

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ – ИНСТИТУТ  
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

**Шубенков Александр Николаевич**

**Эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые  
иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Доктор медицинских наук, профессор,  
Член-корр. РАН Л.Б. Буравкова

Москва 2015

## Содержание

	Список сокращений.....	5
	Введение.....	6
Глава 1.	Обзор литературы	
1.1	Область нанотехнологии.....	13
1.2	Характеристика НЧ Si и области их использования.....	17
1.3	Обоснование выбора <i>in vitro</i> модели.....	22
1.4	Факторы, влияющие на цитотоксичность и биосовместимость НЧ <i>in vitro</i>	
1.4.1	Агрегация НЧ в растворе.....	25
1.4.2	Модификация поверхности НЧ.....	26
1.4.3	Взаимодействие НЧ с компонентами биологических сред....	28
1.5	Интернализация НЧ клетками и влияние НЧ на клеточные органеллы.....	30
Глава 2.	Материалы и методы исследований	
2.1	Использованное оборудование, материалы и реактивы	
2.1.2	Химические реактивы, культуральные среды и пластик.....	38
2.2	Клеточные культуры.....	39
2.2.1	Приготовление сред для культивирования клеток.....	39
2.2.2	Выделение мононуклеаров периферической крови человека.....	39
2.2.3	Культивирование мононуклеаров периферической крови человека.....	39
2.2.4	Культивирование МСК.....	40
2.2.5	Культивирование фетальных фибробластов.....	40
2.2.6	Пассирование МСК и фетальных фибробластов.....	40
2.3	НЧ.....	40
2.3.1	Получение НЧ Si.....	41

2.3.2	Синтез НЧ Si/B.....	41
2.3.3	Синтез НЧ Si/Pd.....	42
2.3.4	Синтез НЧ Si/Au.....	42
2.3.5	Синтез НЧ Si/Ag.....	43
2.3.6	Структура исследования (схема эксперимента).....	43
2.4	Исследование клеточной жизнеспособности, состояния внутриклеточных органелл и активации МНК с применением флуоресцентных зондов и моноклональных антител	
2.4.1	Проточная цитометрия.....	44
2.4.2	Оценка жизнеспособности клеток.....	45
2.4.3	Характеристика трансмембранного потенциала митохондрий	45
2.4.4	Оценка состояния лизосомального компартмента.....	46
2.4.5	Анализ продукции активных форм кислорода.....	46
2.4.6	Анализ активации лимфоцитов.....	46
2.4.7	Анализ продукции цитокинов.....	46
2.4.8	Оценка пролиферативной активности фибробластов.....	47
2.4.9	Оценка жесткости клеточной мембраны МСК.....	47
2.4.10	Исследование структуры актинового цитоскелета МСК.....	48
2.4.11	Оценка поглощения/адсорбции НЧ клетками.....	49
2.5	Статистическая обработка данных.....	49
Глава 3.	Результаты исследования и их обсуждение.....	
3.1	Влияние НЧ на иммунокомпетентные клетки человека.....	50
3.1.2	Влияние НЧ на внутриклеточные компартменты МНК и продукцию АФК.....	55
3.1.3	Активация лимфоцитов и продукция интерлейкинов.....	63
3.2	Влияние НЧ на МСК человека.....	68
3.2.1	Жизнеспособность, состояние органелл и содержание АФК в МСК при инкубации с НЧ.....	69

3.2.2	Влияние НЧ Si и Si/V на пролиферацию эмбриональных фибробластов человека.....	82
3.2.3	Жесткость цитоплазматической мембраны и цитоскелет МСК	87
4	Заключение.....	97
5	Выводы.....	100
6	Список литературы.....	101

**Список сокращений:**

АФК – активные формы кислорода

НЧ – наночастицы

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

МНК – мононуклеары периферической крови

СИФ – средняя интенсивность флуоресценции

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФГК – фитогемагглютинин

ФСБ – фосфатный буфер

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

QT - квантовые точки

SSC – сигнал бокового светорассеяния проточного цитометра

## Введение

В настоящее время в связи с развитием целого ряда отраслей науки и техники появилась возможность манипулировать различными объектами на нанометровом уровне, что привело к созданию иных типов материалов – наноматериалов, имеющих принципиально новые свойства и являющихся предметом изучения относительно недавно появившейся области, называемой нанотехнологией.

Наноматериалы по своим размерам сопоставимы с биологическими молекулами и могут быть спроектированы таким образом, чтобы иметь заданные полезные свойства. Как правило, целенаправленно созданные наночастицы (НЧ) состоят из атомов металлов, неметаллов, а также из смеси атомов металлов и неметаллов. Поверхность наноматериалов может быть покрыта полимерами или биоузнаваемыми молекулами для увеличения биосовместимости и селективной доставки [Betty Y.S. et al., 2010]. На данный момент совсем немного наноматериалов проходят клинические испытания или уже одобрены американским фармакологическим комитетом FDA, как например НЧ  $Fe_2O_3$  и НЧ магнетита ( $\gamma$ - $Fe_3O_4$ ) [Davis M.E. et al., 2010].

В последние годы развитие методов получения различных наноматериалов позволяет управлять их свойствами и получать НЧ, интересные для медицины, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а также биотехнологии в целом. Однако эти же свойства НЧ предполагают потенциальные риски для здоровья человека и соответственно, ограничения их использования. Как следствие, значительные усилия направляются на выявление потенциальной опасности НЧ для организма человека и животных. Сообщается как о токсичности ряда наноматериалов для живых организмов [Жорник Е.В. и др., 2014; Колбин И.А., Колесников О.Л. 2011; Braydich-Stolle et al., 2005; Choi J. et al., 2009; Ahamed M. et al., 2010; Suresh A.K. et al., 2010; Fabrega J. et al., 2011; Tsuchiya T. et al., 1996], так и о практически полной биобезопасности некоторых из них [Андреева Е.Р. и др., 2013; Каливраджиян Э.С. и др., 2012; Gupta A.K., Gupta M. 2005]. Оба эти обстоятельства предполагают возможность использования НЧ в биотехнологии и медицине с соответствующим предварительным изучением их цитотоксических свойств.

Хотя нанотехнология является достаточно новой областью знаний, наноразмерные структуры известны давно и широко распространены в природе. Естественными источниками различных НЧ являются вулканы и лесные пожары. НЧ оксидов кремния и железа образуются в процессе естественного выветривания пород. Двигатели внутреннего сгорания и различные производственные процессы являются антропогенными

источниками НЧ. Фуллерены и нанотрубки могут быть получены искусственным путем, в то же время, они образуются в процессе горения и были обнаружены, например, в выхлопных газах. К искусственным наноструктурам относятся объекты различного состава и морфологии. Неорганические НЧ широко используются в солнцезащитных составах, в качестве меток и контрастирующих агентов при различных исследованиях. Следовательно, стоит учитывать, что более широкое применение различных наноматериалов в промышленности и технике также приведет к их попаданию в окружающую среду, причем неизвестно, подвержены ли они биodeградации и через какие пути могут попадать в организм человека [Латышевская Н.И., Стрекалова А.С. 2011; Подколотная О.А. и др., 2012].

Таким образом, постоянно расширяющиеся области применения наноматериалов в биотехнологии и медицине ставят задачу поиска и апробации методов оценки их биобезопасности.

Для клинической оценки медицинских устройств и имплантируемых материалов, необходимо проверить, чтобы они были нетоксичны, не вызывали неблагоприятных реакций тканей, с которыми будут контактировать. Существует большая потребность в разработке способов анализа цитотоксичности *in vitro*, так как любые материалы, предназначенные для медицинского применения, должны быть корректно оценены перед использованием. Точный и достоверный *in vitro* анализ позволит сократить количество исследований на животных, а также он требует меньше времени [Bhatia S.K. & Yetter A.V. 2008].

Между тем, токсичность НЧ не может быть оценена по сравнению с аналогами в малодисперсной форме или в виде сплошных фаз, так как токсикологические свойства НЧ являются результатом не только их химического состава, но и других особенностей, таких как размер, поверхностный заряд и т. д. Есть мнение, что имеющиеся токсикологические методы, базирующиеся на установлении токсичности вещества относительно массовой концентрации неприемлемы для наноматериалов, для которых основными определяющими свойствами будут величина площади поверхности и число НЧ [Терещенко В.П., Картель Н.Т. 2010]. На данный момент отсутствуют стандартизированные индикаторы нанотоксичности, которые должны обязательно учитывать вклад таких свойств, как поверхностные характеристики, размер, форма, состав, химическая реактивность частиц. Недостаточно разработаны методы выявления, идентификации и количественного определения НЧ в объектах окружающей среды и пищевых продуктах, которые могли бы достаточно хорошо отличить их от химических

аналогов в макродисперсной форме. Отсутствуют новые базы данных и математические модели, базируемые на достижениях биоинформатики и экспериментальных данных относительно токсичности отдельных наноматериалов [Терещенко В.П., Картель Н.Т. 2010].

К одним из потенциально биобезопасных и наиболее перспективных для биотехнологии наноматериалов относятся НЧ кремния. Кремний традиционно рассматривается как нетоксичный полупроводниковый материал и кремниевые НЧ предлагаются для использования в ряде биотехнологических областей [Derfus A.M., Chan WCW, Bhatia S.N. 2004; Fujioka K. et al., 2008; Shiohara A. et al., 2010]. Кремний широко распространен в природе (его доля в земной коре составляет около 27%), биосовместим (в организме здорового человека весом 50-70 кг содержится 0.5-1.0 г кремния, что делает его третьим по содержанию микроэлементом после железа и цинка), подвержен биодegradации (кремний в виде НЧ растворяется в организме человека со скоростью от 1 нм в кислой среде и до 1000 нм в щелочной среде в день с образованием ортокремниевой кислоты). НЧ Si могут быть модифицированы различными функциональными группами, они гораздо стабильнее по сравнению с органическими полимерными матрицами и органическими флуоресцентными зондами. Возможно создание НЧ данного типа, которые будут способны защищать свое внутреннее содержимое (в случае полых НЧ) от внешних воздействий, в частности, кислорода, служить в качестве оптических меток при диагностике и возможной терапии онкологических заболеваний [Лившиц В.А. и др., 2008] и могут быть использованы для целенаправленного транспорта различных веществ, например лекарственного действия [Lu J. et al., 2010].

Перспективность исследованных в данной работе НЧ состоит в том, что НЧ чистого кристаллического кремния способны к флуоресценции, и таким образом, могут быть использованы в создании флуоресцентных наноразмерных биологических зондов, отличающихся высокой степенью флуоресценции и фотостабильностью [Fujoка et al., 2011]. НЧ SiВ предполагается использовать для бор-нейтрон-захватной терапии [Колдаева Ю.А. 2011]. Бор в виде НЧ позволит реализовать адресную доставку и повысить эффективность воздействия на клетки-мишени. Для палладия особенно важно то, что он используется как катализатор различных химических реакций [Ревина А.А. и др., 2006]. НЧ с серебряным покрытием обладают антибактериальными и противовирусными свойствами [Oloffs et al., 1994], а НЧ с золотым покрытием перспективны для противораковой терапии [Monteith et al., 2007; Lee et al., 2008]. Также предполагается, что на золотую поверхность путём обычного электростатического взаимодействия возможно



адсорбировать антитела [Huang et al., 2008], что значительно расширяет перспективы применения таких НЧ в биотехнологии и медицине.

Изучение цитотоксических свойств кремниевых НЧ актуально, поскольку в настоящее время очень активно проводятся исследования, имеющие своей целью изучение необходимых для биотехнологических областей физико-химических свойств НЧ кремния [Li, 2004; Warner et al., 2005], в то время как проблеме их биосовместимости с живыми объектами уделяется недостаточно внимания. В то же время необходимо помнить, что модификация НЧ атомами другого элемента способна не только обеспечить желаемые физико-химические свойства, но и сделать изначально безопасные наноматериалы токсичными для живых организмов.

Исходя из всего вышеизложенного, необходимы подбор и разработка биологических тест-систем, а также скрининг и изучение возможных биологических эффектов НЧ и их поведения в биологических системах, предшествующие их практическому применению [Brayner R. 2008; Nel A. et al. 2006; Service R.F. 2005; Jain A.K. et al., 2007; Donaldson K. et al., 2006; Stern S.T., McNeil E.S. 2008; Maysinger D. 2007]. На наш взгляд, в первую очередь оценка токсического действия НЧ должна быть проведена на клеточном уровне, включая выяснение эффектов на внутриклеточные органеллы и молекулярные процессы.

**Цель** – изучение цитотоксических эффектов модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека.

#### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

- 1) Охарактеризовать влияние кремниевых наночастиц и их модифицированных вариантов на жизнеспособность и пути клеточной гибели иммунокомпетентных и стромальных клеток.
- 2) Оценить участие активных форм кислорода как одного из механизмов активации клеточной гибели под действием кремниевых наночастиц и их модифицированных вариантов.
- 3) Исследовать функциональное состояние внутриклеточных органелл культивируемых клеток при взаимодействии с наночастицами на основе кремния.

- 4) Изучить пролиферативную активность фетальных фибробластов человека после экспозиции с наночастицами Si и Si/B.
- 5) Оценить влияние наночастиц на основе кремния на активацию лимфоцитов и продукцию ими интерлейкинов.
- 6) Изучить изменения актинового цитоскелета и жесткости клеточной мембраны мезенхимальных стромальных клеток при взаимодействии с наночастицами Si и Si/B.

### **Научная новизна.**

Впервые проведен сравнительный анализ цитотоксического действия наночастиц Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO<sub>2</sub> на мезенхимальные стромальные клетки и мононуклеары человека. Показано, что все исследованные наночастицы практически не влияют на жизнеспособность клеток в использованных клеточных моделях *in vitro*, при этом наиболее биосовместимы немодифицированные наночастицы кремния.

Впервые установлены функциональные изменения органелл иммунокомпетентных и стромальных клеток при 24-часовой экспозиции с наночастицами кремния, модифицированными благородными металлами.

Впервые показано, что инкубация мезенхимальных стромальных клеток с наночастицами Si и Si/B приводит к увеличению жесткости их кортикального цитоскелета и снижению содержания F-актина.

Впервые показано, что модифицированные благородными металлами наночастицы кремния способны активировать иммунокомпетентные клетки.

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

Представленные результаты вносят дополнительный вклад в представление об эффектах взаимодействия наноматериалов с иммунокомпетентными и стромальными клетками. Апробированная экспериментальная модель позволяет оценить состояние основных параметров жизнедеятельности на клеточном и субклеточном уровне.

Биосовместимость наночастиц кремния зависит от характера модификации и типа клеток, на которые воздействуют наночастицы. Использованный подход дает возможность проводить скрининг и оценку цитотоксических свойств наноматериалов.

Проведенные исследования доказывают высокую биосовместимость наночастиц чистого кремния, возможность изменения биологических эффектов при модификации и

необходимость тестирования цитотоксичности. Особое внимание следует обращать на способность наночастиц активировать иммунные клетки.

Методической и теоретической основой исследования послужил системный подход и комплексный анализ научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области изучения цитотоксических свойств наноматериалов *in vitro* и потенциала применения кремниевых наночастиц в биотехнологии и медицине. Достоверность результатов обеспечена эмпирической базой, которая основана на практическом и теоретическом материале.

**Методами исследования, использованными в работе были: культуральный, цитофлуориметрический, иммунохимический, микроскопический, статистический.**

### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

- наночастицы кремния не проявляют цитотоксических свойств в моделях *in vitro* и могут считаться биосовместимыми. Модификация кремниевых наночастиц металлами изменяет их свойства, в результате чего модулируется функциональное состояние таких клеточных органелл, как митохондрии и лизосомы, а также уровень внутриклеточных активных форм кислорода без снижения клеточной жизнеспособности.

- при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками наночастицы кремния могут вызывать их активацию. Степень активации зависит от типа наночастиц и их модификации.

- взаимодействие наночастиц кремния и кремний-бора с мезенхимальными стромальными клетками приводит к изменению жесткости клеточной мембраны и снижению содержания F-актина.

### **Апробация работы**

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на Конференциях молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной Дню космонавтики (Москва. 2011, 2012, 2013, 2014 г.), на VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород. 2011 г.), на конференции «World conference on regenerative medicine» (Leipzig, Germany. 2013).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах из перечня ВАК РФ, 4 тезиса докладов.

Диссертация апробирована на заседании межлабораторной конференции ГНЦ РФ-ИМБП РАН 18-го марта 2015 г.

### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №11-02-12210-офи-м и 14-04-00933-а.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 120 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Список литературы состоит из 224 цитируемых источников, из которых 42 - на русском и 182 - на иностранном языке.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Область нанотехнологии

Нанотехнология – область фундаментальной и прикладной науки и техники, имеющая дело с совокупностью теоретического обоснования, практических методов исследования, анализа и синтеза, а также методов производства и применения продуктов с заданной атомной структурой путем контролируемого манипулирования отдельными атомами и молекулами. В России нанотехнологию принято рассматривать как совокупность методов направленного манипулирования материальными объектами в пределах размеров менее 100 нм (1 нанометр =  $1 \times 10^{-9}$  м) [Онищенко Г.Г. 2010]. По одному из других определений нанотехнология - это развитие и применение методов и структур с диапазоном размеров в пределах 1-100 нм [Masciangioli T., Zhang W-X. 2003].

Появление нанотехнологии положило начало развитию новых дисциплин, имеющих отношение к живым системам. Наноэкология (экология наноиндустрии) – новый раздел экологических исследований, предметом которых является потенциал и риски, внешние и внутренние эффекты глобальной наноиндустриализации для окружающей среды человеческой жизнедеятельности, а также проблемы влияния нанотехнологий и наноматериалов на здоровье людей в целях разработки эффективных нормативов и стандартов [Латышевская Н.И., Стрекалова А.С. 2011]. В обзоре [Crane M. et al., 2008], посвященном экологической тематике, суммированы данные OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, Guidelines for the Testing of Chemicals. Effects on Biotic Systems) о токсическом действии НЧ, и предложено обязательно проводить эксперименты на животных класса ракообразных, так как данные животные наиболее чувствительны к воздействию НЧ и ионов металлов, из которых состоят многие НЧ. Еще одна новая дисциплина – наномедицина, которая представляет собой область медицины, где применяются достижения нанотехнологии [Мешалкин Ю.П., Бгатова Н.П. 2008; Ксенофонтова О.И. и др., 2014; Freitas R.A. 2005].

За рубежом проблемами нанобезопасности занимаются с начала 2000 годов. В США данная задача находится в области компетенции FDA, в Евросоюзе OECD, IEC, EFSA, ECETOC. В России изучение вопросов безопасности нанопродукции осуществляет Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Создан проект «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов». По решению Пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравсоцразвития РФ от 2008 года,

задачами, обеспечивающими качество и безопасность нанопродукции и нанопроизводств, были признаны разработка гигиенических нормативов, определяющих безопасные уровни приоритетных видов наноматериалов в воздухе рабочей зоны, населенных пунктов и жилых помещений, питьевой воде, продуктах питания и других объектах внешней среды, а также регламентация процессов производства, транспортировки, использования и утилизации токсичных наноматериалов, которая исключала бы возможность их воздействия на человека в опасных для здоровья масштабах.

На рисунке 1 изображены объекты, измеряемые в нанодиапазоне, микродиапазоне и макрообъекты.

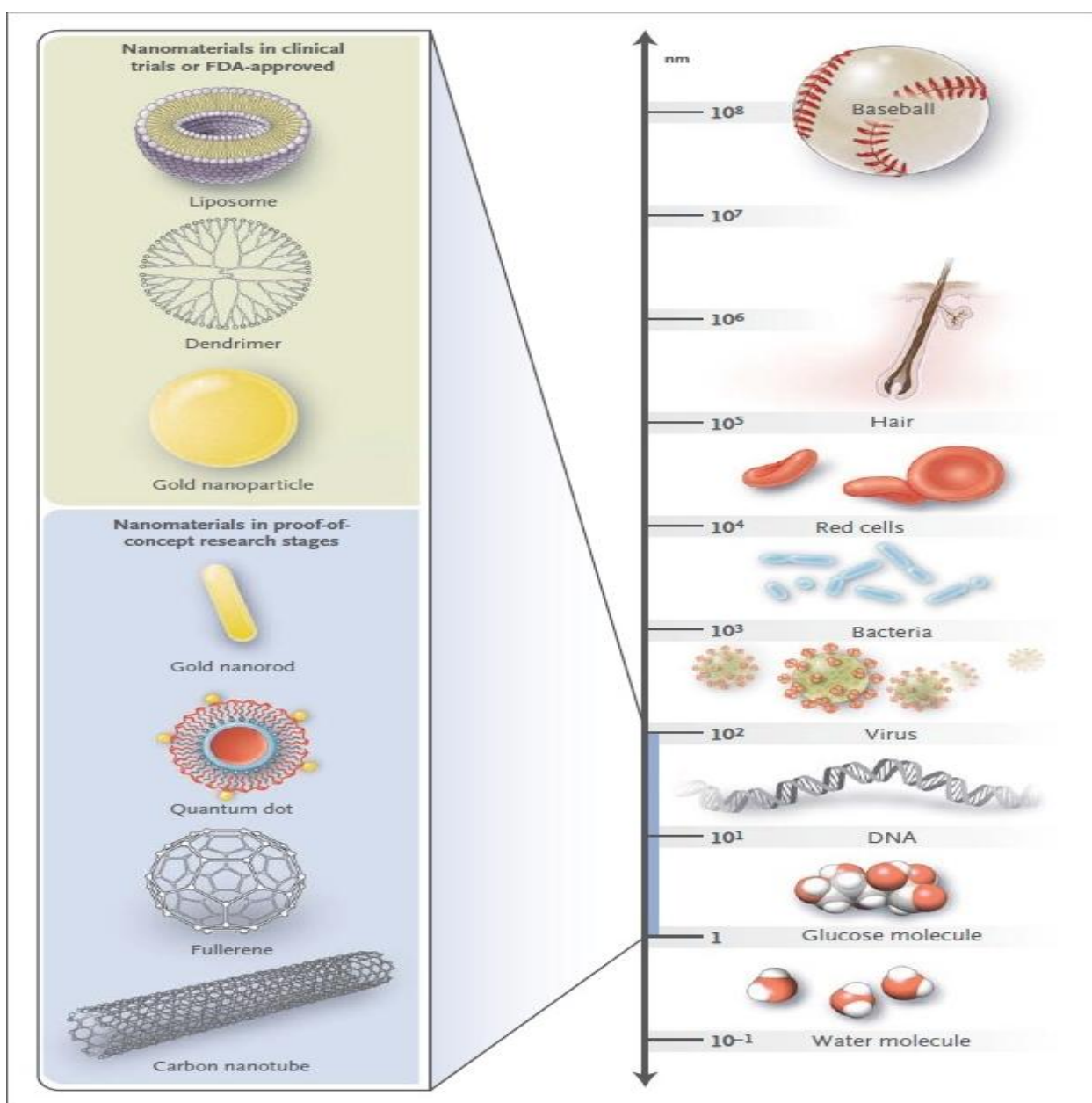


Рис 1. Диапазон размеров нанообъектов [Betty Y.S. 2010].

Для НЧ характерны следующие особенности: крайне высокая удельная поверхность (более  $60 \text{ м}^2/\text{см}^3$ ), поэтому существенная доля образующих их атомов или молекул (и, как следствие, реактивных групп) экспонируется на их поверхности [Kreyling W.G., Semmler-Behnke M., Chaudhry Q. 2010]. НЧ Si диаметром 2 нм состоят из 280 атомов кремния и из них 120 (43%) находятся на поверхности, а НЧ Si диаметром 8 нм содержат уже  $1.3 \times 10^4$  атомов кремния [Klauser F. et al., 2009], НЧ золота диаметром 1.2 нм состоит из 35 атомов золота, а диаметром 1.8 из 150 атомов [Pan Y. et al., 2007]), очень высокая кривизна поверхности, огромная избыточная свободная поверхностная энергия, крайне высокие величины напряженности электростатического поля у поверхности. Все это проявляется из-за размерных ограничений. Эти факторы, в свою очередь, могут изменять такие свойства, как реакционная способность, прочность, электрические и магнитные характеристики. Ограничение размеров частиц вещества величиной, сравнимой с дебройлевской длиной волны электрона приводит к тому, что квантовые эффекты могут доминировать в его поведении. Уменьшение размера частиц до нескольких атомных или молекулярных диаметров приводит к резкому ограничению набора возможных энергетических состояний электронов или экситонов (пар «электрон-дырка») в частице, в результате чего ярко проявляются специфические электронно-оптические и магнитные свойства частиц [Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. 2011]. Все это ведет к проявлению НЧ новых физико-химических свойств, отличных от свойств более крупных частиц аналогичного химического состава, это в свою очередь определяет потенциальную токсичность наноматериалов. За счет большой удельной поверхности увеличиваются абсорбционные свойства и способность вступать в химические реакции, что может провоцировать продукцию АФК (активных форм кислорода), повреждение белков, нуклеиновых кислот, липидов и других биологических молекул. Становится непредсказуемой растворимость. Некоторые НЧ могут накапливаться в организме и объектах окружающей среды. Неизвестно, могут ли НЧ метаболизироваться микроорганизмами и подвергаются ли процессам детоксикации.

Некоторые предполагаемые эффекты НЧ были представлены в докладе главного государственного санитарного врача РФ Г.Г. Онищенко «Вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в условиях расширения *использования наноматериалов и нанотехнологий*» на Международном форуме по нанотехнологиям 2008 года, проходившем в Москве. См. таблицу 1.

Таблица 1. Воздействие наноматериалов на организм и возможные патофизиологические реакции.

Эффект	Возможные патофизиологические последствия
Образование активных форм кислорода	Повреждение белков, ДНК и мембран, окислительный стресс
Окислительный стресс	Индукция ферментов второй фазы, воспаление, митохондриальные нарушения
Митохондриальные нарушения	Повреждение внутренней мембраны, открытие пор в результате изменения мембранной проницаемости, недостаточная выработка энергии, апоптоз, апонекроз, цитотоксичность
Воспаление	Инфильтрация ткани клетками воспаления, фиброз, гранулёмы, атерогенез, экспрессия белков острой фазы (например, С-реактивного белка)
Поглощение ретикулоэндотелиальной системой	Бессимптомная секвестрация и накопление в печени, селезёнке, лимфоузлах, возможное увеличение органов в размерах и их дисфункция
Денатурация, деградация белков	Утрата ферментативной активности, аутоантигенность
Нуклеарное поглощение	Повреждение ДНК, агрегация нуклепротеидов, аутоантигены
Поглощение в нейронной ткани	Нарушения в центральной и периферической нервной системах
Нарушение фагоцитарной функции, «перегрузка частицами», выброс медиаторов	Хроническое воспаление, фиброз, гранулёмы, нарушение вывода инфекционных агентов
Эндотелиальная дисфункция, воздействие на свёртываемость крови	Атерогенез, тромбоз, инсульт, инфаркт миокарда
Образование неоантигенов, падение иммунной толерантности	Аутоиммунность, адъювантное воздействие
Изменение регуляции клеточного цикла	Пролиферация, задержка клеточного цикла, старение
Повреждение ДНК	Мутагенез, метаплазия, канцерогенез



Не вызывает сомнения, что все эти НЧ и их модификации необходимо тщательно изучать и тестировать перед их практическим использованием.

## 1.2 Характеристика наночастиц Si и областей их использования

Среди основных физико-химические свойства кремния, способствующих активному вовлечению наноматериалов на основе НЧ Si для применения в биомедицине и биотехнологии можно выделить следующие:

- Доступность. Кремний распространен в природе, его доля в земной коре составляет около 27%
- Возможно получение кремниевых наноструктур с заданными параметрами и свойствами (и данные технологии развиваются в настоящее время) [Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. 2011].
- Биосовместимость (в организме здорового человека весом 50-70 кг содержится 0.5-1.0 г кремния, что делает его третьим по содержанию микроэлементом после железа и цинка) [Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. 2011].
- Биодegradуемость (кремний в виде НЧ растворяется в организме человека со скоростью от 1 нм в кислой среде и до 1000 нм в щелочной среде в день с образованием ортокремниевой кислоты) [Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. 2011] (биодegradацией материалов называется способность частично или полностью растворяться или химически преобразовываться, не оказывая токсического действия на клетки и ткани, с последующим выведением из организма. Противоположным биодegradации свойством является биоустойчивость, характеризующаяся способностью материала противостоять в течение необходимого промежутка времени комплексному воздействию окружающей среды и тканей, сохраняя при этом свои исходные физико-химические, механические, биологические и функциональные свойства).

Так, например, пористый кремний подвергается гидролизу при комнатных температурах уже в слабощелочных (pH~7.5) средах, что делает возможной его биодegradацию в живых организмах. Он способен преобразовываться в ортокремниевую кислоту, обычно содержащуюся в пище и поэтому подверженную метаболизму ( $\text{Si} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{Si}(\text{OH})_4 + 2\text{H}_2$ ). Ортокремниевая кислота затем проходит через почечные каналы и выводится с мочой [Ксенофонтова О.И. и др., 2014].

Примеры свойств НЧ, их размеров и биологических свойств отражены в таблице 2.

Таблица 2. Физические параметры наночастиц и их биологические свойства.

Тип частиц	Размер (нм)	Свойства НЧ	Биоэффект НЧ
Si	7	Биосовместимы, возможно создание КТ, легко модифицируются	Не токсичны для мононуклеаров, МСК, фибробластов человека в концентрации до 100 мкг/мл. Ускоряет рост фибробластов человека [Шубенков А. Н. 2014]
Si	6.5	Являются квантовыми точками, имеют зеленую флуоресценцию. Подходят для прижизненного меченья клеток. Способны производить свободные радикалы в водных растворах.	В концентрации 1120 мкг/мл (при 48 ч воздействии) менее токсичны в отношении гепатоцитов, чем в отношении клеток HeLa и снижают митохондриальную активность клеток HeLa на 43%. Производимые данными НЧ свободные радикалы негативно влияют на плазматическую мембрану клеток [Fujioka K. et al., 2008]
Si	~3.6	Эпоксид терминированные. Являются квантовыми точками	Токсичны в концентрации 112 мкг/мл для фибробласты WS1 и эпителиальных клеток A549 [Shiohara A. et al., 2010]
Si	3.7	Диол терминированные. Являются квантовыми точками	Токсичны в концентрации 448 мкг/мл для фибробластов WS1 и эпителиальных клеток A549 [Shiohara A. et al., 2010]
Si	1.6	Поверхностная модификация $\text{NH}_2^+$	Токсичны для клеток NR8383 в концентрации 12 нанограмм/мл (24 ч экспозиция) [Bhattacharjee S. et al., 2010]
Si	1.6	Поверхностная модификация $\text{N}_3$	Токсичны для клеток NR8383 в концентрации 270 нанограмм/мл (24 ч экспозиция) [Bhattacharjee S. et al., 2010]
Si	1.6	Поверхностная модификация $\text{COOH}^-$	Не токсичны для клеток NR8383 в концентрации до 3000 нанограмм/мл (24 ч экспозиция) [Bhattacharjee S. et al., 2010]
Si	2-5	Гидрофильны, возможно создание стабильных водных суспензий	Не токсичны в концентрации до 2.5 мг/мл для клеток Hep 2. В концентрации 1 г/л в сочетании ультразвукового воздействия в течение 30 мин вызывают гибель данных клеток [Осминкина Л.А., и др., 2011]
Si	<5.5	Покрываются биополимером	Не токсичны, способны к люминесценции, подвержены биodeградации, подходят для транспорта лекарственных веществ к опухолевым тканям [Park J.-H. et al.,

			2009]
SiO <sub>2</sub>	До 100	Поверхность может быть легко модифицирована, они биосовместимы, а также устойчивы к биодеградации в условиях клеточного окружения	Поглощаются клетками рака яичника человека. Поглощаются МСК, биосовместимы с МСК. В среде, содержащей сыворотку, агрегируют и становятся менее токсичными. Вызывают активацию каспаз и апоптоз мышинных альвеолярных макрофагов [Ekkapongpisit M. et al., 2012]
SiO <sub>2</sub>	14 и 20	НЧ агрегируют, если в среде присутствует сыворотка	Токсичны для клеток CCD-34Lu, HT-1080, A549. Повышают уровень АФК в клетках. Вызывают каспазозависимый апоптоз в клетках HT-1080 [Fede C. et al., 2012]
SiO <sub>2</sub>	14 и 20	НЧ агрегируют, если в среде присутствует сыворотка	Токсичны для клеток CCD-34Lu, HT-1080, A549. Повышают уровень АФК в клетках. Вызывают каспазозависимый апоптоз в клетках HT-1080 [Fede C. et al., 2012]
SiO <sub>2</sub>	30	Активно адсорбируют сывороточные белки	Токсичны для hT эпителиальных клеток (100 мкг/мл) и RAW макрофагов (10 мкг/мл). Увеличивают уровень АФК в этих клетках [Sohaebuddin S. et al., 2010]
SiO <sub>2</sub>	15		В концентрации 25-200 мкг/мл проявляют дозозависимую цитотоксичность на клетки A431 и A549. Увеличивают уровень генерации АФК в клетках. Вызывают перекисное окисление липидов [Ahamed M. 2013]

НЧ двуокиси кремния уже нашли широкое применение в технике, в качестве компонентов лекарственных средств, косметики, компонентов тонеров для принтеров, различных лаков и даже продуктов питания. А в последнее время они начали занимать определенную нишу в биотехнологии как биосенсоры глюкозы, лактата, L-глутамина и гипоксантина [Zhang F.F. et al., 2004], как биомаркеры для идентификации раковых клеток при помощи оптической микроскопии [Santra S. et al., 2001]. Используемые в стоматологии цинк-фосфатные и акриловые композиции, будучи модифицированными НЧ кремния и серебра, увеличивают свою прочность и силу адгезии к дентину зуба [Каливрадзиян Э.С. и др., 2011], наноразмерный кремний обеспечивает более глубокую степень полимеризации акриловых пластмасс и полностью блокирует остаточный мономер, который является основным токсическим агентом [Каливрадзиян Э.С. и др., 2012].

Однако, среди всех возможных перспектив применения НЧ кремния наиболее масштабным и полезным представляется их использование в качестве флуоресцентных зондов.

Для экспресс-методов оценки ряда клеточных параметров часто используют органические флуоресцентные зонды. Однако подобные органические соединения дороги в производстве, крайне быстро разрушаются и имеют не самые лучшие показатели интенсивности флуоресценции. Также спектры их флуоресценции в некоторой степени пересекаются между собой, что имеет негативные последствия при многоцветном анализе. Но подходы к визуализации процессов на уровне клеток, тканей и целых организмов, основанные на введении специальных флуоресцентных меток продолжают развиваться. Сейчас для этих целей апробируют использование полупроводниковых нанокристаллов CdSe, CdTe, PbSe, PbS, НЧ золота, наностержней, углеродных нанотрубок [Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. 2011]. Но на фоне данных наноструктур флуоресцентные зонды на основе НЧ кремния и его композитов выделяются своей биосовместимостью и меньшей стоимостью. Также они существенно стабильнее в сравнении с традиционно используемыми органическими флуоресцентными соединениями и имеют более высокие значения интенсивности флуоресценции.

*Квантовые точки (КТ)* – это кристаллы полупроводников нанометрового размера, которые имеют уникальные химические и физические свойства, нехарактерные для тех же веществ в макромасштабе. На данный момент термин «квантовая точка» используется для обозначения НЧ, способных к излучению света. Квантовые точки могут использоваться как *in vitro* [Chan W.C. 1998], так и *in vivo* [Akerman M.E. et al., 2002].

Первые флуоресцирующие КТ были получены в 1993 году [Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. 1993], однако они имели низкий выход флуоресценции, около 1 %. За счет подбора компонентов и совершенствования технологий производства удалось создавать КТ с относительно высоким квантовым выходом флуоресценции и узким спектром эмиссии. Ключевые усовершенствования (создание КТ с ядром из селенида кадмия и тонкой оболочкой из сульфида цинка) были проведены в 1996-1997 гг [Danek M., Jensen K.F., Murray C.B., Bawendi M.G. 1996]. Это позволило начать широкое применение КТ в прикладных исследованиях, в частности в биологии. Для нанокристаллов полупроводников характерна, в частности, интенсивная люминесценция в ответ на облучение светом с определённой частотой. Данное свойство используется, к примеру, в медицинской диагностике для нахождения и визуализации опухоли за счёт того, что при введении КТ в организм они способны накапливаться в разветвленной системе сосудов

опухолей. Такой процесс визуализации злокачественного образования называют пассивным. При активном пути визуализации КТ химически связывают с биологическими молекулами, такими как антитела, пептиды, белки или ДНК. Полученные комплексы могут быть спроектированы так, чтобы обнаруживать молекулы, типичные для поверхности раковых клеток [Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. 2008]. Предполагается, что кремниевые КТ могут быть безопаснее металсодержащих КТ [Shiohara A. et al. 2004], а сравнительные испытания клеток, меченных FITC и НЧ Si показывают, что НЧ Si характеризуются большей фотостабильностью, что является необходимым требованием к меткам для проведения исследований в режиме реального времени. Уникальные свойства кремния являются многообещающими для использования его НЧ не только в биоимиджинге, но и в качестве носителей нуклеотидов, использования в иммуноанализе и т. д. Все это делает нанокристаллический кремний и композитные материалы на его основе альтернативой оптическим флуоресцентным меткам, традиционно применяемым в биологических исследованиях [Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. 2011]. Так, есть примеры использования люминисцентных наносфер (диаметр частиц 60 – 200 нм), сформированных из полиакриловой кислоты с добавлением НЧ Si для мечения клеток линии НЕК293Т. С помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии показана возможность получения контрастных флуоресцентных изображений. Стоит отметить, что НЧ Si можно возбуждать лазерным излучением с длиной волны 458 и 488 нм, а для FITC подходят лишь лазеры с длиной волны 488 нм [He Y., et al. 2009], что соответственно ограничивает его использование оборудованием, оснащенным только такими лазерами. Также созданы биodeградируемые люминисцентные НЧ кремния, позволяющие доставлять лекарственное вещество к опухолевым тканям [Park J.-H. et al., 2009].

Более 100 лет назад автор химиотерапии и нобелевский лауреат Пауль Эрлих (1854-1915) выдвинул идею «магической пули». В современном виде это можно представить следующим образом. Нанокapsулы с лекарством внутри и химическими рецепторами на внешней поверхности достигают определенного места, где и выделяют лекарство в ответ на изменение окружающих условий, на которое реагируют рецепторы. Самое сложное в подобной терапии – точная дозировка и постепенный (в течение дней и даже недель) выпуск лекарства непосредственно в очаге патологии. В настоящее время в качестве «наноконтeйнеров» используются НЧ пористого кремния, углеродные нанотрубки, биodeградируемые липосомы, мицеллы и полимерные НЧ [Мешалкин Ю.П., Бгатова, Н.П. 2008]. Использование НЧ для целевой доставки противоопухолевых препаратов

заслуживает внимания благодаря перспективе повышения концентрации лекарства в области локализации опухоли. Благодаря высокому отношению площади поверхности НЧ к их объему, возможно обеспечить их высокую нагрузку полезным веществом. Скорость деградации НЧ, а следовательно, и скорость высвобождения лекарства, может быть подобрана при проектировании таких НЧ [Betty Y.S. et al., 2010]. Например, уже проводятся клинические испытания препарата, представляющего НЧ золота диаметром 27 нм, покрытые фактором некроза опухоли TNF-а и полиэтиленгликолем, который предназначен для лечения форм рака, не поддающихся традиционному лечению. Как показывают гистологические исследования, такие НЧ локализуются внутри и вокруг опухоли и не так активно поглощаются другими тканями [Visaria R.K. et al., 2006]. НЧ на кремниевой основе также могут использоваться для целенаправленной доставки лекарств, что позволяет снижать дозу вводимого в организм лекарства, тем самым снижая его токсический эффект на организм.

При терапии онкологических заболеваний НЧ могут использоваться как фотосенсибилизаторы. Фотодинамическая терапия основана на избирательном накоплении фотосенсибилизатора в опухолевых клетках и его способности генерировать синглетный кислород в результате облучения светом определенной длины. В результате под действием света происходит переход обычного кислорода в возбужденное состояние, которое вызывает гибель раковых клеток. Однако очень часто такие вещества являются токсичными сами по себе. При поиске нетоксичных (до их облучения) фотосенсов обращают внимание на полупроводниковые НЧ и углеродные НЧ. В качестве полупроводниковых НЧ возможно использование НЧ пористого кремния [Kovalev D. et al., 2002].

### **1.3 Обоснование выбора *in vitro* модели.**

Культивируемые клетки нашли свое применение в моделировании многих физиологических и патофизиологических процессов. Преимущество такого подхода над экспериментальными моделями с использованием животных очевидно в связи с его простотой проведения. Даже такие легко детектируемые параметры, как видимые под микроскопом морфологические изменения клеток в значительной степени коррелируют с цитотоксическими реакциями культуры, выявляемыми другими методами (результаты визуальной оценки и количественного анализа жизнеспособности имеют между собой высокую степень корреляции) [Bhatia S.K., Yetter A.B. 2008]. Культуры клеток являются современным инструментом, позволяющим воспроизводить реакции организма *in vitro* и

представляют хороший выбор различных моделей для изучения какого-либо происходящего процесса. Применение культур клеток предполагает использование небольшого количества экспериментального материала с возможностью прижизненного мониторинга его состояния и корректировки условий культивирования [Филатова Е.Н., Уткин О.В. 2014]. Европейский центр валидации альтернативных методов ЕС (ECVAM) также одобряет использование моделей *in vitro* для оценки цитотоксичности [Hartung T. 2003].

Стромальные клетки, такие как МСК и фибробласты, хорошо подходят для цитотоксических исследований, так как они являются основным компонентом соединительной ткани и служат типичной моделью для оценки цитотоксичности биоматериалов [Bhatia S.K., Yetter A.B. 2008].

Кроме того, существует значительное давление со стороны биоэтики и с позиции экономики, требующее проводить, по крайней мере, часть цитотоксических исследований на культуре клеток [Фрешни Р. 2010]. Использование для решения этой задачи культивируемых клеток дает возможность разработать экспресс-методы оценки, наиболее приемлемые с позиции биомедицинской этики, а также более простые в проведении и менее затратные по времени, а порой и по стоимости. Оценка клеточных эффектов важна, поскольку в связи со своими размерами наноматериалы могут воздействовать непосредственно на клетки и внутриклеточные структуры. В то же время, *in vitro* исследования позволяют выявить механизмы патофизиологических реакций, показанных в экспериментах на животных, например таких, как повышение генерации АФК [Pre B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M. 2005; Choi J. et al., 2010; Lin W. et al., 2006; Halamoda K.B., et al., 2012; Moore M.N. et al., 2009; Sohaebuddin S.K. et al., 2010].

Основной проблемой при разработке методов оценки цитотоксичности *in vitro* является, с одной стороны, выбор модельных клеток для тестирования. На рисунке 2 представлена схема из презентации: **«Вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в условиях расширения использования наноматериалов и нанотехнологий»** (Г.Г.Онищенко, Международный форум по нанотехнологиям, Москва 2008), отражающая доказанные и потенциальные пути поступления НЧ в организм. Как видно из данной схемы, в первую очередь столкнутся с НЧ клетки кожи, выстилка дыхательных путей и клетки крови.

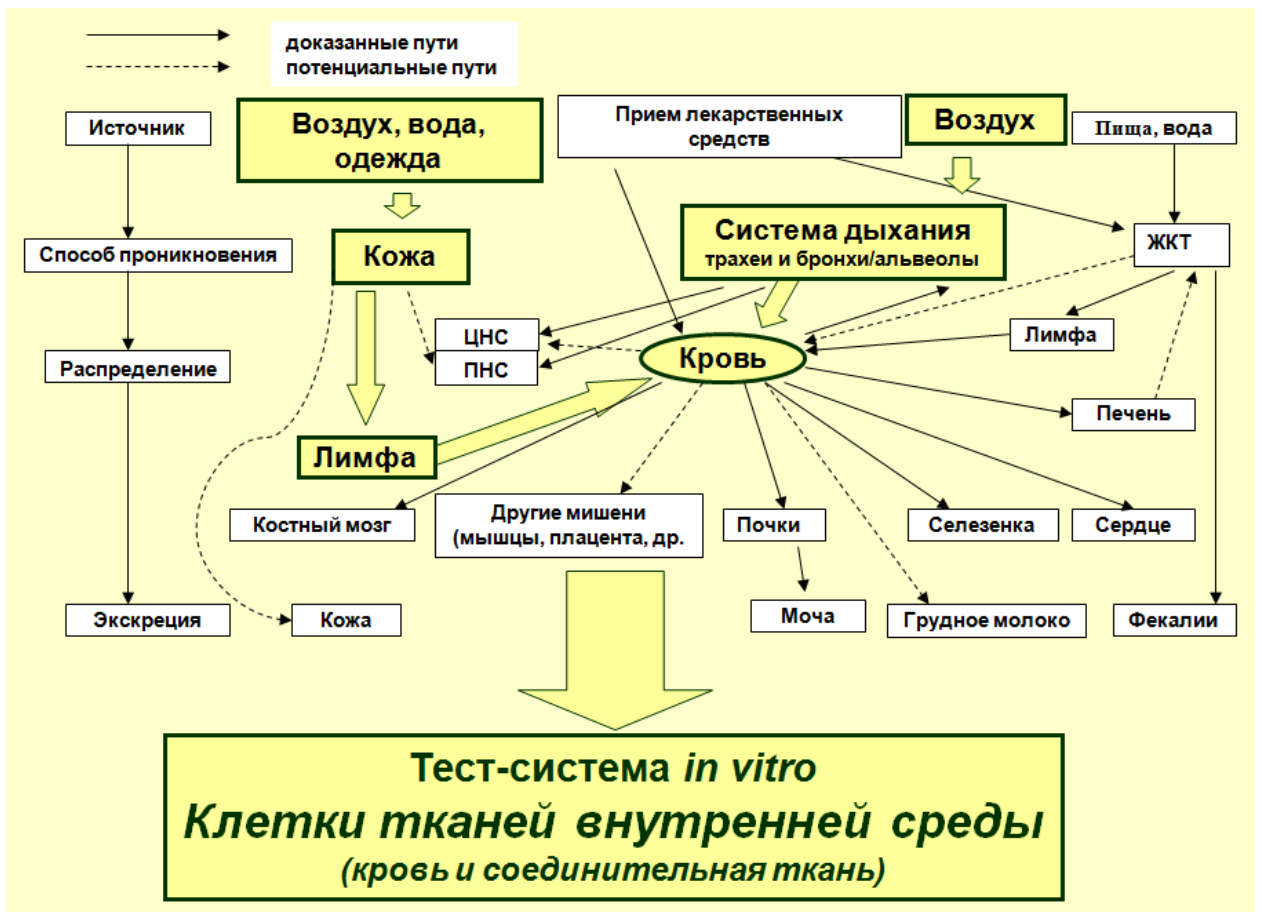


Рис. 2. Схема поступления наночастиц в организм.

А с другой – выбор подлежащих оценке клеточных параметров (как показателей проявления цитотоксичности). При этом важно учитывать, что на определенный вид наноматериалов разные типы клеток способны реагировать различным образом [Sohaebuddin S.K., 2010].

В целом можно заключить, что при изучении цитотоксического действия наноматериалов в моделях *in vitro* следует принимать во внимание:

- 1 – физические параметры НЧ: размер, строение, поверхностный заряд, а также их концентрацию в среде, где происходит контакт с клетками
- 2 – тип клеток, на которых проводится оценка биосовместимости
- 3 – изучаемые биологические параметры, такие как: изменение доли жизнеспособных клеток, изменение продукции АФК, состояние лизосом, митохондриальный потенциал, активация каспаз, поглощение НЧ клетками, пролиферативная активность клеток, адсорбция биологических макромолекул НЧ-ми, перекисное окисление липидов, а также механизмы этих изменений.



## **1.4 Факторы, влияющие на цитотоксичность и биосовместимость наночастиц *in vitro***

### **1.4.1 Агрегация наночастиц в растворе**

В растворе НЧ не ведут себя как инертные объекты. Они часто подвергаются агрегации и/или агломерации, что приводит к образованию новых молекулярных комплексов [Maiorano G. et al., 2010]. Это происходит в силу их взаимодействия при приближении частиц на малые расстояния друг к другу. Сила притяжения между двумя частицами, как показано в [Chu P., Mills D.L. 2007], монотонно возрастает на 3 порядка при приближении частиц от 10 нм до 0,2 нм, достигает экстремума и далее резко убывает с преобладанием отталкивания.

Под устойчивостью дисперсных систем понимают постоянство их свойств во времени. В первую очередь, степени дисперсности, распределения частиц дисперсной фазы по объему системы и взаимодействия между частицами. Наиболее характерный и общий для дисперсных систем тип изменения степени дисперсности связан с коагуляцией, заключающейся в слипании частиц [Фролов Ю.Г. 1989]. Существует ряд подходов для предотвращения данного процесса. Устойчивость золь можно повысить, например, путем покрытия НЧ полимерным слоем (конъюгация с полимером) [Goddard E.D., Vincent B. 1984]. Добавка даже малого количества полимера (особенно полиэлектролитов) к лиофобным коллоидам способна сильно повысить их агрегативную устойчивость, стабилизировать лиофобные коллоиды. Защитный полимер способствует увеличению межфазного взаимодействия, адсорбируясь на поверхности частиц, покрывая ее полностью с образованием адсорбционного слоя и уменьшая поверхностное натяжение, тем самым способствуя образованию сольватного слоя. В результате поверхность НЧ приобретает свойства вещества-стабилизатора (лиофилизуется) и лиофобный золь становится менее чувствительным к коагуляции электролитами (благодаря электростатическим, гидрофобным взаимодействиям и структурно-механическому фактору устойчивости) [Дымкан Л.А. и др., 2008]. Способность полимеров (в том числе биоспецифических макромолекул) стабилизировать лиофобные коллоиды также лежит в основе получения биоконъюгатов – стабильных комплексов НЧ с иммуноглобулинами, лектинами, ферментами, гормонами, липопротеидами и т.д. [Hermanson G.T. 1996], что позволяет модифицировать НЧ с целью расширения их применения в биотехнологии.

#### 1.4.2 Модификация поверхности наночастиц

Функциональные НЧ возможно модифицировать атомами других элементов и молекулами биологической природы с целью дополнения/изменения некоторых их свойств. Например, актуально создание биосовместимых оболочек для флуоресцентных, но изначально токсичных НЧ, придание способности НЧ связываться с теми или иными мишенями, улучшение уже упомянутой коллоидной стабильности НЧ в растворе и т. д. Однако, полученные в результате модифицированные НЧ также требуют проверку на цитотоксичность, даже если до модификации они были признаны биосовместимыми.

На уровне химии именно свойства поверхности НЧ определяют характер их взаимодействия с биологическими структурами. Во многих случаях токсичность НЧ зависит не от свойств материала, из которого они изготовлены, а присутствием на их поверхности различных молекул, которые адсорбируются в том числе в процессе синтеза НЧ. Например, переходные металлы и различные органические молекулы на поверхности частиц являются причиной окислительного стресса. Окислительный стресс в макрофагах, обработанных НЧ, зависит от содержания органических примесей [Li N. et al., 2003], а адсорбированные на поверхности НЧ хинон и ароматические соединения вызывают в данных клетках митохондриальную дисфункцию [Xia T. et al., 2004].

В то же время, нанесение на поверхность НЧ слоя определенных молекул может снижать их токсичность и делать их более биосовместимыми. Например, слой полиэтиленгликоля, нанесенный на поверхность НЧ QD 655, подавляет их токсические свойства, а карбоксильная поверхность напротив, повышает [Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. 2006]. Одним из возможных путей решения проблемы токсичности полупроводниковых квантовых точек может стать их инкапсуляция в слой полимеров различной природы. Кроме того, заключение нанокристаллов в полимерные частицы способствует стабилизации нанокристаллов в водных растворах и позволяет использовать стандартные методы органической химии для ковалентного присоединения к функциональным группам полимерной микрочастицы вышеупомянутых биологических молекул (антитела, биотин, стрептавидин, пептиды, ДНК), способных селективно связываться и флуоресцентно метить объект-мишень [Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. 2007].

Среди способов посадки биоспецифических зондов на НЧ выделяют два основных: адсорбционный и хемосорбционный. Каждый из них имеет свои особенности в плане приготовления и использования маркеров. Согласно общепринятому мнению, стабилизация золотых коллоидов биоспецифичными молекулами (функционализация)

происходит путем пассивной адсорбции полимера на поверхность НЧ за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. Также имеются сообщения о роли SH-групп молекул цистеина в осуществлении процессов связывания белков с поверхностью золотых НЧ [Shenton W., Davis S.A., Mann S. 1999]. К преимуществам простой физической адсорбции можно отнести минимальное воздействие на структуру макромолекулы, а значит сохранение ее функциональных свойств. Однако, при использовании этого способа следует учитывать возможную десорбцию и конкурирование с местами связывания на мишенях. Основной особенностью адсорбции полимеров является то, что высокомолекулярные вещества обычно адсорбируются в количествах, превосходящих реально необходимые для образования мономолекулярного слоя. Преимущества химического прикрепления наиболее ярко проявляются для линейных молекул, подобных ДНК и обусловлены терминальной иммобилизацией, обеспечивающей строгую пространственную ориентацию зондов [Дымкан Л.А. и др., 2008].

В работе [Auffan M. 2006] изучено влияние химического состава поверхностного слоя НЧ оксимагнетита ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) на их цитотоксичность в отношении стромальных клеток. Фибробласты инкубировали в присутствии НЧ оксимагнетита (0-0.1 г/л), покрытых слоем 2,3-димеркаптоянтарной кислоты в течение 24 ч при температуре 37°C. В результате показано почти полное отсутствие цитотоксического эффекта, что связано с устойчивостью покрытия НЧ, исключающего непосредственный контакт материала частицы с клеткой, так как сам материал обладает сильными окислительными свойствами.

Влияние золотых НЧ с модифицированной поверхностью на жизнеспособность клеток Cos-1 и бактерий *E. Coli* исследовалось в работе [Goodman C.M. et al., 2004]. Поверхность частиц была модифицирована присоединением четвертичных аминных или карбоксильных групп. Были получены соответственно катионные и анионные НЧ. Показано, что катионные НЧ умеренно токсичны, анионные НЧ не проявляют токсических свойств. Таким образом, предполагается, что токсичность НЧ золота определяется их взаимодействием с клеточными мембранами, в том числе и электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженным двойным слоем. В работе [Quisenberry L.R., Loetscher L.H., Boyd J.E. 2009] описан способ инактивации *E. Coli* в водной суспензии. Было показано, что НЧ  $\text{PdTiO}_2$  инактивирует бактерии существенно быстрее, чем  $\text{PtTiO}_2$  и чистый  $\text{TiO}_2$ . Также показано, что  $\text{PdTiO}_2$  оказывал антибактериальное действие даже без УФ-облучения, что говорит о наличии особого механизма бактерицидного действия данных НЧ.

Модификация поверхности НЧ может быть использована при регулировании взаимодействия НЧ с иммунной системой. С точки зрения живого организма экзогенные НЧ в нём являются инородными. В результате иммунная система распознает НЧ и реагирует на их присутствие в организме, вызывая фагоцитоз. Такой неспецифический иммунный ответ использовался в работе [Oh J. et al., 2006] для диагностики заболевания печени. При использовании НЧ для направленной доставки лекарственных препаратов стараются подавить этот неспецифический иммунный ответ путем создания биосовместимых оболочек [Pich A. et al., 2008; Lin Ch-A. J. et al., 2008].

Среди методов поверхностной модификации НЧ Si, возможно, следует отдельно упомянуть метод гидросилилирования, так как НЧ становятся пригодны для дальнейшей биоконъюгации с биологическими молекулами. Например, продемонстрирована возможность [Wang L. Reira V., Blasic J. et al., 2004] присоединения молекул ДНК к НЧ Si, а также получены конъюгаты люминисцентных НЧ Si с белком стрептавидином.

Одним из основных поверхностных свойств НЧ, которое возможно изменять путем модификаций и которое влияет на цитотоксические свойства НЧ, является поверхностный заряд частицы. Есть сведения, что НЧ кремния с ядром 1.6 нм, модифицированные  $\text{NH}_2^+$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{COOH}^-$  и имеющие соответственно положительный, нейтральный и отрицательный заряд имели следующие показатели цитотоксичности: положительно заряженные НЧ были токсичны, нейтральные слаботоксичны, отрицательно заряженные практически не токсичны. Таким образом, независимо от типа НЧ, положительный заряд коррелирует с их токсичностью. Однако, из этого правила есть исключения [Bhattacharjee S. et al., 2010].

#### **1.4.3 Взаимодействие наночастиц с компонентами биологических сред**

Изучение поведения НЧ в различных средах, в том числе в биологических, важно по двум причинам. С одной стороны, взаимодействие с биологическими и неорганическими компонентами среды способно изменить цитотоксические и целевые физико-химические свойства НЧ, а с другой – возможно нарушение состояния биомолекул и их выведение из общего объема среды вследствие адсорбции на поверхности НЧ.

В биологической среде, будь то тканевые жидкости или среда культивирования клеток *in vitro*, НЧ способны взаимодействовать с компонентами данных сред. Согласно данным [Ehrenberg M. et al., 2009; Sohaebuddin S.K. et al., 2010], НЧ адсорбируют на своей поверхности белки, образуя так называемую «белковую корону». Впоследствии адсорбированные компоненты среды могут изменять физико-химические свойства НЧ, такие как поверхностный заряд и растворимость, что и будет определять их

коллоидальную стабильность и биологическую активность, т.е. способность проникать в клетку и взаимодействовать с ее структурными компонентами [Maiorano G. et al., 2010; Ekkarongpisit M. et al., 2012]. Образование комплексов биологических молекул с НЧ золота обеспечивается силами электростатического взаимодействия и поверхностного натяжения. Контакт НЧ с биологическими мембранами нередко заканчивается захватом НЧ посредством рецептор-опосредованных и не связанных с рецепторами механизмов [Дымкан Л.А. и др., 2008]. Показано [Ehrenberg M. et al., 2009], что НЧ с положительно заряженной поверхностью обладают более высокой способностью взаимодействовать с клетками при помощи специфического и неспецифического механизмов. При специфическом взаимодействии происходит связывание «белковой короны» с рецепторами мембраны, при неспецифическом — это случайное взаимодействие НЧ с растворенными в среде белками и с клеточной поверхностью. В обоих случаях стабильность связывания белковой молекулы с НЧ будет играть ключевую роль во взаимодействии с клетками [Aggarwal P. et al., 2009; Lundqvist M. et al., 2008]. Например, для НЧ  $Fe_3O_4$  предполагается, что одним из основных факторов, определяющим цитотоксичное действие таких НЧ, их взаимодействие и проникновение в клетки является количественный и качественный состав белковых молекул среды инкубации [Кирошка В.В. и др., 2011].

Данное взаимодействие между биомолекулами и НЧ оказывает влияние не только на свойства НЧ, но и на свойства биомолекул. Адсорбция на поверхности НЧ биологических макромолекул может изменять пространственную структуру данных молекул, а значит, и некоторые функциональные свойства. Так, например, фермент альфа-химотрипсин, адсорбированный на однослойных углеродных нанотрубках, теряет 99% активности из-за нарушения своей вторичной структуры [Karajanagi S.S. 2004].

Замечено, что золотые НЧ в среде DMEM образуют «протеиновую корону», величина которой сильно зависит от времени инкубации с НЧ, а в среде RPMI 1640 образуются более редуцированные короны [Maiorano G. et al., 2010]. Также показано, что в среде RPMI 1640 взаимодействие между частицами выше, чем в DMEM [Maiorano G. et al., 2010]. Данные золотые НЧ способны в различной степени влиять на жизнеспособность клеток HeLa и U937, что может быть связано с различиями в динамике формирования «белковых коронок» в среде RPMI 1640 и вызывает более сильный токсический эффект чем в среде DMEM, что, как предполагается, связано с образованием в RPMI 1640 более редуцированной «белковой короны» [Maiorano G. et al., 2010]. Также эти золотые НЧ с одинаковой эффективностью проникали в клетки U937, будучи растворенными как в

RPMI 1640, так и в DMEM, и локализовались преимущественно в лизосомах [Maiorano G. et al., 2010].

В работе [Sohaebuddin S.K., 2010] было изучено поведение НЧ  $TiO_2$  (диаметр 5-10 нм),  $SiO_2$  (диаметр 30 нм), и трех отличающихся по диаметру типов многослойных углеродных нанотрубок (длина 0.5-2 мкм, диаметр <8 нм, 20-30 нм, а также > 50 нм) в PBS и в клеточной среде с сывороткой. Размер НЧ увеличивался как при инкубации в PBS, так и в клеточной среде, причем в равной степени (что, видимо, говорит о том, что НЧ адсорбировали те компоненты, которые есть как в PBS так и в клеточной среде). Все исследованные в данной работе НЧ адсорбировали сывороточные белки за 30 мин. При исследовании НЧ  $SiO_2$  было замечено, что в содержащей сыворотку среде НЧ агрегировали и были токсичны в концентрации в 5-10 раз превышающей токсичную концентрацию для бессывороточной среды. [Fede C. et al., 2012].

Также отмечено [Петрова Е.А. и др., 2012], что после разбавления раствора НЧ у- $Fe_2O_3$  полной клеточной культуральной средой данные НЧ коагулируют в течение 5 мин, в то время как при разведении бессывороточной средой сохраняют относительную стабильность в течение 30 мин. На основе данного наблюдения было сделано предположение, что основной причиной агрегации магнитных НЧ, сопровождающейся выпадением осадка, является их адсорбция на белках, входящих в состав ЭТС. Таким образом, биологические среды могут существенным образом влиять на агрегатное состояние, физико-химические свойства, и как следствие, биологические эффекты НЧ. Свойства биомолекул при этом также могут меняться. Все это необходимо учитывать при применении НЧ в биотехнологии и медицине.

### **1.5. Интернализация наночастиц клетками и влияние наночастиц на клеточные органеллы**

Существует несколько возможных путей, посредством которых НЧ могут преодолевать естественные клеточные барьеры. Они способны проникать в клетку путем фагоцитоза, макропиноцитоза, эндоцитоза с участием клатрина (либо клатрина и кавеол), а также посредством диффузии и других механизмов, запускаемых электростатическими силами, Ван-дер-Вальсовыми либо стерическими взаимодействиями [Mühlfeld C. et al., 2008]. Поглощение НЧ может зависеть от соотношения адгезии и растяжения клеточной мембраны. Эти параметры могут влиять на так называемое время «обертывания» частицы (wrapping time) [Chithrani, B.D., Chan, W.C.W. 2007].

Конечно, степень эффективности захвата НЧ зависит от типа клеток, в частности, их фагоцитарной способности [Беляева Т.Н. и др., 2009] и типа НЧ. Клатринопосредованный эндоцитоз является преобладающим механизмом, используемым клетками немакрофагального типа при поглощении НЧ [Mousavi S.A. et al., 2004]. Это, в свою очередь, приводит к аккумуляции внеклеточных макромолекул внутри клатринсодержащих везикул, которые сливаются в эндосомные пузырьки и позже становятся деградирующими лизосомами [Thurn K.T. et al., 2007], а далее НЧ могут быть деградированы или экзоцитированы [Rabinow B., Chaubal M.V. 2006]. Однако, в работе [Михеева Э.Р., Плескова С.Н., Балалаева И.В. 2009] показано, что квантовые точки (CdSe/ZnS и CdSe/CdS, покрытые меркаптоуксусной кислотой и полиэтиленгликолем) поглощаются нейтрофильными гранулоцитами посредством фагоцитоза, также авторы этой работы предполагают, что далее данные квантовые точки выходят из фаголизосом. Есть данные, что проникновение КТ CdSe/ZnS в клетки может осуществляться посредством эндоцитоза (клетки карциномы человека HeLa), фагоцитоза (макрофагоподобные клетки мыши линии J774), а также они способны проникать через узкие инвагинации поверхностной мембраны внутрь клетки (скелетные мышечные волокна) [Беляева Т.Н. и др., 2009]. Стоит учитывать, что интернализованные клеткой НЧ не обязательно локализуются в лизосомах. Фуллереноподобные НЧ  $C_{61}(CO_2H)_2$ , например, способны накапливаться в митохондриях фибробластов человека CRL-1635 и клетках обезьяны COS-7 (CRL-1651) [Foley S. et al., 2002].

Исследования показывают, что для одного и того же типа НЧ может существовать несколько возможных путей поглощения клеткой, один из которых может быть более предпочтительным. В работе [Asharani, P.V, Hande, M.P., Valiyaveetil S. 2009] было изучено влияние НЧ серебра на фибробласты человека. Авторы считают, что поглощение НЧ происходило преимущественно посредством клатринзависимого эндоцитоза и макропиноцитоза, однако эндоцитоз происходил и в отсутствие клатрина. Данные НЧ ингибировали пролиферацию фибробластов (IMR-90). Также в работе [Ekkapongpisit M. et al., 2012] показано, что НЧ оксида кремния проникали в клетки рака яичника преимущественно посредством холестеринзависимого эндоцитоза, однако блокирование этого пути не прекращало проникновение НЧ в клетку полностью, хотя и становилось менее эффективным.

Обволакивание НЧ мембраной требует как специфических, так и неспецифических взаимодействий с мембраной и является результатом динамического противостояния механизмов захвата частицы и препятствующих этому процессов. Существует

определенный минимальный радиус частицы, при котором она может быть захвачена внутрь клетки и оптимальный радиус, при котором захват происходит с максимальной эффективностью. Есть данные, что для сферических и цилиндрических частиц такие оптимальные размеры составляют 15 и 30 нм соответственно, но для НЧ, покрытых трансферрином этот радиус составляет около 50 нм [Чеканов А.В., Баранова О.А., Левин А.Д. 2013] (трансферрин активно используется для доставки соединений в клетку с «плохой» фармакокинетикой [Qian Z.M. et al., 2002]).

Логично предположить, что НЧ меньшего размера захватываются более эффективно, чем более крупного, при тех же свойствах их поверхности [Fang C. et al., 2006; Lohbach C. et al., 2006]. Например, увеличение размера НЧ оксида кремния от 10 до 50 нм снижает эффективность их поглощения клетками рака яичника [Ekkapongpisit M. et al., 2012]. Но бывают и исключения из данного правила. Так, процесс неспецифического поглощения был исследован Osaki et.al. В своей работе авторы изучали эндоцитоз при помощи амфифильных сахарсодержащих квантовых точек (15 нм). Они установили оптимум диаметра данных НЧ для их включения в 50 нм, хотя испытывали также варианты с диаметром 15 нм и 5 нм [Osaki F. et al., 2004], а следовательно, в эффективности поглощения существует некий компромисс между размером НЧ и другими их свойствами, например, поверхностным зарядом [Ekkapongpisit M. et al., 2012].

Однако, покрытие (модификация) НЧ различными веществами может не только способствовать поглощению НЧ клетками, но и напротив, ухудшать. Оболочка из полиэтиленгликоля уменьшает неспецифическое связывание и поглощение НЧ клетками [Hild W. A., Breunig M., Goepferich A. 2008]. КТ, покрытые полиэтиленгликолем, не накапливаются клетками HeLa [Беляева Т.Н. и др., 2009]. Однако если использовать полиэтиленгликоль с различными модификациями, включающими некоторые реактивные группы, то можно добиться проникновения таких КТ в клетки HeLa [Duan H., Nie S. 2007]. Например, присоединение карбоксильных или аминогрупп к слою полиэтиленгликоля способствует проникновению подобных НЧ в клетки [Ballou B. et al., 2007].

Форма также способна вносить свой вклад в способность проникновения НЧ в клетку. Например, в работе [Chithrani B.D., Chan W.C.W. 2007] исследовался захват и выделение покрытых трансферрином НЧ золота сферической и стержневидной форм при взаимодействии с клетками STO и SNB19. НЧ захватывались клетками путем опосредованного рецепторами клатринзависимого эндоцитоза. Скорость захвата сферических частиц была больше, чем стержневидных. Таким образом, форма, как и



размер НЧ, значительно влияют на скорость и степень захвата частиц клетками [Chithrani B.D., Chan W.C.W. 2007].

Поверхностный заряд может быть одним из факторов, влияющих на способность НЧ проникать в клетку. Есть данные, что интернализация НЧ зависит от ионных взаимодействий между отрицательным мембранным потенциалом клетки и поверхностным зарядом НЧ [Harush-Frenkel O. et al., 2007], а присутствие карбоксильных функциональных групп на поверхности НЧ полистирола придает отрицательный заряд данным НЧ, вследствие чего возможны электростатические взаимодействия с биологическими молекулами, что в свою очередь может влиять на эффективность поглощения НЧ клетками [Lunov O. et al. 2011]. К примеру, НЧ магнетита ( $Fe_3O_4$ ) диаметром 6 нм исследовали на иммунокомпетентных клетках и на альвеолярных макрофагах в зависимости от концентрации белкового компонента в среде. Показано, что максимальное «насыщение» всех клеток происходило начиная с концентрации НЧ 0.45 мг/мл в среде инкубации при добавлении 20% ЭТС и 0.6 мг/мл НЧ при добавлении 10% ЭТС (эмбриональной телячьей сыворотки). При минимальной концентрации 0.06 мг/мл не наблюдалось зависимости адсорбции на мембране/поглощения НЧ от концентрации белка, что, как предполагают авторы, связано с недостаточным количеством НЧ в среде. Отсюда был сделан вывод, что увеличение концентрации белка в культуральной среде приводит к увеличению количества НЧ, способных взаимодействовать с клетками, то есть белки являются «активаторами» взаимодействия НЧ  $Fe_3O_4$  с альвеолярными макрофагами. Авторы объясняют данный факт тем, что при добавлении НЧ в среду культивирования происходит абсорбция белков на их поверхности за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Что касается цитотоксических свойств данных НЧ, то в диапазоне концентраций НЧ 0.15-0.6 мг/мл наблюдается достоверная разница жизнеспособности клеток по показаниям МТТ-теста в зависимости от концентрации белка в среде. При добавлении 20% ЭТС заметно более выраженное цитотоксическое действие НЧ на клетки. При 0.45 мг/мл НЧ жизнеспособность клеток составляла 77.4% при 10% ЭТС и 52.3% при 20% ЭТС соответственно. При 0.06 и 0.1 мг/мл и больших (1.2 и 1.8 мг/мл) концентрациях НЧ повреждение клеток не зависело от концентрации ЭТС в среде. Анализ выхода цитозольного фермента ЛДГ не показал достоверных отличий в зависимости от концентрации ЭТС в среде инкубации [Кирошка В.В. и др., 2011].

## *Лизосомы*

Лизосомы – главные катаболизирующие органеллы клетки. В них содержится большое количество ферментов (гидролаз) участвующих в разрушении белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. Они участвуют в разрушении комплексов лиганд-рецептор, в метаболизме холестерина, в утилизации органелл и так далее. Лизосомы имеют низкий рН, который обеспечивается мембраносвязанной АТФ-зависимой протонной помпой, обменивающей  $\text{Na}^+$  на  $\text{H}^+$ . Для того, чтобы находящиеся в лизосоме ферменты выполняли свои гидролитические функции необходима кислая среда. Оптимальный уровень рН большинства гидролаз около 5, поэтому их активность ограничена при повреждении лизосом и выходе ферментов в цитозоль, где рН составляет 7.2-7.3. Таким образом, наличие специализированного компартмента для катаболизма веществ обеспечивает оптимальные гидролитические условия.

Внутриклеточное высвобождение лизосомных ферментов (70 различных ферментов) представляет интерес в силу их высокого гидролитического потенциала и широкого спектра действия. Нарушения гомеостаза лизосом нередко связывают с воспалительными процессами и клеточной гибелью. Так, например, во многих работах по моделированию апоптоза обнаружена ранняя утечка в цитозоль лизосомных ферментов, в первую очередь катепсинов, при этом морфологически лизосомы могут выглядеть интактными [Пупышев А. Б. 2011]. Мишенями лизосомных катепсинов в разных ситуациях являются сигнальные цитозольные белки, прокаспазы, митохондрии и ядро клетки [Bröker L.E., Kruyt F. A.E., Giaccone G. 2005], что может указывать на связь между реакциями лизосом и митохондрий на НЧ в данном исследовании. Показано, что слабый окислительный стресс, вызывающий ограниченное повреждение лизосом, может индуцировать апоптоз, тогда как выраженное повреждение лизосом приводит к некрозу [Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W. 2001]. В клетках при их нормальном состоянии лизосомные ферменты находятся в латентном состоянии, поскольку изолированы от цитозоля лизосомной мембраной. При различных повреждениях мембраны происходит проникновение низкомолекулярных внелизосомных субстратов в лизосомы, растет скорость их гидролиза, и при дальнейшем повреждении мембран лизосомные ферменты могут высвобождаться из лизосом и повреждать внелизосомные структуры [Пупышев А.Б. 2011].

Признаки повреждения лизосом наблюдаются при целом ряде воздействий на клетки и организм. Наиболее распространенным и изученным фактором повреждения лизосом является активация перекисного окисления липидов, запускаемая образованием АФК [Terman A. et al., 2006] В лизосомах образование свободных радикалов (АФК) может

происходить по механизму реакций Фентона, катализироваться из перекиси водорода с участием  $Fe_2^+$  в кислой среде в присутствии восстановленного цистеина [Terman A. et al., 2006], и поскольку нагрузка лизосом  $Fe_2^+$  активирует повреждение лизосомных мембран, то это стоит учитывать при диффузии  $Fe_2^+$  с поверхности металлических НЧ. Есть данные, что способностью индуцировать перекисное окисление липидов обладают и НЧ кремния [Shen H.M. et al., 2001]. Молекулярные процессы, лежащие в основе увеличения проницаемости лизосомных мембран, обычно связаны с ослаблением межмембранного взаимодействия составляющих их фосфолипидов, нарушением плотности упаковки липидного бислоя мембран, появлением гидрофильных участков проницаемости мембраны для водорастворимых и заряженных молекул. Таков, например, эффект перекисидации липидов мембран, вызывающей гидрофилизацию фосфолипидов и нарушение структурной организации мембран [Girotti A.W. 1998]. Важно отметить, что границы пермеабилзации мембран лизосом, соответствующие индукции апоптоза, остаются размытыми. Согласно некоторым данным, даже 15%-ная лабилизация лизосом может не вызвать апоптоза [Michihara A. et al., 2005]. Дестабилизация лизосом также связана с генерацией АФК и ассоциирована с нарушением митохондриального мембранного потенциала [Kroemer G., Jaattela M. 2005].

#### *Митохондрии*

Митохондриальный трансмембранный потенциал тесно связан с функционированием митохондрий, создается электрохимическим градиентом протонов по обе стороны мембраны, его поддержание обеспечивается процессами переноса электронов по дыхательной цепи. Митохондриальный трансмембранный потенциал может служить характеристикой и митохондриальной функции, и состояния клетки в целом. Известно, что снижение митохондриального трансмембранного потенциала в клетках, приводящее к деполяризации митохондрий, является одним из признаков апоптоза [Zamzami N. et al., 1995]. Некроз, вызванный клеточной гипоксией, также сопровождается деполяризацией митохондрий [Lemasters J.J. et al., 1987].

При окислительном стрессе митохондрии повреждаются одними из первых, что сопровождается выходом в цитозоль проапоптотических факторов. Показано, что некоторые НЧ способны поглощаться митохондриями, где они вызывают серьезные структурные повреждения, окислительный стресс [Li N. et al., 2003], митохондриальную дисфункцию [Xu F., et al., 2013]. Установлено, что падение митохондриального потенциала является одним из признаков необратимости апоптоза. Поэтому амплитуда и направленность этих изменений митохондриального трансмембранного потенциала может

составлять важный критерий в оценке действия регуляторных факторов на окислительный баланс и функционально-метаболическое состояние клетки [Аверченко Е.А. и др., 2009].

#### *Активные формы кислорода*

Генерация свободных радикалов, индуцирующая окислительный стресс, по современным представлениям является одним из основных механизмов токсичности наноматериалов *in vivo* [Nel. A. et al., 2006]. Способность повышать уровень клеточных АФК показана для НЧ различной природы, например, для CdTe квантовых точек [Ire B. I. et al., 2005], НЧ SiO<sub>2</sub> [Lin W. et al., 2006], углеродных наноматериалов [Halameda K.B. et al., 2012; Moore M.N. et al., 2009]. Также показано, что кремниевые квантовые точки участвуют в генерации кислородных радикалов в водном растворе [Fujioka K. et al., 2008]. А на поверхности полупроводниковых НЧ (к ним относится и кремневые НЧ) могут происходить реакции с кислородом, продуктом которых являются АФК [O'Farrell N. et al., 2006].

Возможно несколько путей формирования свободных радикалов. Среди них - образование активных электронных донорно-акцепторных групп на развалах кристаллической решетки частиц, образование гидроксильных радикалов в реакции Фентона, генерация под действием света [Nel. A. et al., 2009]. Все эти реакции могут протекать как во внеклеточном пространстве, так и при попадании НЧ внутрь клетки [Unfried K. et al., 2007].

В нормальных условиях в клетке накапливается только H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, так как он более стабилен, другие АФК практически не накапливаются [Ткачук В.А. и др., 2012]. В низких концентрациях АФК внутри клеток выступают в роли сигнальных молекул и способны взаимодействовать с клеточными структурами и вызывать их повреждение [Brown D.I., Griendling K.K. 2009]. К АФК относятся химически активные молекулы, образующиеся при неполном восстановлении молекулярного кислорода, в том числе радикалы кислорода и пероксиды. Данные соединения крайне реакционноспособны из-за наличия свободных валентностей, образованных неспаренными электронами, либо слабой связи между атомами кислорода, которая может разрываться с образованием радикалов. В норме высокая реакционная способность АФК используется клетками иммунной системы для нейтрализации патогенов при воспалительных процессах и в управлении другими клеточными реакциями, такими как регуляция сигнальных ферментов и транскрипционных факторов при клеточной пролиферации [Тюрин-Кузьмин П.А. и др., 2010] и апоптозе [Скулачѳ В.П. 2001]. Есть данные, что количества H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в пределах 1-10 мкМ не только не вызывают заметных повреждений клетки, но также способны оказывать

митогенный эффект [Ткачук В.А. и др., 2012]. Гидроксильный радикал  $\text{OH}^\cdot$  способен инициировать радикальные цепные реакции, итогом которых становятся повреждение липидов, а значит и клеточных мембран.  $\text{H}_2\text{O}_2$  наиболее стабильная молекула из всех АФК. Она обладает относительно большим временем жизни и способна распространяться на значительные расстояния в водных растворах. Это связано со значительно более низкой реакционной способностью данной формы АФК. Молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  хорошо растворима в воде и благодаря отсутствию заряда хорошо проходит сквозь биологические мембраны. Другие формы АФК в нормальных условиях практически не накапливаются. К клеточным системам, синтезирующим АФК, относится электрон-транспортная цепь митохондрий, семейство мембранных NADPH-оксидазных комплексов и ряд других оксидаз. Электрон-транспортная цепь митохондрий служит важным источником АФК. Данный набор ферментов осуществляет перенос электронов от NADPH к кислороду, восстанавливая его до воды. АФК способны синтезироваться как при неполном восстановлении кислорода, так и в случае прерывания цепи и перехода электрона на растворенный в матриксе митохондрий кислород [Starkov A.A. 2008].

Несмотря на огромное количество данных о биосовместимых НЧ и о способах их применения в биотехнологии, нужно помнить, что НЧ могут обладать некоторой цитотоксичностью и при анализе НЧ *in vitro* особое внимание нужно уделять таким показателям, как изменения жизнеспособности, уровня АФК, состояния лизосомального и митохондриального компартментов клеток.

Любые новые НЧ или модификации уже существующих должны быть проверены на клеточных моделях перед их применением в практических областях и в первую очередь необходимо оценивать их влияние на клеточную жизнеспособность, продукцию АФК и состояние лизосом и митохондрий. Данные исследования и лежат в основе настоящей работы.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Использованное оборудование, материалы и реактивы

#### 2.1.1. Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: ламинарный шкаф ВЛ22 (Сампо, Россия), CO<sub>2</sub>-инкубатор MCO-17 AIC (Sanyo, Япония), атомный силовой микроскоп Solver P47-Pro (NT-MDT, Россия), конфокальный микроскоп LSM 780 (Zeiss, Германия), световой фазово-контрастный инвертированный микроскоп Leica DM IL (Leica, Германия), вортекс (Elmi, Латвия), центрифугу Eppendorf 5204 R (Eppendorf, Германия), центрифугу Eppendorf minispin (Eppendorf, Германия) водяную баню WB 4 (BioSan, Латвия), проточный цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США), миллиметровые фильтры (Millipore, США), автоматические пипетки (Eppendorf, Германия), гемоцитометр (Bright Line, США), холодильник (Indesit, Россия), низкотемпературный холодильник MDF-U 2086S (Sanyo, Япония).

#### 2.1.2. Химические реактивы, культуральные среды и пластик.

В работе были использованы следующие вещества и культуральные среды: среда  $\alpha$ -MEM (Gibco, США) (минимальная среда Игла), среда RPMI 1640 (Биолот, Россия), фетальная бычья сыворотка (ФБС) (HyClone, США), глутамин (ПанЭко, Россия), раствор трипсина и ЭДТА с концентрациями веществ 0,5 г/л и 0,2 г/л соответственно (Sigma-Aldrich, США), раствор антибиотиков в 0,85% солевом буфере, содержащем 10 000 ед/мл пенициллина и 10 000 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (ПанЭко, Россия), Triton X-100 (Sigma, США), набор для детекции цитокинов FlowCytomix human Th1/Th2 11 Plex (Bender MedSystems, Австралия), набор для определения жизнеспособности клеток ANNEXIN V-FITC Kit (Immunotech, Франция), TRITC-фаллоидин (Sigma, США), флуоресцентный краситель для ДНК – DAPI (Sigma, США), флуоресцентный зонд для выявления митохондрий Mito Tracker red FM ( $\lambda_{\text{возбуждения}} = 581$  нм,  $\lambda_{\text{испускания}} = 644$  нм) (Invitrogen, США), флуоресцентный зонд для выявления лизосом Lyso Tracker Green DND 26 ( $\lambda_{\text{возбуждения}} = 504$  нм,  $\lambda_{\text{испускания}} = 511$  нм) (Invitrogen, США), флуоресцентный зонд для выявления активных форм кислорода H<sub>2</sub>DCFDA ( $\lambda_{\text{возбуждения}} = 492-495$  нм,  $\lambda_{\text{испускания}} = 517-527$  нм) (Invitrogen, США), флуоресцентный зонд для выявления активных форм кислорода CM-H<sub>2</sub>DCFDA ( $\lambda_{\text{возбуждения}} = 492-495$  нм,  $\lambda_{\text{испускания}} = 517-527$  нм) (Invitrogen, США), фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (Sigma-Aldrich, США), тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США), чашки Петри диаметром 35 мм и 60 мм

(Corning-Costar, США), пробирки для проточного цитофлуориметра (Sarstedt, Германия), центрифужные пробирки объемом 15 и 50 мл (Corning, США), наконечники для автоматических пипеток (Eppendorf, Германия).

## **2.2. Клеточные культуры**

Для проведения экспериментов использовали мононуклеары периферической крови человека (МНК), мезенхимальные стромальные клетки (МСК) жировой ткани человека 3-7 пассажей и эмбриональные фибробласты человека 2-11 пассажей.

Для смены сред и пассирования клеток использовали серологические пипетки, центрифужные пробирки объемом 15 и 50 мл (Corning, США), наконечники для автоматических пипеток (Eppendorf, Германия), ламинарный шкаф ВЛ22 (Сампо, Россия).

### **2.2.1. Приготовление сред для культивирования клеток**

Для культивирования МНК использовали среду RPMI 1640 (Биолот, Россия) с 5% содержанием ФБС (NuClone, США), инактивированной при 56<sup>0</sup>С в течение 30 минут. Для культивирования МСК и фибробластов использовалась среда  $\alpha$ -MEM (Gibco, США) с 10% ФБС. В среду RPMI 1640 добавляли 2 мМ L-глутамин и раствор пенициллин-стрептомицина. В среду  $\alpha$ -MEM добавляли раствор пенициллин-стрептомицина и NaHCO<sub>3</sub> 3.7 г/л.

### **2.2.2. Выделение мононуклеаров периферической крови человека.**

Мононуклеары (МНК) получали из периферической крови здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, США). Цельную кровь разбавляли ФБС в соотношении 1:1, наслаивали на Ficoll-Histopaque и центрифугировали при скорости 2400 обор/мин в течение 20 минут, после чего отбирали интерфазное кольцо и переносили в отдельную пробирку. Далее суспензию клеток разбавляли ФБС в соотношении 1:5 и отмывали посредством центрифугирования при 1500 обор/мин в течение 5 минут.

### **2.2.3. Культивирование мононуклеаров периферической крови человека.**

МНК высевали в среду RPMI 1640 в концентрации 1·10<sup>6</sup> кл/мл на чашки 35 мм (Corning, США) и культивировали 24 часа в CO<sub>2</sub> инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37<sup>0</sup>С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % воздуха и 100% влажности.

#### **2.2.4. Культивирование мезенхимальных стромальных клеток**

МСК были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Культивирование МСК проводили в чашках Петри диаметром 60 мм в полной среде  $\alpha$ -MEM. После достижения клетками монослоя клетки пассировали с использованием раствора трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США).

#### **2.2.5. Культивирование фетальных фибробластов**

Эмбриональные фибробласты человека были любезно предоставлены лабораторией роста клеток и тканей ИТЭБ РАН (г. Пущино). В экспериментах использовали эмбриональные фибробласты 7 – 15 пассажей. Фибробласты высевали в чашки 60 мм, и культивировали в полной среде  $\alpha$ -MEM до состояния монослоя.

#### **2.2.6. Пассирование мезенхимальных стромальных клеток и фетальных фибробластов.**

При достижении конфлюэнтного монослоя клетки пересевали. Для этого из чашек Петри удаляли ростовую среду и дважды промывали клетки ФСБ. Для снятия клеток с поверхности пластика использовали раствор трипсин-ЭДТА (Sigma, США) с концентрациями веществ 0,5 г/л и 0,2 г/л соответственно. Клетки инкубировали с данным раствором при 37<sup>0</sup>С, периодически встряхивая чашку в горизонтальной плоскости для перемешивания раствора трипсина и клеток, контролируя отделение клеток от дна чашки под микроскопом. После открепления клеток действие трипсина останавливали добавлением к клеточной суспензии среды с сывороткой. Клетки тщательно ресуспендировали и переносили содержимое чашки в центрифужную пробирку. Затем чашку Петри повторно промывали средой с сывороткой и также переносили эту среду в центрифужную пробирку. Суспензию клеток центрифугировали 5 минут при 1500 об/мин и освобождали от супернатанта. Осадок ресуспендировали в ростовой среде и рассеивали на чашки Петри диаметром 60 мм по 12500 клеток на чашку.

#### **2.3. Наночастицы.**

Все использованные в работе НЧ были изготовлены и любезно предоставлены лабораторией гетерофазных оптических процессов Института общей физики РАН (зав. лаб. Пустовой В.И). Совместные работы проводили в рамках гранта РФФИ №11-02-12210-офи-м. Были использованы наночастицы (НЧ) чистого кристаллического кремния (Si, диаметр 7 нм), а также его модификации бором (Si/B, диаметр 10 нм), палладием



(Si/Pd, диаметр 15 нм), золотом (Si/Au, диаметр 15 нм) и серебром (Si/Ag, диаметр 15 нм). Все НЧ имели кристаллическую решетку типа алмаза и были растворены в воде.

### **2.3.1. Получение наночастиц Si.**

Для получения кремниевых НЧ (Si) использовался метод лазерного пиролиза, который отличается от всех других методов получения НЧ, главным образом, своей чистотой [Vladimirov A. et al., 2011; Kelm E. et al., 2011]. В реакторе отсутствуют любые посторонние вещества, которые могли бы загрязнять получаемые частицы. Кроме того, метод позволяет в широких пределах менять параметры реакции и получать частицы с заранее заданными параметрами, такими как размер, структура, соотношение компонентов, состояние поверхности и т. д.

Синтез наноразмерного порошка кремния осуществлялся в проточном реакторе в струе моносилана SiH<sub>4</sub>, окруженной цилиндрическим потоком буферного газа (аргон либо гелий). Реакция пиролиза индуцировалась непрерывным излучением CO<sub>2</sub>-лазера ИЛГН-802 с длиной волны  $\lambda=10,6$  мкм, выходной мощностью 70 Вт и диаметром луча 6 мм. Сбор получившегося порошка осуществлялся по окончании реакции в блоке со сменными фильтрующими ячейками в атмосфере аргона [Vladimirov A. et al., 2011; Kelm E. et al., 2011]. Анализ размеров полученных наночастиц и их дисперсии по размерам с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показал, что суспензия НЧ достаточно однородна и их диаметр составляет в среднем 7 нм. Проведенный анализ кристаллической структуры образцов с использованием дифракции электронов на кристаллической решетке позволил установить, что НЧ имеют кристаллическую структуру кремния.

### **2.3.2. Синтез наночастиц Si/B.**

Для синтеза НЧ, содержащих бор и кремний, проводился лазерный пиролиз смеси моносилана и трихлорида бора (BCl<sub>3</sub>) [Беклемишев В. и др., 2011]. Как показала ПЭМ, НЧ имели сферическую форму со средним эффективным диаметром около 10 нм. Исследование полученных НЧ методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии в трех произвольно выбранных точках образца показало наличие в спектре линий, соответствующих энергии связи 2s электронов кремния 150-154 эВ и 1s электронов бора 187 эВ. Для экспериментов были выбраны НЧ Si/B, содержащие около 20% бора, такие НЧ сохраняли кристаллическую решетку кремния (кремний, легированный бором).

### **2.3.3. Синтез наночастиц Si/Pd.**

Осаждение металлического палладия на поверхность НЧ проводилось в два этапа [Korovin S. et al., 2005]. Сначала производилась пассивация поверхности кремниевой НЧ добавлением в водный коллоид небольшого количества плавиковой кислоты, которая удаляет атмосферный окисел кремния и создает на поверхности монослой водорода. Полученный коллоид промывали водой для удаления продуктов реакции, добавляли раствор хлористого палладия и помещали в ультразвуковую ванну. Осаждение металлического палладия на поверхности НЧ происходило за счет сильного локального поля на связи Si-H и интенсивного ультразвукового воздействия. Процентное содержание нанокремния и соли палладия рассчитывали так, чтобы толщина слоя составляла 5 нм. Реально полученная толщина слоя составила 2,5-3 нм.

### **2.3.4. Синтез наночастиц Si/Au.**

Покрытие НЧ кремния диаметром 15 нм золотой оболочкой проводилось при осаждении золота из водного раствора соли  $AuCl_3$  [Korovin S.V. et al., 2000]. Водный коллоид из НЧ кремния, содержащих тонкий подслой серебра (менее нанометра) помещался в раствор соли золота и подвергался воздействию ультразвукового излучения в течение 5-10 минут. Такая стимуляция приводила к осаждению свободного золота на поверхность НЧ, расчетная толщина слоя золота составляла приблизительно 3-5 нм. Наличие золотой оболочки на кремниевой НЧ подтверждается спектром поглощения коллоида.

### **2.3.5. Синтез наночастиц Si/Ag.**

НЧ кремния диаметром порядка 15 нм были диспергированы в деионизированную воду. В приготовленный коллоид вводился раствор соли серебра ( $AgNO_3$ ), концентрация раствора рассчитывалась так, чтобы на поверхности НЧ возник слой серебра толщиной порядка 3-5 нм. Восстановление свободного серебра из  $AgNO_3$  происходила за счет высокой химической активности поверхности НЧ кремния и воздействия ультразвука. Наличие слоя серебра на поверхности НЧ определялось по спектрам поглощения коллоида [Korovin S. et al., 2005].

### 2.3.6. Структура исследования (схема эксперимента)

Используемые в качестве моделей клетки инкубировались в чашках Петри в клеточной среде с добавлением НЧ при стандартных условиях температуры и газовой среды. После 24 – 72 ч инкубации клетки отбирали и отделяли от супернатанта при помощи центрифугирования. После чего инкубировали в среде с флуоресцентными зондами и анализировали на проточном цитофлуориметре Erics XL. Все НЧ имели кристаллическую структуру. Схема проводимых экспериментов представлена на рисунке 3.

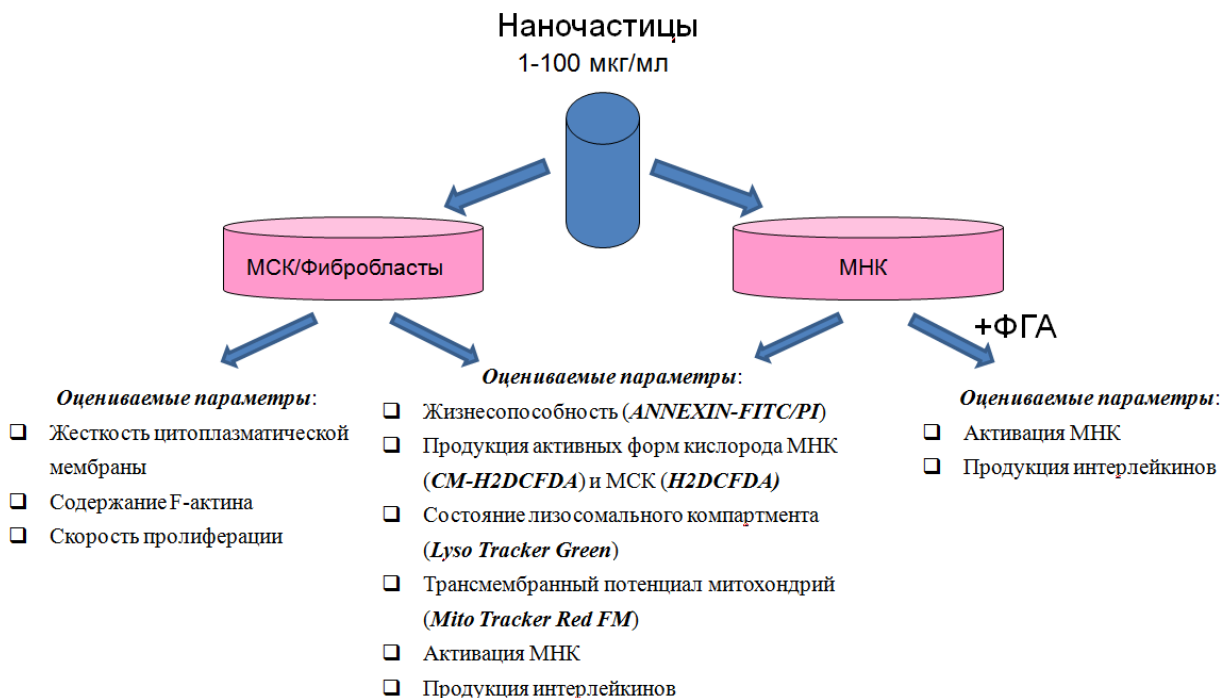


Рис. 3. Общая схема проводимых экспериментов.

Свойства исследованных НЧ представлены в таблице 3.

Таблица 3. Общая характеристика наночастиц

Тип НЧ	Размер, нм	Модификация	Ожидаемый биологический эффект
Si	7	-	Минимальное воздействие на клетку
SiO <sub>2</sub>	7	-	-
Si/B	10	Модификация атомами бора	Поглощение клетками
Si/Pd	15	Кристаллическое кремниевое ядро, покрытое слоем палладия	-
Si/Ag	15	Кристаллическое кремниевое ядро, покрытое слоем серебра	-
Si/Au	15	Кристаллическое кремниевое ядро, покрытое слоем золота	-

## **2.4 Исследование клеточной жизнеспособности, состояния внутриклеточных органелл и активации мононуклеаров с применением флуоресцентных зондов и моноклональных антител.**

### **2.4.1 Проточная цитометрия.**

Определение состояния клеточных параметров проводили с помощью проточного цитофлуориметра Epics XL. В основе метода проточной цитофлуориметрии лежит проведение фотометрических и флуоресцентных измерений отдельных объектов (клеток) схожего размера, пересекающих лазерный луч монохроматического света в ламинарном потоке жидкости (принцип гидродинамического фокусирования), благодаря чему возможно оценить размер, степень светорассеяния и спектр флуоресценции изучаемых объектов. Сфокусированный световой пучок лазера с определенной длиной волны возбуждает молекулы флуоресцирующих красителей, связанных с различными клеточными компонентами. Сигнал, испускаемый флуоресцентными красителями, собирается с помощью системы линз и зеркал и разлагается на компоненты, регистрируемые высокочувствительными детекторами (фотоэлектронными умножителями). Далее информация преобразуется в электрические импульсы и обрабатывается компьютерной программой [Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. 2011].

Все нижеперечисленные зонды использовали согласно инструкциям производителя, клетки анализировали на проточном цитофлуориметре Erics XL при помощи программного обеспечения System II. Предварительно культуральную среду отмывали фосфатным буфером путем центрифугирования при 1500 оборотах в минуту в течение 5 минут на центрифуге (*Eppendorf*, Германия), после чего суспендировали клеточный осадок в 1 мл среды, содержащей зонд, и инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе *Sanyo* (Япония) в течение 30 минут. Анализировали не менее 10 000 событий в каждой пробе.

#### **2.4.2. Оценка жизнеспособности клеток.**

В большинстве экспериментов клеточную жизнеспособность оценивали при помощи набора ANNEXIN V – FITC Kit (Immunotech, Франция) по стандартной методике. Предварительно культуральную среду с клетками трехкратно разбавляли ФСБ и центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 5 минут, после чего освобождали клетки от супернатанта. Клеточный осадок суспендировали в 100 мкл аннексин-связывающего буфера с добавлением 1 мкл Annexin V и 5 мкл йодида пропидия и инкубировали при + 4<sup>0</sup> С в темноте в течение 15 минут. Анализировали не менее 10 000 событий. Определяли долю живых клеток (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), апоптотических клеток (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), некротических клеток (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) и клеток в состоянии постапоптотического некроза (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Цитотоксическое действие НЧ SiO<sub>2</sub> оценивали с помощью МТТ-теста, основанном на способности митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы конвертировать растворимое вещество тетразолиум бромид в нерастворимый формазан, который возможно экстрагировать из клеток при помощи ДМСО. Данный ферментативный процесс активен только в живых клетках. Интенсивность окраски получаемого в результате экстракции раствора пропорциональна доле живых клеток и определяется колориметрически. Последующая фотометрия позволяет точно сопоставить изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток.

#### **2.4.3. Характеристика трансмембранного потенциала митохондрий.**

Трансмембранный потенциал митохондрий был охарактеризован при помощи флуоресцентного зонда Mito Tracker red FM. Молекулы зонда пассивно проникают через клеточную мембрану и аккумулируются в активных митохондриях, а интенсивность их суммарной флуоресценции отражает состояние трансмембранного потенциала. Протокол

использования зонда указан в пункте 2.5.1. Концентрация зонда в среде составляла 0.5 мкМ/л.

#### **2.4.4. Оценка состояния лизосомального компартмента.**

Состояние лизосомального компартмента оценивали при помощи рН чувствительного флуоресцентного зонда Lyso Tracker Green DND 26. Протокол использования зонда указан в пункте 2.5.1. Концентрация зонда в среде составляла 0.05 мкМ/л.

#### **2.4.5. Анализ продукции активных форм кислорода.**

Активные формы кислорода (АФК) выявляли, используя зонд CM-H<sub>2</sub>DCFDA для МНК и H<sub>2</sub>DCFDA для МСК. Данный зонд при взаимодействии с АФК превращается во флуоресцирующее вещество, по интенсивности флуоресценции которого можно судить о количестве АФК в клетках. Протокол использования зонда указан в пункте 2.5.1. Концентрация зонда в среде составляла 1 мкМ/л.

#### **2.4.6. Анализ активации лимфоцитов.**

Активацию лимфоцитов оценивали при помощи пар моноклональных антител CD3/CD25 (флуоресцентная метка FITC/PE) (Immunotec, Франция) и CD3/HLA-DR (флуоресцентная метка FITC/PE) (Immunotec, Франция) на проточном цитофлуориметре Epic XL. Конечная концентрация антител 0.2 мг/л. Для подготовки проб клетки отмывали от среды и инкубировали в PBS с добавлением 10 мкл раствора антител в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Анализировали не менее 5 000 событий.

#### **2.4.7. Анализ продукции цитокинов.**

Для анализа синтеза цитокинов использовалась клеточная среда, отобранная после 24 ч сокультивирования МНК с НЧ, освобожденная от клеток при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 3000 обр/мин и замороженная при температуре -20<sup>0</sup>С. Использовали набор FlowCytomix human Th1/Th2 11 Plex (Bender MedSystems, Австралия). Данный набор позволяет детектировать содержание 11 цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) одновременно при анализе одного образца. При данном методе используются полистироловые гранулы диаметром 5,5 мкм, на которые посажены антитела к перечисленным выше молекулам цитокинов.

Непосредственно перед анализом образцы размораживали при температуре 37<sup>0</sup>С в термостате.

При определении концентрации цитокинов использовали калибровочные образцы, содержащие определенные концентрации цитокинов. Анализ проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Анализ полученных данных проводился сотрудниками лаборатории метаболизма и иммунитета ИМБП при помощи программы FlowCytomixPro, доступ к которой поставляется в комплекте с набором для анализа цитокинов.

#### **2.4.8. Оценка пролиферативной активности фибробластов.**

Пролиферативную активность фибробластов изучали после их культивирования в среде, содержащей НЧ Si и Si/B в концентрациях 100 мкг/мл и 10 мкг/мл. Через 24 часа после пассирования клеток, культуральную среду заменяли на среду с НЧ. По истечении 72 часов среду полностью заменяли на не содержащую НЧ среду, и далее заменяли 50% среды на свежую (свободную от НЧ) каждые 72 часа. Контроль прироста клеток осуществляли, фотографируя в каждой чашке 5 фиксированных рандомически выбранных полей зрения при 10× увеличении на микроскопе Leica.

#### **2.4.9. Оценка жесткости клеточной мембраны мезенхимальных стромальных клеток**

Жесткость клеточной мембраны МСК оценивали при помощи атомно-силового микроскопа Solver P47-Pro (NT-MDT, Россия), исследования проводили совместно с док. физ-мат. наук Ириной Владимировной Огневой (ГНЦ РФ ИМБП РАН). Данный микроскоп сканирует изучаемый объект при помощи тончайшего зонда (кантилевера), измеряющего слабые силы взаимодействия, возникающие между острием и поверхностью образца, определяя изменения в отражении лазерного луча, вызванные этим взаимодействием. Точность измерения достигает нескольких ангстрем [Нолтинг Б. 2005.]. Клетки инкубировали с НЧ в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч и 1 ч.

Жесткость (Н/м) для каждого кантилевера корректировалась по положению резонанса. Для работы в жидкости использовали мягкие кантилеверы с коэффициентом жесткости на уровне 0.01 Н/м. Применялся контактный режим для снятия силовых кривых. Радиус  $r_c$  кривизны кончика всех использованных кантилеверов считался равным 10 нм. Определение механических характеристик клеток начинали с получения калибровочной силовой кривой на стекле с целью вычисления коэффициента перевода отклонения кантилевера, измеряемого в единицах силы тока, в единицы измерения

расстояния –  $a$  (м/А). Затем снимали силовые кривые на клетках, получая зависимость  $y(x)$ , где  $y$  – измеряемое отклонение кантилевера (в А),  $x$  – обобщенная глубина продавливания (в м) [Ogneva I.V. et al., 2014].

#### **2.4.10. Исследование структуры актинового цитоскелета мезенхимальных стромальных клеток**

Влияние НЧ на структуры фибриллярного F-актина МСК исследовали при помощи окраски TRITC-цитопллоидина на конфокальном микроскопе LSM 780. Исследование выполнено совместно с док. мед. наук Сергеем Валентиновичем Буравковым на базе факультета фундаментальной медицины МГУ.

Предварительно отмытые от среды клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 минут. Для пермеабилзации клеток использовали детергент 0.1% Triton X-100, который добавляли к префиксированным клеткам на 15 минут, после чего дважды промывали ФСБ. Далее к клеткам добавляли TRITC-фаллоидин в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 40 минут при 37<sup>0</sup>С, после чего отмывали 3 раза ФСБ. Для сохранения флуоресценции препараты заключали в специальную водорастворимую среду Fluoroshield, содержащую флуоресцентный краситель для ДНК – DAPI. Изменения в структуре актиновых микрофиламентов оценивали с помощью метода флуоресцентной микроскопии на конфокальном микроскопе LSM 780.

Возбуждение флуоресценции красителей (DAPI и TRITC-фаллоидина) осуществляли когерентным лазером (355 нм) и аргоновым лазером при длине 488 нм при выходной мощности в 2% (0.5 мВт, барьерный фильтр для DAPI – 355 нм, для TRITC – 458/561 нм, регистрация в синей области (401 – 556 нм), в красной области (566 – 692 нм) с объективом Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27. Все изображения получали при одинаковых параметрах возбуждения и регистрации (мощность лазера, чувствительность детекторов, времени сканирования и других) для дальнейшего денситометрического анализа. Оценивалась средняя интенсивность в красном канале на каждом изображении после выполнения процедуры отделения фона. Таким образом, вычислялась средняя интенсивность красного канала внутри каждой клетки.

Оценку распределения актиновых волокон по толщине клетки проводили с использованием z-стеков (серийных фокальных оптических срезов по вертикальной оси), на которых измеряли распределение интенсивности флуоресценции TRITC-фаллоидина. Для исключения зависимости получаемого результата от выбора начальной и конечной



вертикальных точек сканирования клетки, полученные кривые распределения интенсивности флуоресценции нормировали по их максимальным значениям.

#### **2.4.11. Оценка поглощения/адсорбции наночастиц клетками**

Оценка проникновения/сорбции НЧ на клеточную мембрану производилась при помощи метода проточной цитометрии. Использовался проточный цитометр Epic XL. Современные цитометры оборудованы датчиками, позволяющими оценивать размер и степень гранулярности анализируемых клеток оценивая свет, отражаемый анализируемыми объектами под разными углами. Для оценки проникновения НЧ в клетку или их адсорбции на клеточной мембране анализировали рассеивание света под углом порядка  $90^0$ .

#### **2.5. Статистическая обработка данных**

Все данные были получены в трех и более независимых экспериментах. Достоверность различий между экспериментами определялась при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни, различие считалось значимым при  $p < 0.05$ . В тексте работы приведены средние значения и ошибка среднего. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Microsoft Excel.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Влияние наночастиц на иммунокомпетентные клетки человека

На первом этапе исследования были проанализированы на жизнеспособность МНК из периферической крови человека и пути клеточной гибели после 24-часовой инкубации с НЧ кремния в диапазоне концентраций 1 -100 мкг/мл.

Все исследованные НЧ не оказывали влияния на жизнеспособность МНК. Однако, при использовании НЧ Si/Au и Si/Ag в концентрации 10 мкг/мл выявлено незначительное снижение процента живых клеток (рис. 4).

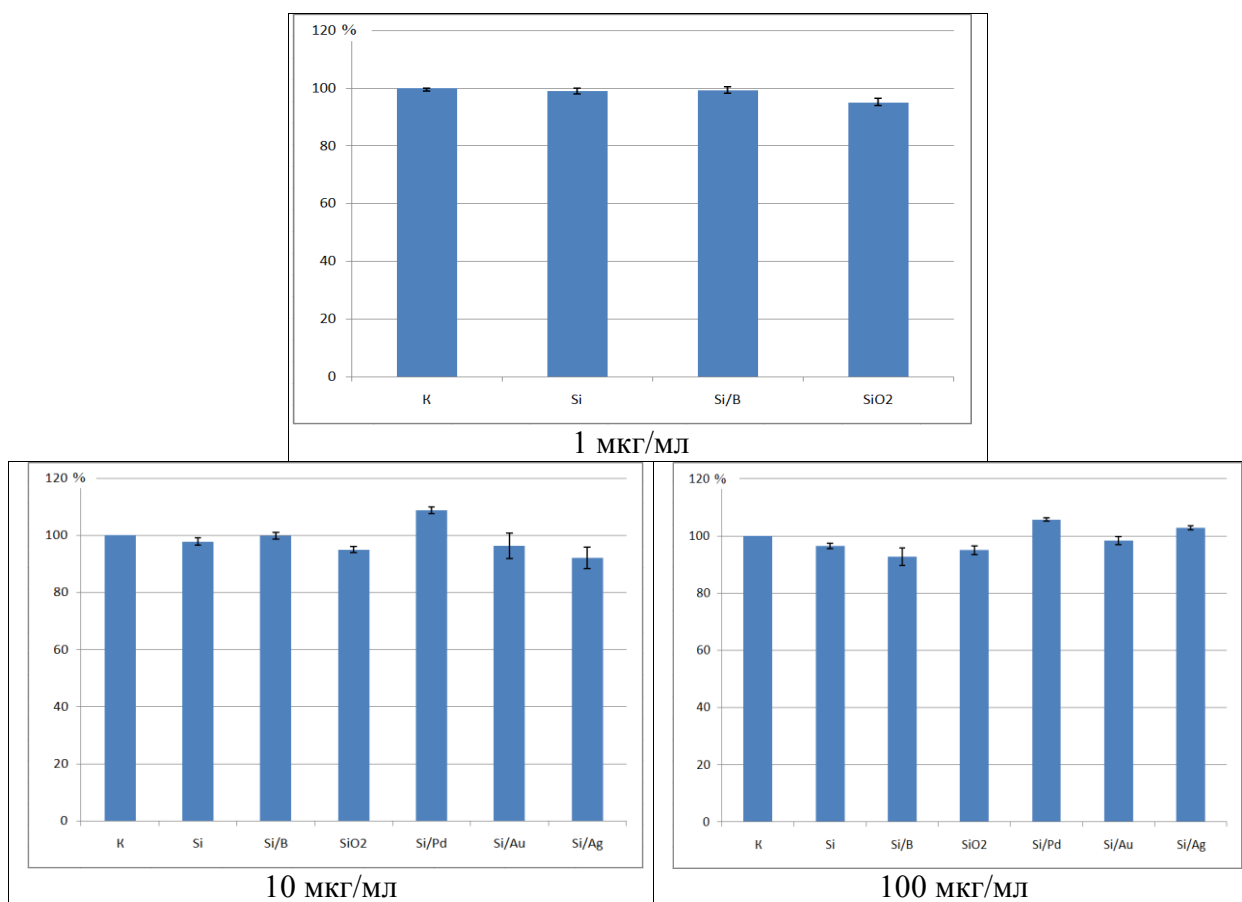


Рис. 4. Влияние кристаллических и модифицированных кристаллических наночастиц кремния на жизнеспособность мононуклеаров человека. Данные представлены как доля живых клеток, выраженная в процентах относительно контроля, контроль принят за 100 %. n=5.

При анализе путей клеточной гибели подсчитывали долю МНК в состоянии апоптоза ( $An^+/PI^-$ ), некроза ( $An^-/PI^+$ ) и в состоянии позднего апоптоза ( $An^+/PI^+$ ), данные представлены в таблице 4.

Таблица 4. Пути гибели моноклеаров при инкубации с наночастицами *in vitro*

Тип НЧ	Концентрация НЧ в среде	Апоптоз, % (An <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )	Некроз, % (An <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )	Поздний апоптоз, % (An <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )
Si	Без НЧ	3.3±0.3	1.1±0.3	7.4±1.1
	1 мкг/мл	3.6±0.7	1.6±0.3	8.8±1.1
	10 мкг/мл	3.7±0.4	2.5±1.0	7.7±1.1
	100 мкг/мл	3.9±0.7	1.9±0.8	9.3±1.2
Si/B	Без НЧ	5.5±1.6	1.3±0.4	5.5±0.9
	1 мкг/мл	6.2±1.8	1.0±0	5.8±0.6
	10 мкг/мл	5.7±1.4	0.7±0.3	6.0±1.1
	100 мкг/мл	7.2±2.8	2.5±0.8	9.0±0.6*
Si/Pd	Без НЧ	10.1±2.6	1.5±0.5	5.7±0.5
	10 мкг/мл	8.1±0.6	2.7±1.2	5.8±1.1
	100 мкг/мл	6.3±1.3	1.1±0.5	5.1±1.4
Si/Au	Без НЧ	6.7±2.4	6.5±2.9	7.4±2.3
	10 мкг/мл	8.8±5.8	11.5±3.7	9.3±2.3
	100 мкг/мл	8.1±1.5	6.2±2.4	7.2±1.9
Si/Ag	Без НЧ	7.1±0.7	3.2±0.7	4.9±0.6
	10 мкг/мл	8.2±1.9	6.0±1.4	10.3±3.3
	100 мкг/мл	5.8±1.2	1.9±1.0	5.3±1.7
SiO <sub>2</sub>	Без НЧ	6.4±0.6	11.6±0.7	Н.о.
	1 мкг/мл	6.8±0.3	10.1±0.3	Н.о.
	10 мкг/мл	7.1±0.2	10.7±0.2	Н.о.
	100 мкг/мл	9.5±0.6*	12.5±0.3	Н.о.

Данные представлены как  $M \pm m$ , \* $p < 0.05$  относительно контроля.  $n=5$ . Н.о. – не определяли.

В результате проведенного исследования не выявлено достоверных изменений в доле МНК в состоянии апоптоза, некроза и позднего апоптоза при взаимодействии с НЧ Si и Si/B во всех исследованных концентрациях. Аналогичное отсутствие эффекта было установлено для низких концентраций НЧ Si, модифицированных металлами. При повышении концентрации НЧ Si/Pd и Si/Ag снижалась доля клеток в состоянии раннего апоптоза. Среди путей клеточной гибели для НЧ Si, Si/B и Si/Pd преобладал ранний и поздний апоптоз. Некроз клеток после экспозиции с данными образцами был

незначительным. Для НЧ Si/Au и Si/Ag преобладания того или иного пути клеточной гибели не наблюдалось. НЧ SiO<sub>2</sub> не оказывали влияния на долю клеток в апоптозе. Во всех экспериментальных сериях процент клеток в состоянии некроза был минимальным.

Важное место в процессах взаимодействия НЧ с живыми клетками играет способность клеток к поглощению НЧ. Будучи захваченными клетками, НЧ могут взаимодействовать с клеточными органеллами, белками, нуклеиновыми кислотами; могут быть вовлечены в процессы внутриклеточной сигнализации, пролиферации [Bogunia-Kubic K., Sugisaka M. 2002; Lewinski N., Colvin V., Drezek R. 2008] и потенциально могут вызывать нарушения этих процессов [Shvedova A. et al., 2003; Nel A. et al., 2006; Jong W. H.D. 2008]. Однако не всегда поглощение НЧ клеткой непременно поведет за собой цитотоксический эффект. Например есть данные, что НЧ имели крайне низкую цитотоксичность в отношении МСК, не оказывали значительных эффектов на клеточную пролиферацию и синтез белка, но при этом поглощались клетками (преимущественно посредством фагоцитоза и пиноцитоза) [Huang X. et al., 2013; Torchilin V.P. 2007].

Так или иначе, о способности НЧ накапливаться тем или иным типом клеток важно знать и в случае, когда НЧ являются компонентом лекарственного средства, которое должно аккумулироваться целевой тканью, и в случае, когда НЧ должны как можно быстрее покинуть организм, если они, к примеру, используются как компонент косметического продукта. Для оценки проникновения/сорбции НЧ на клеточную мембрану использовался метод проточной цитометрии. Основанием для использования данного метода для оценки поглощения НЧ стала возможность разделения клеток крови на дотплоте по рассеянию лазерного света в зависимости от гранулярности цитоплазмы [Salzman G.C. 2001], т. е. при проникновении НЧ в клетку или их адсорбции на клеточную мембрану изменяется рассеивание света под углом 90<sup>0</sup> (боковое светорассеяние (SSC)). Но важно учитывать, что поглощение и адсорбция НЧ на мембране могут идти параллельно. Есть исследования полимерных НЧ, которые не только проникали внутрь, но и сорбировались на мембране клеток МСК и HeLa. Отмечено, что данные НЧ не были токсичны для этих клеток [Florez L. et al., 2012]. Существуют работы, где SSC используется для оценки таких физиологических параметров клеток как митоз, поглощение частиц, деконденсация спермы [Zucker R.M. et al., 1988; Nüsse M., et al 1989; Zucker R.M., Perrault S.D., Elstein K.H. 1992; Giaretti W., Nüsse M. 1994].

При проведении оценки светорассеяния МНК после инкубации с исследованными НЧ показано изменение светорассеяния в экспериментах с НЧ Si и Si/B (рис. 5).

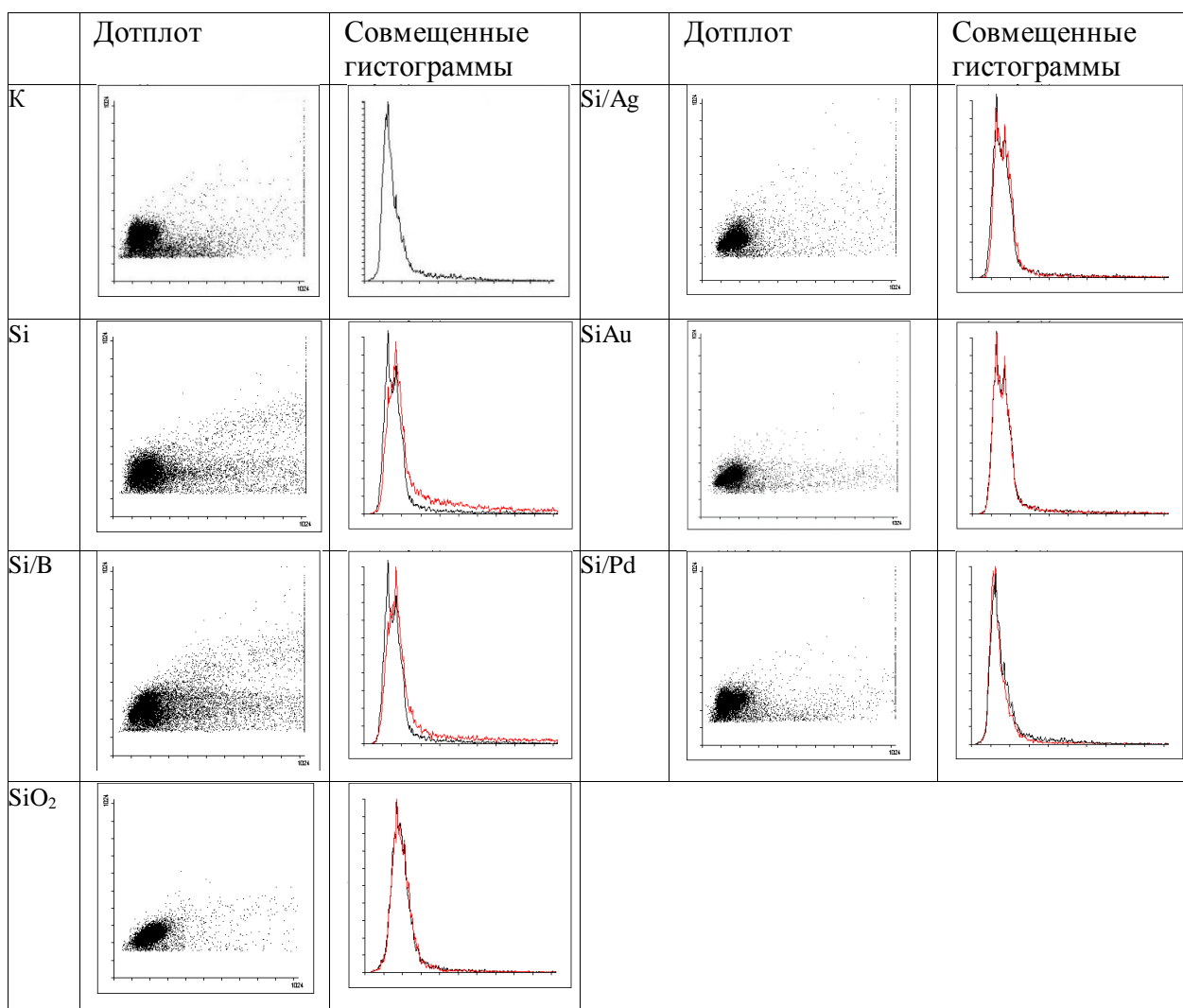


Рис. 5. Приведены гистограммы репрезентативных экспериментов. Представлено точечное распределение моноклеаров в двух осях (на дотплотах и гистограммах X – изменение светорассеяния света клеткой, Y – размер клеток) и наложенные друг на друга гистограммы контрольного и опытных образцов.

Как видно на рисунке 5, гистограммы опытных образцов НЧ, модифицированных металлами и НЧ SiO<sub>2</sub> практически полностью накладываются на гистограмму контрольного образца, что говорит о том, что добавление данных НЧ в среду культивирования не влияет на показатель клеточного светорассеяния.

Отсутствие явных цитотоксических нарушений структуры клеточного цитоскелета НЧ-ми Si при кратковременном воздействии не является неожиданным. В нанотоксикологии в настоящее время кремниевые НЧ считаются биосовместимыми материалами [Дурнев Д.А. и др., 2010; Lu et al., 2011]. Так, НЧ кристаллического кремния диаметром 2–5 нм не оказывали цитотоксического действия на раковые клетки Нер 2 в концентрации до 2,5 мг/мл [Осминкина Л.А. и др., 2011]. Однако есть сведения, что

раковые клетки более устойчивы к воздействию НЧ. В исследовании цитотоксического действия НЧ кремния в концентрации от  $10^{-3}$  до  $10^{-7}\%$  на фибробласты мыши L929 и раковые клетки HEP-2 было зафиксировано увеличение уровня гибели клеток обоих типов, но раковые клетки были менее чувствительны к токсическому действию НЧ [Искусных И.Ю. и др., 2012]. Следовательно, опухолевая трансформация клеток должна учитываться при сравнении данных по цитотоксичности НЧ, полученных в различных клеточных моделях. В работе [Demir E. et al., 2013] изучались НЧ  $\text{TiO}_2$  (2.3 нм),  $\text{ZrO}_2$  (6 нм),  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (16.7 нм). В качестве модели были использованы лимфоциты периферической крови человека и эмбриональные клетки HEK29. Использовались концентрации НЧ 1, 10 и 100 мкг/мл. НЧ  $\text{ZrO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  не оказывали цитотоксических эффектов на лимфоциты и эмбриональные клетки. Однако, НЧ  $\text{TiO}_2$  в концентрации 100 мкг/мл были токсичны для обоих типов клеток.

Существуют работы, посвященные влиянию кремниевых НЧ на В-лимфоциты, Т-клетки, моноциты и RAW макрофаги [Shahbazi M.A. et al., 2013], где исследованные НЧ были модифицированы термически (окисленные, карбонизированные и т. д.). Отрицательно заряженные гидрофильные и гидрофобные НЧ кремния вызывали меньшую потерю АТФ и меньший генотоксический эффект, чем положительно заряженные аминомодифицированные гидрофильные НЧ кремния. Авторы указывают на существенную роль поверхностного заряда в отношении к клеткам иммунной системы. Целостность клеточной мембраны и морфологические изменения клеток были вызваны НЧ кремния при концентрации 50 мкг/мл после 24 ч инкубации с клетками. Термически окисленные и карбонизированные НЧ не вызывали значительных морфологических изменений в В-лимфоцитах, в то время как другие исследованные НЧ вызывали появление пор и пузырьков на поверхности клеток. 3-аминопропилмодифицированные НЧ и модифицированные ундециленовой кислотой делали клетки менее округлыми, что можно считать маркером апоптоза. Самый высокий уровень продукции АФК в данной работе был зафиксирован в RAW макрофагах. Авторы предполагают, что продукция АФК может быть одним из основных факторов цитотоксичности кремниевых НЧ для данной клеточной линии (однако в настоящем исследовании не показано взаимосвязи между повышением уровня АФК и клеточной гибелью).

Будучи захваченными макрофагами, такие НЧ могут взаимодействовать с митохондриями, что может приводить к нарушениям в электронтранспортной цепи и изменениям митохондриального мембранного потенциала (что также наблюдалось в описанных в настоящей работе результатах). Предполагается, что наименьшая

биосовместимость положительно заряженных НЧ обусловлена их взаимодействием с отрицательно заряженной мембраной [Shahbazi M.A. et al., 2013]. Существует мнение, что поверхностный заряд может быть одним из тех свойств, которые определяют гемосовместимость НЧ [Подколотная О.А. 2012]. Нейтрализация катионного заряда поверхности частицы снижает ее гемотоксичность [Dobrovolskaia M.A. 2008]. Однако НЧ SiO<sub>2</sub> с аморфной морфологией несут отрицательный поверхностный заряд, формируемый силанольными группами, и при этом проявляют гемолитические свойства [Murashov V., Harper M., Demchuk E. 2006].

Есть данные, что НЧ SiO<sub>2</sub> диаметром 100 нм безопасны при концентрации до 30 мкг/мл. Однако, при дальнейшем увеличении концентрации проявляется цитотоксический эффект [Pigott G., Pinto P. 1983]. Возможно, НЧ SiO<sub>2</sub> индуцируют активацию каспаз и клеточную смерть через апоптоз, причем приводящие к апоптозу пути различны [Thibodeau M.S. et al., 2004; Fubini B., Hubbard A. 2003]. При исследовании НЧ SiO<sub>2</sub> было отмечено, что в содержащей сыворотку среде НЧ агрегировали и были токсичны лишь в концентрации в 5-10 раз превышающей токсичную концентрацию для безсывороточной среды [Fede C. et al., 2012].

В работе [Андреева Е.Р., Рудимов Е.Г., Горностаева А.Н. 2013] исследовалось влияние монтмориллонита, интеркалированного Ce<sup>+</sup> и монтмориллонита, интеркалированного Ag<sup>+</sup> на МНК человека. Все исследованные НЧ проявляли токсические свойства только при самой высокой концентрации (100 мкг/мл).

Стоит упомянуть, что в нашей работе НЧ Si/Au и Si/Ag вызывали небольшой токсический эффект в тесте на жизнеспособность при концентрации 10 мкг/мл, а не 100 мкг/мл, как следовало бы ожидать. Возможно, что в меньшей концентрации НЧ Si/Au и Si/Ag более токсичны потому, что при 100 мкг/мл они в большей мере подвержены агрегации, в результате которой снижается доля самостоятельных диффундирующих в среде НЧ.

### **3.1.2. Влияние наночастиц на внутриклеточные компартменты мононуклеаров и продукцию активных форм кислорода**

Для оценки функционального состояния МНК после инкубации с НЧ были использованы флуоресцентные зонды: CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Mito Tracker Red FM, Lyso Tracker Green. При анализе данных после инкубации клеток с НЧ мы обнаружили некоторые изменения средней интенсивности флуоресценции (СИФ) клеточных зондов, которые могут быть расценены как изменения клеточного состояния (рис. 6).

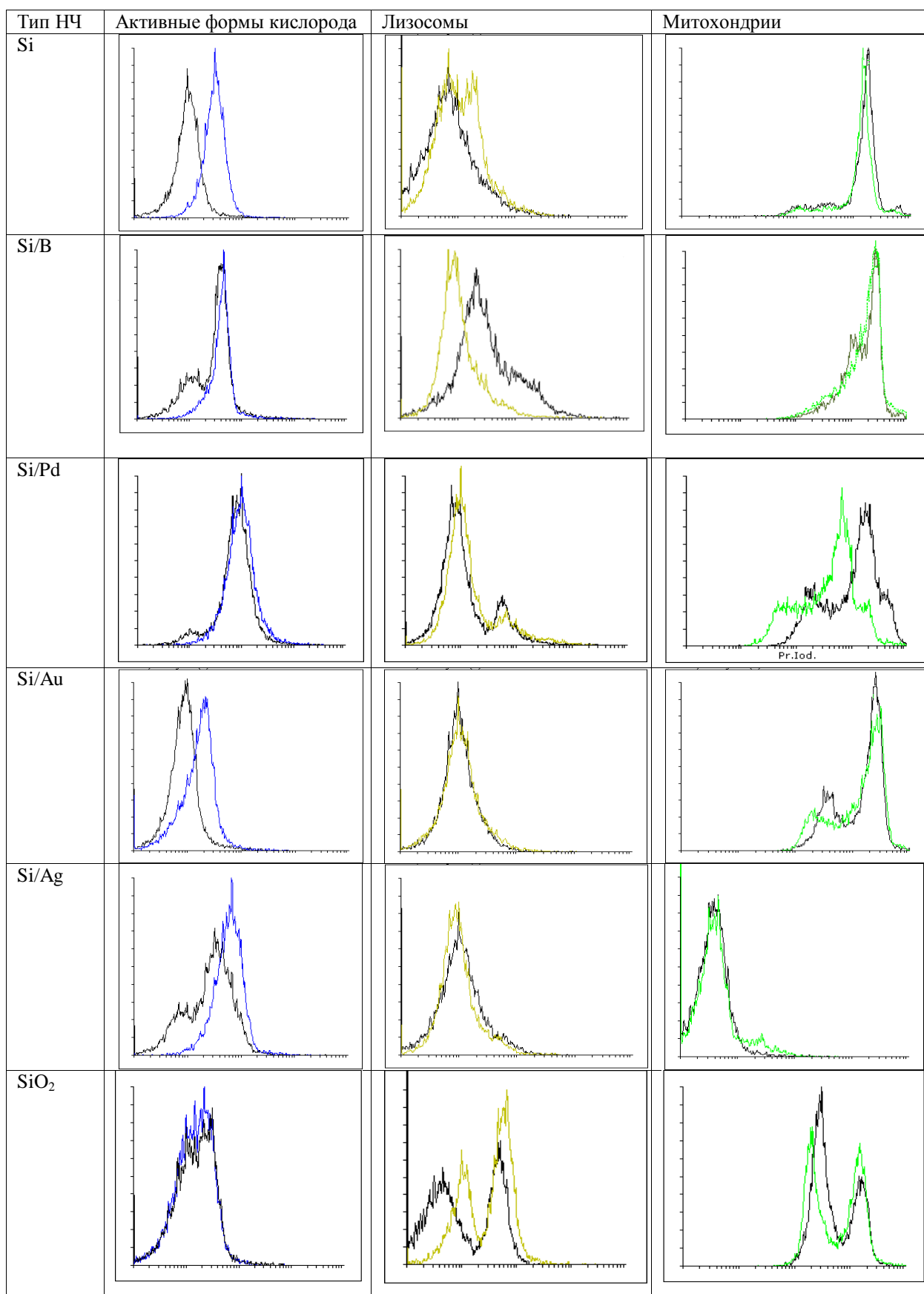


Рис. 6. Гистограммы распределения мононуклеаров, окрашенных зондами после инкубации с наночастицами (100 мкг/мл) 24 ч. Приведены репрезентативные гистограммы.



Наиболее заметный эффект был отмечен при анализе уровня АФК, который выражался в изменении средней интенсивности флуоресценции (СИФ) зонда CM-H<sub>2</sub>DCFDA.

Известно, что генерация АФК является одной из основных причин клеточной гибели [Green M., Hawman E. 2005; Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M., 2005; Lovrić J. et al., 2005], и существуют данные о том, что многие НЧ, проникая в клетку, индуцируют генерацию АФК. Это свойственно, например, CdTe QD [Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M. 2005], НЧ SiO<sub>2</sub> [Lin W. et al., 2006], углеродным наноматериалам [Halamoda K.B. et al., 2012; Moore M.N. et al., 2009], модифицированным кремниевым НЧ [Bhattacharjee S. et al., 2010]. Также показано, что кремниевые QD участвуют в генерации кислородных радикалов в водном растворе [Fujioka K. et al., 2008]. Это указывает на то, что механизм образования АФК, опосредованный влиянием НЧ, в живой клетке может быть не связан со сложными биохимическими преобразованиями. Имеются данные, что все полупроводниковые наноматериалы (к ним относится и кремний) способны действовать как фотокатализаторы, что приводит к реакции с кислородом на поверхности НЧ, продуктом которой являются АФК [O'Farrell N., Houlton A., Hogrocks B.R. 2006]. Однако, исследованные нами НЧ Si и его модификации в указанных концентрациях хотя и вызывали повышение количества АФК, тем не менее, не оказывали цитотоксического действия на МНК (рис. 4). Стоит отметить, что повышенный уровень АФК был обнаружен при скрининге всех типов НЧ Si (рис. 6, 7).

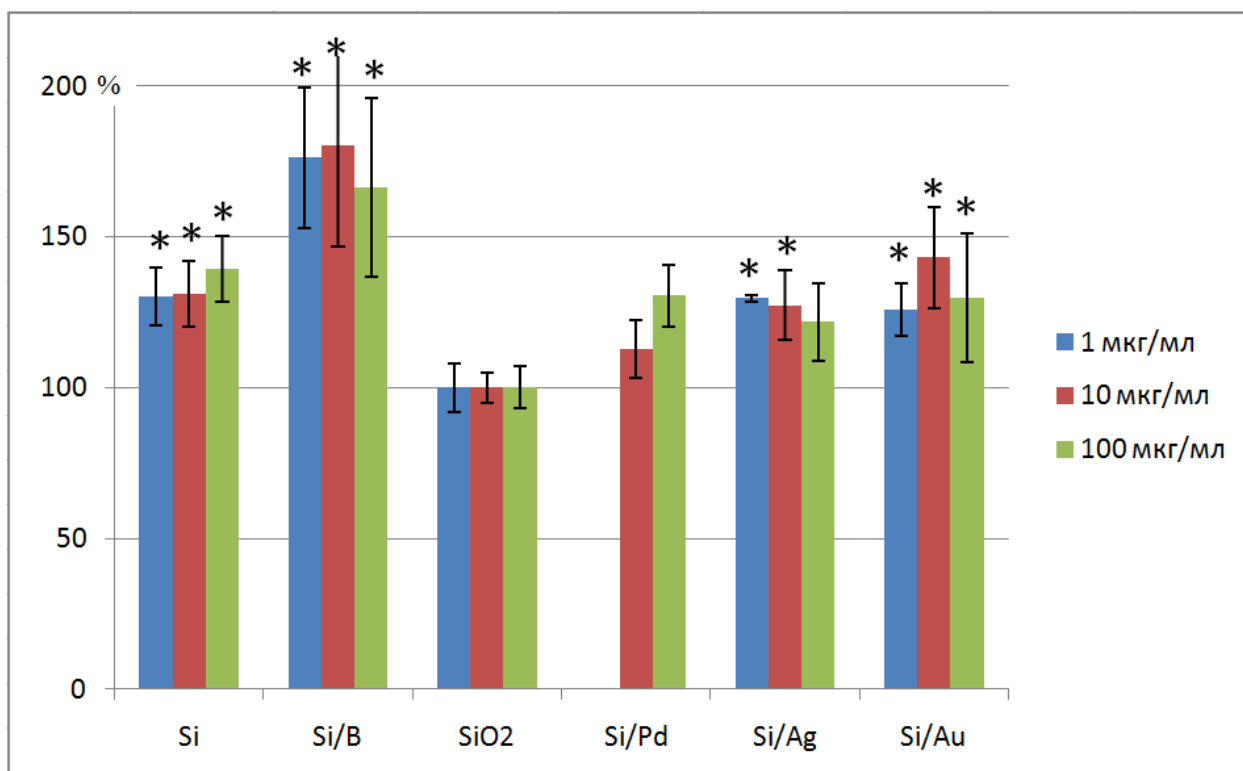


Рис. 7. Средняя интенсивность флуоресценции  $H_2DCFDA$  при инкубации мононуклеаров с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=5$ . СИФ зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%, \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Причем в случае модифицированных золотом и серебром НЧ при концентрации 10 мкг/мл уровень АФК был выше, чем при 100 мкг/мл, что может объяснять некоторое снижение доли живых лимфоцитов, описанное выше. Однако при этом стоит учесть, что данный уровень АФК был ниже, чем в экспериментах с НЧ Si/B, которые не оказывали влияния на жизнеспособность клеток.

Анализ цитотоксичности других НЧ показал, что НЧ серебра диаметром 5-20 нм способны оказывать значимое снижение жизнеспособности лимфоцитов человека в концентрации 10-100 мкг/мл уже через 24 ч после инкубации клеток с НЧ. В случае увеличения продолжительности воздействия НЧ на лимфоциты было отмечено еще большее снижение жизнеспособности. Также было выявлено дозозависимое увеличение генерации АФК. При концентрации 10, 20, 50, 75 и 100 мкг/мл и времени инкубации 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч обнаружено достоверное увеличение уровня АФК во всех образцах при инкубации с НЧ в течение 2-6 ч, а также 24 ч для образцов, обработанных НЧ серебра в концентрации 10 и 20 мкг/мл. При 50-100 мкг/мл НЧ после 24 ч инкубации наблюдалось некоторое уменьшение интенсивности флуоресценции зонда, что, как предполагают

авторы, может быть связано с гибелью клеток и уменьшением их общего числа в культуре. Также данные НЧ способны активировать перекисное окисление липидов в клетках при инкубации в течение 4 и более часов, в результате чего топография поверхности мембраны лимфоцитов значительно менялась [Жорник Е.В. и др., 2014].

Поскольку при определении цитотоксичности НЧ скрининг на жизнеспособность клеток *in vitro* является простым и удобным тестом, в нем используются различные клеточные культуры. В работе [Ahamed M. 2013] изучалось действие НЧ SiO<sub>2</sub> диаметром 15 нм на эпителиальные клетки человека A431 и клетки легочного эпителия человека A549. НЧ использовали в концентрации 25-200 мкг/мл. МТТ-тест показал снижение клеточной жизнеспособности в прямой зависимости от увеличения дозы НЧ вплоть до 49% для клеток A431 и до 45% для клеток A549. Выход лактатдегидрогеназы для клеток A431 повышался до 208%, а для клеток A549 - до 223%. Также по мере увеличения концентрации НЧ SiO<sub>2</sub> в клетках увеличивалась продукция АФК, причем по мере роста уровня АФК снижалась жизнеспособность клеток обоих типов (в то время как повышение АФК под воздействием изученных НЧ не влияло на жизнеспособность). По мере увеличения концентрации НЧ увеличивался уровень экспрессии генов каспазы-3 и каспазы-9 в клетках обоих типов, что свидетельствует о запуске процесса апоптоза.

Ряд авторов полагает, что генерация АФК и окислительный стресс могут быть использованы как одни из основных параметров при оценке цитотоксичности различных НЧ [Xia T. et al., 2006]. Несмотря на то, что не все НЧ обладают теми поверхностными свойствами, которые позволяют генерировать АФК в клетке напрямую, взаимодействие НЧ с клеточными органеллами может приводить к образованию АФК [Xia T. et al., 2006]. Это может быть причиной токсического эффекта, если уровень продукции АФК превосходит антиоксидантную защиту или запускается механизм апоптоза, в который вовлечены митохондрии.

Митохондрии играют центральную роль в энергетическом метаболизме и реагируют даже на небольшие воздействия различных факторов, что может индуцировать гибель клетки по различным сценариям [Hansen J.M., Go Y-M., Jones D.P., 2006]. При экспонировании клеток с НЧ, которые способны индуцировать генерацию АФК, митохондрии реагируют одними из первых [Maysinger D., 2006]. Для оценки состояния митохондрий в данной работе мы анализировали изменения трансмембранного потенциала с использованием зонда Mito Tracker red FM. Данные представлены на рисунке 6, 8.

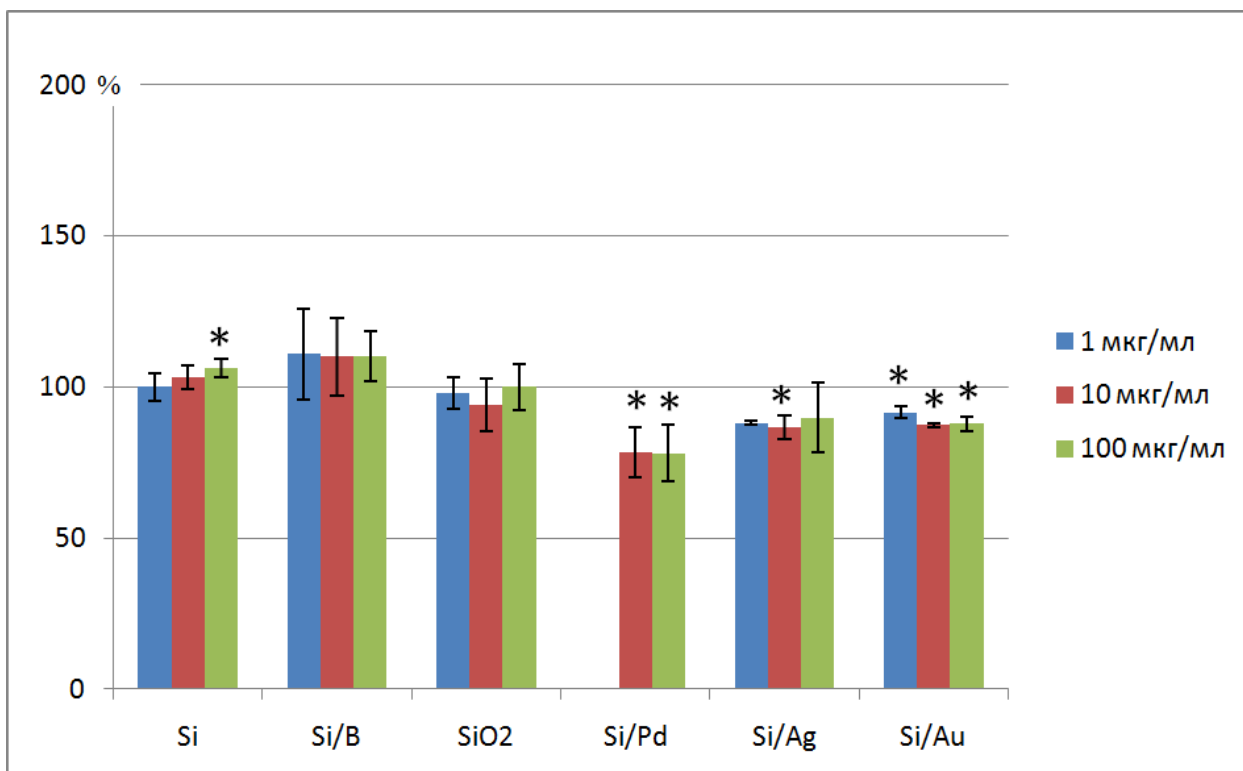


Рис. 8. Средняя интенсивность флуоресценции Mito Tracker при инкубации мононуклеаров с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . Средняя интенсивность флуоресценции зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%, \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Активные митохондрии были выявлены в 100% МНК независимо от наличия и концентрации НЧ. СИФ, характеризующая трансмембранный потенциал митохондрий, не изменялась в экспериментах с Si, повышалась при использовании Si/B и понижалась в экспериментах с НЧ, модифицированными благородными металлами: Si/Pd, Si/Au и Si/Ag. НЧ SiO<sub>2</sub> не оказывали влияния на трансмембранный потенциал митохондрий в МНК (рис. 8).

В работе [Fujoka K. et al., 2011] были использованы НЧ кремния, синтезированные газофазным методом, которые практически не изменяли активность митохондрий в концентрации до 1000 мкг/мл в эксперименте с клетками WS 1 (клетки кожи человека) и A 549 (карцинома легких человека). Авторы предполагают, что это связано с отсутствием модификации поверхности НЧ. Как и в наших экспериментах с НЧ Si/Au и Si/Ag (где было выявлено снижение СИФ Mito Tracker Red, что свидетельствует о снижении трансмембранного потенциала митохондрий), при взаимодействии НЧ серебра диаметром 15 нм с иммортализованными клетками линии C18-4 другие исследователи отмечали значительное снижение митохондриального потенциала и нарушение целостности клеточных мембран [Braydich-Stolle L. et al., 2005]. Кроме того,

серебряные НЧ диаметром 6-20 нм провоцировали снижение уровня метаболизма в раковых клетках U251 и фибробластах AMR-90, которое авторы ассоциировали с ослаблением митохондриальной активности и повышением АФК [Asharani P.V. et al., 2009].

Лизосомы аккумулируют более шестидесяти ферментов, разрушающих внутриклеточные патогены, поврежденные органеллы и белки путем аутофагии [Klionsky D.J., 2007] и способны также аккумулировать токсичные металлы и органические вещества, вызывающие окислительный стресс и повреждение самих лизосом [Moore M.N., 1990; Moore M.N., et al., 2004]. Наибольшее число путей поглощения наноматериалов клеткой связано с данными органеллами, тем самым, представляя лизосомальный компартмент наиболее вероятным внутриклеточным сайтом депонирования и деградации наноматериалов [Stern S.T., Adiseshaiah P.P., Crist R.M., 2012].

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что инкубация с НЧ Si, Si/B и Si/Au приводила к снижению активности лизосом, о чем свидетельствовало уменьшение СИФ Lyso Tracker Green DND 26. НЧ Si/Pd и Si/Ag не влияли на лизосомальный компартмент МНК. НЧ SiO<sub>2</sub> в концентрации 100 мкг/мл увеличивали активность лизосом (рис. 6, 9).

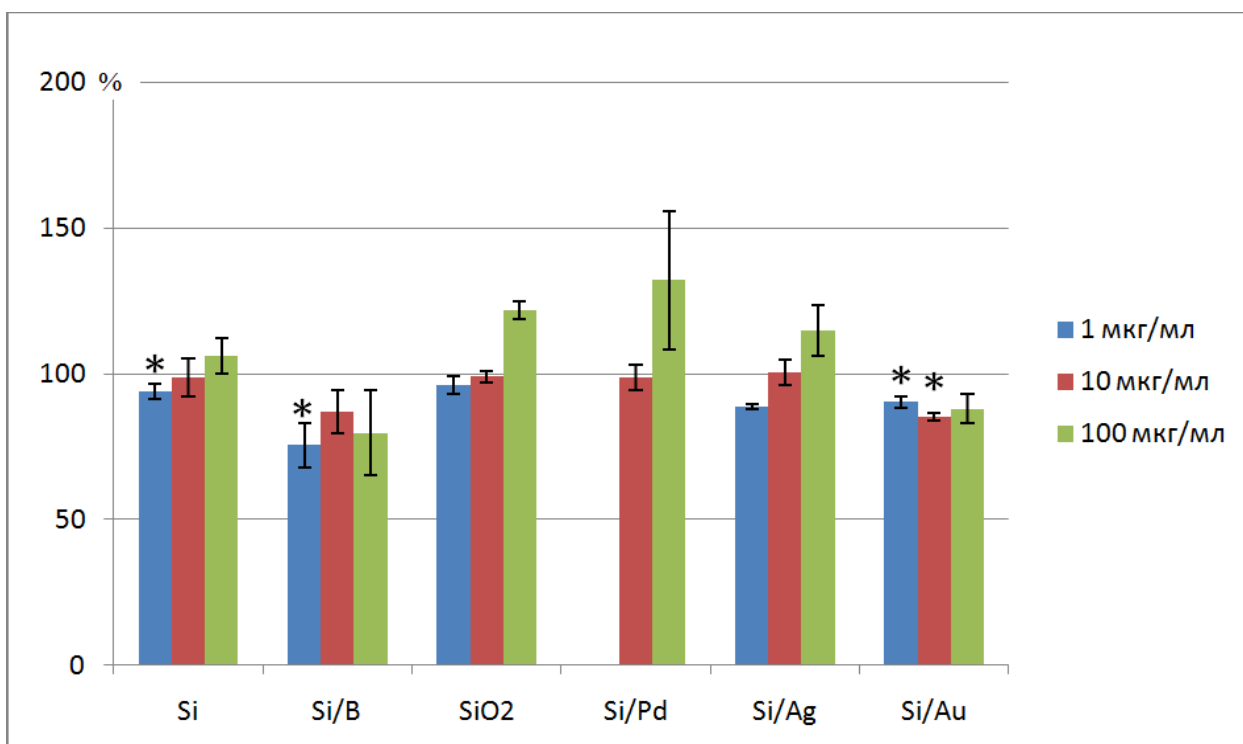


Рис. 9. Средняя интенсивность флуоресценции Lyso Tracker при инкубации мононуклеаров с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . Средняя интенсивность флуоресценции зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%. \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Недавние исследования подтверждают, что некоторые наноматериалы способны индуцировать процесс аутофагии и повреждать лизосомальную мембрану [Stern S.T., Adisheshaiah P.P., Crist R.M. 2012], а активация лизосом способна повышать окислительный стресс [Halamoda K.V. et al., 2012]. В данной работе подобный эффект наблюдался в экспериментах с НЧ Si/Pd в максимальной концентрации (было показано одновременное повышение уровня АФК и СИФ специфичного лизосомального зонда). Хотя изменения лизосомальной проницаемости часто рассматриваются как фактор, приводящий к некрозу, есть данные, что потеря лизосомальной целостности ассоциирована с потерей мембранного потенциала митохондрий [Sohaebuddin S.K. et al., 2010; Xia T. et al., 2008] и способна приводить к апоптозу [Thibodeau M.S. et al., 2004]. Так, НЧ оксида кремния были способны вызывать апоптоз клеток линии МН-S, одной из причин активации которого является активность лизосомальных ферментов [Thibodeau M.S. et al., 2004]. Тем не менее, в настоящей работе не выявлено связи между состоянием лизосомального компартмента (рис. 9) и жизнеспособностью МНК (рис. 4). Существуют работы, в которых показана возможность доставки НЧ внутрь клетки через эндолизосомальные пути фагоцитоза [Panyam J. et al., 2002; Li W. et al., 2011], а отдельные НЧ способны не только быстро проникать в лизосомы, но и оставаться там, как минимум, в течение недели [Baltazar G.C. et al., 2012]. Потеря лизосомальной целостности может быть ассоциирована с потерей мембранного потенциала митохондрий [Xia T. et al., 2008; Sohaebuddin S.K. et al., 2010] и способна приводить к апоптозу [Thibodeau M.S. et al., 2004]. Однако в нашем исследовании, несмотря на выявленное совместное снижение активности лизосом и митохондрий после инкубации лимфоцитов с НЧ Si/Au, это не привело к индукции клеточной гибели при концентрации 100 мкг/мл, но данный эффект проявлялся при концентрации 10 мкг/мл.

Таким образом, в нашей работе показано, что НЧ на основе кремния нетоксичны для МНК, о чем свидетельствует отсутствие значительных изменений в жизнеспособности и соотношении апоптотических и некротических клеток после 24 часовой инкубации. Однако, будучи интеркалированными атомами бора, палладия, золота и серебра, данные наноматериалы способны вызывать изменения митохондрий и лизосомального компартмента. Модификация бором приводила к снижению активности лизосом и повышению трансмембранного потенциала митохондрий. Модификация палладием, золотом и серебром напротив, вызывала понижение трансмембранного потенциала митохондрий, модификация золотом приводила также к снижению активности лизосом. При этом все исследованные НЧ на кремниевой основе повышали количество АФК в

клетках. Полученные результаты указывают на то, что модификация кремниевых НЧ атомами других химических элементов способна изменять степень их цитотоксичности в отношении различных клеточных параметров, что может быть выявлено в системе *in vitro*.

Для всех исследованных НЧ Si не обнаружено зависимости между повышением уровня АФК и изменениями митохондрий и лизосом. Можно предположить, что НЧ влияют на митохондриальный и лизосомальный компартменты посредством механизмов, в которые вовлечены не только АФК.

### **3.1.3. Активация лимфоцитов и продукция интерлейкинов**

Независимо от пути, по которому НЧ могут попасть в организм человека (например, при нанесении на кожу или инъекциях в ткань или кровь), первая клеточная система, которая будет взаимодействовать с этими частицами – это система тканей внутренней среды и иммунокомпетентные клетки. При этом важное значение имеет не только оценка их влияния на жизнеспособность этих клеток, но и изучение их активации при взаимодействии с НЧ.

При активации в популяции лимфоцитов наблюдается увеличение доли клеток, несущих на своей мембране определенные антигены, являющиеся маркерами процесса активации. В данной работе выявляли такие маркеры как CD25 – рецептор IL-2 (маркер ранней активации) и HLA-DR - антиген главного комплекса гистосовместимости II класса (маркер поздней активации).

В результате проведения экспериментов на неактивированных МНК после 72 ч экспозиции с НЧ, как правило, выявлялось увеличение доли CD25+ клеток, а увеличение доли МНК, несущих маркер активации HLA-DR, показано только для НЧ Si/Ag и Si/Au, в то время как в экспериментах с НЧ Si и Si/B доля таких клеток снижалась (рис. 10). Важно отметить, что увеличение экспрессии HLA-DR в экспериментах с НЧ Si/Ag и Si/Au на нестимулированных МНК коррелировало с увеличением продукции провоспалительных цитокинов (рис. 12).

Стимуляция ФГА (фитогемагглютинин) в течение 72 часов достоверно повышала экспрессию маркеров активации CD3/CD25+ - в 10 раз, CD3/HLA-DR – в 2 раза. В экспериментах на ФГА-активированных МНК модифицированные серебром и золотом НЧ практически не оказывали дополнительного влияния на изменение доли CD25+ клеток на фоне ФГА-активации (рис. 11). Экспрессию HLA-DR на активированных МНК НЧ Si и Si/B даже несколько снижали (однако данный эффект не являлся достоверным). Одновременная инкубация МНК с ФГА и НЧ не выявила достоверных отличий в спектре

и количестве интерлейкинов в кондиционированной среде по сравнению с активированными МНК (за исключением TNF- $\alpha$ , который достоверно повышался при использовании НЧ Si/Ag) (рис. 13).

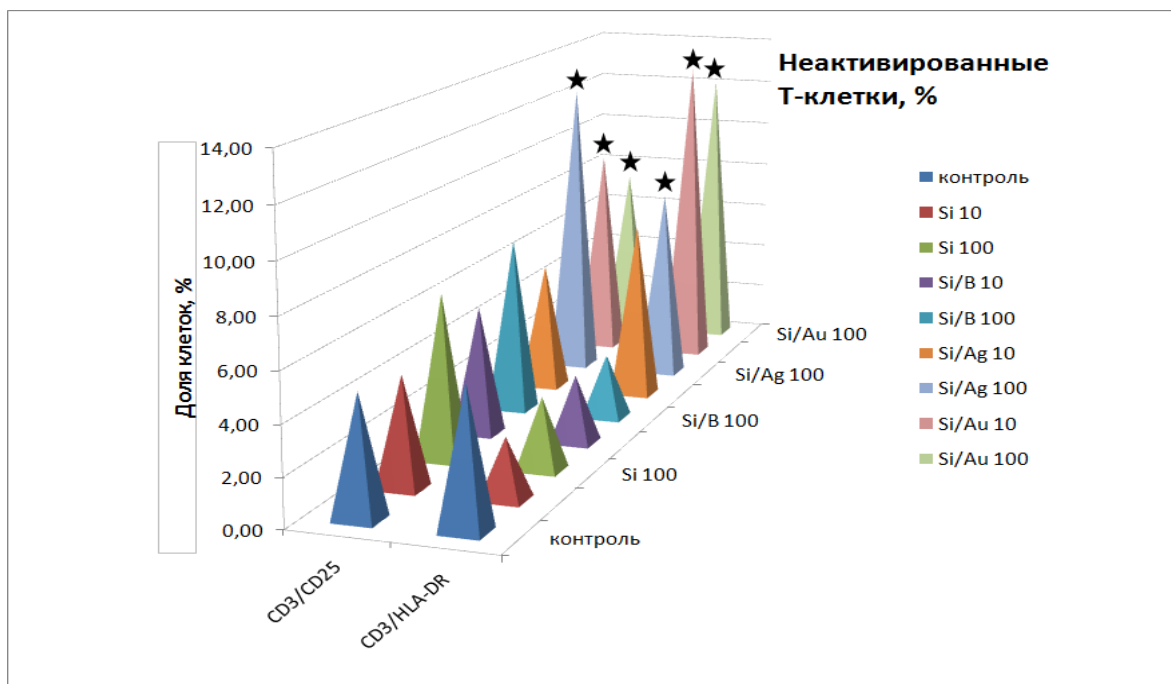


Рис. 10. Экспрессия маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации на Т-клетках после экспозиции с наночастицами *in vitro*. \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц. Данные представлены как доля клеток, несущих соответствующий антиген ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ).

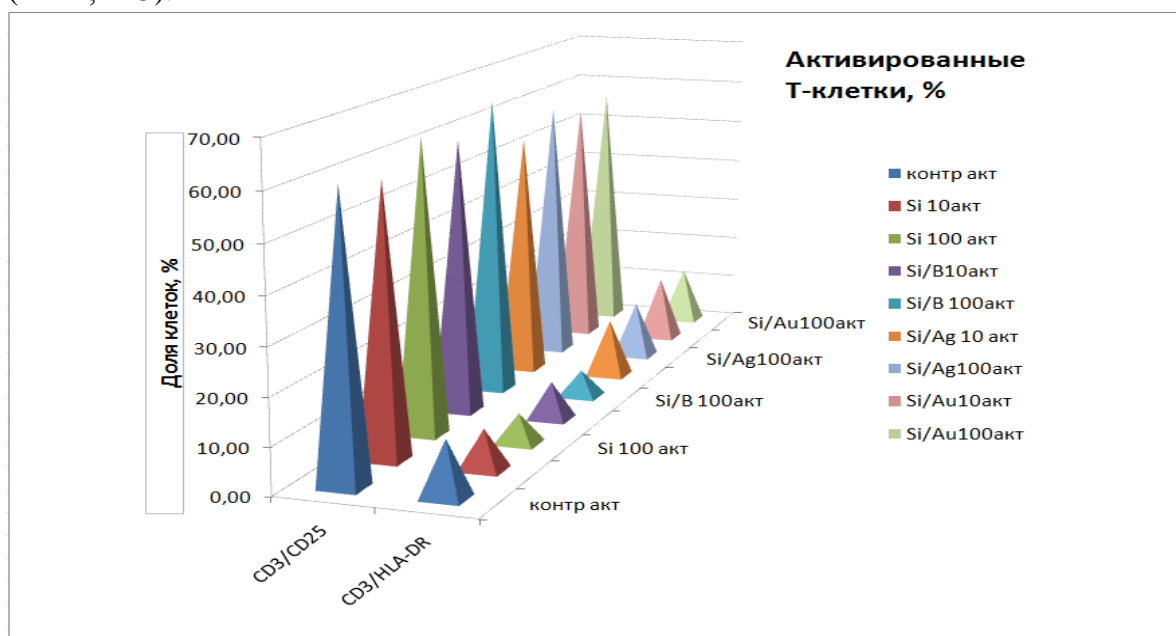


Рис. 11. Влияние наночастиц на экспрессию маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации на ФГА-стимулированных Т-клетках. Данные представлены как доля клеток, несущих соответствующий антиген ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ).



Одним из важных показателей активации иммунокомпетентных клеток после 72 ч инкубации с НЧ (10 мкг/мл и 100 мкг/мл) является продукция интерлейкинов. В образцах кондиционированной среды проведено одновременное измерение уровня 10 цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (IL – интерлейкин, INF – интерферон, TNF – фактор некроза опухоли) после взаимодействия НЧ с МНК. Удалось детектировать IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, содержание других интерлейкинов было ниже уровня чувствительности данного метода.

После экспозиции с НЧ Si/Ag и Si/Au было показано увеличение продукции IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-10 неактивированными мононуклеарами периферической крови человека (рис. 12). Добавление в среду НЧ Si/Ag к нестимулированным МНК приводило к выраженному увеличению продукции цитокинов: IFN- $\gamma$  - в 1,7 раза, IL-1 $\beta$  - в 9,4 раза, TNF- $\alpha$  - в 4,3 раза, IL-6 - в 198,4 раза, IL-10 - в 21,1 раза. Для НЧ Si/Au (нестимулированные МНК) IFN- $\gamma$  - в 7,1 раза, IL-1 $\beta$  - в 14,9 раза, TNF- $\alpha$  - в 10,4 раза, IL-6 в - 289,8 раза, IL-10 - в 29 раз.

В целом можно заключить, что НЧ кремния оказывают провоспалительное влияние на неактивированные МНК. Причем продукция IL-6 достоверно превышает уровни остальных интерлейкинов приблизительно в 10 раз при инкубации неактивированных МНК с НЧ Si/Ag и Si/Au.

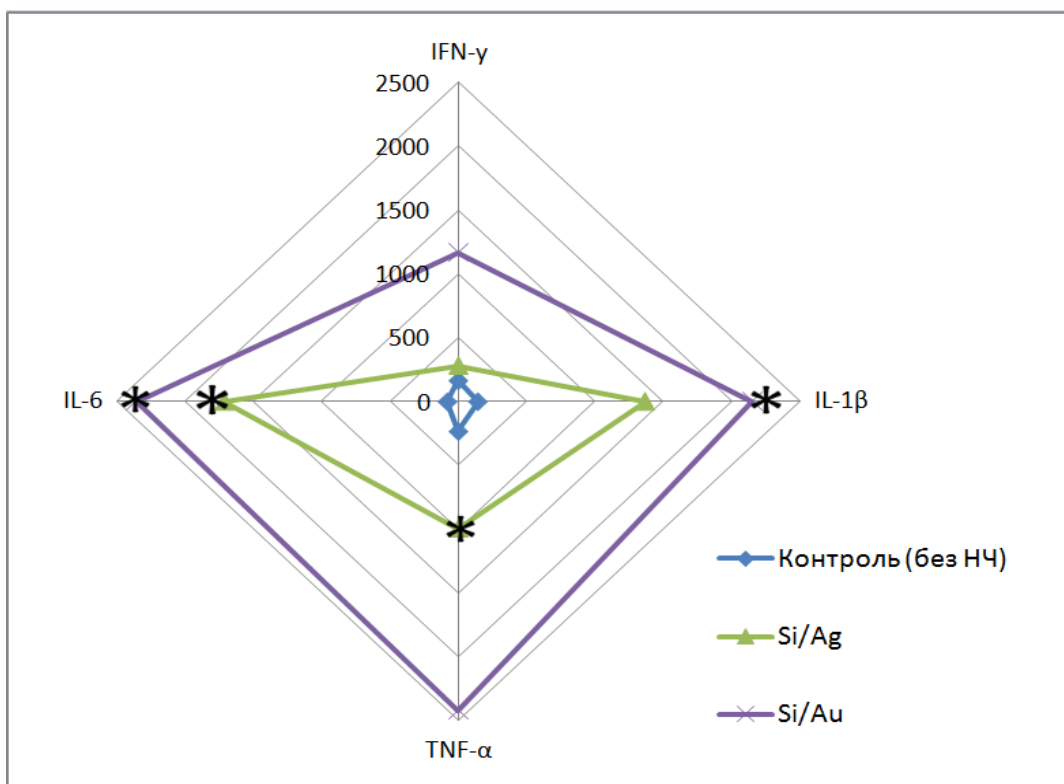


Рис. 12. Продукция интерлейкинов (пкг/мл) при инкубации Т-клеток с наночастицами кремния, модифицированными благородными металлами (100 мкг/мл). Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

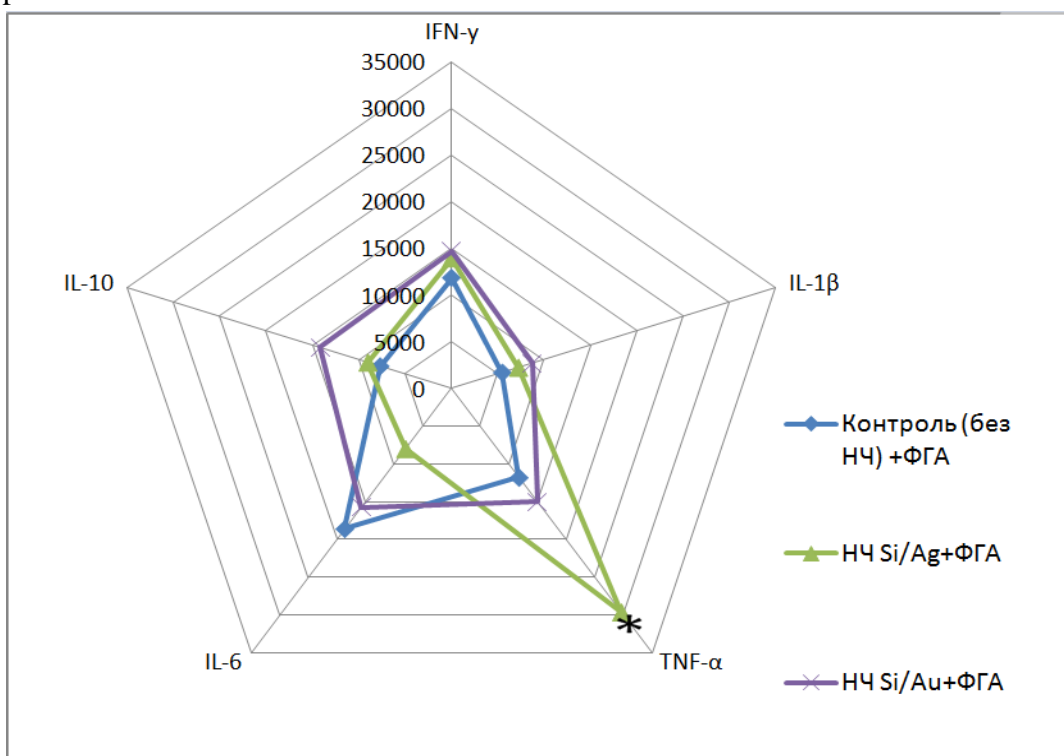


Рис. 13. Продукция интерлейкинов (пкг/мл) при инкубации активированных ФГА Т-клеток с наночастицами (100 мкг/мл). Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Сравнение полученных нами данных с результатами других работ показывает, что аналогичное повышение уровня активации лейкоцитов показано при их инкубации с золотыми НЧ диаметром 60 нм в концентрации до  $0,035 \times 10^{-11}$ . Активация клеток сопровождалась выбросом содержимого из вторичных и азурофильных гранул, что приводило к образованию АФК. Предполагается, что активация могла происходить в результате изменения поверхностного мембранного потенциала клеток [Arvizo R.R. et al., 2010]. В то же время монокристаллические НЧ оксида железа диаметром 4 нм не влияли на функции Т-клеток, а именно жизнеспособность, пролиферацию, синтез интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, не изменяли экспрессию CD-25 и CD-69 на поверхности клеток [Sundstrom J.B., 2004]. Эксперименты *in vivo* показали, что внутримышечное введение НЧ Cu, Fe и Fe-Co мышам вызывало увеличение уровня лейкоцитов в крови в 1.5 раза через 1 сутки и 7 суток инкубации [Янушева Е.В. Мирошников С.А., Кван О.В. 2013], что свидетельствует об активации иммунной системы в ответ на попадание НЧ в организм. Исследование влияния НЧ SiO<sub>2</sub> диаметром 9 нм на нейтрофилы периферической крови (3 ч инкубации в концентрации до  $10.08 \times 10^{13}$  частиц/мл) показало усиление протекающих в клетках метаболических процессов с последующей активацией функциональной активности с истощением бактерицидного потенциала, после чего клетки погибали по некротическому пути, но также не исключен путь апоптоза [Колбин И.А., Колесников О.Л. 2011].

В настоящее время существует гипотеза о взаимодействии НЧ с поверхностью клетки, которая предполагает, что начальным этапом воздействия НЧ на клетку является окислительный стресс, который приводит к включению сигнального каскада с участием генов-регуляторов воспалительных реакций. В результате стресса происходит выброс медиаторов воспалительных реакций, таких как цитокины, включая хемокины и интерлейкины [Жорник Е.В. и др., 2009]. Это подтверждается нашими экспериментальными данными и экспериментами, в которых показано, что обработка лимфоцитов многостенными углеродными нанотрубками в дозе 100 мкг/мл вызывала увеличение уровня экспрессии генов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 в лимфоцитах человека [Жорник Е.В. и др., 2009].

В исследованиях с использованием клеток BEAS 2B кристаллический кремний повышал уровень IL-6, IL-8, IL-12(p70), причем аморфный кремний не показывал таких эффектов [Perkins T.N. et al., 2012]. НЧ SiO<sub>2</sub> и кристаллического кремния вызывали апоптоз дендритных клеток мышей и существенно увеличивали уровень продукции IL-1 $\beta$  [Winter M. et al., 2011].

Ионы переходных металлов (к ним в том числе относятся серебро и золото) способны индуцировать окислительный стресс, что возможно, влечет за собой продукцию TNF- $\alpha$ , который в свою очередь активирует продукцию белков, участвующих в передаче воспалительного сигнала (в том числе IL-1 $\beta$  и IL-8), что может индуцировать апоптоз [Жорник Е.В. и др., 2009]. В наших исследованиях не выявлено увеличения апоптотических иммунных клеток в экспериментах с НЧ Si/Pd, Si/Ag и Si/Au (таблица 4), но НЧ Si/Ag и Si/Au несколько снижали жизнеспособность МСК (рис. 15) за счет увеличения некроза. Повышение уровня провоспалительных цитокинов под воздействием кристаллического кремния не нанометрового, а микро диапазона [Percins T.N. 2012; Serda R.E. et al., 2009] свидетельствует в пользу того, что в данном процессе не играют роли какие-либо специфические свойства, присущие исключительно нанообъектам. Более того, повышение уровня провоспалительных цитокинов происходит под воздействием наноматериалов различной химической природы и формы (а следовательно, такие наноматериалы сильно отличаются между собой по своим «нано» свойствам, таким как каталитическая активность, поверхностный заряд, проводимость и т.п.). Однако сложно утверждать, что продукция провоспалительных интерлейкинов происходит как следствие увеличения уровня внутриклеточных АФК, хотя эффект повышения уровня последних также показан для НЧ различной природы, в том числе и для исследованных нами (рис. 7), так как в нашем исследовании максимальное увеличение уровня АФК при инкубации МНК с НЧ наблюдалось в экспериментах с SiV и было несколько выше, чем в опытах с НЧ, модифицированными золотом и серебром (рис. 7), в то время как продукции провоспалительных цитокинов для данных НЧ Si/V в наших экспериментах не наблюдалось (рис. 12).

Таким образом, приведенные данные указывают на то, что НЧ при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками могут вызывать их активацию, выраженность которой меньше по сравнению с классическими митогенными активаторами, такими как ФГА. При совместном действии НЧ и ФГА аддитивных реакций не наблюдается. Степень активации зависит от типа НЧ и их модификации.

### **3.2 Влияние наночастиц на мезенхимальные стромальные клетки человека**

Для оценки влияния НЧ на МСК человека использовали клетки от четырех различных доноров 3-8 пассажей. Клетки высевали в чашки диаметром 60 мм в количестве 3 000 кл/см<sup>2</sup>. В течение 5-7 суток клетки достигали состояния монослоя, после этого в чашках производили замену среды на среду, содержащую НЧ. Установлено, что

через 24 ч после культивирования со всеми исследованными НЧ кремния клеточная морфология не изменялась (рис. 14).

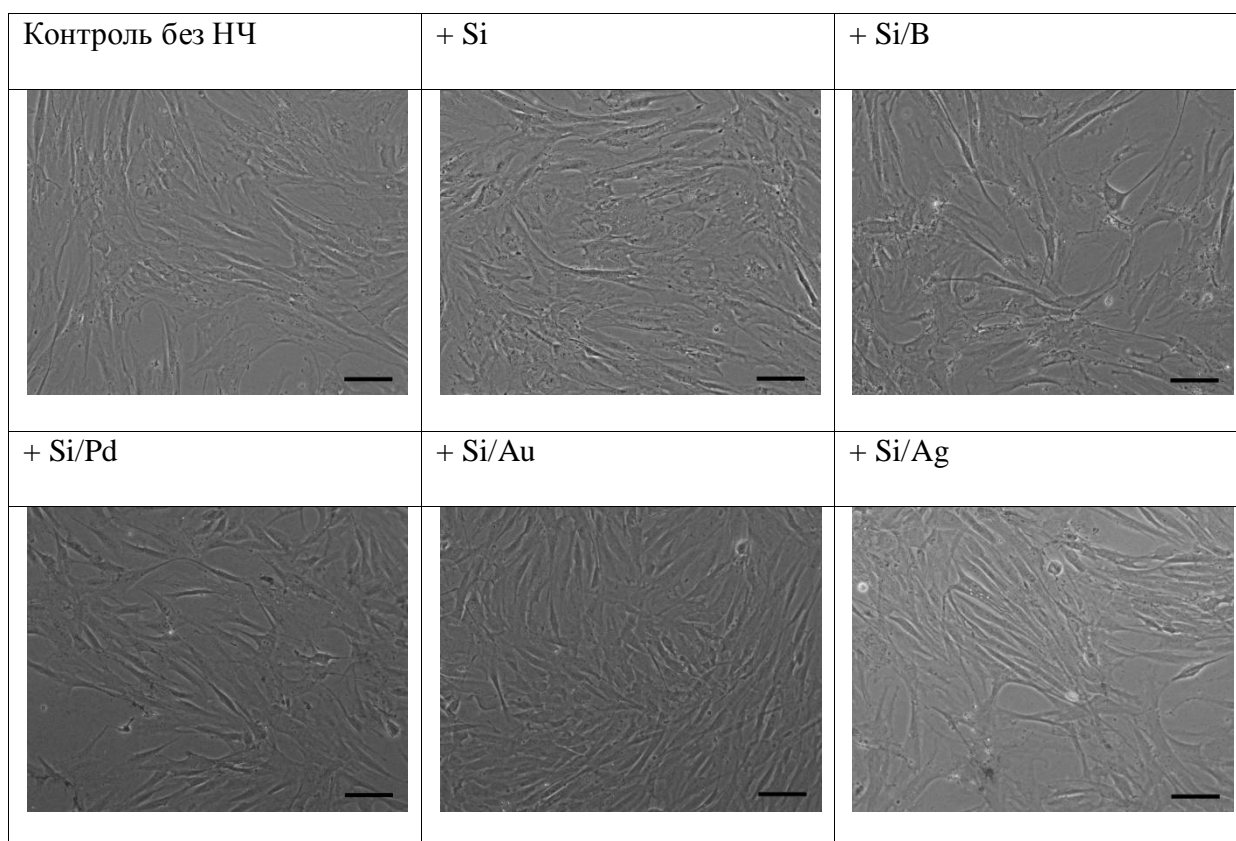


Рис. 14. МСК человека после культивирования с наночастицами в концентрации 100 мкг/мл (микрофотографии реперзентативного эксперимента). Фазовый контраст. Увеличение объектива 10х. Масштабный отрезок 100 мкм.

### 3.2.1 Жизнеспособность, состояние органелл и содержание активных форм кислорода в мезенхимальных стромальных клетках при инкубации с наночастицами

Для оценки жизнеспособности МСК человека использовали тесты Annexin/PI и МТТ-тест. Проведение экспериментов по оценке влияния НЧ на жизнеспособность МСК было начато с исследования НЧ SiO<sub>2</sub>, так как они состоят из природного вещества - оксида кремния. В результате при помощи МТТ-теста было показано, что НЧ SiO<sub>2</sub> снижали долю жизнеспособных клеток лишь при концентрации 100 мкг/мл (рис. 15). Процент живых клеток при этом был достаточно высоким (78%) от контроля.

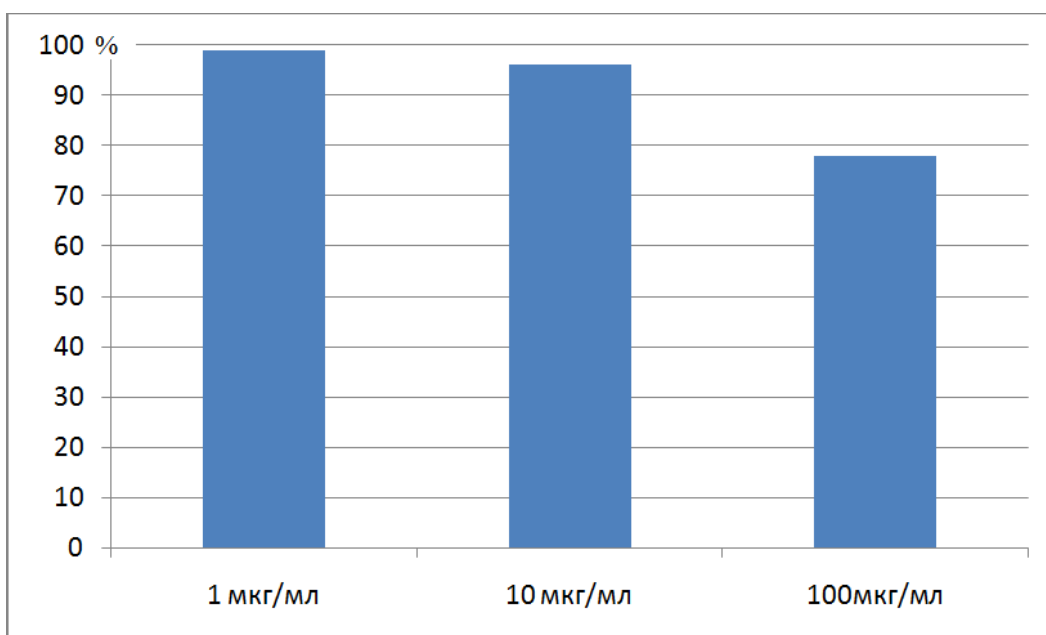


Рис. 15. Жизнеспособность МСК из жировой ткани после 24 часов инкубации с наночастицами SiO<sub>2</sub>. Данные представлены как изменение доли живых клеток по сравнению с контролем. Приведены результаты репрезентативного эксперимента, (n=3). (Доля живых клеток в контроле принята за 100%).

По этой причине в последующих экспериментах на МСК с другими частицами использовалась лишь концентрация 100 мкг/мл. Сводные данные по цитотоксическим эффектам НЧ Si и его модификаций представлены на рис. 16.

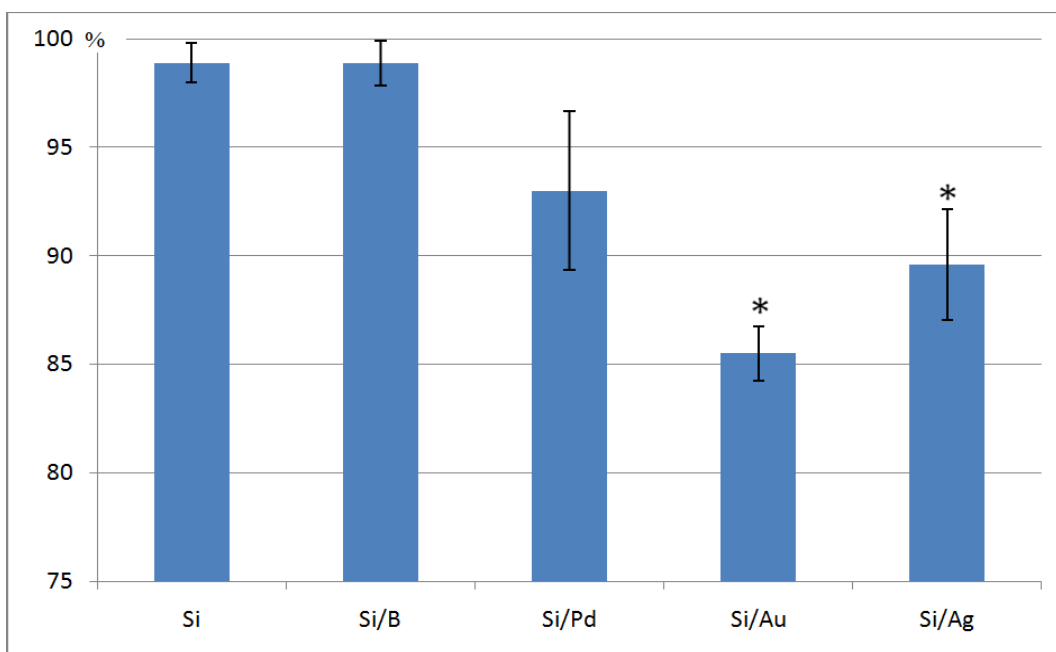


Рис. 16. Влияние модифицированных кристаллических наночастиц кремния (100 мкг/мл) на жизнеспособность МСК. Данные представлены как доля живых клеток, выраженная в процентах относительно контроля. \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ . Доля живых МСК в контроле принята за 100 %, n=5.

Как видно из рис. 16, снижение жизнеспособности при воздействии НЧ не превышало 15% и было максимальным для НЧ Si/Au. Все исследованные модификации НЧ кремния металлами достоверно снижали жизнеспособность МСК, что отличало их от эффектов НЧ чистого кремния Si и модифицированного бором, при применении которых процент живых клеток практически не отличался от контроля.

При анализе путей клеточной гибели в экспериментах с НЧ Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au и Si/Ag было отмечено, что гибель МСК происходила в основном за счет индукции апоптоза, менее всего наблюдалось клеток в состоянии некротической гибели. В то время как для НЧ SiO<sub>2</sub> преобладал некроз (таблица 5).

Таблица 5. Пути гибели мезенхимальных стромальных клеток после инкубации с наночастицами 24 ч *in vitro*

Тип НЧ	НЧ, мкг/мл	Апоптоз (An <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> ) %	Некроз (An <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> ) %	Поздний апоптоз (An <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> ) %
Si	Без НЧ	7.9±1.1	0.9±0.0	2.8±0.3
	100	8.7±1.3	1.0±1.2	2.9±0.4
Si/B	Без НЧ	7.9±1.1	0.9±0.0	2.8±0.3
	100	8.1±1.1	1.2±0.3	3.2±0.4
Si/Ag	Без НЧ	13.6±3.0	1.3±0.2	3.4±0.6
	100	21.4±4.7	2.0±0.6	3.4±0.3
Si/Au	Без НЧ	11.9±4.2	1.3±0.3	3.1±0.6
	100	22.3±3.5	1.5±0.1	4.6±0.3*
Si/Pd	Без НЧ	18.4±1.5	1.9±0.2	3.4±0.4
	100	22.0±1.6	2.4±0.5	4.8±0.5*
SiO <sub>2</sub>	Без НЧ	1,1±0,1	4,6±0,1	Н. о.
	100	1,5±0,1	6,4±0,3*	Н. о.

Данные представлены как  $M \pm m$ , \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ .

Обращает на себя внимание тот факт, что модификация НЧ Si золотом и палладием приводит к увеличению числа клеток в состоянии позднего апоптоза (An<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>).

Исходя из представленных выше данных можно сделать вывод о биобезопасности исследованных НЧ при их кратковременном (24 ч) воздействии на МСК. Однако стоит отметить, что даже в этом случае модификация НЧ кристаллического кремния благородными металлами приводит к достоверному повышению их цитотоксичности.

При анализе показателей светорассеяния на проточном цитометре были замечены изменения в экспериментах с НЧ Si/B на МСК (рис. 17) и фибробластах (рис. 18).

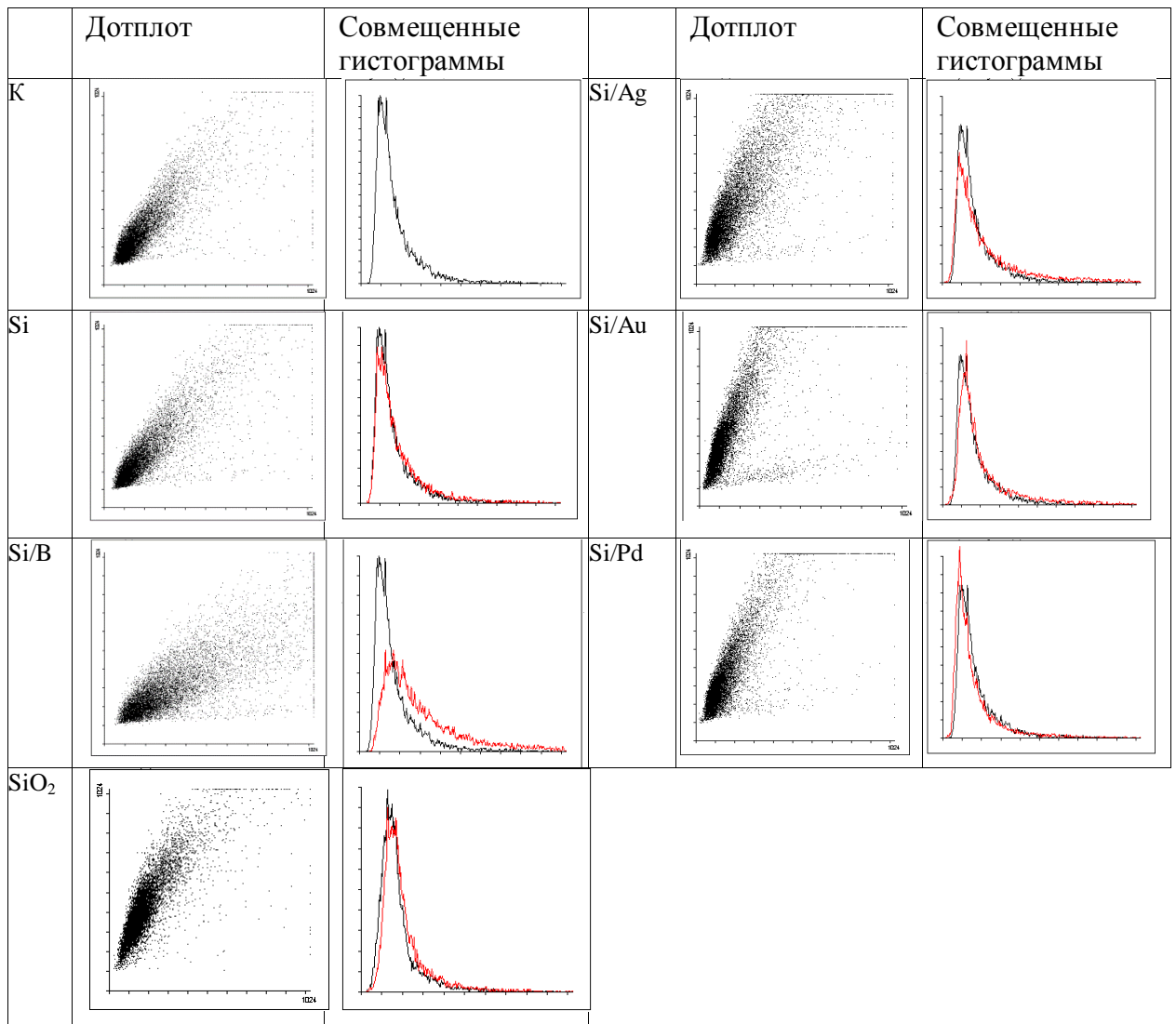


Рис. 17. Приведены гистограммы репрезентативных экспериментов на МСК. Представлено точечное распределение клеток в двух осях (X – степень изменения светорассеяния света клеткой, Y – размер) и наложенные друг на друга гистограммы контрольного и опытных образцов.



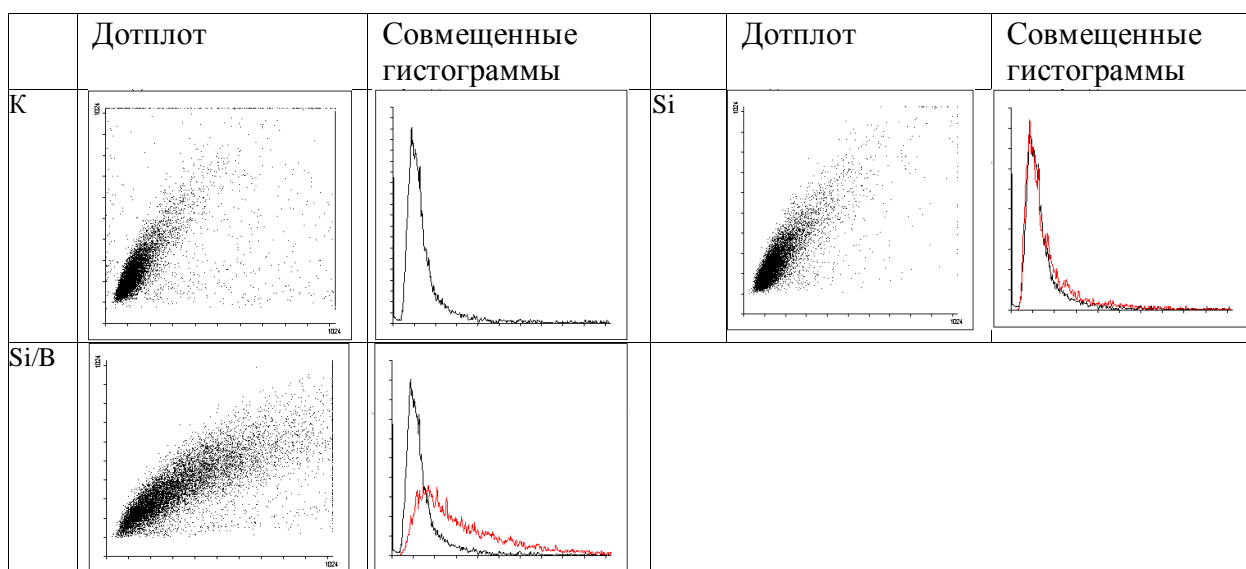


Рис. 18. Приведены гистограммы репрезентативных экспериментов на фибробластах. Представлено точечное распределение клеток в двух осях (На дотплотах и гистограммах X – степень изменения светорассеяния света клеткой, Y – размер) и наложенные друг на друга гистограммы контрольного и опытных образцов.

Как видно из рис. 17 и 18, при инкубации клеток с НЧ Si/B гистограмма опытного образца существенно смещена относительно контрольной по оси абсцисс, что свидетельствует об увеличении доли МСК с более высоким показателем светорассеяния.

В работе [Sohaebuddin S.K., 2010] исследовано влияние НЧ TiO<sub>2</sub> (диаметр 5-10 нм), SiO<sub>2</sub> (диаметр 30 нм), многослойных углеродных нанотрубок MWCNT (диаметр менее 8 нм, 20-30 нм, более 50 нм, длина у всех 0.5-2 мкм) на 3T3 фибробласты, RAW 264.7 макрофаги и бронхиальные эпителиальные клетки человека hT. В результате было показано, что на всех типах клеток сильнее всего изменяется светорассеяние в экспериментах с оксидом титана. Меньше всех оказывали влияние на светорассеяние НЧ SiO<sub>2</sub> (30 нм) и многослойные углеродные нанотрубки всех использованных диаметров. Также есть данные о влиянии НЧ TiO<sub>2</sub> диаметром 5 нм, 23 нм и 5000 нм на клетки яичника китайского хомячка. Клетки инкубировали с НЧ в течение 24 ч в концентрациях 10, 100, 300 и 1000 мкг/мл. В результате было показано, что НЧ диаметром 5 и 23 нм сильнее всего изменяли показатель светорассеяния, причем, чем выше была доза НЧ, тем сильнее изменялось светорассеяние [Suzuki H., Toyooka T., Ibuki Y. 2007]. Однако стоит учитывать, что форма наноматериала также способна определять его токсические свойства. В работе [Adili A. et al., 2008] была изучена цитотоксичность кремниевых нанопроволок по отношению к эпителиальным клеткам. В результате показано, что кремниевые нанопроволоки не обладают токсическими свойствами при концентрации до

190 мг/мл, но являются цитотоксичными при более высокой концентрации. В то же время, показано, что кремниевые сферические НЧ не обладают цитотоксическими свойствами при широком диапазоне концентраций. Таким образом, форма наноразмерных частиц может играть решающую роль при их взаимодействии с клетками. Биосовместимость кремниевых сферических НЧ подтверждается и результатами работы [Jin Y., 2007], в которой исследовалось взаимодействие частиц с клетками A549. И в то же время есть данные, что форма НЧ серебра (нанопроволока и наносфера) практически не влияет на их токсичность [Visnapuu M. et al., 2013].

В работе [Kumar A. et al., 2011] методом проточной цитометрии посредством анализа данных SSC изучалось поглощение НЧ ZnO (диаметр 30 нм) и TiO<sub>2</sub> (диаметр 50 нм) бактериями E. Coli. Было показано увеличение показателя светорассеяния после инкубации бактериальных клеток с НЧ, причем обработка клеток НЧ TiO<sub>2</sub> сильнее влияла на увеличение степени светорассеяния. Поглощение данных НЧ клетками авторы также подтвердили при помощи сканирующей электронной микроскопии. Также показано, что степень светорассеяния возрастает после инкубации МСК человека с НЧ серебра диаметром до 70 нм [Greulich C. et al., 2011].

В ряде случаев стоит учитывать, насколько быстро достигается та или иная степень насыщения клеточных компарментов НЧ. Это важно, например, при высокой степени их токсичности. Очевидно, что проникновение НЧ в клетки находится в прямой зависимости от времени инкубации клеток с НЧ [Беляева Т.Н. 2009]. В работе [Петрова Е.А. и др., 2012] изучались НЧ  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Было показано, что инкубация МСК в питательной среде, содержащей данные магнитные НЧ, несмотря на их выраженную агломерацию, приводила к интенсивному поглощению НЧ клетками. Авторы предполагают, что данный эффект обусловлен продолжительностью инкубации, достаточной для эффективного поглощения НЧ  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> клетками и что за 24 ч достигается максимальное насыщение клеток НЧ, причем дальнейшее увеличение срока культивирования нецелесообразно даже при низкой цитотоксичности данных НЧ. В итоге был сделан вывод, что такие НЧ обладают низкой цитотоксичностью и эффективно маркируют МСК при инкубации в течение 24 ч. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные НЧ локализуются в везикулах в цитоплазме клеток и сохраняются в них при пассировании, не оказывая негативного влияния на способность клеток к адгезии, распластыванию и пролиферации и при делении распределяются между дочерними клетками. Также авторы утверждают, что маркированные магнитными НЧ стволовые клетки могут быть детектированы *in vivo* с помощью магнитно-резонансной томографии. В то же время для НЧ полистирола и

мезопористого кремния достаточно всего лишь 5 мин для их поглощения клетками рака яичника в количествах, достаточных для детекции данных НЧ [Ekkapongpisit M. et al., 2012].

Стоит отметить, что клетки способны также поглощать и частицы микрометрового диапазона. Например, при изучении поглощения микрочастиц пористого кремния (1.6 и 3.2 мкм) клетками пупочной вены человека HUVEC, было показано, что этот процесс зависит от присутствия цитохалазина В. Частицы располагались в перенуклеарной области клетки, определяя направленное движение эндосом вдоль микротрубочек. Через 6 ч состояние клеток не отличалось от контрольных показателей и не зависело от поверхностного заряда частиц [Serda R.E. et al., 2009]. Также проникновение микрометровых частиц описано в работе [Белый Ю.А., Темнов А.А., Миргородская С.А. 2013], где изучена возможность «мечения» МСК магнитными частицами (предварительно обработанными поверхностноактивными веществами для создания условий проникновения в цитоплазму клетки) с целью управления их локализацией в организме (при этом данные НЧ не проявляли цитотоксических свойств).

Таким образом, можно заключить, что малый размер не является определяющим и единственным параметром, от которого зависит способность НЧ проникать в живые клетки. Исследованные нами частицы отличались по диаметру незначительно (таблица 3). И хотя НЧ Si имели наименьший диаметр, тем не менее, показатель светорассеяния изменялся лишь в экспериментах с НЧ Si/B, что было ожидаемо, так как данные НЧ проектировались с целью использования в бор-захватной терапии и должны поглощаться клетками.

#### *Внутриклеточные компартменты*

При оценке негативного воздействия НЧ на клетки важно учитывать не только прямые цитотоксические эффекты, но и влияние на функциональное состояние клеток. Исходя из данных литературы [Nel. A. et al., 2006], особое внимание следует уделять изменению внутриклеточного уровня АФК. В наших экспериментах показано, что при инкубации МСК с НЧ Si/B и Si/Ag отмечено снижение уровня АФК (рис. 19, 20), в то время как эффект повышения уровня АФК отмечен в ряде других работ, где влияние НЧ различной природы изучалось на разных клеточных типах [Ipe B.I. et al., 2005; Lin W. et al., 2006; Halamoda K.V. et al., 2012; Moore M.N. et al., 2009]. Для НЧ Si, Si/Au, Si/Pd и SiO<sub>2</sub> изменений в продукции АФК нами не выявлено.

Установлено, что активность лизосомального компартмента увеличивалась при инкубации клеток с Si/B, SiO<sub>2</sub> и снижалась в экспериментах с Si/Au. Другие НЧ

практически не влияли на данный параметр. Для НЧ Si/Pd также показано небольшое снижение активности лизосом и незначительное снижение жизнеспособности. Однако НЧ Si/Ag, вызывая больший по сравнению с НЧ Si и Si/B цитотоксический эффект, при этом напротив, несколько повышали лизосомальную активность (рис. 19, 21). Таким образом, маловероятно, что понижение активности лизосомального компартмента связано с эффектом снижения жизнеспособности.

Трансмембранный потенциал митохондрий МСК возрастал при инкубации с НЧ Si и Si/Pd и снижался при инкубации с НЧ Si/B (рис. 19, 22). Культивирование в течение 24 часов с НЧ SiO<sub>2</sub> даже при концентрации 100 мкг/мл существенно не влияло на функциональное состояние митохондрий. Другими авторами выявлено увеличение количества морфологических изменений митохондрий в МСК с признаками аутофагии после инкубации клеток с НЧ КТ525. Тем не менее, авторы не отвечают на вопрос о том, является ли повреждение митохондрий событием, непосредственно вызванным данными НЧ, либо это последствие других опосредованных процессов [Seleverstov O. et al., 2006].

Как видно из рис. 19, присутствуют лишь незначительные сдвиги пиков, отражающие изменение интенсивности флуоресценции МСК относительно контроля, что говорит об отсутствии влияния изучаемых НЧ на МСК. Расчет средней интенсивности флуоресценции (СИФ) в клетках также показал, что в большинстве случаев этот показатель для использованных зондов изменялся незначительно. Тем не менее, следует отметить, что СИФ H<sub>2</sub>DCFDA снижалась в случае инкубации МСК с НЧ Si/B и Si/Ag (рис. 20), а некоторое повышение этого показателя в случае с НЧ Si/Pd было недостоверным.

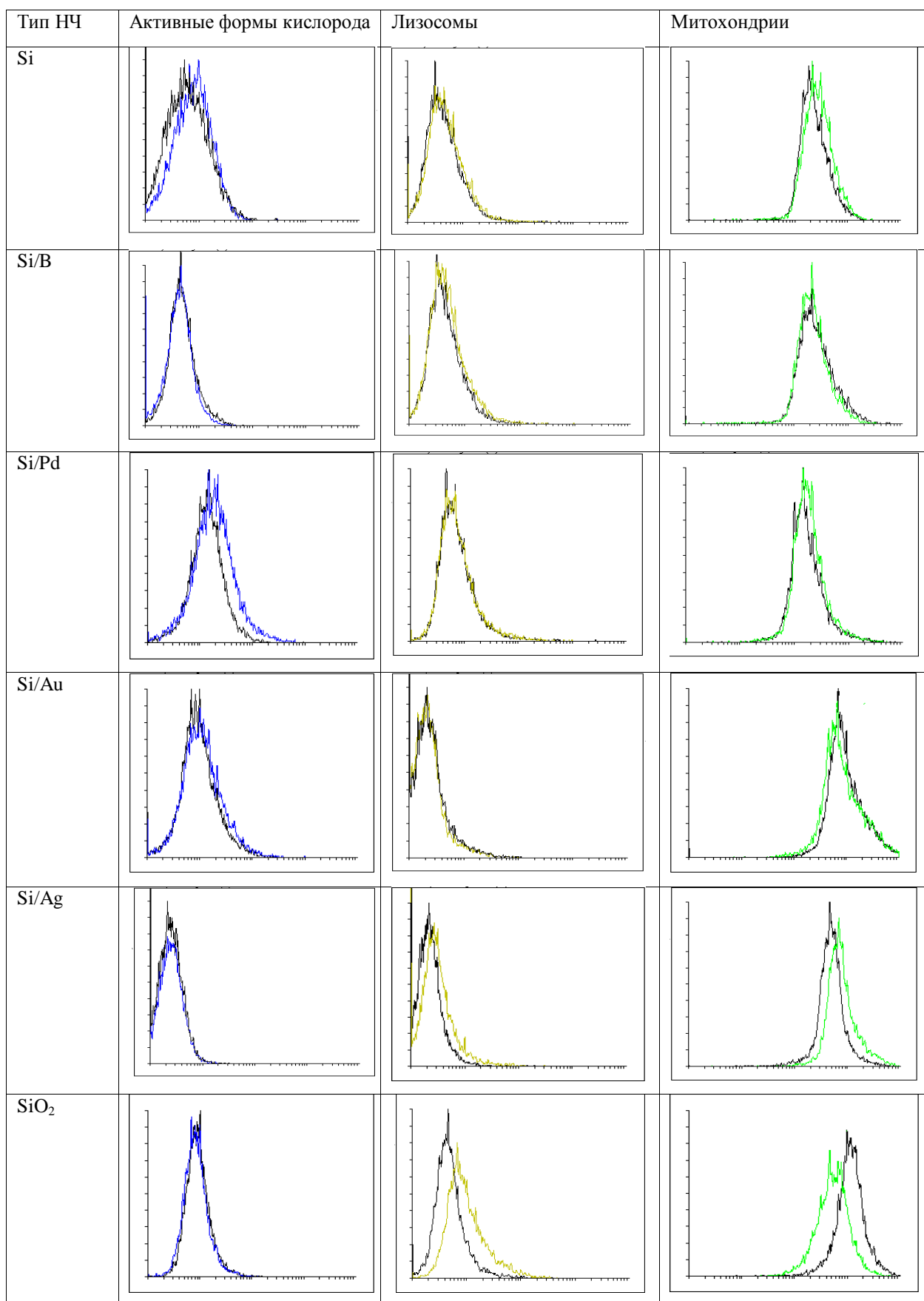


Рис. 19. Репрезентативные гистограммы распределения МСК, окрашенных зондами Mito Tracker, Lyso Tracker, H<sub>2</sub>DCFDA после инкубации с наночастицами 24 ч.

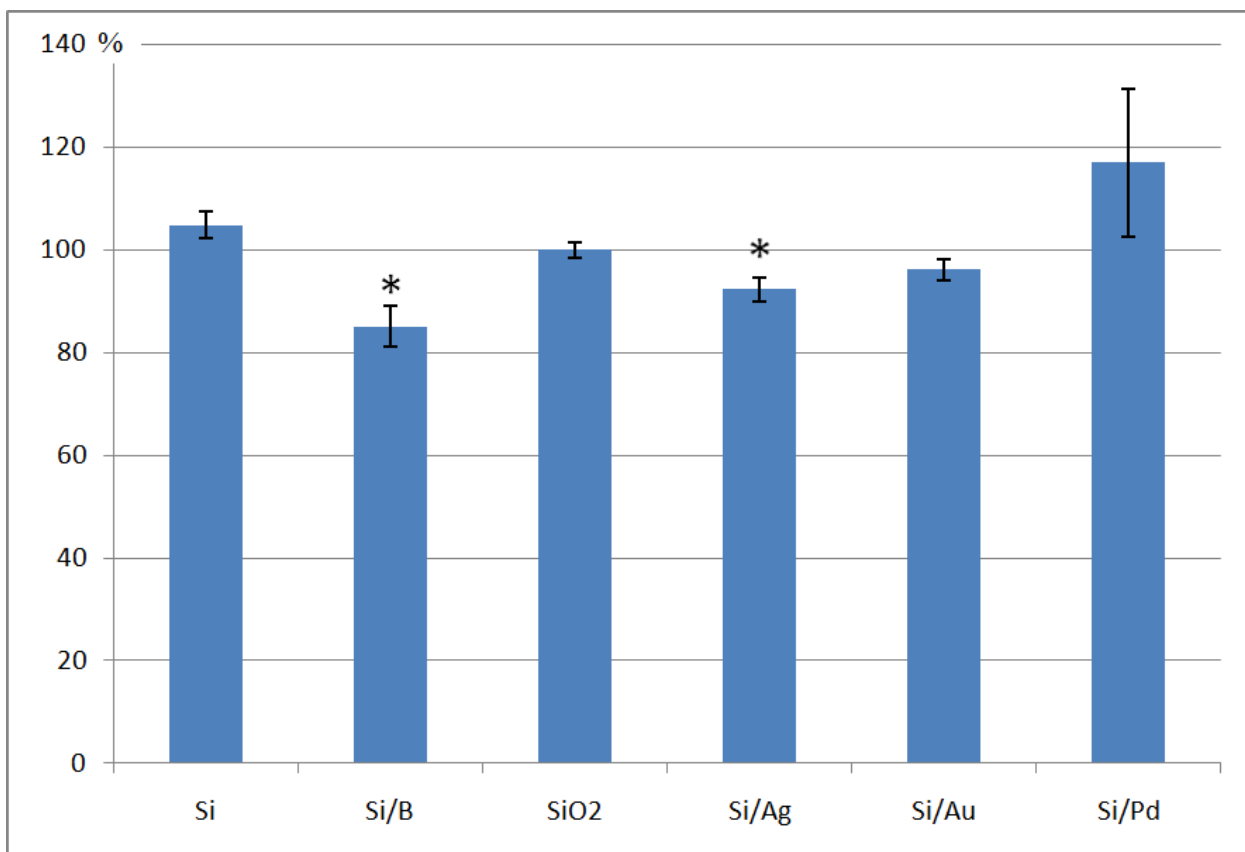


Рис. 20. Средняя интенсивность флуоресценции  $H_2DCFDA$  при инкубации МСК с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . Средняя интенсивность флуоресценции зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%, \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

СИФ зонда Lyso Tracker повышался при взаимодействии клеток с НЧ Si/B и Si/Ag, но снижалась в случае использования НЧ Si/Au (рис. 21). Разнонаправленные изменения были обнаружены и в случае анализа СИФ Mito Tracker Red (рис. 22). Однако, надо принять во внимание, что все эти изменения не выходили за пределы 15-20%.

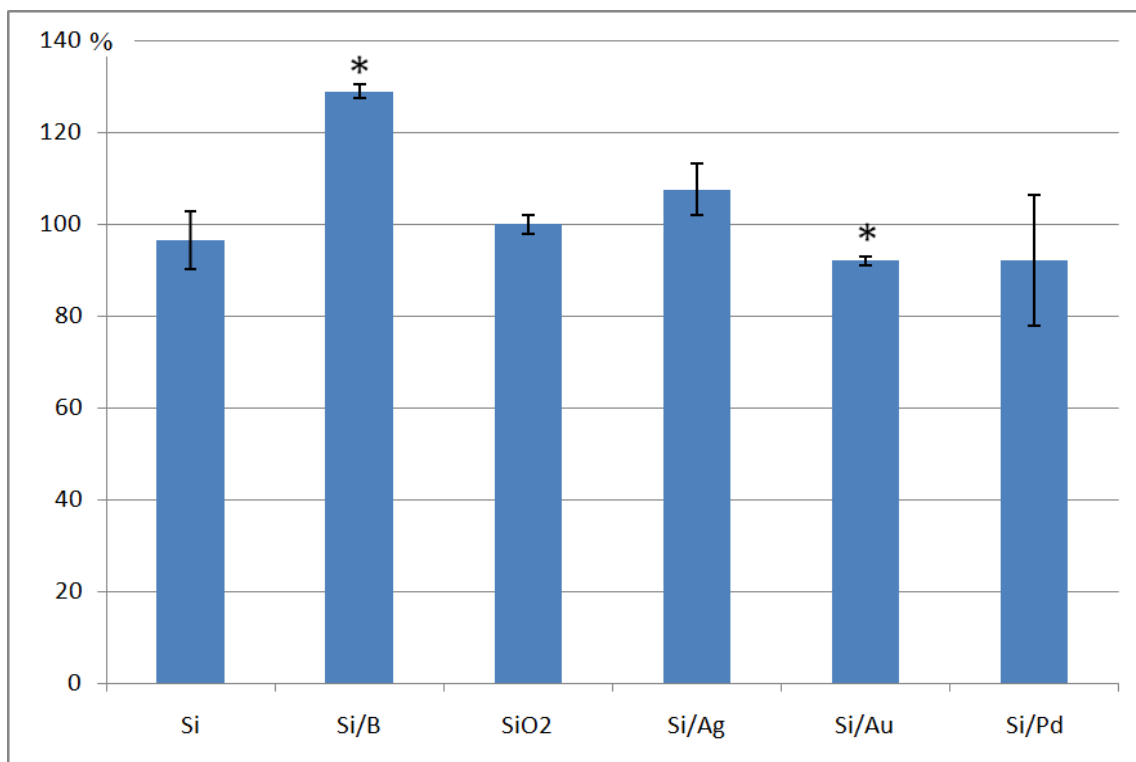


Рис. 21. Средняя интенсивность флуоресценции Lyso Tracker при инкубации МСК с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . Средняя интенсивность флуоресценции зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%, \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

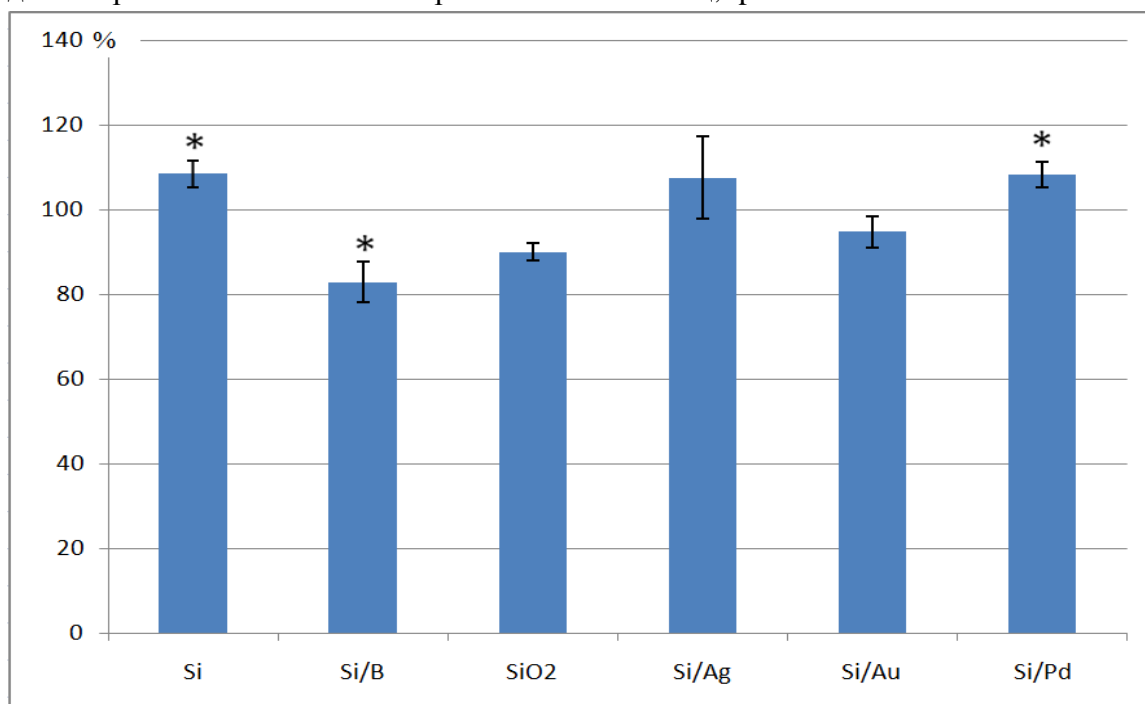


Рис. 22. Средняя интенсивность флуоресценции Mito Tracker при инкубации МСК с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . СИФ зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%, \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Полученные результаты показывают отсутствие выраженных цитотоксических эффектов изученных НЧ на МСК человека. Тем не менее, можно заметить, что модификация НЧ металлами в некоторой степени снижает количество живых клеток, чего нельзя сказать о НЧ Si и Si/V. Возможно, данный эффект снижения жизнеспособности обусловлен диффундированием ионов золота и серебра в клеточную среду [Visnapuu M. et al., 2013]. В подтверждение данной гипотезы можно привести результаты работы [Avalos A. et al., 2014], где изучалось влияние НЧ серебра диаметром 4.7 нм и 42 нм (0.84-2000 мкг/мл, 24, 48, 72 ч) на нормальные фибробласты дермы человека. Было показано значительное снижение роста фибробластов при инкубации с НЧ серебра диаметром 4.7 нм. Инкубация с НЧ серебра диаметром 42 нм показала 50% снижение клеточной жизнеспособности. С другой стороны, при тестировании полимерных НЧ не было выявлено цитотоксических эффектов на МСК и клетки HeLa, хотя было показано, что они проникали внутрь клеток и сорбировались на их мембране [Florez L. et al., 2012]. Однако, стоит учитывать, что разница в размере также может стать причиной цитотоксических свойств. Например, в работе [Pan Y. et al., 2007] изучали воздействие НЧ золота на клетки HeLa, Sk-Mel-28, L929 и J774A1 и в результате было показано, что НЧ золота диаметром 15 нм нетоксичны даже при высоких концентрациях (6.3 мМ), в то время как НЧ диаметром 1,2 нм вызывают гибель клеток при воздействии в течение 12 ч. В то же время было установлено, что независимо от размера частиц, на логарифмической стадии роста клетки в 1,5—3,3 раза более чувствительны токсическому воздействию НЧ золота, чем на стационарной стадии. Токсичность частиц определялась по величине IC50 (концентрация вещества, вызывающая 50%-ное ингибирование роста клеток). Цитотоксические свойства в отношении стромальных клеток показаны в экспериментах на фибробластах. Так, в работе [Avalos A. et al., 2014] изучалось влияние НЧ серебра диаметром 4.7 нм и 42 нм на нормальные дермальные фибробласты кожи человека. Причем подобно нашим данным для МНК (рис. 4) был показан эффект большего снижения жизнеспособности при меньшей концентрации НЧ. МТТ-тест показал значительное снижение роста фибробластов при инкубации с НЧ серебра диаметром 4.7 нм. Причем при концентрации 6,72 мкг/мл наблюдался несколько больший токсический эффект, чем при 13.45 мкг/мл.

Отсутствие цитотоксических реакций было также показано при исследовании НЧ у-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [Петрова Е.А. и др., 2012]. Инкубация МСК в среде, содержащей данные магнитные НЧ не вызывала цитотоксических реакций, хотя НЧ поглощались клетками, не влияя на адгезию и пролиферацию. Другими авторами показано, что НЧ SiO<sub>2</sub> с диаметром 50 нм в весьма высокой концентрации (0.2 мг/мл) не оказывают цитотоксического действия на



МСК, не влияют на их рост, а также не вызывают морфологических изменений [Park K.S. et al., 2010].

Биосовместимость НЧ на кремниевой основе, даже модифицированных флуоресцентными молекулами органических красителей, также показана экспериментально на стромальных клетках. Подобные НЧ способны поглощаться МСК (преимущественно посредством фагоцитоза и пиноцитоза), иметь крайне низкую степень цитотоксичности для этих клеток и не оказывать значительных эффектов на клеточную пролиферацию и синтез белка [Huang X. 2013].

Как уже было сказано, исследованные в нашей работе НЧ не вызывали увеличения уровня АФК в культивируемых МСК. Более того, НЧ Si/B и Si/Ag несколько понижают их уровень в клетках. В то же время в ряде работ показано, что НЧ, напротив, вызывают повышение уровня АФК в стромальных клетках. Так, НЧ серебра диаметром 2 нм поглощались митохондриями фибробластов CRL-2014, что приводило к увеличению уровня АФК и снижало их антиоксидантную защиту [Inkielewicz-Stepniak I. et al., 2014]. Было отмечено, что уровень АФК возрастал по мере увеличения концентрации НЧ. Уровень апоптоза фибробластов увеличивался при культивировании с данными НЧ в концентрации 3.5 мкг/мл. Инкубация нормальных фибробластов дермы с НЧ серебра диаметром 4.7 нм в концентрации 3.36 мкг/мл приводила к повышению уровня АФК в 2.41 раза, а НЧ серебра диаметром 42 нм в концентрации 100 мкг/мл в 1.76 раза. Наибольший эффект наблюдался после 3 ч (для 4.7 нм НЧ) и 24 ч (для 42 нм НЧ) инкубации клеток с НЧ [Avalos A. et al., 2014].

Отсутствие взаимосвязи между жизнеспособностью и количеством АФК, выявленное в нашей работе, было также показано для сферических НЧ двуокиси кремния с диаметром 150-200 нм [Choi J. et al., 2010]. После 24 часов инкубации с этими НЧ авторы не наблюдали отличий в жизнеспособности опытных и контрольных клеток первичной микроглии мозга крысы при всех использованных концентрациях НЧ, несмотря на повышение количества АФК в клетках, которое наблюдалось даже при самых низких концентрациях.

Подобно тому, как на лизосомальный компартмент МСК влияли НЧ Si/Au, показано, что лизосомальный pH падал в клетках ARPE-19 при инкубации с полимерными НЧ диаметром 387.4 нм и 428.5 нм [Baltazar G.C., et al., 2012].

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что изученные НЧ при концентрации до 100 мкг/мл и времени воздействия до суток не обладают токсическими

свойствами, приводящими к гибели МСК, однако способны незначительно изменять уровень АФК и состояние внутриклеточных органелл.

### 3.2.2 Влияние наночастиц Si и Si/B на пролиферацию эмбриональных фибробластов человека

Влияние НЧ Si и Si/B на пролиферацию эмбриональных фибробластов человека оценивали по числу удвоений популяции и времени удвоения популяции. Морфология контрольных клеток и культивируемых с НЧ в течение 6 суток не отличались, что свидетельствует в пользу биосовместимости данных НЧ (рис. 23).

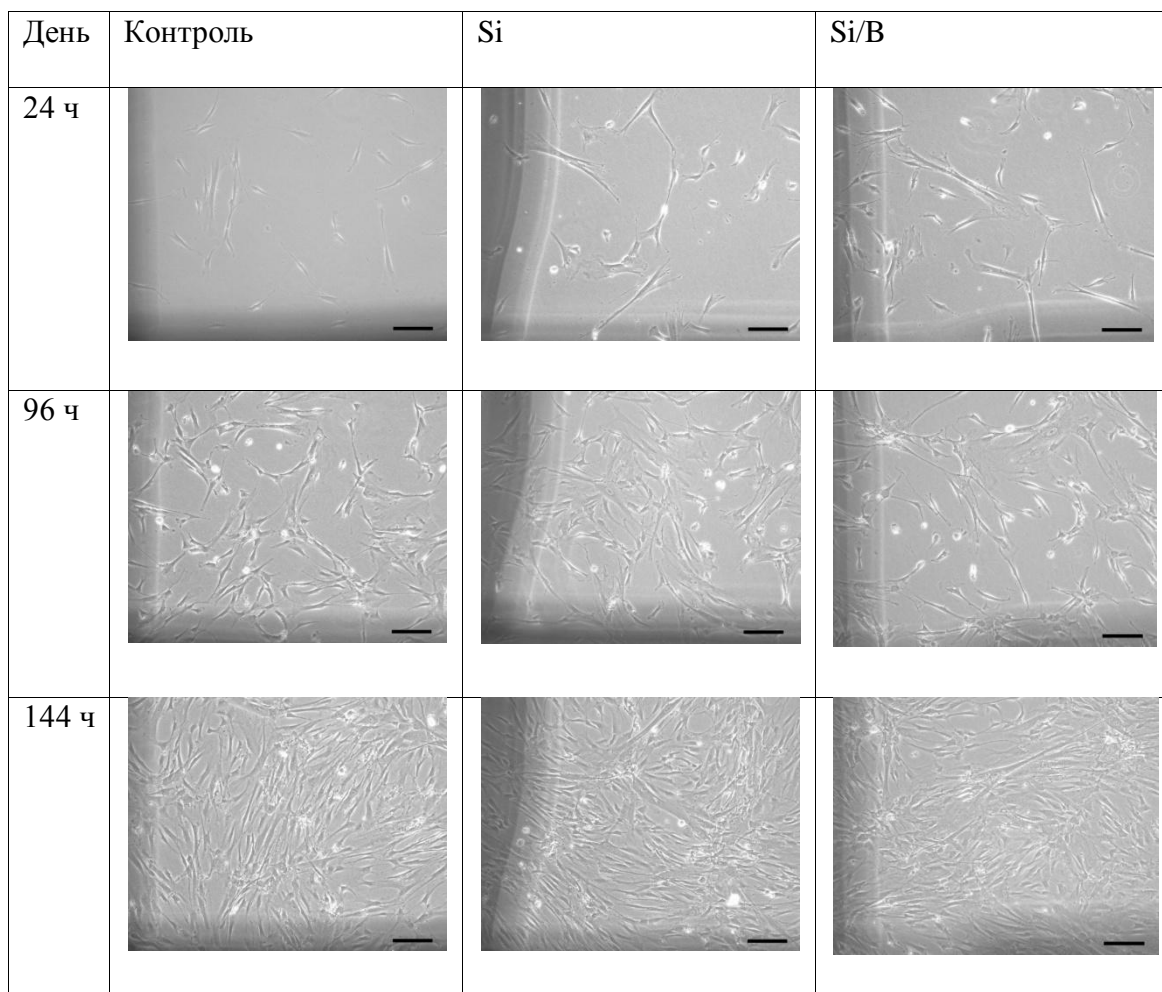


Рис. 23. Фибробласты человека при культивировании в течение 144 ч с наночастицами Si и Si/B. Представлены микрофотографии фиксированного поля зрения на разных сроках эксперимента. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 10$ . Масштабный отрезок 100 мкм.

В результате проведенных экспериментов выявлены изменения в пролиферативной активности клеток. Отмечено, что при добавлении в среду НЧ Si фибробласты пролиферировали быстрее, чем в контроле без добавления НЧ. На рис. 24 приведены данные репрезентативного эксперимента.

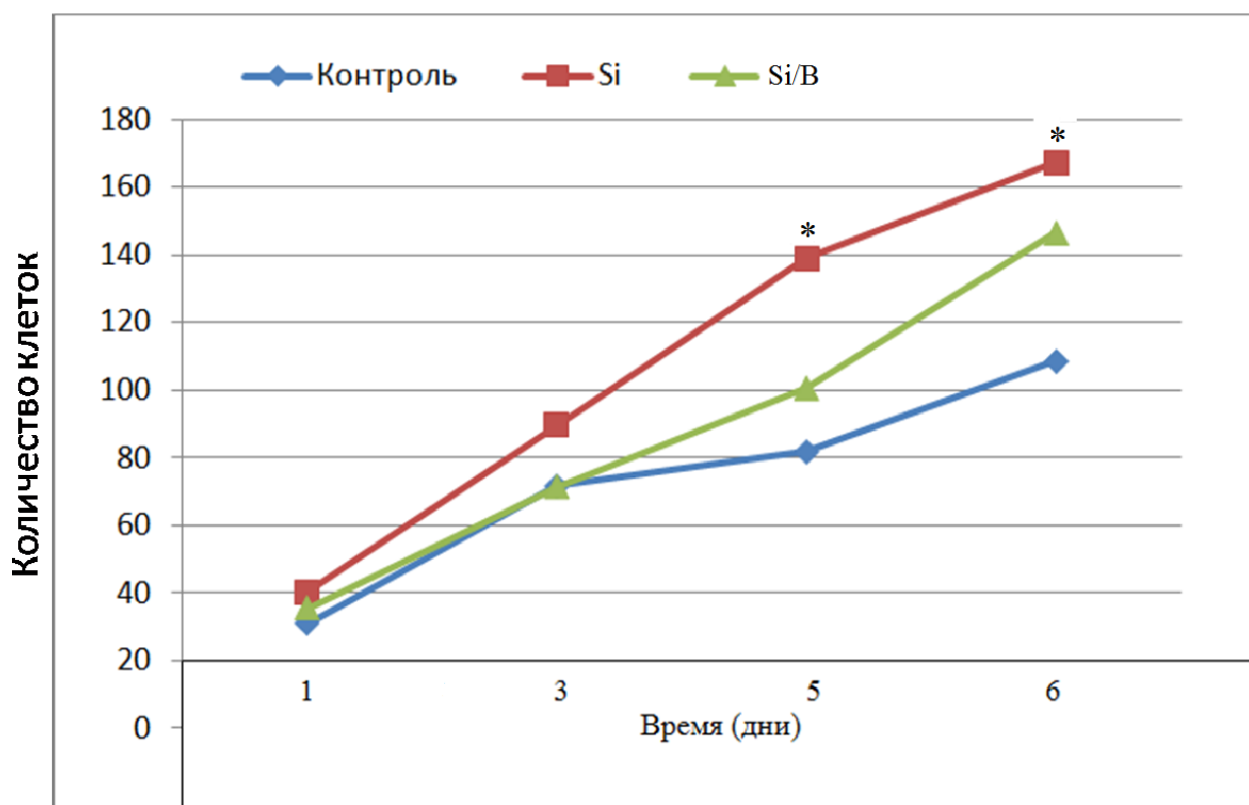


Рис. 24. Влияние наночастиц Si и Si/B (100 мкг/мл) на пролиферацию фетальных фибробластов. Каждая точка – среднее число клеток в пяти полях зрения. Представлены данные репрезентативного эксперимента. \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Стоит отметить, что по истечении 48 часов культивирования клетки с добавлением НЧ Si/B пролиферировали так же, как и клетки в контроле, в то время как при добавлении НЧ Si число клеток увеличивалось быстрее. Увеличение числа контрольных клеток было более медленным. Таким образом, добавление НЧ Si стимулировало пролиферацию эмбриональных фибробластов человека.

В различных экспериментах клетки пролиферировали с разной скоростью, и каждый отдельный пассаж удавалось поддерживать различное количество времени, прежде чем клетки достигали состояния монослоя. Однако внутри экспериментов наблюдаются достоверные отличия. Поэтому прирост клеток оценивали отдельно для каждого эксперимента (таблица 6).

Таблица 6. Изменение числа эмбриональных фибробластов со временем.

Эксперимент	Контроль		Si		Si/B	
	Прирост кл., разы	Время удв., часы	Прирост кл., разы	Время удв., часы	Прирост кл., разы	Время удв., часы
1	4.6±0.3	33.7	6.5±0.8*	28.1	-	-
2	7.0±0.4	26.7	10.9±1.7*	22.2	6.2±0.9	29.0
3	3.4±0.5	42.8	4.3±0.5	36.1	4.3±0.3	36.1

Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=5$ . \* - достоверность отличий от контроля без наночастиц,  $p < 0.05$ .

Из данных таблицы видно, что при добавлении в среду НЧ Si наблюдалось достоверное увеличение прироста фибробластов, которое в среднем было выше в 1.4 раза по сравнению с контролем. Однако в опытах с НЧ Si/B данный эффект был не выявлен. Возможно, это связано с тем, что НЧ Si адсорбируют на свою поверхность различные компоненты среды и сыворотки, образуя так называемую «корону» из биомолекул [Sohaebuddin S.K. et al., 2010], в то время как модифицированные НЧ Si/B могут не обладать требуемыми поверхностными свойствами для образования аналогичной «короны». В литературе описаны случаи, когда модификации изменяют свойства НЧ, например, способствуя проникновению НЧ в цитоплазму МСК [Белый Ю.А., Темнов А.А., Миргородская С.А. 2013]. Можно предположить, что после образования «короны» такие агрегаты (НЧ+биомолекулы) способны седиментировать, повышая таким образом концентрацию питательных веществ и факторов роста, и облегчая их контакт с клетками. Это может быть одним из факторов, усиливающих рост фибробластов. Факт увеличения скорости пролиферации также свидетельствует в пользу биобезопасности НЧ Si. Стоит отметить, что исследованные НЧ Si/B хотя и вызвали в одном из экспериментов снижение роста фибробластов по отношению к контролю, тем не менее, будучи добавленными в аналогичную среду в такой же концентрации не вызывали снижения количества живых фибробластов и МСК.

Ускорение роста эмбриональных фибробластов может происходить и по иной причине. Одним из митогенных факторов может быть умеренное повышение уровня внутриклеточного АФК. Для проверки этого предположения мы проанализировали содержание АФК в эмбриональных фибробластах после инкубации с НЧ.

При оценке влияния НЧ Si и Si/B на фибробласты нами было замечено незначительное повышение АФК (рис. 25).

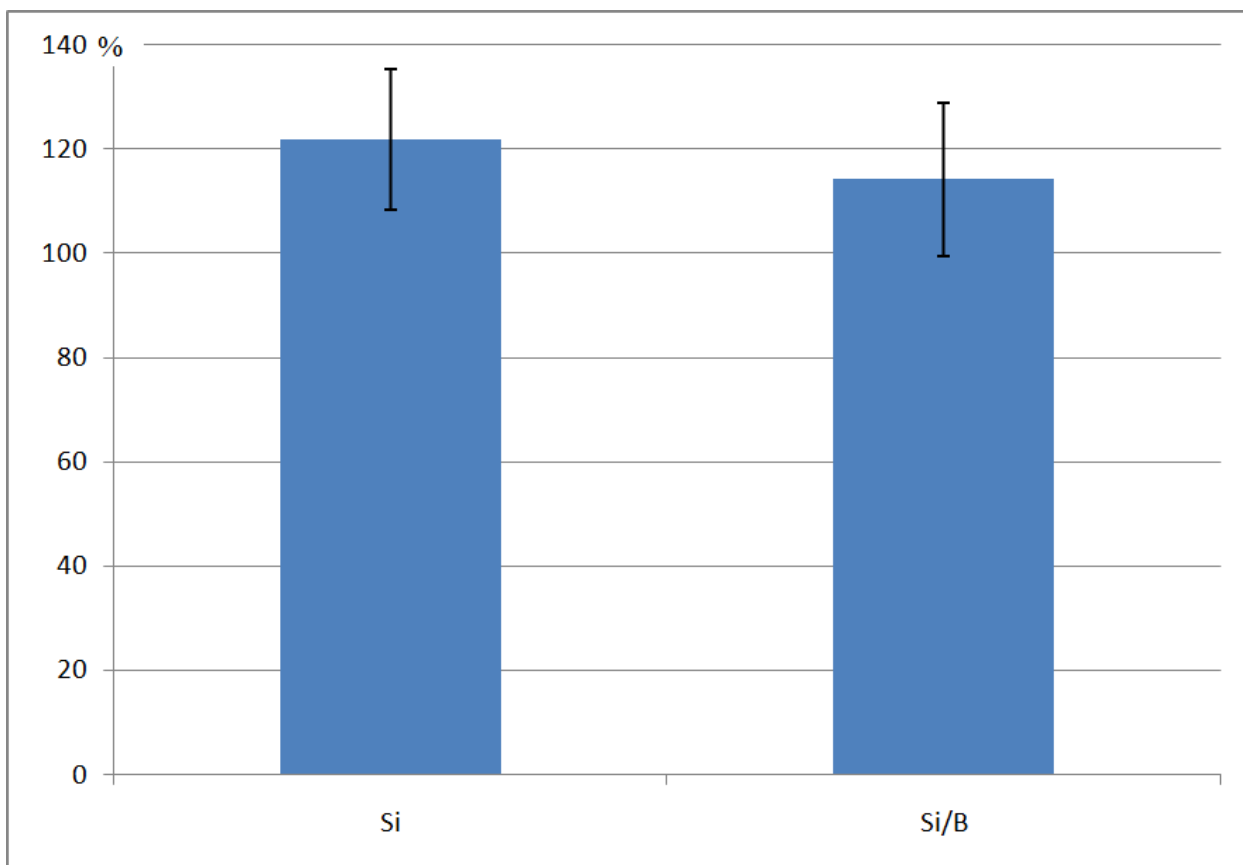


Рис. 25. СИФ H<sub>2</sub>DCFDA при инкубации фибробластов с наночастицами *in vitro*. Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n=3$ . Средняя интенсивность флуоресценции зонда в клетках в образце без добавления наночастиц принята за 100%.

Таким образом, одним из возможных эффектов ускорения роста фибробластов может быть увеличение концентрации внутриклеточных АФК.

Дополнительным доказательством этого предположения являются следующие экспериментальные данные. Например, экзогенный H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> повышает митотический индекс и даже выживаемость культивируемых миобластов L6C5 [Caporossi D. et al., 2003]. Есть данные, что при добавлении к смешанной культуре лимфоцитов 10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдалось увеличение пролиферативной активности клеток [Roth S., Droge W. 1987]. Аналогичный эффект достигался в опытах с культурой первичных фибробластов [Murrell A.C. et al., 1990], а также при добавлении в среду 1 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к клеткам HeLa и фибробластам ВНК-21, при этом антиоксиданты снижали скорость пролиферации [Burdon R.H. Gill V. 1993]. Возможно, что при экзогенном добавлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> хоть и разрушается достаточно быстро, но его митогенное действие может длиться несколько суток [Ткачук В.А. 2012]. Это может объясняться тем, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в самом начале запускает внутриклеточный сигнальный каскад, отвечающий за пролиферативный ответ клеток. Вероятно, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> действует в строго контролируемом узком диапазоне физиологических

концентраций, превышение которого приводит к гиперактивации и гибели клеток [Ткачук В.А. 2012].

В области нанотехнологий в настоящее время особое внимание уделяется наноструктурированным поверхностям. Именно с ними будут контактировать в случае их использования в медицинских целях стромальные клетки. Есть данные, что наноструктурированный кремний (на кремниевой подложке имелись структуры в виде выступов и впадин высотой 10-100 нм) может использоваться как подложка для выращивания стволовых клеток. По данным [Осминкина Л.А. и др., 2011], после 5 сут культивирования на наноструктурированной кремниевой подложке доля стволовых клеток составляла 0.4 от контроля, при этом лишь 60% клеток были распластаны. Однако при дальнейшем культивировании число распластных клеток возросло до 80%, а их внешний вид был сходен с таковым контрольных клеток. Данные результаты свидетельствуют о сохранении жизнеспособности стволовых клеток, но при этом указывают на замедление темпа их пролиферации на наноструктурированной кремниевой поверхности. Аналогичные результаты получены для клеток Нер 2, что связывают со сходством процессов, определяющих поведение различных типов клеток на данной поверхности и предполагают, что механизм такого влияния может быть связан с локальными электрическими полями на поверхности и с действием ортокремниевой кислоты, которая может образовываться при частичном растворении НЧ кремния в воде [Anderson S.H.C. et al., 2003].

Другие НЧ на основе кремния также не показывают цитотоксических и антипролиферативных свойств, например НЧ оксида кремния в концентрации 100, 200, 300 и 400 мкг/мл при их взаимодействии с МСК [Han S.-M. et al., 2012]. НЧ железа также не оказывали влияния на пролиферацию МСК человека [Loebinger M.R. et al., 2009].

Концентрация НЧ в клеточной среде, конечно же, имеет существенное значение в проявлении свойств НЧ, влияющих на пролиферацию клеток. Например, НЧ кремния незначительно увеличивали пролиферацию клеток 3Т3 при концентрации 0.5-2.5 мг/мл, при концентрации выше 3 мг/мл наблюдался обратный эффект [Осминкина Л.А. и др., 2011]. В работе [Asharani P.V, Hande, M.P., Valiyaveetil S. 2009] авторы исследовали влияние серебряных НЧ диаметром 6-20 нм в концентрации 25, 100 и 200 мкг/мл на фибробласты человека IMR-90, которые нормально пролиферировали после добавления НЧ в среду. Однако после обработки этими же НЧ в концентрации 400 мкг/мл фибробластам требовался почти месяц для восстановления пролиферативной активности

после исключения НЧ из среды. Авторы данной работы также предполагают, что деформация цитоскелета может приводить к ингибированию пролиферации клеток.

Стоит отметить, что проникать в клетку и вызывать снижение ее пролиферативного потенциала способны не только частицы нанометрового диапазона, но и более крупные. Так, магнитные частицы (диаметр 2,8 мкм), проникая внутрь МСК, приводили к снижению пролиферативной активности клеток (до 15 % за 72 часа культивирования с частицами, частицы присутствовали в среде лишь 24 часа, после чего среда менялась), при этом жизнеспособность клеток составляла 95% и не нарушалась их функциональная активность [Белый Ю.А., Темнов А.А., Миргородская С.А. 2013].

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о способности немодифицированных НЧ кремния ускорять процесс роста фибробластов. Модификация НЧ кремния бором, в свою очередь, лишает данные НЧ этих свойств. Анализ результатов других исследований показывает, что влияние различных НЧ на клеточную пролиферацию зависит от состава НЧ (включая модификацию поверхности), их размера и концентрации. Также возможно достижение антипролиферативного эффекта без ущерба клеточной жизнеспособности и возвращение клеток к исходному состоянию после исключения НЧ из среды культивирования.

### **3.2.3 Жесткость цитоплазматической мембраны и цитоскелет мезенхимальных стромальных клеток**

В процессе проникновения НЧ в клетки активно вовлечены структуры клеточной мембраны и подлежащего цитоскелета. Тем не менее, вопрос о взаимодействии НЧ с мембраной и подмембранным цитоскелетом клеток остается малоизученным. Мембрана является основной клеточной структурой, реализующей первичное взаимодействие клетки с окружающей ее средой. Изменения в ее структуре и в структуре кортикального цитоскелета, который неразрывно связан с фосфолипидным бислоем, могут запускать целый ряд внутриклеточных процессов, а изменение жесткости кортикального цитоскелета - целый ряд сигнальных процессов и регулировать активность ионных каналов.

Однако оценка структурных изменений мембраны и подмембранного цитоскелета клеток либо связана с их фиксацией, что в свою очередь влечет ряд изменений данных структур, либо занимает достаточно много времени, что может привести к нехарактерным перестройкам цитоскелета. В то же время, показателем интактности структуры являются механические характеристики клеток, в частности, их жесткость. В свою очередь,

измерение механических характеристик с использованием атомной силовой микроскопии можно провести в прижизненных условиях в течение короткого промежутка времени.

В данном разделе было проведено определение механических характеристик МСК при инкубации их с НЧ Si и Si/B.

#### *Жесткость клеток*

Клетки подвергались воздействию НЧ в течение 1 ч и 24 ч. Результаты измерения жесткости клеток свидетельствовали о том, что после 24-часовой инкубации с частицами Si (группа «Si 24 ч») и Si/B (группа «Si/B 24 ч») жесткость клеток увеличивалась на 63% и 136% соответственно по сравнению с контрольной группой (группа «Контроль 24 ч») ( $p < 0.05$ ) (рис. 26).

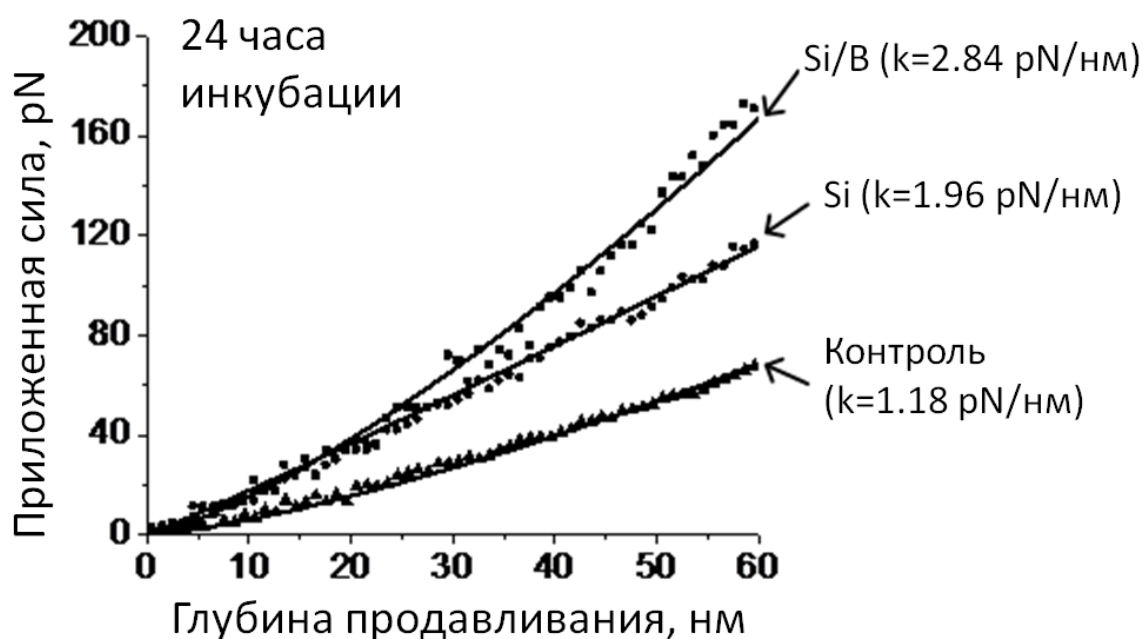


Рис. 26. Изменение жесткости клеток при инкубации с наночастицами Si и Si/B (100 мкг/мл) в течение 24 ч.

При этом после 1-часовой инкубации изменения были более выражены относительно соответствующего контроля (группа «Контроль 1 ч»): жесткость клеток в группе «Si 1 ч» увеличилась на 181%, а группе «Si/B 1 ч» – на 247% ( $p < 0.05$ ) (рис. 27).



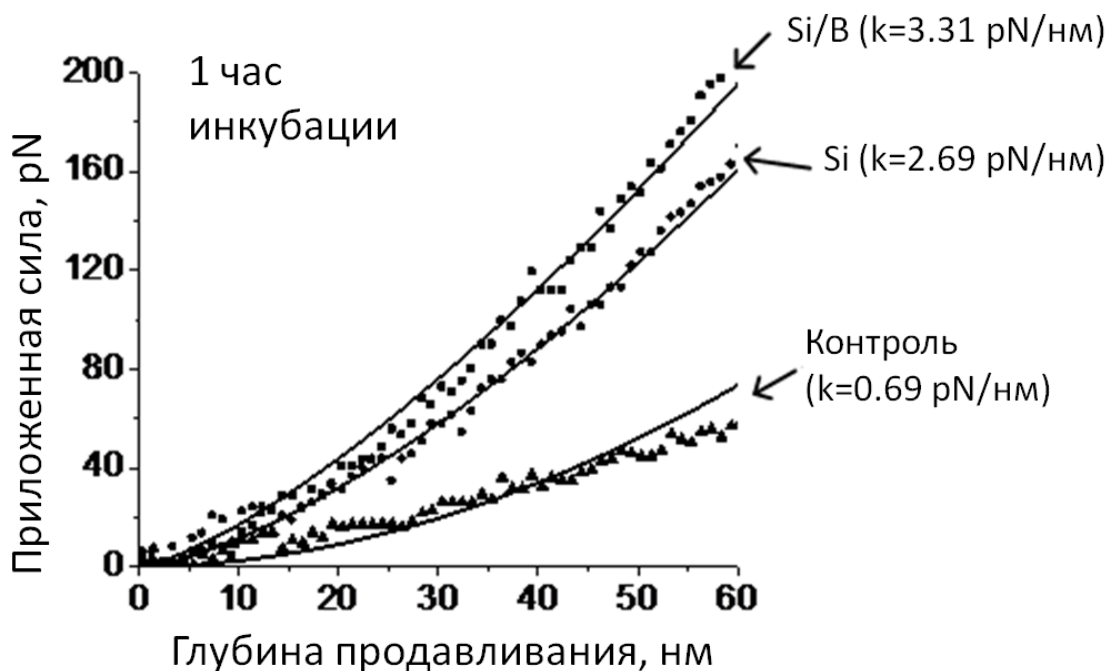


Рис. 27. Изменение жесткости клеток при инкубации с наночастицами Si и Si/B (100 мкг/мл) в течение 1 ч.

Кроме того, и после 24-часовой, и после 1-часовой инкубации жесткость клеток, инкубированных с частицами Si/B была достоверно выше ( $p<0.05$ ), чем клеток, инкубированных с частицами Si (рис. 26, 27).

Следует отметить, что через 1 час после смены среды жесткость клеток (группа «Контроль 1 ч») была ниже на 20% ( $p<0.05$ ), нежели клеток, смену среды которым проводили за 24 часа до начала измерений (группа «Контроль 24 ч») (рис. 28).

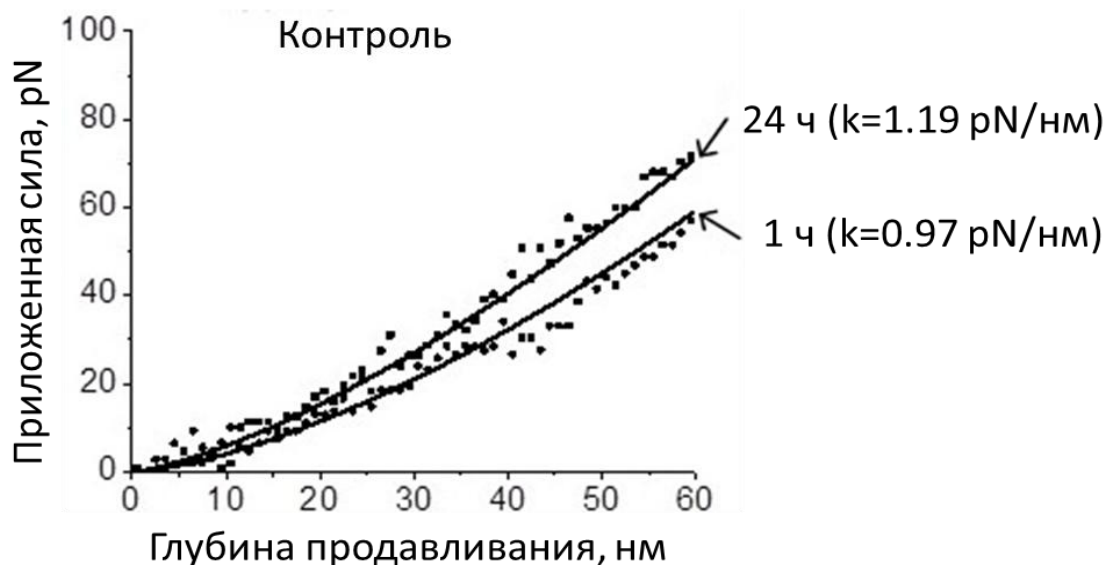


Рис. 28. Изменение жесткости клеток при инкубации в течение 24 ч и 1 ч.

В то же время жесткость клеток, инкубированных с частицами Si в течение одного часа (группа «Si 1 ч») была на 36% выше ( $p < 0.05$ ), чем у клеток, инкубация с теми же частицами которых проводилась в течение 24 часов (группа «Si 24 ч») (рис. 29).

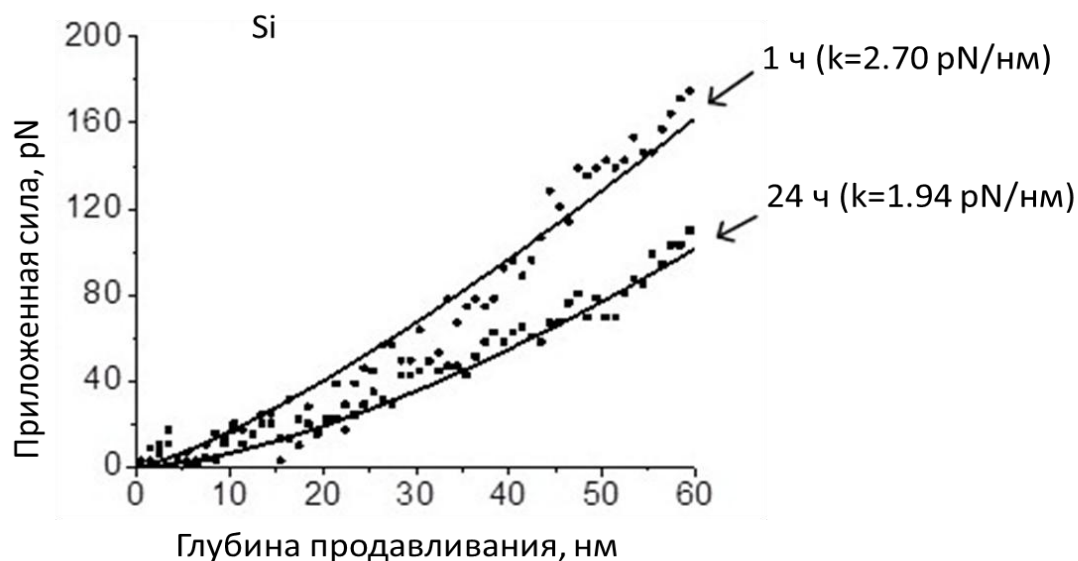


Рис. 29. Изменение жесткости клеток при инкубации с наночастицами Si (100 мкг/мл) в течение 24 ч и 1ч.

Аналогичная картина имела место и при инкубации с частицами Si/B: через 1 час инкубации (группа «Si/B 1 ч») жесткость клеток была выше на 16% ( $p < 0.05$ ), чем клеток группы «Si/B 24 ч») (рис. 30).

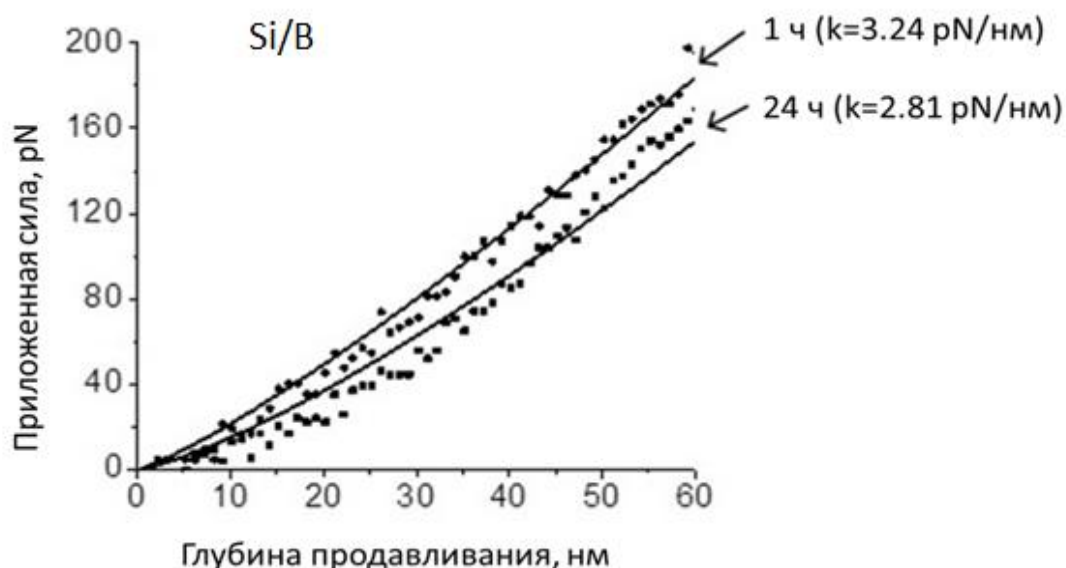


Рис. 30. Изменение жесткости клеток при инкубации с наночастицами Si/B (100 мкг/мл) в течение 24 ч и 1 ч.

Кроме того, следует отметить, что дисперсия значений жесткости клеток, инкубированных с различными типами частиц в течение 1 часа, была существенно больше, чем дисперсия значений жесткости клеток, инкубированных с частицами в течение 24 часов. При этом дисперсии значений жесткости клеток обеих контрольных групп были сопоставимы между собой.

#### *Содержание F-актина*

Интенсивность флуоресценции TRITC-фаллоидина, которая прямо коррелирует с содержанием F-актина, снижалась в ряду «Контроль 24 ч» – «Si 24 ч» – «Si/B 24 ч». Величина данного параметра в группах «Si 24 ч» и «Si/B 24 ч» снижалась по сравнению с группой «Контроль 24 ч» на 31% и 42% соответственно ( $p < 0.05$ ) (рис. 31).

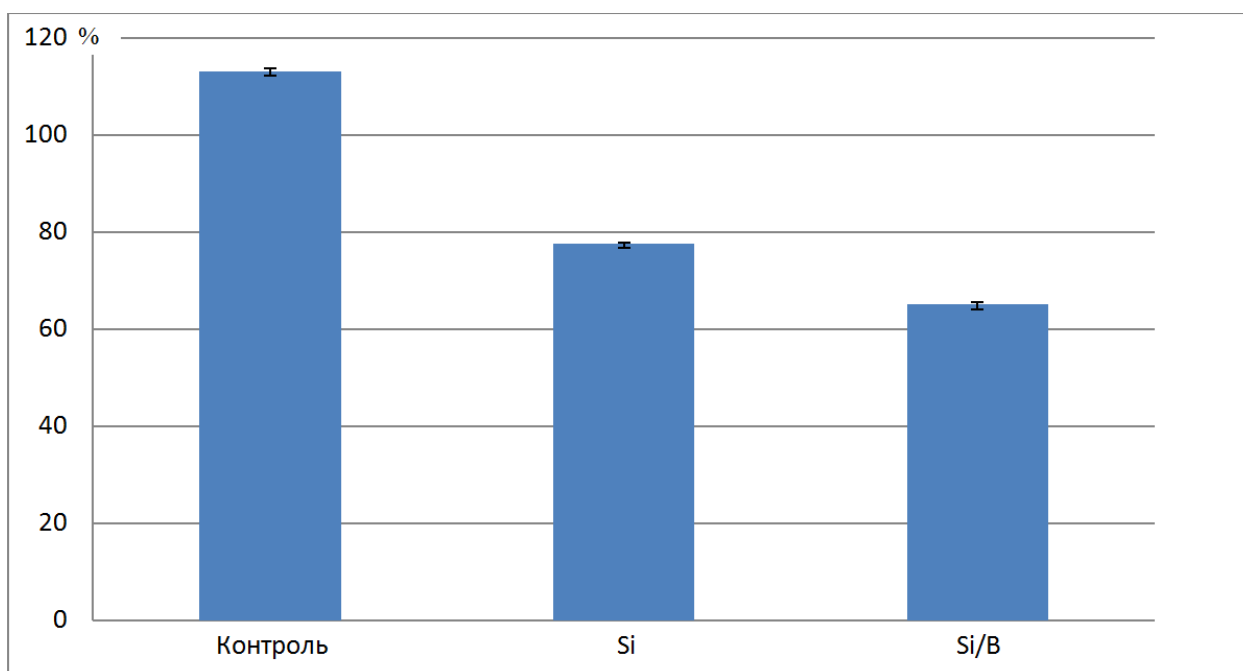


Рис. 31. Интенсивность флуоресценции TRITC-фаллоидина (F-актин) в контроле, при инкубации с наночастицами Si и Si/B в концентрации 100 мкг/мл (Средние значения  $\pm$  стандартное отклонение). По оси ординат – условные единицы.

При этом, изменений интенсивности флуоресценции DAPI (окраска ядер) ни в одной из групп, по сравнению с контрольным уровнем, не отмечалось. Следует обратить внимание на то, что имели место некоторые структурные перестройки актинового цитоскелета при инкубации с НЧ: в клетках группы «Контроль 24 ч» актиновые филаменты расположены, в основном, продольно (рис. 24, А-Д); в клетках группы «Si 24 ч» появляются филаменты, расположенные поперечно (рис. 6, Е-Н); в клетках группы «Si/B 24 ч» расположенных поперечно актиновых филаментов становится больше, нежели в клетках группы «Si 24 ч» (рис. 32, I-L).

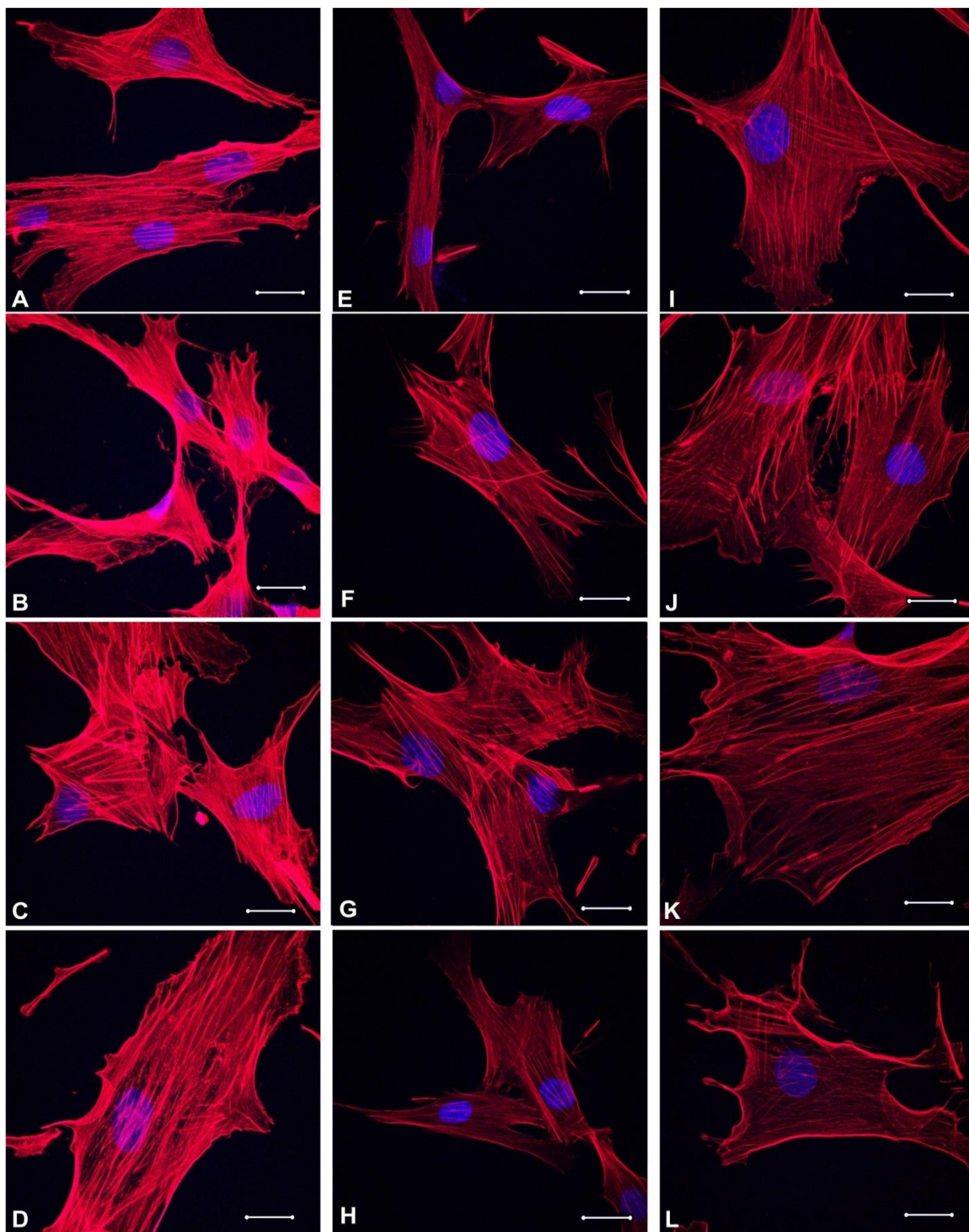


Рис. 32. Репрезентативные фото МСК, окрашенных DAPI (ядра) и TRITC-фаллоидином (F-актин). A-D –Контроль, E-H – Si (100 мкг/мл), I-L – Si/B (100 мкг/мл). Масштабный отрезок 20 мкм.

Проведенная оценка распределения актиновых филаментов по толщине клетки свидетельствовала о том, что во всех исследованных группах («Контроль 24 ч», «Si 24 ч»,

«Si/B 24 ч») имело место центральное расположение актиновых фибрилл без смещения к поверхности клетки (рис. 33).

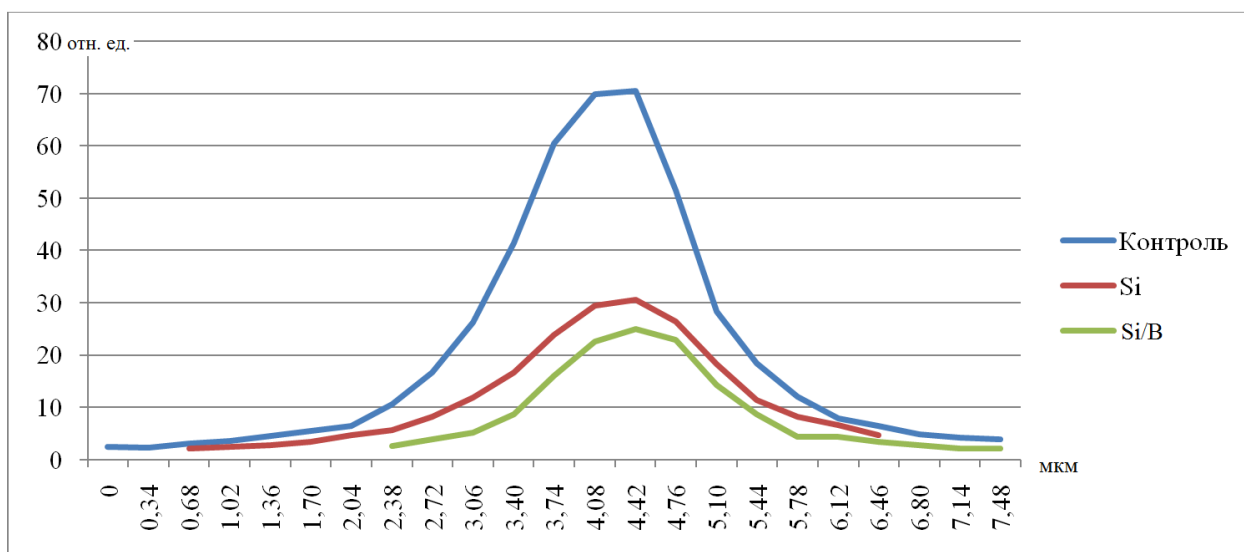


Рис. 33. Интенсивность флуоресценции FITC-фаллоидин (F-актин), полученная на разных глубинах клеток МСК (z-стек) в контроле, при обработке наночастицами Si и Si/B в концентрации 100 мкг/мл и отнормированные по моде распределения.

Есть данные, что НЧ способны изменять механические свойства клеток. Так, [Pi J. et al. 2013] исследовали влияние селеновых НЧ на биомеханические свойства и структуру F-актина клеток MCF-7 методами атомно-силовой и конфокальной микроскопии. Было показано, что сила адгезии и модуль Юнга, как и флуоресценция F-актина достоверно снижаются при инкубации этих клеток в течение 24 часов с НЧ Se в концентрациях 2.5 и 5 мкг/мл. Аналогичные результаты получили [Xu F. et al., 2013] на культивируемых кортикальных нейронах крыс при их взаимодействии с НЧ серебра. При этом снижение флуоресценции как F-актина, так и  $\beta$ -тубулина было достоверным и дозозависимым (при концентрациях НЧ от 1 до 10 мкг/мл). [Gupta A.K. et al., 2004] исследовали культуру клеток фибробластов человека при ее обработке НЧ желатина. Было показано, что данные НЧ размером 50 нм легко проникали через клеточную мембрану и практически не оказывали цитотоксического эффекта, о чем свидетельствовала хорошая выживаемость клеток и нормальная ультраструктура (вплоть до концентрации 500 мкг/мл). Однако, при захвате НЧ фагоцитозом авторы отмечали вакуоли, которые, по их мнению, могут разрушать цитоскелетные структуры клеток [Gupta A. K. et al., 2004]. [Allouni Z. E. et al., 2012], показали, что НЧ TiO<sub>2</sub> проникают в клетки фибробластов L929 при действии цитохалазина D так же, как и в его отсутствие.

Полученные значения жесткости МСК вполне характерны для немышечных клеток человека, таких как фибробласты, лимфоциты, мезенхимальные стволовые клетки, остеобласты, клетки эндотелия [Mathur A.V. et al., 2001; Costa K.D. et al., 2006; Cai X. et al., 2009; Hsieh C.H. et al., 2008].

Измеряемая при 60-нанометровом продавливании жесткость клеток отражает прежде всего состояние структуры мембраны и кортикального цитоскелета (рис. 8). Данные о том, чем определяется жесткость кортикального цитоскелета клеток противоречивы. Так, [Pelling A.E. et al., 2007] исследовали влияние нокодазола (nocodazole) – вещества, приводящего к деполимеризации тубулина, на механические свойства клеток NIH3T3, и показали, что механические свойства мембран снижаются, при этом не отмечается достоверных различий при использовании различных сред (с сывороткой и без). [Costa K.D. et al., 2006] исследовали механические характеристики клеток эндотелия аорты человека (НАЕС). Измерения проводили в контактном режиме в жидкости, глубина продавливания составляла 200 нм. Авторы обнаружили два типа клеток, различающихся по своему модулю Юнга: одни имели модуль упругости  $5.6 \pm 3.5$  кПа, а другие –  $1.5 \pm 0.76$  кПа. Однако после обработки цитохалазином В (в концентрации 4 мкМ) различий в механических характеристиках клеток обнаружено не было и их модуль Юнга составлял  $0.89 \pm 0.46$  кПа, то есть было достоверно ниже, чем до обработки актин-разрушающим агентом. [Collinsworth A. et al., 2002] также показали, что обработка цитохалазином D ведет к потере жесткости клеток, в то время как обработка колхицином, разрушающим микротрубочки, не приводит к изменениям жесткости.

Изменение жесткости может быть обусловлено целым рядом причин: локализацией точки измерения жесткости, изменением содержания белков, в частности соотношения F-актина и G-актина, изменением структурной организации кортикального цитоскелета, модификацией поверхности клетки.

Согласно данным [Mathur A.V. et al., 2001] жесткость клеток в районе проекции ядра существенно выше. Однако в своих измерениях эти авторы использовали глубины продавливания до 1 мкм. Поскольку в измерениях мы использовали глубину продавливания 60 нм, то полагаем, что наблюдаемые изменения жесткости клеток не связаны с локализацией точки измерения жесткости.

Можно предположить, что меньшая жесткость клеток в группе «Контроль 1ч» по сравнению с группой «Контроль 24 ч» связано с механическим воздействием на кортикальный цитоскелет при смене среды, что привело к обратимому нарушению его

структуры и, как следствие, зафиксированному незначительному, хотя и достоверному, снижению жесткости.

Тем не менее, остается не вполне ясным, с чем связано увеличение жесткости при инкубации клеток с различными частицами и чем обусловлено различие в значениях жесткости в зависимости от типа частиц.

С одной стороны, [Cai X. et al., 2009] сравнивая нормальные лимфоциты человека и Т-лимфобластные клетки человека линии Jurkat показали, что механические характеристики клеток могут являться и диагностическим параметром, например при анализе перерождения лимфоцитов. В этом случае увеличение жесткости клеток, отмеченное нами при их взаимодействии с НЧ на основе кремния, может быть одним из первых маркерных признаков их цитотоксического действия.

С другой стороны показано, что при взаимодействии НЧ и клеток модуль Юнга клеток в этих условиях уменьшается [Pi J. et al., 2013]. Однако, следует отметить, что в своих измерениях мы определяли непосредственно жесткость клеток, а не модуль Юнга. Жесткость является генерализованной характеристикой конструкции, что, по нашему мнению, больше соответствует физической природе изучаемого объекта.

Предположив изменение жесткой структуры кортикального цитоскелета, основной вклад в формирование которой вносит F-актин, мы решили определить его содержание, используя TRITC-фаллоидин, интенсивность флуоресценции которого в объеме клетки оценивали с помощью конфокальной микроскопии.

Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание F-актина под мембраной уменьшалось в ряду «Контроль»-«Si»-«Si/B», поскольку интенсивность флуоресценции фаллоидина снижалась в этой последовательности. При этом, прямое тушение флуоресценции F-актина НЧ кажется маловероятным, поскольку в то же время в наших исследованиях не отмечается снижение флуоресценции ядерного красителя DAPI. Переход актина из мембранной в цитоплазматическую фракцию может быть как в виде F-актина, с последующей диссоциацией до G-актина, так и сразу в виде G-актина. Транзиторное увеличение содержания G-актина, в свою очередь, может активировать некоторые сигнальные пути, например SRF-зависимые [Kuwahara K. et al., 2005]. Полученные нами данные о флуоресценции TRITC-фаллоидина после инкубации клеток с НЧ вполне согласуются с данными литературы [Xu F., 2013].

Следовательно, можно полагать, что отмеченное увеличение жесткости связано не с увеличением числа стресс-фибрилл. Возможно, свой вклад в увеличение жесткости вносит тубулиновый цитоскелет [Pelling A.E. et al., 2007]. Однако, на использованных

нами небольших глубинах продавливания при измерении жесткости, его вклад будет весьма незначителен [Collinsworth A. et al., 2002].

Поэтому более вероятным кажется предположение о реорганизации подмембранного цитоскелета. При уменьшении числа актиновых филаментов, но при более плотной их «упаковке», жесткость может возрасти. К такому же эффекту может привести увеличение содержания актин-связывающих белков в кортикальном слое актиновых филаментов при исходном уровне плотности стресс-фибрилл. Визуально отмеченное увеличение числа расположенных поперечно актиновых филаментов может приводить к увеличению жесткости структуры (рис. 32, В). При этом нельзя исключать и одновременной реализации этих сценариев.

Кроме того, модификация поверхности клеток также может приводить к увеличению их жесткости. Увеличение дисперсии значений жесткости клеток в выборке при 1-часовой инкубации, по сравнению с 24-часовой, позволяет предположить, что процесс взаимодействия клеток с частицами находится в активной фазе. При этом часть клеток к моменту измерения уже подверглась действию частиц, а часть – нет; или процесс взаимодействия клеток и частиц как минимум двухстадийный – сначала частицы связываются с поверхностью клеток, модифицируя ее механические свойства, а затем, проникают внутрь клеток, модифицируя структуру кортикального цитоскелета. В пользу второго варианта развития событий свидетельствуют данные о средних значениях жесткости: через 1 час инкубации с частицами жесткость клеток выше, чем через 24 часа. Именно взаимодействие с клеточной мембраной может запускать процесс перестройки кортикального цитоскелета.

Однако, анализируя причины изменения жесткости клеток, следует отметить, что подложкой при культивировании и последующем измерении жесткости служило стекло, что согласно данным литературы [Docheva D. et al., 2008; Takai E. et al., 2005; Yim E.K.F. et al., 2010] может приводить к нехарактерным перестройкам цитоскелета, снижая измеряемую жесткость клеток. В то же время все группы клеток культивировались в одинаковых условиях, что позволяет с уверенностью говорить о наблюдаемых эффектах изменения механических характеристик клеток при их инкубации с НЧ.

Таким образом, инкубация МСК с НЧ Si и Si/B приводит к увеличению жесткости их кортикального цитоскелета на фоне снижения содержания F-актина. Механизм такого увеличения остается не вполне ясным, но, по-видимому, связан с реорганизацией структуры, например, с увеличением числа «сшивок» между стресс-фибриллами вслед за модификацией поверхности клеток или/и взаимодействием с мембраной.



## Заключение

Ряд методов оценки цитотоксичности наноматериалов изложен в методических рекомендациях Роспотребнадзора 2009 г. «Оценка биобезопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*». В данном документе представлены различные, в том числе дешевые и простые методы оценки токсичности различных веществ и материалов. Такие методы давно и широко применяются в экологии, медицине и смежных областях и в них используются такие модельные объекты, как бактерии, дрожжевые грибы, различные ракообразные и т. д.. Однако, данные модели не позволяют детально изучить те возможные реакции клеток, тканей и органов организма млекопитающего, которые должны быть известны при использовании НЧ в качестве компонентов лекарств и в других биотехнологических областях. По этой причине крайне важно иметь способы изучения токсических свойств НЧ *in vitro*, в которых в качестве моделей будут выступать именно те клетки, которые должны контактировать с изучаемыми НЧ. В то же время исследования *in vivo* не позволяют, либо затрудняют оценку реакций на НЧ отдельных клеток и тканей и таких параметров, как влияние НЧ на клеточную пролиферацию, репродуктивный потенциал, оценку канцерогенных свойств, способность к поглощению НЧ различными типами клеток и определение путей поглощения. А также их проведение дороже, требует больше времени и часто противоречит биоэтическим требованиям. Поэтому при анализе цитотоксических свойств НЧ как с экономической точки зрения, с позиции биоэтики, так и с позиции научного подхода представляется целесообразным использование клеточных культур *in vitro* в качестве основного метода оценки цитотоксичности.

В результате проведенной работы апробирован метод оценки цитотоксичности НЧ *in vitro*, который может быть использован в отношении различных НЧ в разных концентрациях. Показана возможность детектировать *in vitro* изменения под воздействием НЧ таких клеточных параметров, как жизнеспособность, изменения митохондриального и лизосомального компартментов, продукцию АФК, скорость пролиферации.

Показана хорошая степень биосовместимости НЧ Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO<sub>2</sub> и их перспективность для использования в биотехнологии. Не выявлено цитотоксических свойств всех исследованных НЧ, которые приводили бы к увеличению числа погибших МНК относительно контроля, а среди погибших клеток не наблюдалось изменения доли клеток в состоянии апоптоза, некроза и позднего апоптоза. Однако, при анализе МСК показана незначительная (не более 15%) токсичность НЧ кремния, модифицированного металлами и для НЧ SiO<sub>2</sub>. Учитывая тот факт, что для всех НЧ, кроме диоксида кремния,

клетки погибали преимущественно путем апоптоза, а в экспериментах с НЧ SiO<sub>2</sub> путем некроза, можно говорить о том, что НЧ SiO<sub>2</sub> менее биосовместимы, так как клеточная гибель путем апоптоза для организма предпочтительнее, чем некроз. Таким образом, можно заключить, что в отношении клеток различного типа НЧ способны проявлять разную степень цитотоксичности, что возможно модулировать путем модификаций.

При анализе всех использованных НЧ для МНК были подтверждены многочисленные данные других исследований, где показано увеличение уровня АФК при инкубации клеток с НЧ различного типа (металлсодержащих, органических). Однако, в отличие от анализа жизнеспособности, где МНК показали большую устойчивость своего нормального состояния, в случае с МСК напротив, не наблюдалось увеличения уровня АФК, а инкубация МСК с НЧ Si/V и Si/Ag приводила к его понижению. Таким образом, нельзя утверждать, что увеличение уровня АФК является обязательным условием активации механизмов клеточной гибели. Однако, в экспериментах с модифицированными металлами НЧ при их концентрации 10 мкг/мл уровень АФК был выше, чем при 100 мкг/мл, что сопровождалось незначительным снижением жизнеспособности при концентрации НЧ 10 мкг/мл. Также модифицированные золотом и серебром НЧ кремния повышали продукцию провоспалительных интерлейкинов и IL-10.

При анализе действия исследуемых НЧ на лизосомальный и митохондриальный компартменты, показаны различные эффекты – как повышения, так и снижения активности этих органелл. Данные эффекты зависят как от модификации НЧ, так и от типа клеток. В результате чего сложно с уверенностью говорить о том, что те или иные изменения состояния митохондриального и лизосомального компартмента играют ключевую роль в наблюдаемом в ряде случаев незначительном снижении клеточной жизнеспособности. Конечно, подобные изменения являются отклонением от обычного клеточного гомеостаза и следовательно, потенциально опасны для клетки. Однако, для НЧ Si также была показана способность стимулировать пролиферацию фетальных фибробластов человека, что свидетельствует о том, что протекающие в клетке (либо в клеточной среде культивирования) под воздействием НЧ процессы не нарушают и не угнетают базовых клеточных функций.

Для НЧ Si/V получены результаты, свидетельствующие в пользу способности данных НЧ поглощаться клетками. Эти НЧ синтезировались для использования в борнейтрон захватной терапии, для чего они должны проникать в клетку. При анализе светорассеяния показано, что эти НЧ либо оседали на мембране, либо проникали в клетку,

что согласуется с изменением жесткости клеточной мембраны, также показанной для НЧ Si/B.

Таким образом, в результате проведенной работы подтверждена высокая степень биосовместимости НЧ чистого кристаллического кремния. Показано, что модификация таких НЧ благородными металлами способна изменять характер их взаимодействия с клетками разных типов. Выявлено, что НЧ Si/B, которые должны иметь контакт с клеткой для их применения в бор-захватной терапии, действительно, как минимум сорбируются клеточной мембраной стромальных клеток.

При анализе современных исследований в области изучения цитотоксических свойств различных НЧ *in vitro* наблюдается отсутствие понимания механизмов, по которым НЧ взаимодействуют с клетками и проявляют свои цитотоксические свойства. Есть данные, что все полупроводниковые наноматериалы (кремний также является полупроводником) способны действовать как фотокатализаторы, в результате чего на поверхности НЧ происходит реакция с кислородом, продуктом которой являются АФК [O'Farell N., Houlton A., Horrocks B.R. 2006], а также можно встретить осторожные предположения, что токсичность НЧ может быть обусловлена их взаимодействием с клеточной мембраной [Pan Y. et al., 2007]. Наиболее часто эффекты воздействия НЧ на клетку объясняются диффундированием ионов металлов с их поверхности в окружающую среду, т. е. в контексте *in vitro* модели - в среду культивирования или в цитоплазму клетки и ее компартменты.

Дисциплина изучения цитотоксических свойств НЧ *in vitro* является молодой, но востребованной областью. Наноматериалы уже применяются в промышленности и биотехнологии и со временем количество различных типов наноматериалов и масштабы их применения будут только увеличиваться. Как следствие, будет увеличиваться частота контактов наноматериалов с организмом человека при их медицинском применении и в следствии неизбежного попадания наноматериалов в окружающую среду. В результате чего с одной стороны мы имеем большое количество наноматериалов, с другой - сложности в оценке их цитотоксических свойств, сопоставимые с оценкой безопасности новых лекарственных средств. Это ставит перед нами задачу разработки методов оценки воздействия наноматериалов на организм человека и апробированная в нашей работе модель *in vitro* показала свою актуальность в данном вопросе.

## Выводы

- 1) Все исследованные НЧ (Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO<sub>2</sub>), при их взаимодействии с несколькими типами культивируемых *in vitro* клеток человека (мезенхимальные стромальные клетки, мононуклеары, эмбриональные фибробласты) в течение 24-48 ч *in vitro* оказывали физиологическое воздействие на функциональные характеристики культивируемых клеток.
- 2) При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови человека *in vitro* все наночастицы кремния (кроме наночастиц диоксида кремния) индуцировали повышение уровня активных форм кислорода. Наночастицы, модифицированные благородными металлами (Ag и Au), вызывали функциональное понижение трансмембранного потенциала митохондрий этих клеток, тогда как наночастицы чистого кремния, а также их модификации бором и золотом приводили к снижению активности лизосом этих клеток.
- 3) Наночастицы кремния, модифицированные благородными металлами (Ag и Au) вызывали увеличение доли лимфоцитов, несущих маркеры активации (CD-25, HLA-DR), а также стимуляцию продукции провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 и противовоспалительного IL-10. Однако, это увеличение было существенно ниже ФГА-стимулированной активации, при которой наночастицы не оказывали аддитивного эффекта как на экспрессию маркеров активации, так и синтез провоспалительных цитокинов.
- 4) В мезенхимальных стромальных клетках при инкубации с наночастицами Si/B и Si/Ag отмечено снижение уровня активных форм кислорода, активность лизосомального компартмента увеличивалась при инкубации с Si/B и снижалась в случае с Si/Au, трансмембранный потенциал митохондрий возрастал при инкубации с наночастицами Si и Si/Pd и снижался при инкубации с наночастицами Si/B.
- 5) Кратковременное (1-24 ч) взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток человека с наночастицами Si и Si/B приводило к увеличению жесткости их кортикального цитоскелета и изменениям структуры F-актина, что не влияло на жизнеспособность клеток.
- 6) Наночастицы чистого Si без модификаций при кратковременной экспозиции обладают высокой биосовместимостью, которая зависит от концентрации и типа клеток, на которые они действуют. Модификация металлами придает данным наночастицам способность влиять на состояние митохондрий и лизосом.

## Список литературы

1. Аверченко Е.А., Кавок Н.С., Степаненко А.М., Боровой И.А., Малюкина М.Ю. Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса. // Бюллетень биофизики. - 2009. - Т.22. - №1. - С. 49-56.
2. Андреева Е.Р., Рудимов Е.Г., Горностаева А.Н. Взаимодействие кремнийсодержащих наночастиц с лейкоцитами периферической крови человека: исследование *in vitro*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т. 155. - №3. - С. 377-380.
3. Беклемишев В., Пустовой В., Коровин С., Владимиров А., Мауджери У. Получение содержащих бор-кремний наночастиц. // Наноиндустрия. - 2011. - №5. - С. 44-45.
4. Белый Ю.А., Темнов А.А., Миргородская С.А. Разработка технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток с магнитными частицами для субретинального введения. // Вестник ОГУ. - 2013. - Т. 4. - С. 40–43.
5. Беляева Т.Н., Салова А.В., Леонтьева Е.А., Моженко Т.П., Корнилова Е.С., Кроленко С.А. Нецелевые квантовые точки в прижизненных конфокально-микроскопических исследованиях клеток. // Цитология. - 2009. - Т. 51. - №10. - С. 830-836.
6. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Даугель-Дауге Н.О., Жанатаев А.К., Шредер Е.Д., Немова Е.П., Шредер О.В., Велигура В.А., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю., Середенин С.Б. Исследование генотоксической и тератогенной активности нанокристаллов кремния. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2010 - Т. 149. - №4. - С. 429-433.
7. Дымкан Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение. Москва. Наука. - 2008.
8. Жорник Е.В., Баранова Л.А., Дрозд Е.С., Судас М.С., Тьяу Н.Х., Быу Н.К., Зунг Ч. Т.Н., Чижик С.А., Волотовский И.Д. Наночастицы серебра индуцируют процессы перекисного окисления липидов и морфологические изменения поверхности лимфоцитов человека. // Биофизика. - 2014. – Т. 59. - №3. - С. 466-473.
9. Жорник Е.В., Емельянова В.П., Баранова Л.А., Волотовский И.Д. Экспрессия генов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 в лимфоцитах в присутствии углеродных нанотрубок. // Известия национальной академии наук Беларуси. – 2009. - №3. - С.47-50.
10. Искусных И. Ю., Попов А. Л., Попова Т. Н., Кашкаров В. М., Ципенюк В. Н. Влияние нанокристаллического кремния на биологическую активность и

- пролиферацию фибробластов и клеток карциномы гортани. // Вестник ВГУ. - 2012. - Т.1. – С. 96-102.
11. Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. Нанокремний: свойства, получение, применение, методы исследования и контроля. Физматлит. – 2011.
  12. Каливраджиян Э.С., Крючков М.А., Чиркова Н.В., Гордеева Т.А. Влияние нанокремния на физико-механические свойства цинк-фосфатного цемента. // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. - 2011. - Т.10. - №1. - С. 126-128.
  13. Каливраджиян Э.С., Чиркова Н.В., Рыжова И.П., Примачева Н.В. Результаты исследования биосовместимости стоматологических материалов, модифицированных наночастицами кремния и серебра. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. - 2012. - Т.17. - №4-1. - С. 269-275.
  14. Кирошка В.В., Самченко И.И., Надутов В.М., Перекос А.Е., Войнаш В.З., Бондаренко Т.П. Взаимодействие наночастиц магнетита с культурой альвеолярных макрофагов при разных концентрациях белка. // Наука и инновации. - 2011. - Т.7. - №6. - С. 44-49.
  15. Колбин И.А., Колесников О.Л. Изменение показателей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови доноров после инкубации с наночастицами диоксида кремния. // Вестник Южно-Уральского гос. Университета. - 2011. - №20. - С. 116-119.
  16. Колдаева Е.Ю., Григорьева Е.Ю., Кулаков Н.В. Влияние меркапто-клозо-додекабората на жизнедеятельность клеток меланомы. // Лучевая диагностика и терапия. – 2011. - Вып. 2. - №1. - С. 117-121.
  17. Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 15 лет исследований. // Российские нанотехнологии. - 2008. - Т. 3. - №3-4. - С. 54-61.
  18. Ксенофонтова О.И., Васин А.В., Егоров В.В., Бобыль А.В., Солдатенков Ф.Ю., Теруков Е.И., Улин В.П., Улин Н.В., Киселев О.И. Пористый кремний и его применение в биологии и медицине. // Журнал технической физики. - 2014. - Т. 84, - №1. - С. 67-78.
  19. Латышевская Н.И., Стрекалова А.С. Экологические проблемы развития нанотехнологий. // Экон. Экол. - 2011. - №1. - С. 224-230.

20. Лившиц В.А., Демишева И.В., Мешков Б.Б., Цыбышев В.П., Алфимов М.В. Исследование сорбции и молекулярной динамики спин-меченых молекул на поверхности наночастиц двуокиси кремния. // Российские нанотехнологии. - 2008. - Т. 4. - С. 99-109.
21. Мешалкин Ю.П., Бгатова Н.П. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии. // Journal of Siberian Federal University. - 2008. - Vol. 3. - P. 248–268.
22. Михеева Э.Р., Плескова С.Н., Балалаева И.В. Поглощение квантовых точек нейтрофильными гранулоцитами и эффекты их взаимодействия с клетками. // International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov. - 2009. - №2. - P. 153-154.
23. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. Техносфера, Москва. Перевод с английского Хромова-Борисова Н.Н. – 2005.
24. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. // Российские нанотехнологии. - 2007. - Т.2. - №1-2. - С. 162-173.
25. Онищенко Г.Г. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в условиях расширенного использования наноматериалов и нанотехнологий. // Гигиена и санитария. - 2010. - №2. - С. 4-7.
26. Осминкина Л.А., Гонгальский М.Б., Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А. Кремниевые НЧ как эффективные соносенсибилизаторы для лечения опухолей. // Онкохирургия. – 2010. - Т.3. - №1. - С. 34-36.
27. Осминкина Л.А., Лукьянова Е.Н., Гонгальский М.Б., Кудрявцев А.А., Гайдарова А.Х., Полтавцева Р.А., Тимошенко В.Ю., Кашкаров П.К., Сухих Г.Т. Влияние наноструктурированного кремния на процессы пролиферации стволовых и раковых клеток. // Бюллетень экспериментальной биологии. – 2011. - Т.151. - №1. - С.91-95
28. Петрова Е.А., Дражина Н.П., Семенова Е.М., Воробьева С.А. Применение магнитных наночастиц для маркирования мезенхимальных стволовых клеток. // Вестник БГУ. - 2012. - №3. - С. 54-59.
29. Подколотная О.А., Игнатьева Е.В., Подколотный Н.Л., Колчанов Н.А. Пути поступления наночастиц в организм млекопитающих, их биосовместимость и клеточные эффекты. // Успехи современной биологии. - 2012. - Т.132. - №1. - С. 3-15.

30. Пупышев А.Б. Пермеабиллизация лизосомных мембран как апоптогенный фактор. // Цитология. - 2011. - Т.53. - №4. - С. 313-324.
31. Ревина А.А., Баранова Е.К., Мулюкин А.Л., Сорокин В.В. Некоторые особенности воздействия кластерного серебра на дрожжевые клетки *Candida utilis*. // «Исследовано в России» - 2005. - № 1. - Р. 1403–1409.
32. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - Т.7. - №6. - Р. 4–10.
33. Терещенко В.П., Картель Н.Т. Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы. Монография. Киев. Наукова думка. - 2010.
34. Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А, Белоусов В.В., Воротников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. // Биологические мембраны. - 2012. - Т.29. - №1-2. - С. 21-37.
35. Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И., Мишина Н.М., Белоусов В.В., Воротников А.В. НАД(Ф)Н оксидаза регулирует EGF-зависимую пролиферацию клеток по механизму, отличному от активации ERK1/2 MAP-киназ. // Биофизика. - 2010. - Т. 55. - С. 1048-1056.
36. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Культуры клеток в моделировании инфекционных процессов. // Успехи современной биологии. - 2014. - №1. - С. 19-25.
37. Фрешни Р. Культура животных клеток. - Москва. Бином. Лаборатория знаний. 2010. С. 406.
38. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии: Поверхностные явления и дисперсионные системы. Москва. - Химия. - 1989. С. 464.
39. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск. - Челябинская государственная медицинская академия Росздрава. . – 2008.- С. 7.
40. Чеканов А.В., Баранова О.А., Левин А.Д. Исследование влияния наночастиц золота на активацию полиморфно-ядерных лейкоцитов крови человека. // Биофизика. - 2013. - Т. 58. - №3. - С. 495-500.
41. Шубенков А.Н., Коровин С.Б., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Пустовой В.И. Модификация поверхности наночастиц кремния серебром или золотом снижает их биосовместимость *in vitro*. // Цитология. – 2014. - Т. 56. - №7. - С. 511-515.



42. Янушева Е.В., Мирошников С.В., Кван О.В. Оценка влияния наночастиц металлов на морфологические показатели периферической крови животных. // Вестник ОГУ. - 2013. - № 12. - P. 203–207.
43. Adili A., Crowe S., Beaux M., Cantrell T., Shapiro P.J., McIlroy D. N., Gustin K. E. Differential cytotoxicity exhibited by silica nanowires and nanoparticles. // *Nanotoxicol.* - 2008. - Vol 2. - № 1. - P.1-8.
44. Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2009. - Vol. 61. - № 6. - P. 428–437.
45. Ahamed M. Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. // *Hum. Exp. Toxicol.* - 2013. - Vol. 32. - № 2. - P. 186–195.
46. Ahamed M., Alsalhi M.S., Siddiqui M.K.J. Silver nanoparticle applications and human health. // *Clin. Chim. Acta.*- 2010. - Vol. 411. - № 23-24. - P. 1841–1848.
47. Akerman M.E., Chan W.C.W., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. // *PNAS.* - 2002. - Vol. 99. - № 20. - P. 12617–12621.
48. Allouni Z.E., Hol P.J., Cauqui M.A., Gjerdet N.R., Cimpan M.R. Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by fibroblasts. // *Toxicol. In Vitro.* Elsevier Ltd. - 2012. - Vol. 26. - № 3. - P. 469–479.
49. Anderson S.H.C., Elliott H., Wallis D.J., Canham L.T., Powell J.J. Dissolution of different forms of partially porous silicon wafers under simulated physiological conditions // *Phys. Status Solidi.* - 2003. - Vol. 197. - № 2. - P. 331–335.
50. Arvizo R.R., Miranda O.R., Thompson M.A., Pabelic C.M., Bhattacharya R., Robertson J. D., Rotello V.M., Prakash Y.S., Mukherjee P. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. // *Nano Lett.* - 2010. - Vol. 10. - №7. - P. 2543-2548.
51. Asharani P.V, Hande M.P., Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. // *BMC Cell Biol.* - 2009. - Vol. 10. - P. 65.
52. Avalos A., Haza A.I., Mateo D., Morales P. Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. // *Int. Wound J.* - 2014. - P. 1–9.
53. Auffan M., Decome L., Rose J., Orsiere T., Meo M. D., Briois V., Chaneac C., Olivi L., Berge-Lefrance J-L., Botta A., Wiesner M. R., Bottero J.-Y. In Vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical

- and Cyto-Genotoxic Study. // *Environ. Sci. Technol.* - 2006. - Vol. 40. - № 14. - P. 4367–4373.
54. Ballou B., Ernst L.A., Andreko S., Harper T., Fitzpatrick J.A.J. Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. // *Bioconjug. Chem.* - 2007. - Vol. 18. - № 2. - P. 389–396.
  55. Baltazar G.C., Guha S., Lu W., Lim J., Boesze-Battaglia K., Laties A. M., Tuagi P., Kompella U.B., Mitchell C.H. Acidic nanoparticles are trafficked to lysosomes and restore an acidic lysosomal pH and degradative function to compromised ARPE-19 cells. // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7. - № 12. - P. 1-10.
  56. Betty Y. S., Kim M.D., James T., Rutka M.D., W.C.W. Chan. Nanomedicine. // *The new England journal of medicine.* - 2010. - Vol. 363. - № 25. - P. 2434-2443.
  57. Bhatia S.K., Yetter A.B. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. // *Cell Biol. Toxicol.* - 2008. - Vol. 24. - № 4. - P. 315–319.
  58. Bhattacharjee S. Hann L.H.J., Evers N.M., Jiang X., Marcelis A.T.M., Zuilhof H., Rietjens I.M.C.M., Alink G.M. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. // *Part. Fibre Toxicol.* - 2010. - Vol. 7. - № 25. - P. 1-12.
  59. Bogunia-Kubik K., Sugisaka M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine // *Biosystems.* - 2002. - Vol. 65. - № 2-3. - P. 123–138.
  60. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofman M-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. // *Toxicol. Sci.* - 2005. - Vol. 88. - № 2. - P. 412–419.
  61. Brayner R. The toxicological impact of nanoparticles. // *Nanotoday.* - 2008. - Vol. 3. - № 1-2. - P. 48–55.
  62. Bröker L.E., Kruyt F.A.E., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. // *Clin. Cancer Res.* - 2005. - Vol. 11. - № 9. - P. 3155–3162.
  63. Brown D.I., Griending K.K. Nox proteins in signal transduction. // *Free Radic. Biol. Med.* - 2009. - Vol.47. - P. 1239-1253.
  64. Brunk U.T., Neuzil J., Eaton J.W. Lysosomal involvement in apoptosis.// *Redox Rep.* - 2001. - Vol.6. - P.91-97.
  65. Burdon R.H., Gill V. Cellularly Generated Active Oxygen Species and Hela Cell Proliferation // *Free Radic. Res.* - 1993. - Vol. 19. - № 3. - P. 203–213.

66. Cai X, Cai J, Dong S, Deng H, Hu M. Morphology and mechanical properties of normal lymphocyte and Jurkat revealed by atomic force microscopy. // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* - 2009. - Vol.25. - №7. - P. 1107–1112.
67. Caporossi D., Ciafre S.A., Pittaluga M., Savini I., Farace M.G. Cellular responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts // *Free Radic. Biol. Med.* - 2003. - Vol. 35. - № 11. - P. 1355–1364.
68. Chan W.C. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection // *Science.* - 1998. - Vol. 281. - P. 2016–2018.
69. Chithrani B.D., Chan W.C.W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. // *Nano Lett.* - 2007. - Vol. 7. - № 6. - P. 1542–1550.
70. Choi J., Zhang Q., Reipa V., Wang N.S., Stratmeyer M.E., Hitchins V.M., Goering P.L. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of photoluminescent silicon nanoparticles with silicon micron-sized particles in RAW 264.7 macrophages. // *J. Appl. Toxicol.* - 2009. - Vol. 29. - P. 52–60.
71. Choi J., Zeng Q., Katz H.E., Guilarte T.R. Silica-based nanoparticle uptake and cellular response by primary microglia. // *Environ. Health Perspect.* - 2010. - Vol. 118. - № 5. - P. 589–595.
72. Chu P., Mills D. Laser-Induced Forces in Metallic Nanosystems: The Role of Plasmon Resonances // *Phys. Rev. Lett.* - 2007. - Vol. 99. - № 12. - P. 127401 (1-4).
73. Collinsworth A.M.Y.M., Zhang S., Kraus W.E., Truskey G.A. Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2002. - Vol. 283. - P. 1219–1227.
74. Costa K.D., Sim A.J., Yin F.C.-P. Non-Hertzian approach to analyzing mechanical properties of endothelial cells probed by atomic force microscopy. // *J. Biomech. Eng.* - 2006. - Vol. 128. - № 2. - P. 176–184.
75. Crane M., Handy R.D., Garrod J., Owen R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. // *Ecotoxicology.* - 2008. - Vol. 17. - P. 421–437.
76. Danek M. Jensen K.F., Murray C.B., Bawendi M.G. Synthesis of Luminescent Thin-Film CdSe/ZnSe Quantum Dot Composites Using CdSe Quantum Dots Passivated with an Overlayer of ZnSe // *Chem. Mater.* - 1996. - Vol. 8. - P. 173–180.

77. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H.J., Selegson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. // *Nature*. - 2010. - Vol. 464. - P. 1067–1070.
78. Demir E., Burgucu D., Turna F., Aksakal S., Kaya B. Determination of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embryonic kidney cells. // *J. Toxicol. Environ. Health. A*. - 2013. - Vol. 76. - № 16. - P. 990–1002.
79. Derfus A.M., Chan W.C.W., Bhatia S.N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. // *Nano Letters*. - 2004. - Vol.4. - №1. - P.11-18.
80. Dobrovolskaia M.A., Aggarwal P., Hall J.B., McNeil S.E. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. // *Molecular pharmaceutics*. -2008. - Vol. 5. № 4. - P. 487–495.
81. Docheva D., Padula D., Popov C., Mutschler W., Clausen-Schaumann H., Schieker M. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. // *J. Cell. Mol. Med.* - 2008. - Vol. 12. - № 2. - P. 537–552.
82. Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G., Alexander A. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. // *Toxicol. Sci.* - 2006. - Vol. 92. - № 1. - P. 5–22.
83. Duan H., Nie S. Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings. // *J Am Chem Soc.* - 2007. - Vol.129. - №11. - P.3333-3338.
84. Ehrenberg M.S., Eriedman A.E., Finkelstein J.N., Oberdorster G., McGrath J.L. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. // *Biomaterials*. - 2009. - Vol. 30. - P. 603–610.
85. Ekkapongpisit M., Giovia A., Follo C., Caputo G., Lsidoro C. Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: effects of size and surface charge groups. // *International Journal of Nanomedicine*. - 2012. - Vol 7. - P. 4147–4158.
86. Fabrega J., Luoma S.N., Tyler C.R., Galloway T.S., Lead J.R. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. // *Environ. Int.* - 2011. - Vol. 37. - P. 517–531.

87. Fang C., Shi B., Pei Y.Y. Hong M.H., Wu J., Chen H.Z. In vitro tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size. // *Eur J Pharm Sci.* - 2006. - Vol.27. - №1. - P.27-36.
88. Fede C., Selvestrel F., Compagnin C., Mognato M., Mancin F., Reddi E., Celotti L. The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox®) is influenced by testing techniques and treatment modalities. // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2012. - Vol. 404. - P. 1789–1802.
89. Florez L., Herrmann C., Cramer J.M., Hauser C.P., Koynov K., Landfester K., Crespy D., Mailander V. How shape influences uptake: interactions of anisotropic polymer nanoparticles and human mesenchymal stem cells. // *Small.* - 2012. - Vol. 8. - № 14. - P. 2222–2230.
90. Foley S., Crowley C., Smaïhi M., Bonfils C., Erlanger B. F., Seta P., Larroque C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2002. - Vol. 294. - P. 116–119.
91. Freitas R.A. What is nanomedicine? // *Nanomedicine.* - 2005. - Vol. 1. - № 1. - P. 2–9.
92. Fubini B., Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis // *Free Radic. Biol. Med.* - 2003. - Vol. 34. - № 12. - P. 1507–1516.
93. Fujioka K., Hiruoka M., Sato K., Manabe N., Miyasaka R., Hanada S., Hoshino A., Tilley R. D., Manome Y., Hirakuri K., Yamamoto K. Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration. // *Nanotechnology.* - 2008. - Vol. 19. - P. 1-7.
94. Fujioka K., Hanada S., Kanaya F., Hoshino A., Sato K., Yokosuka S., Takigami Y., Hirakuri K., Shiohara A., Tilley R. D., Manabe N., Yamamoto K., Manome Y. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles // *J. Phys. Conf. Ser.* - 2011. - Vol. 304. - P. 1-5.
95. Giaretti W., Nusse M. Light scatter of isolated cell nuclei as a parameter discriminating the cell-cycle subcompartments. // *Methods Cell Biol.* - 1994. - Vol. 41. - P. 389-400.
96. Girotti A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. // *Journal of Lipid Research.* - 1998. - Vol. 39. - P. 1529–1542.
97. Goddard E.D., Vincent B. Polymer Adsorption and Dispersion Stability. // *Americ Chem Soc.* - 1984. - Vol. 16. - №3. - P 158-159.
98. Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T., Rotello V.M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. // *Bioconjug. Chem.* - 2004. - Vol. 15. - № 4. - P. 897–900.

99. Green M., Howman E. Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. // *Chem Commun.* - 2005. - № 1. - P.121-123.
100. Greulich C., Diendorf J., Simon T., Eggeler G., Epple M, Koller M. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.* - 2011. - Vol. 7. - P. 347–354.
101. Gupta A.K., Gupta M., Yarwood S.J., Curtis A.S.G. Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts. // *J. Control. Release.* - 2004. - Vol. 95. - P. 197–207.
102. Gupta A.K., Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. // *Biomaterials.* - 2005. - Vol. 26. - № 13. - P. 1565–1573.
103. Halamoda K.B., Chapuis B.C., Guney-Ayra S.,Juillerat-Jeanneret L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. // *Biochem. J.* - 2012. - Vol. 441. - P. 813–821.
104. Han S.-M., Lee H-W., Bhang D-H., Seo K-W., Youn H-Y. Canine mesenchymal stem cells are effectively labeled with silica nanoparticles and unambiguously visualized in highly autofluorescent tissues. // *BMC Vet. Res.* - 2012. - Vol. 8. - № 145. - P. 1-9.
105. Hansen J.M., Go Y.-M., Jones D.P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2006. - Vol. 46. - P. 215–234.
106. Hartung T., Bremer S., Casati S., Coecke S., Corvi R., Fortaner S., Gribaldo L., Halder M., Roi A. J., Prieto P., Sabbioni E., Worth A., Zuang V. ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies. // *Altern Lab Anim.* -2003. - Vol 31. - №5. - P.473-481
107. Harush-Frenkel O., Debotton N., Benita S., Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2007. - Vol. 353. - P. 26–32.
108. He Y., Kang Z-H., Li Q-S., Tsang C.H.A., Fan C-H., Lee S-T. Ultrastable, Highly Fluorescent, and Water-Dispersed Silicon-Based Nanospheres as Cellular Probes // *Angew. Chemie.* - 2009. - Vol. 121. - P. 134–138.
109. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. // *Acad. Press.* - 1996. - P. 785
110. Hild W.A., Breunig M., Goepferich A. Quantum dots - nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2008. - Vol. 68. - № 2. - P. 153–168.

111. Hsieh C.-H., Lin Y.-H., Lin S., Tsai-Wu J.-J., Wu C. H.H., Jiand C.-C. Surface ultrastructure and mechanical property of human chondrocyte revealed by atomic force microscopy. // *Osteoarthritis Cartilage*. - 2008. - Vol. 16. - № 4. - P. 480–488.
112. Huang X., Jain K.P., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. // *Lasers in medical science*. - 2008. - Vol.23. - №3. - P. 217–228.
113. Huang X., Zhang F., Wang H., Niu G., Choi K.Y., Swierczewska M., Zhang G., Gao H., Wang Z., Zhu L., Choi H.S., Lee S., Chen X. Mesenchymal stem cell-based cell engineering with multifunctional mesoporous silica nanoparticles for tumor delivery. // *Biomaterials*. - 2013. - Vol.34. - №7. - P. 1772-1780.
114. Inkielewicz-Stepniak I., Santos-Martinez M.J., Medina C., Radomski M.W. Pharmacological and toxicological effects of co-exposure of human gingival fibroblasts to silver nanoparticles and sodium fluoride. // *Int. J. Nanomedicine*. - 2014. - Vol. 9. - P. 1677–1687.
115. Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M. On the generation of free radical species from quantum dots. // *Small*. - 2005. - Vol.1. - №7. - P. 706–709.
116. Jain A.K., Mehra N.K., Lodhi N., Dubey V., Mishra D.K., Jain P.K., Jain N.K. Carbon nanotubes and their toxicity // *Nanotoxicology*. - 2007. - Vol. 1. - № 3. - P. 167–197.
117. Jin Y., Kannan S., Wu M., Zhao J.X. Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. // *Chem Res Toxicol*. - 2007. - Vol.20. - №8. - P. 1126-1133
118. Jong W.H. De. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. // *International Journal of Nanomedicine*. - 2008. - Vol. 3. - № 2. - P. 133–149.
119. Karajanagi S.S., Vertegel A.A., Kane R.S., Dordick J.S. Structure and Function of Enzymes Adsorbed onto Single-Walled Carbon Nanotubes. // *Langmuir*. - 2004. - Vol. 20. - №26. - P. 11594-11599.
120. Kelm E., Korovin S., Pustovoy V., Surcov A., Vladimirov A. Luminiscent silicon nanoparticles with magnetic properties – production and investigation. // *Applied physics B: Lasers and optics*. - 2011. - Vol.105. - №3. - P. 599-606.
121. Klauser F., Stijepovic R., Endstrasser N., Jaksch S., Memmel N., Scheier P. Oxidation study of silicon nanoparticle thin films on HOPG // *Surf. Sci*. - 2009. - Vol. 603. - P. 2999–3004.
122. Klionsky D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. // *Molecular cell biology*. - 2007. - Vol. 8. - P. 931-937.

123. Korovin S.B., Krinetskii B.B., Pustovoy V.I., Fadeeva S., Konstantaki M., Koudoumas E., Couris S. Optical properties of metal-coated silicon nanocrystals. // *Proceedings of SPIE*. - 2000. - Vol. 4070. - P. 465–471.
124. Korovin S., Vasil`chenko S., Ogluzdin V., Pustovoi V. Optical properties of multishelled amorphous silicon nanoparticles. // *Proc. Of SPIE*. - 2005. - Vol. 5850. - P. 340–345.
126. Kovalev D., Cross E., Kunzner N., Koch F. Resonant Electronic Energy Transfer from Excitons Confined in Silicon Nanocrystals to Oxygen Molecules // *Phys. Rev. Lett.* - 2002. - Vol. 89. - № 13. - P. 137401-1 -137401-4.
127. Kreyling W.G., Semmler-Behnke M., Chaudhry Q. A complementary definition of nanomaterial // *Nano Today*. Elsevier Ltd. - 2010. - Vol. 5. - № 3. - P. 165–168.
128. Kroemer G., Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. // *Nat. Rev. Cancer*. - 2005. - Vol. 5. - № 11. - P. 886–897.
129. Kreyling W.G., Semmler-Behnke M., Chaudhry Q. A complementary definition of nanomaterial. // *Nano Today*. – 2010. - Vol.5. - P.165-168.
130. Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A. A flow cytometric method to assess nanoparticle uptake in bacteria. // *Cytometry Part A*. - 2011. - Vol. 79. - P. 707–712.
131. Kuwahara K., Takano M., Nakao K. Pathophysiological Significance of T-type Ca<sup>2+</sup> Channels: Transcriptional Regulation of T-type Ca<sup>2+</sup> Channel — Regulation of CACNA1H by Neuron-Restrictive Silencer Factor. // *J Pharmacol Sci*. - 2005. - Vol. 99. - P. 211–213.
132. Lee J.S., Seferos D.S., Giljohann D.A., Mirkin C.A. Thermodynamically controlled separation of polyvalent 2-nm gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - Vol.130. - №16. - P. 5430–5431.
133. Lemasters J.J., DiGuseppi J., Nieminen A.L., Herman B. Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. // *Nature*. -1987. - Vol.325. - P. 78-81.
134. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. // *Small*. - 2008. - Vol. 4. - № 1. - P. 26–49.
135. Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage // *Environ. Health Perspect.* - 2003. - Vol. 111. - № 4. - P. 455–460.



136. Li Z.F., Ruckenstein E. Water-soluble poly (acrylic acid) grafted luminescent silicon nanoparticles and their use as fluorescent biological staining labels. // *Nano Letters*. - 2004. - Vol.4. - №8. - P. 1463–1467.
137. Li T., Albee B., Alemayehu M., Diaz R., Ingham L., Kamal S., Rodriguez M., Bishnoi S. W.. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag-Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. - 2010. - Vol 398. - №2. - P. 689–700.
138. Li W., Zhao L., Wei T., Zhao Y., Chen C. The inhibition of death receptor mediated apoptosis through lysosome stabilization following internalization of carboxyfullerene nanoparticles. // *Biomaterials*. - 2011. - Vol.32. - № 16. - P. 4030–4041.
139. Lin W., Huang Y-w., Zhou X-D., Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2006. - Vol. 217. - P. 252–259.
140. Lin C.-A.J., Sperling R. A., Li J. K., Yang T-Y., Li P-Y., Zanella M., Chang W. H., Parak W. J. Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. // *Small*. - 2008. - Vol. 4. - № 3. - P. 334–341.
141. Loebinger M.R., Kyrtatos P. G., Turmaine M., Price A. N., Pankhurst Q., Lythgoe M. F., Janes S. M. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. // *Cancer Res.* - 2009. - Vol. 69. - № 23. - P. 8862–8867.
142. Lohbach C., Neumann D., Lehr C.M., Lamprecht A. Human vascular endothelial cells in primary cell culture for the evaluation of nanoparticle bioadhesion. // *J Nanosci Nanotechnol.* - 2006. - Vol.6. - № 9-10. - P.3303-3309.
143. Lovrić J., Cho S. J., Winnik F. M., Maysinger D. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. // *Chem. Biol.* - 2005. - Vol. 12. - P. 1227–1234.
144. Lu J., Liong M., Li Z., Zink J. I., Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. // *Small*. - 2010. - Vol. 6. - № 16. - P. 1794–1805.
145. Lu J., Liong M., Li Z., Zink J.I., Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. // *Small*. - 2011. - Vol.6. - №16. - P. 1794–1805.
146. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K. A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. // *PNAS*. - 2008. - Vol. 105. - № 38. - P. 14265–14270.

147. Lunov O., Syrovets T., Loos C., Beil J., Delacher M., Torn K., Nienhaus G.U., Musyanovych A., Mailander V., Landfester K., Simmet T. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. // *ACS Nano*. - 2011. - Vol.5. - №3. - P. 1657-1669.
148. Maiorano G., Sabella S., Sorce B., Brunetti V., Malvindi M. A. Cingolani R., Pompa P. P. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. // *ACS Nano*. - 2010. - Vol. 4. - № 12. - P. 7481–7491.
149. Masciangioli T., Zhang W-X. Environmental technologies at the nanoscale. // *Environ Sci Technol*. - 2003. - Vol. 37. - №5. - P. 102–108.
150. Mathur A.B., Collinsworth A.M., Reichert W.M., Kraus W.E., Truskey G.A. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. // *J. Biomech*. - 2001. - Vol. 34. - P. 1545–1553.
151. Maysinger D., Behrendt M., Przybytkowski E. Death by nanoparticles. // *NanoPharmaceuticals Online Journal*. - 2006. - Vol.1. - №1. - P. 1-21.
152. Maysinger D. Nanoparticles and cells: good companions and doomed partnerships. // *Org. Biomol. Chem*. - 2007. - Vol. 5. - № 15. - P. 2335–2342.
153. Michihara A., Toda K., Kubo T., Fujiwara Y., Akasaki K., Tsuji H. Disruptive Effect of Chloroquine on Lysosomes in Cultured Rat Hepatocytes. // *Biol. Pharm. Bull*. - 2005. - Vol. 28. - № 6. - P. 947–951.
154. Monteith G.R., Andrew D.M., Faddy H.M., Roberts-Thomson S.J. Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. // *Nature reviews. Nature rev. Cancer*. - 2007. - Vol.7. - P. 519–530.
155. Moore M.N. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. // *Histochem J*. - 1990. - Vol. 22. - P. 187-191.
156. Moore M.N., Deplege M.H., Radman J.W., Leonard P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. // *Mutation Res*. - 2004. - Vol 552. - P. 247-268.
157. Moore M.N., Redman J.A.J., Redman J.W., Lowe D.M., Frickers P.E., Beesley A. Lysosomal cytotoxicity of carbon nanoparticles in cells of the molluscan immune system: An in vitro study // *Nanotoxicology*. - 2009. - Vol. 3. - № 1. - P. 40–45.
158. Mousavi S.A., Malerod L., Berg T., Kjekshus R. Clatrin-dependent endocytosis. // *Biochem J*. - 2004. - Vol.377. - P.1-16.

159. Mühlfeld C., Rothen-Rutishauser B., Blank F., Vanhecke D., Ochs M., Gehr P. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* - 2008. - Vol.294. - P. L817–L829.
160. Murashov V., Harper M., Demchuk E. Impact of Silanol Surface Density on the Toxicity of Silica Aerosols Measured by Erythrocyte Haemolysis // *J. Occup. Environ. Hyg.* - 2006. - Vol. 3. - № 12. - P. 718–723.
161. Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E+S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. // *J. Am. Chem. Soc.* - 1993. - Vol. 115. - № 19. - P. 8706–8715.
162. Murrell A.C., Nunclan U.K., Chemical S. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. // *Biochem. J.* - 1990. - Vol. 265. - P. 659–665.
163. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. // *Science.* - 2006. - Vol.311. - P. 622–627.
164. Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M.V., Somasundarn P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. // *Nat. Mater. Nature.* - 2009. - Vol. 8. - P. 543–557.
165. Nusse M., Julch M., Geido E., Bruno S., Vinci A. D., Giaretti W., Ruoss K. Flow Cytometric Detection of Mitotic Cells Using the Bromodeoxyuridine / DNA Technique in Combination With 90 " and Forward Scatter Measurements. // *Cytometry.* - 1989. - Vol.10. - P. 312–319.
166. O'Farrell N., Houlton A., Horrocks B.R. Silicon nanoparticles: applications in cell biology and medicine. // *Int. J. Nanomedicine.* - 2006. - Vol.1. - № 4. - P. 451–472.
167. Ogneva I.V., Maximova M.V., Larina I.M. Structure of cortical cytoskeleton in fibers of mouse muscle cells after being exposed to a 30-day space flight on board the BION-M1 biosatellite. // *J Appl Physiol.* - 2014. - Vol.116. - №10. - P.1315-1323.
168. Oh J., Feldman M.D., Kim J., Condit C., Emelianov S., Milner T.E. Detection of magnetic nanoparticles in tissue using magneto-motive ultrasound // *Nanotechnology.* - 2006. - Vol.17. - P. 4183–4190.
169. Oloffs A., Grosse-Siestrup C., Bisson S., Rinck M., Rudolph R., Gross U. Biocompatibility of silver-coated polyurethane catheters and silver-coated Dacron material. // *Biomaterials.* - 1994. - Vol.15. - №10. - P. 753–758
170. Osaki F., Kanamori T., Sando S., Sera T., Aoyama Y. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2004. - Vol.126. - P. 6520–6521.

171. Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahnen-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. // *Small*. - 2007. - Vol.3. - № 11. - P. 1941–1949.
172. Panyam J., Zhou W., Prabha S., Sahoo S. K., Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. // *The FASEB Journal*. - 2002. - Vol.16. - №10. - P. 1217–1226.
173. Park J.-H., Gu L., Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. // *Nat. Mater.* Nature Publishing Group. - 2009. - Vol. 8. - №4. - P. 331–336.
174. Park K.S., Tae J., Choi B., Kim Y.S., Moon C., Kim S.H., Lee H.S., Kim J., Kim J., Park J., Lee J.H., Lee J. E., Joh J.W., Kim S. Characterization, in vitro cytotoxicity assessment, and in vivo visualization of multimodal, RITC-labeled, silica-coated magnetic nanoparticles for labeling human cord blood-derived mesenchymal stem cells. // *Nanomedicine*. - 2010. - Vol.6. - №2. - P. 263-276.
175. Pelling A.E., Dawson D.W., Carreon D.M., Christiansen J.J., Shen R.R., Teitell M.A., Gimzewski J.K. Distinct contributions of microtubule subtypes to cell membrane shape and stability. // *Nanomedicine*. - 2007. - Vol. 3. - № 1. - P. 43–52.
176. Perkins, T.N., Shukla, A., Peeters, P.M., Steinbacher, J.L., Landry, C.C., Lathrop, S.A., Steele C., Reynaert N.L., Wouters E.F.M., Mossman B.T. Mossman, B. T. Differences in gene expression and cytokine production by crystalline vs. amorphous silica in human lung epithelial cells. // *Particle and Fibre Toxicology*. - 2012. - Vol.9. - №6. - P.1-18.
177. Pi J., Yang F., Jin H., Huang X., Liu R., Yang P., Cai J. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Elsevier Ltd. - 2013. - Vol.23. - №23. - P. 6296–6303.
178. Pich A., Zhang F., Shen L., Berger S., Ornatsky O., Baranov V., Winnik M.A. Biocompatible hybrid nanogels. // *Small*. - 2008. - Vol.4. - №12. - P. 2171–2175.
179. Pigott G.H., Pinto P.J. Effects of nonfibrous minerals in the V79-4 cytotoxicity test. // *Environ Health Perspect*. - 1983. - Vol.51. - P. 173-179.
180. Qian Z.M., Li H., Sun H., Ho K. Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. // *Pharmacol Rev*. - 2002. - Vol.54. - №4. - P. 561–587.
181. Quisenberry L.R., Loetscher L.H., Boyd J.E. Catalytic inactivation of bacteria using Pd-modified titania // *Catal. Commun*. - 2009. - Vol.10. - №10. - P. 1417–1422.

182. Rabinow B., Chaubal M.V. Injectable nanoparticles for efficient drug delivery. // *Drugs Pharmaceut. Sic.* - 2006. - Vol.159. - P. 199-229.
183. Roth S., Dröge W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. // *Cell. Immunol.* - 1987. - Vol.108. - №2. - P. 417–424.
184. Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. // *Toxicol. Sci.* - 2006. - Vol.91. - №1. - P. 159–165.
185. Salzman G.C. Light Scatter: Detection and Usadge. // *Current Protocols in Cytometry.* - 2001. 1.13.1-1.13.8
186. Santra S., Zhang P., Wang K., Tapeç R., Tan W. Conjugation of Biomolecules with Luminophore-Doped Silica Nanoparticles for Photostable Biomarkers. // *Anal. Chem.* - 2001. - Vol.73. - №20. - P. 4988–4993.
187. Seleverstov O., Zabirnyk O., Zscharneck M., Bulavina L., Nowicki M., Heinrich J.-M., Yezhelyev., Emmrich F., O'Regan R., Bader A. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. // *Nano Lett.* - 2006. - Vol.6. - №12. - P. 2826–2832.
188. Serda R.E., Ferrati S., Godin B., Tasciotti E., Liu X., Ferrari M. Mitotic trafficking of silicon microparticles. // *Nanoscale.* - 2009. - Vol.1. - №2. - P. 250–259.
189. Service R.F. Calls Rise for More Research on Toxicology of Nanomaterials. // *Science.* - 2005. - Vol.310. - №9. - P. 2005.
190. Shahbazi M.-A., Hamidi M., Makila E.M., Zhang H., Almeida P.V., Kaasalainen M., Salonen J.J., Hirvonen J.T., Santos H.A. The mechanisms of surface chemistry effects of mesoporous silicon nanoparticles on immunotoxicity and biocompatibility. // *Biomaterials.* Elsevier Ltd. - 2013. - Vol.34. - №31. - P. 7776–7789.
191. Shen H-M., Zhang Z., Zhang Q-F., Ong C-N. Reactive oxygen species and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* - 2001. - Vol.280. - №1. - P. 10–17.
192. Shenton W. Davis S.A. Mann S. Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition // *Adv. Mater.* - 1999. - Vol.11. - №6. - P. 449-452.
193. Shiohara A., Hoshino A., Hanaki K., Suzuki K., Yamamoto K. On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots // *Microbiol. Immunol.* - 2004. - Vol.48. - № 9. - P. 669–675.

194. Shiohara A., Hanada S., Prabakar S., Fujioka K., Lim T.H., Yamamoto K., Northcote P. T., Tilley R. D. Chemical reactions on surface molecules attached to silicon quantum dots. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2010. - Vol.132. - №1. - P. 248–253.
195. Shvedova A.A., Castranova V., Kisin E.R., Schwegler-Berry D., Murray A.R., Gandelsman V.Z., Maynard A., Baron P. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. // *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* - 2003. - Vol.66. - №20. - P. 1909–1926.
196. Sohaebuddin S.K., Thevenot P. T., Baker D., Eaton J. W., Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. // *Part. Fibre Toxicol.* - 2010. - Vol.7. - №22. - P. 1-17.
197. Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. // *Ann. NY. Acad. Sci.* - 2008. - Vol.1147. - P. 37-52.
198. Stern S.T., McNeil S.E. Nanotechnology safety concerns revisited. // *Toxicol. Sci.* - 2008. - Vol.101. - № 1. - P. 4–21.
199. Stern S.T., Adisheshaiah P.P., Crist R.M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. // *Part. Fibre Toxicol.* - 2012. - Vol.9. - № 20. - P. 2-15.
200. Sundstrom J.B., Mao H., Santoianni R., Villinger F., Little D. M., Huynh T. T., Mayne A. E., Hao E., Ansari A. A. Magnetic Resonance Imaging of Activated Proliferating Rhesus Macaque T Cells Labeled With Superparamagnetic Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles. - 2004. - Vol.35. - №1. - P. 9-21.
201. Suresh A. K., Pelletier D. A., Wang W., Moon J. W., Gu B., Mortensen N. P., Allison D. P., Joy D. C., Phelps T. J., Doktycz M. J. Silver Nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an Evaluation of Their Comparative Toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. // *Environmental science & technology.* - 2010. - Vol.44. - №13. - P. 5210-5215.
202. Suzuki H., Toyooka T., Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. // *Environ. Sci. Technol.* - 2007. - Vol.41. - №8. - P. 3018–3024.
203. Takai E., Costa K.D., Shaheen A., Hung C.T., Guo X.E. Osteoblast Elastic Modulus Measured by Atomic Force Microscopy Is Substrate Dependent // *Ann. Biomed. Eng.* - 2005. - Vol. 33. - № 7. - P. 963–971.
204. Terman A., Kurz T., Gustafsson Brunk U.T. Lysosomal labilization. // *IUBMB Life.* - 2006. - Vol. 58. - № 9. - P. 531–539.

205. Thibodeau M.S., Giardina C., Knecht D.A., Hilble J., Hubbard. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. // *Toxicol. Sci.* - 2004. - Vol. 80. - № 1. - P. 34–48.
206. Thurn K.T., Brown E.M.B., Wu A., Vogt S., Lai B., Maser J., Paunesku T., Woloschak G. E. Nanoparticles for applications in cellular imaging. // *Nanoscale Res. Lett.* - 2007. - Vol. 2. - № 9. - P. 430–441.
207. Torchilin V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. // *AAPS J.* - 2007. - Vol. 9. - № 2. - P. E128–E147.
208. Tsuchiya T., Oguri I., Yamakoshi Y.N., Miyata N. Novel harmful effects of 60 fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo // *FEBS Lett.* - 1996. - Vol. 393. - № 1. - P. 139–145.
209. Unfried K., Albrecht C., Klotz L-O., Mikecz A.V., Grether-Beck S., Schins R.P.F. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. // *Nanotechnology.* - 2007. - Vol.1. - №1. - P. 52-71.
210. Visaria R.K., Griffin., Williams B.W., Ebbini E.S., Paciotti G.F., Song C.W., Bischof J. C. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-alpha delivery. // *Mol. Cancer Ther.* - 2006. - Vol. 5. - № 4. - P. 1014–1020.
211. Visnapuu M., Joost U., Juganson K., Kunnis-Beres K., Kahru A. Kisand V., Ivask A. Dissolution of silver nanowires and nanospheres dictates their toxicity to *Escherichia coli*. // *Biomed Res. Int.* - 2013. - Vol. 2013. - P. 1-9.
212. Vladimirov A., Korovin S., Surkov A., Kelm E., Pustovoy V. Synthesis of luminescent Si Nanoparticles using the laser-induced pyrolysis // *Laser Phys.* - 2011. - Vol. 21. - № 4. - P. 830–835.
213. Wang L., Reipa V., Blasic J. Silicon nanoparticles as a luminescent label to DNA. // *Bioconjug. Chem.* - 2004. - Vol. 15. - № 2. - P. 409–412.
214. Warner J.H., Hoshino A., Yamamoto K., Tilley R.D. Water-soluble photoluminescent silicon quantum dots. // *Angewandte Chemie.* - 2005. - Vol.117. - P. 4626–4630.
215. Winter M., Beer H.-D., Hornung V., Krämer U., Schins R.P.F., Förster I. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO(2) nanoparticles in murine dendritic cells. // *Nanotoxicology.* - 2011. - Vol 5. - №3. - P.326–340
216. Xia T., Korge P., Weiss J.N., Li N., Venkatesen M.I., Sioutas C., Nel A. Quinones and Aromatic Chemical Compounds in Particulate Matter Induce Mitochondrial Dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity // *Environ. Health Perspect.* - 2004. - Vol. 112. - № 14. - P. 1347–1358.

217. Xia T., Kovoichich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J.I., Wiesner M.R., Nel A.E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*. - 2006. - Vol 6. - №8. - P. 1794–1807.
218. Xia T., Kovoichich M., Liong M., Madler L., Gilbert B., Shi H. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. // *ACS Nano*. - 2008. - Vol 2. - №10. - P.2121-2134.
219. Xu F., Pielt C., Farkass S., Qazzaz M., Syed N. I. Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. // *Molecular Brain*. - 2013. - Vol. 6. - № 29. - P. 1-15.
220. Yim E.K.F., Darling E.M., Kulangara K., Guilak F., Leong K.W. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. // *Biomaterials*. Elsevier Ltd. - 2010. - Vol. 31. - № 6. - P. 1299–1306.
221. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vayssiere J.-L., Petit P.X., Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. // *J. Exp. Med*. - 1995. - Vol.181. - P. 1661-1672.
222. Zhang F.-F., Wan Q., Li C.X., Wang X.L., Zhu Z.Q., Xian Y. Z., Jin L.T., Yamamoto K. Simultaneous assay of glucose, lactate, L-glutamate and hypoxanthine levels in a rat striatum using enzyme electrodes based on neutral red-doped silica nanoparticles. // *Anal. Bioanal. Chem*. - 2004. - Vol. 380. - № 4. - P. 637–642.
223. Zucker R.M., Elstein K.H., Easterling R.E., Massaro E.J. Flow Cytometric Discrimination of Mitotic Nuclei by Right-Angle Light Scatter. // *Cytometry*. - 1988. - Vol. 9. - №3. - P. 226–231.
224. Zucker R.M., Perreault S.D., Elsteain K.H. Utility of Light Scatter in the Morphological Analysis of Sperm. - 1992. - Vol. 13. - №1. - P. 39–47.