На правах рукописи

Чумаков Даниил Сергеевич

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ФОТОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

специальность 03.01.02 – биофизика

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Воронеж -2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Научный руководитель:	доктор биологических наук, старший научный сотрудник Дыкман Лев Абрамович
Официальные оппоненты:	Морозова Ольга Владимировна доктор биологических наук, ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, отдел биофизики, лаборатория медицинских нанотехнологий, ведущий научный сотрудник
	Синдеева Ольга Александровна кандидат биологических наук, АНОО ВПО Сколковский институт науки и технологий, Центр нейробиологии и нейрореабилитации, научный сотрудник
Ведущая организация:	ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится «15» декабря 2020 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу 394018, г. Воронеж, Университетская пл., д.1, медико-биологический факультет, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Воронежского государственного университета http://www.science.vsu.ru.

Автореферат разослан _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета 212.038.03 доктор биологических наук, профессор

Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Золотые наночастицы (ЗНЧ) используют Актуальность темы. В биомедицинских исследованиях (Dreaden et al., 2012). Широкий спектр приложений во многом обусловлен их оптическими свойствами, которые связаны с коллективным возбуждением электронов проводимости (плазмонным резонансом). Плазмонно-резонансные наночастицы используют как усилители оптического сигнала при изучении биомакромолекул (Aldewachi et al., 2017), как фототермосенсибилизаторы при лазерной терапии (Abadeer, Murphy, 2016), для оптической визуализации тканей (Kim et al., 2017) и в других биофизических медицинских технологиях. Несмотря на обширное использование коллоидного золота, имеются пробелы в понимании некоторых вопросов, связанных с взаимодействием наночастиц с биологическими системами. Во-первых, не до конца выясненным является вопрос о размерной цитотоксичности ЗНЧ. Второй важной проблемой является оптимизация лазерной терапии опухолей на основе ЗНЧ. плазмонно-резонансных Она подразумевает подбор оптимальных геометрических параметров наночастиц; доз препарата; способа введения наночастиц в организм. Актуальна также оценка возможности сочетания метода с другими терапевтическими подходами.

В последние годы широкое распространение получили ультрамалые ЗНЧ размером ≤3 нм (Jiang *et al.*, 2018), не обладающие плазмонным резонансом. Известны примеры их использования в качестве антибактериальных агентов (Xie *et al.*, 2018), контрастирующих меток для биовизуализации (Yu *et al.*, 2015), модуляторов ферментативной активности (Fisher *et al.*, 2002), а также носителей противоопухолевых лекарственных препаратов (Zhou *et al.*, 2016).

В отличие от плазмонно-резонансных частиц, токсические свойства которых охарактеризованы весьма подробно (Khlebtsov, Dykman, 2011). биобезопасность ультрамалых ЗНЧ в отношении животных и растений в должной мере не исследована. Однозначно показано, что цельные препараты ультрамалых частиц обладают низкой биосовместимостью (Schmid et al., 2017). Однако не до конца выясненным представляется вопрос о том, какая именно составляющая препарата является токсичной: собственно, наночастицы или компоненты их дисперсионной среды. К примеру, фосфониевые ультрамалые наночастицы получают с использованием тетракис(гидроксиметил)фосфоний хлорида (ТГФХ) (Duff et al., 1993), который представляет собой высокотоксичное соединение, поэтому в дисперсионной среде частиц, получаемых таким способом, могут содержаться токсичные интермедиаты синтеза. Не вполне ясным является также вклад размера золотого ядра в совокупный токсический эффект препаратов ЗНЧ, отмечаемый для их многих типов. Следует принять во внимание, что в процессе

синтеза ЗНЧ используют высокотоксические соединения. Поэтому для корректного ответа на эти вопросы необходимо получить мелкие и крупные наночастицы с использованием одного и того же восстановителя, и стабилизирующих компонентов, чего до начала наших работ по данной теме сделано не было.

Важной областью биомедицинского применения ЗНЧ является плазмоннорезонансная фототермическая терапия (ПРФТ) злокачественных опухолей. На длине волны, соответствующей плазмонному резонансу, ЗНЧ интенсивно поглощают лазерное излучение и нагреваются, следствием чего является термолиз целевых тканей, находящихся в непосредственной близости от наночастиц (Huang *et al.*, 2008). Данный метод позволяет существенно повысить селективность нагрева по сравнению с традиционной лазерной термотерапией. Преимуществами использования ЗНЧ в качестве фототермосенсибилизаторов являются: фотостабильность; возможность настройки плазмонного резонанса на ближнюю спектральную инфракрасную область (800-1350 нм) (Averitt *et al.*, 1999), которая представляет собой, так называемое, «окно прозрачности биотканей» (Weissleder, 2001); отсутствие необходимости межфазового переноса наночастиц, так как их синтез происходит в водных средах (Hühn *et al.*, 2016).

Перспективной разновидностью наночастиц, поглощающих в ближнем ИК диапазоне, являются золотые наностержни (Wang et al., 2013). Экспериментально показано, что эффективность фототермического преобразования у них выше, чем у золотых нанооболочек (Pattani, Tunnell, 2012), которые в 2011 году были допущены до клинических испытаний для лечения плохо поддающихся лечению И рецидивирующих опухолей головы И шеи (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00848042). В работ ряде показана возможность применения золотых наностержней in vivo для реализации фототермической терапии (Dickerson et al., 2008; Von-Maltzahn et al., 2009).

С точки зрения повышения эффективности терапии интересным видится сочетание в рамках одной процедуры фототермической и фотодинамической терапии, при которой происходит подавление опухолевых клеток благодаря соответствующим фотохимическим реакциям с участием фотосенсибилизаторов. Для этого есть предпосылки: сопряжённость обоих методов с оптическим излучением, синергическое воздействие на микроциркуляторное русло опухоли, повышение термочувствительности клеток в условиях гипоксии, вызываемой фотохимической реакцией (Bucharskaya *et al.*, 2016). Работ, посвященных апробации такой комбинированной терапии *in vivo*, немного, и имеются пробелы в понимании оптимальных параметров терапевтического протокола и дизайна наноразмерной конструкции, обеспечивающей реализацию двух видов терапии. В частности, в работе (Zhang *et al*, 2013) для флуоресцентной диагностики опухолей

in vivo применяли наночастицы, покрытые оболочкой из диоксида кремния, функционализированной протопорфирином. Это позволило увеличить степень связывания фотосенсибилизатора частицей в 3 раза по сравнению с конструкциями, в которых поверхность золотых наночастиц непосредственно модифицировали молекулами фотосенсибилизаторов (Jang et al, 2011).

Также следует отметить, что в большинстве исследований, посвященных реализации ПРФТ *in vivo*, использовали привитые опухоли малого размера: 0.1-1 см³ (Chen et al., 2010; Lin et al., 2013; Sun et al., 2014), которые довольно легко Представляет интерес оценка эффективности подвернуть деструкции. фототермотерапии в отношении более крупных опухолевых моделей. Это особенно актуально для случаев использования плазмонно-резонансного фототермолиза не как монотерапии, а в комбинации с другими терапевтическими подходами.

Целью настоящего исследования было выяснение токсических свойств ультрамалых золотых наночастиц и оценка противоопухолевой эффективности разных режимов фототерапевтических воздействий, реализуемых на основе золотых наностержней.

Для достижения данной цели решались следующие задачи:

- 1. Получить с помощью одних и тех же химических агентов плазмоннорезонансные (средний размер 15-50 нм) и ультрамалые золотые наночастицы (средний размер 1-3 нм) и сравнить их влияние на жизнеспособность различных клеточных культур с использованием оптического мониторинга.
- 2. Идентифицировать токсический компонент препарата ультрамалых наночастиц золота.
- 3. Получить нанокомпозиты на основе золотых наностержней и гематопорфирина и охарактеризовать фототермические эффекты, возникающие при их интратуморальном введении при различных режимах фототерапевтических воздействий.
- 4. Оценить противоопухолевую эффективность комбинированной фототермической/фотодинамической терапии крупных привитых опухолей у крыс при интратуморальном введении нанокомпозитов на основе золотых наностержней и гематопорфирина.

Научная новизна

Впервые получены плазмонно-резонансные золотые наночастицы с использованием фосфониевого метода и проведена сравнительная оценка их цитотоксичности с ультрамалыми золотыми наночастицами, полученными в эквивалентных условиях. Впервые установлено, какой из компонентов препарата ультрамалых наночастиц золота обуславливает его цитотоксичность.

Впервые продемонстрирована возможность использования препарата оболочками золотых наностержней с ИЗ диоксида кремния, функционализированных гематопорфирином, для реализации комбинированной опухолей фототермической/фотодинамической терапии in vivo. Впервые эффективности, проведена оценка противоопухолевой комбинированной фототермической/фотодинамической терапии на основе золотых наночастиц крупных привитых опухолей у лабораторных животных.

Теоретическая значимость работы. Расширены представления о взаимодействии плазмонно-резонансных и ультрамалых золотых наночастиц с биологическими системами разного уровня организации, выяснены особенности их влияния на жизнеспособность ряда культур животных и растительных клеток. Установлен характер морфологических изменений и динамики роста опухолевых тканей у животных с введенными золотыми наночастицами и облученных лазерным светом, охарактеризованы термические эффекты, сопровождающие эти изменения.

Практическая значимость работы. Практическая ценность полученных результатов определяется возможностью их приложения для планирования доклинических оценок потенциала фототерапевтических методов, связанных с применением наночастиц золота в качестве термосенсибилизаторов и их дальнейшей оптимизации. Плазмонно-резонансная фототермическая терапия в перспективе может быть использована как метод адъювантной терапии новообразований. поверхностных Результаты, полученные В ходе токсикологических экспериментов, могут быть использованы для оценки биологических рисков, связанных с применением коллоидного золота В областях человеческой деятельности И различных ИХ поступлением В окружающую среду. По результатам работы издано учебно-методическое пособие «Использование солоноводной микроводоросли Dunaliella salina как тест-объекта В токсикологических исследованиях». Получен патент на изобретение «Недеструктивный способ оценки цитотоксичности наночастиц с использованием микроводоросли Dunaliella salina». Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена объемом экспериментального материала, а также использованием адекватных статистических методов.

Положения, выносимые на защиту:

- 1. Фосфониевые плазмонно-резонансные золотые наночастицы, согласно спектрофотометрической и спектрофлуориметрической оценке, не проявляют цитотоксических эффектов для культур микроводорослей *Dunaliella salina* и животных клеток HeLa и Vero, тогда как полученные в эквивалентных условиях ультрамалые золотые наночастицы высокотоксичны по отношению к данным клеточным культурам.
- 2. Цитотоксичность ультрамалых наночастиц золота, стабилизированных фосфониевыми лигандами, ассоциирована с их первичной дисперсионной средой и определяется наличием в ней комплексных соединений золота.
- 3. При интратуморальном введении нанокомпозитов на основе золотых наностержней и гематопорфирина крысам с опухолями и чрескожным облучении лазером ближнего ИК-диапазона фототермическая терапия характеризуется реализацией режима термоабляции.
- 4. Противоопухолевая эффективность комбинированной фотодинамической/фототермической терапии крупных привитых опухолей у крыс с использованием нанокомпозитов на основе золотых наностержней и гематопорфирина, также лазеров с длинами волн 808 и 633 нм эквивалентна таковой при монофототермотерапии и существенно выше, чем при монофотодинамической терапии.

Личный вклад автора. Экспериментальные результаты получены лично автором в сотрудничестве с д.б.н. Терентюком Г.С., к.б.н. Бучарской А.Б., к.б.н. Пылаевым Т.Е., д.ф.-м.н. Хлебцовым Б.Н., к.ф.-м.н. Ханадеевым В.А., м.н.с. Авдеевой Е.С. Общее планирование экспериментов, их обсуждение и подготовка результатов к публикации проводились совместно с д.б.н. В.А. Богатыревым, д.б.н. Л.А. Дыкманом и д.ф.-м.н. Н.Г. Хлебцовым. На защиту вынесены те положения и результаты, в получении которых роль автора была определяющей.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на международных и российских конференциях: 1) IV, V Региональные научные конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии», Саратов, Россия, 2012 (лучший доклад), 2013 (лучший доклад); 2) Белорусско-Российская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Минск, Белоруссия, 2013; 3) Saratov Fall Meeting – International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophysics, Саратов, Россия, 2012, 2013, 2017, 2018, 2019; 4) VIII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», Саратов, Россия, 2016; 5) Международная

научно-практическая конференция «Растения и микрорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC, Уфа, Россия, 2018.

Работа выполнена в лаборатории нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН по планам НИР в рамках госбюджетной темы: «Многофункциональные наноматериалы основе на металлических И композитных наночастии: синтез, характеристика И биомедицинские применения», № гос. регистрации 01201359050.

Диссертационные исследования были частично поддержаны грантом РНФ 14-13-01167 «Золотые и композитные наночастицы и ассемблированные наноструктуры для аналитических и биомедицинских применений» (рук. д.ф.-м.н. профессор Хлебцов Н.Г.), грантами РФФИ: 16-04-00520 «Солоноводные водоросли рода Dunaliella как модельный объект изучения механизмов цитотоксичности наноматериалов» (рук. д.б.н. Богатырев В.А.), 18-04-00469 «Взаимодействие растений с наночастицами золота: физиологические, биохимические и фитотоксические аспекты» (рук. д.б.н. Дыкман Л.А.), а также грантом Фонда содействия инновациям УМНИК-17 по договору № 12749ГУ/2017 от 25.04.2018 «Разработка диагностической экспресс-тест системы для оценки токсичности наноматериалов» (рук. Чумаков Д.С.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 статей в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в российские и международные базы данных; 3 статьи в нерецензируемых изданиях и 13 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов, двух глав, содержащих результаты и обсуждение, заключения, выводов и списка использованной литературы. Текст работы занимает 129 страниц. Работа содержит 27 рисунков. Список литературы состоит из 232 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез и характеристика золотых наночастиц. В работе использовали три вида ЗНЧ: фосфониевые золотые наночастицы с размерами порядка 2 нм (ФЗНЧ-2), фосфониевые плазмонно-резонансные золотые наночастицы (ФПЗНЧ) и золотые наностержни, покрытые оболочками из диоксида кремния и функционализированные гематопорфирином (ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП). Синтез ФЗНЧ-2 и ФПЗНЧ осуществляли восстановлением золотохлористоводородной кислоты (HAuCl₄) тетракисгидроксиметилфосфоний хлоридом (ТГФХ) в разных условиях на основе метода Даффа (Duff *et al.*, 1993). Синтез ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП осуществляли трехстадийно. На первом этапе получали золотые наностержни на основе метода (Ratto *et al.*, 2010), на втором этапе методом гидролиза тетрэтилортосиликата на них формировали оболочку из диоксида кремния (Chen *et al.*, 2011). На третьем этапе на поверхности частиц формировали вторую оболочку из диоксида кремния, функционализированную гематопорфирином (Gorelikov, Matsuura, 2008). Характеристику наночастиц осуществляли фотометрическим и электронном-микроскопическим методами.

Определение содержания золота в препаратах наночастиц. Содержание золота в препаратах наночастиц определяли с использованием атомноабсорбционного спектрометра Dual Atomizer Zeeman AA iCE 3500. Для калибровки спектрометра использовали раствор HAuCl₄ в HCl (0.1 M) или раствор коллоидного золота с известной концентрацией. Во втором случае наночастицы растворяли в царской водке (HCl:HNO₃=3:1).

Используемые биологические тест-модели. Токсикологическое тестирование наночастиц проводили в условиях *in vitro* с использованием культур животных клеток линий HeLa и Vero и культур микроводорослей *D. salina*. Для апробации комбинированной фототерапии опухолей на основе $3HC/SiO_2/SiO_2/\Gamma\Pi$ *in vivo* использовали белых беспородных крыс с подкожно привитыми холангиокарциномами линии PC-1. Все экспериментальные манипуляции с крысами осуществляли при достижении опухолью объема 4 ± 0.5 см³.

Дизайн токсикологических экспериментов с культурами животных клеток. Токсикологические тесты с животными клетками проводили в 96луночных планшетах. Экспозицию клеток с токсикантами проводили в течение 24 ч. Подсчет клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток TC20 (BioRad, США) Количественную оценку цитотоксичности проводили с помощью флуориметрического теста на основе красителя резазурина. Качественную оценку жизнеспособности проводили посредством окрашивания клеток парой флуоресцентных красителей флуоресцеиндиацетатом/пропидием-йодидом.

токсикологических Лизайн экспериментов с микроводорослями. Токсикологические тесты с культурами микроводорослей проводили в 96луночных планшетах. Экспозицию клеток с токсикантами проводили в течение 48 ч. Подсчет клеток проводили в лунке микропланшета после предварительной фиксации клеток 0.01% глутаровым альгедидом. Клетки на изображениях подсчитывали автоматически с использованием программы ImageJ. Количественную проводили оценку цитотоксичности посредством определения содержания хлорофилла недеструктивно фотометрического В Качественно жизнеспособность клетках И спиртовых экстрактах. В микроводорослей оценивали микроскопически основе изменения на автофлуоресценции хлорофилла в клетках при экспозиции с токсикантами.

Определение активности антиокислительных ферментов в лизатах Активность супероксиддисмутазы (СОД) клеточных культур. И глутатионредуктазы (ГР) оценивали в культурах клеток D. salina и животных клетках линии HeLa с целью дополнительной токсикометрической характеризации воздействия ультрамалых наночастиц золота. Активность СОД определяли по степени ингибирования восстановления водорастворимой соли тетразолия WST-1 до формазана по методу Пескина (Peskin, Winterbourn, 2000). Спектрофотометрическую детекцию осуществляли на длине волны 450 нм. Под единицей активности супероксиддисмутазы Е понимали количество фермента, необходимого для ингибирования 50 % восстановления водорастворимой соли тетразолия WST-1. Определение активности глутатионредуктазы проводили методом Смита (Smith et al., 1988). В ходе реакции глутатионредуктаза переводит окисленный глутатион (GSSG) В восстановленное состояние (GSH). Восстановленный глутатион взаимодействует с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной THF^{2-} . (ДТНБ) с образованием 2-нитро-5-тиобензоат аниона кислотой Количественная оценка изменения оптической плотности на длине волны 405 нм активность фермента. Количество белка в клетках позволила рассчитать определяли бицинхониновым методом (Smith et al., 1985).

Реализация сочетанной фототермической/фотодинамической терапии привитых опухолей у крыс на основе ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП in vivo. Было сформировано 5 групп животных по 6 особей в каждой. Животным группы № 1 вводили интратуморально 1 ΜЛ суспензии $3HC/SiO_2/SiO_2/\Gamma\Pi$, причем концентрация золота в препарате составляла 500 мкг Au/мл. Таким образом, вводимая доза наночастиц составила 2 мг Аи/кг в пересчете на золото. Препарат в опухоль вводили шприцом в трех различных точках со скоростью инфузии 100 мкл суспензии/мин. Параметры интратуморального введения были подобраны с учетом работы (Xie et al., 2012). Затем опухоли животных облучали 808 нм и 633 нм лазерами с целью реализации комбинированной фототерапии. Животным группы № 2 интратуморально вводили наночастицы и облучали только 633 нм лазером с целью реализации фотодинамического воздействия. Животным группы № 3 интратуморально вводили наночастицы и облучали только 808 нм лазером с целью реализации фототермического воздействия. Животным группы № 4 (контрольной) вводили интратуморально физиологический раствор и облучали их опухоли 808 нм лазером. Животным группы № 5 (контрольной) вводили интратуморально физиологический раствор и не подвергали облучению лазером.

Перед началом эксперимента все животные подвергались анестезии при помощи препарата Zoletil 50, после чего кожа над опухолью эпилировалась. Далее животным вводили препарат наночастиц. Через 1 ч после введения препарата крысам на кожу над опухолью стеклянной палочкой наносили просветляющий

раствор следующего состава: 40% этанол, 25% глицерин, 10% ПЭГ-300, 10% ДМСО. Через 15 мин опухоли облучали лазерами. Для облучения использовался полупроводниковый непрерывный ближний ИК лазер LS-2-N-808-10000 (Лазерные системы, Россия) с длиной волны 808 нм, а также гелий-неоновый непрерывный лазер GN-5P (Плазма, Россия) с длиной волны 633 нм. По мере облучения опухоли осуществлялся неинвазивный мониторинг температуры при помощи тепловизора. Расстояние между тепловизором и поверхностью опухоли было равно 50 см. Через 3 дня после облучения по 2 животных из каждой группы эвтанизировали и забирали образцы опухолевой ткани для морфологического исследования. По 4 животных из каждой группы оставляли для контроля дожития.

Статистическая обработка результатов исследований. Полученные данные были представлены в виде средней арифметической и её стандартного отклонения (M±Sd). Проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась с использованием теста Шапиро-Уилка. Проверка равенства дисперсий осуществлялась с использованием теста Левена. Для оценки значимости различий количественных признаков использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (р), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование цитотоксичности золотых наночастиц для культур клеток

Характеристика фосфониевых золотых наночастиц

По результатам электронно-микроскопического анализа средний диаметр синтезированных ультрамалых ФЗНЧ-2 составил 2.5±0.6 нм. Данные о размерах получены в результате измерений для ансамбля из 200 частиц по их изображениям, полученным на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) (рис. 1а, б). Спектр экстинкции суспензии ФЗНЧ-2 сразу после приготовления не имел характерного плазмонно-резонансного пика, а отличался слабо выраженным «плечом» в области 500 нм (рис. 1в).

Для получения более крупных плазмонно-резонансных наночастиц с использованием тех же химических веществ протокол Даффа модифицировали. Изменения заключались в уменьшении конечной концентрации ТГФХ в 5 раз, изменении порядка внесения реагентов в реакционную смесь и ее нагреве после внесения реагентов. На рис. 2 представлены ТЭМ-изображения ФПЗНЧ, спектр экстинкции и гистограмма распределения частиц по размерам. По данным электронно-микроскопических измерений средний диаметр ФПЗНЧ составил

17.1±5.7 нм. Спектр экстинкции суспензии плазмонно-резонансных наночастиц имел соответствующий максимум поглощения при длине волны 521 нм.



Рис. 1. Характеристика синтезированных ФЗНЧ-2: ТЭМ изображения ФЗНЧ-2 (а, б); спектр экстинкции суспензии ФЗНЧ-2 (в); гистограмма распределения по размерам ФЗНЧ-2 (г).



Рис. 2. Характеристика синтезированных ФПЗНЧ: ТЭМ изображения ФПЗНЧ (а, б); спектр экстинкции суспензии ФПЗНЧ-2 (в); гистограмма распределения по размерам ФПЗНЧ (г).

Оценка цитотоксичности препаратов фосфониевых ЗНЧ для клеточных культур

Рисунок 3 иллюстрирует количественную фотометрическую И флуориметрическую оценку цитотоксичности ФЗНЧ-2 и ФПЗНЧ (рис. 3а), а также различных фракций препарата ФЗНЧ-2 (рис. 36) для культур микроводорослей D. salina и культур животных клеток линий HeLa и Vero. Препарат ФЗНЧ-2 проявлял высокую цитотоксичность в отличие от синтезированных с использованием тех же реагентов плазмонно-резонансных наночастиц, которые характеризовались высокой биосовместимостью для всех использованных клеточных культур. К примеру, при тестовой концентрации золота 80 мг Аи/л эффективность действия ФЗНЧ-2, токсического выраженная в изменении содержания хлорофилла, для культур D. salina составила 98.5±0.5%, а эффективность токсического действия ФПЗНЧ составила 10.5±2.7%.

Основной токсический эффект препарата ФЗНЧ-2 был ассоциирован с составом его первичной дисперсионной среды, компоненты которой (ДС-1), были получены после первой отмывки частиц. По данным атомно-абсорбционной спектроскопии, в ДС-1 содержалось невосстановленное золото в количестве 168±10 мг Аи/л, что составило примерно 17% от общего содержания золота в препарате ФЗНЧ-2. В препарате, аналогичном ДС-1, полученном для ФПЗНЧ, невосстановленного золота обнаружено не было. Именно ионное золото рассматривается нами как источник токсичности дисперсионной среды.

Препараты свежеприготовленных ФЗНЧ-2 и их ДС-1 демонстрировали значительную цитотоксичность по отношению к клеткам линии HeLa, которая сравнима с результатами, полученными для микроводорослей. При тестовой концентрации ФЗНЧ-2 40 мг Аи/л эффективность их токсического действия составила 98±1% для культур микроводорослей D. salina и 95±1.5% для клеток линии HeLa. Эффективность токсического действия для животных клеток выражалась в изменении их дыхательной активности. Напротив, токсические свойства ФЗНЧ-2 для животных клеток линии Vero существенным образом отличались от результатов, полученных с использованием культур D. salina и HeLa. При тестовой концентрации ФЗНЧ-2 40 мг Аи/л эффективность их токсического действия составила 95±1.5% для клеток линии HeLa и 66±2% для клеток линии Vero. Аналогично, цитотоксичность ДС-1 по отношению к линии Vero была снижена при всех тестовых разведениях в 2-4 раза по сравнению с HeLa и культурами микроводорослей. При тестовом разведении ДC-1. содержащем 7 мг Au/л, эффективность токсического действия для Vero составила 22.6±4.2%, а для HeLa 91.3±5.2%.



Рис. 3. Количественная оценка эффективности токсического действия ФЗНЧ-2 и ФПЗНЧ (а), а также различных препаратов ФЗНЧ-2 (б) для культур микроводорослей *D. salina* и культур животных клеток линий HeLa и Vero. Стрелками показано фактическое содержание золота в препаратах токсикантов по данным атомно-абсорбционной спектроскопии.

Таким образом, было показано, что ФПЗНЧ не проявляли цитотоксичность по отношению к животным и растительным клеткам в отличие от ФЗНЧ-2,

синтезированных с использованием таких же химических агентов. Было также установлено, что токсический эффект препарата ФЗНЧ-2 ассоциирован с составом их дисперсионной среды.

После трех отмывок препарат ФЗНЧ-2 (ФЗНЧ-2 отм.) проявлял существенно менее значимые токсические эффекты для культур микроводорослей D. salina. При максимальной тестированной концентрации 66 МΓ Au/л эффективность его токсического действия составила 36.2±4%. Для животных был регистрируемо токсичен во всем клеток он вовсе не диапазоне исследованных концентраций.

Мы предположили, что эти факты могут быть связаны также с модификацией поверхности частиц присутствующими в культуральной среде животных клеток сывороточными альбуминами. В культуральной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка содержится порядка 2 г/л альбуминов. При этом в среде Бен-Амотца, которую используют для культивирования микроводорослей, белков не содержится. В работе (Alkilany *et al.*, 2009) было показано, что помещение ЗНЧ в культуральную среду, содержащую протеины, приводит к тому, что они спонтанно сорбируются на частицах, образуя оболочку, которую называют «белковой короной». Вследствие такой функционализации изменяется поверхностная активность частиц и их токсические свойства.

С целью проверки влияния альбуминов в среде на токсичность отмытых частиц препарат ФЗНЧ-2 отм. преинкубировали в 0.1% растворе бычьего сывороточного альбумина. Оказалось, что такая преинкубация приводит к полному исчезновению токсического эффекта ФЗНЧ-2 для культур *D. salina*, что свидетельствует о том, что относительно слабый, но выраженный токсический эффект ФЗНЧ-2 отм. для *D. salina* обусловлен отсутствием белков в культуральной среде микроводорослей, способных функционализировать поверхность частиц.

Можно допустить, что токсичность препарата ДС-1 должна снижаться при его обработке восстановителем благодаря довосстановлению ионного золота. Для проверки этой гипотезы к 1 мл препарата ДС-1 добавляли сильный восстановитель – борогидрид натрия – таким образом, чтобы его финальная концентрация составила 0.04%. При этом изначально бесцветный препарат ДС-1 приобретал коричневый оттенок, а его цитотоксичность по отношению к клеточным культурам снижалась примерно в 10 раз. К примеру, для культур *D. salina* при минимальном тестовом разведении ДС-1 добавление NaBH₄ снижало эффективность токсического действия с 96±1.4% до 9.4±2%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основным источником токсичности в ДС-1 являются именно комплексные соединения золота.

Определение активности антиокислительных ферментов

Рис. 4 5 иллюстрируют И результаты определения активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы (ГР) в культурах микроводорослей (рис. 4a, 5a) и животных клетках линии HeLa (рис. 46, 56), экспонированных с препаратом ФЗНЧ-2. Нами были выбраны такие тестовые разведения ФЗНЧ-2, которые не вызывали статистически достоверного первичной тест-функции (солержание изменения значения хлорофилла. дыхательная активность) для получения дополнительной информации о характере токсического действия препарата. СОД и ГР представляют собой важные маркеры состояния клеточной антиокислительной системы. К примеру, данные ферменты использовались применительно к оценке воздействия наночастиц в работе (Niska et al., 2015), в которой авторы регистрировали снижение активности СОД примерно на 30-45% после 24-часовой экспозиции остеобластов с препаратом наночастиц диоксида титана, а также в исследовании (Afifi et al., 2016), авторами которого было показано, что активность СОД и ГР снижалась в мозговых тканях рыб Oreochromis niloticus и Tilapia zilii при воздействии наночастиц серебра.

Перед определением активности ферментов подсчитывали количество растительных и животных клеток, а также определяли содержание белка в лизатах бицинхониновым методом. Было клеточных показано, ЧТО при экспозиции с токсикантом не происходит достоверного изменения количества образцах. контрольных И опытных Полученные клеток В результаты свидетельствуют о том, что активность СОД и ГР в культурах микроводорослей и животных клеток, экспонированных с ФЗНЧ-2, снижалась по сравнению с контрольными пробами. В частности, активность СОД снижалась в культурах D. salina примерно на 37%: с 2.2±0.3 Е/мг белка до 1.4±0.2 Е/мг белка. Активность ГР снижалась примерно на 40%: с 50.4±5.3 нмоль/мин/мг белка до 31.7±4.5 нмоль/мин/мг белка. В культурах HeLa активности СОД и ГР снижались примерно на 30%: с 3±0.15 Е/мг белка до 2.4±0.3 Е/мг белка и с с 65.7±9.4 нмоль/мин/мг белка до 46.2±7.5 нмоль/мин/мг белка, соответственно. Подобные изменения ассоциированы с состоянием окислительного стресса. Известно, что фосфиновые комплексы золота способны индуцировать окислительный стресс в клетках. Наиболее подробно охарактеризована биологическая активность 1-тиобета-D-глюкопиранозато)(триэтилфосфин)золота 2,3.4,6-тетраацетата (ауранофина) (Roder, Thompson, 2015). Показано, что ауранофин ингибирует тиоредоксинредуктазы 2014). активности al., (Fan et тиоредоксинглутатионредуктазы (Sharlow et al, 2014), супероксиддисмутазы (Gao et al., 2016). Предположительный механизм заключается в образовании стабильных комплексов ауранофина и молекул ферментов за счет его сродства к

тиоловым и селено-группам белковых молекул. Можно высказать предположение, что присутствующие в цельном препарате ФЗНЧ-2 комплексные соединения золота проявляют схожую с описанными в литературе фосфиновыми комплексами золота биологическую активность.



Рис. 4. Оценка активности супероксиддисмутазы в культурах *D. salina* (а) и культурах HeLa (б) при экспозиции клеток с ФЗНЧ-2.



Рис. 5. Оценка активности глутатионредуктазы в культурах *D. salina* (а) и культурах HeLa (б) при экспозиции клеток с ФЗНЧ-2.

Оценка эффективности комбинированной фототерапии опухолей у крыс на основе золотых наночастиц

Характеристика композитных золотых наностержней

На рис. 6 представлены электронно-микроскопические изображения золотых наностержней (ЗНС), покрытых оболочками из диоксида кремния и функционализированных гематопорфирином (ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП) (рис. 6а, 6б), а

также их характеристические спектры экстинкции на разных этапах синтеза (рис. 6б).

На первом этапе синтеза с использованием технологии восстановления на мягких матрицах получали покрытые полиэтиленгликолем ЗНС с длиной 44±7 нм и шириной 11±2 нм, соответственно.

На втором этапе синтеза на поверхности ЗНС формировали оболочку из диоксида кремния. На третьем этапе синтеза на поверхности $3HC/SiO_2$ формировали еще один слой мезопористого диоксида кремния, функционализированный молекулами гематопорфирина при помощи метода, описанного в работе (Gorelikov, Matsuura, 2008). Таким образом, средние значения длины и ширины финальных композитных наностержней вида ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП составили 100±16 нм и 66±9 нм, соответственно. Плазмоннорезонансные максимумы экстинкции композитных частиц 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП были зарегистрированы при длинах волн 830 нм и 514 нм, соответственно. Спектр экстинкции 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП имел дополнительный максимум поглощения при длине волны 400 нм, что соответствует полосе поглощения гематопорфирина (Kessel, 1984). Появление этого максимума служит подтверждением того факта, что молекулы гематопорфирина были успешно инкорпорированы в силикатную оболочку композитных частиц. Концентрация гематопорфирина в исходном 3HC/SiO₂/SiO₂/ΓΠ составила 85 мг/л 10 000 препарате ИЛИ молекул гематопорфирина на частицу.

С целью дополнительного подтверждения инкорпорации гематопорфирина в частицы и реализации фотодинамической терапии на основе 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП тест с 9,10-антрацендиил-бис(метилен)дималоновой кислотой использовали представляет собой (АДБДК). которая фактически химический сенсор образования синглетного кислорода. В рамках теста данное соединение реагирует с синглетным кислородом с образованием эндопероксида, вследствие чего оптическая плотность АДБДК при 380 нм снижается. Исследовали кинетику фотоокисления АДБДК в присутствии нанокомпозитов в течение 60 мин облучения 633 нм лазером. На рис. 6 представлены характеристические пики поглощения АДБДК и снижение их высоты по мере облучения лазером. В частности, снижалась высота пика при 380 нм (рис. 6г). Для сравнения регистрировали фотодинамическую активность раствора гематопорфирина в такой же концентрации. Значимых различий зарегистрировано не было. Это свидетельствует о том, что включенные в композитные наностержни молекулы способность гематопорфирина сохранили фотохимическую активность, К генерации синглетного кислорода при облучении светом.



Рис. 6. Характеристика синтезированных 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП: ТЭМ-изображения 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП (а, б); спектры экстинкции 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП, а также веществ и материалов, использованных для их синтеза (в); динамика изменения спектра экстинкции смеси АДБДК и 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП при облучении 633 нм лазером в течение 60 мин (г).

Характеристика фототермических эффектов при облучении привитых опухолей

На рис. 7 представлена кинетика лазерного нагрева опухолей в различных Представлены данные для четырех групп из группах животных. ПЯТИ сформированных, что связано с тем, что животные одной из контрольных групп не подвергались облучению лазером. Наименьший нагрев был зарегистрирован для животных, которым вводили интратуморально композитные наночастицы и облучали 633 лазером Незначительное температурное HM приращение обусловлено небольшой плотностью мощности красного лазера ≈160 мВт/см². Значительный нагрев отмечался для групп животных, которым вводили

композитные наночастицы и облучали 808 нм лазером. В группе, где была реализована только ПРФТ, температура кожи над опухолью через 120 сек нагрева составила 57.1±4.3°C, а в группе крыс, у которых проводилась сочетанная терапия двумя лазерами – 59.6±3.8°С. Максимальные температуры, достигаемые при облучении у животных данных двух групп, составили 78.4±8.2°C и 81.3±7.6°C, соответственно, и достоверно не отличались, что является дополнительным подтверждением, что облучение 633 нм лазером не вносило значимого вклада в Чтобы дифференцировать температурное приращение. эффект лазерного воздействия от эффекта сочетания лазерного излучения и наличия наночастиц была сформирована группа животных, которым вводили 0.9% раствор NaCl и облучали 808 нм лазером при плотности мощности 2 Вт/см². Для этой группы был зарегистрирован незначительный нагрев. Максимальная температура кожи над опухолью в этой группе крыс составила 42.6±2.4°С, что свидетельствует о том, что основной температурный инкремент при облучении ассоциирован с наличием Таким образом, было показано, что фототермическая терапия у наночастиц. животных с введенными 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП характеризовалась повышением температур кожи над опухолью до $\approx 80^{\circ}$ С, то есть реализацией режима термоабляции.



Рис. 7. Кинетика лазерного нагрева участков кожи над опухолями у крыс, у которых были реализованы различные терапевтические протоколы.

Оценка противоопухолевой эффективности комбинированной фототерапии на основе 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП

Ha рис. 8 представлены фотографии опухолей V различных экспериментальных и контрольных групп животных через 3 дня после проведения тех или иных терапевтических воздействий. Видно, что опухоли контрольных животных (рисунки 8б, 8в), которым интратуморально групп вводили раствор, демонстрируют отсутствие внешних признаков физиологический деструкции. Для опухолей животных, у которых была реализована только фотодинамическая терапия посредством введения ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП и облучения 633 нм лазером, отмечались покраснение и развитие отека в области воздействия, но значительных внешних признаков повреждения также зарегистрировано не было (рис. 8г). Наибольшая степень деструкции опухолей была достигнута в группах животных, у которых была реализована плазмонно-резонансная фототермическая терапия и комбинированная фототерапия двумя лазерами (рис. 8д, 8е). Установлено, что большая часть опухолевой ткани некротизирована, что свидетельствует о значительной деструкции опухоли в этих группах животных.



Рис. 8. Внешний вид привитых опухолей у крыс через 3 дня после реализации терапевтических воздействий: (а, б) в группе животных с введенным 0.9% раствором NaCl без облучения; (в) в группе животных с введенным 0.9% раствором NaCl и облучением 808 нм лазером; (г) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 633 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (е) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (е) в

На рис. 9 представлены изображения гистологических срезов опухолей печени РС-1.



Рис. 9. Гистологические изображения опухолей у крыс через 3 дня после реализации терапевтических воздействий: (а) в группе животных с введенным 0.9% раствором NaCl без облучения; (б) в группе животных с введенным 0.9% раствором NaCl и облучением 808 нм лазером; (в) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 633 нм лазером; (г) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением 808 нм лазером; (д) в группе животных с введенными нанокомпозитами и облучением двумя лазерами.

Образцы опухолевых тканей забирали через 3 дня после облучения опухолей. Опухолевые клетки были овально-округлой формы с эксцентрично расположенными ядрами. В группах животных, которым интратуморально вводили 0.9% раствор NaCl, опухоль сохраняла типичное альвеолярное строение. Сосуды в соединительнотканных прослойках полнокровны, содержат эритроциты (рис. 9а, 9б). На срезе опухолевой ткани после фотодинамического воздействия большая часть опухолевых клеток сохранна, но с дистрофическими изменениями. Визуализируются поля некрозов с инфильтрацией нейтрофилов (рис. 9в). Наиболее выраженные деструктивные изменения характерны для опухолей, фототермолизу и сочетанной фототерапии присутствии подвергшихся В ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП (рис. 9г, 9д). Отмечается некротизированная ткань с контурами клеток без ядер и соединительнотканными перегородками. Площади областей некроза занимают порядка 90% от общей площади. На изображениях также визуализируются очаги нейтрофильной инфильтрации.

Рис. 10 иллюстрирует кинетику опухолевого роста у пяти групп крыс, использованных в эксперименте.



Рис. 10. Динамика опухолевого роста у крыс, зарегистрированная в течение 21 дня после экспериментальных воздействий.

В контрольной группе животных, которым интратуморально вводили 0.9% раствор NaCl, динамика роста опухоли имела стандартный характер, и к 21 дню ее объем увеличился в 2.5 раза и достиг значения 10.3±0.7 см³. В группе животных, которых облучали 808 нм лазером при плотности мощности 2 Вт/см² и вводили интратуморально физиологический раствор, отмечалась стимуляция опухолевого роста по сравнению с контрольными животными, которых не облучали лазером. Это явление можно объяснить усилением оксигенации и перфузии опухолевой ткани при температурах порядка 42-43°C, которые были достигнуты у животных данной группы.

Фотодинамическое воздействие В качестве монотерапии В группе животных, которым вводили ЗHC/SiO₂/SiO₂/ГП и облучали 633 нм лазером, оказалось неэффективным. Наиболее значительное снижение размеров опухоли отмечалось в группах животных, у которых была реализована ПРФТ в качестве монотерапии и комбинированная фототерапия в присутствии 3HC/SiO₂/SiO₂/ГП. На третий день после терапевтических воздействий объем опухоли в этих группах уменьшался примерно на 90%, причем значимых различий в противоопухолевой эффективности в этих двух группах зафиксировано не было. Показательный эффект был достигнут через три недели после воздействия. Реализация

комбинированной фототерапии и монофототермической терапии ингибировала опухолевой рост примерно на 37 % по сравнению с контрольной группой. Так, объем опухоли в группе животных с комбинированной фототерапией на 21 –й день после воздействия составлял 3.8 ± 0.6 см³, тогда как в контрольной группе объем опухоли достиг значения 10.3 ± 0.7 см³.

Таким образом, установлено, что комбинированная терапия крупных привитых опухолей у крыс на основе ЗНС/SiO₂/SiO₂/ГП была эквивалентна по противоопухолевой эффективности монофототермотерапии.

На рисунке 11 представлена схема, отражающая схему облучения и возможные биологические эффекты, возникающие при воздействии наночастиц на опухолевую ткани при сочетанном облучении двумя лазерами с длинами волн 808 и 633 нм.



Рис. 11. Схема экспериментального сочетанного лазерного воздействия на опухолевую ткань в присутствии композитных золотых наночастиц, функционализированных гематопорфирином.

Фототермическая терапия в температурном диапазоне 70-80 °C вызывает случайную клеточную смерть клеток, разрыв мембран и денатурацию белков. Фотодинамическая терапия характеризуется индукцией фотохимической реакции с образованием активных форм кислорода, повреждающие опухолевые клетки и вызывающие программируемую и случайную клеточную гибель. Также в литературе обсуждается противоопухолевый эффект фотодинамической терапии, ассоциированный со стимуляцией противоопухолевого иммунного ответа за счет активации антигенпрезентирующих дендритных клеток (Agostinis et al., 2011). В нашем случае превалирующий эффект оказывала фототермическая терапия. Лазерное облучение ближним ИК-лазером (λ =808 нм) с плотностью мощности 2 BT/cM^2 присутствии наночастиц приводило В К деструкции ткани с морфологическими признаками коагуляционного некроза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В анализе токсических свойств ультрамалых ЗНЧ, мы сравнили влияние на жизнеспособность различных клеточных культур ультрамалых ЗНЧ и плазмоннорезонансных ЗНЧ, полученных с использованием одних и тех же химических агентов. При этом был идентифицирован токсический компонент препарата ультрамалых ЗНЧ. Таковым оказалась ионная форма золота из первичной дисперсионной среды ультрамалых ЗНЧ. В качестве модельного токсиканта были получены ультрамалые фосфониевые ЗНЧ диаметром 2 нм. Модифицировав оригинальный протокол синтеза, ΜЫ получили плазмонно-резонансные фосфониевые ЗНЧ диаметром 17 нм. По результатам токсикологических тестов с использованием культур животных клеток линий HeLa и Vero и культуры микроводорослей D. salina было установлено, что плазмонно-резонансные ЗНЧ не проявляли цитотоксичность по отношению к указанным клеточным культурам, в отличие от ультрамалых ЗНЧ, синтезированных с использованием таких же химических реагентов. Токсический эффект препарата ультрамалых фосфониевых наночастиц золота был ассоциирован с их исходной дисперсионной средой. Показано, токсичным компонентом дисперсионной что среды являются растворимые в ней комплексные соединения золота. При этом наиболее чувствительными к действию данного препарата оказались культуры микроводоросли D. salina, а также культуры животных клеток линии HeLa. При этом отмытые от компонентов указанной выше дисперсионной среды ультрамалые фосфониевые ЗНЧ существенной цитоксичностью не обладали.

В рамках проведенной нами апробации комбинированной фототерапии привитых опухолей на основе золотых наностержней, покрытых оболочками из диоксида кремния и функционализированных гематопорфирином, было показано, что их интратуморальное введение в сочетании с облучением лазером приводило к реализации режима термоабляции у животных. Установлено, что для крупных привитых опухолей у крыс с начальным объемом примерно 4 см³ терапевтические эффекты, оказываемые комбинированной фототерапией и монофототермической терапией равнозначны, а фотодинамическая терапия не повышает общую эффективность в данном случае.

Таким образом, проведенная работа позволила получить новые сведения о взаимодействии ЗНЧ нескольких типов (плазмонно-резонансные и ультрамалые наносферы, композитные наностержни) с биологическими объектами разной природы (культуры растительных и животных клеток, а также биологические ткани). Получены новые данные о токсических свойствах ультрадисперсного коллоидного золота. Расширены представления о возможностях использования ЗНЧ в сочетании с лазерным излучением для фотодеструкции опухолей.

Полученные результаты имеют практическое значение для оценки биобезопасности ЗНЧ, а также для планирования доклинических оценок потенциала фототерапевтических методов, связанных с применением наночастиц золота в качестве фототермосенсибилизаторов.

выводы

1.Плазмонно-резонансные фосфониевые ЗНЧ с диаметром 17.1±5.7 нм нетоксичны по отношению к культурам растительных и животных клеток, тогда как синтезированные с использованием таких же реагентов фосфониевые ЗНЧ диаметром 2.5±0.6 нм проявляли значительную цитотоксичность.

2. Тестовая концентрация 10 мг Au/л ультрамалых фосфониевых 3HЧ при 24 ч экспозиции индуцировала снижение активности антиокислительных ферментов: супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы на 40% в культурах *D.salina* и на 30% в культурах животных клеток линии HeLa.

3. Цитотоксичность ультрамалых фосфониевых ЗНЧ ассоциирована с их первичной дисперсионной средой (ДС-1), компоненты которой были получены после отмывки частиц, а отмытые наночастицы токсичностью не обладали. Довосстановление золота борогидридом натрия снижало токсичность ДС-1 в 10 раз при всех тестируемых разведениях.

4. При интратуморальном введении крысам наночастиц на основе золотых наностержней и гематопорфирина в дозе 2 мг Au/кг участки кожи над привитыми опухолями нагревались до 78.4±8.2°С при чрескожном облучении лазером с $\lambda = 808$ нм и до 81.3 ± 7.6 °С при сочетанном облучении лазерами с $\lambda = 808$ нм и $\lambda = 633$ нм ,что на 39°С выше, чем у животных, которым интратуморально вводили раствор 0.9% NaCl и облучали лазером с $\lambda = 808$ нм.

5. Комбинированная лазерная фототермическая/фотодинамическая терапия крупных 4 см³ опухолей у крыс, реализуемая на основе золотых наностержней и гематопорфирина значительно ингибировала опухолевый рост, уменьшая объем опухолей на 21 день после воздействия на 37% по сравнению с опухолями животных контрольной группы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и РИНЦ:

1. Terentyuk G., Panfilova E., Khanadeev V., **Chumakov D.**, Genina E., Bashkatov A., Tuchin V., Bucharskaya A., Maslyakova G., Khlebtsov N., Khlebtsov B. Gold nanorods with a hematoporphyrinloaded silica shell for dual modality photodynamic and photothermal treatments of tumors *in vivo* // Nano Research. – 2014. – Vol. 7, No 3. – P. 325-337.

2. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Afanasyeva G.A., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Zlobina O.V., **Chumakov D.S.**, Bashkatov A.N., Genina E.A., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Tuchin V.V. The morpho-functional assessment of plasmonic photothermal therapy effects on transplanted liver tumor // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2015. – Vol. 8, No 3. – P. 1541004-1–1541004-8.

3. **Чумаков** Д.С., Пылаев Т.Е., Авдеева Е.С., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А. Исследование цитотоксичности ультрамалых фосфониевых наночастиц золота с использованием культур растительных и животных клеток // Российские нанотехнологии. – 2019. – Т. 14, № 3-4. – С. 81-92.

4. **Чумаков Д.С.**, Голубев А.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А. Оптическая оценка жизнеспособности микроводорослей *Dunaliella salina* при токсикологическом тестировании // Коллоидный журнал. – 2017. – Т. 79, № 6. – С. 808-812.

5. Чумаков Д.С., Соколов А.О., Богатырев В.А., Соколов О.И., Селиванов Н.Ю., Дыкман Л.А. «Зеленый» синтез наночастиц золота с использованием культур клеток *Arabidopsis thaliana* и *Dunaliella salina* // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13, № 9-10. – С. 85-91.

6. Терентюк Г.С., Иванов А.В., Полянская Н.И., Максимова И.Л., Скапцов А.А., **Чумаков Д.С.**, Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Фототермические эффекты при лазерном нагреве золотых наностержней в суспензиях и в привитых опухолях в экспериментах *in vivo* // Квантовая электроника. 2012. – Т. 42, № 5. – С. 380-389.

7. Терентюк Г.С., Генина Э.А., Башкатов А.Н., Рыжова М.В., Цыганова Н.А., **Чумаков Д.С.**, Хлебцов Б.Н., Сазонов А.А., Долотов Л.Е., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г, Иноземцева О.А. Использование фракционной лазерной микроабляции и ультразвука для улучшения доставки наночастиц золота в кожу in vivo // Квантовая электроника. – 2012. – Т. 42, № 6. – С. 471-477.

8. **Чумаков** Д.С., Баско М.В., Дихт Н.И., Бучарская А.Б., Родионова Т.В., Терентюк Г.С. Апробация плазмонно-резонансной фототермической терапии злокачественных опухолей в условиях экспериментов *in vivo* // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 700-706.

9. **Чумаков** Д.С., Голубев А.А., Коннова С.А., Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Оценка цитотоксичности ионного и коллоидного золота для микроводоросли *Dunaliella salina* в микропланшетной тест-системе // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. – 2017. – Т. 17, № 3. – С. 305-312.

Статьи в нерецензируемых изданиях:

10. **Чумаков Д.С.** Оценка противоопухолевой эффективности комбинированной лазерной терапии перевитого альвеолярного рака печени с использованием нанокомпозитов // Исследования молодых ученых в биологии и экологии: сборник научных трудов. – Саратов, 2013. – С. 106-109.

11. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Terentyuk G.S., **Chumakov D.S.**, Basko M.V., Bucharskaya A.B., Genina E.A., Bashkatov A.N., Khlebtsov N.G. Mesoporous silica and composite nanostructures for theranostics // Proceedings of the International Conference Nanomaterials: Applications and Properties. – 2013. – Vol. 2, No. 4. – P. 04NABM25-1–04NABM25-3.

12. **Chumakov D.S.**, Prilepskii A.Y., Dykman L.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., Bogatyrev V. A. Cytotoxicity evaluation of gold nanoparticles on microalga *Dunaliella salina* in microplate test-system // Proceedings of SPIE. – 2018. – Vol. 10716. – 12 p.

Тезисы докладов:

13. Терентюк Г.С., Иванов А.В., Полянская Н.И., Терентюк А.Г., **Чумаков Д.С.**, Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Фототермические эффекты при лазерном нагреве золотых наночастиц // IV Съезд биофизиков России. Симпозиум III «Физика – в медицине и экологии». Материалы докладов. – 2012. – Нижний Новгород, 20-26 августа, 2012. – Т. 3. – С. 225.

14. Genina E., Bashkatov A., Terentyuk G., Kochubey V., Volkova E., **Chumakov D.**, Terentyuk A., Tuchin V., Bucharskaya A., Maslyakova G., Navolokin N., Khlebtsov B., Khlebtsov N. Fluorescence of nanocomposites in skin, inner organs, and transplanted tumors: *ex vivo* and *in vivo* study // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». – 2012. – Саратов, 25-28 сентября, 2012. – http://sfm.eventry.org/report/638.

15. Terentyuk G., Genina E., Bashkatov A., Chumakov D., Terentyuk A., Genin V., Tuchin V., Bucharskaya A., Maslyakova G., Navolokin N., Khlebtsov B., Khlebtsov N.G. Photodynamic therapy of transplanted tumors with nanocomposites-photothermosensitizers: a pilot study // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». _ 2012. Саратов, 25-28 сентября 2012. _ http://sfm.eventry.org/report/639.

16. Bashkatov A., Terentyuk G., Genina E., **Chumakov D.**, Terentyuk A., Genin V., Tuchin V., Bucharskaya A., Maslyakova G., Navolokin N., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Photothermolysis of transplanted tumors with nanocomposites-photothermosensitizers: a pilot study // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». – 2012. – Саратов, 25-28 сентября, 2012. – http://sfm.eventry.org/report/640.

17. Терентюк Г.С., Баско М.В., Бучарская А.Б., **Чумаков** Д.С., Иванов А.В., Маслякова Г.Н., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Оценка противоопухолевой эффективности фотосенсибилизаторов // Российский биотерапевтический журнал. Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – 2013. – Москва, 23-25 мая 2013. – С. 81.

18. Terentyuk G.S., **Chumakov D.S.**, Maksimova I.L., Basko M.V., Ivanov A.V., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Evaluation of photothermal effects induced by laser heating of gold nanorods // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». – 2013. – Саратов, 24-27 сентября 2013. – http://sfm.eventry.org/report/892.

19. Панфилова Е.В., Терентюк Г.С., Ханадеев В.А., **Чумаков Д.С.**, Генина Э.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Хлебцов Н.Г., Хлебцов Б.Н. Нанокомпозиты на основе Аи наностержней и гематопорфирина для фотодинамической и фототермической терапии опухолей *in vivo* // Материалы международной научной Интернет-конференция

«Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий». – 2014. – Казань, 18-19 ноября 2014. – С. 107.

20. Богатырев В.А., **Чумаков Д.С.**, Хлебцов Б.Н., Дыкман Л.А. Цитотоксичность коллоидного золота // Acta Naturae. Научные труды V съезда физиологов СНГ и V съезда биохимиков России. – 2016. – Сочи, 4-8 октября, 2016. – С. 240.

21. **Чумаков Д.С.**, Голубев А.А., Богатырев В.А. Недеструктивный способ оценки жизнеспособности микроводоросли *Dunaliella salina* при инкубации с поверхностно-активными веществами // Материалы VIII Всероссийской конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». – 2016. – Саратов, 14-18 октября 2016. – С. 139.

22. Chumakov D., Golubev A., Dykman L., Khlebtsov B., Khlebtsov N., Bogatyrev V. Cytotoxicity evaluation of gold nanoparticles on the microalga *Dunaliella salina* in microplate test-system // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». – 2017. – Саратов, 25-29 сентября 2017. – http://sfm.eventry.org/report/2898.

23. Chumakov D.S., Pylaev T.E., Avdeeva E.S., Dykman L.A., Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A. Study of ultra-small gold nanoparticles toxicity towards microalga *Dunaliella salina* and animal cells // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». – 2018. – Саратов, 24-29 сентября 2018. – http://sfm.eventry.org/report/3317.

24. **Чумаков** Д.С., Пылаев Т.Е., Авдеева Е.С., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А. Характеристика размерной цитотоксичности наночастиц золота с использованием микропланшетной тест-системы на основе микроводоросли *Dunaliella salina* // Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». – 2018. – Уфа, 15-19 июня 2018. – С. 253.

25. Bogatyrev V.A., **Chumakov D.S.**, Pylaev T.E., Avdeeva E.S., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Cytotoxic properties of gold nanoparticles bioreduced by extracts of *Dunaliella salina* // Материалы международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting». – 2019. –Саратов, 23-27 сентября 2019. – http://sfm.eventry.org/report/3937.

Патент:

26. Пат. 2692675. Российская федерация, МПК⁵¹ G01N 33/00 (2006.01) B82B 3/00 (2006.01) A61K 35/748 (2015.01). Недеструктивный способ оценки цитотоксичности наночастиц с использованием микроводоросли *Dunaliella salina* в качестве биосенсора / **Чумаков** Д.С., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А. – Заявка № 2018123205. – Опубл. 26.06.2019. – Бюл. № 18. – 13 с.

Учебно-методическое пособие:

27.**Чумаков Д.С.**, Голубев А.А., Коннова С.А., Богатырев В.А. Использование солоноводной микроводоросли *Dunaliella salina* как тест-объекта в токсикологических исследованиях: Учеб.метод. пособие для студентов биол. фак., обучающихся по направлению «06.03.01 – Биология (Бакалавриат)». – Саратов, 2017. – 29 с.: ил.