визуализировать частицы в условиях эксперимента и с высокой точностью установить локализацию транспортируемых агентов в клетке. Для повышения эффективности транспортировки необходима модификация поверхности частиц с целью увеличения максимально возможной нагрузки транспортируемыми молекулами. В данной работе модификация поверхности проводилась с использованием групп (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана, для которых доказана способность повышать прочность связей переносимых молекул с функционализированной поверхностью (Kayan, 2014).

Основной задачей данного исследования являлось проведение сравнения эффективности использования двух типов частиц диоксида кремния, которые включали в свой состав кластерный комплекс молибдена. Эти частицы были одинаковы по составу, но в 10 раз отличались в диаметре – наночастицы обладали диаметром 50±2 нм, а микрочастицы – 500±33 нм. Сравнение

зависимости биологических эффектов частиц от их диаметра – это актуальная задача, которой сейчас начинает уделяться всё больше внимания. Во многих работах показано, что частицы с различным диаметром обладают различными механизмами токсичности (Brandao, 2021), способами проникновения в клетку (Flood-Garibay, 2021) и эффектами на организм в целом (Handa, 2017). Логично предположить, что и области применения для частиц с разными диаметрами будут различны. Для частиц диоксида кремния, допированных кластерным комплексом молибдена, ранее не проводилось исследование зависимости биологических эффектов от диаметра частиц. Именно поэтому данному вопросу также уделяется большое внимание в этой работе.

На первом этапе работы представлялось необходимым оценить такие параметры, как темновая токсичность частиц, их способность проникать в клетки и фотоиндуцированная токсичность. Параметры частиц, оцененные на первом этапе, позволяют отнести частицы к одной из трех областей применения, перечисленных выше – рентгеноконтрастные агенты, фотосенсибилизаторы или люминесцентные агенты для доставки препаратов в клетку. Кроме того, на данном этапе проводилось сравнение частиц различного диаметра между собой, что позволило выявить некоторые закономерности влияния размера частиц на их свойства. Второй этап работы заключается в более подробном исследовании нано- и микрочастиц в предлагаемых областях применения.

На момент начала данного исследования было непонятно, будет ли концентрация кластерного комплекса молибдена в матрице диоксида кремния влиять на токсичность частиц для клеток. Чтобы ответить на этот вопрос, были получены микро- и наночастицы с различными долями кластерного комплекса в их составе. Частицы $\{Mo_6I_8\}^{0,001}@SiO_2$ включали 1 мг, а частицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ – 10 мг кластерного комплекса на 1 г кремния, поскольку это максимально возможная массовая доля кластерного комплекса в частицах диоксида кремния. Методом МТТ-теста было показано, что после инкубации клеток линии Hep-2 с растворами данных частиц, токсический эффект, оказанный на клетки, достоверно не отличался для частиц с одинаковым диаметром, но различными концентрациями кластерного комплекса $\{Mo_6I_8\}$. Эти результаты позволяют нам заключить, что включение кластерного комплекса молибдена в состав матрицы диоксида кремния нивелирует собственные токсические эффекты данного кластера, оставляя лишь цитотоксичность самих

частиц. Это можно объяснить тем, что токсичность кластерных комплексов обусловлена их проникновением в клетки в свободном виде (Vorotnikova, 2016). Поскольку кластерный комплекс в составе кремниевой матрицы крепко связан с диоксидом кремния, выход его в чистом виде из состава частиц практически невозможен. За счет этого, основной фактор токсичности данных веществ был элиминирован.

Таким образом, включив в частицы значительные количества молибденового комплекса, мы получили легко определяемые в клетке агенты доставки, эффективные фотосенсибилизаторы или высококонтрастные препараты, не увеличивая при этом их опасность для клеток и организма в целом. Поскольку различное содержание кластерного комплекса в частицах не влияло на их токсичность, в дальнейших исследованиях стало возможным использовать микро- и наночастицы с максимальной долей включенного кластера молибдена – 10 мг кластерного комплекса $\{Mo_6I_8\}$ на 1 г диоксида кремния.

Еще одно наблюдение, которое можно сделать на основании результатов, полученных в данном эксперименте – микрочастицы обладают более высокой цитотоксичностью по сравнению с наночастицами. Полуингибирующие концентрации растворов микрочастиц лежат в диапазоне 1,687-1,755 мг/мл, тогда как полуингибирующие концентрации наночастиц не были достигнуты (Таб. 2). Эти результаты были достаточно неожиданны, поскольку в литературных данных, как правило, наиболее токсичными для клеток оказываются наночастицы. Более высокая токсичность наночастиц по сравнению с микрочастицами была показана на таких клеточных линиях, как кожные фибробласты (Quignard, 2012) и легочные фибробласты V79 (Guichard, 2016), HeLa (Lu, 2009), мышиные клетки Лангерганса XS52 (Nabeshi, 2010), клетки альвеолярной карциномы A549 (Fede, 2014, Wottrich, 2004, Napierska, 2012) и аденокарциномы легких Calu-3 (McCarthy, 2012), эпителиальные клетки бронхов BEAS-2B (Li, 2016, 2019), клетки миокарда крысы H9c2 (Ye, 2010) клетки печени крысы BRL (Sun, 2013), клетки гепатокарциномы человека HepG2 (Li, 2011), кератиноциты человека HaCaT (Yang, 2010, Gong, 2017) и т.д. Хотя низкая токсичность полученных в данной работе наночастиц – это многообещающий результат, объяснить более высокую токсичность для микрочастиц затруднительно. Возможно, более высокая токсичность микрочастиц связана с их медленным выведением из клетки. Требуются дополнительные исследова-

ния этого феномена. Более высокая биологическая совместимость наночастиц по сравнению с микрочастицами позволяет сделать заключение о наибольшей адекватности их использования в качестве рентгеноконтрастных или фотоиндуцируемых агентов.

Следующим этапом исследования стала оценка такого показателя, как кинетика накопления частиц в клетках. Этот параметр необходим для того, чтобы выявить время оптимальной концентрации транспортного агента в клетках-мишенях, а, в случае фотодинамической терапии - рассчитать время облучения опухоли после введения вещества. В случае же применения препарата в качестве рентгеноконтрастного агента его проникновение в клетки должно быть минимальным. Клетки Hep-2, инкубированные с микро- и наночастицами $\{Mo_6I_8\}^{0.01}@SiO_2$, выявили схожую динамику как в случае микрочастиц, так и в случае наночастиц. Проникновение в клетки начинается уже через полчаса, и между 4 и 8 часами выходит на плато (см. рис. 18). Проникновение наночастиц в клетки происходит быстрее по сравнению с микрочастицами, но это отличие очень незначительно. Это можно объяснить способностью наночастиц к дополнительному способу проникновения в клетку по сравнению с микрочастицами. В литературе для частиц диаметром меньше 80 нм, помимо клатрин-опосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза, описан также способ проникновения в клетку через кавеолы (Zhang, 2010, Lu, 2009, Flood-Garibay, 2021). Кроме того, макропиноцитозом может быть одномоментно захвачено большое количество наночастиц, тогда как микрочастицы, в силу своего большего диаметра, будут захватываться небольшими “порциями”.

Сопутствующий эксперимент, который был проведен после измерения кинетики накопления – это оценка кинетики выведения частиц из клетки. На рис. 21 представлены данные, демонстрирующие более медленное выведение микрочастиц из клетки. Возможно, более высокая токсичность микрочастиц по сравнению с наночастицами обусловлена именно тем, что они дольше задерживаются в клетках. Кроме того, по остаточному свечению клеток даже через 24 часа после начала элиминации частиц можно судить, что они выводятся из клеток не окончательно. Продолжение этого эксперимента дольше чем 24 часа бессмысленно, поскольку на данной временной точке частицы начнут распределяться между делящимися клетками и, таким образом, мы уже не увидим реальную картину их выведения. Для частиц тяжелых металлов, таких, как золото,

накопление и задержка в клетках организма может приводить к нежелательным побочным эффектам (Cabral, 2014). Однако для частиц на основании диоксида кремния задержка в клетке не является фатальным фактором. В последнее время как для пористых, так и для цельных кремниевых частиц было неоднократно показано такое свойство, как биодергадируемость – то есть способность самостоятельно распадаться внутри клетки с последующим выходом из клетки даже в случае продолжительной задержки в цитоплазме (Croissant, 2018, Hao, 2015, Cassano, 2015). Проникновение в клетки в течение 4-8 часов – это приемлемый промежуток для проведения облучения опухоли или для удержания транспортируемых молекул в клетке. Медленное выведение частиц из клетки может быть использовано в фотоиндуцированной терапии, поскольку открывает возможность нескольких последовательных облучений очага опухоли без необходимости дополнительного повторного введения фотосенсибилизатора. При использовании частиц в качестве доставщиков биологически активных молекул их способность задерживаться в клетках на несколько часов дает такие преимущества как постепенное высвобождение переносимого вещества, а также - пролонгация действия доставляемой молекулы внутри клетки. Тот факт, что микрочастицы достаточно долго задерживаются в клетках, также позволяет создать механизм, обеспечивающий многократное контролируемое выделение препарата из микрочастицы в клетку.

Поскольку и микро-, и наночастицы выявили достаточно высокую способность к проникновению в клетки, их использование в качестве рентгеноконтрастных агентов для сосудистой диагностики может быть затруднено из-за возможности быстрого поглощения частиц тканями. Таким образом, наиболее целесообразными являются две потенциальные области для применения меченых кластерным комплексом частиц кремния – это фотодинамическая терапия и доставка биологически активных молекул в клетку.

Следующим этапом оценки биологических эффектов полученных частиц стало изучение их фотоиндуцированной токсичности. Поскольку кластерные комплексы тяжелых металлов характеризуются не только своими люминесцентными свойствами, но и своей способностью генерировать синглетный кислород при облучении (Fedorenko, 2020), одним из главных опасений для их включения в состав агентов для доставки белков было то, что кластерные комплексы в составе частиц будут резко увеличивать токсичность под

действием света. Если при активации светом частицы остаются нетоксичными, можно предположить, что они послужат эффективными и безопасными агентами доставки. В случае же применения частиц в качестве фотосенсибилизаторов их параметры должны быть противоположными – активация светом должна приводить к успешной элиминации как можно большего числа включающих частицы клеток (Allison, 2014).

Для проверки данного параметра, клетки Hep-2 были инкубированы с частицами, имеющими максимальную концентрацию кластерного комплекса в составе, и затем облучены галогенной лампой. Выявленная токсичность значительно отличалась для микро- и наночастиц. Наночастицы демонстрируют высокую фотоиндуцированную токсичность, приводя к гибели более 60% клеток после облучения (см. рис. 25). Токсичность же микрочастиц оставалась незначительной даже в самых высоких концентрациях, выживаемость клеток после облучения сохранялась на уровне выше 80% (см. рис. 24).

Наночастицы диоксида кремния, включающие в свой состав кластерный комплекс молибдена, сохраняют фототоксические свойства, присущие самому молибденовому комплексу. В то же время микрочастицы, также включающие кластер молибдена в состав матрицы, сохраняют лишь люминесцентные свойства кластера и не обладают фототоксичностью. Вероятнее всего это связано с большой разницей в абсолютной площади поверхности между микрочастицами и наночастицами. При одинаковом объеме суммарная площадь поверхности для наночастиц будет в разы больше, чем поверхность микрочастиц. Поскольку кластерный комплекс равномерно распределён по объему частиц, токсичность частиц возрастает с ростом удельной площади их поверхности, поскольку в данном случае растет количество активных кластерных единиц, доступных для взаимодействия с кислородом.

Кроме того, для наночастиц описаны такие биологические эффекты, как снижение митохондриального мембранного потенциала опухолевых клеток (Lai X., 2015; Dong, 2020) и способность накапливаться в лизосомах (Flood-Garibay, 2021). Хотя в отсутствие облучения наночастицы не проявляют цитотоксического эффекта, при активации светом и выделении активных форм кислорода именно влияние на митохондрии и возникновения «утечки» лизосомальных ферментов может приводить к повышенной токсичности наночастиц по сравнению с микрочастицами.

На данном этапе работы для частиц диоксида кремния диаметром 50±2 и 500±33 нм были выявлены наиболее перспективные способы применения. Наночастицы прекрасно проявляют себя как фотосенсибилизатор, поэтому дальнейшее их применение в этой роли видится наиболее удачным. Микрочастицы же, напротив, демонстрируют низкую токсичность не только в темноте, но и после облучения. В сочетании с их способностью проникать в клетку и задерживаться в ней на несколько часов и яркой люминесценцией, микрочастицы могут стать эффективными доставщиками биологически активных молекул.

На основании полученных данных целесообразным представлялось провести дальнейшее изучение биологических свойств микрочастиц как доставщиков биологических молекул, и наночастиц – в качестве фототоксического агента для фотодинамической терапии.

4.3. Оценка эффективности микрочастиц в роли агентов-переносчиков. Цельные и пористые наночастицы кремния становятся достаточно популярным объектом исследования в различных областях биологии и медицины благодаря своей высокой инертности, биосовместимости и большой площади поверхности. Этот тип частиц был успешно использован для доставки нуклеиновых кислот, белков, агентов для визуализации и препаратов против различных типов заболеваний (Huang, 2019; Meka, 2018; Muhammad, 2011; Tang, 2011; Jafari, 2019). Среди минусов применения подобных транспортеров авторы указывают высокую острую и хроническую токсичность, а также негативные последствия для окружающей среды (Huang, 2019). Несмотря на то, что в последние десятилетия были проделаны многочисленные работы по разработке терапевтических препаратов на основе наночастиц кремния, в медицинскую практику удалось внедрить лишь некоторые из них (Li, 2016).

В отличие от наночастиц, микрочастицы кремния в роли агентов для доставки терапевтически активных препаратов почти не изучались. В тех немногих работах, где исследователи занимались оценкой токсичности микрочастиц, указывается, что, помимо способности проникать в клетки млекопитающих, эти частицы также могут быть менее токсичными для клеток и организма в целом, чем наночастицы кремния (Liu, 2012, Godin 2008). Еще одним значительным плюсом микрочастиц с диаметром больше 300 нм является их неспособность пересекать плацентарный барьер, что облегчает их применение при

беременности (Refuerzo, 2011). Возможность успешного использования микрочастиц кремния в качестве доставщиков обусловлена также и тем, что полимерные частицы субмикронных размеров из других материалов уже успешно используются в данной области (O'Hagan, 2004; Tsakiridis, 2009; Gennet, 2009).

Кроме того, в работах ряда авторов отмечается, что частицы с размерами около 500 нм имеют крайне низкую вероятность локализации в лизосомах (Rejman, 2004). Лизосомальная локализация, присущая более мелким частицам, является одной из основных причин утраты активными веществами их терапевтических свойств после успешной доставки в клетку. Использование частиц большего диаметра позволит нам обойти это препятствие и даст возможность продлить действие доставляемых веществ.

В качестве модельной молекулы для доставки нами был выбран зеленый флуоресцирующий белок GFP. Во-первых, его свечение в зеленой области спектра не пересекается с красным свечением микрочастиц, помеченных кластерным комплексом молибдена. Эта особенность позволяет оценить локализацию как частиц, так и доставляемого ими белка, по отдельности, и соотнести полученные результаты. Во-вторых, сам по себе GFP не способен проникать в клетки (Schmidt, 2017; Pesce, 2013; Gautam, 2016). Если проникновение данного белка в клетки наблюдается, можно однозначно сказать, что это произошло именно благодаря доставке его с помощью микрочастиц.

Для усиления связывания доставляемого белка с поверхностью микрочастиц, их поверхность была модифицирована глицидильными группами (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана. Функционализация неорганических переносчиков – достаточно часто встречающаяся методика, позволяющая усилить связывание неорганической поверхности частиц с органическими соединениями, которые они переносят (Mateo, 2003). Таким образом, можно оптимизировать степень максимальной загрузки транспортных агентов, позволяя переносить большее количество вещества, используя меньшее количество частиц. В перспективе, такой подход может значительно снизить системную токсичность такой системы доставки, так как будет требовать введение в организм меньшего объема препарата.

Чтобы проверить эффективность функционализации поверхности наших микрочастиц, было проведено сравнение трех групп $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ – одна группа частиц была конъюгирована с GFP после проведения функциона-

лизации поверхности глицидильными группами (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана, вторая – конъюгирована с GFP без предварительной функционализации. В качестве негативного контроля использовалась группа микрочастиц, не имеющих GFP на поверхности. Микрочастицы во всех трех группах включали в свой состав кластерный комплекс молибдена.

Интенсивность зеленой эмиссии микрочастиц, которым была проведена функционализация поверхности, по меньшей мере, в 4,5 раза превышали эмиссию не функционализированных микрочастиц в GFP (см. рис. 27). Это является свидетельством того, что использование глицидильных групп в составе внешней оболочки частиц, действительно, повышает количество связей между поверхностью частицы и белком, который она переносит. Повышение интенсивности эмиссии в зеленой области явно говорит о том, что концентрация переносимых белков на поверхности микрочастицы значительно возросла, увеличивая эффективность исследуемых микрочастиц в качестве доставщиков. Кроме того, ковалентная связь белка с кремниевой частицей обеспечивает большую безопасность и надежность данных транспортных агентов при введении веществ *in vivo*.

Еще один факт, который был выявлен в данном эксперименте, это одинаковая интенсивность красной люминесценции для всех трех групп микрочастиц. Неизменность данного параметра говорит о том, что модификация поверхности микрочастиц и их последующая конъюгация с GFP никак не влияет на люминесцентные свойства кластерного комплекса молибдена, включенного в состав кремниевой матрицы частиц.

Следующий параметр, который необходимо было оценить, чтобы понять перспективы использования полученных в данной работе микрочастиц в качестве доставщиков – их способность переносить с собой в клетки прикрепленные к ним молекулы. Для этого клетки линии Hep-2, проинкубированные с раствором функционализированных и конъюгированных с GFP частиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, с микрочастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ без GFP и с чистым раствором GFP без микрочастиц были изучены с помощью флуоресцентной микроскопии. Как видно на рис. 27, микрочастицы способны самостоятельно проникать в клетки, сохраняя при этом яркую люминесценцию в красном спектре. В то же время GFP неспособен к самостоятельному проникновению в клетки, что согласуется с литературными данными (Schmidt, 2017; Pesce, 2013;

Gautam, 2016). Клетки же, инкубированные с микрочастицами, которые переносили на своей поверхности молекулы GFP, давали свечение и в красной, и в зеленой областях. Это говорит о том, что в клетки проникли не только сами микрочастицы, но и доставляемые ими белки.

Завершающим исследованием в данной работе стало более подробное изучение внутриклеточной локализации микрочастиц после их проникновения в клетку. При доставке активных молекул наибольшую опасность для них представляют лизосомы, способные дезактивировать проникшие в клетку молекулы до того, как они выполнили свою функцию (Yu, 2020). Хотя для микрочастиц на основе полимеров было показано, что их проникновение в клетку не сопровождается объединением с лизосомами (Rejman, 2004), для микрочастиц на основе кремния этот параметр не оценивался. Поскольку флуоресцентная микроскопия не дает достаточно подробной информации об особенностях внутриклеточной локализации веществ, для проведения данного анализа была выбрана просвечивающая электронная микроскопия.

На полученных изображениях видно, что после проникновения в клетку микрочастицы чаще всего можно найти заключенными в мультивезикулярные тельца, что наблюдается у 32% от всех исследованных клеток (см. рис. 33 – 35, рис. 42). В лизосомах частицы также обнаруживаются, причем лизосомы, содержащие микрочастицу, чаще всего транспортируют и миелиновые тельца (см. рис. 38 – 40). Это может говорить о том, что частицы распознаются клеткой как структуры, которые будет сложно или невозможно переработать.

Возможно, невыведенные из клетки микрочастицы вместе с миелиновыми тельцами транспортируются к резидуальному тельцу, где могут оставаться вплоть до момента клеточной гибели (см. рис. 41). Если это действительно так, данную особенность микрочастиц можно использовать для доставки препаратов с пролонгированным действием. Тем не менее, стоит учитывать, что такой механизм внутриклеточного транспорта неминуемо включает этап транспортировки частиц лизосомами, как мы видим на рис. 36 – 38. Судя по данным флуоресцентной микроскопии (см. рис. 27), лизосомальный транспорт не повлиял на люминесцентную активность GFP. Однако для доставки более чувствительных молекул будет более предпочтительным использование мезопористых частиц с включением транспортируемого вещества в поры.

Таким образом, на основании исследования способности микрочастиц служить агентами доставки, можно заключить: микрочастицы диоксида кремния, включающие кластерный комплекс молибдена, способны успешно доставлять биологически активные молекулы в клетку. Низкая токсичность микрочастиц, их способность к яркой люминесценции, а также задержка в клетке в течение нескольких часов после проникновения, делает их удачной моделью для доставки молекул, которым требуется длительное время для проявления своего эффекта.

4.4. Оценка эффективности наночастиц в качестве фотосенсибилизаторов. Наночастицы являются значительно более популярным объектом исследований по сравнению с микрочастицами. Многие авторы используют наночастицы металлов в качестве фото- и термоактивируемых агентов для фотодинамической терапии (Vasilchenko, 2010; Asem, 2016). Одним из хорошо охарактеризованных примеров неорганических металлических наночастиц является золото. Золото широко использовалось как для выявления, так и для прямой терапии рака. Сильное оптическое поглощение золота позволяет использовать его для локализации опухолевых очагов, в то время как его фототермические свойства делают пригодным золото для противоопухолевой терапии (Zhang, 2017). Еще один популярный объект исследования в области фотодинамической терапии – наночастицы серебра.

Точный механизм действия наночастиц серебра при раке остается неясным, однако считается, что серебро реагирует с кислой средой, которая часто встречается в опухоли, с образованием активных форм кислорода, которые могут вызывать повреждение клеточных структур, и в конечном итоге приводят к апоптозу. Также было обнаружено, что серебро ингибирует фактор роста эндотелия сосудов и, таким образом, обладает антиангиогенным действием в раковых опухолях (Nicolae-Maranciuc, 2022). Среди недостатков этих соединений авторы отмечают их высокую неспецифическую и темновую токсичность, которая создается, в том числе, за счет высокого поверхностного натяжения металлических частиц.

Наночастицы диоксида кремния в роли фотосенсибилизаторов изучены недостаточно хорошо, по сравнению с наночастицами металлов, однако они могут послужить хорошей альтернативной металлическим частицам. Матрица из диоксида кремния легко поддается модификации и функционализации в

зависимости от того, какие свойства мы хотим придать частицам, а также позволяет менять количество кластерного комплекса молибдена в составе матрицы. Кластерный комплекс молибдена придает частицам значительную фотоиндуцируемую токсичность, а его люминесцентные свойства позволяют отслеживать проникновение частиц в клетки.

Первый вопрос, на который необходимо ответить при исследовании потенциального фотосенсибилизатора – насколько эффективная элиминация клеток происходит при облучении. МТТ-тест, который выявил фотоиндуцируемую токсичность вещества в описанном выше эксперименте, не дает однозначного ответа на этот вопрос. Этот метод позволяет выявить количество жизнеспособных клеток по изменению оптической плотности раствора. Он основан на способности митохондриальных дегидрогеназ клеток восстанавливать неокрашенные формы МТТ-реагента (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (Sigma, США)) до кристаллического формазана, растворимого в диметилсульфоксиде.

В результате, количество образовавшегося формазана прямо пропорционально количеству метаболически активных клеток, а интенсивность окрашивания – это отражение жизнеспособности клеток в каждой лунке. Поскольку МТТ-тест основан на оценке метаболической активности клеток, мы не можем с уверенностью утверждать, что облучение клеток после их инкубации с наночастицами вызвало их гибель. Остается вероятность, что облучение лишь подавляет активность митохондрий в клетках, что нарушает переработку МТТ-реагента и дает ложноотрицательный сигнал при измерении жизнеспособности. Чтобы исключить эту возможность, был использован еще один метод исследования токсичности препаратов – двойное окрашивание йодидом пропидия и Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific).

Метод двойного окрашивания позволяет точно отличить и количественно оценить долю живых и погибших клеток до и после облучения. Результаты двойного окрашивания соответствуют картине, полученной в МТТ-тесте (см. рис. 45, 46). В отсутствие облучения наночастицы демонстрируют низкую токсичность – даже в наиболее высокой концентрации клетки сохраняют жизнеспособность выше 80%. После облучения наночастицы проявляют значительную токсичность, число погибших клеток в максимальной концентрации 0,15 мг/мл достигает 67% от контроля. Этот результат подтверждает

полученные ранее результаты МТТ-теста и позволяет нам сделать следующие выводы:

1. Инкубация клеток с наночастицами и их последующее облучение не нарушает метаболических процессов в клетке – в противном случае результаты МТТ-теста не сходились бы с результатами двойного окрашивания.

2. Наночастицы диоксида кремния с включением кластерного комплекса молибдена, действительно, проявляют значительную фототоксичность после первого же облучения. Их низкая темновая токсичность и хорошая способность проникать в клетки открывают широкие перспективы для применения наночастиц в качестве фотоиндуцируемых терапевтических агентов.

Кремниевая матрица наночастиц дает возможность модифицировать их поверхность различными биологически активными молекулами, в том числе и антителами. Такой подход обеспечит таргетность полученного препарата и позволит более точно локализовать частицы в опухолевом очаге (Yu, 2020). Поскольку после облучения выживает меньше половины инкубированных с частицами клеток, это дает надежду на редкую необходимость повторных введений препарата, что облегчило бы протекание терапии и является очень ценным качеством для фотосенсибилизатора (Nyokong, 2012).

Следующей задачей стала оценка локализации наночастиц внутри клетки. Локализация фотосенсибилизатора очень важна для эффективной терапии. Для наночастиц с диаметром меньше 70 нм описаны два возможных варианта распределения в клетке – это образование скоплений в свободной цитоплазме клеток и/или лизосомах (Rejman, 2004) и диффузное распределение по цитоплазме клетки с возможным прохождением через ядерные поры (Borm, 2011). И тот, и другой вариант имеет свои плюсы при фотодинамической терапии – проникновение в клеточное ядро может привести к повреждению ДНК и нарушению клеточного цикла во время облучения, а образование агломератов частиц обеспечит выделение высоких локальных концентраций активных форм кислорода с возможным последующим повреждением клеточных органелл (Yu, 2020).

Поскольку исследуемые наночастицы оксида кремния включают в свой состав кластерный комплекс молибдена, генерируемая им люминесценция позволяет легко детектировать частицы в клетках с помощью конфокальной микроскопии. Для обнаружения их локализации в клетках были дополни-

тельно окрашены ядра и цитоскелет. Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, позволяют заключить, что наночастицы не проникают в клеточное ядро (см. рис. 48). Судя по наблюдаемым в клетке сгусткам свечения, частицы лежат в цитоплазме агломератами, и лишь малая их часть распределена по цитоплазме диффузно. Интенсивность люминесценции, наблюдаемая на флуоресцентном микроскопе, говорит о высокой концентрации частиц в каждой отдельно взятой клетке. Это позволяет надеяться, что при облучении наблюдаемые нами агломераты частиц будут выделять значительные количества синглетного кислорода.

Просвечивающая электронная микроскопия подтверждает то, что наночастицы располагаются внутри клеток агломератами (см. рис. 49). Примечательно, что большая часть наночастиц лежит в цитоплазме свободно, и лишь небольшая часть локализуется внутри эндосом. Это хороший показатель для фотосенсибилизатора, поскольку активные формы кислорода эффективны лишь в первые несколько секунд после активации препарата, а преодоление эндосомальной мембраны может замедлить их действие, снижая, таким образом, противоопухолевую активность (Gunaydin, 2021). Еще одна важная особенность, которую можно отметить на электронограммах – концентрация агломератов наночастиц в непосредственной близости от ядра клетки. Несколько крупных скоплений наночастиц, расположенных с разных сторон от клеточного ядра, могут оказать разрушительный эффект при активации (Gunaydin, 2021).

Заключительным этапом данной работы стала проверка механизма токсического действия наночастиц. Принцип работы фотосенсибилизатора заключается в выделении активных форм кислорода (ROS), которые разрушают клетку изнутри в течение нескольких секунд, после чего деактивируются (Price, 2010; Kholin, 2017). Такой механизм обеспечивает безопасность фотосенсибилизатора для окружающих опухоль здоровых тканей, поскольку короткое время жизни ROS является гарантией сохранения жизнеспособности соседних клеток. Для проверки того, действительно ли в клетках, инкубированных с наночастицами, после облучения начинают выделяться активные формы кислорода, клетки были проинкубированы с наночастицами и затем окрашены внутриклеточным красителем 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich). Проникая в клетки краситель не проявляет

люминесценции до появления в них активных форм кислорода. ROS активируют 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат, и он начинает активно люминесцировать, что позволяет определить его в клетках и измерить интенсивность люминесценции.

В качестве положительного контроля в проведенном эксперименте использовалась перекись водорода, которая вызывает оксидативный стресс в клетках как в темноте, так и на свету. В качестве отрицательного контроля использовались клетки, не инкубировавшиеся с наночастицами. Еще одним контролем стали клетки, инкубированные с радахлорином. Радахлорин применяется в клинике как фотосенсибилизатор (Mirzaei, 2015) и в данном эксперименте он был использован для сравнения и подтверждения увиденного на клетках эффекта наночастиц. Профили люминесценции, полученные нами для радахлорина и для наночастиц, имели сходство (см. рис. 49). И в том, и в другом случае наблюдалось достоверное отличие в выделяемых количествах активных форм кислорода между клетками до облучения и клетками после облучения ($p<0,005$). При облучении клетки, инкубированные с радахлорином, и клетки, инкубированные с наночастицами, демонстрируют одинаково высокие концентрации синглетного кислорода в цитоплазме. Это многообещающий результат, который свидетельствует о том, что механизм токсичности наночастиц, действительно, основан на выделении ROS, следовательно, данное соединение имеет большой потенциал в качестве фотоиндуцируемого агента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы на клеточной линии Hep-2 были изучены биологические эффекты кластерных комплексов молибдена $Na_2[Mo_6I_8(2\text{-}[2\text{-}(2\text{-метоксиэтокси})\text{этокси}]\text{ацетат})_6]$ и $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ и их стабильность в водном растворе. Хотя данными соединениями была проявлена умеренная фотодинамическая токсичность, их низкая стабильность в водном растворе и в питательной культуральной среде не позволяет провести их полноценное изучение на биологических объектах.

Чтобы обойти трудности, которые вызывает использование кластерных комплексов в растворе, в данной работе были впервые получены частицы диоксида кремния диаметром 50± и 500±33 нм, которые включают в свою матрицу кластерный комплекс молибдена $\{Mo_6I_8\}$. Поскольку данные частицы обладают многими полезными свойствами – рентгеноконтрастность, люминесценция, фотоиндуцируемая активность – необходимо было определить для них оптимальную область перспективного применения.

Было проведено сравнение биологических эффектов частиц, а именно – темновой токсичности, фотоиндуцированной токсичности, кинетики клеточного накопления и выведения. Было показано, что токсичность частиц обоих диаметров не зависит от концентрации кластерного комплекса в их составе. Кинетика клеточного накопления и выведения для нано- и микрочастиц была схожей, однако в токсичности были выявлены значительные различия. Темновая токсичность проявлялась в большей степени у микрочастиц. Возможно, более высокая темновая токсичность микрочастиц по сравнению с наночастицами обусловлена тем, что они дольше задерживаются в клетках. В то же время фотоиндуцированная токсичность более значима у наночастиц. Это объясняется большей удельной площадью поверхности наночастиц по сравнению с микрочастицами. Таким образом, было продемонстрировано, что биологические эффекты – и, соответственно, возможные области применения частиц – зависят от их диаметра. Микрочастицы в дальнейшем исследовались с точки зрения их применения в качестве агентов для доставки биологически активных молекул, а наночастицы – в качестве фотосенсибилизаторов.

Как микро-, так и наночастицы показали себя эффективными в выбранных для них перспективных областях. Дополнительно модифицированные глицидильными группами микрочастицы хорошо себя проявили как

доставщики белка GFP. Для наночастиц была проведена оценка механизмов токсичности и показан уровень генерации активных форм кислорода при облучении, сравнимый с используемым в клинике фотосенсибилизатором радахлорином. Оба типа частиц проникают в клетки в течение 4-8 часов и задерживаются в клеточной цитоплазме на протяжении 24 часов, что дает широкий временной диапазон для их использования. Таким образом, результаты данного исследования имеют не только фундаментальный характер, но и открывают широкие перспективы для практического использования в клинике.

ВЫВОДЫ

1. Инкубация клеток линии Hep-2 с кластерными комплексами молибдена $Na_2[Mo_6I_8$(2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]ацетат)6] и $[\{Mo_6I_8\}(DMSO)_6](NO_3)_4$ с последующим облучением вызывает фотоиндуцированную гибель клеток. Жизнеспособность клеток значительно меняется в зависимости от времени выдержки растворов кластерных комплексов, что является следствием быстрого гидролиза комплексов и затрудняет изучение их эффектов на биологических объектах.

2. После инкубации клеток линии Hep-2 с частицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ диаметром 50 нм в отсутствие света выживаемость клеток не меняется, тогда как активация наночастиц светом приводит к фотоиндуцированной гибели клеток. Инкубация клеток Hep-2 с частицами диаметром 500 нм, напротив, снижает жизнеспособность клеток в отсутствие света, и не вызывает фотоиндуцированной токсичности. Полуингибирующие концентрации растворов микрочастиц лежат в диапазоне 1,687-1,755 мг/мл; полуингибирующие концентрации наночастиц не достигнуты.

3. Накопление в клетках Hep-2 частиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ диаметром 50 нм достигает максимума через 4 ч инкубации, тогда как для захвата частиц диаметром 500 нм клеткам требуется 8 ч. Время полного выведения обоих типов частиц из цитоплазмы клеток составляет более чем 24 ч.

4. При проникновении в клетку частицы остаются в цитоплазме, не проникая в ядро. Микрочастицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ локализуются поодиночке в эндосомах и микровезикулярных тельцах, тогда как наночастицы образуют скопления в цитоплазме.

5. Клетки линии Hep-2 приобретают свойство активно поглощать GFP в составе конъюгата с микрочастицами $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, что обусловлено способностью микрочастиц $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$ эффективно доставлять GFP внутрь клетки.

6. Биологические эффекты допированных кластерным комплексом молибдена частиц диоксида кремния зависят от их диаметра, и не зависят от массовой доли кластерного комплекса в составе частиц.

7. Облучение видимым светом клеток линии Hep-2, содержащих поглощенные наночастицы $\{Mo_6I_8\}^{0,01}@SiO_2$, вызывает значительное повышение уровня генерации активных форм кислорода, сравнимое с уровнем, проявляемым используемым в медицине фотосенсибилизатором радахлорином.

Список сокращений

GFP - «*green fluorescent protein*», зеленый флуоресцентный белок;

ROS – реактивные формы кислорода

$ASiO_2$ – аморфный диоксид кремния

DMSO – диметилсульфоксид

PBS – фосфатный буфер

ПЭМ – просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия

ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

DDSA – додеценилсукциновый ангидрид

DSF – 5,6-карбокси-2,7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahamed, M., Akhtar, M.J., Alhadlaq, H.A., 2020. Influence of silica nanoparticles on cadmium-induced cytotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in human liver HepG2 cells. Environmental Toxicology 35, 599–608. https://doi.org/10.1002/tox.22895

2. Ahmad, J., Ahamed, M., Akhtar, M.J., Alrokayan, S.A., Siddiqui, M.A., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A.A., 2012. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. Toxicology and Applied Pharmacology 259, 160–168. https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.020

3. Allison, R.R., 2014. Photodynamic therapy: oncologic horizons. Future Oncology 10, 123–124. https://doi.org/10.2217/fon.13.176

4. Asem, H., El-Fattah, A.A., Nafee, N., Zhao, Y., Khalil, L., Muhammed, M., Hassan, M., Kandil, S., 2016. Development and biodistribution of a theranostic aluminum phthalocyanine nanophotosensitizer. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 13, 48–57. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.12.005

5. Ambrogi, V., Marmottini, F., Pagano, C., 2013. Amorphous carbamazepine stabilization by the mesoporous silicate SBA-15. Microporous and Mesoporous Materials 177, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.04.008

6. Ambrogi, V., Perioli, L., Marmottini, F., Accorsi, O., Pagano, C., Ricci, M., Rossi, C., 2008. Role of mesoporous silicates on carbamazepine dissolution rate enhancement. Microporous and Mesoporous Materials 113, 445–452. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.12.003

7. Aubert, T., Cabello-Hurtado, F., Esnault, M.-A., Neaime, C., Lebret-Chauvel, D., Jeanne, S., Pellen, P., Roiland, C., Le Polles, L., Saito, N., Kimoto, K., Haneda, H., Ohashi, N., Grasset, F., Cordier, S., 2013. Extended Investigations on Luminescent Cs 2 [Mo 6 Br 14]@SiO 2 Nanoparticles: Physico-Structural Characterizations and Toxicity Studies. J. Phys. Chem. C 117, 20154–20163. https://doi.org/10.1021/jp405836q

8. Azouz, R.A., Korany, R.M.S., 2021. Toxic Impacts of Amorphous Silica Nanoparticles on Liver and Kidney of Male Adult Rats: an In Vivo Study. Biol Trace Elem Res 199, 2653–2662. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02386-3

9. Barel, A.O., Paye, M., Maibach, H.I. (Eds.), 2014. Handbook of cosmetic science and technology, 4. ed. ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.

10. Blechinger, J., Bauer, A.T., Torrano, A.A., Gorzelanny, C., Bräuchle, C., Schneider, S.W., 2013. Uptake Kinetics and Nanotoxicity of Silica Nanoparticles Are

Cell Type Dependent. Small 9, 3970–3980. https://doi.org/10.1002/smll.201301004

11. Borm, P.J.A., Tran, L., Donaldson, K., 2011. The carcinogenic action of crystalline silica: A review of the evidence supporting secondary inflammation-driven genotoxicity as a principal mechanism. Critical Reviews in Toxicology 41, 756–770. https://doi.org/10.3109/10408444.2011.576008

12. Borzęcka, W., Trindade, T., Torres, T., Tomé, J., 2016. Targeting Cancer Cells with Photoactive Silica Nanoparticles. CPD 22, 6021–6038. https://doi.org/10.2174/1381612822666160614083804

13. Bouchoucha, M., Béliveau, É., Kleitz, F., Calon, F., Fortin, M.-A., 2017. Antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticles for brain microvessel endothelial cell targeting. J. Mater. Chem. B 5, 7721–7735. https://doi.org/10.1039/C7TB01385J

14. Bouchoucha, M., Côté, M.-F., C.-Gaudreault, R., Fortin, M.-A., Kleitz, F., 2016. Size-Controlled Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Tunable Drug Release and Enhanced Anti-Tumoral Activity. Chem. Mater. 28, 4243–4258. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b00877

15. Bouledjouidja, A., Masmoudi, Y., Van Speybroeck, M., Schueller, L., Badens, E., 2016. Impregnation of Fenofibrate on mesoporous silica using supercritical carbon dioxide. International Journal of Pharmaceutics 499, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.049

16. Brandão, F., Costa, C., Bessa, M.J., Dumortier, E., Debacq-Chainiaux, F., Hubaux, R., Salmon, M., Laloy, J., Stan, M.S., Hermenean, A., Gharbia, S., Dinischiotu, A., Bannuscher, A., Hellack, B., Haase, A., Fraga, S., Teixeira, J.P., 2021. Genotoxicity and Gene Expression in the Rat Lung Tissue following Instillation and Inhalation of Different Variants of Amorphous Silica Nanomaterials (aSiO2 NM). Nanomaterials 11, 1502. https://doi.org/10.3390/nano11061502

17. Brandhonneur, N., Boucaud, Y., Verger, A., Dumait, N., Molard, Y., Cordier, S., Dollo, G., 2020. Molybdenum cluster loaded PLGA nanoparticles as efficient tools against epithelial ovarian cancer. Int J Pharm 120079. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120079

18. Brandhonneur, N., Hatahet, T., Amela-Cortes, M., Molard, Y., Cordier, S., Dollo, G., 2018. Molybdenum cluster loaded PLGA nanoparticles: An innovative theranostic approach for the treatment of ovarian cancer. Eur J Pharm Biopharm 125, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.01.007

19. Brydson, R., 2001. Electron energy loss spectroscopy, Microscopy

handbooks. Bios in association with the Royal Microscopical Society, Oxford.

20. Cabellos, J., Gimeno-Benito, I., Catalán, J., Lindberg, H.K., Vales, G., Fernandez-Rosas, E., Ghemis, R., Jensen, K.A., Atluri, R., Vázquez-Campos, S., Janer, G., 2020. Short-term oral administration of non-porous and mesoporous silica did not induce local or systemic toxicity in mice. Nanotoxicology 14, 1324–1341. https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1818325

21. Cabral, R.M., Baptista, P.V., 2014. Anti-cancer precision theranostics: a focus on multifunctional gold nanoparticles. Expert Review of Molecular Diagnostics 14, 1041–1052. https://doi.org/10.1586/14737159.2014.965683

22. Cabrera, I.C., Berlioz, S., Fahs, A., Louarn, G., Carriere, P., 2020. Chemical functionalization of nano fibrillated cellulose by glycidyl silane coupling agents: A grafted silane network characterization study. International Journal of Biological Macromolecules 165, 1773–1782. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.045

23. Cassano, D., Rota Martir, D., Signore, G., Piazza, V., Voliani, V., 2015. Biodegradable hollow silica nanospheres containing gold nanoparticle arrays. Chem. Commun. 51, 9939–9941. https://doi.org/10.1039/C5CC02771C

24. Chan, W.-T., Liu, C.-C., Chiang Chiau, J.-S., Tsai, S.-T., Liang, C.-K., Cheng, M.-L., Lee, H.-C., Yeung, C.-Y., Hou, S.-Y., 2017. In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. IJN Volume 12, 3421–3432. https://doi.org/10.2147/IJN.S126823

25. Chatterjee, N., Jeong, J., Yoon, D., Kim, S., Choi, J., 2018. Global metabolomics approach in in vitro and in vivo models reveals hepatic glutathione depletion induced by amorphous silica nanoparticles. Chemico-Biological Interactions 293, 100–106. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.013

26. Chen, Fenglei, Jin, J., Hu, J., Wang, Y., Ma, Z., Zhang, J., 2019. Endoplasmic Reticulum Stress Cooperates in Silica Nanoparticles-Induced Macrophage Apoptosis via Activation of CHOP-Mediated Apoptotic Signaling Pathway. IJMS 20, 5846. https://doi.org/10.3390/ijms20235846

27. Chen, Fengxia, Zhang, H., Jiang, L., Wei, W., Liu, C., Cang, S., 2019. Enhancing the cytotoxic efficacy of combined effect of doxorubicin and Cyclosporin encapsulated photoluminescent graphene dotted mesoporous nanoparticles against lung cancer cell-specific drug targeting for the nursing care of cancer patients. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 198, 111578. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111578

28. Chen, J., Liu, J., Hu, Y., Tian, Z., Zhu, Y., 2019. Metal-organic framework-coated magnetite nanoparticles for synergistic magnetic hyperthermia and chemotherapy with pH-triggered drug release. Sci Technol Adv Mater 20, 1043–1054. https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1682467

29. Chen, W., Cheng, C.-A., Lee, B.-Y., Clemens, D.L., Huang, W.-Y., Horwitz, M.A., Zink, J.I., 2018. Facile Strategy Enabling Both High Loading and High Release Amounts of the Water-Insoluble Drug Clofazimine Using Mesoporous Silica Nanoparticles. ACS Appl. Mater. Interfaces 10, 31870–31881. https://doi.org/10.1021/acsami.8b09069

30. Choi, E., Kim, S., 2019. Surface pH buffering to promote degradation of mesoporous silica nanoparticles under a physiological condition. J Colloid Interface Sci 533, 463–470. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.08.088

31. Chuĭko, A.A., 2003. Meditsinskaia khimiia i klinicheskoe primenenie dioksida kremniia. Naukova Dumka, Kiev.

32. Cornu, R., Chrétien, C., Pellequer, Y., Martin, H., Béduneau, A., 2020. Small silica nanoparticles transiently modulate the intestinal permeability by actin cytoskeleton disruption in both Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX models. Arch Toxicol 94, 1191–1202. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02694-6

33. Croissant, J.G., Brinker, C.J., 2018. Biodegradable Silica-Based Nanoparticles: Dissolution Kinetics and Selective Bond Cleavage, in: The Enzymes. Elsevier, pp. 181–214. https://doi.org/10.1016/bs.enz.2018.07.008

34. Cui, G., Zhang, H., Guo, Q., Shan, S., Chen, S., Li, C., Yang, X., Li, Z., Mu, Y., Shao, H., Du, Z., 2020. Oxidative stress-mediated mitochondrial pathway-dependent apoptosis is induced by silica nanoparticles in H9c2 cardiomyocytes. Toxicology Mechanisms and Methods 30, 646–655. https://doi.org/10.1080/-15376516.2020.1805664

35. Cui, M., Zhang, W., Xie, L., Chen, L., Xu, L., 2020. Chiral Mesoporous Silica Materials: A Review on Synthetic Strategies and Applications. Molecules 25. https://doi.org/10.3390/molecules25173899

36. Dening, T.J., Rao, S., Thomas, N., Prestidge, C.A., 2016. Novel Nanostructured Solid Materials for Modulating Oral Drug Delivery from Solid-State Lipid-Based Drug Delivery Systems. AAPS J 18, 23–40. https://doi.org/10.1208/s12248-015-9824-7

37. Deng, Y.-D., Zhang, X.-D., Yang, X.-S., Huang, Z.-L., Wei, X., Yang, X.-F., Liao, W.-Z., 2021. Subacute toxicity of mesoporous silica nanoparticles to the

intestinal tract and the underlying mechanism. Journal of Hazardous Materials 409, 124502. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124502

38. de Pace, R.C.C., Liu, X., Sun, M., Nie, S., Zhang, J., Cai, Q., Gao, W., Pan, X., Fan, Z., Wang, S., 2013. Anticancer activities of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated nanoliposomes in MCF7 breast cancer cells. J Liposome Res 23, 187–196. https://doi.org/10.3109/08982104.2013.788023

39. Derylo-Marczewska, A., Marczewski, A.W., Skrzypek, I., Pikus, S., Kozak, M., 2008. Effect of addition of pore expanding agent on changes of structure characteristics of ordered mesoporous silicas. Applied Surface Science 255, 2851–2858. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.08.026

40. Dobrzynska, M., Napierala, M., Florek, E., 2020. Flavonoid Nanoparticles: A Promising Approach for Cancer Therapy. Biomolecules 10, 1268. https://doi.org/10.3390/biom10091268

41. Dong, X., Wu, Z., Li, X., Xiao, L., Yang, M., Li, Y., Duan, J., Sun, Z., 2020. The Size-dependent Cytotoxicity of Amorphous Silica Nanoparticles: A Systematic Review of in vitro Studies. IJN Volume 15, 9089–9113. https://doi.org/10.2147/IJN.S276105

42. Dollo, G., Boucaud, Y., Amela-Cortes, M., Molard, Y., Cordier, S., Brandhonneur, N., 2020. PLGA nanoparticles embedding molybdenum cluster salts: Influence of chemical composition on physico-chemical properties, encapsulation efficiencies, colloidal stabilities and in vitro release. Int J Pharm 576, 119025. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119025

43. Douroumis, D., Onyesom, I., Maniruzzaman, M., Mitchell, J., 2013. Mesoporous silica nanoparticles in nanotechnology. Critical Reviews in Biotechnology 33, 229–245. https://doi.org/10.3109/07388551.2012.685860

44. Du, Z., Chen, S., Cui, G., Yang, Y., Zhang, E., Wang, Q., Lavin, M., Yeo, A., Bo, C., Zhang, Y., Li, C., Liu, X., Yang, X., Peng, C., Shao, H., 2018. Silica nanoparticles induce cardiomyocyte apoptosis via the mitochondrial pathway in rats following intratracheal instillation. Int J Mol Med. https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4045

45. Du, Z., Zhao, D., Jing, L., Cui, G., Jin, M., Li, Y., Liu, X., Liu, Y., Du, H., Guo, C., Zhou, X., Sun, Z., 2013. Cardiovascular Toxicity of Different Sizes Amorphous Silica Nanoparticles in Rats After Intratracheal Instillation. Cardiovasc Toxicol 13, 194–207. https://doi.org/10.1007/s12012-013-9198-y

46. Duan, J., Hu, H., Feng, L., Yang, X., Sun, Z., 2017. Silica nanoparticles

inhibit macrophage activity and angiogenesis via VEGFR2-mediated MAPK signaling pathway in zebrafish embryos. Chemosphere 183, 483–490. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.138

47. Duan, J., Liang, S., Feng, L., Yu, Y., Sun, Z., 2018. Silica nanoparticles trigger hepatic lipid-metabolism disorder in vivo and in vitro. IJN Volume 13, 7303–7318. https://doi.org/10.2147/IJN.S185348

48. Duan, J., Yu, Yongbo, Yu, Yang, Li, Y., Huang, P., Zhou, X., Peng, S., Sun, Z., 2014. Silica nanoparticles enhance autophagic activity, disturb endothelial cell homeostasis and impair angiogenesis. Part Fibre Toxicol 11, 50. https://doi.org/10.1186/s12989-014-0050-8

49. Durnev, A.D., Solomina, A.S., Daugel-Dauge, N.O., Zhanataev, A.K., Shreder, E.D., Nemova, E.P., Shreder, O.V., Veligura, V.A., Osminkina, L.A., Timoshenko, V.Yu., Seredenin, S.B., 2010. Evaluation of Genotoxicity and Reproductive Toxicity of Silicon Nanocrystals. Bull Exp Biol Med 149, 445–449. https://doi.org/10.1007/s10517-010-0967-3

50. Eren, Z.S., Tunçer, S., Gezer, G., Yildirim, L.T., Banerjee, S., Yilmaz, A., 2016. Improved solubility of celecoxib by inclusion in SBA-15 mesoporous silica: Drug loading in different solvents and release. Microporous and Mesoporous Materials 235, 211–223. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.08.014

51. Evtushok, D.V., Melnikov, A.R., Vorotnikova, N.A., Vorotnikov, Y.A., Ryadun, A.A., Kuratieva, N.V., Kozyr, K.V., Obedinskaya, N.R., Kretov, E.I., Novozhilov, I.N., Mironov, Y.V., Stass, D.V., Efremova, O.A., Shestopalov, M.A., 2017. A comparative study of optical properties and X-ray induced luminescence of octahedral molybdenum and tungsten cluster complexes. Dalton Trans. 46, 11738–11747. https://doi.org/10.1039/C7DT01919J

52. Fan, X., Domszy, R.C., Hu, N., Yang, A.J., Yang, J., David, A.E., 2019. Synthesis of silica-alginate nanoparticles and their potential application as pH-responsive drug carriers. J Solgel Sci Technol 91, 11–20. https://doi.org/10.1007/s10971-019-04995-4

53. Farooq, A., Shukur, A., Astley, C., Tosheva, L., Kelly, P., Whitehead, D., Azzawi, M., 2018. Titania coating of mesoporous silica nanoparticles for improved biocompatibility and drug release within blood vessels. Acta Biomaterialia 76, 208–216. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.024

54. Fede, C., Millino, C., Pacchioni, B., Celegato, B., Compagnin, C., Martini,

P., Selvestrel, F., Mancin, F., Celotti, L., Lanfranchi, G., Mognato, M., Cagnin, S., 2014. Altered Gene Transcription in Human Cells Treated with Ludox® Silica Nanoparticles. IJERPH 11, 8867–8890. https://doi.org/10.3390/ijerph110908867

55. Fedorenko, S., Elistratova, J., Stepanov, A., Khazieva, A., Mikhailov, M., Sokolov, M., Kholin, K., Nizameev, I., Mendes, R., Rümmeli, M., Gemming, T., Weise, B., Giebeler, L., Mikhailova, D., Dutz, S., Zahn, D., Voloshina, A., Sapunova, A., Daminova, A., Fedosimova, S., Mustafina, A., 2020. ROS-generation and cellular uptake behavior of amino-silica nanoparticles arisen from their uploading by both iron-oxides and hexamolybdenum clusters. Materials Science and Engineering: C 117, 111305. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111305

56. Feng, L., Ning, R., Liu, J., Liang, S., Xu, Q., Liu, Y., Liu, W., Duan, J., Sun, Z., 2020. Silica nanoparticles induce JNK-mediated inflammation and myocardial contractile dysfunction. Journal of Hazardous Materials 391, 122206. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122206

57. Fijneman, A.J., Högblom, J., Palmlöf, M., With, G., Persson, M., Friedrich, H., 2020. Multiscale Colloidal Assembly of Silica Nanoparticles into Microspheres with Tunable Mesopores. Adv. Funct. Mater. 30, 2002725. https://doi.org/10.1002/adfm.202002725

58. Fischer, T., Winter, I., Drumm, R., Schneider, M., 2021. Cylindrical Microparticles Composed of Mesoporous Silica Nanoparticles for the Targeted Delivery of a Small Molecule and a Macromolecular Drug to the Lungs: Exemplified with Curcumin and siRNA. Pharmaceutics 13, 844. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060844

59. Flood-Garibay, J.A., Méndez-Rojas, M.A., 2021. Effects of Co-Solvent Nature and Acid Concentration in the Size and Morphology of Wrinkled Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery Applications. Molecules 26, 4186. https://doi.org/10.3390/molecules26144186

60. Fruijtier-Pölloth, C., 2012. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material. Toxicology 294, 61–79. https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.001

61. Fukushima, K., Tabuani, D., Abbate, C., Arena, M., Rizzarelli, P., 2011. Preparation, characterization and biodegradation of biopolymer nanocomposites based on fumed silica. European Polymer Journal 47, 139–152. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.10.027

62. Gao, Y., He, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Gao, T., Wang, J.-H., Wang, S., 2021. Zwitterion-functionalized mesoporous silica nanoparticles for enhancing oral delivery of protein drugs by overcoming multiple gastrointestinal barriers. Journal of Colloid and Interface Science 582, 364–375. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.08.010

63. Gao, Q., Zhang, J., Gao, J., Zhang, Z., Zhu, H., Wang, D., 2021. Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. Front. Bioeng. Biotechnol. 9, 647905. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.647905

64. Gautam, A., Nanda, J.S., Samuel, J.S., Kumari, M., Priyanka, P., Bedi, G., Nath, S.K., Mittal, G., Khatri, N., Raghava, G.P.S., 2016. Topical Delivery of Protein and Peptide Using Novel Cell Penetrating Peptide IMT-P8. Sci Rep 6, 26278. https://doi.org/10.1038/srep26278

65. Gehrke, H., Frühmesser, A., Pelka, J., Esselen, M., Hecht, L.L., Blank, H., Schuchmann, H.P., Gerthsen, D., Marquardt, C., Diabaté, S., Weiss, C., Marko, D., 2012. In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. Nanotoxicology 7, 274–293. https://doi.org/10.3109/17435390. 2011.652207

66. Gennet, N., Alexander, L.M., Sánchez-Martín, R.M., Behrendt, J.M., Sutherland, A.J., Brickman, J.M., Bradley, M., Li, M., 2009. Microspheres as a vehicle for biomolecule delivery to neural stem cells. New Biotechnology 25, 442–449. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.05.006

67. Gisbert-Garzarán, M., Manzano, M., Vallet-Regí, M., 2017. pH-Responsive Mesoporous Silica and Carbon Nanoparticles for Drug Delivery. Bioengineering 4, 3. https://doi.org/10.3390/bioengineering4010003

68. Godin, B., Gu, J., Serda, R.E., Bhavane, R., Tasciotti, E., Chiappini, C., Liu, X., Tanaka, T., Decuzzi, P., Ferrari, M., 2010. Tailoring the degradation kinetics of mesoporous silicon structures through PEGylation. J. Biomed. Mater. Res. 9999A, NA-NA. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32807

69. Godin, B., Tasciotti, E., Liu, X., Serda, R.E., Ferrari, M., 2011. Multistage Nanovectors: From Concept to Novel Imaging Contrast Agents and Therapeutics. Acc. Chem. Res. 44, 979–989. https://doi.org/10.1021/ar200077p

70. Gong, C., Yang, L., Zhou, J., Guo, X., Zhuang, Z., 2017. Possible role of PAPR-1 in protecting human HaCaT cells against cytotoxicity of SiO2 nanoparticles. Toxicology Letters 280, 213–221. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.213

71. Gongalsky, M.B., Sviridov, A.P., Bezsudnova, Yu.I., Osminkina, L.A., 2020. Biodegradation model of porous silicon nanoparticles. Colloids and Surfaces

B: Biointerfaces 190, 110946. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110946

72. Grasset, F., Dorson, F., Molard, Y., Cordier, S., Demange, V., Perrin, C., Marchi-Artzner, V., Haneda, H., 2009. ChemInform Abstract: One-Pot Synthesis and Characterizations of Bifunctional Phosphor-Magnetic @SiO 2 Nanoparticles: Controlled and Structured Association of Mo 6 Cluster Units and γ-Fe 2 O 3 Nanocrystals. ChemInform 40. https://doi.org/10.1002/chin.200902214

73. Grasset, F., Dorson, F., Molard, Y., Cordier, S., Demange, V., Perrin, C., Marchi-Artzner, V., Haneda, H., 2008. One-pot synthesis and characterizations of bi-functional phosphor–magnetic @SiO2 nanoparticles: controlled and structured association of Mo6 cluster units and γ-Fe2O3 nanocrystals. Chem. Commun. 4729. https://doi.org/10.1039/b806919k

74. Grossgarten, M., Holzlechner, M., Vennemann, A., Balbekova, A., Wieland, K., Sperling, M., Lendl, B., Marchetti-Deschmann, M., Karst, U., Wiemann, M., 2018. Phosphonate coating of SiO2 nanoparticles abrogates inflammatory effects and local changes of the lipid composition in the rat lung: a complementary bioimaging study. Part Fibre Toxicol 15, 31. https://doi.org/10.1186/s12989-018-0267-z

75. Guichard, Y., Fontana, C., Chavinier, E., Terzetti, F., Gaté, L., Binet, S., Darne, C., 2016. Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. Toxicol Ind Health 32, 1639–1650. https://doi.org/10.1177/0748233715572562

76. Gulin-Sarfraz, T., Jonasson, S., Wigenstam, E., von Haartman, E., Bucht, A., Rosenholm, J., 2019. Feasibility Study of Mesoporous Silica Particles for Pulmonary Drug Delivery: Therapeutic Treatment with Dexamethasone in a Mouse Model of Airway Inflammation. Pharmaceutics 11, 149. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040149

77. Guo, C., Ma, R., Liu, X., Xia, Y., Niu, P., Ma, J., Zhou, X., Li, Y., Sun, Z., 2018. Silica nanoparticles induced endothelial apoptosis via endoplasmic reticulum stress-mitochondrial apoptotic signaling pathway. Chemosphere 210, 183–192. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.170

78. Guo, C., Wang, J., Yang, M., Li, Yang, Cui, S., Zhou, X., Li, Yanbo, Sun, Z., 2017. Amorphous silica nanoparticles induce malignant transformation and tumorigenesis of human lung epithelial cells via P53 signaling. Nanotoxicology 11, 1176–1194. https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1403658

79. Guo, C., Xia, Y., Niu, P., Jiang, L., Duan, J., Yu, Y., Zhou, X., Li, Y., Sun, Z., 2015. Silica nanoparticles induce oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in vitro via activation of the MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor-κB signaling. IJN 1463. https://doi.org/10.2147/IJN.S76114

80. Guo, C., Yang, M., Jing, L., Wang, J., Yu, Y., Li, Yang, Duan, J., Zhou, X., Li, Yanbo, zwsun@ccmu.edu.cn, Z., 2016. Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species-mediated MAPK/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling. IJN Volume 11, 5257–5276. https://doi.org/10.2147/IJN.S112030

81. Guo, Z., Martucci, N.J., Liu, Y., Yoo, E., Tako, E., Mahler, G.J., 2018. Silicon dioxide nanoparticle exposure affects small intestine function in an in vitro model. Nanotoxicology 12, 485–508. https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1463407

82. Gunaydin, G., Gedik, M.E., Ayan, S., 2021a. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer–A Review of the Current Clinical Status. Front. Chem. 9, 686303. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.686303

83. Gunaydin, G., Gedik, M.E., Ayan, S., 2021b. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. Front. Chem. 9, 691697. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.691697

84. Hadipour Moghaddam, S.P., Mohammadpour, R., Ghandehari, H., 2019. In vitro and in vivo evaluation of degradation, toxicity, biodistribution, and clearance of silica nanoparticles as a function of size, porosity, density, and composition. J Control Release 311–312, 1–15. https://doi.org/10.1016/ j.jconrel.2019.08.028

85. Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Focella, T.M., Smilowitz, H.M., 2006. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. BJR 79, 248–253. https://doi.org/10.1259/bjr/13169882

86. Hakeem, A., Zahid, F., Zhan, G., Yi, P., Yang, H., Gan, L., Yang, X., 2018. Polyaspartic acid-anchored mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive doxorubicin release. Int J Nanomedicine 13, 1029–1040. https://doi.org/10.2147/IJN.S146955

87. Hao, X., Hu, X., Zhang, C., Chen, S., Li, Z., Yang, X., Liu, H., Jia, G., Liu, D., Ge, K., Liang, X.-J., Zhang, J., 2015. Hybrid Mesoporous Silica-Based Drug Carrier Nanostructures with Improved Degradability by Hydroxyapatite. ACS Nano 9, 9614–9625. https://doi.org/10.1021/nn507485j

88. Handa, T., Hirai, T., Izumi, N., Eto, S., Tsunoda, S., Nagano, K., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., 2017. Identifying a size-specific hazard of silica nanoparticles after intravenous administration and its relationship to the other hazards that have negative correlations with the particle size in mice. Nanotechnology 28, 135101. https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5d7c

89. Halubek-Gluchowska, K., Szymański, D., Tran, T.N.L., Ferrari, M., Lukowiak, A., 2021. Upconversion Luminescence of Silica–Calcia Nanoparticles Co-doped with Tm3+ and Yb3+ Ions. Materials 14, 937. https://doi.org/10.3390/ma14040937

90. He, Q., Shi, J., 2011. Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility. J. Mater. Chem. 21, 5845. https://doi.org/10.1039/c0jm03851b

91. He, Q., Zhang, Z., Gao, F., Li, Y., Shi, J., 2011. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. Small 7, 271–280. https://doi.org/10.1002/smll.201001459

92. Hempt, C., Kaiser, J.-P., Scholder, O., Buerki-Thurnherr, T., Hofmann, H., Rippl, A., Schuster, T.B., Wick, P., Hirsch, C., 2020. The impact of synthetic amorphous silica (E 551) on differentiated Caco-2 cells, a model for the human intestinal epithelium. Toxicology in Vitro 67, 104903. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104903

93. Heinen, S., Cuéllar-Camacho, J.L., Weinhart, M., 2017. Thermoresponsive poly(glycidyl ether) brushes on gold: Surface engineering parameters and their implication for cell sheet fabrication. Acta Biomaterialia 59, 117–128. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.029

94. Hong, S., Shen, S., Tan, D.C.T., Ng, W.K., Liu, X., Chia, L.S.O., Irwan, A.W., Tan, R., Nowak, S.A., Marsh, K., Gokhale, R., 2016. High drug load, stable, manufacturable and bioavailable fenofibrate formulations in mesoporous silica: a comparison of spray drying versus solvent impregnation methods. Drug Delivery 23, 316–327. https://doi.org/10.3109/10717544.2014.913323

95. Hosseini, A., Ebadollahi-Natanzi, A., Foroughi, M., Shetab-Boushehri, S.V., 2020. Barium- and Bismuth-loaded Clinoptilolite Micro- and Nano-Particles as Proposed New Efficient Contrast Agents. CCHTS 23, 191–195. https://doi.org/10.2174/1386207323666200218113537

96. Huang, Y., Zhao, X., Zu, Y., Wang, L., Deng, Y., Wu, M., Wang, H., 2019. Enhanced Solubility and Bioavailability of Apigenin via Preparation of Solid Dispersions of Mesoporous Silica Nanoparticles. Iran J Pharm Res 18, 168–182.

97. Hukins, D.W.L., Mahomed, A., Kukureka, S.N., 2008. Accelerated aging for testing polymeric biomaterials and medical devices. Medical Engineering & Physics 30, 1270–1274. https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2008.06.001

98. Inoue, M., Sakamoto, K., Suzuki, A., Nakai, S., Ando, A., Shiraki, Y., Nakahara, Y., Omura, M., Enomoto, A., Nakase, I., Sawada, M., Hashimoto, N., 2021. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. Part Fibre Toxicol 18, 21. https://doi.org/10.1186/s12989-021-00415-0

99. Izak-Nau, E., Kenesei, K., Murali, K., Voetz, M., Eiden, S., Puntes, V.F., Duschl, A., Madarász, E., 2014. Interaction of differently functionalized fluorescent silica nanoparticles with neural stem- and tissue-type cells. Nanotoxicology 8, 138–148. https://doi.org/10.3109/17435390.2013.864427

100. Jafari, S., Derakhshankhah, H., Alaei, L., Fattahi, A., Varnamkhasti, B.S., Saboury, A.A., 2019. Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications. Biomedicine & Pharmacotherapy 109, 1100–1111. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.167

101. Jaganathan, H., Godin, B., 2012. Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles. Advanced Drug Delivery Reviews 64, 1800–1819. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.008

102. Ji, Z., Guo, W., Sakkiah, S., Liu, J., Patterson, T., Hong, H., 2021. Nanomaterial Databases: Data Sources for Promoting Design and Risk Assessment of Nanomaterials. Nanomaterials 11, 1599. https://doi.org/10.3390/nano11061599

103. Jin, Z., Sun, Y., Yang, T., Tan, L., Lv, P., Xu, Q., Tao, G., Qin, S., Lu, X., He, Q., 2021. Nanocapsule-mediated sustained H2 release in the gut ameliorates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. Biomaterials 276, 121030. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121030

104. Jing, B., Jin, J., Xiang, R., Liu, M., Yang, L., Tong, Y., Xiao, X., Lei, H., Liu, W., Xu, H., Deng, J., Zhou, L., Wu, Y., 2018. Vorinostat and quinacrine have synergistic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia through reactive oxygen species increase and mitophagy inhibition. Cell Death Dis 9, 589. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0679-6

105. Juère, E., Del Favero, G., Masse, F., Marko, D., Popat, A., Florek, J., Caillard, R., Kleitz, F., 2020. Gastro-protective protein-silica nanoparticles formulation for oral drug delivery: In vitro release, cytotoxicity and mitochondrial activity. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 151, 171–180. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.03.015

106. Kayan, A., Mert, O., 2014. Preparation of l-Lactide/3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane Copolymeric Materials with Various Catalysts. J Inorg Organomet Polym 24, 1055–1062. https://doi.org/10.1007/s10904-014-0083-3

107. Kerkhofs, S., Saïdi, F., Vandervoort, N., Van den Mooter, G., Martineau, C., Taulelle, F., Martens, J.A., 2015. Silica capsules enclosing P123 triblock copolymer micelles for flurbiprofen storage and release. J. Mater. Chem. B 3, 3054–3061. https://doi.org/10.1039/C5TB00058K

108. Kersting, M., Olejnik, M., Rosenkranz, N., Loza, K., Breisch, M., Rostek, A., Westphal, G., Bünger, J., Ziegler, N., Ludwig, A., Köller, M., Sengstock, C., Epple, M., 2020. Subtoxic cell responses to silica particles with different size and shape. Sci Rep 10, 21591. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78550-5

109. Kholin, V.V., Chepurna, O.M., Shton, I.O., Voytsehovich, V.S., Pavlov, S.V., Zabolotna, N.I., Romaniuk, R., Wójcik, W., Amirgaliyev, Y., Kovalev, V., 2017. In-vivo monitoring of oxygen saturation in murine carcinoma during PDT by diode laser light diffuse reflectance, in: Romaniuk, R.S., Linczuk, M. (Eds.), . Wilga, Poland, p. 104453N. https://doi.org/10.1117/12.2280980

110. Kim, H.S., Kumbar, S.G., Nukavarapu, S.P., 2023. Amorphous silica fiber matrix biomaterials: An analysis of material synthesis and characterization for tissue engineering. Bioactive Materials 19, 155–166. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.04.002

111. Kim, J.-E., Kim, H., Meang, E.-H., Song, Y.-J., Kim, M.-K., 2014. In vitro cytotoxicity of SiO2 or ZnO nanoparticles with different sizes and surface charges on U373MG human glioblastoma cells. IJN 235. https://doi.org/10.2147/IJN.S57936

112. Kim, J.-S., Lee, S., Doh, H., Kim, M., Kim, D., 2021. Real-Time Tracking of Highly Luminescent Mesoporous Silica Particles Modified with Europium β-Diketone Chelates in Living Cells. Nanomaterials 11, 343. https://doi.org/10.3390/nano11020343

113. Kirla, H., Hughes, L., Henry, D.J., 2020. Carbohydrate coated

fluorescent mesoporous silica particles for bacterial imaging. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 188, 110751. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110751

114. Ko, J.-W., Lee, H.-J., Shin, N.-R., Seo, Y.-S., Kim, S.-H., Shin, I.-S., Kim, J.-S., 2018. Silicon Dioxide Nanoparticles Enhance Endotoxin-Induced Lung Injury in Mice. Molecules 23, 2247. https://doi.org/10.3390/molecules23092247

115. Ko, J.-W., Shin, N.-R., Je-Oh, L., Jung, T.-Y., Moon, C., Kim, T.-W., Choi, J., Shin, I.-S., Heo, J.-D., Kim, J.-C., 2020. Silica dioxide nanoparticles aggravate airway inflammation in an asthmatic mouse model via NLRP3 inflammasome activation. Regulatory Toxicology and Pharmacology 112, 104618. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104618

116. Krasilnikova, A.A., Shestopalov, M.A., Brylev, K.A., Kirilova, I.A., Khripko, O.P., Zubareva, K.E., Khripko, Y.I., Podorognaya, V.T., Shestopalova, L.V., Fedorov, V.E., Mironov, Y.V., 2015. Prospects of molybdenum and rhenium octahedral cluster complexes as X-ray contrast agents. J Inorg Biochem 144, 13–17. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.12.016

117. Krasilnikova, A.A., Solovieva, A.O., Ivanov, A.A., Trifonova, K.E., Pozmogova, T.N., Tsygankova, A.R., Smolentsev, A.I., Kretov, E.I., Sergeevichev, D.S., Shestopalov, M.A., Mironov, Y.V., Shestopalov, A.M., Poveshchenko, A.F., Shestopalova, L.V., 2017. Comprehensive study of hexarhenium cluster complex Na4[{Re6Te8}(CN)6] - In terms of a new promising luminescent and X-ray contrast agent. Nanomedicine 13, 755–763. https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.016

118. Låg, M., Skuland, T., Godymchuk, A., Nguyen, T.H.T., Pham, H.L.T., Refsnes, M., 2018. Silica Nanoparticle-induced Cytokine Responses in BEAS-2B and HBEC3-KT Cells: Significance of Particle Size and Signalling Pathways in Different Lung Cell Cultures. Basic Clin Pharmacol Toxicol 122, 620–632. https://doi.org/10.1111/bcpt.12963

119. Lai, X., Wei, Y., Zhao, H., Chen, S., Bu, X., Lu, F., Qu, D., Yao, L., Zheng, J., Zhang, J., 2015. The effect of Fe 2 O 3 and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells: Nanoparticles, cytotoxicity and metabolism. J. Appl. Toxicol. 35, 651–664. https://doi.org/10.1002/jat.3128

120. Lee, C.-H., Cheng, S.-H., Wang, Y.-J., Chen, Y.-C., Chen, N.-T., Souris, J., Chen, C.-T., Mou, C.-Y., Yang, C.-S., Lo, L.-W., 2009. Near-Infrared Mesoporous Silica Nanoparticles for Optical Imaging: Characterization and In Vivo Biodistribution. Adv. Funct. Mater. 19, 215–222. https://doi.org/10.1002/adfm.200800753

121. Li, Q., Hu, H., Jiang, L., Zou, Y., Duan, J., Sun, Z., 2016. Cytotoxicity and autophagy dysfunction induced by different sizes of silica particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. Toxicol. Res. 5, 1216–1228. https://doi.org/10.1039/C6TX00100A

122. Li, Y., Duan, J., Chai, X., Yang, M., Wang, J., Chen, R., Sun, Z., 2019. Microarray-assisted size-effect study of amorphous silica nanoparticles on human bronchial epithelial cells. Nanoscale 11, 22907–22923. https://doi.org/10.1039/C9NR07350G

123. Li, Yang, Sun, L., Jin, M., Du, Z., Liu, X., Guo, C., Li, Yanbo, Huang, P., Sun, Z., 2011. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. Toxicology in Vitro 25, 1343–1352. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.003

124. Li, X., Xue, M., Raabe, O.G., Aaron, H.L., Eisen, E.A., Evans, J.E., Hayes, F.A., Inaga, S., Tagmount, A., Takeuchi, M., Vulpe, C., Zink, J.I., Risbud, S.H., Pinkerton, K.E., 2015. Aerosol droplet delivery of mesoporous silica nanoparticles: A strategy for respiratory-based therapeutics. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 11, 1377–1385. https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.007

125. Li, X., Zhang, X., Zhao, Y., Sun, L., 2020. Fabrication of biodegradable Mn-doped mesoporous silica nanoparticles for pH/redox dual response drug delivery. Journal of Inorganic Biochemistry 202, 110887. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110887

126. Liao, Y.-T., Liu, C.-H., Yu, J., Wu, K.C.-W., 2014. Liver cancer cells: targeting and prolonged-release drug carriers consisting of mesoporous silica nanoparticles and alginate microspheres. Int J Nanomedicine 9, 2767–2778. https://doi.org/10.2147/IJN.S60171

127. Liang, C., Zhang, X., Wang, Z., Wang, W., Yang, M., Dong, X., 2020. Organic/inorganic nanohybrids rejuvenate photodynamic cancer therapy. J. Mater. Chem. B 8, 4748–4763. https://doi.org/10.1039/D0TB00098A

128. Liberman, A., Wu, Z., Barback, C.V., Viveros, R., Blair, S.L., Ellies, L.G., Vera, D.R., Mattrey, R.F., Kummel, A.C., Trogler, W.C., 2013. Color Doppler Ultrasound and Gamma Imaging of Intratumorally Injected 500 nm Iron–Silica Nanoshells. ACS Nano 7, 6367–6377. https://doi.org/10.1021/nn402507d

129. Liu, T., Li, L., Fu, C., Liu, H., Chen, D., Tang, F., 2012. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. Biomaterials 33, 2399–2407. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.008

130. Liu, T., Liu, H., Fu, C., Li, L., Chen, D., Zhang, Y., Tang, F., 2013. Smaller Silica Nanorattles Reabsorbed by Intestinal Aggravate Multiple Organs Damage. j. nanosci. nanotech. 13, 6506–6516. https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7545

131. Lozano, O., Silva-Platas, C., Chapoy-Villanueva, H., Pérez, B.E., Lees, J.G., Ramachandra, C.J.A., Contreras-Torres, F.F., Lázaro-Alfaro, A., Luna-Figueroa, E., Bernal-Ramírez, J., Gordillo-Galeano, A., Benitez, A., Oropeza-Almazán, Y., Castillo, E.C., Koh, P.L., Hausenloy, D.J., Lim, S.Y., García-Rivas, G., 2020. Amorphous SiO2 nanoparticles promote cardiac dysfunction via the opening of the mitochondrial permeability transition pore in rat heart and human cardiomyocytes. Part Fibre Toxicol 17, 15. https://doi.org/10.1186/s12989-020-00346-2

132. Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M., Sarmento, B., 2017. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture. Mol. Pharmaceutics 14, 1264–1270. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165

133. Lu, F., Wu, S.-H., Hung, Y., Mou, C.-Y., 2009. Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. Small 5, 1408–1413. https://doi.org/10.1002/smll.200900005

134. Lundqvist, M., Sethson, I., Jonsson, B.-H., 2004. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. Langmuir 20, 10639–10647. https://doi.org/10.1021/la0484725

135. Lungu, I.I., Rădulescu, M., Mogoşanu, G.D., Grumezescu, A.M., 2016. pH sensitive core-shell magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer therapy. Rom J Morphol Embryol 57, 23–32.

136. Ma, H., Song, B., Wang, Y., Cong, D., Jiang, Y., Yuan, J., 2017. Dual-emissive nanoarchitecture of lanthanide-complex-modified silica particles for in vivo ratiometric time-gated luminescence imaging of hypochlorous acid. Chem. Sci. 8, 150–159. https://doi.org/10.1039/C6SC02243J

137. Mahmoud, A.M., Desouky, E.M., Hozayen, W.G., Bin-Jumah, M., El-Nahass, E.-S., Soliman, H.A., Farghali, A.A., 2019. Mesoporous Silica Nanoparticles Trigger Liver and Kidney Injury and Fibrosis Via Altering TLR4/NF-κB, JAK2/STAT3 and Nrf2/HO-1 Signaling in Rats. Biomolecules 9, 528. https://doi.org/10.3390/biom9100528

138. Maleki, A., Kettiger, H., Schoubben, A., Rosenholm, J.M., Ambrogi, V., Hamidi, M., 2017. Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs. Journal of Controlled Release 262, 329–347. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.047

139. Malfait, B., Correia, N.T., Mussi, A., Paccou, L., Guinet, Y., Hédoux, A., 2019. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. Microporous and Mesoporous Materials 277, 203–207. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.10.022

140. Manzano, M., 2021. Chronology of Global Success: 20 Years of Prof Vallet-Regí Solving Questions. Pharmaceutics 13, 2179. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122179

141. Martín-Saavedra, F.M., Ruíz-Hernández, E., Boré, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M., Vilaboa, N., 2010. Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. Acta Biomaterialia 6, 4522–4531. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.030

142. Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J.M., Betancor, L., Pessela, B.C.C., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2003. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. Biomacromolecules 4, 772–777. https://doi.org/10.1021/bm0257661

143. Mathieu, Coppel, Respaud, Nguyen, Boutry, Laurent, Stanicki, Henoumont, Novio, Lorenzo, Montpeyó, Amiens, 2019. Silica Coated Iron/Iron Oxide Nanoparticles as a Nano-Platform for T2 Weighted Magnetic Resonance Imaging. Molecules 24, 4629. https://doi.org/10.3390/molecules24244629

144. McCarthy, C.A., Ahern, R.J., Dontireddy, R., Ryan, K.B., Crean, A.M., 2016. Mesoporous silica formulation strategies for drug dissolution enhancement: a review. Expert Opinion on Drug Delivery 13, 93–108. https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1100165

145. McCarthy, J., Inkielewicz-Stępniak, I., Corbalan, J.J., Radomski, M.W., 2012. Mechanisms of Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles on Human Lung Submucosal Cells in Vitro: Protective Effects of Fisetin. Chem. Res. Toxicol. 25, 2227–2235. https://doi.org/10.1021/tx3002884

146. Meka, A.K., Jenkins, L.J., Dàvalos-Salas, M., Pujara, N., Wong, K.Y., Kumeria, T., Mariadason, J.M., Popat, A., 2018. Enhanced Solubility, Permeability and Anticancer Activity of Vorinostat Using Tailored Mesoporous Silica

Nanoparticles. Pharmaceutics 10. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040283

147. Meissner, J., Prause, A., Bharti, B., Findenegg, G.H., 2015. Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength. Colloid Polym Sci 293, 3381–3391. https://doi.org/10.1007/s00396-015-3754-x

148. Mendez, N., Liberman, A., Corbeil, J., Barback, C., Viveros, R., Wang, J., Wang-Rodriguez, J., Blair, S.L., Mattrey, R., Vera, D., Trogler, W., Kummel, A.C., 2017. Assessment of in vivo systemic toxicity and biodistribution of iron-doped silica nanoshells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 13, 933–942. https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.018

149. Mo, J., He, L., Ma, B., Chen, T., 2016. Tailoring Particle Size of Mesoporous Silica Nanosystem To Antagonize Glioblastoma and Overcome Blood–Brain Barrier. ACS Appl. Mater. Interfaces 8, 6811–6825. https://doi.org/10.1021/acsami.5b11730

150. Muhammad, F., Guo, M., Qi, W., Sun, F., Wang, A., Guo, Y., Zhu, G., 2011. pH-Triggered Controlled Drug Release from Mesoporous Silica Nanoparticles via Intracelluar Dissolution of ZnO Nanolids. J. Am. Chem. Soc. 133, 8778–8781. https://doi.org/10.1021/ja200328s

151. Murugadoss, S., Lison, D., Godderis, L., Van Den Brule, S., Mast, J., Brassinne, F., Sebaihi, N., Hoet, P.H., 2017. Toxicology of silica nanoparticles: an update. Arch Toxicol 91, 2967–3010. https://doi.org/10.1007/s00204-017-1993-y

152. Murugadoss, S., van den Brule, S., Brassinne, F., Sebaihi, N., Mejia, J., Lucas, S., Petry, J., Godderis, L., Mast, J., Lison, D., Hoet, P.H., 2020. Is aggregated synthetic amorphous silica toxicologically relevant? Part Fibre Toxicol 17, 1. https://doi.org/10.1186/s12989-019-0331-3

153. Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Yamashita, T., Yamashita, K., Yoshida, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Imazawa, T., Itoh, N., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., 2010. Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. Pharmazie 65, 199–201.

154. Nakayama, M., 2018. Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. Front. Immunol. 9, 103. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00103

155. Napierska, D., Thomassen, L.C.J., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Martens, J.A., Hoet, P.H., 2009. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. Small 5, 846–

853. https://doi.org/10.1002/smll.200800461

156. Napierska, D., Thomassen, L.C.J., Vanaudenaerde, B., Luyts, K., Lison, D., Martens, J.A., Nemery, B., Hoet, P.H.M., 2012. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: The role of size and surface area. Toxicology Letters 211, 98–104. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.002

157. Nemmar, A., Yuvaraju, P., Beegam, S., Pathan, J., Kazzam, E.E., Ali, B.H., 2016. Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles. IJN 919. https://doi.org/10.2147/IJN.S92278

158. Nicolae-Maranciuc, A., Chicea, D., Chicea, L.M., 2022. Ag Nanoparticles for Biomedical Applications-Synthesis and Characterization-A Review. Int J Mol Sci 23, 5778. https://doi.org/10.3390/ijms23105778

159. Nyokong, T., Ahsen, V. (Eds.), 2012. Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security. Springer Netherlands, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3872-2

160. O'Hagan, D.T., Singh, M., Ulmer, J.B., 2004. Microparticles for the delivery of DNA vaccines. Immunol Rev 199, 191–200. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00153.x

161. Ogawa, T., Okumura, R., Nagano, K., Minemura, T., Izumi, M., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., Maeda, Y., Kumanogoh, A., Tsutsumi, Y., Takeda, K., 2021. Oral intake of silica nanoparticles exacerbates intestinal inflammation. Biochemical and Biophysical Research Communications 534, 540–546. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.047

162. Okamoto, H., Sugiyama, Y., Nakano, H., 2011. Synthesis and Modification of Silicon Nanosheets and Other Silicon Nanomaterials. Chem. Eur. J. 17, 9864–9887. https://doi.org/10.1002/chem.201100641

163. Olszowska, I., Leśniewski, A., Kelm, A., Pieta, I.S., Siejca, A., Niedziółka-Jönsson, J., 2020. Zinc oxide quantum dots embedded in hydrophobic silica particles for latent fingermarks visualization based on time-gated luminescence measurements. Methods Appl. Fluoresc. 8, 025001. https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab6f24

164. Park, H.J., Sohn, J.-H., Kim, Y.-J., Park, Y.H., Han, H., Park, K.H., Lee, K., Choi, H., Um, K., Choi, I.-H., Park, J.-W., Lee, J.-H., 2015. Acute exposure to silica

nanoparticles aggravate airway inflammation: different effects according to surface characteristics. Exp Mol Med 47, e173–e173. https://doi.org/10.1038/emm.2015.50

165. Park, J.-H., Jeong, H., Hong, J., Chang, M., Kim, M., Chuck, R.S., Lee, J.K., Park, C.-Y., 2016. The Effect of Silica Nanoparticles on Human Corneal Epithelial Cells. Sci Rep 6, 37762. https://doi.org/10.1038/srep37762

166. Park, S.B., Joo, Y.-H., Kim, H., Ryu, W., Park, Y., 2015. Biodegradation-tunable mesoporous silica nanorods for controlled drug delivery. Materials Science and Engineering: C 50, 64–73. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.073

167. Park, S.B., Jung, W.H., Kim, K.Y., Koh, B., 2020. Toxicity Assessment of SiO2 and TiO2 in Normal Colon Cells, In Vivo and in Human Colon Organoids. Molecules 25, 3594. https://doi.org/10.3390/molecules25163594

168. Petrache Voicu, S., Dinu, D., Sima, C., Hermenean, A., Ardelean, A., Codrici, E., Stan, M., Zărnescu, O., Dinischiotu, A., 2015. Silica Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Autophagy but Not Apoptosis in the MRC-5 Cell Line. IJMS 16, 29398–29416. https://doi.org/10.3390/ijms161226171

169. Pesce, D., Wu, Y., Kolbe, A., Weil, T., Herrmann, A., 2013. Enhancing cellular uptake of GFP via unfolded supercharged protein tags. Biomaterials 34, 4360–4367. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.038

170. Pellen-Mussi, P., Tricot-Doleux, S., Neaime, C., Nerambourg, N., Cabello-Hurtado, F., Cordier, S., Grasset, F., Jeanne, S., 2018. Evaluation of Functional SiO 2 Nanoparticles Toxicity by a 3D Culture Model. j nanosci nanotechnol 18, 3148–3157. https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14619

171. Pham, D.-H., De Roo, B., Nguyen, X.-B., Vervaele, M., Kecskés, A., Ny, A., Copmans, D., Vriens, H., Locquet, J.-P., Hoet, P., de Witte, P.A.M., 2016. Use of Zebrafish Larvae as a Multi-Endpoint Platform to Characterize the Toxicity Profile of Silica Nanoparticles. Sci Rep 6, 37145. https://doi.org/10.1038/srep37145

172. Prieto-Montero, R., Katsumiti, A., Cajaraville, M.P., López-Arbeloa, I., Martínez-Martínez, V., 2020. Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Bioimaging of Cancer Cells. Sensors 20, 5590. https://doi.org/10.3390/s20195590

173. Price, M., Kessel, D., 2010. On the use of fluorescence probes for detecting reactive oxygen and nitrogen species associated with photodynamic therapy. J. Biomed. Opt. 15, 051605. https://doi.org/10.1117/1.3484258

174. Quignard, S., Mosser, G., Boissière, M., Coradin, T., 2012. Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts. Biomaterials

33, 4431–4442. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.004

175. Rabolli, V., Badissi, A.A., Devosse, R., Uwambayinema, F., Yakoub, Y., Palmai-Pallag, M., Lebrun, A., De Gussem, V., Couillin, I., Ryffel, B., Marbaix, E., Lison, D., Huaux, F., 2014. The alarmin IL-1α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. Part Fibre Toxicol 11, 69. https://doi.org/10.1186/s12989-014-0069-x

176. Rastegari, E., Hsiao, Y.-J., Lai, W.-Y., Lai, Y.-H., Yang, T.-C., Chen, S.-J., Huang, P.-I., Chiou, S.-H., Mou, C.-Y., Chien, Y., 2021. An Update on Mesoporous Silica Nanoparticle Applications in Nanomedicine. Pharmaceutics 13, 1067. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071067

177. Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1863, 2977–2992. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012

178. Refuerzo, J.S., Godin, B., Bishop, K., Srinivasan, S., Shah, S.K., Amra, S., Ramin, S.M., Ferrari, M., 2011. Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats. American Journal of Obstetrics and Gynecology 204, 546.e5-546.e9. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.02.033

179. Refsnes, M., Skuland, T., Lilleaas, E., Øvrevik, J., Låg, M., 2019. Concentration-dependent cytokine responses of silica nanoparticles and role of ROS in human lung epithelial cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol 125, 304–314. https://doi.org/10.1111/bcpt.13221

180. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Biochemical Journal 377, 159–169. https://doi.org/10.1042/bj20031253

181. Ribeiro, T., Baleizão, C., Farinha, J., 2014. Functional Films from Silica/Polymer Nanoparticles. Materials 7, 3881–3900. https://doi.org/10.3390/ma7053881

182. Riehl, L., Ströbele, M., Enseling, D., Jüstel, T., Meyer, H.-J., 2016. Molecular Oxygen Modulated Luminescence of an Octahedro -hexamolybdenum Iodide Cluster having Six Apical Thiocyanate Ligands: Molecular Oxygen Modulated. Z. anorg. allg. Chem. 642, 403–408. https://doi.org/10.1002/zaac.201600021

183. Riikonen, J., Xu, W., Lehto, V.-P., 2018. Mesoporous systems for poorly soluble drugs – recent trends. International Journal of Pharmaceutics 536, 178–186.

https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.054

184. Rojas-Mancilla, E., Oyarce, A., Verdugo, V., Morales-Verdejo, C., Echeverria, C., Velásquez, F., Chnaiderman, J., Valiente-Echeverría, F., Ramirez-Tagle, R., 2017. The [Mo_6Cl14]2- Cluster is Biologically Secure and Has Anti-Rotavirus Activity In Vitro. Molecules 22. https://doi.org/10.3390/molecules22071108

185. Rkein, A.M., Ozog, D.M., 2014. Photodynamic Therapy. Dermatologic Clinics 32, 415–425. https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009

186. Ruiz-González, M.L., Torres-Pardo, A., González-Calbet, J.M., 2021. The Role of Transmission Electron Microscopy in the Early Development of Mesoporous Materials for Tissue Regeneration and Drug Delivery Applications. Pharmaceutics 13, 2200. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122200

187. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W., Martins, N., 2019. The Therapeutic Potential of Apigenin. IJMS 20, 1305. https://doi.org/10.3390/ijms20061305

188. Santha Moorthy, M., Bharathiraja, S., Manivasagan, P., Lee, K.D., Oh, J., 2017. Synthesis of surface capped mesoporous silica nanoparticles for pH-stimuli responsive drug delivery applications. Medchemcomm 8, 1797–1805. https://doi.org/10.1039/c7md00270j

189. Schremmer, I., Brik, A., Weber, D.G., Rosenkranz, N., Rostek, A., Loza, K., Brüning, T., Johnen, G., Epple, M., Bünger, J., Westphal, G.A., 2016. Kinetics of chemotaxis, cytokine, and chemokine release of NR8383 macrophages after exposure to inflammatory and inert granular insoluble particles. Toxicology Letters 263, 68–75. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.08.014

190. Schmidt, S., Tavernaro, I., Cavelius, C., Weber, E., Kümper, A., Schmitz, C., Fleddermann, J., Kraegeloh, A., 2017. Silica Nanoparticles for Intracellular Protein Delivery: a Novel Synthesis Approach Using Green Fluorescent Protein. Nanoscale Res Lett 12, 545. https://doi.org/10.1186/s11671-017-2280-9

191. Sekeres, M.A., Othus, M., List, A.F., Odenike, O., Stone, R.M., Gore, S.D., Litzow, M.R., Buckstein, R., Fang, M., Roulston, D., Bloomfield, C.D., Moseley, A., Nazha, A., Zhang, Y., Velasco, M.R., Gaur, R., Atallah, E., Attar, E.C., Cook, E.K., Cull, A.H., Rauh, M.J., Appelbaum, F.R., Erba, H.P., 2017. Randomized Phase II Study of Azacitidine Alone or in Combination With Lenalidomide or With Vorinostat in Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes and Chronic

Myelomonocytic Leukemia: North American Intergroup Study SWOG S1117. J Clin Oncol 35, 2745–2753. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.66.2510

192. Serda, R.E., Mack, A., van de Ven, A.L., Ferrati, S., Dunner, K., Godin, B., Chiappini, C., Landry, M., Brousseau, L., Liu, X., Bean, A.J., Ferrari, M., 2010. Logic-Embedded Vectors for Intracellular Partitioning, Endosomal Escape, and Exocytosis of Nanoparticles. Small 6, 2691–2700. https://doi.org/10.1002/smll.201000727

193. Seydoux, E., Rothen-Ruthishauser, B., Nita, I., Gazdhar, A., Petri-Fink, A., Blank, F., von Garnier, C., Balog, S., Stumbles, P., 2014. Size-dependent accumulation of particles in lysosomes modulates dendritic cell function through impaired antigen degradation. IJN 3885. https://doi.org/10.2147/IJN.S64353

194. Sheldon, J.C., 1962. 76. Bromo- and iodo-molybdenum(II) compounds. J. Chem. Soc. 410. https://doi.org/10.1039/jr9620000410

195. Shen, S., Ng, W.K., Chia, L., Dong, Y., Tan, R.B.H., 2010. Stabilized Amorphous State of Ibuprofen by Co-Spray Drying With Mesoporous SBA-15 to Enhance Dissolution Properties. Journal of Pharmaceutical Sciences 99, 1997–2007. https://doi.org/10.1002/jps.21967

196. Shen, Y., Cao, B., Snyder, N.R., Woeppel, K.M., Eles, J.R., Cui, X.T., 2018. ROS responsive resveratrol delivery from LDLR peptide conjugated PLA-coated mesoporous silica nanoparticles across the blood–brain barrier. J Nanobiotechnol 16, 13. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0340-7

197. Song, Y., Du, D., Li, L., Xu, J., Dutta, P., Lin, Y., 2017. In Vitro Study of Receptor-Mediated Silica Nanoparticles Delivery across Blood–Brain Barrier. ACS Appl. Mater. Interfaces 9, 20410–20416. https://doi.org/10.1021/acsami.7b03504

198. Song, Y., Zhou, B., Du, X., Wang, Y., Zhang, J., Ai, Y., Xia, Z., Zhao, G., 2020. Folic acid (FA)-conjugated mesoporous silica nanoparticles combined with MRP-1 siRNA improves the suppressive effects of myricetin on non-small cell lung cancer (NSCLC). Biomedicine & Pharmacotherapy 125, 109561. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109561

199. Spataru, C., Ianchis, R., Petcu, C., Nistor, C., Purcar, V., Trica, B., Nitu, S., Somoghi, R., Alexandrescu, E., Oancea, F., Donescu, D., 2016. Synthesis of Non-Toxic Silica Particles Stabilized by Molecular Complex Oleic-Acid/Sodium Oleate. IJMS 17, 1936. https://doi.org/10.3390/ijms17111936

200. Speybroeck, M.V., Barillaro, V., Thi, T.D., Mellaerts, R., Martens, J., Humbeeck, J.V., Vermant, J., Annaert, P., Den Mooter, G.V., Augustijns, P., 2009.

Ordered Mesoporous Silica Material SBA-15: A Broad-Spectrum Formulation Platform for Poorly Soluble Drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences 98, 2648–2658. https://doi.org/10.1002/jps.21638

201. Sun, D., Gong, L., Xie, J., Gu, X., Li, Y., Cao, Q., Li, Q., A., L., Gu, Z., Xu, H., 2018. Toxicity of silicon dioxide nanoparticles with varying sizes on the cornea and protein corona as a strategy for therapy. Science Bulletin 63, 907–916. https://doi.org/10.1016/j.scib.2018.05.037

202. Sun, J., Chen, Xue, 2013. Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo. IJN 1129. https://doi.org/10.2147/IJN.S42242

203. Sun, Y., Huffman, K., Freeman, W.R., Sailor, M.J., Cheng, L., 2020. Intravitreal safety profiles of sol-gel mesoporous silica microparticles and the degradation product (Si(OH)4). Drug Delivery 27, 703–711. https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1760401

204. Takeuchi, S., Hase, T., Shimizu, S., Ando, M., Hata, A., Murakami, H., Kawakami, T., Nagase, K., Yoshimura, K., Fujiwara, T., Tanimoto, A., Nishiyama, A., Arai, S., Fukuda, K., Katakami, N., Takahashi, T., Hasegawa, Y., Ko, T.K., Ong, S.T., Yano, S., 2020. Phase I study of vorinostat with gefitinib in BIM deletion polymorphism/epidermal growth factor receptor mutation double-positive lung cancer. Cancer Sci 111, 561–570. https://doi.org/10.1111/cas.14260

205. Tan, B.-J., Liu, Y., Chang, K.-L., Lim, B.K.W., Chiu, G.N.C., 2012. Perorally active nanomicellar formulation of quercetin in the treatment of lung cancer. Int J Nanomedicine 7, 651–661. https://doi.org/10.2147/IJN.S26538

206. Tang, H., Guo, J., Sun, Y., Chang, B., Ren, Q., Yang, W., 2011. Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 421, 388–396. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.013

207. Tella, J.O., Adekoya, J.A., Ajanaku, K.O., 2022. Mesoporous silica nanocarriers as drug delivery systems for anti-tubercular agents: a review. R. Soc. open sci. 9, 220013. https://doi.org/10.1098/rsos.220013

208. Teo, B.K., Sun, X.H., 2007. Silicon-Based Low-Dimensional Nanomaterials and Nanodevices. Chem. Rev. 107, 1454–1532. https://doi.org/10.1021/cr030187n

209. Thomas, M.J.K., Slipper, I., Walunj, A., Jain, A., Favretto, M.E., Kallinteri, P., Douroumis, D., 2010. Inclusion of poorly soluble drugs in highly ordered mesoporous silica nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics 387,

272–277. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.023

210. Trzeciak, K., Chotera-Ouda, A., Bak-Sypien, I.I., Potrzebowski, M.J., 2021. Mesoporous Silica Particles as Drug Delivery Systems—The State of the Art in Loading Methods and the Recent Progress in Analytical Techniques for Monitoring These Processes. Pharmaceutics 13, 950. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070950

211. Trzeciak, K., Kaźmierski, S., Wielgus, E., Potrzebowski, M.J., 2020. DiSupLo - New extremely easy and efficient method for loading of active pharmaceutical ingredients into the pores of MCM-41 mesoporous silica particles. Microporous and Mesoporous Materials 308, 110506. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110506

212. Tsakiridis, A., Alexander, L.M., Gennet, N., Sanchez-Martin, R.M., Livigni, A., Li, M., Bradley, M., Brickman, J.M., 2009. Microsphere-based tracing and molecular delivery in embryonic stem cells. Biomaterials 30, 5853–5861. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.024

213. Tsou, M.-H., Lee, C.-C., Wu, Z.-Y., Lee, Z.-H., Lin, H.-M., 2021. Mesoporous silica nanoparticles with fluorescent and magnetic dual-imaging properties to deliver fucoidan. International Journal of Biological Macromolecules 188, 870–878. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.148

214. Tüncel, Ö., Kahraman, E., Bağci, G., Atabey, N., Özçelik, S., 2021. Engineered silica nanoparticles are biologically safe vehicles to deliver drugs or genes to liver cells. Materials Science and Engineering: C 119, 111585. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111585

215. Turecek, P.L., Bossard, M.J., Schoetens, F., Ivens, I.A., 2016. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences 105, 460–475. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.015

216. Turquet, F.-X., Corbella, M., Fellah, C., Montagnac, G., Reynard, B., Bonneviot, L., Zhang, K., Albela, B., 2021. Incorporation of Manganese Complexes within Hybrid Resol-Silica and Carbon-Silica Nanoparticles. Nanomaterials 11, 774. https://doi.org/10.3390/nano11030774

217. Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry: Electronic Release. CD, 2003. Wiley-VCH, Weinheim.

218. van Rijt, S.H., Bölükbas, D.A., Argyo, C., Wipplinger, K., Naureen, M.,

Datz, S., Eickelberg, O., Meiners, S., Bein, T., Schmid, O., Stoeger, T., 2016. Applicability of avidin protein coated mesoporous silica nanoparticles as drug carriers in the lung. Nanoscale 8, 8058–8069. https://doi.org/10.1039/C5NR04119H

219. Vallet-Regi, M., Rámila, A., del Real, R.P., Pérez-Pariente, J., 2001. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. Chem. Mater. 13, 308–311. https://doi.org/10.1021/cm0011559

220. Vasilchenko, S.Yu., Volkova, A.I., Ryabova, A.V., Loschenov, V.B., Konov, V.I., Mamedov, A.A., Kuzmin, S.G., Lukyanets, E.A., 2010. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantology. J. Biophoton. 3, 336–346. https://doi.org/10.1002/jbio.200900099

221. Vismara, E., Melone, L., Gastaldi, G., Cosentino, C., Torri, G., 2009. Surface functionalization of cotton cellulose with glycidyl methacrylate and its application for the adsorption of aromatic pollutants from wastewaters. Journal of Hazardous Materials 170, 798–808. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.042

222. von Haartman, E., Lindberg, D., Prabhakar, N., Rosenholm, J.M., 2016. On the intracellular release mechanism of hydrophobic cargo and its relation to the biodegradation behavior of mesoporous silica nanocarriers. European Journal of Pharmaceutical Sciences 95, 17–27. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.001

223. Vorotnikova, N.A., Alekseev, A.Y., Vorotnikov, Y.A., Evtushok, D.V., Molard, Y., Amela-Cortes, M., Cordier, S., Smolentsev, A.I., Burton, C.G., Kozhin, P.M., Zhu, P., Topham, P.D., Mironov, Y.V., Bradley, M., Efremova, O.A., Shestopalov, M.A., 2019. Octahedral molybdenum cluster as a photoactive antimicrobial additive to a fluoroplastic. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 105, 110150. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110150

224. Vuong, Q.L., Gillis, P., Roch, A., Gossuin, Y., 2017. Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles used as contrast agents in magnetic resonance imaging: a theoretical review: Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles. WIREs Nanomed Nanobiotechnol 9, e1468. https://doi.org/10.1002/wnan.1468

225. Walter, D., 2013. Primary Particles – Agglomerates – Aggregates, in: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Ed.), Nanomaterials. Wiley, pp. 9–24. https://doi.org/10.1002/9783527673919.ch1

226. Wang, M., Wang, K., Deng, G., Liu, X., Wu, X., Hu, H., Zhang, Y., Gao, W., Li, Q., 2020. Mitochondria-Modulating Porous Se@SiO2 Nanoparticles Provide

Resistance to Oxidative Injury in Airway Epithelial Cells: Implications for Acute Lung Injury. IJN Volume 15, 2287–2302. https://doi.org/10.2147/IJN.S240301

227. Wang, W., Zeng, C., Feng, Y., Zhou, F., Liao, F., Liu, Y., Feng, S., Wang, X., 2018. The size-dependent effects of silica nanoparticles on endothelial cell apoptosis through activating the p53-caspase pathway. Environmental Pollution 233, 218–225. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.053

228. Wang, Y., Zhao, Y., Cui, Y., Zhao, Q., Zhang, Q., Musetti, S., Kinghorn, K.A., Wang, S., 2018. Overcoming multiple gastrointestinal barriers by bilayer modified hollow mesoporous silica nanocarriers. Acta Biomaterialia 65, 405–416. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.025

229. Wang, Yumei, Ke, J., Guo, X., Gou, K., Sang, Z., Wang, Yanbu, Bian, Y., Li, S., Li, H., 2022. Chiral mesoporous silica nano-screws as an efficient biomimetic oral drug delivery platform through multiple topological mechanisms. Acta Pharmaceutica Sinica B 12, 1432–1446. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.014

230. Wang, Zhenzhen, Wang, C., Liu, S., He, W., Wang, L., Gan, J., Huang, Z., Wang, Zhenheng, Wei, H., Zhang, J., Dong, L., 2017. Specifically Formed Corona on Silica Nanoparticles Enhances Transforming Growth Factor β1 Activity in Triggering Lung Fibrosis. ACS Nano 11, 1659–1672. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07461

231. Waters, K.M., Masiello, L.M., Zangar, R.C., Tarasevich, B.J., Karin, N.J., Quesenberry, R.D., Bandyopadhyay, S., Teeguarden, J.G., Pounds, J.G., Thrall, B.D., 2009. Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. Toxicological Sciences 107, 553–569. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn250

232. Wei, J., Liu, J., Liang, S., Sun, M., Duan, J., 2020. Low-Dose Exposure of Silica Nanoparticles Induces Neurotoxicity via Neuroactive Ligand–Receptor Interaction Signaling Pathway in Zebrafish Embryos. IJN Volume 15, 4407–4415. https://doi.org/10.2147/IJN.S254480

233. Wottrich, R., Diabaté, S., Krug, H.F., 2004. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. International Journal of Hygiene and Environmental Health 207, 353–361. https://doi.org/10.1078/1438-4639-00300

234. Wu, C., Chen, B., Wang, Quan, Peng, Pan, Xu, Wu, C., Wu, 2012. In vitro and in vivo evaluation of ordered mesoporous silica as a novel adsorbent in

liquisolid formulation. IJN 199. https://doi.org/10.2147/IJN.S26763

235. Wu, B., Liang, Y., Tan, Y., Xie, C., Shen, J., Zhang, M., Liu, X., Yang, L., Zhang, F., Liu, L., Cai, S., Huai, D., Zheng, D., Zhang, R., Zhang, C., Chen, K., Tang, X., Sui, X., 2016. Genistein-loaded nanoparticles of star-shaped diblock copolymer mannitol-core PLGA-TPGS for the treatment of liver cancer. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 59, 792–800. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.087

236. Xu, G., Shi, H., Ren, L., Gou, H., Gong, D., Gao, X., Huang, N., 2015. Enhancing the anti-colon cancer activity of quercetin by self-assembled micelles. Int J Nanomedicine 10, 2051–2063. https://doi.org/10.2147/IJN.S75550

237. Xue, J.-Y., Li, X., Sun, M.-Z., Wang, Y.-P., Wu, M., Zhang, C.-Y., Wang, Y.-N., Liu, B., Zhang, Y.-S., Zhao, X., Feng, X.-Z., 2013a. An Assessment of the Impact of SiO 2 Nanoparticles of Different Sizes on the Rest/Wake Behavior and the Developmental Profile of Zebrafish Larvae. Small 9, 3161–3168. https://doi.org/10.1002/smll.201300430

238. Yadav, Y.C., Pattnaik, S., Swain, K., 2019. Curcumin loaded mesoporous silica nanoparticles: assessment of bioavailability and cardioprotective effect. Drug Development and Industrial Pharmacy 45, 1889–1895. https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1672717

239. Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X., Yang, L., Yuan, J., Huang, H., He, L., Zhang, B., Zhuang, Z., 2010. SiO2 nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. Part Fibre Toxicol 7, 1. https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-1

240. Yang, K.-N., Zhang, C.-Q., Wang, W., Wang, P.C., Zhou, J.-P., Liang, X.-J., 2014. pH-responsive mesoporous silica nanoparticles employed in controlled drug delivery systems for cancer treatment. Cancer Biol Med 11, 34–43. https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.003

241. Yang, Y.-X., Song, Z.-M., Cheng, B., Xiang, K., Chen, X.-X., Liu, J.-H., Cao, A., Wang, Y., Liu, Y., Wang, H., 2014. Evaluation of the toxicity of food additive silica nanoparticles on gastrointestinal cells: Toxicity of food additive nano silica to gastrointestinal cells. J. Appl. Toxicol. 34, 424–435. https://doi.org/10.1002/jat.2962

242. Yao, X., Tian, Z., Liu, J., Zhu, Y., Hanagata, N., 2017. Mesoporous Silica Nanoparticles Capped with Graphene Quantum Dots for Potential Chemo-Photothermal Synergistic Cancer Therapy. Langmuir 33, 591–599.

https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04189

243. Ye, Y., Liu, J., Chen, M., Sun, L., Lan, M., 2010. In vitro toxicity of silica nanoparticles in myocardial cells. Environmental Toxicology and Pharmacology 29, 131–137. https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.002

244. Yu, X., Zhu, Y., 2016. Preparation of magnetic mesoporous silica nanoparticles as a multifunctional platform for potential drug delivery and hyperthermia. Sci Technol Adv Mater 17, 229–238. https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1178055

245. Yu, H., Yang, Z., Li, F., Xu, L., Sun, Y., 2020. Cell-mediated targeting drugs delivery systems. Drug Delivery 27, 1425–1437. https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1831103

246. Yu, Y., Wang, Z., Wang, R., Jin, J., Zhu, Y.Z., 2021. Short-Term Oral Administration of Mesoporous Silica Nanoparticles Potentially Induced Colon Inflammation in Rats Through Alteration of Gut Microbiota. IJN Volume 16, 881–893. https://doi.org/10.2147/IJN.S295575

247. Yuan, H., Gao, F., Zhang, Z., Miao, L., Yu, R., Zhao, H., Lan, M., 2010. Study on Controllable Preparation of Silica Nanoparticles with Multi-sizes and Their Size-dependent Cytotoxicity in Pheochromocytoma Cells and Human Embryonic Kidney Cells. Journal of Health Science 56, 632–640. https://doi.org/10.1248/jhs.56.632

248. Yukina, G.Yu., Polovnikov, I.V., Sukhorukova, E.G., Zhuravskii, S.G., Galagudza, M.M., 2020. Morphological Analysis of the Respiratory Tract of Rats after Parenteral Administration of Silicon Dioxide Nanoparticles. Bull Exp Biol Med 170, 93–97. https://doi.org/10.1007/s10517-020-05011-4

249. Zeng, C., Shang, W., Wang, K., Chi, C., Jia, X., Fang, Cheng, Yang, D., Ye, J., Fang, Chihua, Tian, J., 2016. Intraoperative Identification of Liver Cancer Microfoci Using a Targeted Near-Infrared Fluorescent Probe for Imaging-Guided Surgery. Sci Rep 6, 21959. https://doi.org/10.1038/srep21959

250. Zhang, B.-C., Luo, B.-Y., Zou, J.-J., Wu, P.-Y., Jiang, J.-L., Le, J.-Q., Zhao, R.-R., Chen, L., Shao, J.-W., 2020. Co-delivery of Sorafenib and CRISPR/Cas9 Based on Targeted Core–Shell Hollow Mesoporous Organosilica Nanoparticles for Synergistic HCC Therapy. ACS Appl. Mater. Interfaces 12, 57362–57372. https://doi.org/10.1021/acsami.0c17660

251. Zhang, C., Chen, W., Zhang, T., Jiang, X., Hu, Y., 2020. Hybrid nanoparticle composites applied to photodynamic therapy: strategies and applications. J.

Mater. Chem. B 8, 4726–4737. https://doi.org/10.1039/D0TB00093K

252. Zhang, J., Zhu, Y., Li, J., Zhu, M., Tao, C., Hanagata, N., 2013. Preparation and characterization of multifunctional magnetic mesoporous calcium silicate materials. Science and Technology of Advanced Materials 14, 055009. https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/5/055009

253. Zhang, R., Wang, X., Wang, J., Cheng, M., 2018. Synthesis and Characterization of Konjac Glucomannan/Carrageenan/Nano-silica Films for the Preservation of Postharvest White Mushrooms. Polymers (Basel) 11. https://doi.org/10.3390/polym11010006

254. Zhang, W., Yu, M., Xi, Z., Nie, D., Dai, Z., Wang, J., Qian, K., Weng, H., Gan, Y., Xu, L., 2019. Cancer Cell Membrane-Camouflaged Nanorods with Endoplasmic Reticulum Targeting for Improved Antitumor Therapy. ACS Appl. Mater. Interfaces 11, 46614–46625. https://doi.org/10.1021/acsami.9b18388

255. Zhang, Y., Zhi, Z., Jiang, T., Zhang, J., Wang, Z., Wang, S., 2010. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. Journal of Controlled Release 145, 257–263. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.029

256. Zhang, J., Tang, H., Liu, Z., Chen, B., 2017. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy. IJN Volume 12, 8483–8493. https://doi.org/10.2147/IJN.S148359

257. Zhou, F., Liao, F., Chen, L., Liu, Y., Wang, W., Feng, S., 2019. The size-dependent genotoxicity and oxidative stress of silica nanoparticles on endothelial cells. Environ Sci Pollut Res 26, 1911–1920. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3695-2

258. Zhou, M., Xie, L., Fang, C.-J., Yang, H., Wang, Y.-J., Zhen, X.-Y., Yan, C.-H., Wang, Y., Zhao, M., Peng, S., 2016. Implications for blood-brain-barrier permeability, in vitro oxidative stress and neurotoxicity potential induced by mesoporous silica nanoparticles: effects of surface modification. RSC Adv. 6, 2800–2809. https://doi.org/10.1039/C5RA17517H

259. Zhou, S., Wu, D., Yin, X., Jin, X., Zhang, X., Zheng, S., Wang, C., Liu, Y., 2017. Intracellular pH-responsive and rituximab-conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to lymphoma B cells. J Exp Clin Cancer Res 36, 24. https://doi.org/10.1186/s13046-017-0492-6

260. Zhu, Jingjing, Zhang, Ying, Chen, X., Zhang, Yue, Zhang, K., Zheng, Hongyue, Wei, Y., Zheng, Hangsheng, Zhu, Jiazhen, Wu, F., Piao, J.-G., Zhu, Z., Li, F., 2021. Angiopep-2 modified lipid-coated mesoporous silica nanoparticles for glioma targeting therapy overcoming BBB. Biochemical and Biophysical Research Communications 534, 902–907. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.076

261. Zuo, D., Duan, Z., Jia, Y., Chu, T., He, Q., Yuan, J., Dai, W., Li, Z., Xing, L., Wu, Y., 2016. Amphipathic silica nanoparticles induce cytotoxicity through oxidative stress mediated and p53 dependent apoptosis pathway in human liver cell line HL-7702 and rat liver cell line BRL-3A. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 145, 232–240. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.006

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н., профессору, Шестопаловой Лидии Владимировне за помощь в постановке цели и задач при выполнении работы и обсуждении полученных результатов, Центру коллективного пользования ИЦиГ СО РАН, к.б.н. Байбородину Сергею Ивановичу и Розину Виктору Георгиевичу за предоставление доступа к конфокальному микроскопу и трансмиссионному электронному микроскопу. Коллегам из ИНХ СО РАН: к.х.н. Воротникову Юрию Андреивичу, к.х.н. Прониной Екатерине Валерьевне, к.х.н. Новиковой Евгении Дмитриевне и д.х.н. Шестопалову Михаилу Александровичу за получение частиц диоксида кремния и октаэдрических кластерных комплексов молибдена и помощь в охарактеризации материалов, к.б.н. Соловьевой Анастасии Олеговне (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН) и Мирошниченко Светлане Михайловне (ФИЦ ФТМ) за помощь в проведении биологических исследований.