

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ А.В. НИКОЛАЕВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

На правах рукописи

ВОРОТНИКОВ Юрий Андреевич

**ПОЛУЧЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ
ОКТАЭДРИЧЕСКИХ КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛИБДЕНА
И ИХ АПРОБАЦИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

02.00.01 – неорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Шестопалов Михаил Александрович

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ | 8 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 16 |
| 1.1. Матрицы | 18 |
| 1.1.1. Металл-органические координационные полимеры | 18 |
| 1.1.2. Органические полимеры | 19 |
| 1.1.3. Аморфный диоксид кремния SiO_2 | 20 |
| 1.2. Соединения лантаноидов (Ln) | 21 |
| 1.2.1. Материалы на основе Ln и МОКП | 23 |
| 1.2.2. Материалы на основе Ln и органических полимеров | 26 |
| 1.2.3. Материалы на основе Ln и SiO_2 | 32 |
| 1.3. Квантовые точки (QD) | 34 |
| 1.3.1. Материалы на основе QD и МОКП | 37 |
| 1.3.2. Материалы на основе QD и органических полимеров | 38 |
| 1.3.3. Материалы на основе QD и SiO_2 | 41 |
| 1.4. Комплексы рутения | 43 |
| 1.4.1. Материалы на основе комплексов рутения и МОКП | 46 |
| 1.4.2. Материалы на основе комплексов рутения и органических полимеров | 48 |
| 1.4.3. Материалы на основе комплексов рутения и SiO_2 | 50 |
| 1.5. Октаэдрические кластерные комплексы | 54 |
| 1.5.1. Материалы на основе кластерных комплексов и МОКП | 56 |
| 1.5.2. Материалы на основе кластерных комплексов и органических полимеров | 57 |
| 1.5.3. Материалы на основе кластерных комплексов и SiO_2 | 60 |
| 1.6. Комбинирование люминофоров в различных матрицах | 62 |
| 1.7. Заключение | 64 |
| ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 66 |
| 2.1. Исходные реагенты и измерительные приборы | 66 |
| 2.2. Получение материалов на основе MIL-101 и MIL-101-пуз (пуз = пиразин) | 67 |
| 2.2.1. Синтез MIL-101 | 67 |
| 2.2.2. Получение 3@MIL-101 | 67 |

| | |
|---|----|
| 2.2.3. Синтез MIL-101-пуз..... | 68 |
| 2.2.4. Получение 3-MIL-101-пуз..... | 68 |
| 2.2.5. Экстракция кластерного комплекса из 3@MIL-101 и 3-MIL-101-пуз..... | 68 |
| 2.2.6. Методы характеристики и изучения свойств..... | 69 |
| 2.2.6.1. Площадь поверхности и структура пор..... | 69 |
| 2.2.6.2. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода..... | 69 |
| 2.2.6.3. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест..... | 69 |
| 2.2.6.4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)..... | 70 |
| 2.2.6.5. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК, индуцированных 3@MIL-101 на клетках линии Нер-2..... | 70 |
| 2.2.6.6. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности..... | 70 |
| 2.3. Получение материалов на основе полистиролсульфоната натрия (PSS)..... | 71 |
| 2.3.1. Синтез полистиролсульфоната натрия (PSS)..... | 71 |
| 2.3.2. Получение $n^x@PSS$ | 71 |
| 2.3.3. Методы характеристики и изучения свойств..... | 72 |
| 2.3.3.1. Гельпроникающая хроматография (ГПХ)..... | 72 |
| 2.3.3.2. Вискозиметрия..... | 72 |
| 2.3.3.3. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест..... | 72 |
| 2.3.3.4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)..... | 72 |
| 2.3.3.5. Проточная цитометрия (FACS)..... | 72 |
| 2.3.3.6. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности..... | 72 |
| 2.4. Получение материалов на основе аморфного диоксида кремния (SiO_2)..... | 73 |
| 2.4.1. Получение микрочастиц $n^x@SiO_2$ (MPs) – метод Штобера..... | 73 |
| 2.4.2. Получение наночастиц $n^x@SiO_2$ (NPs) – микроэмульсионный метод..... | 73 |
| 2.4.3. Получение комплексов An и Bn $\{[Mo_6X_8](H_2O)_2(OH)_4\}$ из 1, 2 и 3..... | 73 |
| 2.4.4. Модификация поверхности $3^{0,01}@SiO_2$ MPs эпокси-группами ($mod-3^{0,01}@SiO_2$ MPs)..... | 74 |
| 2.4.5. Конъюгация $mod-3^{0,01}@SiO_2$ MPs с GFP (Зеленый флуоресцентный белок – Green Fluorescent Protein)..... | 74 |
| 2.4.6. Методы характеристики и изучения свойств..... | 74 |
| 2.4.6.1. Площадь поверхности..... | 74 |
| 2.4.6.2. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода..... | 75 |
| 2.4.6.3. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест..... | 75 |
| 2.4.6.4. Исследование кинетики поглощения частиц клетками..... | 75 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.6.5. Исследование кинетики высвобождения наночастиц из клеток | 75 |
| 2.4.6.6. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) | 76 |
| 2.4.6.7. Изучение распределения микрочастиц в клетке (флуоресцентная микроскопия) | 76 |
| 2.4.6.8. Изучение распределения частиц в клетке (ПЭМ) | 76 |
| 2.4.6.9. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности | 76 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 78 |
| 3.1. <i>Материалы на основе MIL-101</i> | 79 |
| 3.1.1. <i>Получение и характеристика материалов</i> | 79 |
| 3.1.2. <i>Стабильность материалы в воде</i> | 82 |
| 3.1.3. <i>Люминесцентные свойства</i> | 83 |
| 3.1.4. <i>Оценка эффективности генерации синглетного кислорода</i> | 84 |
| 3.1.5. <i>Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест</i> | 86 |
| 3.1.6. <i>Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)</i> | 87 |
| 3.1.7. <i>Генерация АФК в живых клетках</i> | 88 |
| 3.1.8. <i>Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности</i> | 89 |
| 3.2. <i>Материалы на основе полистиролсульфоната натрия (PSS)</i> | 90 |
| 3.2.1. <i>Получение и характеристика материалов</i> | 90 |
| 3.2.2. <i>Люминесцентные свойства</i> | 93 |
| 3.2.3. <i>Жизнеспособность клеток и клеточное проникновение</i> | 94 |
| 3.2.4. <i>Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности</i> | 95 |
| 3.3. <i>Материалы на основе SiO₂</i> | 96 |
| 3.3.1. <i>Микрочастицы</i> | 96 |
| 3.3.1.1. <i>Синтез микрочастиц</i> | 96 |
| 3.3.1.2. <i>Состав материалов и химическая структура</i> | 98 |
| 3.3.1.3. <i>Морфология материалов</i> | 102 |
| 3.3.1.4. <i>Люминесцентные свойства</i> | 103 |
| 3.3.1.5. <i>Оценка эффективности генерации синглетного кислорода</i> | 105 |
| 3.3.2. <i>Наночастицы</i> | 106 |
| 3.3.2.1. <i>Синтез, состав и морфология материалов</i> | 106 |
| 3.3.2.2. <i>Люминесцентные свойства</i> | 107 |
| 3.3.2.3. <i>Генерация синглетного кислорода</i> | 108 |
| 3.4. <i>Биологические свойства материалов на основе SiO₂</i> | 109 |

| | |
|--|-----|
| <i>3.4.1. Микрочастицы</i> | 109 |
| <i>3.4.1.1. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест</i> | 111 |
| <i>3.4.1.2. Клеточное проникновение и распределение в клетке</i> | 112 |
| <i>3.4.1.3. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности</i> | 115 |
| <i>3.4.2. Наночастицы</i> | 116 |
| <i>3.4.2.1. Определение цитотоксичности</i> | 116 |
| <i>3.4.2.2. Клеточное проникновение и выведение</i> | 118 |
| <i>3.4.2.3. Распределение в клетке</i> | 119 |
| <i>3.4.2.4. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности</i> | 121 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 124 |
| ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ | 126 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 128 |
| БЛАГОДАРНОСТИ | 159 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
ФДТ – фотодинамическая терапия
GFP – (*Green Fluorescent Protein*) зеленый флуоресцентный белок
МОКП – металл–органический координационный полимер
ТЭОС – тетраэтоксисилан
ПАВ – поверхностно-активное вещество
mSiO₂ – частицы мезопористого SiO₂
Ln – лантаноиды
УФ – ультрафиолетовое излучение
ИК – инфракрасное излучение
UCL (*upconversion luminescence*) – апконверсионная люминесценция
UCNPs (*upconversion nanoparticles*) – апконверсионные наночастицы
МР – магнитный резонанс
PVDK – 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2,5-диметокси-1,4-фенилен)бис(этен-2,1-диил)добензойная кислота
ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид
HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
ДПК – дипиколиновая кислота
Ad – аденин
BPDC – бифенил-4,4'-дикарбоновая кислота
DMFA – N, N-диметилформамид
DOBDC – 2,5-дигидрокситерефталевая кислота
PEG –полиэтиленгликоль
PEI – полиэтиленимин
РАА – полиакриловая кислота
in vitro – биологические эксперименты, проводящиеся на культуре живых клеток
in vivo – биологические эксперименты, проводящиеся на живом организме
PS – полистирол
PVP – поливинилпирролидон
ТМОС – тетраметоксисилан
DOX – доксорубицин
APTES – 3-аминопропилтриэтоксисилан
СРТ – камптотецин
QD – квантовая точка
ТОР – триоктилфосфин
ТОРО – триоктилфосфиноксид
DSPE-mPEG –1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгли-
коль)]

ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой

ПАМАМ – полиамидоамин

Imz – имидазол

bpy – бипиридил

dpp – 4,7-дифенил-1,10-фенантролин

TMSPS – триметилсилилпропансульфонат

phen – 1,10-фенантролин

dppz – дипиридо[3,2-а:2',3'-с]феназин

NH₂-phen – 5-амино-1,10-фенантролин

terpy – 2,2':6',2''-терпиридин

PMMA – полиметилметакрилат

pyz – пиразин

ESI-MS (*Electrospray ionization mass spectrometry*) – масс-спектрометрия с использованием ионизации распылением в электрическом поле

MPs (*microparticles*) – микрочастицы

NPs (*nanoparticles*) – наночастицы

АФК – активные формы кислорода

DCFH-DA – 5,6-карбокси-2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат

ГПХ – гельпроникающая хроматография

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид

PBS (*phosphate buffered saline*) – фосфатный буфер

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

PSS – полистролсульфонат натрия

EDS (*Energy dispersive X-ray spectroscopy*) – рентгеновская энергодисперсионная спектроскопия

РСА – рентгеноструктурный анализ

РФА – рентгенофазовый анализ

FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) – проточная цитометрия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Октаэдрические галогенидные кластерные комплексы молибдена проявляют большое количество свойств, интересных с точки зрения практических применений. Одними из наиболее значимых свойств являются их яркая люминесценция в красной и ближней инфракрасной областях спектра, высокая эффективность в процессах фотоиндуцированной генерации синглетного кислорода, а также их высокая фотостабильность. Данные свойства позволяют прогнозировать возможность применения данных соединений в такой востребованной в наши дни области, как биомедицина, включающую в себя люминесцентную визуализацию живых систем, фотодинамическую терапию, создание антибактериальных покрытий и др. Стоит отметить, что существует возможность их применения и в других областях, например, фотовольтаика, фотоника, оптика, сенсорика и др. Все это делает комплексы подобного типа заметными конкурентами применяемым в наши дни соединениям. Тем не менее, существует одна значимая проблема применения кластерных комплексов, особенно в биомедицине – низкая гидролитическая устойчивость. Одним из наиболее удобных методов решения данной проблемы является включение комплексов в различные инертные и биосовместимые матрицы. Использование данного подхода позволяет не только повысить стабильность люминофоров в водной среде, но и придать системе в целом большую гибкость и универсальность за счет свойств самой матрицы. Вследствие этого выбор матрицы не менее важен, чем выбор люминофора. В данной работе было выбрано три типа матриц различной природы, в результате чего свойства финальных материалов достаточно сильно различаются. Принимая во внимание свойства каждого из типов материалов, для них была продемонстрирована перспективность применения в различных областях биологии и медицины. Данное исследование показывает насколько гибко можно подстраивать свойства системы «комплекс-матрица» под необходимое применение.

Таким образом, систематическое изучение закономерностей образования материалов на основе различных матриц и кластерных комплексов, зависимостей люминесцентных и фотосенсибилизационных свойств от состава материала, влияния включения комплекса в матрицу на токсические показатели и др. является актуальным направлением в данной области. Кроме того, стоит отметить, что за последние несколько лет наблюдается стремительный рост количества публикаций, посвященных потенциальным биомедицинским

приложениям кластерных комплексов, что также подтверждает актуальность представленной работы и данного направления в целом.

Степень разработанности темы исследования

История развития химии кластерных комплексов достаточно стара и богата и берет свое начало ещё со второй половины XVIII века с исследований хлоридных комплексов молибдена. За более чем 150 лет исследований ученые набрали достаточно большой запас знаний о фундаментальных свойствах данных соединений для перехода к следующей стадии – изучению возможностей практического применения. Действительно, во многих работах, особенно в современных, упоминается принципиальная возможность применения подобных комплексов в различных областях человеческой жизнедеятельности. Тем не менее, вплоть до 2014 года это были только предположения, не подтвержденные экспериментальными данными. После 2014 года наблюдается большой рост количества публикаций, значительная часть которых выполнена в соавторстве с диссертантом, посвященных применению комплексов в тех или иных областях. Стоит отметить, что в работах также наблюдается смещение акцентов с применений самих комплексов на применение материалов, содержащих комплексы в качестве люминесцентных компонентов. Этот факт связан с тем, что сами по себе кластерные комплексы обладают низкой гидролитической устойчивостью. Использование матрицы-носителя повышает универсальность системы, позволяя варьировать как морфологию материалов, так и их свойства в зависимости от типа матрицы. Подобная гибкость системы позволяет получать материал со свойствами, необходимыми для конкретного применения.

Таким образом, развитие подходов к получению люминесцентных материалов на основе кластерных комплексов является актуальной задачей ввиду большого потенциала их использования в различных областях жизни человека. При этом большой интерес представляет изучение и систематизация закономерностей образования материалов, таких как, взаимодействия между кластерным комплексом и матрицей, влияние количества и типа кластерного комплекса на свойства материалов и т.д. Знание этих закономерностей позволит получать материалы со свойствами, необходимыми для конкретных применений.

Цель работы заключается в получении люминесцентных материалов на основе матриц различной природы, содержащих октаэдрические галогенидные кластерные комплексы молибдена, и изучении возможности их применения в биологических системах. В рамках достижения данной цели решались следующие **задачи**:

- получение материалов на основе кластерных комплексов $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ или I) и матриц различной природы – органической (PSS), неорганической (SiO_2) и металл-органической (MIL-101);
- характеристика полученных материалов набором физико-химических методов анализа (ИК-спектроскопия, элементный анализ, рентгеновская дифракция на монокристаллических и порошковых образцах, сканирующая и просвечивающая электронные микроскопии, и др.);
- изучение способов взаимодействия между матрицей и кластерным комплексом в зависимости от типа матрицы;
- изучение люминесцентных свойств и определение фотофизических показателей (квантовый выход, времена жизни и максимум эмиссии люминесценции) полученных материалов в зависимости от типа комплекса и его содержания;
- оценка эффективности материалов в качестве фотосенсибилизаторов в процессе генерации синглетного кислорода;
- изучение биологических свойств полученных материалов, таких как темновая и фотоиндуцированная цитотоксичности, кинетика поглощения и выведения, а также распределение в клетках.

Научная новизна работы

На основе октаэдрических кластерных комплексов молибдена состава $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$ и трех матриц различной природы получено несколько типов материалов. Показано, что в случае металл-органического координационного полимера MIL-101 (МОКП) наблюдается образование соединений типа гость-хозяин. Модификация каркаса молекулами пиперазина, способными координироваться к комплексу, позволяет включать комплекс в МОКП посредством образования ковалентных связей. Показано, что материалы на основе MIL-101 способны генерировать активные формы кислорода внутри клеток, а также проявляют умеренную фотоиндуцированную цитотоксичность.

На основе водорастворимой органической матрицы – полистиролсульфоната натрия (PSS), впервые были получены водорастворимые кластер-содержащие материалы. Изучение люминесцентных свойств материалов с различным типом кластерного ядра и количеством включаемого комплекса показало, что наилучшие свойства наблюдаются для $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}$. Показано, что все материалы проявляют крайне низкую темновую и фотоиндуцированную цитотоксичности.

На основе аморфного диоксида кремния было получено два типа материалов – микро- и наноразмерные частицы (**MPs** – microparticles и **NPs** – nanoparticles). Показано, что в процессе получения материала происходит полный, либо частичный гидролиз кластерного комплекса и образование как водородных, так и ковалентных связей между комплексом и диоксидом кремния. При большом избытке комплекса наблюдается образование смеси фаз диоксида кремния и гидролизованного комплекса. Изучение люминесцентных свойств материалов с различным типом кластерного ядра и количеством включаемого комплекса показало, что наиболее выраженные люминесцентные свойства наблюдаются для $\{Mo_6I_8\}^{4+}$. При увеличении количества кластерного комплекса наблюдается сначала повышение фотофизических характеристик, а затем их постепенное снижение. Показано, что уменьшение размера частиц положительно влияет на эффективность генерации синглетного кислорода, что связано с увеличением удельной площади поверхности.

Изучение биологических свойств материалов на основе SiO_2 показало, что они проявляют низкую темновую цитотоксичность, способны проникать в клетку и находиться в ней достаточно долгое время. Также показано, что частицы легко детектируются внутри клеток благодаря их люминесценции. Модификация поверхности микрочастиц зеленым флуоресцентным белком **GFP** (Green Fluorescent Protein), который не способен проникать в клетки самостоятельно, позволила продемонстрировать их перспективность для трансдукции белков. В свою очередь, для наночастиц была показана высокая эффективность в процессах генерации активных форм кислорода (а именно синглетного кислорода) внутри клетки, и как следствие, их высокая фотоиндуцированная цитотоксичность, значения которой сравнимы с коммерчески доступным фотосенсибилизатором Радахлорином. Полученные данные являются первой демонстрацией проявления высокой фототоксичности материалов на основе кластерных комплексов молибдена.

Результаты данной работы являются существенным вкладом не только в фундаментальные знания в области материаловедения, но и имеют ценность для дальнейшего развития возможностей практических применений материалов на основе кластерных комплексов.

Практическая значимость работы

Полученные данные о закономерностях образования материалов, а также типах реализуемых взаимодействий и свойствах финальных материалов демонстрируют возможность варьирования их свойств для необходимых применений. В работе

продемонстрированы перспективы применения материалов различного типа в нескольких направлениях биологии и медицины: материалы на основе MIL-101 – биовизуализация, ФДТ (фотодинамическая терапия), адресная доставка и пролонгированное действие; материалы на основе PSS – биовизуализация; материалы на основе SiO₂: (1) микрочастицы – биовизуализация и доставка белков в клетку; (2) наночастицы – биовизуализация и ФДТ.

Данные по кристаллическим структурам новых соединений, полученных в рамках настоящего исследования, депонированы в банках структурных данных и являются общедоступными.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология исследования включает в себя этапы получения материалов на основе различных матриц и кластерных комплексов молибдена (Bu₄N)₂[{Mo₆X₈}(NO₃)₆]. Материалы на основе MIL-101, MIL-101-pyz (**pyz** - пиразин) и PSS были получены пропиткой заранее полученных матриц раствором кластерного комплекса. Материалы на основе SiO₂ были получены путем аммиачного гидролиза тетраэтоксисилана (**ТЭОСа**) в присутствии кластерных комплексов двумя методами: микрочастицы – метод Штобера, наночастицы – микроэмульсионным методом. Характеризация полученных соединений проводилась на современном оборудовании при использовании общепризнанных методов, таких как электронная и ИК-спектроскопии, элементные анализы CHN, **EDS** и **ICP-AES**, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (**ЯМР**), рентгенофазовый анализ (**РФА**) и др. Морфология всех нерастворимых в воде материалов была изучена методами просвечивающей и сканирующей электронных микроскопий (**ПЭМ** и **СЭМ**). Водорастворимые материалы на основе PSS были исследованы с помощью гель-проникающей хроматографии (**ГПХ**). Спектры люминесценции для полученных материалов регистрировались при помощи чувствительного к красному свету датчика. Квантовые выходы определены с использованием абсолютных квантовых выходов фотолюминесценции при использовании измерительной системы Hamamatsu Photonics, C9920-03.

При проведении биологических исследований использовались раковые клетки линий Нер-2 и HeLa. Цитотоксичность материалов изучалась с использованием МТТ-теста (**МТТ** – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид). Количество живых, мертвых и апоптотических клеток определяли с помощью метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI. Визуализацию клеток проводили с использованием методов ПЭМ, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (**КЛСМ**) и флуоресцентной

микроскопии. Кинетику проникновения материалов в клетку и их выведения изучали методом проточной цитометрии. Для определения фотоиндуцированной цитотоксичности использовалась лампа с длиной волны $\lambda \geq 400$ нм, а жизнеспособность клеток после облучения определяли методом МТТ.

В ходе работы контроль достоверности результатов выполнялся проведением перекрестных анализов. Достоверность оценки цитотоксического эффекта материалов подтверждена тремя сходящимися данными.

Положения, выносимые на защиту:

- методы получения люминесцентных материалов на основе кластерных комплексов $(\text{Vc}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$ и
 - металл-органического координационного полимера МП-101 и его модифицированного пиперазином производного – МП-101-пуз (X = I);
 - водорастворимого органического полимера полистиролсульфоната натрия PSS (X = Cl, Br, I);
 - аморфного диоксида кремния в виде сферических частиц двух размеров – микрочастицы ($\varnothing \sim 500$ нм) (X = Cl, Br, I) и наночастицы ($\varnothing \sim 50$ нм) (X = I);
- результаты исследования состава и морфологии полученных материалов и типов взаимодействия, реализующихся между кластерным комплексом и матрицей в процессе получения материалов, а также влияние количества включаемого комплекса на эти характеристики;
- результаты изучения люминесцентных свойств и эффективности фотосенсибилизации процесса генерации синглетного кислорода полученными материалами в зависимости от состава кластерного ядра, количества кластерного комплекса и типа материала;
- результаты изучения биологических свойств на перевиваемых клеточных культурах, такие как цитотоксичность, клеточное поглощение и выведение из клетки, распределение в клетке, механизмы поглощения, генерация активных форм кислорода внутри клетки, люминесцентная визуализация внутри клетки, доставка белков, фотоиндуцированная цитотоксичность.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в постановке цели и задач исследования, анализе литературных данных по теме диссертации, выполнении экспериментальных исследований и обработке полученных данных, обсуждении результатов работы и формулировке выводов. Диссертантом были лично выполнены синтезы всех указанных

в экспериментальной части соединений и материалов (матрицы MIL-101 и MIL-101-pуз предоставлены аспирантом Чеплаковой А.М.), проведены микроскопические исследования и исследования фотофизических характеристик образцов, а также обработка данных, полученных на клеточных культурах. Подготовка статей и тезисов докладов осуществлялась совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на конференциях российского и международного уровней: VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев – 2014» (Санкт-Петербург, Россия, 2014), 52 и 53 Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2014-2015), Международный семинар IV International Workshop of Transition Metal Clusters, IWTMC (Новосибирск, Россия, 2014), XXVI Международная Чугаевская конференция по координационной химии (Казань, Россия, 2014), 48 Международный конгресс по химии «IUPAC-2015» (Пусан, Корея, 2015), IX Международная конференция молодых ученых по химии «Менделеев-2015» (Санкт-Петербург, Россия, 2015), Международный семинар «CLUSPOM-Altay» (Алтай, Россия, 2015), Международный семинар «CLUSPOM-1» (Ренн, Франция, 2016), Международная конференция 42nd International Conference on Coordination Chemistry (Брест, Франция, 2016), XIII Международная конференция «Спектроскопия координационных соединений» (Туапсе, Россия, 2016), V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2016), Байкальская школа-конференция по химии (Иркутск, Россия, 2017), IV Школа-конференция молодых учёных «Неорганические соединения и функциональные материалы» ICFM-2017 (Новосибирск, Россия, 2017), 27 Международная Чугаевская конференция по химии координационных соединений и 4 школа-конференция для молодых ученых «Physicochemical Methods in Coordination Chemistry» (Нижний Новгород, Россия, 2017), Международный семинар «CLUSPOM-2018» (Жиф-сюр-Иветт, Франция, 2018).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в международных журналах, которые входят в перечень индексируемых в международной системе научного цитирования Web of Science. В материалах всероссийских и зарубежных конференций опубликованы тезисы 27 докладов.

Степень достоверности результатов исследований

Достоверность представленных результатов основывается на высоком методическом уровне проведения работы, согласованности экспериментальных данных с данными других исследований. О признании информативности и значимости основных результатов работы мировым научным сообществом также говорит их опубликование в рецензируемых журналах различного уровня и высокая оценка на российских и международных конференциях.

Соответствие специальности 02.00.01 – неорганическая химия

Диссертационная работа соответствует п. 1. «Фундаментальные основы получения объектов исследования неорганической химии и материалов на их основе» паспорта специальности 02.00.01 – неорганическая химия.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 158 страницах, основной текст работы содержит 49 рисунков и 6 таблиц. Работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, описания полученных результатов и их обсуждения, основных результатов и выводов, списка цитируемой литературы (311 наименований) и приложений на 33 страницах, в которых приведены дополнительные данные по диссертационной работе.

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт неорганической химии им. А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук (ИНХ СО РАН) в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований ИНХ СО РАН по приоритетному направлению V.44. «Фундаментальные основы химии», программа ФНИ СО РАН V.44.4. «Развитие научных основ направленного синтеза новых неорганических и координационных соединений и функциональных материалов на их основе», номер гос.регистрации: 0300-2014-0010. Кроме того, работа была выполнена в рамках проектов РФФИ (14-03-92612, 15-33-20083, 17-03-00140, 18-33-00209) и РФФИ (14-14-00192 и 18-75-10060). Также результаты исследований были поддержаны премией им. академика А.В. Николаева за успехи в научной работе в 2016-2017, 2017-2018 и 2018-2019гг. (ИНХ СО РАН), стипендией правительства Новосибирской области в 2017г. и премией мэрии г. Новосибирска 2018г., а также премией Special Prize in Topsoe PhD Students Competition 2017 for Fundamental importance.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В последние десятилетия активно развиваются методы исследования процессов, протекающих на клеточном и молекулярном уровнях. Одним из многообещающих методов в данном направлении является использование люминесцентной визуализации. В самом методе, как ясно из названия, используются вещества, обладающие яркой люминесценцией, но немаловажными аспектами также являются возможность их модификации для увеличения биосовместимости и/или придания свойства адресной доставки к нужному объекту, а также низкая токсичность. Помимо этого, удобно, чтобы данные соединения обладали люминесценцией в диапазоне 650-1450 нм, то есть в красной и ближней инфракрасной областях спектра, так как (1) фотоны ИК-области незначительно влияют на живые организмы, поскольку в основном они не поглощаются тканями. Благодаря этому, фотоны могут проникать глубоко в ткани, что позволяет неинвазивно обнаруживать биологические молекулы или события. (2) Поскольку автофлуоресценция живой ткани, в основном находится в области от фиолетового до синего, визуализация в ИК-области также обеспечивает преимущество чувствительности обнаружения из-за улучшения отношения сигнал/шум. (3) Дополнительным преимуществом фотонов ИК-области для биологической визуализации является их ограниченное рассеяние в сравнении с видимыми фотонами, что приводит к улучшению разрешения изображения. Кроме того, люминофоры в некоторых случаях имеют люминесцентный отклик на определённые компоненты внешней среды, благодаря чему они могут служить в качестве биосенсоров на различные внешние факторы, такие как температура (внутриклеточные люминесцентные термометры), кислород (измерение уровня кислорода внутри живых систем), наличие в растворе (или в живой системе) определенных молекул (белков, аминокислот, антибиотиков, молекул ДНК и др.) или ионов (био- и иммуносенсоры). Отдельно стоит выделить *красные* люминофоры, которые способны передавать энергию возбужденного состояния молекулярному триплетному кислороду ($^3\text{O}_2$), переводя его в возбужденное синглетное состояние ($^1\text{O}_2$). Синглетный кислород имеет высокую химическую активность и вследствие этого, в случае его генерации внутри клеток, способен разрушать клеточные структуры, приводя к клеточной гибели, на чем и основан один из многообещающих методов терапии раковых заболеваний – фотодинамическая терапия. Таким образом, можно заключить, что люминесцентные соединения имеют огромное количество применений в областях биологии и медицины и поскольку конструирование и синтез описанных соединений лежит на плечах химиков, в последнее время наблюдается активный рост публикаций по разработке

люминесцентных соединений для биологической визуализации, диагностики заболеваний и терапии.

В настоящее время наиболее многообещающими (и в случае некоторых из них широко используемыми на практике) соединениями являются различные органические люминофоры, комплексы рутения, полупроводниковые и углеродные квантовые точки, соединения лантаноидов, октаэдрические кластерные комплексы переходных металлов и т.д. Состав, строение и свойства представленных соединений будут описаны далее. Однако известно, что все описанные люминофоры в той или иной мере обладают недостатками в свободном виде. Так, наиболее широко используемые органические люминофоры, не смотря на высокие коэффициенты поглощения, значения квантовых выходов и узкие полосы эмиссии, проявляют высокую фотовыгораемость, т.е. необратимо разрушаются при воздействии облучения. Неорганические люминофоры зачастую лишены данного недостатка, однако и у них есть ряд серьезных проблем. Например, комплексы рутения зачастую нерастворимы и/или неустойчивы в биологических средах вследствие того, что для усиления поглощения и, как следствие люминесценции, как правило используются гидрофобные полиароматические гетероциклические лиганды. Квантовые точки также зачастую являются гидрофобными, так как для стабилизации их поверхности используются протяженные алифатические молекулы. Кроме того, наиболее изученные квантовые точки на основе кадмия и халькогенов характеризуются высокой токсичностью вследствие их постепенного разрушения в биологических средах и высвобождения ионов Cd^{2+} . Аналогичные проблемы затрагивают и соединения лантаноидов: высокая гидрофобность вследствие использования ароматических лигандов в качестве антенн для усиления люминесцентных свойств и низкая гидролитическая устойчивость. В случае же не использования лигандов-антенн происходит значительное снижение люминесцентных свойств. Таким образом, на основании вышесказанного, казалось бы, можно заключить, что использование данных соединений в био- и медицинских приложениях невозможно, однако химики нашли немало способов повысить их стабильность и биосовместимость. Одним из ставших уже классическим методов стабилизации люминофоров является их включение в определенные вещества, выполняющие в данном случае роль матрицы, которая экранирует соединение от внешней среды, например органические полимеры, аморфный диоксид кремния (SiO_2), металл-органические координационные полимеры (МОКП) и др. Помимо этого, кроме увеличения стабильности, правильный подбор матрицы может приводить к усилению необходимых свойств, например люминесцентных или фотосенсибилизационных (генерация 1O_2). Также использование матрицы позволяет легко

комбинировать различные типы люминофоров для усиления свойств одного из них или проявления синергетического эффекта. Возможна также дальнейшая модификация матрицы различными молекулами, имеющими свойства адресной доставки или терапевтический эффект. Таким образом, создание композита люминофор-матрица расширяет возможность применения известных люминесцентных соединений.

Данный обзор литературы будет направлен на освещение работ по изучению материалов на основе красных неорганических люминофоров (соединения лантаноидов, полупроводниковые квантовые точки, комплексы рутения, и кластерные комплексы) и таких матриц, как МОКП, органические полимеры и SiO_2 и демонстрации их возможных применений в биологических и медицинских приложениях. Для начала рассмотрим некоторые общие свойства самих матриц.

1.1. Матрицы

1.1.1. Металл-органические координационные полимеры

Металл-органические координационные полимеры (МОКП) представляют собой соединения, состоящие из ионов металлов или кластеров и координированных к ним органических лигандов, с образованием одно-, двух- или трехмерных структур. (рис. 1)

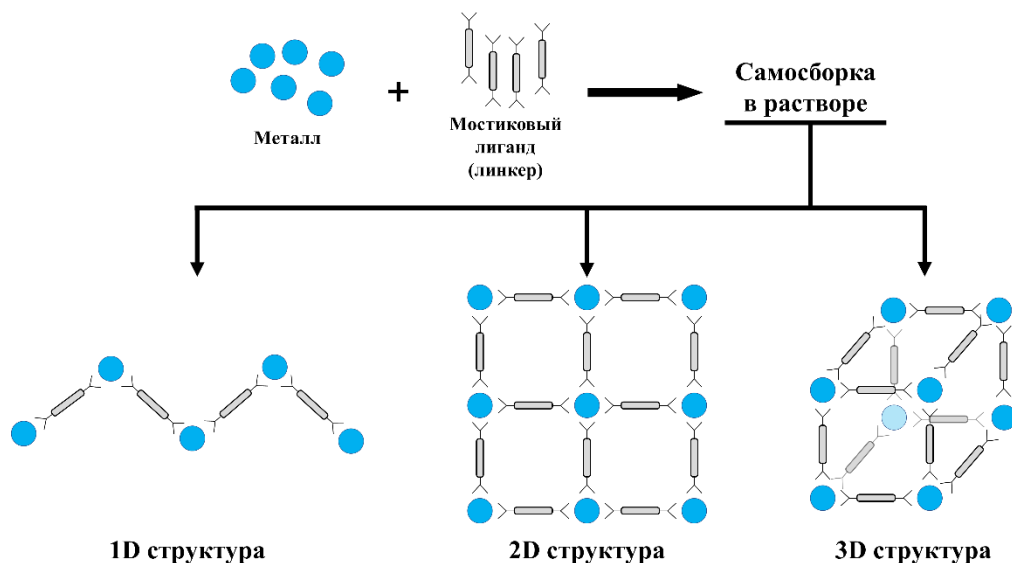


Рис. 1. Схема получения МОКП и репрезентация возможных структур.

Зачастую в качестве органических лигандов выступают двух- и более основные кислоты, самыми известными из которых являются бензолкарбоновые кислоты. Набор используемых для получения МОКП металлов крайне велик – например Zn, Al, Fe, Mn и многие другие. Наибольший интерес координационные полимеры вызывают благодаря высокой пористости и возможности, в некоторых случаях, удалять из пор гостевые

молекулы растворителя с сохранением структуры и заполнять их другими соединениями. Области их возможных применений также очень обширны: очистка и разделение газа, катализ, суперконденсаторы и др. Также МОКП перспективны с точки зрения биологии и медицины, например, они могут выступать в качестве компонентов сенсоров или систем доставки лекарственных средств. Многообразие свойств МОКП и, соответственно, возможных перспектив их применения послужило причиной быстрого развития данной области химии, и, стараниями ученых всего мира, на данный момент получено и изучено огромное количество координационных полимеров.

1.1.2 Органические полимеры

В общем смысле *полимер* (от греч. *πολύ* – много и *μέρος* – часть) представляет собой большую молекулу или макромолекулу, состоящую из многих повторных субъединиц. Полимеры варьируются от известных синтетических пластмасс, таких как полистирол, полиметилметакрилат и др., до природных биополимеров, таких как ДНК, белки, полисахариды и др. Несмотря на то, что природные полимеры используются человеком с давних времен, массовое производство синтетических полимеров и их активное использование началось только в начале XX века. В наше время без использования синтетических и природных полимеров не обходится практически ни одна область человеческой жизнедеятельности.

Применение полимеров не обошло стороной и области биологии и медицины. В частности, в настоящее время большое количество исследователей использует полимеры в качестве матриц или стабилизирующих агентов. Например, нерастворимым полимерам, таким как полистирол или полиметилметакрилат, можно придать форму нано- или микросфер, включив в них необходимые молекулы, к примеру люминофоры, которые за счет этого будут экранированы от окружающей среды и не будут подвержены разрушению в водной или биологической среде. С другой стороны, заряженные полимеры (поликатионы и полианионы) зачастую используются в коллоидной химии для стабилизации частиц в растворе. Кроме того, покрытие поверхности частиц биосовместимыми гидрофильными полимерами позволяет повысить биобезопасность системы в целом. Также стоит отметить, что современные синтетические возможности позволяют получать мультифункциональные полимеры путем внедрения в цепь определенных мономеров, несущих необходимые функциональные группы, или создания блочных полимеров (блок-сополимеров). Таким образом, многообразие органических полимеров и способов их модификации обеспечивает огромную гибкость их свойств и позволяет направленно получать полимеры с

заданными свойствами. Все это обеспечило большую популярность использования полимеров с целью создания композитных материалов для областей биологии и медицины.

1.1.3. Аморфный диоксид кремния SiO₂

Создание нанокомпозитов на основе диоксида кремния является, наверное, одним из самых разработанных направлений в области биомедицинских применений. Такое обширное изучение нанокомпозитов обусловлено рядом интересных свойств диоксида кремния. (1) SiO₂ обладает высокой химической стабильностью, инертностью и термической устойчивостью, что делает его идеальным кандидатом для создания материалов на его основе. (2) частицы SiO₂ обладают высокой коллоидной стабильностью благодаря (а) высокому электростатическому отталкиванию, так как его поверхность при нейтральных или щелочных рН заряжена отрицательно в связи с низким значением его изоэлектрической точки (рН = 2-3); (б) его поверхность имеет более низкую силу ван-дер-ваальсовых взаимодействий, нежели оксиды металлов. (3) SiO₂ прозрачен для света и магнетизма – он не поглощает свет и не влияет на магнитные поля, что позволяет допантам с разными свойствами при комбинировании в диоксиде кремния сохранять свои оптические и/или магнитные свойства. (4) поверхность SiO₂ является гидрофильной, а сам он признан нетоксичным и биосовместимым, что делает его пригодным для биомедицинских применений. (5) способы получения и модификации SiO₂ хорошо развиты и относительно просты, что, несомненно, повышает интерес ученых к созданию материалов на его основе.

Можно выделить два основных способа создания нанокомпозитов на основе SiO₂ – метод Штобера и микроэмульсионный метод (метод обращенной микроэмульсии). Оба подхода основаны на гидролизе алкоксисиланов, в основном тетраэтоксисилана (ТЭОС) – Si(OEt)₄. Метод Штобера был предложен в 1968 году [1] и заключается в аммиачном гидролизе ТЭОСа в смеси этанол-вода. Данный метод достаточно удобен в связи с его простотой и возможностью замены (ограниченной) этанола на другие растворители, в зависимости от природы включаемого допанта. Однако основным недостатком метода Штобера является ограниченная возможность получать монодисперсные частицы с размером меньше 100 нм. Более универсальным подходом является микроэмульсионный метод. Суть метода заключается в использовании растворителя, не смешивающегося с водой, в качестве основной фазы коллоидной системы и поверхностно-активных веществ (ПАВ). При этом вода, в которой происходит гидролиз ТЭОС, заключается в обратные мицеллы, образованные ПАВ, которые выступают в роли шаблонов для частиц. Подобные мицеллы имеют очень узкое распределение по размерам и их размер может

достаточно легко регулироваться соотношением компонентов системы, однако их размер обычно меньше 100 нм. Таким образом, обладая знаниями об обоих методах, исследователи способны получать частицы SiO_2 в широком диапазоне размеров – от десятков до сотен нанометров.

Отдельно стоит выделить развитие методов получения частиц мезопористого SiO_2 (mSiO_2), который вызывает *особый* интерес с точки зрения биологии и медицины. Обычно для получения mSiO_2 используют описанные выше подходы с небольшой модификацией: в реакцию добавляют дополнительный ПАВ (обычно цетилтриметиламмоний бромид – ЦТАБ), который образует стрежневидные упорядоченные мицеллы, выступающие в роли внутренних темплатов в процессе гидролиза алкоксисиланов. В дальнейшем ПАВ можно легко удалить простой промывкой растворителями с определенным рН. В результате образуются высокопористые частицы диоксида кремния. Высокий интерес к mSiO_2 обусловлен возможностью включения в его поры различных биомолекул, например лекарственных препаратов для химиотерапии. В сочетании с легкостью модификации поверхности функциональными молекулами, например чувствительными к изменению рН или обладающими свойством адресной доставки, а также возможностью включения веществ, позволяющих отслеживать положение композита, например люминофоры (люминесцентная визуализация), электроноплотные частицы (компьютерная томография) или МР-контрастные соединения (МР-томография – магнитно-резонансная томография) это делает мезопористые частицы диоксида кремния прекрасной платформой для создания комплексных препаратов, обладающих терапевтическим и диагностическим действием (агенты для тераностики).

1.2 Соединения лантаноидов (Ln)

Группа лантаноидов (**Ln**) включает в себя пятнадцать элементов от лантана до лютеция, а также скандий и иттрий. Все лантаноиды в форме Ln^{3+} , кроме La^{3+} , Pm^{3+} и Lu^{3+} , проявляют выдающиеся люминесцентные свойства [2]. Отличительными чертами люминесцентных свойств лантаноидов можно назвать узкие полосы эмиссии, фотостабильность, а также большие значения времен жизни люминесценции. Как можно видеть из рисунка 2, люминесценция лантаноидов перекрывает огромный спектральный диапазон – от ближней ультрафиолетовой области (**УФ**) до ближней инфракрасной области (**ИК**). Положение длин волн этих полос существенно не изменяется с изменением лиганда или таких параметров как температура, давление или рН. К одному из самых больших недостатков данных соединений можно отнести низкие коэффициенты поглощения и, как

следствие, низкую интенсивность люминесценции. Данная проблема была решена в середине прошлого века благодаря открытию «антенного эффекта» [2]. Данный эффект основан на использовании антенных лигандов (обычно ароматические или полиароматические молекулы), которые способны усиливать металл-центрированную эмиссию за счет передачи энергии с возбужденных уровней лиганда на возбужденные уровни металла. Данное открытие вызвало огромный интерес ученых к комплексам лантаноидов и послужило толчком к развитию данного направления. Отдельно стоит отметить еще одно свойство люминесценции лантаноидов, а именно возможность возбуждения соединений двумя и более низкоэнергетическими фотонами (ИК) с высвечиванием фотонов с более высокой энергией (например УФ, видимая область или ИК). В русском языке данный эффект носит название апконверсионная люминесценция (UCL, от англ. *upconversion luminescence*) [2].

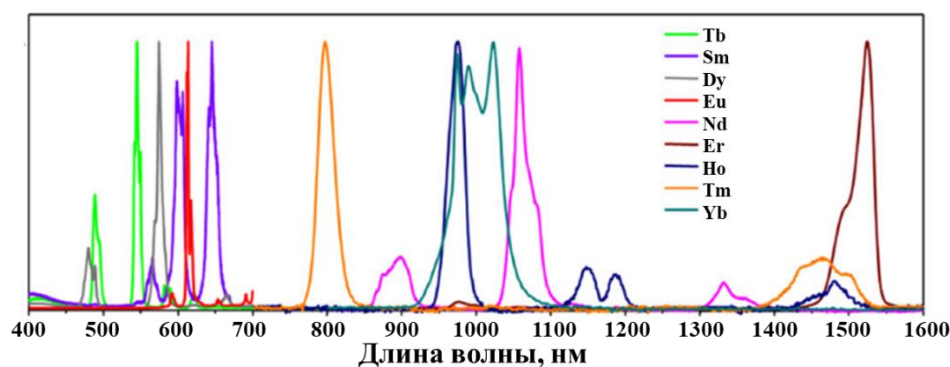


Рис. 2. Спектры эмиссии соединений лантаноидов.

В настоящее время лантаноиды применяются в огромном количестве направлений человеческой жизнедеятельности, среди которых катализаторы, компоненты оптоэлектроники, магнитов, лазеров и многое другое [2]. Конечно, богатые люминесцентные свойства лантаноидов интересны и с точки зрения биологии и медицины. Наиболее интересны для данных областей лантаноиды, способные проявлять эмиссию в красной и инфракрасной областях спектра. Что касается классической люминесценции, т.е. перевод фотона с более высокой энергией в фотон с более низкой энергией, то наибольшее количество исследований сосредоточены на комплексах европия (Eu^{3+}). В тоже время не стоит забывать о способности соединений лантаноидов к UCL. Данный эффект *особенно* интересен с точки зрения биологии и медицины, поскольку позволяет и возбуждать соединения и получать эмиссию в ИК-области. А использование ИК диапазона в биологических и медицинских целях имеет бóльшие перспективы нежели использование УФ или видимой области. Стоит отметить, что UCL молекулярных комплексов лантаноидов достаточно

неэффективна и в настоящее время для создания УС люминофоров используется метод создания наночастиц определенной структуры, допированных трехвалентными ионами лантаноидов (*upconversion nanoparticles* – **UCNPs**) [2]. В качестве матрицы обычно используют кристаллические наночастицы фторидов металлов, такие как например, LaF_3 , YF_3 , NaYF_4 , BaYF_5 и другие. В качестве допантов обычно используют ионы Yb^{3+} и Nd^{3+} , а для усиления поглощения в ИК-области также добавляют Er^{3+} , Tm^{3+} , и Ho^{3+} . Помимо этого, для повышения модальности системы (то есть придания дополнительного свойства) часто в качестве допанта также используется Gd^{3+} , который, как известно, в настоящее время является одним из лучших МР-контрастеров. Таким образом, подобные системы могут сочетать в себе несколько свойств, позволяющих визуализировать их в живых системах – люминесценция в ИК-области, МР-контраст и рентгеновская контрастность (вследствие высокой молярной массы лантаноидов и их высокой локальной концентрации). Подобные частицы также обладают высокой фото- и химической стабильностью, а также имеется возможность их последующей модификации с целью создания композитных материалов. Активно используются методы покрытия частиц органическими полимерами, SiO_2 и др.

За последнее десятилетие в исследованиях, направленных на соединения лантаноидов, наблюдается активное смещение с изучения их фундаментальных свойств на непосредственную демонстрацию их возможных применений. Наиболее ярко данное смещение наблюдается в областях биологии и медицины. Далее рассмотрим достижения ученых в области создания материалов на основе лантаноидов и различных матриц с разделением по матрицам.

1.2.1. Материалы на основе Ln и МОКП

В данной главе и далее удобно будет сразу выделять основные подходы, используемые исследователями для создания композитных материалов. Так, основные методы создания материалов на основе МОКП и Ln, можно условно разделить на три группы. Первый метод основан на том, что лантаноиды, поскольку они тоже являются металлами, способны выступать в роли металлоцентров, образующих сам каркас, и, таким образом, сами способны образовывать МОКП [3-6]. Второй метод основан на включении в поры заранее приготовленного МОКП ионов или комплексов лантаноидов (пропитка) [7-10]. И третий метод основан на выращивании координационных полимеров вокруг заранее приготовленных наночастиц лантаноидов (UCNPs) [11].

На настоящий момент работы по изучению возможности применения материалов на основе МОКП и лантаноидов, проявляющих люминесценцию в красной и ИК-областях, в биологии и медицине достаточно слабо развиты. Исключением является изучение возможности их применения в качестве внутриклеточных люминесцентных термометров [12, 13]. Данный эффект основан на изменении интенсивности люминесценции при изменении температуры и позволяет создавать наноразмерные термометры, способные измерять температуру внутри клеток или даже в пределах клеточных органелл. Однако и эти исследования являются новыми и в основном они не старше 2010 года. В остальном, большинство исследований направлены на развитие сенсоров на различные ионы металлов [7, 9, 13, 14], биомолекулы [5, 10, 13], газы (в том числе O₂) [13] и pH [6, 13]. Все сенсорные свойства также основаны на изменении интенсивности эмиссии лантаноидов при изменении внешних условий. Также имеется небольшой ряд работ, в которых демонстрируется возможность применения данных объектов в качестве агентов для биовизуализации [3, 4, 6]. Далее рассмотрим подробнее наиболее интересные и выдающиеся работы.

К одной из первых работ по изучению применения материалов на основе МОКП и лантаноидов в качестве агентов для визуализации в ближней ИК-области можно отнести работу *Foucault-Collet и др.* [3], опубликованную в 2013 году. В данной работе авторами был получен МОКП Yb-PVDK-3 на основе Yb³⁺ и 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2,5-диметокси-1,4-фенилен)бис(этен-2,1-диил)дibenзойная кислота (**PVDK**) (Рис. 3). В данном случае органический лиганд выступает также в качестве антенного лиганда.

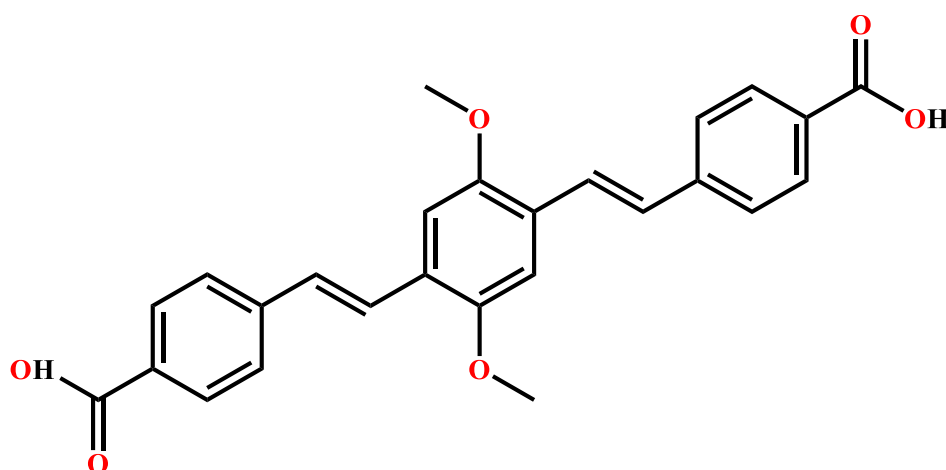


Рис. 3. Структура 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2,5-диметокси-1,4-фенилен)бис(этен-2,1-диил)дibenзойной кислоты.

Синтез наноразмерного МОКП проводили методом обращенной микроэмульсии. В качестве поверхностно-активного вещества использовали цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ). Полученные нано-МОКП имеют морфологию блоков со средними размерами 0,5 (±0,3) мкм (длина) на 316 (±156) нм (ширина) на 176 (±52) нм (толщина). Данный

материал проявляет отсутствие фотовыгорания, стабильность в водных растворах и заметную люминесценцию с максимумом эмиссии на 980 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 450$ нм), однако его значения квантовых выходов составляют $1,0 (\pm 0,3) \times 10^{-4}$ в воде и $5,2 (\pm 0,8) \times 10^{-5}$ в 0,1 М буфере **HEPES** (pH = 7,3). Данные значения достаточно низки в сравнении со многими люминесцентными соединениями лантаноидов, однако достаточны для получения хорошо различимого сигнала с использованием приборов люминесцентной визуализации, например, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Все исследованные свойства показали возможность изучения образцов в качестве перспективных агентов для биовизуализации и далее авторами были изучены цитотоксичность и клеточное проникновение Yb-PVDC-3. Цитотоксичность была изучена на клетках HeLa (клетки карциномы шейки матки человека) и NIH 3T3 (мышинные эмбриональные фибробласты) методом МТТ. Было продемонстрировано, что нано-МОКП проявляют относительно низкую клеточную токсичность вплоть до концентрации 50 мкг/мл. Клеточное проникновение и локализация были изучены с помощью КЛСМ. Было показано, что кристаллы Yb-PVDC-3 способны проникать в клетки и локализуются по всему объему цитоплазмы, не проникая в ядро.

Еще одним интересным примером демонстрации применения систем на основе МОКП и Ln является работа *Zhang и др.* [10] В данной работе авторы разработали эффективный сенсор на дипиколиновую кислоту (ДПК), которая является уникальным биомаркером на споры *бацилл* (грамположительные палочковидные бактерии, образующие внутриклеточные споры) и в частности на *Bacillus anthracis*, которая является возбудителем такого страшного заболевания, как сибирская язва. Сам сенсор представляет собой координационный полимер bio-MOF-1 ($\text{Zn}_8(\text{Ad})_4(\text{BPDC})_6\text{O}_2$, где **Ad** – аденин, **BPDC** – бифенил-4,4'-дикарбоновая кислота), пропитанный нитратами тербия и европия ($\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ и $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$) – Tb/Eu@bio-MOF-1. Далее с использованием суспензии Tb/Eu@bio-MOF-1 в N,N-диметилформамиде (ДМФА) были получены пленочные образцы. Материал проявляет ярко-оранжевую люминесценцию при возбуждении светом с длиной волны 254 нм. Оранжевый цвет является следствием переноса энергии с ионов тербия на ионы европия. Сам механизм определения ДПК состоит в следующем: в отсутствие ДПК наблюдается перенос энергии с Tb^{3+} на Eu^{3+} и, соответственно, ярко-оранжевая люминесценция. Однако при добавлении ДПК, она образует хелатный комплекс с Tb^{3+} и перенос энергии с ДПК на Tb^{3+} постепенно становится доминирующим процессом переноса энергии. Таким образом, после добавления ДПК оранжевая люминесценция сменяется зеленой, что можно наблюдать невооруженным взглядом. Далее авторы посредством записи спектров

эмиссии в присутствии различного количества ДПК продемонстрировали быстрый отклик и высокую чувствительность сенсора с пределом чувствительности 34 нМ, который намного ниже инфицирующей дозы спор *Bacillus anthracis* (60 мкМ) для человека.

В работе *Sava Gallis и др.* [4] был получен еще один пример МОКП на основе лантаноидов и изучена их цитотоксичность и клеточное проникновение. Для получения координационных полимеров авторами был выбран достаточно большой набор Ln, а именно Eu, Nd, Yb, Y, Tb и Yb/Nd, а в качестве органического лиганда выступала 2,5-дигидрокситерефталевая кислота (**DOBDC**). В результате был получен ряд образцов LnDOBDC микрометрового размера. Выбор такого большого ряда Ln объясняется перекрыванием их люминесценцией большого диапазона длин волн – от ~614 до 1350 нм. Также, для демонстрации возможности применения материалов в наноразмерной форме с использованием простой обработки раствора прекурсоров микроволнами авторами были получены наночастицы EuDOBDC. Для МОКП на основе Eu, Nd, Yb и Yb/Nd, а также для наночастиц EuDOBDC, была изучена цитотоксичность на клетках HeLa и RAW264.7 (мышинные макрофаговые клетки) при инкубации в течение 24 и 48 часов. Было продемонстрировано, что в целом все образцы проявляют достаточно низкую токсичность на обоих типах клеток и для большинства образцов не была достигнута даже 80% клеточная гибель вплоть до концентраций 500 мкг/мл, однако при инкубации в течение 48 часов наблюдались несколько более высокие значения токсичности. В тоже время наноразмерный образец показал значительно более высокую цитотоксичность, причем зависящую как от концентрации, так и от времени, что в общем-то характерно для наночастиц. Далее клетки, инкубированные с материалами также в течение 24 и 48 часов были изучены с помощью КЛСМ. Было показано, что по прошествии 48 часов наблюдается значительное снижение люминесценции, которое скорее всего связано с разрушением структуры МОКП. Данная тенденция к разрушению структуры также может объяснить рост токсичности при длительной инкубации. Тем не менее, даже через 48 часов 25 % частиц в клетках HeLa и 39 % – в клетках RAW264.7 сохранили люминесцентные свойства, исходя из чего, по мнению авторов полученные образцы можно рассматривать в качестве перспективных агентов для долгосрочных экспериментов по изучению биораспределения и отслеживанию процессов на клеточном уровне.

1.2.2. Материалы на основе Ln и органических полимеров

В случае использования полимеров, для создания композитных материалов с соединениями лантаноидов исследователями обычно используется два подхода. Первый

подход основан на использовании молекулярных комплексов Ln^{3+} , которые либо включают в заранее подготовленную полимерную матрицу, либо проводят полимеризацию в присутствии комплексов [15-23]. Второй подход направлен на покрытие UCNPs готовыми полимерами (обычно водо- или органорастворимыми) [24-45]. Наиболее часто используемыми полимерами являются полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленимин (PEI) и полиакриловая кислота (PAA). Данный метод является более популярным в литературе, что, по-видимому, связано с удобством использования UCNPs, которые проявляют как классическую люминесценцию, так и UCL.

Значительная часть работ в данной области направлена на фундаментальные исследования физико-химических свойств полученных веществ, однако в последнее время наблюдается увеличение количества публикаций, в которых авторы проводят успешную демонстрацию возможности применения подобных соединений в модельных биологических системах. Так за последние 10 лет в данном направлении опубликовано внушительное количество работ по изучению влияния композитов на жизнедеятельность различных клеточных культур [15, 19-21, 27, 28, 34, 35, 40, 41, 45], применения их в качестве сенсоров на различные биомолекулы [17, 18, 22, 24, 32, 34], агентов для визуализации *in vitro* (на культурах клеток) [15, 20, 21, 27, 35, 41, 43, 45] и *in vivo* (на живых организмах) [29, 36, 38, 44], а также средств адресной доставки [35, 41, 45]. Отдельно можно выделить комбинирование материалов на основе UCNPs, обладающих эмиссией в красной и ИК-областях, с фотосенсибилизаторами (веществами, способными генерировать $^1\text{O}_2$), область поглощения которых перекрывается с областью эмиссии UCNPs, в частности с производными порфиринов, с целью создания агентов для ФДТ [28, 32, 46]. В данных работах демонстрируется значительная клеточная гибель при облучении клеток, инкубированных с веществами, ИК-лазером.

Далее рассмотрим наиболее представительные работы в области изучения применения композитов на основе соединений Ln и органических полимеров. Одной из наиболее ранних работ по изучению влияния Ln-содержащих материалов на жизнедеятельность клеточных культур является работа 2007 года *Vancaeyzele и др.* [15] В ней авторы использовали первый из приведенных выше подходов, а именно включение молекулярных комплексов $\text{Ln}(4,4,4\text{-трифторо-1-(2-нафтил-1,3-бутандион)}_3$, представленных на рисунке 4, в матрицу полистирола (PS). В качестве лантаноидов были выбраны Ho, Tb и Eu, а также следующие композиции: Pr/Ho/La/Tb/Eu, Pr/Ho и Tb/Eu.

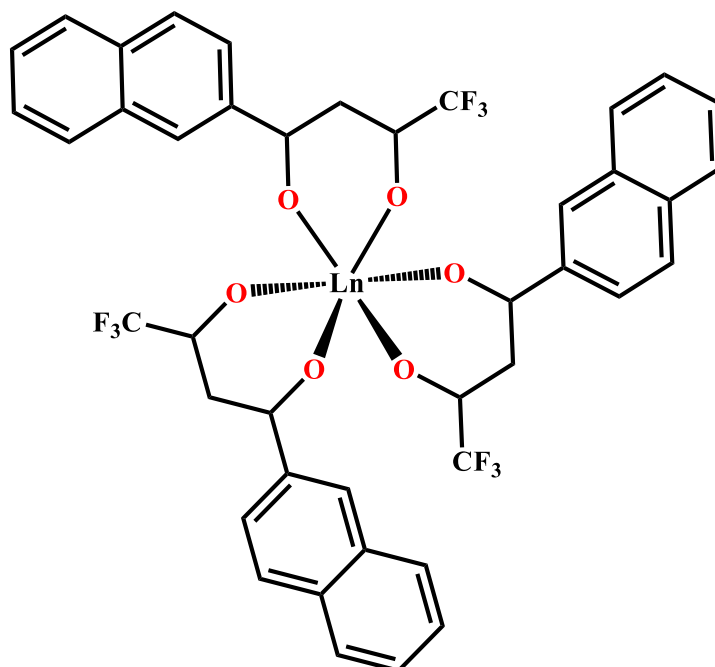


Рис. 4. Структура комплексов Ln(4,4,4-трифторо-1-(2-нафтил-1,3-бутандион)₃.

Методом миниэмульсионной полимеризации стирола в присутствии дивинилбензола, который обеспечивает сшивку цепей полимера и способствует образованию частиц сферической формы, и комплексов Ln были получены наночастицы с диаметром $\sim 45-90$ нм (размер варьировался для различных Ln) и узким распределением по размеру, содержащие $\sim 10^3$ хелатированных ионов лантаноидов. Полученные частицы проявляют хорошую коллоидную стабильность – даже через несколько месяцев не наблюдается полного выпадения частиц. Для определения механизма проникновения частиц в клетки авторы выбрали две лейкозные клеточные культуры человека: KG-1a (острый миелоидный лейкоз) и K562 (хронический миелоидный лейкоз). На основании проведенных исследований было показано, что частицы хорошо проникают в клетки и предпочтительным механизмом проникновения является неспецифический эндоцитоз.

Другим интересным исследованием, относящимся к первому подходу, является работа *Zheng и др.* [19], в которой авторы использовали крайне необычный полимер в качестве матрицы – так называемые "цилиндрические полимерные щетки", являющиеся сополимерами различных эфиров метакриловой кислоты. (рис. 5) Данный тип полимеров благодаря разветвленной структуре и наличию большого количества хелатирующих групп является хорошим кандидатом для создания стержневидных гибридных наночастиц. В работе материалы были получены в три достаточно простых стадии. (рис. 5) На первой стадии (I) проводилась пропитка полимера метансульфоновой кислотой для повышения уровня сорбции ионов лантаноидов. На второй стадии (II) полученный полимер был пропитан ионами Ln^{3+} (Gd, Nd, Eu, Tb, Tb/Gd и Tb/Nd). Заключительной стадией (III) было

покрытие полимера тонким слоем SiO_2 посредством щелочного гидролиза тетраметоксисилана (ТМОС) с получением целевого продукта.

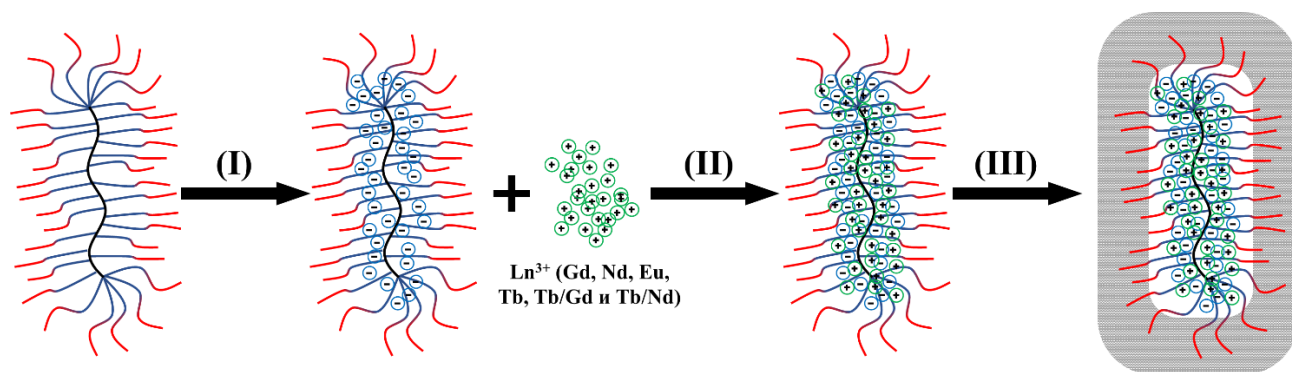


Рис. 5. Схема получения материала на основе "цилиндрических полимерных щеток".

Для полученных материалов была изучена цитотоксичность на клетках линии A549 (клеточная линия, производная от бронхоальвеолярной карциномы человека) и было показано, что они не проявляют значительного влияния на жизнедеятельность клеток в концентрациях вплоть до 150 мкг/мл.

Что касается второго метода получения материалов, а именно покрытия UCNPs различными полимерами, то здесь количество интересных и масштабных исследований гораздо больше. Например, в работе *Jin и др.* [27] было изучено влияние покрытия частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ различными полимерами (поливинилпирролидон (PVP), PEI и PAA) на такие биологические свойства материалов, как цитотоксичность и клеточное проникновение. Представленные полимеры несут различный заряд, PVP – нейтральный, PEI – положительный, PAA – отрицательный и, таким образом, можно сказать, что данная работа направлена на изучение влияния поверхностного заряда частиц на биологические свойства. $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PVP были получены сольвотермальным синтезом. $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PEI и $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PAA были получены путем замены PVP посредством взаимодействия $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PVP с PEI и PAA соответственно в растворе при нагревании. Изучение цитотоксичности данных соединений на клеточных линиях HeLa и U87MG (клетки глиобластомы человека) показало, что самым нетоксичным материалом является отрицательно заряженный $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PAA. В тоже время изучение клеточного проникновения с помощью КЛСМ при возбуждении лазером с длиной волны 980 нм на тех же клеточных линиях выявило, что в обоих случаях $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PEI показало значительно более высокую степень проникновения – $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PEI \gg $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PVP $>$ $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PAA. Данную особенность можно объяснить отрицательным зарядом клеточной мембраны, имеющую большее сродство к положительно заряженным частицам $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PEI. Для $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ -PEI, имеющего наибольшую проникающую способность, авторами был

изучен механизм клеточного проникновения и было показано, что частицы проникают внутрь клеток посредством клатрин-зависимого эндоцитоза.

Интересным исследованием является работа *Sun и др.* [29] В данной работе авторы изучают возможность применения нанокристаллов $\text{BaYF}_5:\text{Eu}$, покрытых модифицированным PEG, в качестве агентов для рентгеновской люминесцентной компьютерной томографии. Нанокристаллы были получены посредством термического разложения смеси ацетилацетоната бария и трифторацетатов иттрия и европия в смеси октадекан/олеиновая кислота при 300°C . Далее покрытие из олеиновой кислоты было заменено на модифицированный PEG, содержащий концевые карбоксильные группы, что позволило перевести кристаллы в водную среду. Таким образом, в результате были получены кристаллы размером ~ 14 нм, проявляющие свойства рентгенолюминофоров, то есть они способны переводить высокоэнергетическое рентгеновское излучение в свет. Так, после подкожной инъекции водной дисперсии нанокристаллов мыши линии Nude и облучении её рентгеном, в местах инъекции наблюдается детектируемая красная эмиссия (эмиссия Eu^{3+}), что подтверждает перспективность применения данной системы. Помимо этого, наличие концевых карбоксильных групп PEG предоставляет возможность дальнейшей модификации необходимыми молекулами, например для придания свойства адресной доставки.

Возможность создания терапевтических средств на основе соединений лантаноидов и органических полимеров была продемонстрирована в работе *Yan и др.* [45] Данная работа сконцентрирована скорее именно на свойствах полимерной матрицы, нежели соединений лантаноидов. В работе для получения материалов методом RAFT полимеризации (Reversible Addition–Fragmentation Chain-Transfer Polymerization) авторами был синтезирован амфифильный фторированный блок-сополимер поли(OEGMA-co-DMAEMA)-b-MESEF (OEGMA – метакрилат метилового эфира олигоэтиленгликоля, DMAEMA – 2-(N,N-диметиламино)этил метакрилат, MESEF – 2-((2-метакрилоилоксиэтил)дисульфанил)этил 3,5-бис(трифторометил)бензоат)). Данный полимер, при добавлении к нему определенных молекул или частиц способен к самосборке с образованием гибридных наночастиц. Интересной особенностью подобных полимеров является то, что при понижении pH среды или помещении их в среду, содержащую окислительные компоненты (например, клеточные оксидазы), наночастицы способны разрушаться, высвобождая заключенные в них вещества, на чем и основано данное исследование. В работе в качестве молекул-темплатов вокруг которых будет происходить самосборка полимера авторы использовали UCNPs лантаноидов – $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}@ \text{NaGdF}_4$ как в индивидуальном виде, так и в комбинации с известным препаратом для химиотерапии – доксорубицином (**DOX**). В

результате было показано, что гибридные наночастицы без DOX проявляют низкую клеточную токсичность на клетках линии MCF-7 (клетки рака молочной железы человека), в то время как при допировании DOX наблюдается значительный рост токсичности, причем образец является даже более токсичным, нежели DOX в свободном виде, что говорит о более высокой степени проникновения частиц и, соответственно, более высокой концентрации препарата внутри клетки. Также методом КЛСМ было изучено клеточное проникновение и показано, что после 8 часов инкубации не наблюдается перекрывания люминесценции DOX и UCNPs, что говорит о разрушении наночастиц при воздействии пониженного pH раковых клеток, а также клеточных оксидаз и высвобождении содержимого.

В заключении хотелось бы рассказать о наиболее масштабном исследовании, проведенном в данной области – работе *Liu и др.* [36] В ней авторы продемонстрировали возможность использования трех основных свойств UCNPs, интересных для биомедицинских применений: UCL, МР-контрастирование и высокая рентгеновская контрастность. Наночастицы были получены следующим образом: соли LnCl_3 растворяли в воде с добавлением мочевины, после чего нагревали при 90°C с получением $\text{Lu}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Gd}/\text{Yb}/\text{Er}$. Затем образец подвергали кальцинированию при 900°C с образованием наночастиц $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Gd}/\text{Yb}/\text{Er}$. Заключительной стадией было покрытие их поверхности полимером. Для этого $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Gd}/\text{Yb}/\text{Er}$ смешивали с PEG, содержащим алкоксисилановую группу и подвергали ультразвуковой обработке. Изучение цитотоксичности образцов на клетках линии MCF-7 показало, что они не проявляют заметного эффекта на пролиферацию клеток вплоть до концентрации 10 мкг/мл при инкубации в течение 24 и 48 часов. Далее авторами было проведено подробное изучение биологических свойств образцов на мышинной модели при внутривенном введении включая *in vivo* UCL визуализацию, магнитно-резонансную томографию и рентгеновскую компьютерную томографию. Было показано, что во всех случаях после введения образца в случае UCL визуализации и МР-томографии наблюдаются хорошо детектируемые сигналы. Также было показано, что частицы являются перспективными агентами для рентгеновской компьютерной томографии, давая прекрасную картину контрастирования *in vivo*, причем эффективность контраста намного превосходит коммерческий препарат Йобитридол. Помимо этого, было проведено подробное исследование биораспределения, механизма выведения, гистологические исследования внутренних органов, а также острой и хронической токсичности после внутривенной инъекции на мышинной модели. Результаты экспериментов показали, что в целом вещество проявляет низкие показатели токсичности, выводится из организма через

печень и почки и не оказывает значительного влияния на внутренние органы. Практически полное выведение препарата из организма наблюдается через месяц после введения.

1.2.3. Материалы на основе Ln и SiO₂

Среди всех описанных выше покрытий диоксид кремния является наиболее популярным. В данной области опубликовано огромное количество работ, что можно объяснить относительной простотой получения материалов, а также огромным разнообразием доступных алкоксисиланов, позволяющих варьировать свойства итоговых веществ. Способы получения материалов на основе Ln и SiO₂ первично можно разделить на две группы, в которых используют либо UCNPs, либо молекулярные комплексы лантаноидов. В первую группу входит покрытие диоксидом кремния (методами обращенной микроэмульсии, Штабера либо пиролитическим методом) заранее синтезированных наночастиц лантаноидов [47-70]. В свою очередь, второй метод можно дополнительно разделить на три группы, а именно: (1) покрытие заранее приготовленных частиц SiO₂ группами, способными координироваться к ионам лантаноидов [23, 71-78]; (2) использование комплексов лантаноидов, содержащих лиганды, модифицированные алкоксисилановыми группами, в процессе получения наночастиц [79-84]; (3) получение частиц в присутствии простых солей или молекулярных комплексов лантаноидов, не содержащих функционализированных лигандов, т.е. прямое включение [85-92]. Исходя из количества и качества публикаций можно сделать вывод, что использование UCNPs более популярно среди исследователей. С начала 2000-х годов было опубликовано большое количество работ по изучению данной тематики, в которых авторы в основном исследовали фундаментальные свойства композитов, постепенно заостряя внимание читателей на перспективах их использования в биомедицинских приложениях [23, 47-49, 52, 53, 62, 67, 71, 74, 77, 81, 83, 86, 87, 90]. Также было опубликовано небольшое количество работ, в которых демонстрировалась возможность применения материалов в качестве компонентов сенсоров на определенные молекулы [72, 80, 85] и детектирования некоторых типов микроорганизмов [50, 73, 80, 82, 85]. С 2012 года началось активное исследование подобных материалов на живых объектах, о чем свидетельствует взрывной рост публикационной активности с исследованиями возможности применений в качестве агентов для визуализации *in vitro* [50, 54-59, 61, 63, 65, 68, 70, 75, 76, 78, 84, 89, 91, 93] и *in vivo* [54-57, 59, 65, 68, 89, 91, 93], а также платформ для создания систем терапии раковых опухолей, основанных на адресной доставке лекарственных средств с использованием специальных блокирующих молекул или частиц, способных отщепляться при выполнении определенных условий (ИК-излучение

(эмиссия лантаноидов), изменение pH и др.), тем самым вызывая высвобождение лекарства [58, 60, 65, 68, 91-93]. Существует также небольшое количество работ, в которых показана эффективность подобных систем доставки на мышинной модели с искусственно привитой раковой опухолью с демонстрацией значительного уменьшения (вплоть до нуля) размеров опухоли [55, 60, 68, 91-93]. Далее будет рассмотрено несколько наиболее выдающихся работ по описанным направлениям.

Одним из первых масштабных исследований биологической активности композитов соединений Ln и SiO₂ является работа *Xia и др.* [54] В ней авторами был получен материал, выступающий в роли перспективного тримодального агента для биовизуализации *in vitro* и *in vivo* (UCL визуализация, МР-контраст и компьютерная томография). Для получения материалов использовали первый из описанных выше подходов, а именно покрытие наночастиц NaLuF₄:Yb/Tm тонким слоем диоксида кремния. Покрытие проводили методом обращенной микроэмульсии. Для придания наночастицам свойства МР-контрастности авторы проводили модификацию поверхности SiO₂ диангидридом диэтилен-триаминпентауксусной кислоты (ДТПА) с последующим взаимодействием с GdCl₃, что приводило к образованию хелатных комплексов GdДТПА, ковалентно связанных с поверхностью диоксида кремния. Полученным материалам были проведены подробные исследования биологических свойств на здоровой (LO2 – клетки печени человека) и раковой (HeLa) клеточных культурах. Изучение цитотоксичности показало, что наночастицы практически не влияют на жизнедеятельность клеток вплоть до концентрации 500 мкг/мл. Методом КЛСМ ($\lambda_{\text{возб}} = 980$ нм) было показано, что частицы проникают в оба типа клеток и механизмом проникновения является эндоцитоз. Заключительной стадией работы были исследования на мышах. Изучение острой и хронической токсичности материалов на мышах показало практически полное отсутствие влияния препарата на морфологию тканей внутренних органов (низкая токсичность). В заключение авторами была продемонстрирована возможность применения материалов в качестве тримодальных агентов для *in vivo* визуализации. Было показано, что при внутривенной инъекции имеется возможность визуализации внутренних органов такими методами, как *in vivo* UCL визуализация, МР и компьютерная томография с получением изображений высокого качества.

Помимо области визуализации, UCNPс могут быть интересны с точки зрения создания систем для адресной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных средств, что было продемонстрировано в работе *Chien и др.* [55] Структуру созданной авторами системы можно разделить на 4 уровня, каждый из которых имеет свое назначение: (1) ядро NaYF₄:Yb/Tm (UCL $\lambda_{\text{эм}} = 360, 480, 800$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 980$ нм); (2) слой SiO₂,

модифицированный $-NH_2$ группами, а также сорбированными молекулами DOX; (3) покрытие PEG, модифицированным фолиевой кислотой (адресная доставка); (4) молекулы 2-нитробензиламина, присоединенные к фолиевой кислоте и удерживающие DOX внутри системы (фотоиндуцируемое высвобождение DOX). Принцип работы системы заключается в следующем: после доставки композита в область раковой опухоли ее облучают ИК излучением, при этом под воздействием эмиссии в УФ области ($\lambda_{эм} = 360$ нм) происходит фотоокисление молекул 2-нитробензиламина и их отщепление с последующим высвобождением лекарственного препарата. Возможность детектирования ИК люминесценции $NaYF_4:Yb/Tm$ внутри организма является дополнительным средством диагностики. Авторами было продемонстрировано, что материалы хорошо проникают в клетки и проявляют низкую токсичность без облучения и высокую – при облучении ИК лазером. Изучение противораковой активности материалов было проведено на мышах с привитой раковой опухолью. Посредством *in vivo* визуализации было показано, что при внутривенном введении препарат концентрируется в области опухоли и при облучении ИК лазером наблюдается некоторое замедление ее роста, что свидетельствует о проявлении терапевтического эффекта. При проведении эксперимента в течение 9 дней было показано, что опухоль не проявляла тенденции к росту.

В работе *Chan и др.* [91], также посвященной созданию систем доставки лекарственных средств, авторы использовали несколько иной подход. Вместо композитов $UCNPs@SiO_2$ авторы использовали мезопористые наночастицы диоксида кремния, допированные ионами Eu^{3+} (люминесценция) и Gd^{3+} (МР-контраст). Для включения лекарственного средства (камптотecin – СРТ) авторы модифицировали поверхность SiO_2 тиольными группами ($-SH$), образующими дисульфидные $-S-S-$ связи с СРТ. Подобный тип связей способен медленно разрушаться внутри организма под воздействием глутатиона, тем самым высвобождая препарат. Для придания свойства адресной доставки поверхность была дополнительно модифицирована фолиевой кислотой. Авторы продемонстрировали, что при внутривенном введении материала мышам с привитой раковой опухолью через 23 дня наблюдается уменьшение ее размера практически до нуля, в то же время СРТ в чистом виде не оказывал никакого эффекта на размер опухоли.

1.3. Квантовые точки (QD)

Квантовые точки (QD) представляют собой кристаллические наночастицы полупроводников размером от 1 до 10 нм (например, $InGaAs$, $CdSe$ или $GaInP/InP$), покрытые монослоем из органических молекул-стабилизаторов. Ввиду настолько малого размера,

электронные и оптические свойства данных объектов подвержены сильному влиянию квантового размерного эффекта и, вследствие этого, QD занимают промежуточное положение между объемными полупроводниками и молекулярными соединениями. Иначе говоря, свойства квантовых точек напрямую зависят от их физического размера, т.е. изменение их размера приводит к изменению ширины энергетической щели и, следовательно, длины волны эмиссии или проводниковых свойств. (рис. 6)

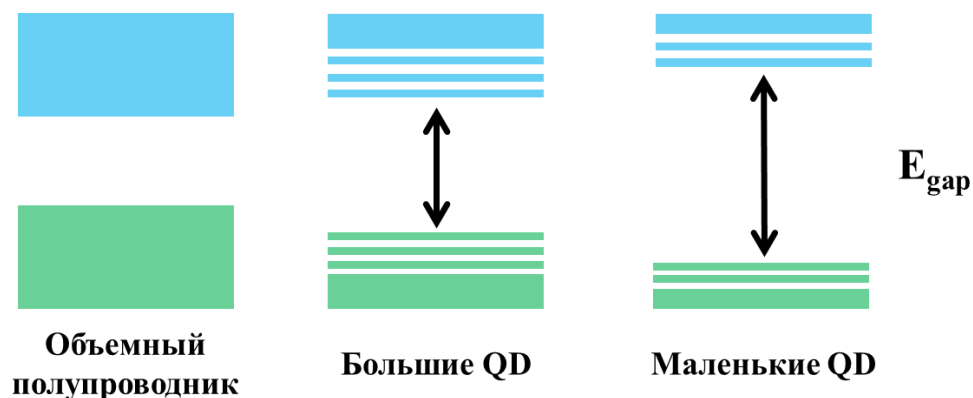


Рис. 6. Изменение ширины запрещенной зоны при уменьшении физического размера полупроводника.

Возможность точной регулировки свойств квантовых точек и послужила причиной роста интереса научного сообщества к данному классу соединений, в результате чего учеными было разработано множество методов получения QD с заданным размером, в том числе и в промышленных (килограммовых) количествах. В настоящее время квантовые точки находят применение в качестве транзисторов, светодиодов, компонентов солнечных ячеек и диодных лазеров, а также интересны с точки зрения альтернативы органическим люминофорам в области биовизуализации.

Одной из проблем применения квантовых точек в качестве люминофоров является их относительно низкий квантовый выход, что связано с безызлучательной рекомбинацией пары электрон-дырка на поверхности частицы. Данную проблему удалось решить посредством создания частиц типа ядро-оболочка (ядро из одного полупроводника покрывает оболочка из другого). Данный класс квантовых точек разделяют на два типа по природе электронных структур используемых полупроводников. (рис. 7) К точкам *Tuna 1* относят частицы, в которых в качестве оболочки используется более широкозонный полупроводник, который выполняет роль пассиватора поверхностных состояний и локализует электрон-дырочную пару внутри ядра. Использование данного подхода позволяет увеличить эффективность люминесценции. К точкам *Tuna 2* относят частицы, в которых ширины запрещенных зон полупроводников сопоставимы, но сдвинуты относительно друг друга,

что позволяет локализовать носители заряда (электрон и дырка) в разных частях нанокристалла – электрон в оболочке, дырку в ядре (либо наоборот). Данный подход вследствие разнесения носителей заряда в пространстве позволяет получать системы с большими временами жизни. Кроме того, в этом случае наблюдается смещение максимума эмиссии в красную область (вплоть до ИК-области).

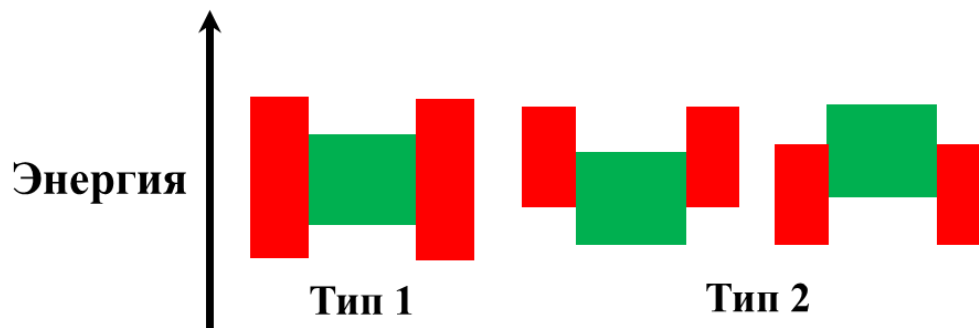


Рис. 7. Типы QD ядро-оболочка (ядро – зеленый и оболочка красный).

Таким образом, как упоминалось ранее, варьирование люминесцентных свойств квантовых точек путем изменения размера и состава, т.е. получение соединений с четко заданными оптическими свойствами, а также малый размер частиц делает QD перспективными для применения в качестве люминесцентных биомаркеров и агентов для *in vitro* и *in vivo* визуализации. Самыми популярными соединениями в данной области являются квантовые точки на основе халькогенидов кадмия (CdQ, где Q = S, Se или Te), что обусловлено высокими люминесцентными характеристиками ($\lambda_{эм}$ варьируется от 500 до 800 нм), относительной простотой получения, а также хорошо изученными способами дальнейшей модификации. Основным способом их получения является коллоидный синтез, в котором рост нанокристаллов происходит в высококипящих растворителях при высоких температурах в присутствии молекул-стабилизаторов (наиболее часто используется смесь триоктилфосфина (ТОР) и триоктилфосфинооксида (ТОРО)). Поскольку в представленном методе размер частиц является функцией от времени реакции, достаточно легко выделять частицы нужного размера посредством остановки реакции. К основным недостаткам кадмиевых QD можно отнести первичное гидрофобное покрытие, а также медленное разрушение нанокристалла в водных растворах, сопровождающееся выделением крайне токсичных ионов Cd^{2+} . В настоящее время данные проблемы достаточно успешно решаются посредством замены гидрофобного покрытия на гидрофильные полимеры или включения нанокристаллов в нерастворимые инертные матрицы. Далее рассмотрим особенности создания материалов на основе QD и различных матриц, их

основные свойства, а также наиболее интересные примеры их применения в биологии и медицине.

1.3.1. Материалы на основе QD и МОКП

В настоящее время в литературе существует три основных подхода к получению материалов типа QD@МОКП [94]. Первый подход заключается в росте нанокристаллов в заранее синтезированной матрице МОКП и делится на две основные стадии: включение молекул прекурсоров в МОКП и последующий рост квантовых точек внутри пор полимера. Согласно известной всем аналогии с популярными сувенирами, данный подход называют "корабль в бутылке" (*ship in bottle*). Второй подход имеет обратную природу – в данном случае используют заранее синтезированные квантовые точки, к которым добавляют прекурсоры МОКП. Соответственно данный подход носит название "бутылка вокруг корабля" (*bottle around ship*). Существует еще третий, менее популярный подход, который основан на взаимодействии заранее полученных МОКП и QD посредством предварительной модификации одного из объектов функциональными группами, за счет которых и происходит взаимодействие. Стоит отметить, что последний подход удобен с точки зрения возможности контроля над размером и морфологией исходных объектов.

На данный момент количество публикаций в области биомедицинских применений композитов квантовых точек, проявляющих красную или ИК люминесценцию, и МОКП крайне мало. В целом отсутствуют упоминания даже о проведении первичных экспериментов подобных систем даже на клеточных культурах. Большинство работ направлены либо на изучение фундаментальных свойств композитов данного типа [94], либо на создание сенсорных систем [95-97]. Тем не менее можно проследить некоторую корреляцию между развитием представленного направления и, скажем, развитием области биомедицинских применений соединений на основе лантаноидов. В случае лантаноидов наблюдалась следующая тенденция: (1) изучение методов создания материалов; (2) изучение фундаментальных свойств материалов; (3) демонстрация возможностей применения материалов в сопутствующих областях – в основном сенсоры различного типа; (4) переход к реальным демонстрациям применений на живых системах *in vitro* и *in vivo*. Исходя из данной корреляции развитие биомедицинских применений данных композитов в настоящее время находится на стадии, предшествующей переходу к изучению биологических свойств, и, учитывая выдающиеся свойства каждого компонента в отдельности, можно предсказывать дальнейшее развитие этой области.

Работа Wang и др. [97] является крайне интересным и изящным примером применения композитов типа QD@МОКП для создания сенсорных систем. В данном случае для получения композита авторы использовали подход "бутылка вокруг корабля" – заранее полученные квантовые точки CdTe комбинировали с прекурсорами полимера ZIF-8 ($Zn(NO_3)_2$ и 2-метилимидазол) в воде в присутствии PVP. В результате были получены частицы CdTe@ZIF-8 размером ~ 600 нм, проявляющие яркую эмиссию (максимум – 595 нм) при возбуждении светом с длиной волны 385 нм. Авторы показали, что в присутствии перекиси водорода (H_2O_2) интенсивность люминесценции CdTe значительно падает, ввиду чего они могут быть использованы в качестве сенсорных систем, детектирующих активность оксидаз, которые при окислении молекул-субстратов выделяют перекись. Покрытие из МОКП в данном случае служит в качестве защиты от воздействия более крупных молекул (например, самих оксидаз), в тоже время молекулы H_2O_2 остаются способны проникать через поры полимера и вызывать тушение люминесценции. Для демонстрации эффективности сенсорной системы в работе использовали два типа оксидаз: оксидаза глюкозы (glucose oxidase – GOx) и оксидаза мочевой кислоты (urate oxidase – UOx), определение активности которых в крови человека является важной частью диагностики заболеваний человека. Авторами было продемонстрировано, что при добавлении к CdTe@ZIF-8 смеси глюкоза/GOx или мочевая кислота/UOx наблюдается значительное снижение люминесценции, причем предел обнаружения составил 0,26 МЕ/л и 0,024 МЕ/л соответственно. Авторы отмечают, что в литературе встречается мало примеров систем определения активности оксидаз подобного типа и их результаты значительно превосходят известные аналоги.

1.3.2. Материалы на основе QD и органических полимеров

В отличие от материалов на основе МОКП, область материалов на основе органических полимеров развита значительно лучше. Это объясняется тем, что стабилизаторы поверхности, в качестве которых могут выступать и полимерные вещества, необходимы для самого существования квантовых точек. Использование гидрофильных полимеров позволяет перевести QD в водную среду, что также необходимо для применения в биомедицинских приложениях. Кроме того, имеется общая тенденция понижения токсичности и повышения стабильности гетерогенных систем при использовании полимеров в качестве стабилизаторов, что особенно важно в случае квантовых точек, так как при разрушении они выделяют в среду токсичные ионы тяжелых металлов (например Cd^{2+}). В целом методы создания композитов на основе квантовых точек и полимеров практически

аналогичны методам, применяемым в случае UCNPs. Можно выделить три основных подхода: (1) покрытие гидрофобных QD амфифильными полимерами (обладающими одновременно гидрофильными и гидрофобными свойствами) [98-105]; (2) замена гидрофобного покрытия QD на гидрофильный полимер [99, 105-117]; (3) получение полимерных частиц методом полимеризации в присутствии QD [99, 101, 118-121]. С точки зрения возможных применений в большинстве работ данные композиты рассматриваются в качестве сенсоров на различные молекулы или ионы [99, 103, 107, 122], агентов для *in vitro* [98, 101, 102, 104, 105, 108-110, 118, 120, 123-127] и *in vivo* [98, 101, 117, 127] биовизуализации и систем адресной доставки [102, 115, 122, 127]. Также в литературе присутствует достаточно большое количество исследований фундаментальных свойств данных материалов [100-102, 105, 106, 111-114, 116, 119, 121, 128, 129]. Особенно стоит отметить ряд работ, в которых изучение биомедицинских применений подобных композитов дошло до доклинических испытаний на приматах, а именно на макаках резус [130, 131]. И поскольку в этих работах исследователи продвинулись дальше всего на пути к применению систем подобного типа, именно они далее будут рассмотрены в подробностях.

Работа *Ye и др.* [130] посвящена изучению токсичности квантовых точек *tuna I* состава CdSe/CdS/ZnS ($\lambda_{эм} \sim 625$ нм), заключенных в мицеллы, образованные фосфолипидным бислоем. QD были получены в два этапа: (1) синтез CdSe QD из CdO и TOP-Se в присутствии тетрадецилфосфоновой кислоты и ТОРО при нагревании при 300 °С; (2) покрытие CdSe слоем CdS/ZnS посредством взаимодействия CdSe с CdO, Zn(CH₃COO)₂ и TOP-S в присутствии олеиновой кислоты и ТОРО при нагревании при 210 °С. Для создания фосфолипидного бислоя полученные частицы, диспергированные в хлороформе смешивали с **DSPE-mPEG** (1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)]), перемешивали и упаривали растворитель, после чего диспергировали в воде. Для проведения экспериментов по изучению токсичности было взято 7 макак (6 подопытных и 1 контроль). Дисперсию ($C_{QD} = 10$ мг/мл) вводили животным внутривенно в дозе 25 мг/кг, после чего изучали состав крови и мочи, изменение температуры тела, веса и поведения макак в течение 90 дней. Авторами было показано, что введение данной дозы QD не привело к каким-либо нарушениям иммунного ответа, функций почек или печени, свертывания или состава крови. По прошествии 90 дней 5 макак (4 подопытных и 1 контроль) подвергали эвтаназии для гистологического анализа внутренних органов *ex vivo*. Оставшиеся 2 макаки изучались ещё в течение года и наблюдение также не выявило заметных отклонений в здоровье и поведении животных. Гистологический анализ не выявил патологических изменений в сердце, легких, почках, печени или селезенке.

Изучение содержания кадмия, селена и цинка в различных органах методом ICP-AES показало, что квантовые точки в основном локализованы в почках, печени и селезенке, причем соотношение Cd/Se в почках выше, чем в других органах. Авторы полагают, что находясь в печени и селезенке квантовые точки медленно разрушаются, высвобождая ионы Cd^{2+} , которые накапливаются в почках. Однако несмотря на данный факт, основываясь на результатах ICP-AES можно заключить, что через 90 дней из организма выводится более 90 % введенных квантовых точек. Таким образом можно заключить, что в целом данная система не показала проявление токсического эффекта на организм приматов и является перспективной для биомедицинских приложений, однако авторы заявляют, что остаточное количество кадмия в почках, печени и селезенке может вызвать нежелательные последствия и таким образом в дальнейшем требуется более длительное и детальное изучение.

Во второй работе *Liu и др.* [131], выполненной в той же группе, что и предыдущая, исследовался другой тип квантовых точек, а именно кремниевые квантовые точки (SiQD). Для стабилизации поверхности и повышения биосовместимости авторы покрывали частицы блок-сополимером F127 (сополимер полиэтилен оксида (PEO) и полипропилен оксида (PPO) – $(PEO)_{100}(PPO)_{65}(PEO)_{100}$. Синтез квантовых точек осуществляли в две стадии. Первая – высокотемпературный пиролиз SiH_4 с использованием углекислотным лазером. Ввиду большого размера полученных частиц, они не проявляют люминесцентных свойств, и не являются квантовыми точками. Поэтому для получения SiQD проводили вторую стадию – исходные частицы подвергали травлению смесью HF и HNO_3 до появления люминесценции требуемого цвета, в данном случае $\lambda_{эм} = 800$ нм. Покрытие частиц блоксополимером происходило путем смешения дисперсии SiQD в хлороформе с полимером, последующего упаривания растворителя и диспергирование в воде. Токсичность полученных модифицированных частиц изучали на двух модельных животных – мышах и макаках-резус. Животным вводили дисперсии частиц ($C_{SiQD} = 10$ мг/мл) в дозе 200 мг/кг. После введения препарата в течение 14 недель авторами проводилось изучение поведения, веса и температуры тела животных, а также изучался состав крови и мочи. В течении всего исследования авторами не было замечено внешних проявлений токсичности, таких как снижение веса, изменение температуры или поведения, для обеих групп животных. Также анализы крови или мочи не показали каких-либо нарушений иммунного ответа, функций почек или печени, свертывания или состава крови. По прошествии 14 недель 1 мышь и 1 макака были подвергнуты эвтаназии для проведения гистологического анализа внутренних органов *ex vivo*. Гистологический анализ органов мыши показал ярко-

выраженное токсическое влияние SiQD на ткани печени. Согласно результатам определения содержания Si в органах мыши методом ICP-AES SiQD по большей части аккумулируются в селезенке, причем не наблюдается выведения частиц из организма. Абсолютно противоположные результаты были получены в случае макаки: гистологический анализ не выявил каких-либо нарушений тканей органов. Авторы не могут объяснить полученную картину, но данные свидетельствуют о низкой токсичности препарата в высокой дозе для приматов.

1.3.3. Материалы на основе QD и SiO₂

В случае материалов на основе QD и SiO₂, благодаря возможности замены первичного стабилизирующего слоя квантовых точек, можно выделить четыре метода их покрытия диоксидом кремния. (1) Микроэмульсионный метод с использованием гидрофильных силанов (ТЭОС, 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES) и др.) и гидрофобных квантовых точек (обычно используют QD без предварительной модификации, то есть покрытые монослоем ТОРО/ТОР) [132-139]. (2) Получение гидрофильных QD посредством замены поверхностных групп и их последующее покрытие диоксидом кремния методом Штобера или микроэмульсионным методом [140-143]. (3) Последовательное покрытие гидрофобных QD рядом силанов в следующем порядке: гидрофобный – амфифильный – гидрофильный [144, 145]. (4) Предварительная замена покрытия QD на силан-содержащие группы и последующий совместный гидролиз с другим силаном [146, 147]. Исходя из исследования литературы по биомедицинским применениям данного типа материалов можно заключить, что данное направление развито достаточно слабо по сравнению с материалами на основе органических полимеров, и все же значительно сильнее нежели материалы на основе МОКП. На данный момент большинство исследований направлены на изучение фундаментальных свойств подобных систем [132-134, 137, 140, 141, 146, 148]. Что касается биологических исследований, то встречается достаточно много работ, посвященных изучению клеточной токсичности и биовизуализации *in vitro* [135, 136, 139, 142-144, 147, 149]. Также встречается ряд исследований, часть которых будет подробнее рассмотрена далее, в которых ученые переходят к изучению биологических эффектов *in vivo* на грызунах – острая токсичность и визуализация [127, 142, 145, 149, 150].

В работе *Bakalova u др.* [145] авторы проводили подробное исследование возможностей использования материалов на основе квантовых точек для *in vivo* визуализации. В качестве QD были выбраны кадмиевые квантовые точки *muna 2* – CdSe/ZnS. Для их перевода в водную среду и придания биосовместимости авторы использовали два подхода: (1)

покрытие QD дендримером **РАМАМ-С12** (полиамидоамин); (2) покрытие диоксидом кремния и его последующая модификация амино-группами. В случае первого подхода было показано, что внутривенное введение препарата в хвостовую вену мыши вызывает снижение артериального давления и частоты сердечных сокращений, что, по-видимому, связано с разрушением системы в организме и высвобождением РАМАМ и QD в индивидуальной форме. Путем химического связывания дендримеров между собой авторам удалось добиться повышения стабильности системы и нивелировать токсический эффект. В тоже время при проведении экспериментов по визуализации сосудов головного мозга мыши было показано, что в случае обоих препаратов не удалось добиться необходимого разрешения. Второй подход, использованный в работе, оказался более удачным. Однако, авторы отмечают, что использование частиц *in vivo* в индивидуальной форме невозможно по причине их низкой коллоидной устойчивости при физиологических условиях. Для решения данной проблемы частицы были покрыты PEG. Полученная система показала отсутствие негативного влияния на организм подопытных животных при внутривенном введении. Кроме того, в отличие от системы с РАМАМ, данная система показала хорошие результаты при проведении экспериментов по визуализации сосудов головного мозга. В заключение авторы продемонстрировали возможность люминесцентной *in vivo* визуализации на примере мыши с привитой раковой опухолью. Для этого проводили внутривенную инъекцию суспензии частиц в дозе 1,6 нмоль/кг, после чего визуализировали все тело мыши. Полученное изображение показало, что через 90 минут после инъекции максимальная интенсивность эмиссии наблюдается в области печени. В тоже время, интенсивность эмиссии в опухоли была в 3 раза выше, чем во всем остальном теле, что подтверждает перспективность использования подобной системы для *in vivo* визуализации, однако она несомненно требует дальнейшей доработки.

Другим интересным исследованием, направленным на разработку препаратов на основе квантовых точек и SiO₂ для *in vivo* люминесцентной визуализации, является работа Kumar и др. [142] В данной работе авторы использовали необычную морфологию QD, а именно квантовые точки в виде стержней – quantum rods (QR). QR состава CdSe/CdS/ZnS были получены в две стадии: (1) получение CdSe QD взаимодействием оксида кадмия с TOP-Se в присутствии тетрадецилфосфоновой кислоты и ТОРО при 300°C; (2) покрытие CdSe QD слоем CdS/ZnS путем их взаимодействия с оксидом кадмия, ацетатом цинка и TOP-S в растворе олеиновой кислоты при ~210°C. Покрытие полученных частиц слоем диоксида кремния различной толщины проводили путем гидролиза ТЭОС с использованием микроэмульсионного метода. Авторами были изучены люминесцентные свойства

частиц в зависимости от толщины слоя SiO_2 и было показано, что увеличение толщины слоя приводит к увеличению интенсивности эмиссии и квантового выхода, что говорит о лучшем экранировании от окружающей среды. Однако при увеличении толщины слоя выше 25 нм наблюдается ухудшение коллоидной стабильности системы в водной среде и при физиологических условиях. Изучение цитотоксичности показало, что наночастицы практически не влияют на жизнедеятельность клеток линии Panc 1 (клетки поджелудочной железы человека) вплоть до концентрации 20 мкг/мл. Методом КЛСМ ($\lambda_{\text{возб}} = 442$ нм) было показано, что частицы хорошо проникают в клетки и механизмом проникновения является фагоцитоз. Поскольку полученная система продемонстрировала яркую люминесценцию, высокую коллоидную устойчивость, низкую клеточную токсичность и хорошее клеточное проникновение, авторы решили изучить возможность ее применения для *in vivo* люминесцентной визуализации раковой опухоли. Для этого использовали мышь с привитой опухолью, которой в область опухоли вводили препарат. Тело мыши визуализировали с помощью источника света с длиной волны 488 нм. В результате было показано, что через 5 минут после инъекции в области опухоли детектируется достаточно сильный люминесцентный сигнал, при этом, по прошествии 10 минут частицы равномерно распространяются по всему объему опухоли. Данные, полученные авторами, показывают перспективность данной системы в качестве агентов для *in vivo* люминесцентной визуализации.

1.4. Комплексы рутения

Изучение комплексов рутения и возможность их применения в биологии и медицине активно развивается в течение последних нескольких десятилетий. Можно отметить, что химия и биологические эффекты данных комплексов изучены гораздо лучше в сравнении с любым другим типом соединений, рассматриваемых в данном обзоре. Данная особенность развития легко объясняется ситуацией, сложившейся в современном мире, а именно – стремительным ростом количества больных раковыми заболеваниями и высокой смертностью [151, 152]. В настоящее время по данным Всемирной Организации Здравоохранения рак является одной из главных причин смертности во всем мире и примерно 1 из 6 смертей вызвана раковыми заболеваниями. Данный факт вынуждает ученых активно исследовать новые типы противораковых препаратов. В современной терапии рака в качестве подобных лекарственных средств в основном используются органические соединения, в тоже время препараты, основанные на металлокомплексах достаточно редки, хотя и очень эффективны. Самыми выдающимися и известными представителями

противораковых препаратов на основе металлокомплексов являются комплексы платины, такие как цисплатин, карбоплатин и др. Они представляют собой плоскоквадратные комплексы платины и относятся к цитостатическим препаратам, т.е. соединениям, способным связывать жизненно необходимые молекулы (ДНК, РНК, белки) внутри клетки и препятствовать ее делению, тем самым вызывая клеточную гибель. Несмотря на достаточно высокую эффективность, препараты на основе платины также известны низкой селективностью действия, то есть токсичностью и для здоровых клеток, а также наличием большого количества побочных эффектов, таких как периферическая нейропатия (поражение периферических нервов), потеря волос и миелотоксичность (подавление работы костного мозга) и др. Все это побудило ученых к поиску новых терапевтически активных комплексов металлов. Одним из наиболее удачных примеров данных соединений и являются комплексы рутения. Учеными было выяснено, что комплексы рутения с ароматическими лигандами не только достаточно легко проникают сквозь клеточную мембрану благодаря высокой липофильности, но и обладают в целом более низким токсическим эффектом в сравнении с соединениями платины. Помимо этого, интересным фактом является возможность внутриклеточного восстановления комплексов Ru(III) (малоактивные с точки зрения цитостатического эффекта) до Ru(II) и их одновременного частичного гидролиза, так как именно гидролизованные комплексы Ru(II) способны выступать в роли цитостатических агентов. Обозначенные факты значительно повысили интерес исследователей к подобным соединениям, благодаря чему в настоящее время известны тысячи комплексов рутения различного состава, а также достаточно хорошо изучены их биологические эффекты. Первым наиболее значимым результатом по созданию препаратов на основе комплексов рутения было проведение клинических исследований соединения NAMI-A ($[\text{ImzH}][\text{транс-RuCl}_4(\text{DMCO})(\text{Imz})]$, **Imz** – имидазол), которые, однако, провалились из-за низкой терапевтической эффективности и неоднозначности данных. Тем не менее, два других препарата на основе Ru(II), а именно KP1019 ($[\text{IndzH}][\text{транс-RuCl}_4(\text{Indz})_2]$) и NKP1339 ($\text{Na}[\text{транс-RuCl}_4(\text{Indz})_2]$) прошли стадию доклинических исследований и показали высокую эффективность [153, 154].

Не смотря на высокий потенциал комплексов рутения в качестве цитостатических препаратов, их свойства не ограничиваются возможностью связывания ДНК. Немаловажным свойством подобных комплексов является их яркая люминесценция в красной области спектра с высокими значениями времен жизни и квантовых выходов. Более того, комплексы определенного состава проявляют высокую эффективность в процессах двухфотонного возбуждения люминесценции, что, несомненно, указывает на перспективность

их применения в биовизуализации и ФДТ и делает их еще более интересными кандидатами на роль противораковых препаратов [155]. За последние 10 лет было проведено огромное количество исследований, посвященных изучению эффективности комплексов рутения для ФДТ на модельных объектах (клетки, грызуны) и возможности её (эффективности) усиления, что позволило накопить большой багаж знаний по данному направлению. Однако ввиду того, что само по себе развитие фотодинамической терапии еще не достигло пика, сообщений о клинических или даже доклинических испытаниях комплексов рутения в качестве агентов для ФДТ в данное время нет.

Помимо этого, можно выделить еще одно возможное направление применения комплексов рутения в терапии рака, основанное на эффекте фотоактивации – так называемая фотоактивированная химиотерапия. Данный эффект косвенно связан с проявлением комплексами люминесцентных свойств, в частности с возможностью переходить в возбужденное состояние при облучении светом. Он открывает большое количество механизмов терапевтического действия, например: (1) фотоиндуцированное замещение лиганда(ов) на воду и образование цитостатически активной формы, что позволяет вводить пациенту препарат, изначально не проявляющий цитостатических свойств; (2) использование лигандов, способных связываться с ДНК, что позволяет проводить ее фотоокисление, обусловленное близостью металла, тем самым вызывая необратимое разрушение ее структуры; (3) присоединение химиотерапевтически активных соединений к лигандам или в качестве лигандов комплекса и их последующее фотоактивированное отщепление и др. В настоящее время данная область является малоизученной и количество публикаций с данной направленностью достаточно невелико, однако стоит ожидать ее дальнейшего развития.

Исходя из вышесказанного можно отметить, что исследования данных комплексов с точки зрения применения в медицине уже привели к достаточно значимым результатам. Это подтверждается огромным количеством публикаций по данной тематике, а также проведением клинических испытаний [153, 154]. Однако несмотря на то, что они являются менее токсичной альтернативой комплексам платины, их объединяет общий недостаток – отсутствие адресной доставки при использовании в индивидуальной форме. В целом мировые исследования показывают, что включение активных компонентов в различные матрицы является не только наиболее удобным методом придания адресности, но подобный подход также приводит к получению более биосовместимой и стабильной системы. Данный подход активно применяется и в случае комплексов рутения. В литературе

присутствует множество работ, посвященных включению комплексов в различные матрицы, что будет подробно рассмотрено в следующих главах.

1.4.1. Материалы на основе комплексов рутения и МОКП

Справедливо отметить, что использование МОКП в качестве матрицы для получения материалов, содержащих комплексы рутения, в настоящее время является не самым распространённым в литературе подходом. Отсутствие большого числа публикаций в данной области объясняется тем, что применение МОКП в биологии и медицине само по себе находится на раннем уровне развития. Тем не менее, в литературе присутствует ряд достаточно интересных работ по изучению применения подобных материалов в биологии и медицине. Что касается методов получения МОКП, содержащих комплексы рутения, то можно выделить три основных подхода: (1) использование комплексов рутения, в которых один из лигандов содержит две карбоксильные группы, в качестве мостикового лиганда при получении МОКП [156-161]; (2) простое включение комплексов рутения в поры заранее полученного полимера [162-169]; (3) сборка необходимого комплекса внутри пор МОКП ("корабль в бутылке") [170]. Большинство работ на настоящий момент направлены на изучение фундаментальных свойств соединений, таких как изменение люминесценции, кристаллической структуры, пористости МОКП и др. в зависимости от способа получения композита и типа или количества допанта [156, 159, 160, 162-166, 169]. В тоже время работы, направленные на демонстрацию биомедицинского применения материалов, появились только около 5 лет назад, так что их количество достаточно сильно ограничено. Можно отметить, что даже работы, в которых для изучения биологических свойств материалов используются клеточные культуры, достаточно редки, не говоря уже об исследованиях на грызунах, которых нет совсем. Так, существует ряд исследований, в которых демонстрируется возможность использования композитов МОКП и RuL_3^n в качестве сенсоров на кислород [158], компонентов иммуносенсоров на различные биомолекулы [161], агентов для ФДТ [168, 171] и систем доставки цитостатических препаратов [170]. Рассмотрим основные достижения ученых в данном направлении.

В работе *Rojas и др.* [170] авторами путем взаимодействия $[Ru(n\text{-кумол})Cl]_2Cl_2$ с коммерческим лекарственным противораковым препаратом Митоксантроном (рис. 8) был получен новый цитостатически активный комплекс рутения $[(\eta^6\text{-}n\text{-кумол})_2Ru_2\text{митоксантро- нато}]Cl_2$.

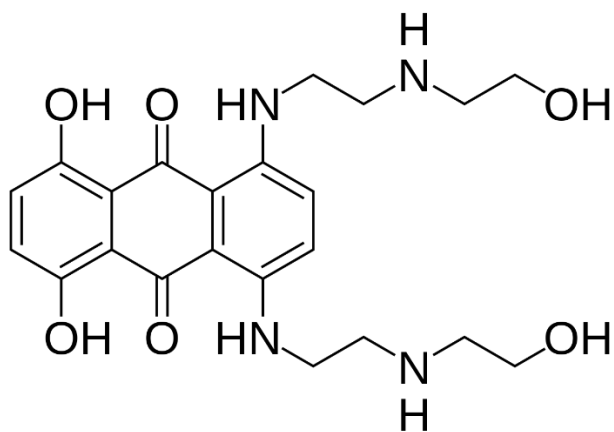


Рис. 8. Структура Митоксантрона.

Для соединения были изучены биологические свойства, такие как способность связываться с ДНК, аминокислотами и протеазами, а также их противораковая активность. Было показано, что комплекс проявляет более высокую или сравнимую эффективность в данных процессах в сравнении со свободным митоксантроном. Противораковая активность была изучена на нескольких типах культур клеток – раковых (A2780 (клетки карциномы яичника человека), A2780cis, MCF-7, HL-60 (клетки линии промиелоцитарного лейкоза человека)) и здоровой (LLC-PK1 (клетки проксимальных почечных канальцев)). Было показано, что в случае трех из четырех культур раковых клеток концентрация комплекса рутения необходимая для достижения IC_{50} ниже, чем концентрация *цис*-платина, однако в сравнении со свободным Митоксантроном комплекс показал несколько меньшую активность. В случае культуры здоровых клеток комплекс показал наименьшую токсичность. Далее авторы решили провести включение комплекса в наноразмерный МОКП на основе железа MIL-100-Fe. Первоначальная попытка включить комплекс в полимер простой пропиткой не увенчалась успехом по причине слишком большого размера комплекса. Для решения данной проблемы авторами был предложен метод сборки комплекса внутри полимера. Для этого MIL-100-Fe пропитывали раствором $[Ru(H_2O)_3Cl_3]$, после чего проводили реакцию с α -терпиненом для получения $[Ru(n\text{-кумол})Cl]_2Cl_2$. Полученное соединение вовлекали в реакцию с Митоксантроном в результате чего необходимый комплекс образовывался непосредственно внутри пор МОКП. Первичные эксперименты по изучению биологических свойств композита не увенчались успехом по причине разрушения полимера и комплекса в физиологической среде, тем не менее, представленный подход является крайне перспективным для создания систем подобного рода.

В работе *Chen и др.* [171] авторы изучали возможность применения данных систем в качестве агентов для биовизуализации и фотодинамической терапии. Для получения материалов авторы использовали подход простой пропитки предварительно полученного

наноразмерного UiO-67 комплексом рутения $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (**bpy** – бипиридил). Изучение люминесцентных свойств показало, что включение комплекса в МОКП увеличивает фотостабильность, интенсивность люминесценции ($\lambda_{\text{эм}} = 440$ нм) практически в два раза, а также значения квантового выхода с 2,6 до 5,5 по сравнению со свободным комплексом. Авторы предполагают, что данный эффект связан с экранированием молекул комплекса друг от друга, что предотвращает тушение люминесценции, вызванное агрегацией. Кроме того, было показано, что материал проявляет достаточно высокую люминесценцию при двухфотонном возбуждении ($\lambda_{\text{эм}} = 880$ нм), причем эффективность двухфотонного возбуждения материала практически в два раза выше эффективности, наблюдаемой для свободного комплекса. На культуре раковых клеток A549 были изучены биологические свойства полученных композитов. Так, с помощью метода КЛСМ при возбуждении лазером с длиной волны 880 нм было показано, что частицы проникают в клетки и локализуются в цитоплазме. Изучение темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности показало, что в отсутствии света материал проявляет достаточно низкую токсичность вплоть до 200 мкг/мл. При облучении культур клеток, инкубированных с частицами, источником видимого света ($\lambda_{\text{эм}} > 400$ нм) и мощностью 200 мВ/см² в течение 10 минут наблюдалась гибель ~ 80% клеток (при концентрации 200 мкг/мл), что подтверждает перспективность данного материала в качестве агента для биовизуализации и ФДТ.

1.4.2. Материалы на основе комплексов рутения и органических полимеров

Согласно проведенному изучению литературы, посвященной биомедицинским применениям материалов на основе органических полимеров и комплексов рутения, подавляющее большинство исследований направлено на получение сферических наноразмерных частиц. Можно выделить два основных способа получения частиц: (1) получение частиц путем радикальной полимеризации в присутствии комплекса, что обеспечивает его равномерное распределение по всему объему частицы, причем в данном случае не происходит образования ковалентных связей между полимером и комплексом [172, 173]; (2) покрытие заранее полученных частиц молекулами комплекса, причем полимер может содержать функциональные группы, способные координироваться к рутению [174], комплекс может закрепляться за счет электростатических взаимодействий [175-177], либо частицу можно покрывать дополнительным тонким слоем полимера, в присутствии комплекса [178]. Количество публикаций посвященных возможным применениям подобных материалов невелико, однако все также можно выделить несколько основных направлений: изучение фундаментальных свойств [176, 178], сенсоры на O₂ (в том числе в живых

организмах) [174, 175], биовизуализация [174, 175, 178] и иммуносенсоры на биомолекулы [173], а также в качестве систем адресной доставки и терапии раковых заболеваний [177].

Работа *Wang и др.* [175] посвящена получению внутриклеточных сенсоров на кислород. Для получения материалов авторы использовали метод пропитки коммерчески доступных amino-модифицированных частиц полистирола со средним диаметром 85 нм раствором комплекса $[\text{Ru}(\text{dpp})_3](\text{TMSPS})_2$ (**dpp** – 4,7-дифенил-1,10-фенантролин, **TMSPS** – 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат). Комплекс $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ был выбран ввиду его высокой эффективности двухфотонного возбуждения. Кроме того, замена противоиона Cl^- на TMSPS^- привела к проявлению растворимости комплекса в полистироле, что повысило эффективность пропитки. Для полученных частиц были изучены люминесцентные свойства и было показано, что они проявляют интенсивную эмиссию как при возбуждении светом с длиной волны 488 нм, так и 830 нм. Также как при однофотонном, так и при двухфотонном возбуждении наблюдалась линейная зависимость интенсивности люминесценции от содержания кислорода в атмосфере, что подтверждает возможность использования материала в качестве сенсора на кислород, причем имеется возможность использовать различные типы излучения. Исследования биологических эффектов материалов проводились с использованием МТТ-теста для определения цитотоксичности и КЛСМ для подтверждения проникновения частиц в клетку (клетки линии MCF-7). Значение IC_{50} для материала составило 23 мкг/мл. также было показано, что частицы быстро проникают в клетку и аккумулируются в клеточных органеллах, таких как эндосомы или аппарат Гольджи. Низкая токсичность, быстрое проникновение в клетку и линейная зависимость люминесценции от количества кислорода демонстрируют перспективность представленного материала в качестве внутриклеточного сенсора на кислород.

Наиболее интересным исследованием в данной области является работа *Huang и др.* [177]. В ней авторы выбрали в качестве объекта исследований искусственные фолат-модифицированные липосомы, допированные комплексом $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (**phen** – 1,10-фенантролин, **dppz** – дипиридо[3,2-а:2',3'-с]феназин) – f-LP-Ru. Допирование проводили путем пропитки полученных заранее липосом раствором комплекса в этаноле. Основной идеей работы является то, что фолат-модифицированные липосомы обеспечивают адресную доставку материала в ткани опухоли, после чего при облучении тканей лазером с длиной волны возбуждения комплекса ($\lambda_{\text{возб}} > 405$ нм) происходит разрушение липосом и высвобождение цитостатически активного комплекса непосредственно в опухоли. Селективность материала проверяли с помощью проточной колориметрии на клетках с разной

экспрессией фолатных рецепторов. Было показано, что материалы накапливаются в клетках с более высокой экспрессией рецепторов в больших количествах, что говорит о высокой селективности. Изучение цитотоксичности f-LP-Ru методом МТТ-теста показало полное отсутствие токсичности материала вплоть до концентраций 1000 мкг/мл. Фотоиндуцированную цитотоксичность изучали методом КЛСМ. Для этого клетки инкубировали с люминесцентными красителями – кальцеином АМ, который проникает только в живые клетки и EthD-1, проникающим в мертвые клетки, а также с f-LP-Ru. После этого клетки изучались с помощью КЛСМ. В данном случае материалы располагаются на поверхности клеток, не проникая внутрь, так как они привязаны к поверхностным фолатным рецепторам. После этого клетки в течение 30 минут облучали лазером с длиной волны 405 нм и мощностью 2,78 Дж/см² и снова изучались с помощью КЛСМ. После облучения наблюдается достаточно интенсивная красная люминесценция, относящаяся к рутению, внутри ядер, что говорит о разрушении липосом и поглощении высвободившегося комплекса клеткой, после чего он связывает ДНК. Также люминесцентные красители указывают на достаточно быструю клеточную гибель после облучения. Таким образом, можно заключить, что авторы успешно разработали препарат, обладающий адресным фотоиндуцированным цитостатическим эффектом.

1.4.3. Материалы на основе комплексов рутения и SiO₂

Область рутений-содержащих материалов на основе диоксида кремния развита значительно лучше в сравнении с приведенными ранее. Данный факт легко объясняется простотой получения и последующей модификации подобных материалов. Так, в большом количестве работ авторы дополнительно модифицируют поверхность диоксида кремния группами, способными связывать, например, ионы гадолиния для придания дополнительной модальности – в данном случае возможности детектирования частиц посредством использования метода магнитно-резонансной томографии (МРТ). Также встречаются работы, в которых предварительно полученные частицы оксида железа, проявляющего магнитные свойства, покрывают слоем рутений-содержащего диоксида кремния, что также повышает модальность системы. В целом методы получения подобных материалов можно разделить на два подхода. Первый подход является самым простым и, как следствие, наиболее популярным – включение комплексов без образования ковалентных связей с матрицей SiO₂ [179-195]. В данном случае комплекс (наиболее часто используют простейший представитель [Ru(bpy)₃]²⁺) добавляется в среду и для получения частиц используют любой из приведенных в гл. 1.1.3 методов получения частиц SiO₂. Вторым методом

заключается в образовании ковалентных связей между комплексом и матрицей, и его в свою очередь можно разделить на два подхода. (а) Предварительная модификация лиганда комплекса силанольной группой с образованием комплекса типа $[RuL'_2L-Si(OR)_3]$ [196-201]. Силанольная группа способна гидролизироваться с образованием связи с поверхностью диоксида кремния типа $RuL'_2L-Si-(O-Si-)$. Причем в данном случае возможно как покрытие заранее полученных частиц, так и одновременный гидролиз комплекса и силана. (б) Предварительная модификация поверхности частиц диоксида кремния группами, способными координироваться к рутению [202]. Области применения подобных материалов также очень разнообразны. Наряду с изучением фундаментальных свойств [182, 191, 196, 197, 200], данные системы рассматриваются с точки зрения применения в качестве сенсоров (в том числе внутриклеточных) на различные внешние условия, такие как содержание кислорода [180, 189, 198, 201] или иных молекул или ионов, например Cu^{2+} [194], pH среды [184], температуру (люминесцентные термометры) [192, 193, 195], агенты для биовизуализации [179, 184, 186, 187, 193, 199, 201], иммуносенсоров и детекторов на различные биомолекулы, клетки определенного типа и др. [181, 183, 185, 190, 197, 199], а также средств доставки цитостатически активных комплексов рутения или других молекул в клетку [184, 202].

Интересным примером использования подобных систем в качестве сенсоров на определенные биомолекулы является работа *Rossi и др.* [183] В работе авторы создали систему флуоресцентного количественного детектирования гена HER2/neu, который является важным биомаркером в диагностике некоторых типов рака, например рака молочной железы. Для получения частиц в работе использовался метод Штобера: гидролиз ТЭОСа в водно-этанольной смеси в присутствии комплекса $[Ru(phen)_3]Cl_2$. Таким образом авторами было получено три типа частиц диаметром 65 ± 8 нм, 440 ± 18 нм и 800 ± 20 нм. Изучение фотостабильности полученной системы показало значительный прирост стабильности, что связано с экранированием комплекса при его включении внутрь частиц. Далее авторы проводили модификацию поверхности диоксида кремния посредством гидролиза 3-меркаптопропилтриметоксисилана в присутствии частиц. Далее модифицированные частицы покрывали стрептавидином, белком, который способен образовывать прочные комплексы с другим белком – биотином, что было необходимо для присоединения к поверхности биотин-модифицированного антитела анти-HER2/neu. Сам метод анализа заключался в следующем: предметное стекло, модифицированное аминогруппами, выдерживали в растворе HER2/neu, после чего промывали и помещали в суспензию, содержащую анти-HER2/neu модифицированные частицы, после чего снова промывали от

избытка частиц. Полученное стекло изучали с помощью флуоресцентного микроскопа и строили зависимость количества флуоресцентных частиц от концентрации. Из полученной зависимости можно легко как качественно, так и количественно определять присутствие HER2/neu (предел обнаружения = 1 нг/мл). Также при необходимости можно использовать другие сочетания ген-антитело.

Другим интересным примером создания систем детектирования является работа *Song и др.* [197] В ней авторы работали над созданием системы детектирования одного из самых распространённых в мире паразитических микроорганизмов *Giardia lamblia* или *Кусечная лямблия*. Данный вид паразитов распространяется через воду и пищу и ее обнаружение является важной задачей. В работе для получения частиц авторы использовали подход, направленный на образование ковалентной связи между комплексом рутения и диоксидом кремния. Для этого был получен комплекс $[Ru(NH_2\text{-phen})_3](PF_6)_2$ (**NH₂-phen** – 5-амино-1,10-фенантролин). Далее комплекс модифицировали силанольной группой посредством реакции с ангидридом янтарной кислоты и APTES. Частицы получали микроэмульсионным методом. Изучение частиц с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показало, что в случае образования ковалентных связей с матрицей наблюдается более равномерное распределение комплекса по объему частицы. Далее поверхность частиц была модифицирована стрептавидином, аналогично приведенному ранее примеру. Детектирование цист *Giardia lamblia* проводили следующим образом: в раствор цист добавляли антитела анти-*Giardia*, биотинированные кроличьи антитела IgG-класса и стрептавидин-модифицированные наночастицы. После этого смесь инкубировали 2 дня, отделяли цисты, промывали и изучали с помощью флуоресцентного микроскопа. На полученных изображениях наблюдается ярко-красное свечение, что говорит об эффективности представленного метода в детектировании цист *Giardia lamblia*.

В работе *Frasconi и др.* [202] авторы изящно продемонстрировали возможность практического использования способности комплексов рутения к фотоиндуцированному отщеплению лигандов в области медицины. В работе авторами была получена система доставки лекарственных препаратов, активируемая светом. Для создания материала использовали частицы мезопористого диоксида кремния MCM-41, модифицированного бензонитрильными группами, способными координироваться к рутению. Присоединение комплекса проводили путем взаимодействия модифицированных частиц MCM-41 с $[Ru(\text{terpy})(\text{dppz})(H_2O)](PF_6)_2$ (**terpy** – 2,2':6',2''-терпиридин). В процессе взаимодействия происходило отщепление координированной молекулы воды и координация нитрильной группы к металлоцентру. Для полученного материала была изучена эффективность

фотоактивации. Для этого образцы помещали в воду и подвергали облучению белым светом ($\lambda > 450$ нм), после чего записывали спектры эмиссии суспензии. При этом отчетливо наблюдалось постепенное окрашивание раствора в красный цвет и снижение интенсивности эмиссии (вызвано образованием аква-комплекса), что говорит о фотоактивированном высвобождении молекул комплекса. Полное исчезновение эмиссии наблюдалось после 1 часа облучения. Успешность данного эксперимента позволила авторам перейти к следующему шагу – изучению эффективности связывания молекул ДНК при фотоактивации. Для этого образец диспергировали в буферном растворе (рН = 7,0), облучали светом до полного исчезновения эмиссии, после чего в систему добавляли раствор ДНК. При этом происходило появление и усиление эмиссии комплекса рутения, что говорит о способности комплексов эффективно связывать ДНК. Поскольку в качестве матрицы выступает мезопористый диоксид кремния, имеется принципиальная возможность включения в поры дополнительных химиотерапевтических препаратов. Кроме того, комплексы рутения, находящиеся на поверхности частиц, будут выступать в качестве молекул, блокирующих высвобождение препарата из пор, а при фотоактивации будет происходить одновременное высвобождение обоих препаратов. Таким образом можно значительно снизить отрицательное воздействие лекарственных средств на здоровые ткани и увеличить общую эффективность лечения. В данной работе авторами был выбран коммерческий цитостатический препарат Паклитаксел. Было показано, что при облучении частиц, допированных Паклитакселем, действительно происходит высвобождение как Паклитакселя, так и комплексов рутения, однако высвобождение Паклитакселя несколько замедленно и происходит только через ~ 1 час. Заключительной стадией исследования было изучение биологических эффектов системы *in vivo*. Так, с использованием КЛСМ было показано, что частицы проникают в клетки и локализуются по всему ее объему. После облучения клетки наблюдается значительное усиление эмиссии. Исследование цитотоксичности на раковых культурах клеток показало, что до облучения частицы проявляют относительно низкую токсичность, в то время как после облучения их токсичность растет и становится сопоставима с токсичностью свободного препарата. Все приведенные результаты говорят об эффективности разработанной модельной системы для фотоактивированной терапии раковых заболеваний. Не стоит забывать, что использование SiO_2 в качестве матрицы позволяет легкую модификацию с целью придания адресности доставки, а наличие пор позволяет включать в частицы любые препараты.

1.5. Октаэдрические кластерные комплексы

Несмотря на то, что «кластерные комплексы», или в англоязычной литературе – «clusters», были известны еще с середины XIX века, сам термин впервые был введен в работе F.A. Cotton в 1967 году [203]. В оригинале формулировка термина звучит как «*Metal atom cluster is a finite group of metal atoms that are held together mainly, or at least to a significant extent, by bonds directly between the metal atoms, even though some nonmetal atoms may also be intimately associated with the cluster*». Другими словами, кластерными комплексами называются соединения, содержащие ковалентную связь металл-металл. Введение данного термина позволило выделить и объединить в одну группу достаточно большой класс комплексов переходных металлов. В настоящее время группа кластерных комплексов насчитывает огромное количество соединений различной нуклеарности (т.е. количества атомов металла) и строения – начиная от двух-, трех-, четырехъядерных и т.д. до комплексов, содержащих десятки, а то и сотни атомов металла. Однако, так как данный литературный обзор посвящен применению красных неорганических люминофоров, наибольшее внимание будет уделено октаэдрическим шестиядерным кластерным комплексам молибдена, вольфрама и рения, которые обладают одними из самых выдающихся люминесцентных свойств среди представителей своего класса.

Октаэдрические кластерные комплексы молибдена, вольфрама и рения можно описать общей формулой $[\{M_6X_8\}L_6]^n$, где $M = Mo, W, Re$; $X = Cl, Br, I$ ($M = Mo, W$) или S, Se, Te ($M = Mo, W, Re$); $L =$ органический или неорганический лиганд. В общем случае данные комплексы представляют собой октаэдр из шести атомов металла, вписанный в куб из восьми, так называемых внутренних, μ_3 -мостиковых лигандов X . Полученная система $\{M_6X_8\}^m$ называется кластерным ядром и является основой данных соединений. Помимо этого, каждый атом металла дополнительно координирован одним внешним лигандом L . (рис. 9) Внешние лиганды оказывают огромное влияние на свойства кластерных комплексов, а относительная легкость их замещения позволяет в той или иной мере варьировать или усиливать необходимые характеристики. Одной из интересных особенностей кластерных комплексов является высокая устойчивость кластерного ядра – в некоторых случаях оно является стабильным при температурах выше $1000^\circ C$, в сильноокислых и сильнощелочных средах, а также в присутствии сильных окислителей. Кластерные комплексы обладают широким набором функциональных (т.е. имеющих потенциальное применение) свойств, которые обуславливают высокий рост интереса исследователей к их изучению. Однако публикации с результатами по изучению возможностей применения

данных объектов начали появляться только в последние 10 лет, что, по-видимому, связано с открытием высоко-люминесцентных кластерных комплексов.

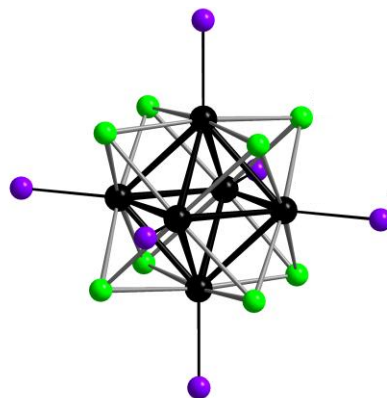


Рис. 9. Строение октаэдрического кластерного комплекса $[\{M_6X_8\}L_6]^n$.

Одним из наиболее интересных и многофункциональных свойств комплексов является ярко-выраженная люминесценция в красном и ближнем ИК диапазонах спектра (550-1000 нм) при возбуждении светом с длиной волны 250-500 нм с высокими значениями времен жизни (несколько сотен микросекунд) и квантовых выходов люминесценции (вплоть до 80%). Также они способны выступать в качестве фотосенсибилизаторов в процессах генерации синглетного кислорода. Стоит отметить, что наиболее эффективными люминофорами являются кластерные комплексы молибдена и вольфрама. Благодаря наличию этих двух сопряженных свойств, подобные соединения, как и некоторые из описанных ранее люминофоров, могут найти применение как в областях, рассматриваемых в данном обзоре, например в качестве компонентов сенсорных систем, агентов для биовизуализации и ФДТ, так и в иных областях – фотонике (компоненты лазеров и световодов), фотовольтаике (компоненты солнечных батарей) и др. Кроме того, недавнее открытие возможности возбуждать люминесценцию комплексов рентгеновским излучением (рентген-индуцированная люминесценция) [204, 205] делает комплексы еще более перспективными в области медицины – их можно рассматривать в качестве агентов для глубоко-проникающей ФДТ. Тем не менее, не смотря на возможные перспективы использования кластерных комплексов, они также не лишены недостатков. Основным недостатком является то, что большинство из них либо не растворимы в воде, либо обладают низкой гидролитической устойчивостью. На данный момент в литературе существует всего два достоверных примера относительно устойчивых в водной среде люминесцентных комплексов молибдена, а именно $Na_2[\{Mo_6I_8\}(N_3)_6]$ и $Na_2[\{Mo_6I_8\}(NCS)_6]$, которые, тем не менее, также склонны к частичному гидролизу и со временем в водном растворе переходят в частично гидролизованные формы [206]. Нетрудно понять, что подобное поведение не способствует применению комплексов в чистом виде, так как зачастую компоненты

приборов и сенсоров находятся в постоянном контакте с воздухом, который содержит достаточно большое количество воды, и протекание гидролиза, безусловно, будет негативно сказываться на работоспособности. В случае использования в биологии и медицине также необходима высокая устойчивость препарата в водной среде. Одним из самых удобных методов решения данной проблемы является включение в стабильную матрицу. Далее будут рассмотрены некоторые примеры создания различных материалов на основе кластерных комплексов и различных матриц. В связи с тем, что данная область является очень молодой, количество работ биомедицинской направленности весьма ограничено, а также большая часть работ выполнена с участием диссертанта. Поэтому помимо материалов для применения в биологии и медицине будут рассмотрены и материалы для других областей, что позволит понять концепцию включения комплексов в определенный тип матрицы.

1.5.1. Материалы на основе кластерных комплексов и МОКП

Область материалов на основе кластерных комплексов и МОКП в настоящее время развита крайне слабо, о чем свидетельствует малое количество публикаций по данной теме. И все же можно выделить два основных подхода, которые используются для получения подобных материалов: (1) пропитка МОКП раствором комплекса, т.е. включение в поры за счет нековалентных взаимодействий [207-211] и (2) пропитка МОКП, модифицированного группами, способными координироваться к кластерному комплексу, т.е. возможность реализации двух типов включения – за счет как ковалентного, так и нековалентного связывания [211]. Можно заметить, что первый подход более популярен в литературе, что, по-видимому, связано со сложностями модификации полимеров. Что касается применений, то во всех работах авторы изучают самое популярное применение МОКП – сорбцию газов (в том числе селективную). Стоит отметить, что включение комплексов в МОКП данными методами не принесло значительного увеличения сорбции/селективности сорбции финального материала. Что касается изучения биологических свойств, то на данный момент существует всего одна подобная работа, однако она была выполнена автором диссертации и будет рассмотрена далее. Нельзя не отметить еще один интересный факт: исходя из структурных особенностей кластерных комплексов, а именно, строения кластерного ядра, включающего тесно связанную группу атомов металла, и возможности координации к ядру лигандов, способных образовывать мостиковые связи, например CN^- , их можно рассматривать с точки зрения так называемых вторичных строительных блоков для получения МОКП. Данная идея не нова, и в литературе

встречается немало попыток получения МОКП подобным способом, однако до 2018 года не было достигнуто значимых результатов. Только в 2018 году впервые появилась работа *Litvinova и др.* [212], в которой авторам удалось получить перманентно пористый МОКП с трехмерной структурой на основе кластерных комплексов рения. В работе использовали комплекс состава $K_4[\{Re_6Se_8\}(CN)_6]$, который при взаимодействии с $Gd(NO_3)_3$ и 2,5-фурандикарбоновой (fdc) или 2,5-тиофендикарбоновой (tdc) кислотой образовывал МОКП состава $[\{Gd(H_2O)_3\}_2(fdc)\{Re_6Se_8\}(CN)_6] \cdot nH_2O$ или $[\{Gd(H_2O)_3\}_2(tdc)\{Re_6Se_8\}(CN)_6] \cdot nH_2O$. Интересно отметить, что полученные продукты в полной мере обладают свойствами каждого из отдельных реагентов: (1) парамагнетизм ионов Gd^{3+} , (2) люминесцентные свойства кластерного комплекса, (3) способность кластерного ядра к обратимому окислению. Помимо всего прочего, данные полимеры устойчивы в водной среде, не разрушаются при удалении гостевых молекул воды (активации), а также обладают достаточно высокой площадью поверхности. Также авторами была изучена сорбция газов активированными МОКП на примере CO_2 , N_2 и CH_4 и было показано, что они проявляют гораздо более высокую эффективность сорбции по отношению к CO_2 . Таким образом, большое количество функциональных свойств полученных соединений делает их перспективными кандидатами на роль сенсоров на различные агрессивные и/или токсичные вещества, обладающие окислительными или восстановительными свойствами, так как окисление полимера вызывает одновременное усиление парамагнитных и снижение люминесцентных свойств, а также изменение цвета вещества, или сорбентов, позволяющих с высокой эффективностью разделять смесь газов.

1.5.2. Материалы на основе кластерных комплексов и органических полимеров

История развития материалов на основе комплексов и органических матриц началась в 90-х годах прошлого века с работ *Jackson и др.* [213], *Robinson и др.* [214], *Ghosh и др.* [215], в которых авторы изучали возможность включения на тот момент наиболее люминесцентного комплекса Mo_6Cl_{12} ($[\{Mo_6Cl_8\}Cl_2Cl_{4/2}]$) и его производных в PVP. Полученные материалы рассматривались с точки зрения сенсоров на кислород, в связи с чем авторы занимались подробным изучением механизмов и кинетики тушения люминесценции комплексов молекулярным кислородом. Первые упоминания о возможном применении подобных материалов в биологии и медицине появляются только в 2011 году в работе *Ghosh и др.* [216], в которой авторы включали комплекс $K_2[\{Mo_6Cl_8\}Cl_6]$ в кислород-проницаемый фотоотверждаемый силиконовый полимер и изучали детектирование растворенного в воде кислорода. Развитие техник замещения внешних лигандов комплексов и

демонстрация того, что комплексы с ядрами $\{Mo_6Br_8\}$ и $\{Mo_6I_8\}$ с негалогенидными лигандами проявляют гораздо более высокие люминесцентные свойства, послужило толчком к дальнейшему развитию направления. Начиная примерно с 2013 года количество работ по получению и направлений применения подобных материалов сильно выросло, и на данный момент по количеству публикаций данная область, в химии октаэдрических кластерных комплексов, занимает лидирующее направление. Также способы получения материалов стали гораздо разнообразнее. Так, основные методы получения можно разделить по типу взаимодействия комплекса с полимером: (1) прямое включение комплекса в полимер без образования каких-либо связей – может осуществляться как полимеризация в присутствии комплекса [204, 216], так и включение в уже готовый полимер [213, 215, 217-223]. (2) включение комплекса в полимер с образованием какого-либо типа связи (возможно включение как в уже готовые полимеры, так и полимеризация в присутствии комплекса). Второй метод также можно разделить на несколько групп по типу образуемых связей: ковалентная связь, образование которой можно осуществлять путем внедрения в структуру комплекса лиганда, содержащего полимеризуемую группу [224, 225], либо внедрением в полимер групп, способных координироваться к кластерному комплексу [214, 226-229], и ионная связь, образование которой реализуется аналогично подходу с ковалентной связью – замена исходного катиона комплекса на катион, содержащий полимеризуемую группу [230-234] или использование полимера, содержащего группы, способные выступать в качестве противоионов комплекса [235, 236]. В плане возможных применений подобных материалов можно выделить следующие области: сенсоры на кислород [213-216, 220, 230] или биоактивные молекулы [219, 221], световоды [217], люминесцентные солнечные концентраторы [218], люминесцентные чернила [222] и др. В тоже время после упоминания в 2011 году возможности применения материалов на основе кластерных комплексов в биологии и медицине, первые работы с реальной демонстрацией подобных применений появились только спустя 5 лет. Тем не менее, за последние три года практически ни одна публикация не обходится без исследования биологических свойств. Таким образом, с точки зрения биологии и медицины авторы рассматривают данные материалы в качестве агентов для биовизуализации [227-229] и веществ, проявляющих фотодинамическую (в том числе при возбуждении рентгеновским излучением) [204] или антибактериальную активность [235, 236].

Одно из первых исследований, посвященных получению материалов на основе кластерных комплексов молибдена и органических матриц в контексте биологических применений состоит из двух публикаций. В первой из них, *Efremova и др.* [226], использовали

метод получения материалов с образованием ковалентной связи между функциональными группами полимера и кластерным комплексом. Для этого был синтезирован комплекс $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{NO}_3)_6]$, раствор которого использовался для пропитки микрочастиц полистирола, модифицированного тиольными группами PS-SH, в результате чего происходило замещение лабильных NO_3^- лигандов комплекса на -SH группы полимера. Стоит отметить, что в работе использовался полистирол, цепи которого были "сшиты" посредством полимеризации с добавлением дивинилбензола, что обеспечило образование сферических частиц. В тоже время благодаря данному линкеру полимерные шарики приобрели способность набухать в растворах без потери формы и, таким образом в процессе пропитки комплекс проникал внутрь частицы. В результате исследования было показано, что подобная техника позволяет защитить комплекс от взаимодействия с кислородом воздуха – несмотря на то, что фотофизические характеристики материала значительно снизились по сравнению с исходным комплексом, они были постоянны даже в водных растворах. Полученные результаты показали перспективность использования подобных материалов в биологических целях, в частности в качестве агентов для биовизуализации, что и было изучено в работе *Vorotnikova u др.* [227] Посредством использования МТТ-теста, авторами было показано, что частицы обладают крайне низкой токсичностью по отношению к клеткам линии Нер-2 – значения IC_{50} не были достигнуты во всем диапазоне доступных концентраций материала. В тоже время было показано, что материалы не проявляют способности к генерации синглетного кислорода, что, по-видимому, связано с эффективным экранированием комплекса. Таким образом, отсутствие как темновой, так и фотоиндуцированной цитотоксичности делает подобные материалы прекрасными кандидатами на роль агентов для биовизуализации.

Другим интересным исследованием является работа *Kirakci u др.* [204], в которой авторы впервые продемонстрировали рентген-индуцированную люминесценцию кластерных комплексов молибдена. Данный факт позволил им приступить к изучению комплексов в концепции рентген-индуцированной ФДТ. Для получения материалов авторы использовали подход аналогичный примененному в предыдущих статьях: взаимодействие комплекса $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{OOC-1-адамтан})_6]$ с раствором полистирола, содержащего $-\text{SO}_3^-$ группы привело к самосборке частиц. Далее авторами было показано, что данные частицы проявляют типичную для комплексов красную люминесценцию при возбуждении рентгеновским излучением. Более того, при удалении кислорода из окружающей среды наблюдается значительное увеличение интенсивности люминесценции, что косвенно говорит о генерации синглетного кислорода. Тем не менее, генерация $^1\text{O}_2$ также

была достоверно подтверждена авторами посредством детектирования люминесценции синглетного кислорода. Таким образом данные материалы действительно могут рассматриваться в качестве агентов для рентген-индуцированной ФДТ.

В работах *Beltran u др.* [235] и *Felip-Leon u др.* [236] авторы изучили возможность применения материалов в качестве веществ, обладающих высокой антибактериальной активностью. Материалы были получены посредством пропитки коммерчески доступных микрочастиц полистирола, поверхность которых покрыта заряженными группами $-NMe_3^+$, раствором комплекса $(Bu_4N)_2[Mo_6I_8](CH_3COO)_6$. При этом замена катиона Bu_4N^+ на NMe_3^+ закрепляла комплекс на поверхности частиц посредством электростатических взаимодействий. В работе были использованы полимеры двух типов морфологии – макропористые частицы и полимер, образующий гель (непористый). Для изучения антибактериальной активности образцов на их поверхность насеивали различные типы бактерий (Грамотрицательные *P. aeruginosa* и Грамположительные *S. aureus*), после чего облучали светом ($\lambda = 460$ нм). Результаты исследований показали, что пористость матрицы-носителя играет ключевую роль в эффективности антибактериальной активности – в обоих случаях материал на основе макропористого полимера показал более высокую эффективность. В случае *S. Aureus* наблюдалась гибель 99,999999% микроорганизмов для макропористого материала и 99,99% для полимера гелевого типа. Данная работа демонстрирует, что комплексы являются перспективными кандидатами на роль фотоактивных компонентов для создания самоочищающихся покрытий, для функционирования которых достаточно солнечного света или света дневных ламп.

1.5.3. Материалы на основе кластерных комплексов и SiO_2

Область получения материалов на основе кластерных комплексов и аморфного диоксида кремния получила свое развитие с работ *Grasset u др.* 2008 года [237, 238]. В данных работах авторы впервые получили материалы на основе SiO_2 и комплексов состава $Cs_2[Mo_6X_8]X_6$ ($X = Cl, Br$ или I) и продемонстрировали, что они проявляют люминесцентные свойства и хорошо диспергируются в воде, что делает их перспективными для таких областей как бивизуализация и ФДТ. Тем не менее, первые исследования биологических свойств подобных объектов появились только в 2013 году в работе *Aubert u др.* [239], которая будет подробно рассмотрена далее. В целом, способы получения подобных материалов не слишком разнообразны, и сводятся к двум основным методам, описанным в главе 1.1.3. – (1) метод Штобера [240, 241] и микроэмульсионный метод [237-239, 242-244]. Справедливо отметить, что большинство данных работ направлено на получение

материалов именно для биологических применений. Исключение составляет одна статья – *Dechezelles u др.* [240], в которой авторы путем упорядочения на подложке частиц SiO_2 , допированных комплексом $\text{Cs}_2[\{\text{Mo}_6\text{Br}_8\}\text{Br}_6]$, получали фотонные (коллоидные) кристаллы, проявляющие люминесцентные свойства, зависящие от угла возбуждающего излучения. Также стоит отметить, что значительная часть работ по получению подобных материалов и изучению их как физико-химических, так и биологических свойств выполнена лично либо при непосредственном участии диссертанта и будет описана далее в разделе "*Результаты и их обсуждение*".

Работа *Aubert u др.* [239] является ключевой для данной области не только по причине первенства в изучении биологических свойств подобных объектов, но и по причине того, что в ней авторы впервые подробно изучили, каким именно образом комплекс включается в матрицу диоксида кремния. Сами материалы получали микроэмульсионным методом в присутствии комплекса $\text{Cs}_2[\{\text{Mo}_6\text{Br}_8\}\text{Br}_6]$ (средний размер частиц – 45 нм). Полученные наночастицы были изучены с помощью твердотельного ЯМР на ядрах ^{29}Si . Данные показали, что в процессе получения материалов происходит гидролиз комплекса с образованием формы $[\{\text{Mo}_6\text{Br}_8\}\text{Br}_{6-x-y}(\text{OH})_x(\text{H}_2\text{O})_y]^n$, вследствие чего реализуется два типа взаимодействий – ковалентная связь (Mo-O-Si) и водородные связи между внешними лигандами комплекса и концевыми OH группами диоксида кремния (Mo-OH $_2$ ···O(H)-Si). Также в работе было продемонстрировано, что частицы обладают достаточно низкой цитотоксичностью по отношению к клеткам линий Caco-2 (клетки аденокарциномы толстого кишечника) и MRC-5 (фибробласты легких человека), причем токсических эффект зависел только от концентрации и не имел зависимости от времени. Данная работа является первой в ряду исследований, посвященных демонстрации биологических применений подобных объектов.

В работе *Neaime u др.* [243] авторы использовали аналогичный подход к получению материалов, однако в качестве исходного комплекса был выбран $\text{Cs}_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{C}_2\text{F}_5\text{COO})_6]$. Использование этого комплекса позволило авторам получить материал, обладающий более ярко-выраженными люминесцентными свойствами. Данный факт можно объяснить тем, что $\text{Cs}_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{C}_2\text{F}_5\text{COO})_6]$ является одним из наиболее эффективных люминофоров среди известных комплексов молибдена. По-видимому, в процессе получения материалов происходит лишь частичное замещение внешних лигандов на воду, что позволяет в некоторой степени сохранить люминесцентные свойства комплекса. Для увеличения биосовместимости и клеточного проникновения поверхность частиц была модифицирована трансферрином. С использованием люминесцентной микроскопии было показано,

что частицы хорошо проникают в раковые клетки SKmel 28 (клетки меланомы человека) и локализуются в цитоплазме клетки.

В работе *Pellen-Mussi и др.* [244] авторы подробно изучили цитотоксичность материалов, полученных в работе [239]. Для изучения использовались клетки различных линий – A549 (клетки аденокарциномы легкого человека), L929 (мышинные фибробласты) и KB (клетки рака горла человека). Кроме того, изучение проводилось как на 2D (стандартный метод), так и на 3D (сuspензия клеток) моделях. Использование 3D модели позволяет в некоторой степени имитировать естественные ткани. По результатам исследования было показано, что частицы проявляют низкий цитотоксический эффект по отношению к клеткам линий A549 и L929 в случае как 2D, так и на 3D модели. Токсичность имеет исключительно концентрационно-зависимый характер и в случае самых высоких концентраций (100 мкг/мл) процент выживаемости клеток составил ~ 60-80%. Интересным является тот факт, что в случае клеток линии KB наблюдалась иная картина – частицы (включая чистые частицы SiO₂) проявляли как концентрационно-зависимый, так и время-зависимый характер токсичности. Причем в случае 2D моделей значимая токсичность наблюдалась только при высоких концентрациях (100 мкг/мл) и процент выживаемости клеток составлял ~ 40-50%, в то время как в случае 3D моделей уже при концентрации 1 мкг/мл наблюдалось снижение количества живых клеток до ~ 80-90%. При использовании концентрации 100 мкг/мл процент выживаемости клеток составлял ~ 10%. Данное исследование наглядно демонстрирует, что в целом кластер-содержащие наночастицы SiO₂ проявляют достаточно низкую цитотоксичность, которая, однако, зависит не только от клеточной линии, но также и от типа используемой модели. В общем можно заключить, что данные объекты обладают значительными перспективами в областях биологии и медицины, однако безусловно требуются дальнейшие более сложные исследования на моделях *in vivo*.

1.6. Комбинирование люминофоров в различных матрицах

Отдельно стоит выделить примеры реализации подхода, направленного на комбинирование различных типов люминофоров, представленных в данном литературном обзоре, внутри одной матрицы. Таких работ не слишком много, но все же они стоят упоминания. Использование данного подхода позволяет либо получать систему с функциональными компонентами, работающими независимо друг от друга [245], либо усиливать свойство одного из них за счет второго [246, 247].

Работа *Ge и др.* [245] посвящена получению мультимодальной системы, направленной на одновременное детектирование ионов Hg²⁺ *in vitro* и *in vivo*, и, в тоже время, имеющую

функцию визуализации живых систем (как клеточных культур, так и животных). Сама система является достаточно сложной и представляет собой частицу имеющую структуру "yolk-shell" ("желток-скорлупа"), т.е. между ядром частицы и ее оболочкой существует пустое пространство. В роли "желтка" или ядра частицы выступает UCNP состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}@\text{NaGdF}_4$. Данное ядро заключено в "скорлупу" или оболочку из мезопористого диоксида кремния. Для придания дополнительной модальности авторы включили в пространство между ядром и оболочкой комплекс рутения. Для увеличения биосовместимости частиц, повышения стабильности дисперсии и защиты UCNPs и комплексов Ru поверхность частиц была дополнительно покрыта PEI. Таким образом, благодаря наличию большого количества функциональных компонентов данная система приобрела определенный набор функциональных свойств: (1) UCNPs позволяют проводить визуализацию живых систем как за счет UCL (люминесцентные способы детектирования), так и за счет наличия ионов Gd^{3+} (МР-контраст) и (2) комплексы рутения являются чувствительными на присутствие ионов Hg^{2+} , что выражается в изменении интенсивности их люминесценции за счет передачи энергии, что позволяет количественно и селективно детектировать ртуть в живых системах. Авторами были наглядно продемонстрированы все описанные возможности применения. Так предел обнаружения ионов Hg^{2+} составил 0,16 мкМ. Помимо этого, были проведены эксперименты по определению цитотоксичности системы на клетках линии HeLa и было показано, что она является абсолютно нетоксичной вплоть до концентрации 400 мкг/мл. Возможность применения материала в качестве МР-контрастера было продемонстрировано на мыши линии Кунминг. После введения препарата в хвостовую вену мышь изучали методом МРТ. Было показано, что через 30 минут после инъекции наблюдается хорошее контрастирование печени и селезенки. Также были проведены эксперименты по люминесцентной визуализации *in vitro* на клеточных культурах и *in vivo* и *ex vivo* на мыши линии Nude. В случае клеточных культур наблюдалась яркая зеленая и красная люминесценция в цитоплазме клетки. В случае эксперимента на животных было показано, что после 30 минут и 2 часов после введения препарата в хвостовую вену наблюдается отчетливая визуализация посредством UCL, в то время как через 24 часа интенсивность люминесценции значительно падает. Аналогичный анализ внутренних органов подтвердил результаты исследований с использованием МРТ – наиболее яркая эмиссия наблюдалась в печени и селезенке мыши.

Еще одной интересной работой в данном направлении является работа *He и др.* [247] В ней авторы также использовали UCNPs и комплексы рутения, однако сама работа была направлена на разработку системы адресной доставки с контролируемым

высвобождением лекарственного препарата. Для создания системы были выбраны UCNPc состава $\text{NaYF}_4:\text{TmYb}@\text{NaYF}_4$, которые также покрывали слоем мезопористого диоксида кремния. Поверхность полученных частиц была дополнительно модифицирована амино-группами. После этого авторы загружали в поры частиц противораковый препарат DOX. К полученной системе добавляли комплекс рутения, содержащий один аквалиганд, который замещался на амино-группу частиц, в результате чего происходила его координация и закупорка пор. Принцип действия данного материала основан на реакции фотокаталитического отщепления комплекса рутения под воздействием синего света. При трехфотонном возбуждении UCNPc ИК-лазером малой мощности наблюдается синяя эмиссия, которой достаточно, чтобы спровоцировать процесс отщепления комплекса рутения, в результате чего происходит раскупорка пор и высвобождение лекарственного препарата. На примере раковых клеток линии HeLa авторами была продемонстрирована эффективность разработанной системы – уже после 10 минут облучения наблюдалась гибель 75% клеток.

На данный момент единственной работой, в которой были скомбинированы кластерные комплексы и другие типы люминофоров, является работа *Molard и др.* [246] В данном исследовании авторы получили полимер полиметилметакрилат (PMMA), содержащий кластерный комплекс молибдена с ядром $\{\text{Mo}_6\text{Vt}_8\}$ и комплекс Er^{3+} . Комбинация данных люминофоров позволила значительно повысить эффективность люминесценции Er^{3+} в инфракрасной области спектра, что, по-видимому, связано с передачей энергии с кластерного комплекса и на Er^{3+} .

1.7. Заключение

В заключение стоит отметить, что существует гораздо большее количество красных неорганических люминофоров, не говоря уже об органических, однако в данном обзоре литературы рассмотрены только три наиболее популярных разновидности, а также кластерные комплексы. На основании приведенных данных можно отметить, что каждый из рассмотренных классов соединений обладает своими недостатками, которые, однако, как показывает публикационная активность, не являются непреодолимым препятствием для их дальнейшего применения на практике и, тем более, для изучения способов устранения этих недостатков и демонстрации возможностей их применения. Справедливо отметить, что кластерные комплексы также не лишены недостатков, однако их свойства в целом делают их заметными конкурентами более популярным соединениям в областях биологии и медицины, о чем свидетельствует как рост количества публикаций по данному

направлению, так и то, что практически ни одна публикация, посвященная комплексам, не обходится без изучения их биологических свойств. Таким образом, дальнейшая разработка области применения кластерных комплексов в биологии и медицине является актуальной и перспективной, исходя из чего вытекают цели и задачи данной работы, описанные в главе "*Введение*".

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Исходные реагенты и измерительные приборы

$(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$ ($\text{X} = \text{Cl}$ (1), Br (2), I (3)) были получены по методике описанной в [226, 248]. Все неупомянутые реактивы относятся к классу чда и выше и приобретены в Sigma Aldrich либо в Alfa Aesar.

Порошковые дифрактограммы регистрировали на автоматическом дифрактометре Philips APD 1700 с использованием CuK_α излучения, графитового монохроматора и внутреннего кремниевого стандарта. Рентгеноструктурный анализ проводили на автоматическом дифрактометре Bruker Nonius X8 Apex с использованием излучения Mo-K_α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) с графитовым монохроматором. Элементный CHN-анализ был проведен на CHNS-O анализаторе EuroVector EA3000. ИК-спектры записаны с помощью ИК Фурье спектрометра VERTEX 80 (Bruker). Электронные спектры поглощения (ЭСП) записывали для растворов соединений в соответствующем растворителе на спектрометре Ultrospec 3300 pro. Спектры диффузного отражения записаны с помощью UV-Vis-NIR 3101 PC spectrophotometer (Shimadzu Corporation). Исследование содержания тяжелых элементов выполнено с использованием метода ИСП-АЭС на высокоразрешающем спектрометре iCAP-6500 (Thermo Scientific) с распылительной камерой циклонного типа и распылителем «SeaSpray»; энергодисперсионный анализ проведен на Hitachi TM3000 TableTop SEM с приставкой Bruker QUANTAX 70 EDS. Термогравиметрический анализ проводился на термовесах TG 209 F1 Iris (NETZSCH) в интервале температур 25–850 °C и скоростью нагрева 10 К/мин в токе гелия (30 мл/мин). Измерение размера частиц и дзета-потенциала в растворе проводили при помощи ZetaSizer Nano-ZS. Масс-спектры получены на масс-спектрометре высокого разрешения Maxis 4G (Bruker Daltonics, Germany).

Морфология образцов изучена при использовании сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM 5700 CarryScore и просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Zeiss), распределение элементов по образцу изучено при помощи спектроскопии характеристических потерь энергии электрона (Bios Scientific Publishers Ltd, 2001). Для изучения распределения комплексов по объему материала также использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany), построенный на базе микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss) и оборудованный лазерным диодом (405 нм) и объективом APOCHROMAT 63×/1.4 Oil DIC LD.

^1H ЯМР спектры записаны на приборе Bruker Avance 200. Твердотельные ^{29}Si CP-MAS ЯМР-спектры записаны на приборе 500 MHz Bruker Avance II.

Для измерений эмиссии порошковых образцов их помещали между двумя не флуоресцентными стеклянными пластинами. Для измерений эмиссии растворов их поглощение было задано $< 0,1$ при 355 нм. Каждый раствор помещали в две кварцевые кюветы и одну из них деаэрировали продувкой Ar в течение 30 мин, а затем кювету запаивали. Измерения проводились при 298 К. Образцы возбуждались лазерными импульсами 355 нм (длительность 6 нс, LOTIS ТП, LS-2137/3). Корректированные спектры эмиссии регистрировались на многоканальном фотодетекторе (Hamamatsu Photonics, PMA-12). Затухание эмиссии анализировали с помощью системы со streak-камерой (Hamamatsu Photonics, C4334 и C5094). Квантовые выходы излучения были определены с использованием системы измерения абсолютного квантового выхода фотолюминесценции (Hamamatsu Photonics, C9920-03), которая содержит ксеноновую лампу в качестве источника возбуждения (длина волны возбуждения задана на 380 нм), интегрирующую сферу и многоканальный фотодетектор (Hamamatsu Photonics, PMA-12).

2.2. Получение материалов на основе MIL-101 и MIL-101-пуз (пуз = пиразин)

2.2.1. Синтез MIL-101

Наноразмерный MIL-101 был синтезирован в соответствии с немного модифицированной процедурой, описанной в статье [249]. Типичная методика синтеза заключается в следующем: в автоклаве с тефлоновой вставкой смешивали нитрат хрома (1,2 г, 3 ммоль), терефталевую кислоту (500 мг, 3 ммоль), 3 М HF (1 мл, 3 ммоль) и H₂O (15 мл), затем нагревали до 220°C в течение 3 часов и выдерживали при этой температуре 6 часов, после чего смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученный осадок отфильтровывали с использованием стеклянного фильтра с размером пор 160 мкм для удаления избытка терефталевой кислоты. Дополнительную очистку MIL-101 проводили в четыре этапа: обрабатывали горячим N,N-диметилформамидом (ДМФА) (60°C) в течение 1 часа – два раза, а затем горячим этанолом (70°C) в течение 3 часов (два раза). Полученный материал высушивали при 80°C в течение 12 часов.

2.2.2. Получение 3@MIL-101

Кластерный комплекс **3** (50 мг, 0,020 ммоль) растворяли в 4 мл CH₂Cl₂ и добавляли MIL-101 (300 мг, ~0,3 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. После пропитки твердый продукт **3**@MIL-101 отфильтровывали, промывали двумя порциями CH₂Cl₂ (2 × 500 мкл) и сушили на воздухе при 70°C. Выход составил 330 мг. ИК-спектроскопия, ν , см⁻¹: 3100 (ср., шир.), 1698 (пл.), 1654 (с.), 1614 (с.), 1550 (пл.), 1506 (ср.), 1433 (пл.), 1400 (с.), 1292 (ср.), 1157 (сл.), 1105 (сл.), 1018 (сл.), 926

(сл.), 881 (сл.), 829 (сл.), 808 (сл.), 777 (сл.), 746 (ср.), 704 (сл.), 663 (сл.), 577 (ср.). Соотношение Mo/Cr = 1/8,37.

2.2.3. Синтез MIL-101-пуз

MIL-101 (500 мг, ~ 0,5 ммоль) активировали в динамическом вакууме в течение 6 ч при 180°C для полного удаления воды (остаточное давление составляло 5×10^{-2} мбар). После этого порошок MIL-101 добавляли к 10 мл раствора пиразина в толуоле (84 мг, 1,05 ммоль) при постоянном токе Ar. Полученную смесь перемешивали в течение 6 ч при 80°C а затем 2 дня при комнатной температуре. Порошок MIL-101-пуз отфильтровывали, промывали двумя порциями толуола (2×5 мл) и сушили на воздухе при 70°C. Выход составил 270 мг. Вычислено для $\text{Cr}_3\text{OF}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)_3(\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2)_{1,7}(\text{H}_2\text{O})_6$ ($\text{C}_{30,8}\text{H}_{30,8}\text{Cr}_3\text{FN}_{3,4}\text{O}_{19}$): C 39,9; H 3,3; N 5,1. Найдено: C 39,9; H 3,3; N 5,1. ИК-спектроскопия, ν , cm^{-1} : 3100 (ср., шир.), 1701 (ср.), 1655 (с.), 1612 (с.), 1549 (с.), 1506 (с.), 1433 (пл.), 1400 (с.), 1319 (ср.), 1294 (ср.), 1254 (ср.), 1157 (ср.), 1124 (пл.), 1105 (ср.), 1057 (сл.), 1018 (ср.), 924 (сл.), 881 (сл.), 827 (ср.), 808 (ср.), 746 (с.), 704 (с.), 663 (ср.), 579 (с.), 463 (ср.).

2.2.4. Получение 3-MIL-101-пуз

Кластерный комплекс **3** (50 мг, 0,020 ммоль) растворяли в CH_2Cl_2 (4 мл) и добавляли MIL-101-пуз (150 мг, ~0,16 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. После реакции твердый продукт **3**-MIL-101-пуз отфильтровывали, промывали двумя порциями CH_2Cl_2 (2×500 мкл) и сушили на воздухе при 70°C. Выход составил 170 мг. ИК-спектроскопия, ν , cm^{-1} : 3428 (с., шир.), 1695 (пл.), 1670 (пл.), 1624 (с.), 1549 (ср.), 1508 (ср.), 1400 (с.), 1159 (сл.), 1109 (сл.), 1059 (сл.), 1016 (сл.), 883 (сл.), 831 (сл.), 748 (с.), 665 (ср.), 588 (с.). Соотношение Mo/Cr = 1/3.83.

2.2.5. Экстракция кластерного комплекса из 3@MIL-101 и 3-MIL-101-пуз

3 мг **3**@MIL-101 и **3**-MIL-101-пуз помещали в стеклянную вials объемом 10 мл и добавляли 3 мл физиологического раствора. Полученные смеси оставляли на 24 часа. В качестве контрольных экспериментов MIL-101 и MIL-101-пуз также были помещены в аналогичные экспериментальные условия. После экстракции реакционные смеси центрифугировали (10 мин, 7000 об/мин) и декантировали. Супернатант желтого цвета, полученный из **3**@MIL-101, исследовали с помощью электроспрей масс-спектрометрии (ESI-MS). В качестве образца сравнения использовали раствор, полученный гидролизом 40 мг **3** в 30 мл дистиллированной воды.

2.2.6. Методы характеристики и изучения свойств

2.2.6.1. Площадь поверхности и структура пор

Измерения адсорбции азота (N₂) при 77К проводились с использованием Autosorb iQ (Quantachrome Instruments). Образцы предварительно дегазировали в динамическом вакууме при 450 К в течение 20 часов. Изотермы адсорбции-десорбции N₂ измерялись в диапазоне относительных давлений p/p_0 от 10^{-4} до 0,99. Удельная площадь поверхности рассчитывалась по данным, полученным на основе моделей Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) и Ленгмюра. Подходы Гурвича и Сайто и Фоули, как наиболее подходящие для изучаемых материалов, использовались для оценки общего объема пор и распределения размеров пор соответственно.

2.2.6.2. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода

2,3-дифенил-*para*-диоксен (ДПД) был получен по методике, приведенной в статье [250] (чистота полученного ДПД была оценена по спектру ¹H-ЯМР). ДПД является известной в литературе «ловушкой» на синглетный кислород [227, 235, 251]. Типичный эксперимент заключался в следующем: 10 мг MIL-101, MIL-101-pуз, 3@MIL-101 или 3-MIL-101-pуз и раствор 29 мг (0,12 ммоль) 2,3-дифенил-*para*-диоксена в ацетоне-d₆ (0,6 мл) помещали в ЯМР ампулу. После этого смесь насыщали кислородом в течение 5 мин. Полученным образцам были записаны нулевые спектры ¹H-ЯМР. Затем ампулы облучали ртутной лампой ДРШ-500 с использованием светофильтра СЗС-7 (итоговая длина волны излучения $\lambda \geq 400$ нм) в течение необходимого времени. Спектры ¹H ЯМР (200 МГц) записывали на спектрометре Bruker Avance 200 NMR.

2.2.6.3. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест

Клетки линии Нер-2 высевали в 96-луночные планшеты с концентрацией 5×10^3 клеток/лунка, а затем инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Затем клетки обрабатывали средой, содержащей MIL-101, MIL-101-pуз, 3@MIL-101 или 3-MIL-101-pуз в диапазоне концентраций 0,5-500 мкг/мл и инкубировали в течение 72 часов при тех же условиях. Затем в каждую лунку добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ) до конечной концентрации 250 мкг/мл и инкубировали в течение 4 часов. Образованный формазан затем растворяли в ДМСО (100 мл). Оптическую плотность измеряли с помощью фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, USA) на длине волны 620 нм. Эксперимент повторяли три раза в разные дни.

2.2.6.4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Клетки Нер-2 высевали на покровные стекла ($1,5 \times 10^5$ клеток/стекло) и инкубировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Затем культуральную среду заменяли свежей средой, содержащей 62,5 мкг/мл MIL-101, MIL-101-puz, 3@MIL-101 или 3-MIL-101-puz и инкубировали клетки в течение 24 часов. Клетки, инкубированные в отсутствие исследованных соединений, использовали в качестве контроля. Далее клетки дважды промывали фосфатным буфером (PBS), фиксировали в 4% параформальдегиде и визуализировали с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany), снабженного лазерным диодом (405 нм) для флуоресценции и с $100\times$ масляным иммерсионным объективом. Изображения были получены и проанализированы с помощью программного обеспечения ZEN 2009.

2.2.6.5. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК, индуцированных 3@MIL-101 на клетках линии Нер-2

Клетки линии Нер-2 высевали в 96-луночный планшет (1×10^4 клеток/лунка) и инкубировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Затем питательную среду заменяли свежей средой, содержащей 125, 62,5 и 31,25 мкг/мл 3@MIL-101 и инкубировали в течение 24 часов. Клетки, инкубированные в чистой среде и в присутствии 100 мкМ H_2O_2 , использовали как отрицательный и положительный контроль соответственно. Перед проведением эксперимента клетки инкубировали с 10 мкМ 5,6-карбокситетрагидро-2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетатом (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich) в HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) в течение 5 мин при 37°C , а затем облучали галогеновой лампой 500 Вт ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 15 мин. Ядро клетки окрашивали Hoechst 33342. Для автоматической флуоресцентной визуализации использовали IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) с увеличением $200\times$. Полученные изображения использовались для анализа интенсивности флуоресценции DCFH-DA с использованием программного обеспечения IN Cell Investigator (GE Healthcare, UK). Данные представляют собой усредненную интенсивность флуоресценции DCFH-DA.

2.2.6.6. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

Клетки линии Нер-2 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 5×10^3 клеток/лунка и культивировали в течение 24 часов. Затем питательную среду заменяли свежей средой, содержащей от 500 до 125 мкг/мл 3@MIL-101 и 3-MIL-101-puz, инкубировали в течение 24 ч, а затем облучали галогеновой лампой мощностью 500 Вт ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 30 мин. Клетки, культивируемые в среде без материалов, служили

отрицательным контролем. Облученные клетки окрашивали Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин при 37°C и PI (*от англ.* Propidium iodide, Пропидиум иодид) (Sigma-Aldrich) в течение 10 мин при 37°C. Для автоматической флуоресцентной визуализации использовали IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) с увеличением 100×. Полученные изображения были использованы для анализа живых, апоптотических и мертвых клеток среди всей популяции с использованием программного обеспечения IN Cell Investigator (GE Healthcare, UK).

2.3. Получение материалов на основе полистиролсульфоната натрия (PSS)

2.3.1. Синтез полистиролсульфоната натрия (PSS)

Полистиросульфат натрия (PSS) был получен путём радикальной полимеризации согласно методике, описанной в работах [252, 253]. Для этого 10 г стиролсульфоната натрия моногидрата и 10 мг персульфата аммония помещали в колбу объемом 250 мл, растворяли в 100 мл дистиллированной воды и при перемешивании продували аргоном в течение 1 часа. Далее реакционную смесь нагревали до температуры 80°C и продолжали перемешивание в течение 24 ч. Затем образовавшийся вязкий раствор медленно прикапывали к 1,5 л этилового спирта при интенсивном перемешивании. Полученный полимер белого цвета промывали этиловым спиртом и сушили на воздухе при температуре 70°C. Выход составил 9,1 г (91%). Вычислено для $(\text{CH}_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O})_n$: С 39,7; Н 4,6; N 0, S 13,2. Найдено: С 39,5; Н 4,6; N 0; S 13,0.

2.3.2. Получение $n^x@PSS$

Все процедуры проводились при комнатной температуре. Материалы $n^x@PSS$ (где $n = 1, 2$ или 3 , а $x = 1, 5, 10$ или 100 – масса кластерного комплекса $1, 2$ или 3 в миллиграммах на 100 мг исходного полимера) получали согласно следующей методике: 100 мг PSS помещали в стеклянную вialу, добавляли 5 мл раствора ацетона, содержащего кластерный комплекс (1, 5, 10 или 100 мг), и перемешивали в течение 18 часов при комнатной температуре. Затем жёлтый отделяли от раствора путём центрифугирования (7700 об/мин в течение 10 минут), промывали ацетоном до потери окраски раствора, затем несколько раз этиловым спиртом и сушили на воздухе при температуре 70°C. Для $n^{100}@PSS$ найдено: С 37,2; Н 4,8; N 0; S 12,2 ($n = 1$); С 35,7; Н 4,5; N 0; S 12,5 ($n = 2$); С 36,7; Н 4,7; N 0; S 12,5 ($n = 3$).

2.3.3. Методы характеристики и изучения свойств

2.3.3.1. Гельпроникающая хроматография (ГПХ)

Молекулярные массы (M_n) и полидисперсность образцов измеряли на хроматографе Agilent-LC 1200, оснащенном колонкой PL-aquagel-OH mixed C и детектором показателя преломления. 0,7% раствор NaN_3 в деионизированной воде использовали в качестве элюента при скорости потока 1 мл/мин. Калибровка проводилась с использованием стандартов ПЕО (Agilent). Образцы полимерных материалов растворяли в деионизированной воде (0,3 мг в 1 мл) и выдерживали в течение 24 часов перед анализом для обеспечения полного растворения.

2.3.3.2. Вискозиметрия

Значения относительной вязкости (или соотношения вязкости) η_r определяли с использованием вискозиметра Уббелюде для концентрации 0,05 г/л в дистиллированной воде при 25°C. $\eta_r = t/t_0$, где η_r - коэффициент вязкости, t - среднее время истечения раствора и среднее время истечения чистого растворителя.

2.3.3.3. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.3. Использовали клетки линий HeLa или Нер-2. Диапазон концентраций PSS и \mathbf{n}^{100} @PSS – 3,2-3300 мг/мл.

2.3.3.4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.4. Использовали клетки линий HeLa или Нер-2. Концентрации PSS и \mathbf{n}^{100} @PSS – 100 мг/мл.

2.3.3.5. Проточная цитометрия (FACS)

Клетки линий Нер-2 и HeLa инкубировали с 100 мг/мл PSS или \mathbf{n}^{100} @PSS при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 часов. Затем клетки промывали PBS и изучали с использованием проточного цитометра FACS Canto II (Becton Dickinson). Использовали источник излучения 488 нм и фильтр излучения 695 нм. Все данные усредненной интенсивности флуоресценции были полученной с популяции 10000 клеток. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo Software.

2.3.3.6. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.6. Использовали клетки линий Нер-2 и HeLa. Диапазон концентраций \mathbf{n}^{100} @PSS – 3,2-51,6 мг/мл.

2.4. Получение материалов на основе аморфного диоксида кремния (SiO_2)

2.4.1. Получение микрочастиц $n^x@SiO_2$ (MPs) – метод Штобера

Общая методика синтеза $n^x@SiO_2$ MPs (где $n = 1, 2$ или 3 , а x - загрузка n в граммах на 1 г полученного SiO_2 , равная 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5) заключалась в следующем: 6 мл раствора ацетона, содержащего кластерный комплекс n (0,0135, 0,135, 0,675, 1,35, 6,75, 13,5, 67,5, 135, 270, 405, 540 или 675 мг) помещали в 10 мл виалу. ТЭОС (0,5 мл), H_2O (0,75 мл) и 25% водный раствор аммиака (0,5 мл) добавляли к раствору при интенсивном перемешивании. После этого виалы плотно закрывали и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Полученные растворы, окрашенные в цвета от желтого до красного в зависимости от содержания n , центрифугировали (10 мин, 7000 об/мин), промывали несколькими циклами обработки ультразвуком/центрифугирования: 5 раз ацетоном и 5 раз водой и сушили при 60°C на воздухе.

2.4.2. Получение наночастиц $n^x@SiO_2$ (NPs) – микроэмульсионный метод

Общая методика синтеза $3^x@SiO_2$ NPs (где $x = 0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1$) заключалась в следующем: комплекс 3 (0,7, 8,5, 17, 85 или 170 мг) растворяли в этаноле (2,5 мл). Затем к полученному этанольному раствору 3 добавляли дистиллированную воду (2,5 мл). В отдельной колбе на 250 мл ПАВ Brij L4 (15 мл) растворяли в *n*-гептане (47 мл). Для получения микроэмульсии в колбу с раствором ПАВ добавляли раствор 3 в смеси этанол/вода (1,6 мл) и 25% водный раствора аммиака (1,3 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин для обеспечения гомогенности микроэмульсии, затем добавляли 2 мл ТЭОС и перемешивали в течение 3 дней. После этого полученный желтоватый раствор центрифугировали (10 мин, 7000 об/мин), промывали несколькими циклами обработки ультразвуком/центрифугированием: 3 раза этанолом, 2 раза водой и 1 раз ацетоном, а затем сушили при 60°C на воздухе.

2.4.3. Получение комплексов A_n и B_n $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]$ из 1, 2 и 3

Осадки A_n и B_n , где n относится к исходным соединениям $1, 2$ или 3 , были получены согласно следующим процедурам: 500 мг n (0,291 ммоль для 1 , 0,241 ммоль для 2 или 0,204 ммоль для 3) растворяли в ацетоне (30 мл). Затем добавляли 2,5% водный раствор аммиака (3,2 мл). При этом наблюдалось осаждение твердого вещества (желтого цвета в случае 1 , оранжевого в случае 2 и темно-оранжевого в случае 3). Осадок A_n отфильтровывали через 12 часов после высаживания. Осадки B_n получали после полного испарения маточного раствора на воздухе. Все осадки промывали 3 раза ацетоном и сушили на воздухе. В случае B_2 и B_3 были получены кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного

анализа. Выходы, рассчитанные для продукта состава $[\{Mo_6X_8\}(H_2O)_2(OH)_4] \cdot 2H_2O$, составили 278 мг (95,5%), 319 мг (97,6%) и 298 мг (84,3%) для $X = Cl, Br$ и I соответственно.

2.4.4. Модификация поверхности $3^{0,01}@SiO_2$ MPs эпокси-группами (*mod-3^{0,01}@SiO₂ MPs*)

50 мг порошка $3^{0,01}@SiO_2$ MPs диспергировали в 2,5 мл гексана посредством обработки ультразвуком в течение 30 мин. Затем к дисперсии добавляли 7,5 мкл Et_3N и 0,05 мл (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана и полученную смесь нагревали при $55^\circ C$ в течение 3,5 часов при осторожном перемешивании. Продукт реакции, то есть функционализированные MPs, отделяли центрифугированием (10 мин, 7000 об/мин), промывали пять раз гексаном и один раз ацетоном и сушили при комнатной температуре на воздухе.

2.4.5. Конъюгация *mod-3^{0,01}@SiO₂ MPs* с GFP (Зеленый флуоресцентный белок – *Green Fluorescent Protein*)

10 мг *mod-3^{0,01}@SiO₂ MPs* промывали дважды 5 мл буфера для промывания (0,1 M NaCl) и ресуспендировали в 1 мл буфера для проведения конъюгации (Na_2CO_3 и $NaHCO_3$ в концентрациях 5,8 мг/мл и 3,8 мг/мл соответственно, $pH = 10$). 30 мкл GFP (10 мг/мл), смешанного с 1 мл буфера для проведения конъюгации, добавляли к дисперсии частиц и перемешивали в течение 24 часов. После этого полученную дисперсию промывали 5 мл буфера для промывания, ресуспендировали в 2 мл раствора для связывания свободного белка (глицин : Triton X-100 : $H_2O = 50$ мг : 0,014 мл : 20 мл) и осторожно перемешивали в течение 30 минут. Наконец, конъюгат снова промывали 5 мл буфера для промывания и ресуспендировали в 1 мл буфера для хранения (Triton X-100 : PBS = 0,023 мл : 50 мл, $pH = 7,4$). Конечная концентрация конъюгата составляла 10 мг/мл. Эксперимент был повторен для нефункционализированных $3^{0,01}@SiO_2$ MPs, чтобы продемонстрировать необходимость функционализации для связывания GFP.

2.4.6. Методы характеристики и изучения свойств

2.4.6.1. Площадь поверхности

Удельную площадь поверхности MPs и NPs измеряли с помощью технологии криоадсорбции азота с использованием Autosorb iQ (Quantachrome Instruments) при 77K. Образцы сначала дегазировали в вакууме при 393K в течение ночи. Изотермы адсорбции-десорбции N_2 измерялись в диапазоне относительных давлений 10^{-5} -0,99 и рассчитывались по данным, полученным на основе стандартной модели БЭТ.

2.4.6.2. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.2. Исследование было проведено для $3^x@SiO_2$ ($x = 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,002, 0,003, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1$ для MPs и $x = 0,001, 0,005, 0,01$ для NPs).

2.4.6.3. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.3. Использовали клетки линии Нер-2. Диапазон концентраций: SiO_2 и $3^x@SiO_2$ ($x = 0,01$ для MPs и $0,001, 0,01$ для NPs) – $0,0015-1,5$ мг/мл; $3^{0,01}@SiO_2-GFP$ – $0,001-1$ мг/мл.

2.4.6.4. Исследование кинетики поглощения частиц клетками

Клетки Нер-2 высевали в 6-луночные планшеты с концентрацией 3×10^5 клеток/лунка для каждого момента времени и инкубировали в течение 24 ч для достижения конfluence более 50%. $3^x@SiO_2$ ($x = 0,01$ для MPs и $0,001, 0,01$ для NPs) разводили в среде ЕМЕМ до конечной концентрации $0,1$ мг/мл, $3^{0,01}@SiO_2-GFP$ и чистого GFP – до 20 мкг/мл. Частицы обрабатывали ультразвуком в течение ~ 15 мин перед всеми экспериментами. Затем клетки инкубировали с MPs, $3^{0,01}@SiO_2-GFP$ и GFP в питательной среде в течение $0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8$ и 16 ч или с NPs в течение $0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4$ и 8 ч при $37^\circ C$ в атмосфере $5\% CO_2$. После инкубации клетки трижды промывали ледяным PBS для удаления свободных NPs. Затем клетки трипсинизировали и ресуспендировали в свежем PBS с 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Суспензии клеток анализировали с использованием FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Для $3^{0,01}@SiO_2$ использовали источник излучения с длиной волны 488 нм и фильтр эмиссии 695 ± 40 нм, для $3^{0,01}@SiO_2-GFP$ и GFP – 488 нм и 530 ± 30 нм. Данные выражали в величинах усредненного значения флуоресценции, полученного из популяции $10\ 000$ клеток.

2.4.6.5. Исследование кинетики высвобождения наночастиц из клеток

Клетки Нер-2 высевали в 6-луночные планшеты с концентрацией 3×10^5 клеток/лунка для каждой временной точки ($0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4$ и 24 ч) и инкубировали в течение 24 ч для достижения конfluence более 50%. $3^x@SiO_2$ NPs ($x = 0,001, 0,01$) разводили в среде ЕМЕМ до конечной концентрации $0,1$ мг/мл и обрабатывали ультразвуком в течение ~ 15 мин перед всеми экспериментами. Затем клетки инкубировали с NPs в течение 2 ч при $37^\circ C$ в атмосфере $5\% CO_2$. После инкубации питательную среду, содержащую NPs, заменяли свежей средой и инкубировали в течение $0,25, 0,5, 1, 2, 4$ и 24 ч. Затем клетки трипсинизировали и ресуспендировали в свежем PBS с 10% эмбриональной бычьей

сыворотки. Суспензии клеток анализировали с использованием FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Условия аналогичны приведенным в п. 2.4.6.4.

2.4.6.6. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.4. Использовали клетки линии Нер-2. Концентрация $\mathbf{3}^x@SiO_2$ NPs ($x = 0,001, 0,01$) – 0,1 мг/мл.

2.4.6.7. Изучение распределения микрочастиц в клетке (флуоресцентная микроскопия)

Клетки Нер-2 высевали на 96-луночные планшеты с концентрацией 7×10^3 клеток/луночка и инкубировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем культуральную среду заменяли свежей средой, содержащей 0,1 мг/мл $\mathbf{3}^{0,01}@SiO_2$ MPs или 0,02 мг/мл $\mathbf{3}^{0,01}@SiO_2$ -GFP или 20 мкг/мл GFP и инкубировали в течение 18 ч. Клетки, инкубированные в чистой среде, использовали в качестве контроля. После инкубации клетки дважды промывали PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде и визуализировали с использованием IN Cell Analyzer IN (GE Healthcare, USA). Ядра клеток были окрашены Hoechst 33342 (Thermo Fisher scientific), цитоскелеты визуализировали окрашиванием Alexa Fluor™ 532 Phalloidin (Sigma Aldrich). Для визуализации частиц использовали источник возбуждения с длиной волны 375 нм и фильтр эмиссии 700 нм, для Hoechst – 375/488, для Phalloidin – 531/554 и для $\mathbf{3}^{0,01}@SiO_2$ -GFP и GFP – 488/530.

2.4.6.8. Изучение распределения частиц в клетке (ПЭМ)

Клетки Нер-2 выращивали в культуральном матрасе площадью 25 см² (6×10^5 клеток на колбу) в течение 24 ч, после чего клетки инкубировали с 0,1 мг/мл чистых SiO₂ NPs или $\mathbf{3}^x@SiO_2$ ($x = 0,01$ для MPs и 0,001, 0,01 для NPs) в течение 24 часов. Клетки промывали PBS и трипсинизировали. Затем 1 мл среды, содержащей 1×10^6 клеток центрифугировали при 1000g в течение 5 мин при комнатной температуре для образования гранул на дне микропробирки. Клетки фиксировали 2% глутаральдегидом в PBS в течение 2 ч, затем два раза подвергали промывке PBS по 30 мин каждая. После этого к осажденным фиксированным клеткам добавляли 1% раствор OsO₄ в PBS (1 мл) и оставляли на 1 час. Ультратонкие срезы (70 нм) были получены с использованием ультрамикротомы Leica EM UC7 и помещены на медные сеточки. Образцы изучали с использованием просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Zeiss).

2.4.6.9. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

Эксперимент проводили аналогично приведенному в п. 2.2.6.6. Использовали клетки линий Нер-2 и HeLa Диапазон концентраций $\mathbf{3}^{0,01}@SiO_2$ MPs – 0,0046-0,15 мг/мл, SiO₂

NPs и $\mathbf{3}^x@SiO_2$ NPs ($x = 0,001, 0,01$) – 0,0125-0,22 мг/мл. В качестве позитивного контроля использовали коммерчески доступный фотосенсибилизатор Радахлорин[®] в концентрациях, типичных для исследований *in vitro* (0,0025-0,1 мг/мл).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенный обзор литературы наглядно демонстрирует перспективность направления создания материалов на основе октаэдрических кластерных комплексов и различных матриц для биологических и медицинских применений. Тем не менее, можно заметить, что на данный момент существует достаточно ограниченное количество работ по данному направлению. Фактически можно сказать, что работы по исследованию подобных материалов начались только в 2016 году (не считая единственной более ранней работы 2010 года [239]). Отсутствие подобных исследований и побудило начать разработку данного направления, и на данный момент большая часть работ, посвященных изучению возможностей применения кластер-содержащих материалов, опубликована с участием диссертанта.

Данная работа посвящена получению и изучению материалов на основе матриц различной природы и октаэдрических галогенидных кластерных комплексов молибдена с ядром $\{Mo_6X_8\}^{4+}$ (где $X = Cl, Br$ или I) для биомедицинских применений. Подобные комплексы в последнее время привлекают большое внимание ученых-материаловедов в основном благодаря проявлению выдающихся люминесцентных свойств. В частности, они демонстрируют яркую эмиссию в области наименьшего поглощения живых тканей (550-900 нм) и высокие (до 70%) значения квантовых выходов люминесценции [234, 254-256]. Более того, известно, что кластерные комплексы молибдена способны выступать в роли эффективных фотосенсибилизаторов в процессах генерации синглетного кислорода [204, 206, 220, 257]. Наличие данных свойств позволяет прогнозировать их перспективность в областях биологии и медицины, таких как люминесцентная визуализация живых систем или фотодинамическая терапия. К сожалению, большинство известных кластерных комплексов молибдена не растворимы в воде и быстро гидролизуются, полностью [258] либо частично [259], с образованием нерастворимых осадков. В тоже время даже те, редкие примеры водорастворимых кластерных комплексов, не выпадающих в осадок при их выдерживании в воде, также претерпевают частичный гидролиз [206]. Отсутствие растворимости и/или плохая стабильность комплексов в воде очевидно препятствуют исследованиям их биологических свойств и, следовательно, изучению их биомедицинских применений. Для решения этих проблем применим классический метод включения комплексов в инертную биосовместимую матрицу.

В рамках представленной диссертационной работы для получения материалов были выбраны кластерные комплексы состава $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$. (рис. 10) Выбор данных объектов обуславливается тем, что они обладают ярко-выраженными люминесцентными свойствами, а также, что немаловажно, нитратные лиганды являются высоко лабильными и, как следствие, в процессе получения материала способны замещаться на группы матрицы-носителя. За счет этого эффекта комплексы способны образовывать прочную связь с матрицей повышая стабильность финального материала. В работе было выбрано три матрицы-носителя различной природы: водорастворимый органический полимер – полистиролсульфонат натрия, неорганическая матрица – аморфный диоксид кремния и матрица смешанной природы – МОКП MIL-101. Все полученные материалы были подробно изучены набором современных физико-химических методов, а также особое внимание было уделено изучению люминесцентных и биологических свойств объектов [260, 261, 262, 263]. Ввиду того, что каждая из матриц обладает различными свойствами, концепция применения финальных материалов сильно ранжируется:

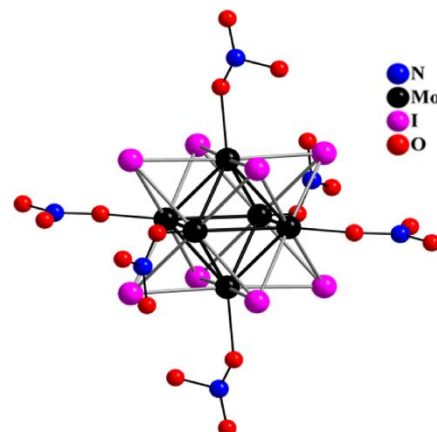


Рис. 10. Строение кластерного аниона $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]^{2-}$.

- 1) материалы на основе MIL-101 – биовизуализация и ФДТ [260];
- 2) материалы на основе PSS ($\mathbf{n}^x@PSS$) – биовизуализация [261];
- 3) материалы на основе SiO_2
 - a. микрочастицы $\mathbf{n}^x@SiO_2$ – биовизуализация и доставка биомолекул [262];
 - b. наночастицы $\mathbf{3}^x@SiO_2$ – биовизуализация и ФДТ [262, 263];

Теперь перейдем к более подробному рассмотрению каждого из материалов в отдельности.

3.1. Материалы на основе MIL-101

3.1.1. Получение и характеристика материалов

Изучение материалов данного типа описано в работе [260]. Исходный наноразмерный MIL-101 был получен согласно методике, приведенной в статье [249]. Морфология координационного полимера была охарактеризована с помощью ПЭМ (Приложение, рис. П1). Полученные изображения показали, что соединение представляет собой кристаллический порошок с размером кристаллов около 100-200 нм. Включение комплекса **3** в наноразмерный MIL-101 проводили посредством простой пропитки дисперсии МОКП в CH_2Cl_2 . В

связи с отсутствием каких-либо функциональных групп в полимере, мы предположили, что пропитка приводит к образованию соединения включения **3**@MIL-101 с типом взаимодействия «гость-хозяин». Ранее в литературе была продемонстрирована инкапсуляция различных кластерных комплексов молибдена и рения, а именно $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{Br}_8\}\text{F}_6]$, $(\text{Et}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{Cl}_8\}\text{Cl}_6]$, $(\text{Bu}_4\text{N})_4[\{\text{Re}_6\text{S}_8\}(\text{CN})_6]$, $\text{K}_4[\{\text{Re}_6\text{S}_8\}(\text{HCOO})_6]$ и $\text{K}_4[\{\text{Re}_4\text{S}_4\}\text{F}_{12}]$ в матрицу MIL-101 [207-209, 211, 264]. Было показано, что подобные анионные комплексы способны легко проникать в полости полимера через большие окна (10-15 Å) и удерживаться внутри пор благодаря сильному электростатическому взаимодействию с положительно заряженным каркасом MIL-101. Изучение соединения **3**@MIL-101 методом элементного анализа EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) показало, что соотношение Cr/Mo в образце равно 8,37, что соответствует 0,06 молекул комплекса на формульную единицу MIL-101 или ~0,7 молекул комплекса на каждую мезополость.

Не смотря на простоту включения комплексов в полости МОКП, сильного электростатического взаимодействия с каркасом не достаточно для их надежного удержания внутри пор, и они легко высвобождаются при смене среды. Для более прочного связывания комплексов мы предложили иной подход – использование дополнительного функционального лиганда. В качестве данного лиганда был выбран пиразин, имеющий в пара-положении два донорных атома азота. Наноразмерный MIL-101 был модифицирован путем взаимодействия с раствором пиразина в толуоле, как описано в работе [265]. При этом происходит частичное замещение координированных к атому хрома молекул воды на пиразин. Наличие второго атома азота в пиразине позволяет координировать к нему комплекс с образованием ковалентной связи.

Соединение состава **3**-MIL-101-pyz было получено аналогично **3**@MIL-101. Мы предположили, что взаимодействие комплекса **3** с MIL-101-pyz приведет к замещению высоко лабильных нитратных лигандов и образованию ковалентной связи Mo-N. Изучение полученного соединения методом элементного анализа EDS показало, что соотношение Cr/Mo в образце равно 3,83, что соответствует 0,13 молекул комплекса на формульную единицу MIL-101-pyz или ~1.47 молекул комплекса на каждую мезополость. Можно заметить, что модификация координационного полимера увеличила количество включаемого комплекса больше, чем в два раза, что косвенно подтверждает теорию об образовании ковалентных связей.

Порошковые рентгеновские дифрактограммы MIL-101, MIL-101-pyz, а также **3**@MIL-101 и **3**-MIL-101-pyz приведены на рисунке 11. Из полученных данных можно видеть, что

как модификация MIL-101, так и включение кластерного комплекса, не влияют на кристаллическую структуру координационного полимера.

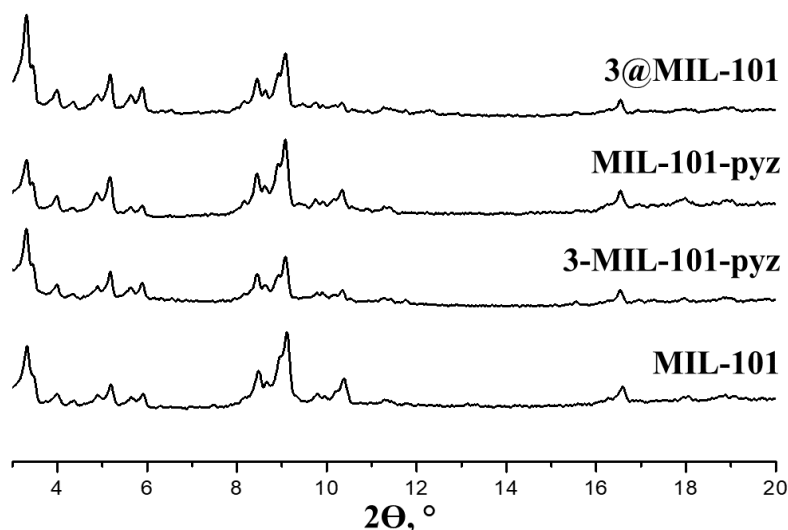


Рис. 11. Рентгеновские дифрактограммы MIL-101, MIL-101-pyz, 3@MIL-101 и 3-MIL-101-pyz.

Также методом низкотемпературной адсорбции азота для всех соединений была изучена удельная площадь поверхности и рассчитаны размеры пор. (табл. 1) Изотермы адсорбции-десорбции азота при 77К и кривые распределения размеров пор представлены в приложении (Приложение, рис. П2 и П3). Согласно расчетам, MIL-101 и MIL-101-pyz являются высокопористыми, однако в случае MIL-101-pyz наблюдается небольшое снижение площади поверхности, адсорбционной емкости и размера пор. В тоже время 3@MIL-101 и 3-MIL-101-pyz демонстрируют еще более низкие значения по сравнению с исходными соединениями. Очевидно, что данная тенденция к снижению показателей обусловлена включением молекул комплексов и/или пиразина в поры и, как следствие, снижением их объема. Таким образом, полученные соединения в некоторой степени сохраняют пористую структуру исходного MIL-101 с умеренным уменьшением показателей.

Т а б л и ц а 1

Значения удельной площади поверхности и объема пор MIL-101, MIL-101-pyz, 3@MIL-101 и 3-MIL-101-pyz

| Соединение | Удельная площадь поверхности, м ² /г | | V _{пор} , см ³ /г | V _{адс(N₂)} , см ³ /г |
|---------------|---|------|---------------------------------------|--|
| | Ленгмюр | БЭТ | | |
| MIL-101 | 4695 | 3256 | 1,57 | 1300 |
| 3@MIL-101 | 3236 | 2287 | 1,11 | 719 |
| MIL-101-pyz | 4290 | 3055 | 1,47 | 953 |
| 3-MIL-101-pyz | 3023 | 2243 | 1,13 | 732 |

3.1.2. Стабильность материалов в воде

Предположительно образование ковалентных связей между матрицей и кластерным комплексом должно было увеличить стабильность системы в целом и предотвратить вымывание комплекса из пор. Для того, чтобы подтвердить данную теорию материалы **3@MIL-101** и **3-MIL-101-pyz** помещали в фосфатный буферный раствор при pH = 7,4 и выдерживали в течение 24 часов. В качестве контроля использовали MIL-101 и MIL-101-pyz, которые выдерживали в тех же экспериментальных условиях. После проведения экстракции и последующего центрифугирования было обнаружено, что в случае **3@MIL-101** раствор над осадком (супернатант) был окрашен в желтый цвет. (рис. 12) Напротив, в случае соединения **3-MIL-101-pyz** супернатант был бесцветным, что наглядно подтверждает повышение стабильности системы при образовании ковалентных связей Mo-N.

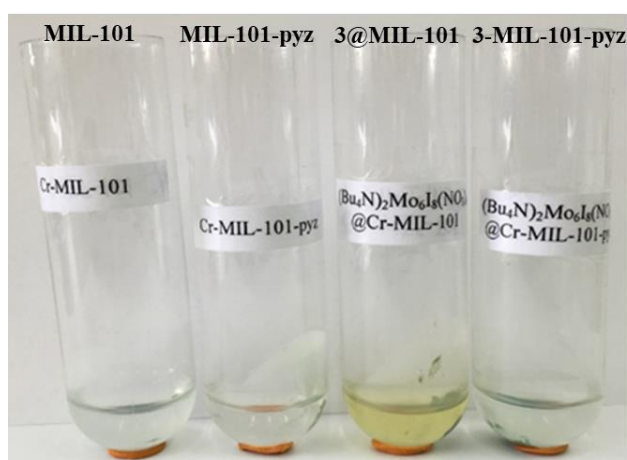


Рис. 12. Растворы, полученные после экстракции MIL-101, MIL-101-pyz, **3@MIL-101** и **3-MIL-101-pyz**.

Поскольку исходный кластерный комплекс **3** не растворим в воде, мы предположили, что одновременно с вымыванием комплекса из пор полимера происходит его гидролиз с образованием водорастворимых форм аква-гидроксо комплекса. Для подтверждения теории был проведен дополнительный эксперимент, в котором комплекс **3** помещали в воду и выдерживали в течение 24 часов. По прошествии суток наблюдалось практически полное растворение комплекса в воде с образованием оранжевого раствора. Окрашенный супернатант и раствор **3** в воде были изучены с помощью электроспрей масс-спектрометрии (ESI-MS). Полученные масс-спектры показали, что оба раствора идентичны по составу. (Приложение, рис. П4(а)) В области m/z от 810 до 900 (положительная область) наблюдался богатый набор сигналов со сложной структурой. Детальный анализ спектра показал наличие ряда форм, образовавшихся при гидролизе комплекса, т.е. при замене внешних лигандов NO₃⁻ на H₂O и OH⁻, а именно $(\{Mo_6I_8\}(OH)_2 \cdot xH_2O)^{2+}$ и $(\{Mo_6I_8\}(OH)(NO_3) \cdot yH_2O)^{2+}$ (где x = 1-9 и y = 0-6). Симуляция пиков отдельных форм и

их последующее математическое сложение позволило получить спектр, который идеально совпал с практическим. (Приложение, рис. П4(б) и П5) Стоит отметить, что повышение рН до физиологического значения 7,4 привело к осаждению комплекса из раствора в виде нейтрального соединения $[\{Mo_6I_8\}(H_2O)_2(OH)_4] \cdot zH_2O$. (Приложение, рис. П6)

3.1.3. Люминесцентные свойства

Люминесцентные свойства были изучены для порошковых образцов исходного MIL-101, соединений **3**@MIL-101 и **3**-MIL-101-pyz, а также из гидролизованного комплекса **3** как в аэрированном, так и в деаэрированном водных растворах. Спектры эмиссии приведены на рисунке 13, а длины волн максимума эмиссии ($\lambda_{эм}$), значения абсолютных квантовых выходов ($\Phi_{эм}$) и времен жизни эмиссии ($\tau_{эм}$) – в таблице 2. Несмотря на то, что красную люминесценцию образцов можно отчетливо видеть невооруженным глазом, значения квантовых выходов люминесценции образцов на основе MIL-101 находятся вне пределов определения интегрирующей сферы, т.е. $< 0,01$.

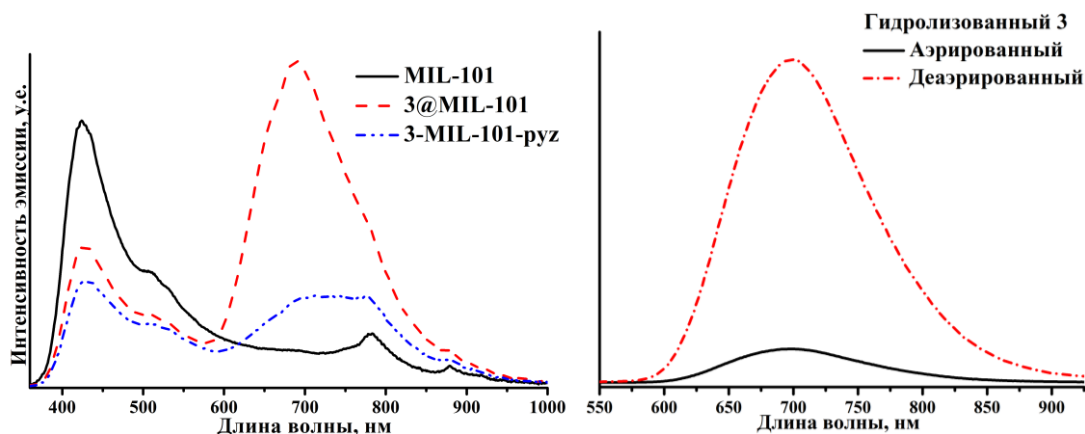


Рис. 13. Спектры люминесценции MIL-101, **3**@MIL-101 и **3**-MIL-101-pyz (слева) и гидролизованного комплекса **3** (справа)

Т а б л и ц а 2

Фотофизические характеристики образцов MIL-101, **3**@MIL-101 и **3**-MIL-101-pyz и гидролизованного комплекса **3**

| Образец | $\lambda_{эм}$, нм | $\tau_{эм}$, мкс (А) | $\Phi_{эм}$ |
|--|---------------------|--|-------------|
| MIL-101 | 424, 783 | $\tau_1 = 2,75 (0,01)$ $\tau_2 = 0,48 (0,08)$ $\tau_3 = 0,08 (0,91)$ | $< 0,01$ |
| 3 @MIL-101 | 424, 690 | $\tau_1 = 14,3 (0,02)$ $\tau_2 = 0,88 (0,19)$ $\tau_3 = 0,16 (0,79)$ | $< 0,01$ |
| 3 -MIL-101-pyz | 431, 740 | $\tau_1 = 7,28 (0,02)$ $\tau_2 = 1,36 (0,19)$ $\tau_3 = 0,25 (0,79)$ | $< 0,01$ |
| Гидролизированный 3 аэрированный | 700 | 8,16 | 0,02 |
| Гидролизированный 3 деаэрированный | 700 | 55,3 | 0,11 |

На представленных спектрах материалов можно наблюдать два относительно узких пика люминесценции с максимумами на ~ 430 нм и ~ 780 нм. (рис. 13) Эти пики принадлежат собственной люминесценции MIL-101 и их можно отнести к переносу заряда с лиганда на металл (430 нм) [266-268] и электронному переходу ${}^2E \rightarrow {}^4A_2$ в атомах Cr(III) (780 нм) [209, 269]. В тоже время, широкий пик люминесценции с максимумом на ~ 700 нм в случае **3**@MIL-101 и **3**-MIL-101-puz определенно относится к люминесценции кластерного комплекса молибдена, включенного в МОКП. Заметим, что интенсивность эмиссии комплекса в случае **3**-MIL-101-puz значительно ниже, чем для **3**@MIL-101. (рис. 13) Подобное различие в интенсивностях, а также в значениях времен жизни эмиссии (табл. 2), может быть объяснено различным составом комплекса внутри полимера, т.е. различным лигандным окружением кластерного ядра $\{Mo_6I_8\}^{4+}$. В случае **3**-MIL-101-puz происходит замещение нитратных лигандов на молекулы пиразина, что, по-видимому, отрицательно сказывается на люминесцентных свойствах комплекса. Подобное уменьшение интенсивности эмиссии кластерных комплексов уже было показано в литературе на примере материала на основе PS-SH, в котором при включении комплекса в матрицу происходило замещение внешних нитратных лигандов на $-S^-$ и для материала наблюдалась более низкая интенсивность люминесценции [226, 227]. С другой стороны, координация ядра $\{Mo_6I_8\}^{4+}$ пиразиновыми лигандами создала альтернативный путь рассеяния энергии «кластерное ядро \rightarrow молекула пиразина \rightarrow координационный полимер». Такой эффект также был продемонстрирован в литературе на примере MIL-101-biru, пропитанного раствором $[\{Re_6S_8\}(HCOO)_6]^{4-}$. При этом наблюдалось аналогичное снижение интенсивности люминесценции по сравнению с исходным комплексом [211]. Также следует отметить, что фотофизические характеристики кластерных комплексов сильно зависят от присутствия кислорода и его концентрации. Например, деаэрированный водный раствор гидролизованного комплекса **3** продемонстрировал примерно в 7 раз более длинное время жизни эмиссии и на порядок более высокое значение квантового выхода, по сравнению с аэрированным раствором (рис. 13, табл. 2).

3.1.4. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода

Фотофизические характеристики кластерных комплексов молибдена, такие как времена жизни эмиссии и квантовые выходы, очень чувствительны к присутствию молекулярного кислорода [232, 234, 256, 270, 271], что можно также наблюдать на примере данных из таблицы 2. Данный эффект наиболее заметен для растворов комплексов. Одной из причин данного эффекта является эффективный перенос энергии с возбужденного кластерного комплекса на триpletный кислород (3O_2), что приводит к образованию

высокоактивной синглетной формы кислорода ($^1\text{O}_2$) [213, 251]. Так как соединения **3@MIL-101** и **3-MIL-101-pyz** являются достаточно пористыми для проникновения молекулярного кислорода, было проведено исследование их способности к генерации синглетного кислорода. Существует достаточно большое количество способов детектирования образовавшегося синглетного кислорода – например, прямое определение квантового выхода синглетного кислорода (благодаря собственной люминесценции $^1\text{O}_2$ на $\lambda \sim 1270$ нм) или косвенное определение с использованием молекул-ловушек, способных селективно окисляться синглетным кислородом (детектирование продукта окисления можно проводить с помощью таких методов, как ^1H ЯМР, спектрофотометрия и др.). В данной работе использовали 2,3-дифенил-*para*-диоксен, который является известной ловушкой на синглетный кислород, т.к. он легко окисляется в его присутствии с образованием этиленгликоль дибензоата (Приложение, Схема П1). Детектирование продукта реакции производилось по спектрам ^1H ЯМР, где отчетливо видны пики, относящиеся к протонам *a* и *b*, отмеченным на схеме П1, исходя из которых можно рассчитать количество окисленной ловушки. Рассчитанные степени конверсии 2,3-дифенил-*para*-диоксена после облучения светом с $\lambda \geq 400$ нм в присутствии материалов в течение различного времени приведены в таблице 3 и в Приложении, рис. П7. Фрагменты ^1H ЯМР спектров представлены в Приложении, рис. П8.

Т а б л и ц а 3

Показатели эффективности генерации синглетного кислорода

| Образец | Конверсия 2,3-дифенил- <i>para</i> -диоксена, % | | |
|----------------------|---|-----|-----|
| | 1 ч | 3 ч | 5 ч |
| MIL-101 | 0,1 | 0,5 | 0,5 |
| 3@MIL-101 | 1,0 | 2,4 | 5,8 |
| MIL-101-pyz | 0 | 1,1 | 1,2 |
| 3-MIL-101-pyz | 0,3 | 1,9 | 5,4 |

Можно заметить, что кластер-содержащие материалы **3@MIL-101** и **3-MIL-101-pyz** демонстрируют удовлетворительную активность в генерации синглетного кислорода, тогда как для MIL-101, а также для MIL-101-pyz наблюдается лишь незначительная конверсия 2,3-дифенил-*para*-диоксена. Более того, активность генерации синглетного кислорода **3@MIL-101** и **3-MIL-101-pyz** практически одинакова, несмотря на значительно более высокое содержание комплекса в **3-MIL-101-pyz**.

3.1.5. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест

Токсичность соединений играет решающую роль для их применения в фотодинамической терапии и других биоприложениях и является первичным критерием их отбора. Известно, что хромсодержащие соединения, особенно соединения Cr(VI), в основном обладают высокой токсичностью. В данной работе было использовано высокостабильное соединение MIL-101, содержащее Cr(III), токсичность которого намного ниже, чем для соединений Cr(VI). В ходе исследований мы оценили влияние исходных матриц и кластер-содержащих материалов на жизнедеятельность клеток Нер-2 с использованием МТТ-теста. В данном методе происходит восстановление желтого МТТ-реагента редуцтазами живых клеток до фиолетового формазана. Формазан образуется в виде кристаллов фиолетового цвета, которые затем растворяют в ДМСО и по соотношению значений поглощения исследуемого и контрольного (клетки инкубируются без добавления препарата) образцов определяют процент выживших клеток. Было показано, что MIL-101 и 3@MIL-101 не оказывают значимого влияния (т.е. жизнеспособность клеток составляет более 80%) на жизнедеятельность клеток в диапазоне концентраций от 0,5 мкг/мл до 125 мкг/мл. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для MIL-101 и 3@MIL-101 составили 744±16 мкг/мл и 535±48 мкг/мл соответственно. В тоже время соединения MIL-101-pyz и 3-MIL-101-pyz оказывают более сильное влияние на метаболическую активность клеток. Например, жизнеспособность клеток после инкубации с MIL-101-pyz и 3-MIL-101-pyz была ниже 80% в том же диапазоне концентраций до 125 мкг/мл. Значения IC₅₀ составили 407±26 мкг/мл и 339±16 мкг/мл соответственно. (рис. 14)

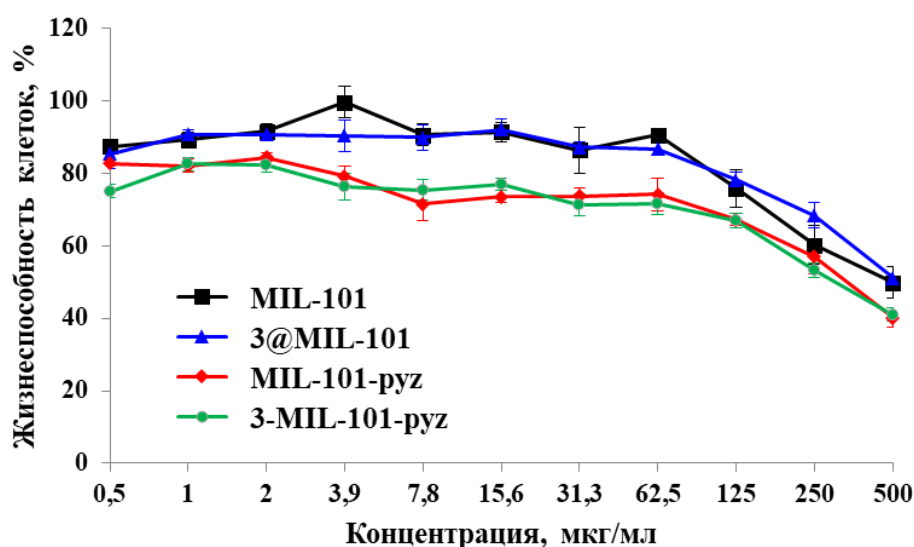


Рис. 14. Влияние MIL-101, MIL-101-pyz, 3@MIL-101 и 3-MIL-101-pyz на жизнеспособность клеток линии Нер-2

Таким образом, полученные результаты показывают, что в обоих случаях включение кластерного комплекса в полимер приводит к увеличению токсичности в сравнении с исходными матрицами. В тоже время наблюдается и значительная разница в токсичности самих матриц – модифицированный пирaziном MIL-101-пуз имеет практически в два раза более низкое значение IC₅₀ в сравнении с исходным MIL-101. Также стоит отметить, что из-за большой разницы в токсичностях матриц, кластер-содержащий материал 3@MIL-101 является менее токсичным, чем даже чистый MIL-101-пуз.

3.1.6. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Для оценки способности исходных матриц и кластер-содержащих материалов проникать в клетку и изучения их внутриклеточного распределения использовался метод КЛСМ (клетки линии Нер-2). (рис.15) Полученные изображения демонстрируют, что все изученные соединения не проникают во внутриклеточное пространство, а лишь налипают на поверхность клеточную мембрану. Интересным является тот факт, что после инкубации клеток с 3@MIL-101 наблюдается красная флуоресценция, распределенная по всей цитоплазме клетки, что свидетельствует о проникновении флуоресцентного вещества внутри клеток. Поскольку распределение красной флуоресценции внутри цитоплазмы было однородным, можно предположить, что кластерные комплексы, включенные в 3@MIL-101, высвобождаются из каркаса MIL-101 во время инкубации и диффундируют через клеточную мембрану в цитоплазму (рис. 15). Данный эффект наглядно демонстрирует, что матрица MIL-101 обеспечивает доставку кластерных комплексов до клеточной мембраны без их удаления из пор или повреждения, после чего кластерные комплексы высвобождаются и проникают в цитоплазму. Напротив, в случае инкубации клеток с 3-MIL-101-пуз красная люминесценция наблюдалась исключительно на поверхности клеток. По-видимому, это связано с неспособностью MIL-101-пуз проникать через клеточную мембрану, а также сильного связывания кластерных комплексов с металлоорганическим координационным полимером.

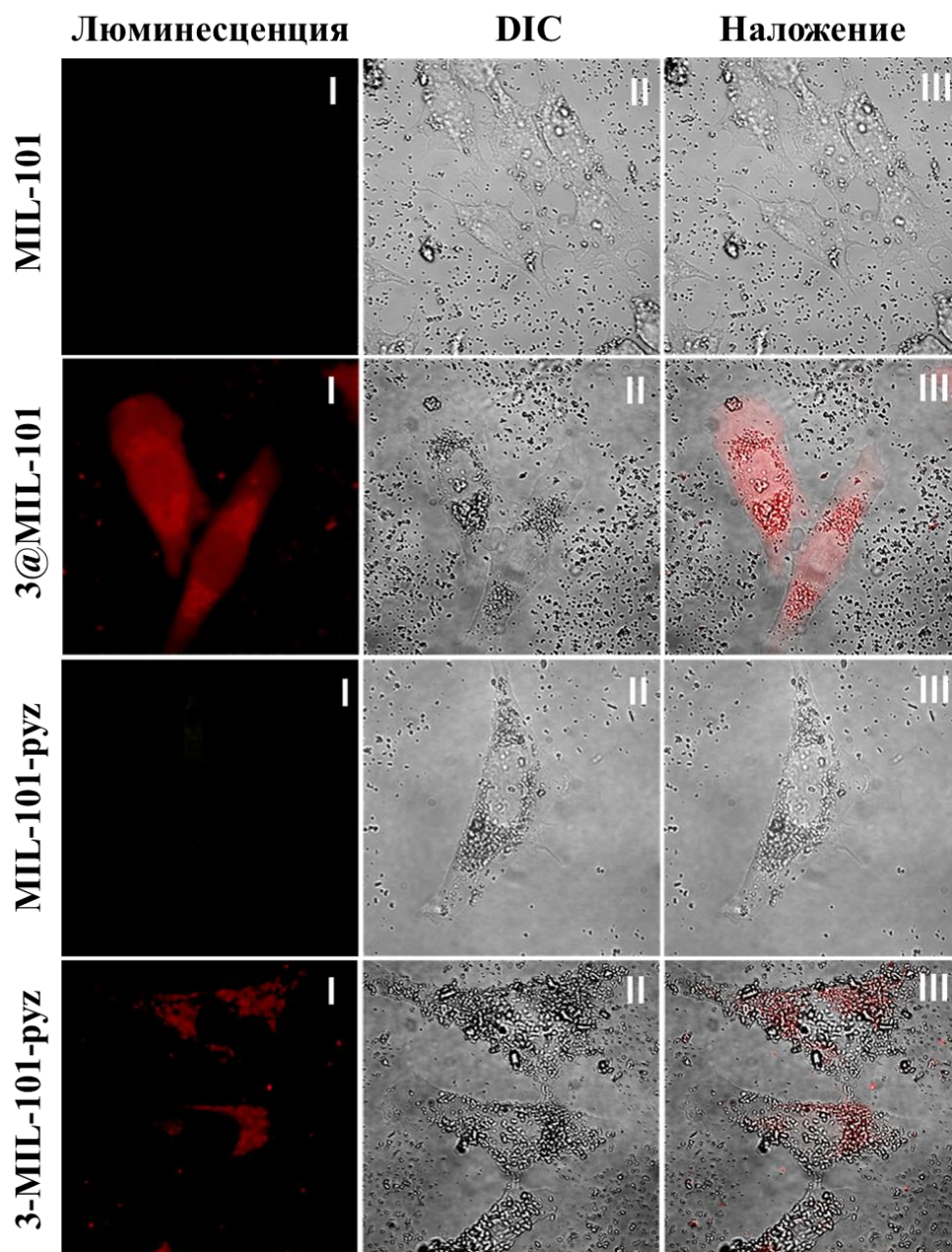


Рис. 15. Изображения клеток линии Нер-2 после инкубации с материалами, полученные с помощью метода КЛСМ (DIC - *Differential interference contrast*).

3.1.7. Генерация АФК в живых клетках

Как было показано в главе 3.1.4., кластер-содержащие материалы 3@MIL-101 и 3-MIL-101-pyz способны генерировать синглетный кислород. Поскольку метод фотодинамической терапии (ФДТ) основан на генерации люминофорами различных видов активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный кислород $^1\text{O}_2$, который считается основным цитотоксическим агентом в ФДТ и индуцирует апоптоз опухолевых клеток, следующий этап исследования материалов заключался в детектировании и количественном определении уровня генерации АФК внутри клеток Нер-2, инкубированных с 3@MIL-101. Для проведения исследования был выбран именно 3@MIL-101, т.к. только в случае этого материала наблюдалось проникновение кластерного комплекса в цитоплазму

клетки. Для детектирования наличия внутриклеточных АФК использовали 5,6-карбокси-2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (**DCFH-DA**), чувствительный к окислению различными АФК, включая $^1\text{O}_2$. При окислении DCFH-DA переходит в флуоресцентную форму, что можно отчетливо детектировать методами флуоресцентной микроскопии. Клетки, инкубированные в чистой питательной среде и в присутствии H_2O_2 , использовали как отрицательный и положительный контроль соответственно. Полученные данные демонстрируют, что в присутствии H_2O_2 наблюдается яркая флуоресценция DCFH-DA, соответствующая количеству АФК, которая не зависит от облучения. (Приложение, рис. П9) В тоже время, количество АФК в клетках, инкубированных в чистой питательной среде, пренебрежимо мал как до, так и после облучения. После облучения светом внутри клеток, инкубированных в присутствии **3@MIL-101**, наблюдается ярко-зеленая флуоресценцию, что указывает на высокое количество АФК (Приложение, рис. П10). Как можно видеть из рисунка 16, количество АФК возрастает при увеличении концентрации материала. Таким образом, эти данные подтверждают, что **3@MIL-101** способен генерировать АФК не только *in vitro* (см. главу 3.1.4), но также и в живых клетках.

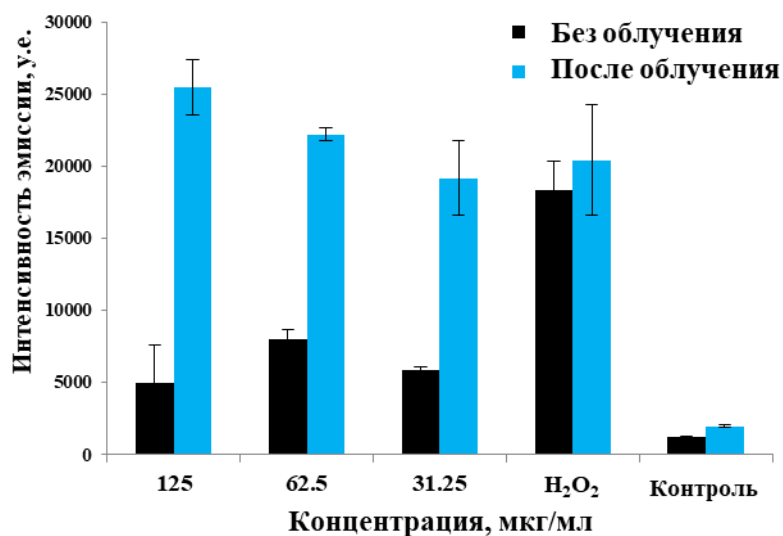


Рис. 16. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК внутри клеток Нер-2, инкубированных с **3@MIL-101**.

3.1.8. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

Таким образом, в ходе исследований было установлено, что кластерные комплексы, включенные в MIL-101, могут высвободиться из каркаса и проникать сквозь мембрану клеток Нер-2 в цитоплазму (рис. 15). В тоже время внутри клеток они способны генерировать АФК (рис. 16). Оба этих фактора играют решающую роль в использовании материала **3@MIL-101** в качестве агента для фотодинамической терапии. В данном случае, материал **3-MIL-101-ruz** можно было использовать в качестве отрицательного контроля,

поскольку комплекс в нем прочно связан с каркасом и, таким образом, не может проникать в клетки в свободной форме. Для проведения эксперимента клетки Нер-2 инкубировали с соединениями **3@MPL-101** и **3-MPL-101-puz**, а затем облучали светом с $\lambda \geq 400$ нм и оценивали количество жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток. Полученные результаты представлены на рисунке 17 и в Приложении, рис. П11.

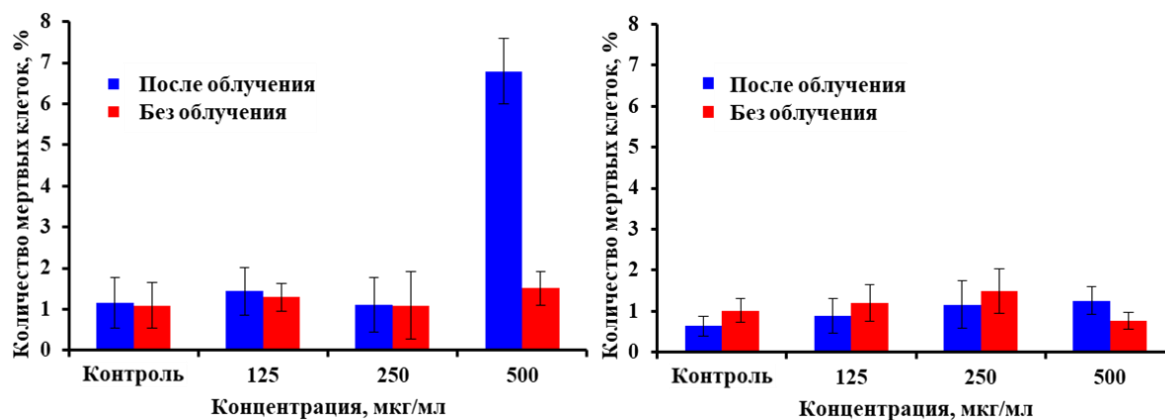


Рис. 17. Жизнеспособность клеток линии Нер-2, инкубированных с **3@MPL-101** (слева) и **3-MPL-101-puz** (справа), через 4 часа после облучения и выраженная в процентах мертвых клеток.

Было показано, что после облучения в случае клеток, инкубированных с **3@MPL-101** в концентрации 500 мкг/мл, наблюдается гибель $7 \pm 1,3\%$ клеток, тогда как ни в контрольной группе, ни в клетках, инкубированных с **3-MPL-101-puz**, мертвых клеток не было обнаружено. Таким образом, использование данного подхода перспективно для создания агентов для фотодинамической терапии, однако необходимо использовать кластерные комплексы с более высокими фотофизическими и фотосенсибилизационными показателями.

3.2. Материалы на основе полистиролсульфоната натрия (PSS)

3.2.1. Получение и характеристика материалов

Изучение материалов данного типа описана в работе [261]. Для получения водорастворимого материала, содержащего кластерный комплекс с ядром $\{Mo_6X_8\}^{4+}$, было предложено начать исследования с полистиролсульфоната натрия (PSS) (рис. 18), который является недорогой, лёгкой в приготовлении высокомолекулярной водорастворимой полимерной матрицей. Также известно, что он может образовывать связь с катионами металлов и положительно заряженными комплексами благодаря наличию большого количества сульфатных групп [272].

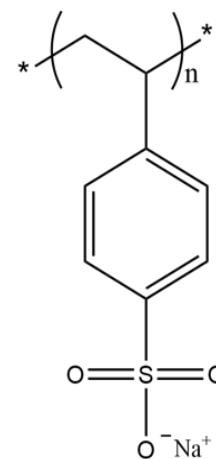


Рис. 18. Структура PSS

Наличие данных групп позволяет использовать PSS для лечения гиперкалиемии (аномально высокой концентрации калия в крови) [273].

Высокомолекулярный полимер PSS был получен путём свободнорадикальной полимеризации натриевой соли 4-стиролсульфоновой кислоты в водном растворе в присутствии инициатора полимеризации – персульфата аммония. Согласно элементному анализу в полученном полимере на один мономерный фрагмент приходится две молекулы воды. Молекулярную массу определили с помощью гель-проникающей хроматографии (ГПХ), и она составила 2,2 МДа.

Водорастворимый материал $n^x@PSS$ (где $x = 1, 5, 10$ или 100 – масса кластерного комплекса в миллиграммах на 100 мг исходного полимера) был получен путём пропитки полимера раствором кластерного комплекса **1**, **2** или **3** в ацетоне. После проведения реакции, осадки жёлтого цвета (бледно жёлтый, жёлтый и тёмно-жёлтый для $X = Cl, Br$ и I соответственно) были отделены от раствора путём центрифугирования, промыты ацетоном и этиловым спиртом от кластерного комплекса, несвязанного с полимером, и побочных продуктов ($NaNO_3$ и Bu_4NNO_3), а затем высушены. Исследования образцов методом электронной спектроскопии показали широкую полосу поглощения в области 270-450 нм, что подтверждает включение комплексов. (Приложение, рис. П12-П14)

Согласно данным ИК-спектроскопии (рис. 19, Приложение, рис. П15-П17), спектр материалов $n^x@PSS$ не содержит характерных колебаний NO_3^- -группы. Следовательно, можно сделать вывод, что все нитратные лиганды в ходе реакции были замещены на сульфо-группы и удалены из системы в виде $NaNO_3$ и Bu_4NNO_3 . Данные CHN/S анализа согласуются с результатами ИК-спектроскопии и подтверждают отсутствие азота в полученных материалах.

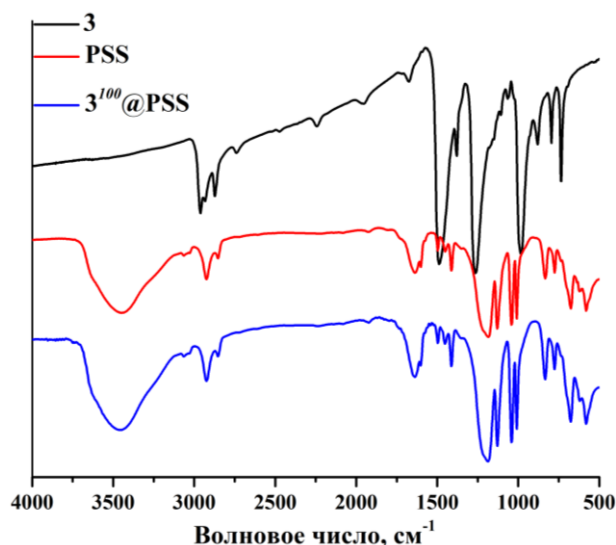


Рис. 19. ИК-спектры PSS, $3^{100}@PSS$ и исходного комплекса **3**.

С помощью метода ICP-AES было определено содержание молибдена и натрия в полученных материалах. Как и ожидалось, содержание молибдена увеличивается с увеличением значения x , в то время как содержание натрия уменьшается. На основе полученных данных был построен график зависимости содержания молибдена в массовых % от x (рис. 20, Приложение, рис. П18). Так же была построена теоретическая кривая содержания молибдена в полученных материалах при 100% включении кластерного комплекса.

Следует отметить, что содержание молибдена значительно меньше теоретического. Мы видим, что реальное содержание молибдена достигает определенного максимума и далее выходит на плато, что свидетельствует о предельном насыщении полимера. Для комплекса с Cl в кластерном ядре максимально достигаемое содержание молибдена равно 1,6%, для Br в кластерном ядре - 1,4%, для I в кластерном ядре - 1,9%. Все дальнейшие характеристики были проведены для образцов $n^{100}@PSS$.

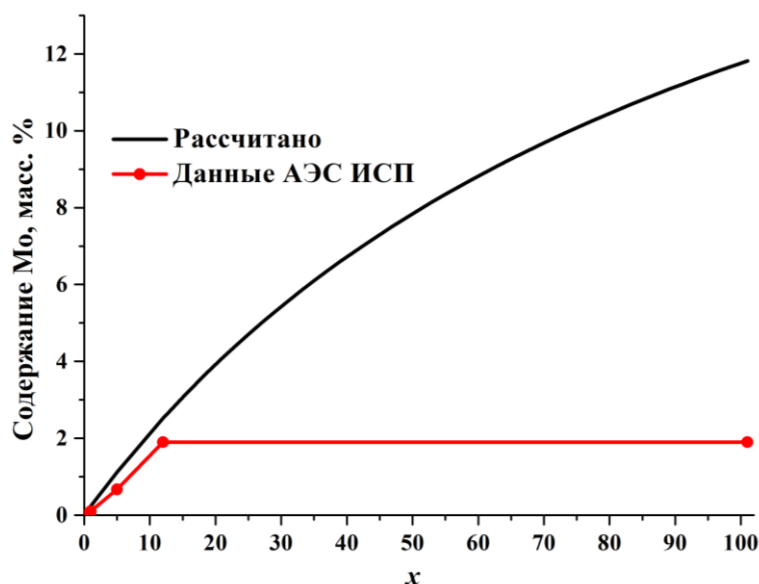


Рис. 20. Зависимость рассчитанного (чёрная линия) и реального (красная линия) содержания Mo от x (где $x = 1, 5, 10$ и 100) для $3^@PSS$.

Для того, чтобы оценить влияние включения кластерных комплексов в PSS на его гидродинамические свойства, мы сравнили данные ГПХ и вискозиметрии для водных растворов чистого PSS и $n^{100}@PSS$. Согласно данным ГПХ молекулярная масса гибридных материалов $n^{100}@PSS$ равна 1,9 МДа, что немного ниже, чем для чистого полимера. Снижение молекулярной массы хоть и является неожиданным, но может быть связано с тем, что в качестве стандартов был использован полиэтиленгликоль (PEG). С помощью данного стандарта можно определить лишь приблизительное значение молекулярной массы M_n . Кроме того, значение M_n в большой степени зависит от поведения гибридного полимера. Например, можно ожидать, что PSS, связанный с кластерным комплексом, может образовывать глобулы. Вязкость обоих растворов одинаковая и составляет $\eta_r = 3,7 -$

следовательно, исходный полимер и полученные материалы имеют схожую молекулярную массу.

3.2.2. Люминесцентные свойства

Как упоминалось ранее в главе 3.1.3., включение кластерных комплексов в матрицы с образованием ковалентных связей приводит к изменению лигандного окружения кластерного ядра и фотофизических характеристик. Для полученных материалов ($\mathbf{n}^{100}@PSS$) были подробно изучены люминесцентные свойства – записаны спектры эмиссии, определены значения абсолютного квантового выхода и времен жизни фотолюминесценции. Спектры эмиссии представлены на рисунке 21, а длины волн максимума эмиссии ($\lambda_{эм}$), значения абсолютных квантовых выходов ($\Phi_{эм}$) и времен жизни эмиссии ($\tau_{эм}$) приведены в таблице 4.

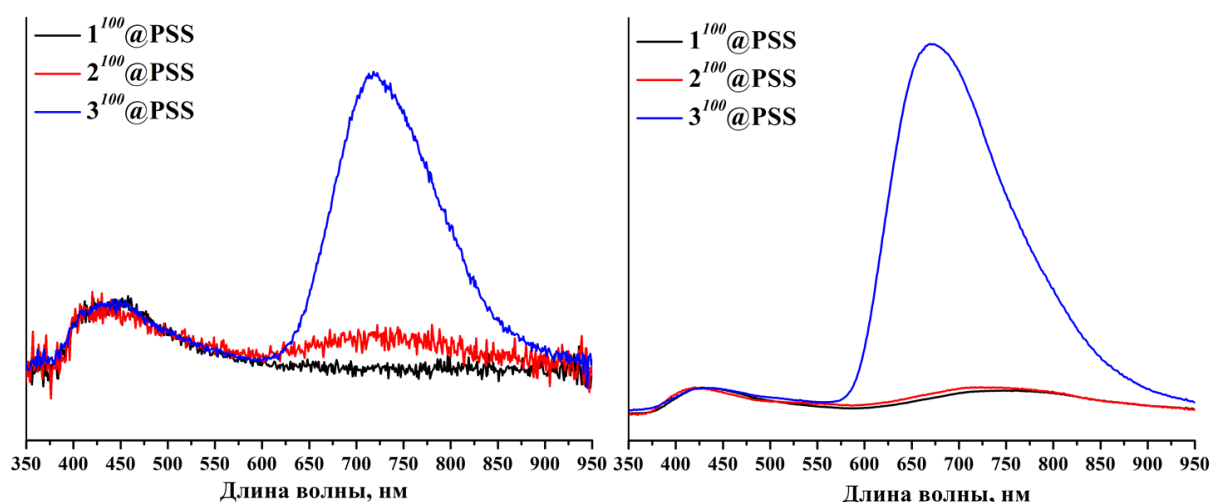


Рис. 21. Спектры люминесценции материалов $\mathbf{n}^{100}@PSS$ нормированные на эмиссию PSS: в порошке (слева) и в деаэрированном растворе (справа).

Т а б л и ц а 4

Фотофизические характеристики материалов $\mathbf{n}^{100}@PSS$

| | Порошок | | | Дегазированный водный раствор | | |
|------------------------|---------------------|---|-------------|-------------------------------|---|-------------|
| | $\lambda_{эм}$, нм | $\tau_{эм}$, мкс (А) | $\Phi_{эм}$ | $\lambda_{эм}$, нм | $\tau_{эм}$, мкс (А) | $\Phi_{эм}$ |
| $\mathbf{1}^{100}@PSS$ | 753 | $\tau_1 = 25$ (0,08) $\tau_2 = 3,5$ (0,31) $\tau_3 = 0,7$ (0,61) | 0,01 | - | - | - |
| $\mathbf{2}^{100}@PSS$ | 725 | $\tau_1 = 10,6$ (0,09) $\tau_2 = 1,3$ (0,24) $\tau_3 = 0,2$ (0,67) | 0,01 | - | - | - |
| $\mathbf{3}^{100}@PSS$ | 671 | $\tau_1 = 74,8$ (0,19) $\tau_2 = 30,8$ (0,38) $\tau_3 = 3,5$ (0,43) | 0,03 | 718 | $\tau_1 = 43,4$ (0,83) $\tau_2 = 8,1$ (0,17) | 0,01 |

На спектрах люминесценции наблюдаются два максимума эмиссии: ~ 430 нм и ~ 700 нм, которые соотносятся с собственной люминесценцией матрицы и люминесценцией кластерного комплекса соответственно. Отметим, что материалы $\mathbf{1}^{100}@PSS$ и $\mathbf{2}^{100}@PSS$ обладают гораздо более низкими значениями $\tau_{эм}$ и $\Phi_{эм}$ по сравнению с $\mathbf{3}^{100}@PSS$, в то время как значение $\lambda_{эм}$ увеличивается в ряду $Cl > Br > I$ (рис. 21, табл. 4, Приложение, рис. П19, П20). Данное поведение люминесцентных свойств уже было продемонстрировано в литературе на примере материалов на основе PS-SH [226, 227].

В случае аэрированных и деаэрированных растворов $\mathbf{1}^{100}@PSS$ и $\mathbf{2}^{100}@PSS$ определить фотофизические показатели не удалось, т.к., как упоминалось ранее, они не проявляют ярко выраженных люминесцентных свойств. Напротив, водный раствор $\mathbf{3}^{100}@PSS$ демонстрировал люминесценцию, видимую невооруженным глазом. Как и ожидалось, при насыщении раствора $\mathbf{3}^{100}@PSS$ аргоном наблюдался значительный рост интенсивности эмиссии и фотофизических показателей (рис. 21). Как и в случае материалов на основе MIL-101 тушение люминесценции вызвано взаимодействием триплетного кислорода с возбужденным кластерным комплексом.

В сравнении с исходными кластерными комплексами \mathbf{n} в твёрдом состоянии положение максимума эмиссии для твердых $\mathbf{n}^{100}@PSS$ сдвигается на 12 нм и 60 нм в коротковолновую область для $X = Cl$ и Br соответственно, в то время как для $X = I$ максимум сдвигается только на 5 нм в длинноволновую область. Такое поведение может быть объяснено изменением внешнего лигандного окружения кластерного комплекса, т.е. замещение нитратных лигандов на сульфонатные группы полимера и молекулы воды. Также стоит отметить, что времена жизни и квантовые выходы $\mathbf{n}^{100}@PSS$ значительно меньше, чем для известного кластерного комплекса молибдена с терминальными сульфонатными лигандами [234, 255]. Мы полагаем, что это связано с присутствием молекул воды в лигандном окружении кластерного ядра в материалах $\mathbf{n}^{100}@PSS$. Тушение фотолюминесценции аквалигандами происходит посредством безызлучательных релаксаций. Данные релаксации связаны с О-Н вибрациями, что хорошо описано в литературе [204, 274].

3.2.3. Жизнеспособность клеток и клеточное проникновение

Влияние чистого PSS и материалов $\mathbf{n}^{100}@PSS$ на жизнеспособность клеток линии Нер-2 и HeLa было оценено с помощью МТТ – теста в диапазоне концентраций 3,2-3300 мкг/мл (рис. 22). Как и ожидалось, PSS проявляет очень низкую токсичность во всём диапазоне исследуемых концентраций. $\mathbf{1}^{100}@PSS$ также проявляет относительно низкую токсичность, поэтому значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) не было достигнуто в исследованном диапазоне концентраций в случае обоих клеточных

линий. Напротив, материалы, содержащие более «тяжёлые» кластерные комплексы, являются более токсичными для клеток линии HeLa и значения IC_{50} составили 1300 ± 300 мкг/мл ($X = Br$) и 370 ± 80 мкг/мл ($X = I$).

По данным КЛСМ было установлено, что материалы на основе PSS не проникают в клетки обоих типов. Поскольку чувствительность метода проточной цитометрии значительно выше, чем конфокальной микроскопии [275], материалы также были исследованы данным методом (рис. 22). Было показано, что интенсивность люминесценции клеток линии HeLa, инкубированных с материалами $2^{100}@PSS$ и $3^{100}@PSS$, действительно увеличивается, но незначительно. В случае же клеток Нер-2 интенсивность люминесценции значительно увеличивалась после инкубации с $3^{100}@PSS$. (рис. 22) Таким образом, можно заключить, что материалы $2^{100}@PSS$ и $3^{100}@PSS$ проникают в клетки HeLa в незначительных количествах, в то время как проникновение $3^{100}@PSS$ достигает заметных значений.

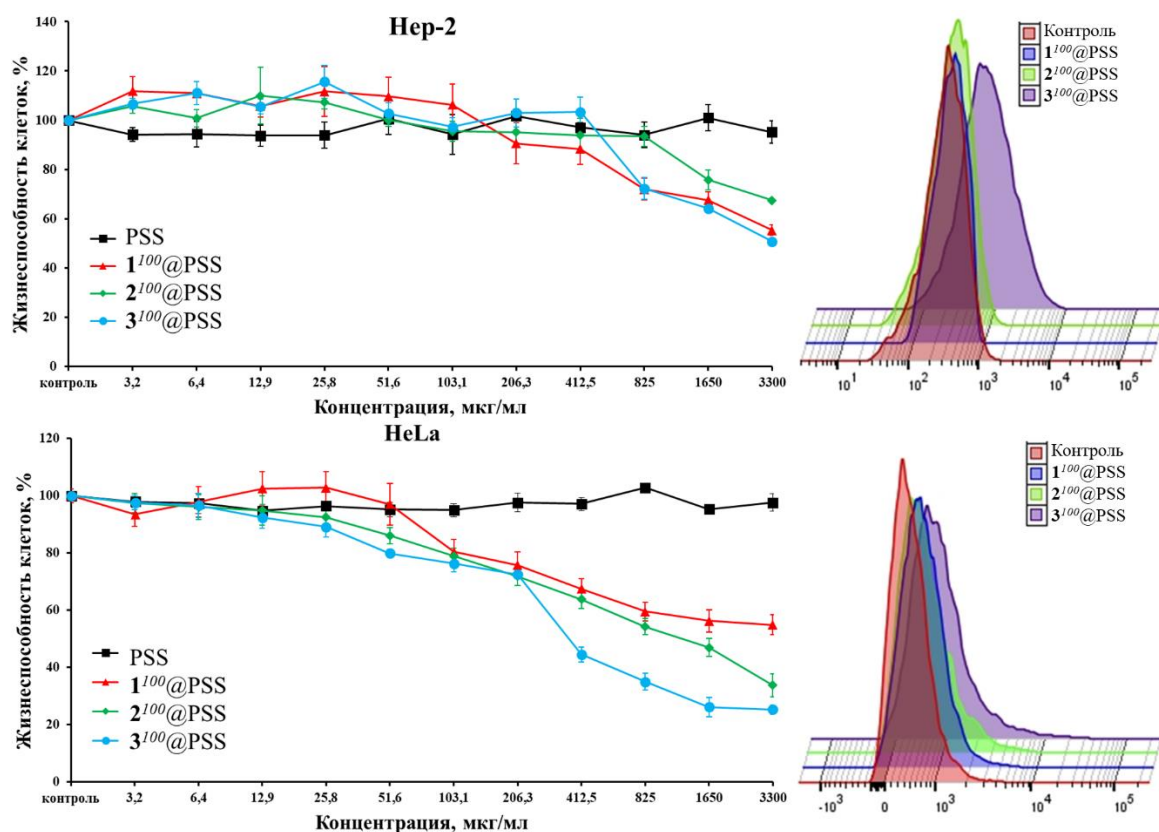


Рис. 22. Влияние PSS и $n^{100}@PSS$ на жизнеспособность клеток и клеточное проникновение $n^{100}@PSS$ (Нер-2 – верхний ряд, HeLa – нижний ряд).

3.2.4. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

По данным проточной цитометрии (см. главу 3.2.3) некоторые материалы проникают в клетки, поэтому для них была оценена фотоиндуцированная цитотоксичность *in vitro* на клетках линии Нер-2 и HeLa, в диапазоне нетоксичных концентраций 3,2–51,6 мкг/мл (рис. 23). Согласно полученным данным, материалы $2^{100}@PSS$ и $3^{100}@PSS$ проявляют незначительную фотоиндуцированную цитотоксичность по отношению к клеткам HeLa:

при самых высоких концентрациях (51,6 мкг/мл) процент живых клеток после облучения в течение 30 минут ($\lambda > 400$ нм) составил $\sim 70\%$ для $2^{100}@PSS$ и $\sim 62\%$ для $3^{100}@PSS$. $1^{100}@PSS$, в свою очередь, не проявляет фототоксического эффекта, что, вероятно, связано со слабовыраженными люминесцентными свойствами материала.

Удивительно, но в случае клеток линии Нер-2 даже $3^{100}@PSS$ (который, как было указано выше, хорошо проникает в клетки данной линии) не показал какой-либо заметной фотоиндуцированной цитотоксичности. Данное наблюдение, наряду с заметно более высокими значениями IC_{50} для всех материалов в случае темновой токсичности, явно демонстрируют более высокую устойчивость клеток Нер-2 к внешним воздействиям по сравнению с клетками HeLa.

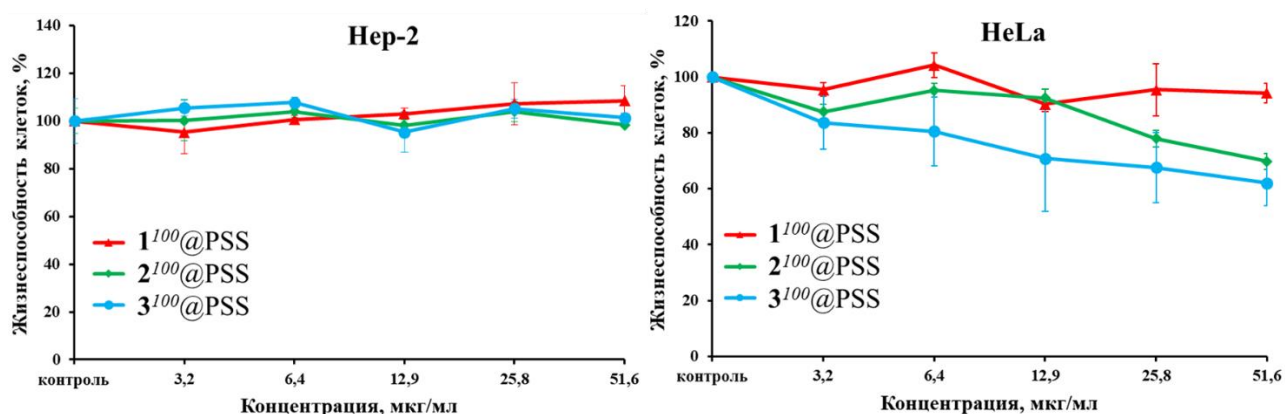


Рис. 23. Жизнеспособность клеток, инкубированных с $n^{100}@PSS$, после облучения светом.

3.3. Материалы на основе SiO_2

3.3.1. Микрочастицы

3.3.1.1. Синтез микрочастиц

Изучение материалов данного типа описано в работе [262]. Большой ряд микрочастиц диоксида кремния, допированных кластерными комплексами молибдена, $n^x@SiO_2$ MPs (где n соответствует комплексам **1**, **2** или **3**, x – загрузка **1-3** в граммах на 1 г получаемого SiO_2) был получен аммиачным гидролизом ТЭОС (т.е. по методу Штобера) в присутствии различных количеств соответствующих комплексов. В частности, загрузки кластерных комплексов (x) составляли от 0,0001 до 5 г на 1 г получаемого SiO_2 . Стоит отметить, что в случае комплекса **1** его количество было ограничено $x = 0,5$. Ограничение обусловлено тем, что материалы $1^x@SiO_2$ MPs при $x \geq 0,5$ окрашивались в серовато-синий цвет, в то время как цвет других MPs варьировался от желтого до красного в зависимости от типа и количества комплекса.

Рассмотрим более подробно некоторые химические процессы и взаимодействия, которые могут реализовываться в процессе получения данных материалов:

(i) Гидролиз комплексов. Поскольку внешние нитратные лиганды комплексов являются высоко лабильными, стоит ожидать, что в щелочных растворах они могут быть легко замещены на OH^- или H_2O . Иными словами, наряду с гидролизом ТЭОС возможно параллельное протекание процесса гидролиза **1-3** с образованием соответствующих аквагидроксо комплексов. Действительно, в работах *Sheldon* и др. демонстрируется, что повышение рН водного раствора $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}\text{X}_6]^{2-}$ приводит к замещению всех внешних лигандов X на OH^- и H_2O , с образованием осадков, которые описываются общей формулой $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot z\text{H}_2\text{O}$ ($\text{X} = \text{Cl}$ (**4**· $z\text{H}_2\text{O}$), Br (**5**· $z\text{H}_2\text{O}$) и I (**6**· $z\text{H}_2\text{O}$)) [276, 277]. Также в данных работах было продемонстрировано существование растворимых гексагидроксо комплексов $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{OH})_6]^{2-}$, которые существуют только в сильнощелочных водных растворах [277, 278]. Аналогичным получению материалов образом, т.е. посредством смешивания разбавленного водного раствора $(\text{H}_3\text{O})_2[\{\text{Mo}_6\text{Cl}_8\}\text{Cl}_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ с водным раствором аммиака, был получен нейтральный аквагидроксо комплекс **4**· $12\text{H}_2\text{O}$, кристаллическая структура которого была определена методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [279]. Кроме того, предполагается, что в растворах могут сосуществовать промежуточные частично гидролизованные формы комплекса [280-282].

(ii) Образование водородных связей. Как было упомянуто в предыдущем пункте, в процессе получения материалов происходит гидролиз комплексов. Данный факт позволяет предположить, что аква- и гидроксо-лиганды способны образовывать водородные связи с группами $-\text{Si}-\text{OH}$. (рис. 24)

(iii) Образование ковалентных связей Si-O-Mo. Образование ковалентных связей между матрицей SiO_2 и кластерными комплексами молибдена было описано в работе *Aubert u др.* [239] Данный тип взаимодействий может реализоваться посредством замещения внешних лигандов комплексов на депротонированные группы $-\text{Si}-\text{O}^-$, которые образуются за счет ионизации групп $-\text{Si}-\text{OH}$ в щелочных средах. (рис. 24) Принимая во внимание образование как водородных, так и ковалентных связей, состав кластерных комплексов в матрице можно выразить общей формулой $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{H}_2\text{O})_{6-y-z}(\text{OH})_y(\text{OSi})_z]_{4-y-z}$. Более того, при увеличении количества комплекса, z , вероятно, будет стремиться к 0, т.е. преимущественно будет образовываться аквагидроксо комплекс.

(iv) Разрушение кластерных комплексов. *Sheldon* в своей ранней работе отметил, что $\text{Mo}(\text{II})$ в соединении $\text{Mo}_6\text{Cl}_{12}$ способен окисляться в щелочных растворах до $\text{Mo}(\text{V})$. Как упоминалось выше, при попытках получить материал на основе **1** с загрузкой комплекса больше 0,5 наблюдалось образование серовато-синего осадка. Это наблюдение можно объяснить разрушением кластерного ядра в результате гидролиза, с образованием

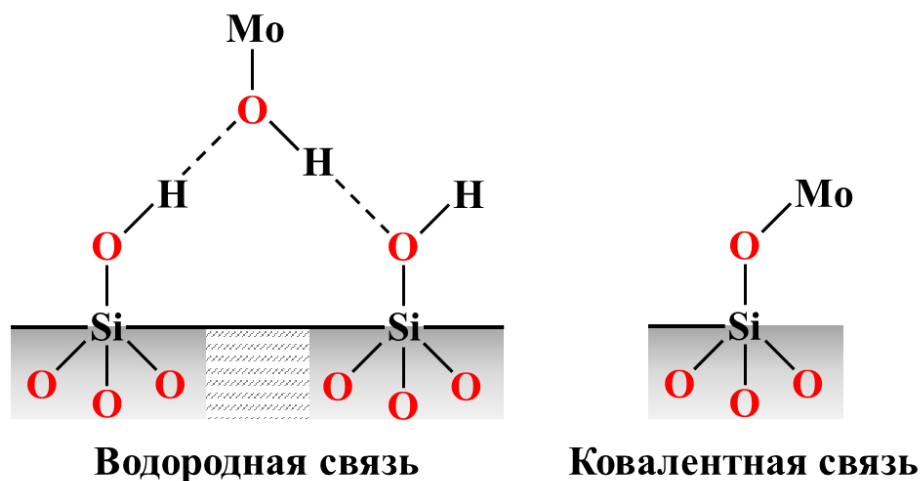


Рис. 24. Возможные типы взаимодействия между матрицей SiO_2 и кластерным комплексом.

форм $[\{\text{Mo}_6\text{Cl}_{8-y}(\text{OH})_y\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]$ [280, 281] и их последующим окислением до молибденовой сини (т.е. полиоксомолибдатов).

Для того, чтобы лучше понять процессы, проходящие при аммиачном гидролизе комплексов **1-3**, мы смоделировали условия метода Штобера без добавления ТЭОСа в реакционную смесь. После добавления в растворы **1-3** в ацетоне водного раствора аммиака наблюдалось количественное образование окрашенных осадков. Для дальнейшей характеристики осадки выделяли из реакционных смесей через 12 часов (**An**) и после полного испарения растворителя на воздухе (**Vn**) (n относится к исходным комплексам **1-3**).

3.3.1.2. Состав материалов и химическая структура

Для того, чтобы установить, действительно ли в процессе получения материалов реализуются вышеупомянутые химические процессы и взаимодействия, МРs и осадки **An** и **Vn** были охарактеризованы различными методами анализа. На ИК-спектрах всех полученных МРs не наблюдалось колебаний как NO_3 -групп, так и катионов тетрабутиламмония. (Приложение, рис. П21-П23) Аналогичным образом, элементный анализ CHN не показал наличия азота и углерода в материалах. Изучение осадков **An** и **Vn** теми же методами также показало удаление катионов Bu_4N^+ и нитратных лигандов в реакциях гидролиза **1-3**. (Приложение, рис. П24-П26) Совокупность полученных данных подтверждает предположение о том, что комплексы **1-3** полностью гидролизуются в процессе получения материалов.

Осадки **An** и **Vn** также были подробно изучены с помощью РФА и термogrавиметрического анализа (ТГА). Дифрактограммы и кривые ТГ приведены в Приложении, рис. П27-П32. На дифрактограммах осадков **A1** и **A2** можно наблюдать уширенные пики (гало) с максимумами около $12,3^\circ$ и $11,7^\circ$, соответственно. Для осадка **A3** также

наблюдается пик гало и несколько уширенных пиков с острыми вершинами на $11,4^\circ$, $12,2^\circ$ и $13,4^\circ$. Мы обнаружили, что эти пики совпадают с пиками на теоретической дифрактограмме фазы $[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [258], что говорит об образовании фазы аквагидроксо комплекса с низкой кристалличностью. Потерю массы осадков **An** изучали при помощи ТГА в интервале температур 60°C – 200°C . В случае всех образцов процент потери массы хорошо коррелирует с удалением двух кристаллизационных и двух координированных молекул воды из $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ с образованием ранее известных соединений $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{OH})_4]$ [277, 278]. В совокупности полученные данные показывают, что при гидролизе **1-3** раствором аммиака наблюдается образование аморфных или низкокристаллических фаз $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (осадки **An**).

На дифрактограммах осадков **Vn** наблюдается более кристаллические фазы по сравнению с осадками **An**. Мы полагаем, что данный эффект связан с химическим "старением" порошков. В случае осадка **V1** мы обнаружили два слабых пика на $10,5^\circ$ и $11,7^\circ$, что соответствует теоретической дифракционной картине кристаллической фазы $[\{\text{Mo}_6\text{Cl}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) [279], и пик гало, аналогичный осадку **A1**. Стоит отметить, что при старении наблюдается изменение цвета осадка **V1**, что, по-видимому, связано с образованием молибденовой сини. Результаты ТГА подтвердили, что осадок **V1** состоит в основном из аморфной фазы $4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, тогда как содержание $4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ было ниже предела обнаружения анализа.

На дифрактограммах осадков **V2** можно заметить сосуществование двух фаз: аморфной и кристаллической, причем количество кристаллической фазы гораздо больше, чем в случае **V1**. Профиль аморфной фазы соответствует профилю **A2**, в то время как острые пики совпадают с теоретической дифракционной картиной кристаллического $[\{\text{Mo}_6\text{Br}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($5 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), который является изоструктурным $4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Об образовании кристаллической фазы также свидетельствует несколько кристаллов на стенках виал, которые были пригодны для рентгеноструктурного анализа. РСА достоверно подтвердил, что кристаллическая фаза в осадке **V2** соответствует фазе $5 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Приложение, табл. П1). Результат ТГА **V2** показал потерю шести молекул воды, что означает, что осадок состоит из механической смеси трех эквивалентов $5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и двух эквивалентов $5 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

В свою очередь на дифрактограмме **V3** наблюдается одна фаза, обладающая высокой кристалличностью и хорошо совпадающая с теоретической дифрактограммой $6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Результат ТГА осадка **V3** также подтвердил состав соединения – $6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Аналогично **V2** на стенах виалы было обнаружено несколько кристаллов, пригодных для РСА.

Удивительным оказался тот факт, что их кристаллическая структура соответствовала соединению $6 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, которое имеет иную дифрактограмму. Принимая во внимание данные, полученные с помощью РФА и ТГА, мы предположили, что большая часть осадка В3 состоит из кристаллической фазы $6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ с примесной фазой кристаллического $6 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Стоит отметить, что содержание примесной фазы было ниже предела обнаружения обоих методов.

Совокупность полученных данных свидетельствуют о том, что аммиачный гидролиз соединений 1-3 происходит путем быстрого образования метастабильной аморфной фазы $n \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. "Старение" этих фаз в водных средах приводит к их перекристаллизации с получением более стабильных кристаллических фаз $n \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ или $n \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

На порошковых дифрактограммах чистых МРs и $n^x @ \text{SiO}_2$ МРs с $x \leq 0,1$ (рис. 25, Приложение, рис. П33-П34) наблюдаются типичные пики гало на 22° , соответствующие аморфному SiO_2 [283, 284]. Увеличение количества кластерного комплекса в частицах выше $x = 0,1$, в случае $n = 2$ или 3, приводит к уменьшению интенсивности, сужению пика гало и появлению новых узких пиков, аналогичным обнаруженным в дифрактограммах осадков А2 и В3 соответственно. В случае $2^x @ \text{SiO}_2$ сужение пика было отнесено к образованию аморфной фазы $5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Напротив, на дифрактограммах $3^x @ \text{SiO}_2$ ($x \geq 1$) отчетливо наблюдалось образование кристаллической фазы $6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 25).

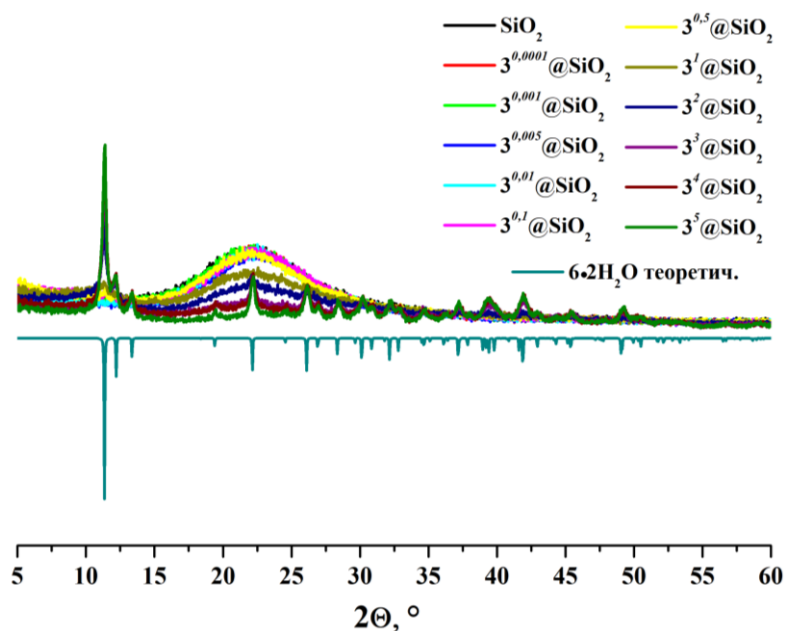


Рис. 25. Порошковая дифрактограмма чистых SiO_2 и $n^x @ \text{SiO}_2$ МРs.

Изучение дифракции электронов в выбранной области для образцов $3^x @ \text{SiO}_2$ ($x = 0,05, 0,5$ и 5) (рис. 26) дополнительно подтвердило, что образцы с низким содержанием 3 являются аморфными. В тоже время при повышении количества комплекса наблюдается рост кристаллическости образцов.



Рис. 26. Дифракция электронов в выбранной области для образцов $3^x@SiO_2$ ($x = 0,05, 0,5$ и 5).

Совокупность полученных данных подтверждает предположение, упомянутое в главе 3.3.1. – при увеличении загрузки комплекса выше $x = 0,1$, значение z в формуле $[\{Mo_6X_8\}(H_2O)_{6-y-z}(OH)_y(OSi)_z]_{4-y-z}$ стремится к нулю.

Образец $3^{0,1}@SiO_2$ был изучен с помощью ^{29}Si CP MAS ЯМР спектроскопии (Cross Polarization Magic Angle Spinning NMR). На полученном спектре наблюдалось два заметных изменения в сравнении со спектром чистых SiO_2 MPs (рис. 27): сдвиг сигнала Q3 (т.е. Si-OH) примерно на 2 ppm и увеличение соотношения Q4/Q3. Сдвиг сигнала Q3 объясняется изменением окружения кремния, что свидетельствует об образовании водородных связей между Si-OH и Mo-OH или Mo-OH₂. В тоже время увеличение интенсивности сигнала Q4, вероятно, является результатом образования ковалентных связей Si-O-Mo, что согласуется с известными данными [285-287].

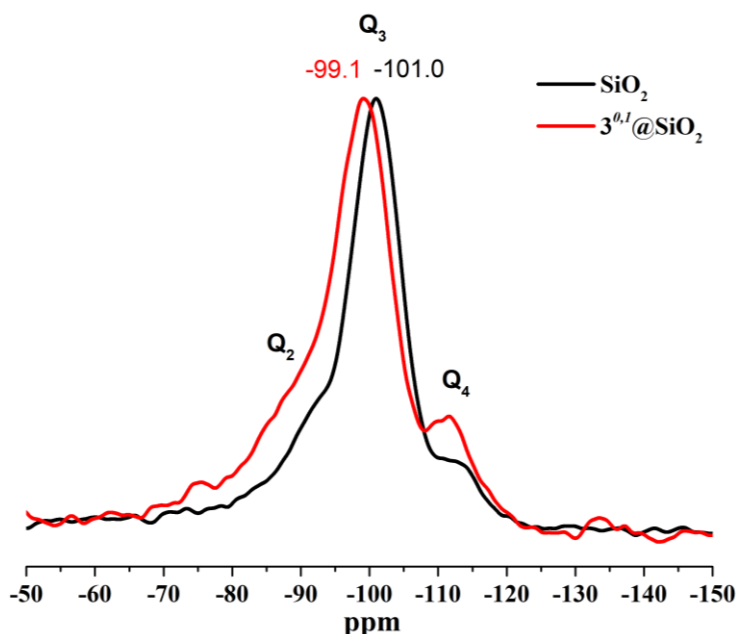


Рис. 27. ^{29}Si CP MAS ЯМР-спектры чистых SiO_2 и $3^{0,1}@SiO_2$ MPs.

Спектры диффузного отражения в преобразовании Кубелки-Мунка для микрочастиц (Приложение, рис. П35-П37) продемонстрировали усиление оптического поглощения в видимой области в случае частиц, допированных комплексами, по сравнению с чистыми

SiO₂ MPs. Отметим, что в спектрах образцов В1 и 1^x@SiO₂ (где $x \geq 0,5$) наблюдалось поглощение в красной области (> 600 нм). Это поглощение связано с образованием молибденовой сини, как было упомянуто выше [288, 289]. Точное массовое содержание (мас. %) молибдена в MPs было определено методом ICP-AES. На основе полученных данных был построен график зависимости содержания молибдена в массовых % от x . (рис. 28) Так же были построены теоретические кривые содержания молибдена в полученных материалах при 100% включении кластерных комплексов 1-3 в виде $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ при 100% гидролизе ТЭОСа. Можно заметить, что содержание молибдена в MPs было несколько ниже теоретического. По данным TGA, это несоответствие, вероятно, является результатом присутствия в образцах 4-5% воды, которые сказываются на общей массе и не учитываются в расчётных кривых (Приложение, рис. П38-П40).

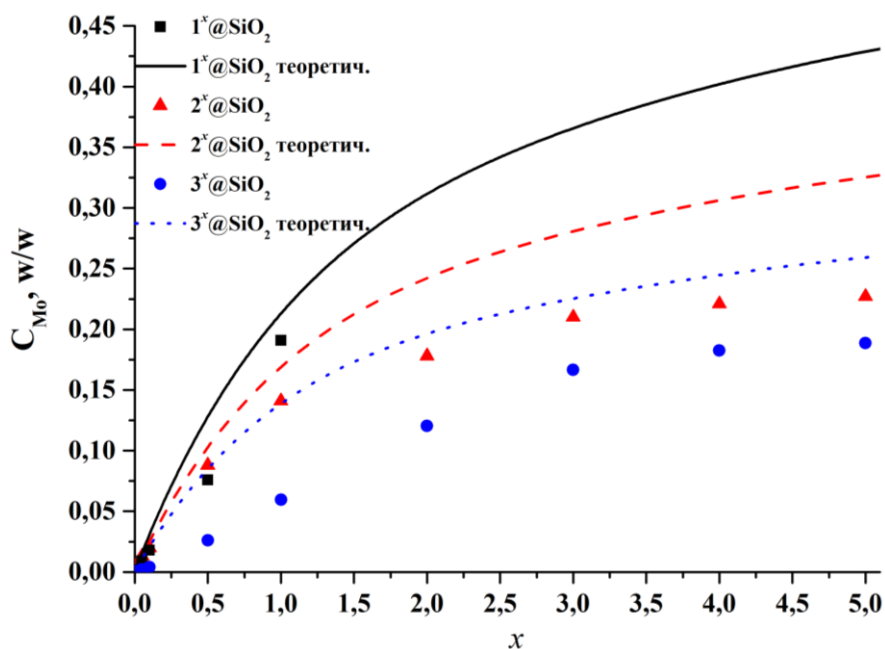


Рис. 28. Зависимость рассчитанного и реального содержания Мо от x (где $x = 1, 5, 10$ и 100) для 3^x@SiO₂.

3.3.1.3. Морфология материалов

Форма и морфология всех полученных MPs была изучена с помощью ПЭМ. (рис. 29, Приложение, рис. П41-43) Серия образцов 3^x@SiO₂ также была изучена методом СЭМ (сканирующая электронная микроскопия). (рис. 29, Приложение, рис. П44) Полученные изображения показали, что как чистые SiO₂, так и n^x@SiO₂ с содержанием комплекса до $x = 0,1$ имеют практически идеальную сферическую форму и диаметр ~ 500 нм. Увеличение загрузки комплексов выше $x = 0,1$ приводит к искажению сферической формы частиц, а при $x \geq 0,5$ наблюдается образование крупных частиц неправильной формы. (рис. 29)

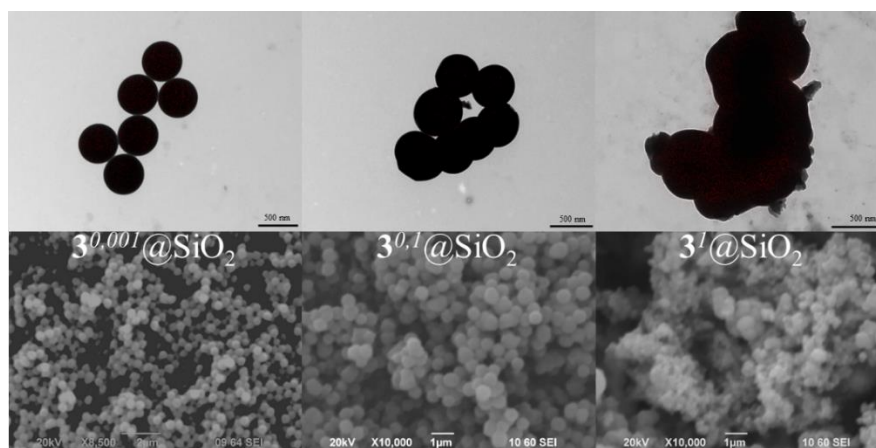


Рис. 29. Изображения $Zr^x@SiO_2$ MPs ($x = 0,001, 0,1$ и 1), полученные с помощью ПЭМ (верхний ряд) и СЭМ (нижний ряд).

Также было исследовано распределение кластерного комплекса внутри MPs с использованием метода спектроскопии характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ). На рисунке П43 приведены полученные изображения MPs, на которых распределение молибдена в образце изображено красными точками. Можно заметить, что кластерный комплекс однородно распределен по всему объему частицы. Изображения, полученные с помощью КЛСМ, также показали равномерное распределение эмиссии по объему образцов. (Приложение, рис. П45)

3.3.1.4. Люминесцентные свойства

Поскольку, как было показано ранее, внешние нитратные лиганды кластерных комплексов **1-3** замещаются в процессе получения материалов, необходимо было понять, как включение комплекса в матрицу влияет на его люминесцентные свойства. Например, в более ранних работах по включению $Cs_2[\{Mo_6X_8\}X_6]$ и $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(CF_3CO_2)_6]$ в матрицу SiO_2 показали, что для материалов наблюдается снижение интенсивности эмиссии, а положения максимумов эмиссии несколько смещаются относительно спектров исходных комплексов. Также, значения времен жизни эмиссии для материалов были ниже, а значения квантовых выходов не были определены [238, 239, 257].

Фотофизические характеристики были исследованы для порошковых образцов $n^x@SiO_2$. Спектры эмиссии приведены на рисунке 30 и в Приложении, рис. П46-П47, а длины волн максимума эмиссии ($\lambda_{эм}$), значения абсолютных квантовых выходов ($\Phi_{эм}$) и времен жизни эмиссии ($\tau_{эм}$) приведены в Приложении, табл. П2. Для сравнения в таблице П2 также приведены фотофизические характеристики ($\lambda_{эм}$, $\tau_{эм}$ и $\Phi_{эм}$) **1-3**. Полученные данные показывают, что люминесцентные свойства материалов значительно отличаются от свойств исходных соединений **1-3**. (Приложение, рис. П48-П49, табл. П3) Для образцов $1^x@SiO_2$ и $2^x@SiO_2$ наблюдается батохромный сдвиг максимума эмиссии на ~ 60 и ~ 85 нм

соответственно. В случае же $3^x@SiO_2$ напротив наблюдается гипсохромный сдвиг на ~ 35 нм. Более того, увеличение загрузки комплекса, независимо от состава кластерного ядра, приводит к постепенному батохромному сдвигу максимумов эмиссии для всех образцов. (Приложение, табл. П2) Эти сдвиги обусловлены изменением лигандного окружения исходных комплексов – от $(NO_3)_6$ до $(H_2O)_{6-y-z}(OH)_y(OSi)_z$, где z зависит от соотношения $n/TЭОС$ в реакционной смеси (чем выше количество комплекса, тем ниже z).

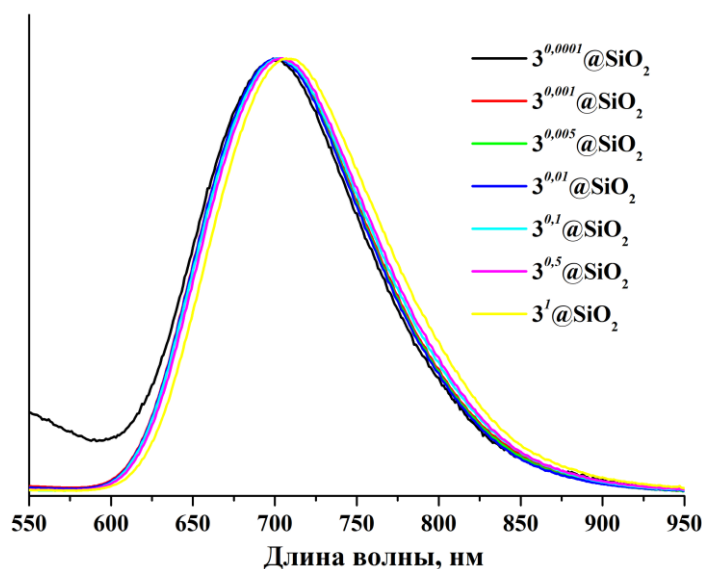


Рис. 30. Нормированные спектры эмиссии образцов $3^x@SiO_2$.

Помимо сдвигов максимумов эмиссии, значения времен жизни и квантовых выходов также меняются. Отметим, что $\Phi_{эм}$ для соединения **3** значительно выше, чем для **1** и **2**. Аналогичная картина наблюдалась и в случае материалов: $\Phi_{эм}$ $3^x@SiO_2$ (вплоть до 0,09) значительно выше, чем у $1^x@SiO_2$ и $2^x@SiO_2$ ($< 0,01$).

Детальное исследование квантовых выходов большой серии $3^x@SiO_2$ с маленьким шагом увеличения x показало, что для $\Phi_{эм}$ наблюдается тенденция сначала к постепенному увеличению, а затем к уменьшению значений при увеличении концентрации комплекса. (Приложение, табл. П4) В частности, для материалов $3^x@SiO_2$, в случае, когда x находится в диапазоне 0,0002-0,002, наблюдаются самые высокие значения $\Phi_{эм}$ – вплоть до 0,09. В тоже время, дальнейшее увеличение x приводит к плавному снижению $\Phi_{эм}$ до 0,01. Предположительно, такое уменьшение значений квантового выхода связано с образованием кристаллитов аквагидроксо комплекса $6 \cdot 2H_2O$ в $3^x@SiO_2$ при $x > 0,002$. Стоит отметить, что при очень низких загрузках комплекса ($x < 0,0002$), также наблюдается очень низкие значения квантовых выходов, что, вероятно, связано с включением незначительных количеств комплекса в матрицу.

Для оценки влияния образования аквагидроксо комплексов в частицах на фотофизические характеристики материалов мы также исследовали люминесцентные свойства

соединений **An** и **Bn**. **A1-A2** и **B1-B2** продемонстрировали типичную для октаэдрических кластерных комплексов молибдена люминесценцию в широком диапазоне длин волн. Удивительным оказался тот факт, что **A3** и **B3** вообще не проявляют детектируемой эмиссии, в то время как материалы на основе **3** являются наиболее люминесцентными. (Приложение, рис. П50-П51, табл. П3) Из полученных данных можно видеть, что максимумы эмиссии **A1** и **B1** находятся на 745 нм, а значения $\Phi_{эм}$ составляют менее 0,01. В тоже время интенсивность люминесценции **A2** и **B2** оказалась значительно выше в сравнении с остальными соединениями, максимумы эмиссии у них различны и находятся на 715 и 705 нм, а значения квантовых выходов составляют 0,01 и 0,02 соответственно. Эти расхождения между двумя химически подобными соединениями можно объяснить либо влиянием молекул кристаллизационной воды на свойства люминесценции, либо влиянием состава и кристалличности образцов (**A2** – аморфный $5 \cdot 2H_2O$ и **B2** – смесь аморфного $5 \cdot 2H_2O$ и кристаллического $5 \cdot 12H_2O$).

Таким образом, низкие фотофизические свойства как **1** и **2**, так и аквагидроксо комплексов **A1-A2** и **B1-B2** объясняют практически полное отсутствие люминесценции материалов $1^x@SiO_2$ и $2^x@SiO_2$. Аналогично, отсутствие фотолюминесценции $6 \cdot 2H_2O$ (**A3** и **B3**) хорошо объясняет уменьшение значений как $\Phi_{эм}$, так и $\tau_{эм}$ материалов $3^x@SiO_2$ при $x \geq 0,002$. Тем не менее, существует диапазон концентраций $0,0002 < x < 0,002$, в котором влияние форм аквагидроксо комплекса достаточно мало и наблюдается достаточно интенсивная эмиссия материалов.

3.3.1.5. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода

Как упоминалось ранее, люминесценция кластерных комплексов **1-3** эффективно гасится молекулярным кислородом. Для количественного определения синглетного кислорода использовалась методика, описанная в главе 3.1.4. Таким образом, концентрация этиленгликоль дибензоата и рассчитанная конверсия 2,3-дифенил-*para*-диоксена после облучения светом приведены в Приложении, табл. П5. Фрагменты 1H ЯМР спектров представлены в Приложении, рис. П52. Согласно полученным данным, комплекс **3**, который, как было показано в главе 3.3.1.4., проявляет наиболее ярко-выраженные люминесцентные свойства, является также наиболее эффективным фотосенсибилизатором и степень конверсии для него составила 16 %.

Также были исследованы фотосенсибилизационные свойства $3^x@SiO_2$ MPs. На рисунке 31 приведены графики конверсии 2,3-дифенил-*para*-диоксена в присутствии девяти образцов $3^x@SiO_2$ с различным x в зависимости от времени облучения. Согласно полученным данным, увеличение времени облучения приводило к постепенному увеличению

конверсии ловушки. Также можно заметить, что образцы с более высоким содержанием комплекса ($x = 0,05$ и $0,1$), проявляют несколько большую эффективность. Максимальная степень конверсии составила $\sim 3,5\%$.

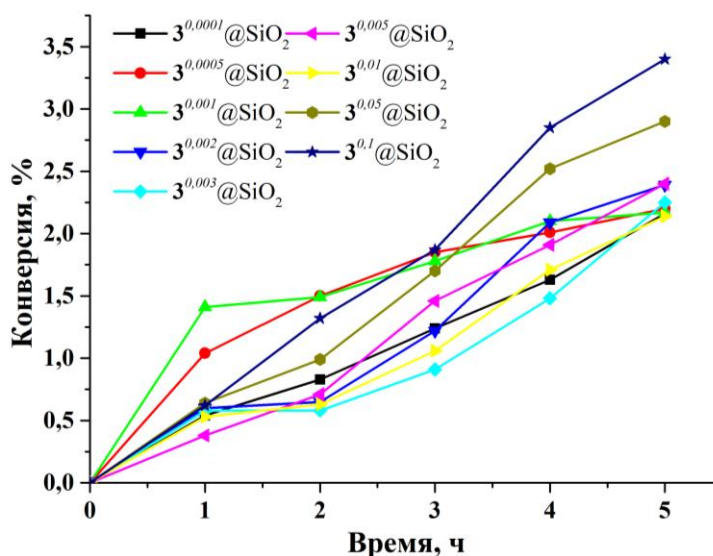


Рис. 31. Конверсия 2,3-дифенил-пара-диоксена в присутствии различных $3^x@SiO_2$ в зависимости от времени облучения.

3.3.2. Наночастицы

3.3.2.1. Синтез, состав и морфология материалов

Изучение материалов данного типа описано в работе [262]. В предыдущих главах были подробно изучены кластер-содержащие микрочастицы диоксида кремния. Мы решили проверить, как влияет размерный фактор на свойства подобных материалов, в особенности на люминесцентные и фотосенсибилизационные. Для этого было решено получить наночастицы (NPs) диоксида кремния, допированные кластерным комплексом **3**, поскольку MPs с данным комплексом были наиболее люминесцентными. Для получения материалов $3^x@SiO_2$ NPs (где $x = 0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1$) использовался слегка модифицированный микроэмульсионный метод, описанный в работе *Aubert и др.* [239] Большой загрузки комплекса в данном случае достигнуть не удалось по причине слабой растворимости комплекса **3** в этаноле.

ИК-спектры и CHN анализы полученных NPs подтвердили аналогичное MPs замещение как внешних нитратных лигандов, так и катионов Vu_4N^+ исходного комплекса **3**, а также отсутствие поверхностно-активного вещества Brij L4. Изображения, полученные с помощью ПЭМ показали, что все NPs имеют идеальную сферическую форму. С увеличением загрузки комплекса x наблюдается увеличение диаметра частиц от 55 нм до 65 нм. (рис. 32) Аналогично MPs, набор аналитических методов (РФА, ИК- и электронная спектроскопии, спектроскопия диффузного отражения и CHN анализ) однозначно

подтвердил наличие кластерного комплекса и одинаковое окружение кластерного ядра в NPs. Точное массовое содержание молибдена в MPs было определено методом ICP-AES (табл. 5). Для сравнения в таблице приведены количества молибдена для MPs с идентичными x . Можно заметить, что согласно полученным данным, в случае NPs количество включенного комплекса выше уже при $x = 0,005$.

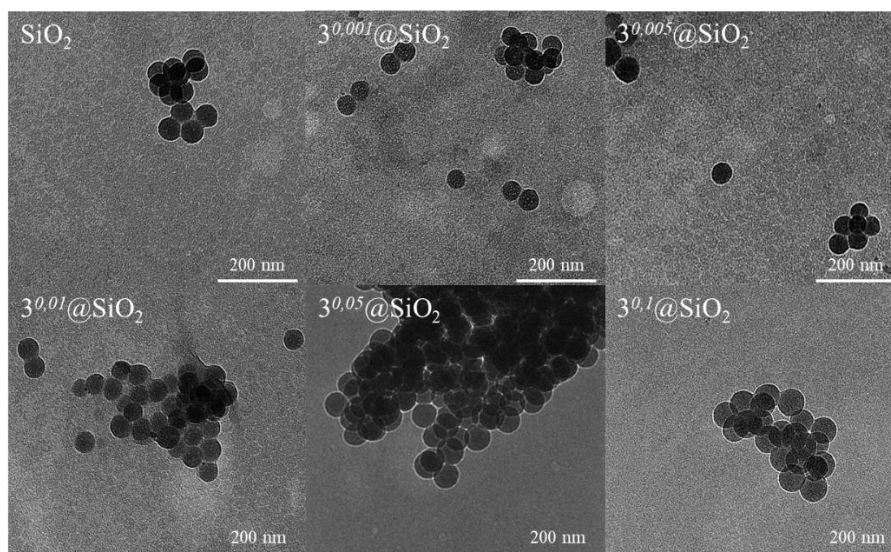


Рис. 32. Изображения чистых SiO_2 и $3^x@SiO_2$ NPs ($x = 0,001, 0,005, 0,01, 0,05$ и $0,1$), полученные с помощью ПЭМ.

Т а б л и ц а 5

Сравнение содержания Мо в MPs и NPs

| Образец | мас.% Мо в MPs | мас.% Мо в NPs |
|-------------------|----------------|----------------|
| $3^{0,001}@SiO_2$ | 0,00016 | 0,00016 |
| $3^{0,005}@SiO_2$ | 0,00056 | 0,00044 |
| $3^{0,01}@SiO_2$ | 0,00085 | 0,0011 |
| $3^{0,05}@SiO_2$ | 0,0021 | 0,0049 |
| $3^{0,1}@SiO_2$ | 0,0040 | 0,0072 |

#MPs – микрочастицы, NPs – наночастицы

3.3.2.2. Люминесцентные свойства

Для оценки влияния размера частиц на свойства люминесценции материалов, мы определили фотофизические характеристики NPs и сравнили их с ранее полученными результатами для MPs. (рис. 33, Приложение, рис. П53, табл. П2) Было показано, что свойства NPs при $x \leq 0,005$ близки к свойствам MPs. В тоже время, увеличение количества комплекса в NPs выше этого значения приводит к более резкому снижению значений как квантовых выходов, так и времен жизни эмиссии. Данная тенденция, вероятно, связана с более высокой степенью гидролиза комплекса, вследствие большей продолжительности

реакции получения материалов. Дополнительно этот факт подтверждают результаты анализа ICP-AES, описанные выше (табл. 5).

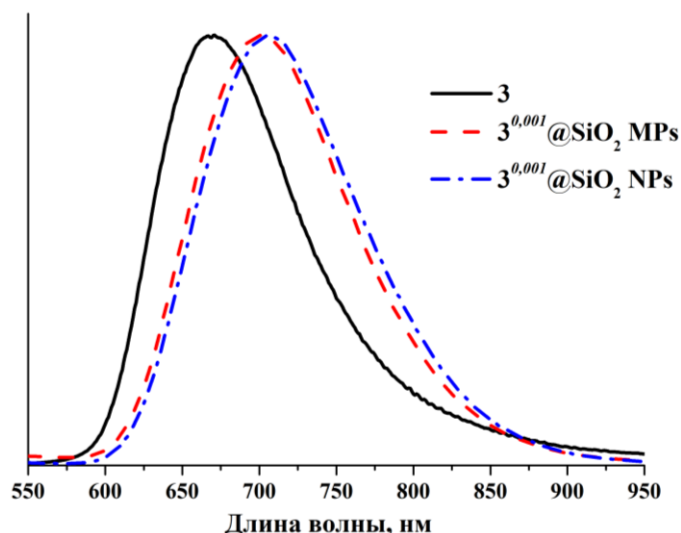


Рис. 33. Сравнение нормированных спектров эмиссии **3**, $3^{0,001}@SiO_2$ NPs и $3^{0,001}@SiO_2$ MPs.

3.3.2.3. Генерация синглетного кислорода

Для полученных NPs также была оценена эффективность генерации синглетного кислорода. Сравнение полученных значений конверсии в присутствии NPs ($3^x@SiO_2$, $x = 0,001, 0,005$ и $0,01$) со значениями для подобных MPs показало, что эффективность генерации 1O_2 у наночастиц была примерно в четыре раза выше, чем у микрочастиц. (рис. 34) Мы предположили, что причиной повышения эффективности генерации синглетного кислорода в случае NPs является более высокая удельная площадь поверхности материала, что значительно влияет на скорость взаимодействия с 3O_2 . Действительно, удельная площадь поверхности MPs, полученная с помощью измерений по методу БЭТ, составила $60 \text{ м}^2/\text{г}$, в то время как для NPs – $280 \text{ м}^2/\text{г}$, то есть почти в 5 раз выше. Изотермы сорбции азота приведены в Приложении, рис. П54.

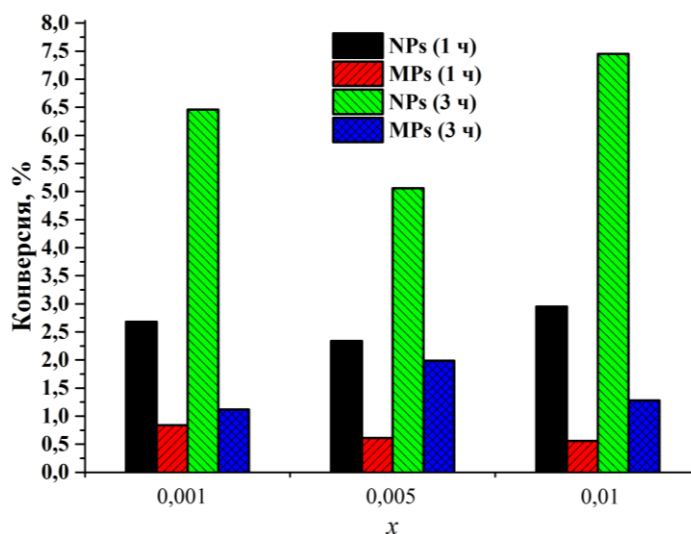


Рис. 34. Сравнение степени конверсии 2,3-дифенил-*пара*-диоксена в присутствии MPs и NPs после 1 и 3 часов облучения светом с длиной волны $\lambda \geq 400$ нм.

3.4. Биологические свойства материалов на основе SiO₂

3.4.1. Микрочастицы

Как было показано в предыдущих главах, микроразмерные материалы $3^x@SiO_2$ MPs обладают наилучшими люминесцентными свойствами по сравнению с $1^x@SiO_2$ и $2^x@SiO_2$. Кроме того, они также проявляют достаточно низкие фотосенсибилизационные свойства. Совокупность достаточно яркой эмиссии в красной области спектра (легкость детекции) и низкую эффективность генерации 1O_2 (низкая фототоксичность) делает эти объекты привлекательными для области биологии в качестве агентов для биовизуализации, а также в качестве люминесцентной метки в системах доставки биомолекул. Кроме того, стоит отметить, что в литературе отсутствует информация об изучении применения непористых микрочастиц диоксида кремния, допированных люминофорами, в качестве доставщиков биомолекул в клетку. Более того, количество изучения микроразмерных частиц SiO₂ в контексте биомедицинских приложений также невелико [290-292]. Тем не менее, в данных работах показано, что микрочастицы способны хорошо проникать в клетки, а также являются менее цитотоксичными, в сравнении с подобными наночастицами [290-292]. Интересным является тот факт, что MPs размером более 500 нм после проникновения в клетку не локализуются в лизосомах – органеллах, ответственных за "пищеварение" клетки и удаление отходов [292]. Данное свойство делает микрочастицы и подобные материалы особенно интересными для применения в качестве систем доставки, т.к. снижается вероятность разрушения клеткой доставленной биомолекулы.

Трансдукция белков (Protein Transduction) – это перспективная новая технология, которая может быть использована для изучения функций белков и ферментов, а также для доставки терапевтически активных белков [293-295]. В данной технологии используются специальные молекулы или частицы, выступающие в роли доставщиков, и способные проникать в клетку посредством рецептор-независимых механизмов, таких как фагоцитоз или пиноцитоз. При рецептор-зависимых механизмах возникает ответная реакция клетки и происходит разрушение белка или другой биоактивной молекулы. Переносимый белок может быть связан с доставщиком как ковалентно, так и нековалентными взаимодействиями (например, физическая сорбция). Оба варианта имеют свои достоинства и недостатки, значимость которых варьируется в зависимости от применения. Например, в контексте применений *in vivo* наиболее интересна прочная связь между доставщиком и белком. Поэтому, для оценки потенциала люминесцентных MPs в этой области, мы функционализировали поверхность наиболее люминесцентного материала – $3^{0,01}@SiO_2$, эпоксидными группами с использованием APTES. Данная модификация позволяет в дальнейшем

конъюгировать частицы с необходимыми белками [296]. Полученные $\text{mod-3}^{0,01}@\text{SiO}_2$ MPs затем конъюгировали с зеленым флуоресцентным белком (GFP -Green Fluorescent Protein). GFP обладает рядом преимуществ для данной работы: (1) его эмиссия не перекрывается с эмиссией комплекса, что позволит легко подтвердить успешность конъюгации и факт проникновения в клетку; (2) в свободной форме GFP не проникает в клетки [297]. В результате взаимодействия amino-групп белка с поверхностными глицидильными группами частиц происходит раскрытие цикла с образованием ковалентной связи. На рисунке 35 представлен общий план эксперимента.

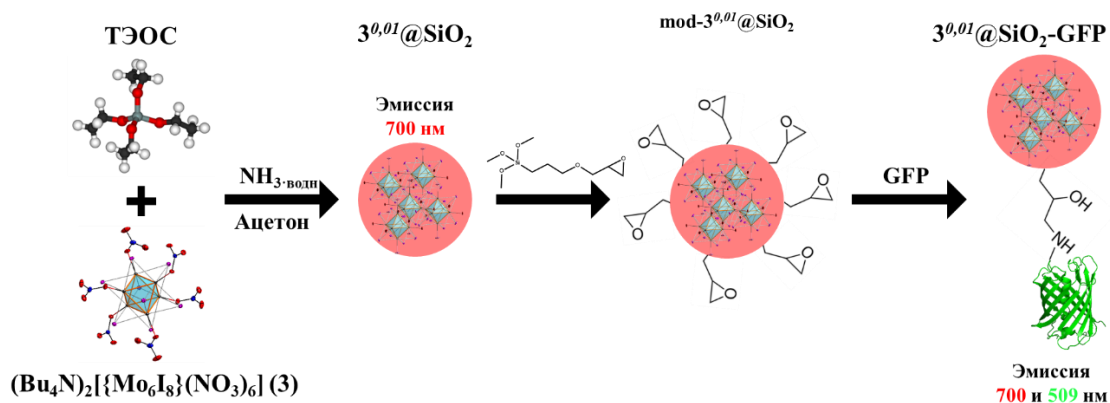


Рис. 35. Схема получения конъюгата $3^{0,01}@\text{SiO}_2\text{-GFP}$.

Поскольку хорошо известно, что белки способны сорбироваться на поверхность диоксида кремния за счет нековалентных взаимодействий [298], было важно продемонстрировать, что модификация наночастиц необходима для конъюгирования с GFP. В связи с этим мы провели дополнительный эксперимент, в котором $3^{0,01}@\text{SiO}_2$ пропитывали раствором GFP. Полученный материал и $3^{0,01}@\text{SiO}_2\text{-GFP}$ были проанализированы с помощью проточной цитометрии (FACS). (рис. 36)

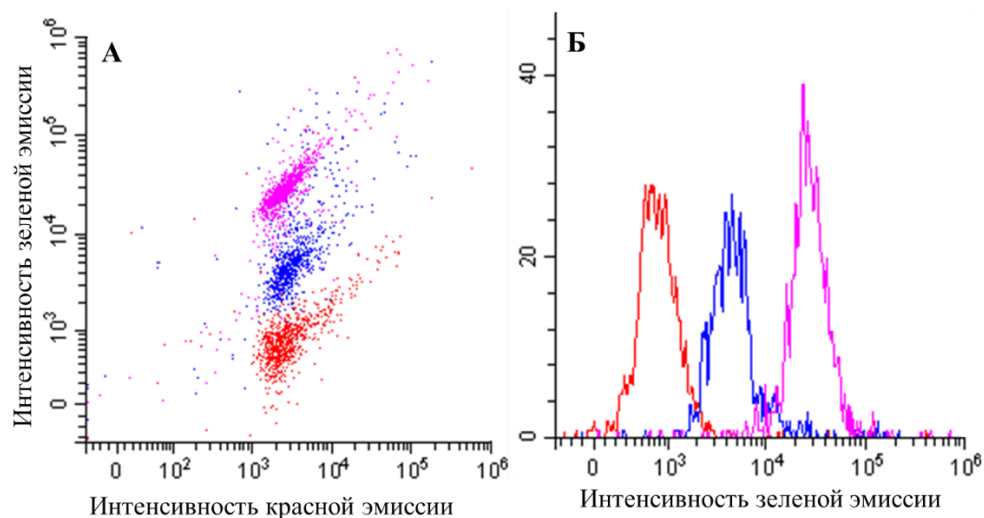


Рис. 36. Данные проточной цитометрии для $3^{0,01}@\text{SiO}_2$ (красный), нефункционализованные $3^{0,01}@\text{SiO}_2$ (синий) и $3^{0,01}@\text{SiO}_2\text{-GFP}$ (розовый).

Согласно полученным данным, оба образца проявляют одинаковую интенсивность красной эмиссии, т.е. во время всех манипуляций не происходит разрушения комплекса (рис. 36(A)). Кроме того, в области зеленой люминесценции частицы $\mathbf{Z}^{0,01}@SiO_2$ -GFP проявляют по меньшей мере в 4,5 раза большую интенсивность эмиссии, в сравнении с нефункционализированными $\mathbf{Z}^{0,01}@SiO_2$. (рис. 36(B), Приложение, рис. П55) Таким образом, модификация поверхности действительно значительно увеличивает способность частиц связывать белки.

3.4.1.1. Оценка цитотоксичности материалов, МТТ-тест

Для оценки цитотоксичности образцов $\mathbf{Z}^{0,01}@SiO_2$ и $\mathbf{Z}^{0,01}@SiO_2$ -GFP на клетках линии Нер-2 использовался стандартный МТТ-тест. Полученные результаты по цитотоксичности представлены на рисунке 37. Для сравнения, также была изучена токсичность чистых SiO_2 MPs и $\mathbf{Z}^x@SiO_2$ с $x = 0,0005, 0,001$ и $0,005$. (Приложение, рис. П56) Значения концентраций полумаксимального ингибирования (IC_{50}) приведены в таблице 6. Согласно полученным данным, чистые SiO_2 и материалы имеют близкие значения токсичности. В частности, в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,18 мг/мл все MPs не оказывают влияния на жизнеспособность клеток. Таким образом, концентрации, оптимальные для проведения биологических исследований не должны превышать 0,18 мг/мл.

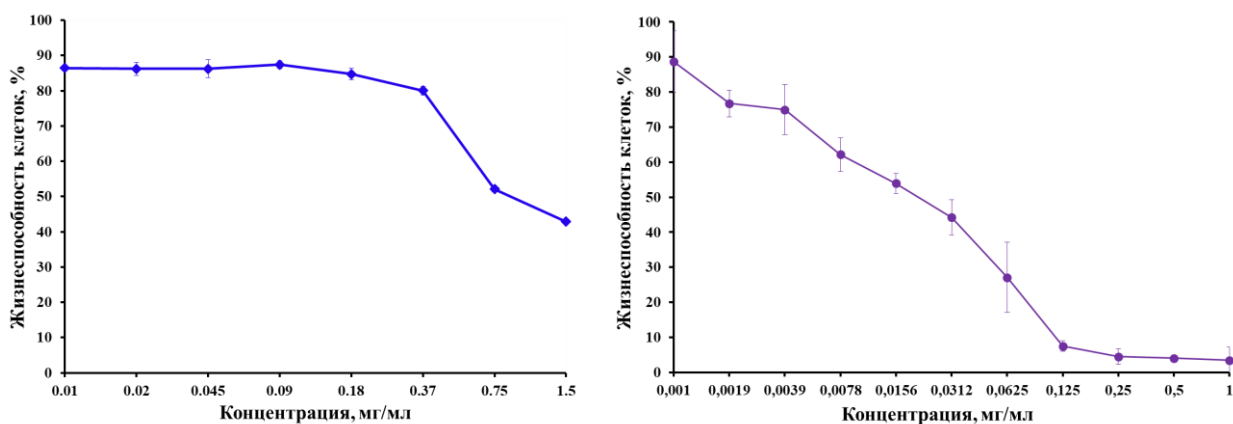


Рис. 37. Влияние $\mathbf{Z}^{0,01}@SiO_2$ (слева) и $\mathbf{Z}^{0,01}@SiO_2$ -GFP (справа) на жизнеспособность клеток линии Нер-2.

В тоже время, для $\mathbf{Z}^x@SiO_2$ -GFP наблюдалась значительно более высокая цитотоксичность: значение IC_{50} было примерно в 50 раз ниже, в сравнении с неконъюгированным материалом. Данный результат согласуется с литературными данными: например, в работе [299] описывается высокая токсичность GFP в случае проникновения в клетку. Значительное повышение токсичности материала после конъюгации является дополнительным доказательством успешной доставки GFP внутрь клетки.

Значения IC_{50} для чистых SiO_2 , $3^x@SiO_2$ и $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP

| | SiO_2 | $3^x@SiO_2$ | | | | $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| | | $x = 0,0005$ | $x = 0,001$ | $x = 0,005$ | $x = 0,01$ | |
| IC_{50} , мг/мл | $1,27 \pm 0,03$ | $0,86 \pm 0,01$ | $0,92 \pm 0,01$ | $1,06 \pm 0,02$ | $0,94 \pm 0,01$ | $0,022 \pm 0,002$ |

3.4.1.2. Клеточное проникновение и распределение в клетке

Поглощение клетками наночастиц диоксида кремния хорошо описано в литературе, в то время как, несмотря на более низкую цитотоксичность MPs [290-292], исследования микрочастиц с размером более 200 нм встречаются достаточно редко [292, 300]. В данной работе клеточное проникновение и локализация частиц в клетках линии Нер-2 была изучена с использованием флуоресцентной микроскопии (рис. 38), проточной цитометрии (рис. 39) и ПЭМ (рис. 40).

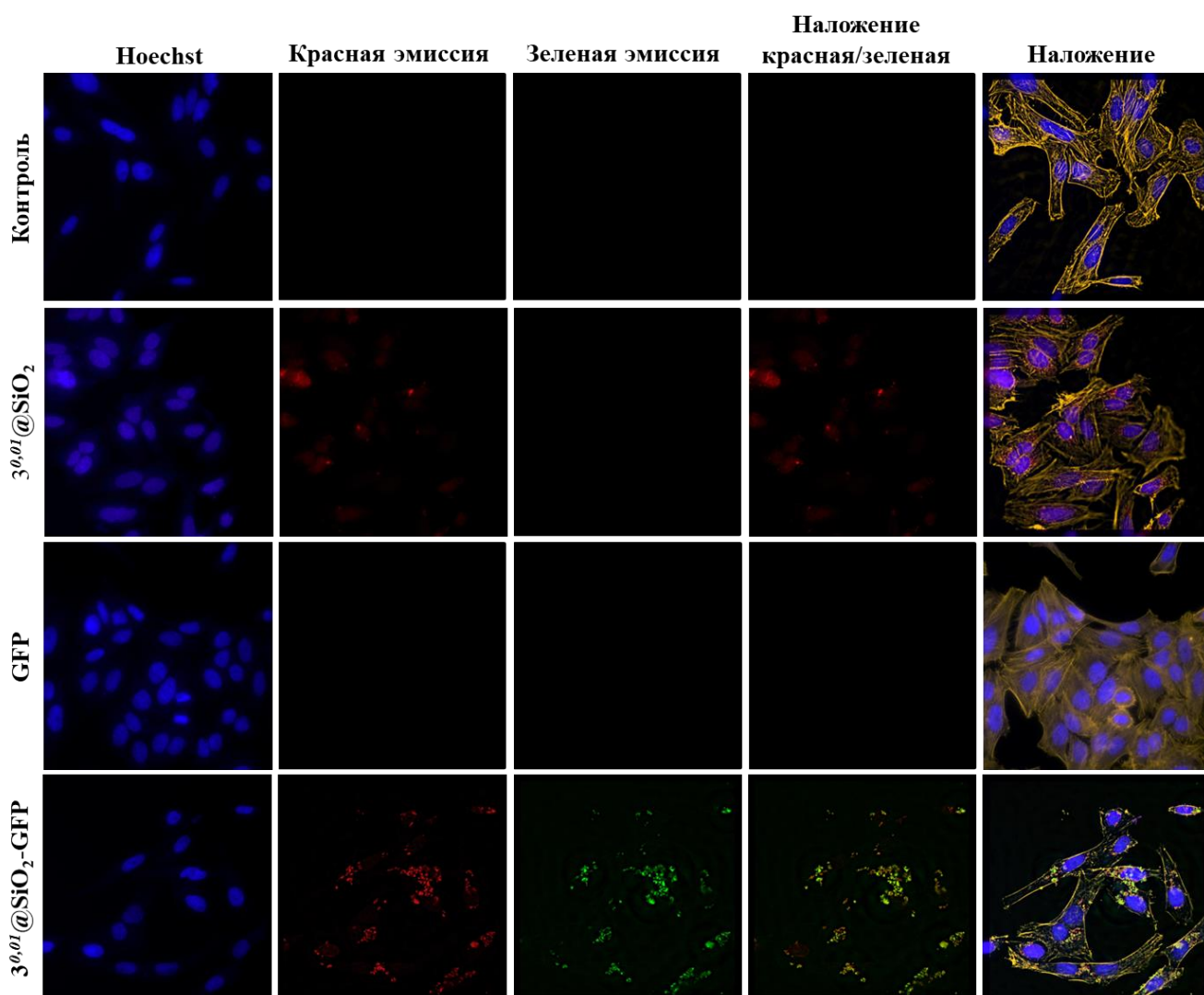


Рис. 38. Изображения клеток линии Нер-2, инкубированных с $3^{0,01}@SiO_2$, $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP и чистым GFP, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии.

Изображения клеток, инкубированных с $3^{0,01}@SiO_2$ и $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP и чистым GFP, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, представлены на рисунке 38. Исходя из этих данных можно сделать несколько важных выводов. Во-первых, оба образца проникают в клетки Нер-2, поскольку можно видеть красную люминесценцию, распределенную по всему объему цитоплазмы клеток. Во-вторых, сам GFP не проникает в клетки, что согласуется с другими исследованиями [297]. В-третьих, в случае $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP зеленая люминесценция GFP полностью перекрывается с красной люминесценцией комплексов, что означает, что GFP проникает в клетку как часть конъюгата с MPs.

Данные, полученные с помощью проточной цитометрии (рис. 39) также подтверждают вышеупомянутые выводы об успешном включении в клетки как $3^{0,01}@SiO_2$, так и $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP. Действительно, для клеток, инкубированных с обоими типами образцов, наблюдается значительное увеличение интенсивности люминесценции по сравнению с отрицательным контролем. В тоже время, в клетках, инкубированных с чистым GFP, интенсивность не увеличивалась (рис. 39(A)).

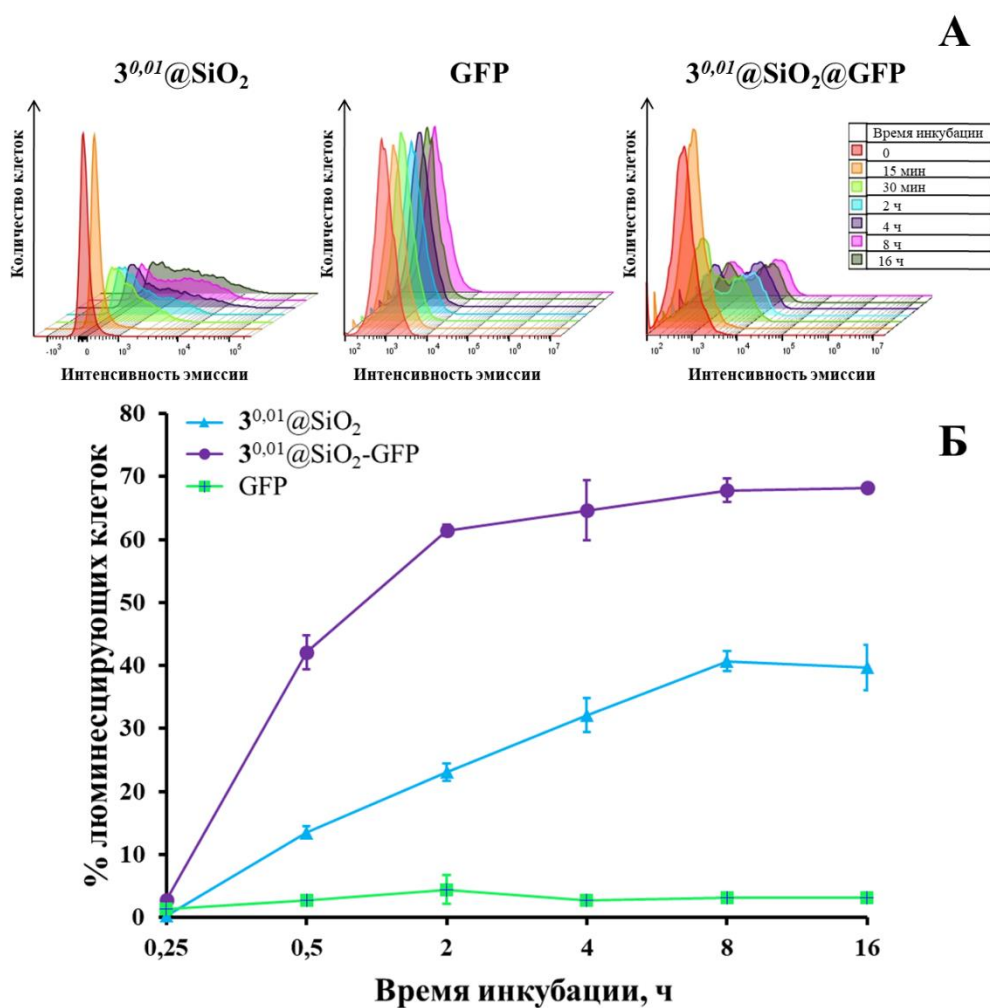


Рис. 39. Клеточное проникновение $3^{0,01}@SiO_2$, $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP и чистого GFP, определенное с помощью проточной цитометрии (A), кинетика проникновения, выраженная в процентах люминесцирующих клеток, от времени инкубации (Б).

Кинетика проникновения, выраженная в процентах люминесцирующих клеток Нер-2 от времени (рис. 39(Б)), показала, что максимальная скорость включения частиц $3^{0,01}@SiO_2-GFP$ наблюдается в течение первого часа инкубации и выходит на плато после 4 часов. В случае $3^{0,01}@SiO_2$ скорость поглощения частиц была намного медленнее, не смотря на использование более высокой концентрации. Данное несоответствие кинетики поглощения, вероятно, связано как с различным покрытием поверхности частиц, так и с разной степенью агломерации, которая менее выражена в случае $3^{0,01}@SiO_2-GFP$ (Приложение, рис. П55, П57).

Более подробно проникновение частиц было изучено с помощью метода ПЭМ. (рис. 40) Также этот метод позволяет сделать некоторые предположения о механизме проникновения. Из литературных данных известно, что в отличие от наночастиц для микрочастиц наиболее предпочтительными механизмами являются как пиноцитоз, так и фагоцитоз [301].

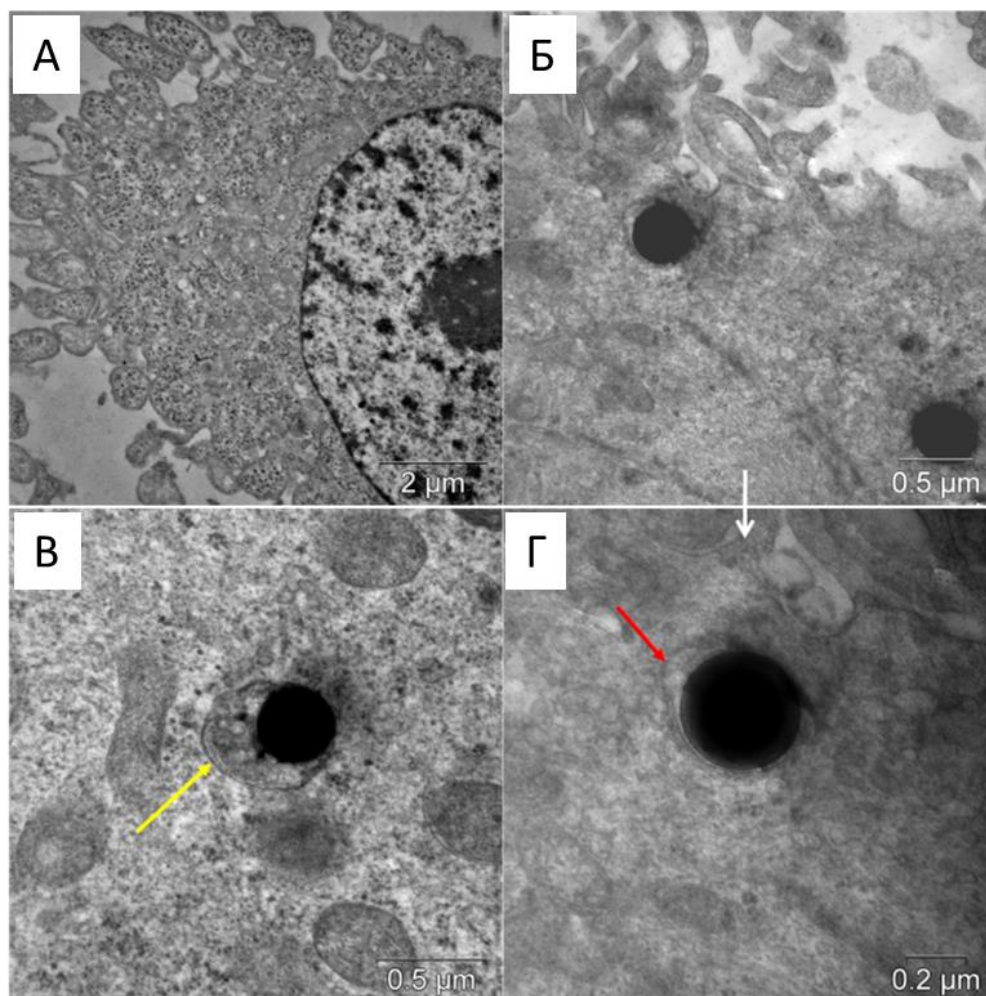


Рис. 40. Изображения клеток Нер-2, полученные с помощью ПЭМ: контрольные клетки (А) и клетки после 12 часов инкубации с MPs (Б-Г). Красная стрелка показывает частицу в однослойной везикуле, желтая стрелка показывает частицу в эндосоме.

Полученные изображения (рис. 40, Приложение, рис. П58) клеток после инкубации с $3^{0,01}@SiO_2$ и $3^{0,01}@SiO_2$ -GFP показали, что независимо от материала, частицы локализируются внутри однослойных везикул, расположенных в клеточной цитоплазме. Более того, в данных везикулах не было обнаружено внеклеточной жидкости (рис. 40(Б) и (Г)). Это наблюдение указывает на то, что наиболее вероятным механизмом клеточного проникновения для MPs является фагоцитоз [302, 303]. Также стоит отметить, что внутри лизосом клеток не было обнаружено частиц материалов. (рис. 40(В)) Вероятно, большая инертность MPs является причиной того, что фагосомы, содержащие частицы, не сливаются с лизосомами. Данное наблюдение свидетельствует о том, что частицы могут находиться в цитоплазме в течение длительного времени без какой-либо активной экскреции и повреждения белка.

3.4.1.3. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

Поскольку приведенные выше результаты подтверждают, что микроразмерные материалы, несмотря на большие размеры, успешно проникают в клетки Нер-2 и локализируются по всему объему цитоплазмы, необходимо было оценить фотоиндуцированную токсичность образцов. (рис. 41) Фототоксичность материалов определяли согласно методу, описанному в главе 3.1.8. Для инкубации с клетками был выбран образец $3^{0,01}@SiO_2$, взятый в нетоксичном диапазоне концентраций – 0,0046-0,15 мг/мл. В качестве образца сравнения использовали чистый SiO_2 .

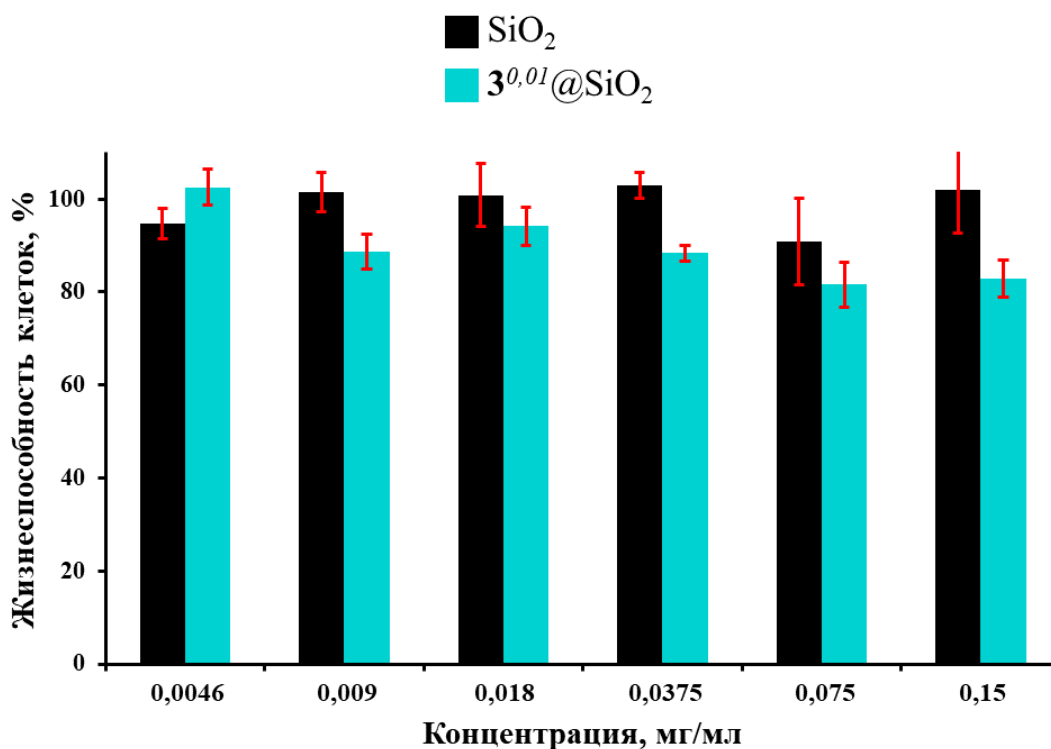


Рис. 41. Жизнеспособность клеток, инкубированных с чистыми SiO_2 и $3^{0,01}@SiO_2$ MPs, после облучения светом с длиной волны $\lambda \geq 400$ нм.

Полученные данные демонстрируют, что $\mathbf{3}^{0,01}@SiO_2$ проявляет лишь немного более высокую фотоиндуцированную цитотоксичность в сравнении с чистым диоксидом кремния, который является нетоксичным во всем диапазоне исследованных концентраций (рис. 41). Тем не менее, даже при наибольшей концентрации материала, процент живых клеток после облучения составил более 80%.

Таким образом, можно заключить, что фотоиндуцированная цитотоксичность MPs оказалась незначительно выше, чем у изученных ранее материалов, допированных комплексом **3** (см. главы 3.1.8. и 3.2.4.) – выживаемость клеток Нер-2, инкубированных с $\mathbf{3}@MPL-101$, составила ~93%, в то время как для материалов $\mathbf{3}@PSS$ не было обнаружено фотоиндуцированного цитотоксического эффекта. Совокупность полученных данных подтверждает перспективность представленных материалов в качестве доставщиков биомолекул в клетку, включая те биомолекулы, которые не проникают в свободном виде. Наличие хорошо детектируемой люминесценции, рецептор-независимый механизм проникновения, а также проявление низкой темновой и фотоиндуцированной токсичности – все эти свойства позволяют легко отследить факт проникновения конъюгата в клетку и не беспокоиться о разрушении биомолекулы.

3.4.2. Наночастицы

Изучение биологических свойств наночастиц описано в работе [263]. В отличие от MPs, NPs продемонстрировали достаточно высокую эффективность генерации синглетного кислорода в сочетании с ярко-выраженными люминесцентными свойствами. Кроме того, согласно литературным данным, наночастицы имеют оптимальный размер (50 нм) и форму для биологических исследований [304, 305]. Сочетание приведенных свойств делает наноразмерные кластер-содержащие материалы интересными с точки зрения визуализации живых систем, а также в качестве агентов для ФДТ.

3.4.2.1. Определение цитотоксичности

Влияние чистых наночастиц SiO_2 , $\mathbf{3}^{0,001}@SiO_2$ и $\mathbf{3}^{0,01}@SiO_2$ в диапазоне концентраций 0,0015-1,5 мг/мл на жизнеспособность клеток Нер-2 оценивали методом МТТ (см. главу 3.1.5.). Было показано, что NPs в концентрации от 0,0015 до 0,375 мг/мл не проявляют цитотоксического эффекта. Однако увеличение концентрации всех изученных образцов выше 0,75 мг/мл вызывает резкое снижение количества метаболически активных клеток до 80%. (рис. 42)

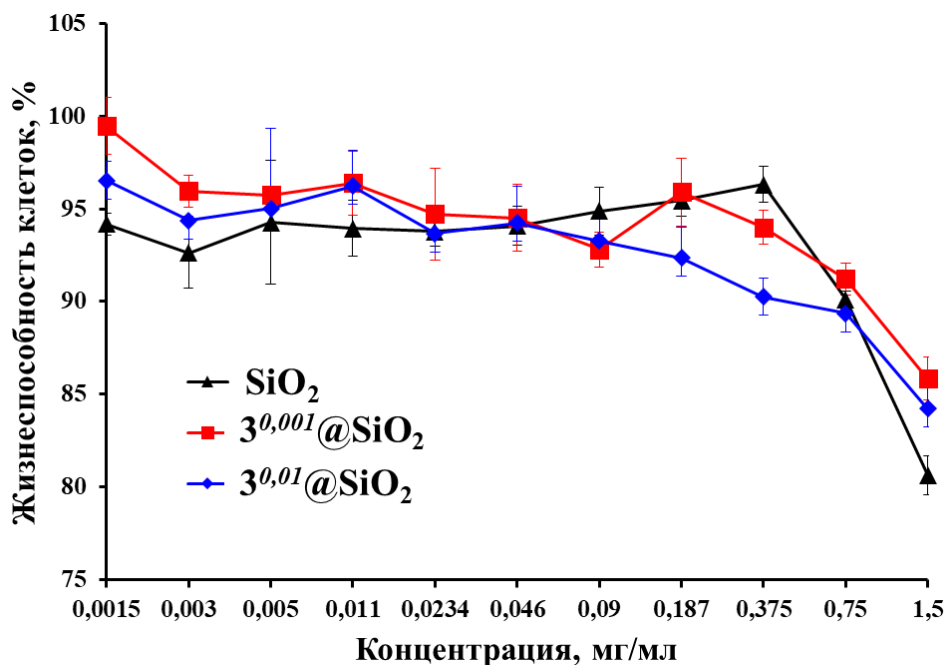


Рис. 42. Влияние чистых SiO₂ и 3^x@SiO₂ NPs (x = 0,001, 0,01) на жизнеспособность клеток линии Нер-2.

Помимо этого, влияние NPs на жизнеспособность и пролиферацию клеток Нер-2 и степень их апоптоза, было изучено с использованием метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI. Окрашенные клетки изучали с помощью флуоресцентного микроскопа. Полученное изображение демонстрирует морфологические изменения клеток Нер-2, происходящие после инкубации с материалом. (рис. 43) Было показано, что инкубация клеток с наночастицами в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,18 мг/мл, не влияет ни на плотность, ни на жизнеспособность клеток. (рис. 44) Этот вывод хорошо согласуется с данными анализа МТТ. Однако было замечено, что использование концентраций 0,375-1,5 мг/мл приводит к уменьшению плотности клеток. Таким образом, концентрации, оптимальные для проведения биологических исследований аналогичны МРs и не должны превышать 0,18 мг/мл.

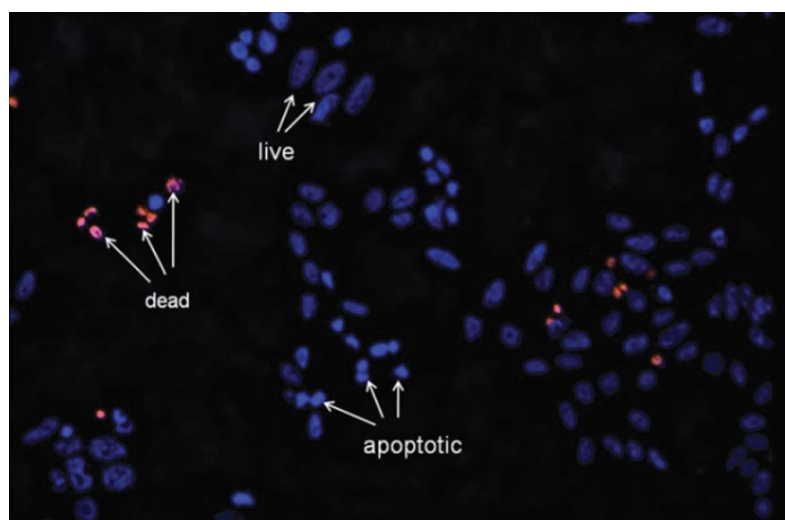


Рис. 42. Морфологические изменения клеток линии Нер-2 после инкубации с 1,5 мг/мл 3^{0,001}@SiO₂ NPs. Данные получены с использованием метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.

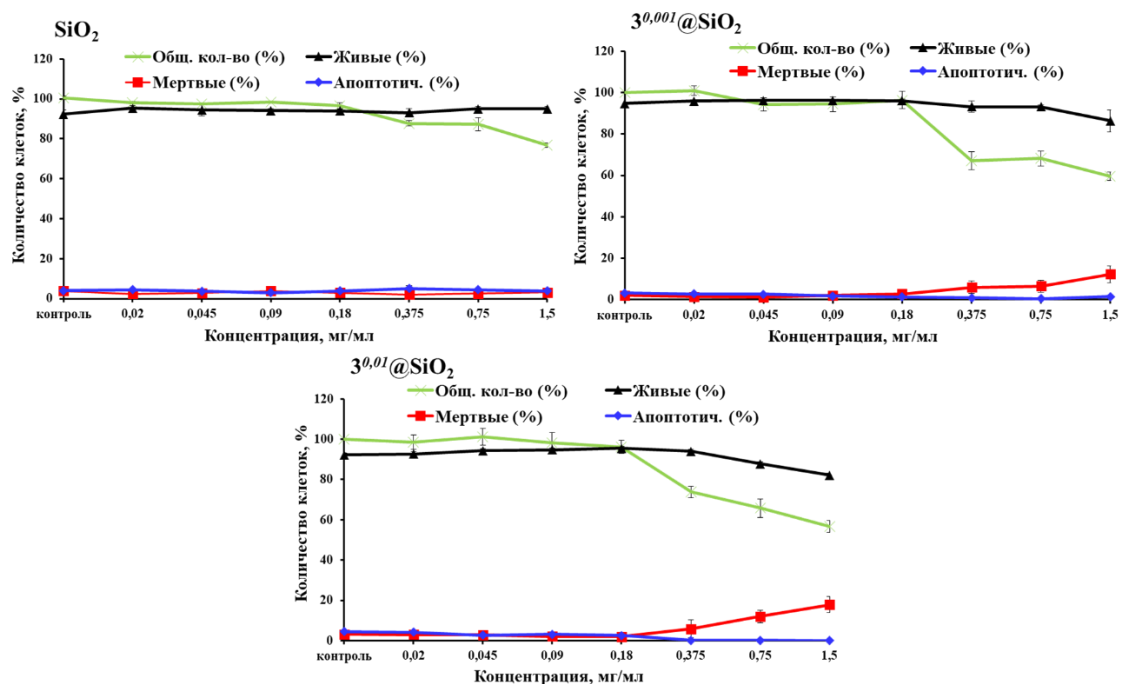


Рис. 44. Влияние чистых SiO₂ и 3^x@SiO₂ NPs (x = 0,001, 0,01) на жизнеспособность и пролиферацию клеток линии Нер-2, определенное с помощью метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.

3.4.2.2. Клеточное проникновение и выведение

Анализ кинетики поглощения частиц клетками и их выведения проводили с использованием проточной цитометрии (FACS). Клетки Нер-2 инкубировали с наночастицами 3^x@SiO₂ (x = 0,001, 0,01) в концентрации 0,1 мг/мл. Согласно полученным данным, интенсивность люминесценции клеток, инкубированных с частицами, была намного выше, чем у контрольных клеток. Для изучения кинетики поглощения был построен график зависимости средней интенсивности люминесценции клеток от времени инкубации. (рис. 45) Максимальное поглощение для обоих образцов наблюдалось после двух часов инкубации, после чего оно выходило на плато и практически не изменялось до 24 часов. Поскольку, как было показано, максимальное накопление наночастиц наблюдается через 2 часа инкубации, исследование кинетики выведения материалов проводилось на клетках, инкубированных в течение данного периода времени. (рис. 45) Было показано, что NPs активно выводятся из клеток в течение первых 2 часов, после чего интенсивность люминесценции существенно не изменяется и остается на достаточно высоком уровне. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что материалы быстро проникают в клетки и остаются там в течение длительного времени. Более того, количество включенного комплекса не влияет на скорость поглощения и выведения.

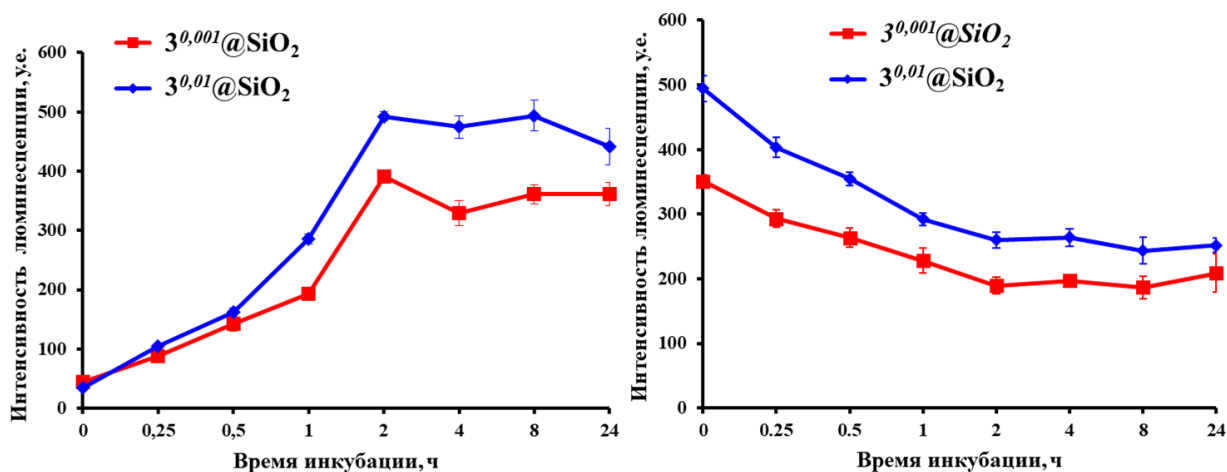


Рис. 45. Кинетика поглощения (слева) частиц клетками и их выведения (справа).

3.4.2.3. Распределение в клетке

Для изучения распределения наночастиц в клетке были использованы методы КЛСМ и ПЭМ. На изображениях, полученных с помощью конфокальной микроскопии, можно отчетливо наблюдать интенсивную красную люминесценцию (рис. 46, Приложение, рис. П59). Кроме того, использование метода создания псевдо-3D изображения (Z-stack), основанного на сложении фотографий нескольких слоев, (Приложение, рис. П60) позволило подтвердить локализацию люминесцентных центров именно внутри клеток.

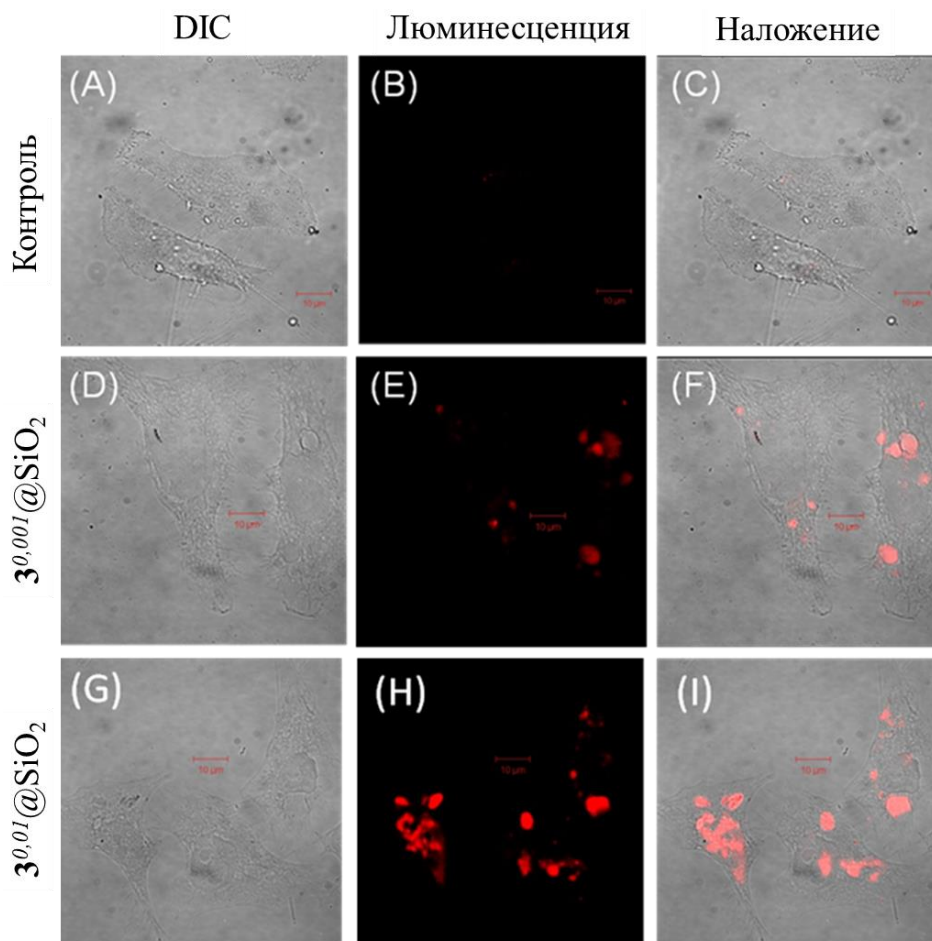


Рис. 46. Изображения клеток линии Нер-2 после инкубации с материалами, полученные с помощью метода КЛСМ (DIC - Differential interference contrast).

Данный факт свидетельствует о том, что наночастицы действительно проникают в клетки, а не налипают на поверхность. Подробное изучение изображений показало, что наночастицы локализуются в цитоплазме и на периферии клеток, а также в пространстве около ядер.

Изображения клеток, инкубированных с наночастицами в идентичных условиях, полученные с помощью ПЭМ, дали гораздо больше деталей о локализации частиц, а также позволили выдвинуть некоторые предположения о возможном механизме проникновения. Во-первых, на изображениях не наблюдается признаков аномальных изменений ультраструктуры клеток. Во-вторых, для всех образцов не было обнаружено различий в распределении в клетке. В-третьих, на изображениях можно видеть, что NPs в основном находятся в мембранных везикулах разных размеров, то есть в эндосомах (рис. 47, Приложение, рис. П61-П62), что позволяет предположить, что возможным механизмом проникновения частиц является эндоцитоз. Кроме того, измерения дзета-потенциала чистых SiO_2 , $\text{Z}^{0,001}@\text{SiO}_2$ и $\text{Z}^{0,01}@\text{SiO}_2$ показали, что все они имеют отрицательные заряды со значениями -23 ± 2 мВ, -40 ± 1 мВ, и -21 ± 1 мВ соответственно, что дополнительно подтверждает предположение о возможном механизме проникновения [306, 307]. Тем не менее, даже с учетом полученных данных, возможны альтернативные механизмы, такие как, например, поглощение внеклеточной жидкости посредством микропиноцитоза [308].

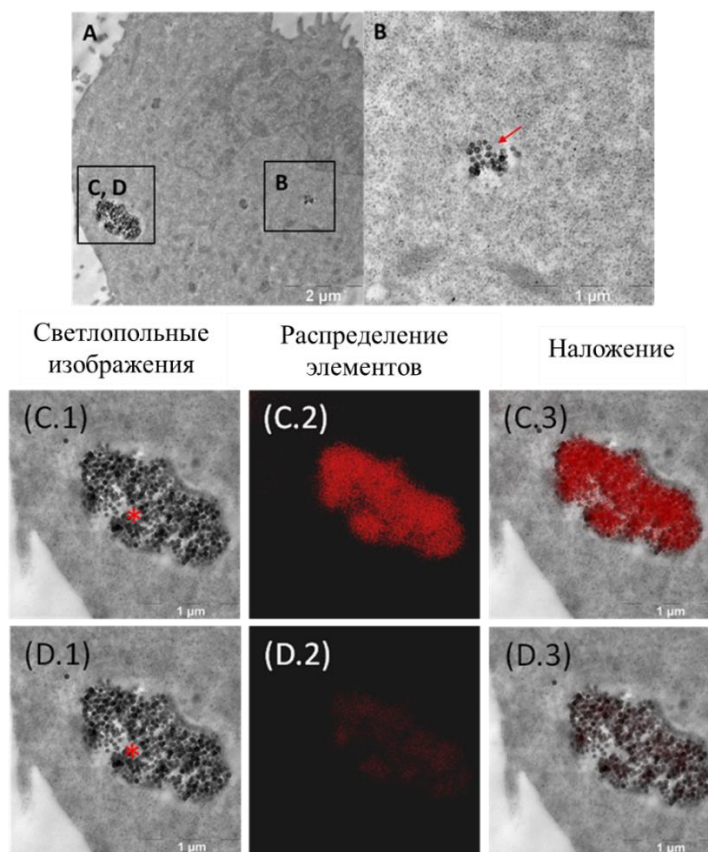


Рис. 47. Изображения клеток линии Нер-2 после инкубации с $\text{Z}^{0,001}@\text{SiO}_2$, полученные с помощью метода ПЭМ. C2 – распределение кремния, D2 – распределение молибдена.

3.4.2.4. Оценка фотоиндуцированной цитотоксичности

В предыдущих главах было показано, что кластер-содержащие NPs могут легко проникать в клетки и оставаться в них в течение достаточно долгого времени, а также то, что они проявляют низкую темновую токсичность. Данные свойства являются необходимыми для агентов для ФДТ. В первую очередь мы подтвердили факт генерации АФК внутри клеток Нер-2 с использованием флуоресцентного красителя DCFH-DA, аналогично методу, описанному в *главе 3.1.7.* (Приложение, рис. П63-П64) В качестве положительного контроля использовали раствор перекиси водорода, а также коммерчески доступный фотосенсибилизатор Радахлорин® в концентрациях, применяемых для экспериментов *in vitro* [309]. Анализ полученных изображений подтвердил генерацию АФК внутри клеток, причем интенсивность люминесценции DCFH-DA в случае материала $\text{Z}^{0,01}\text{@SiO}_2$ и Радахлорина была идентичной, что говорит о высокой эффективности фотосенсибилизатора. В связи с этим, мы решили изучить фотоиндуцированную токсичность материалов $\text{Z}^{0,001}\text{@SiO}_2$ и $\text{Z}^{0,01}\text{@SiO}_2$ также на клетках линии Нер-2. Анализ проводили аналогично описанному в *главе 3.1.8.* Клетки Нер-2 инкубировали с чистым SiO_2 (отрицательный контроль), $\text{Z}^{0,001}\text{@SiO}_2$ и $\text{Z}^{0,01}\text{@SiO}_2$ в нетоксичных концентрациях (в случае темновой цитотоксичности) – 0,0125-0,22 мг/мл. В качестве положительного контроля также использовали Радахлорин. Затем клетки облучали светом $\lambda \geq 400$ нм и оценивали количество живых, мертвых и апоптотических клеток методом двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.

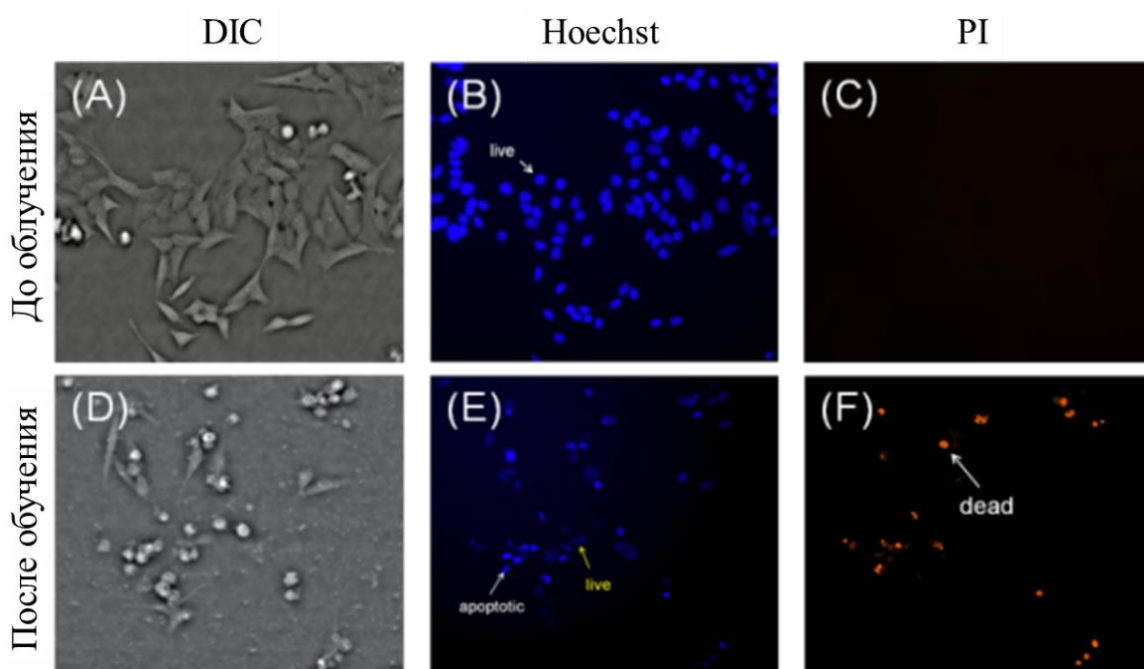


Рис. 48. Влияние $\text{Z}^{0,01}\text{@SiO}_2$ NPs на клетки линии Нер-2 до (*верхний ряд*) и после (*нижний ряд*) облучения светом с длиной волны $\lambda \geq 400$ нм. Данные получены с использованием метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.

С помощью световой микроскопии было показано, что клетки Нер-2 имеют веретеновидную форму, плотно контактируют с соседними клетками (образуют монослой) и хорошо прилипают к поверхности культурального матраса. (рис. 48, Приложение, рис. Пб5-Пб6) Эти характеристики, говорящие об отсутствии негативного влияния, наблюдаются как во всех группах без облучения, так и в отрицательном контроле, а также в случае облучения после добавления чистых SiO₂. Однако при добавлении наночастиц в концентрациях выше 0,18 мг/мл и последующего облучения наблюдалось сжатие и округление клеток.

Влияние концентрации фотосенсибилизаторов на жизнеспособность клеток приведено на рисунке 49. Было показано, что при инкубации с 0,0125-0,05 мг/мл $Z^{0,001}@SiO_2$ и, 0,05 мг/мл $Z^{0,01}@SiO_2$ и 0,01525 мг/мл Радахлорина количество апоптотических клеток было максимальным. Более того, при концентрациях $Z^{0,001}@SiO_2$ выше 0,18 мг/мл, $Z^{0,01}@SiO_2$ – выше 0,025 мг/мл и Радахлорина – выше 0,01525 мг/мл наблюдалось заметное увеличение количества мертвых клеток.

В случаях $Z^{0,01}@SiO_2$ и Радахлорина нам удалось определить значения IC₅₀, которые составили 0,075±0,007 мг/мл и 0,021±0,002 мг/мл, соответственно. В тоже время, в случае $Z^{0,001}@SiO_2$ даже при самой высокой концентрации 0,22 мг/мл наблюдалась гибель только ~35 % клеток. Таким образом, можно заключить, что материал с большим количеством включенного комплекса проявил более сильную фотоиндуцированную токсичность. Значения IC₅₀ материала $Z^{0,01}@SiO_2$ находятся примерно на одном уровне со значениями Радахлорина, который используется для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных опухолей.

Мы полагаем, что фотоиндуцированная цитотоксичность материалов обусловлена в основном свободными частицами материала, а не локализованными в эндосомах, (см. главу 3.4.2.3.) поскольку отсутствие оболочки вокруг частицы увеличивает эффективность воздействия АФК. Кроме того, существует вероятность того, что генерируемый высокоактивный синглетный кислород, может разрушать эндосомальную/лизосомальную мембрану и обеспечивать высвобождение частиц из эндосом, в дальнейшем увеличивая эффективность фотодинамической активности. Действительно, в некоторых работах было показано, что фотоактивные соединения, как в свободном виде, так и включенные в наночастицы, могут быть использованы для разрушения эндосомной мембраны при воздействии света [310, 311].

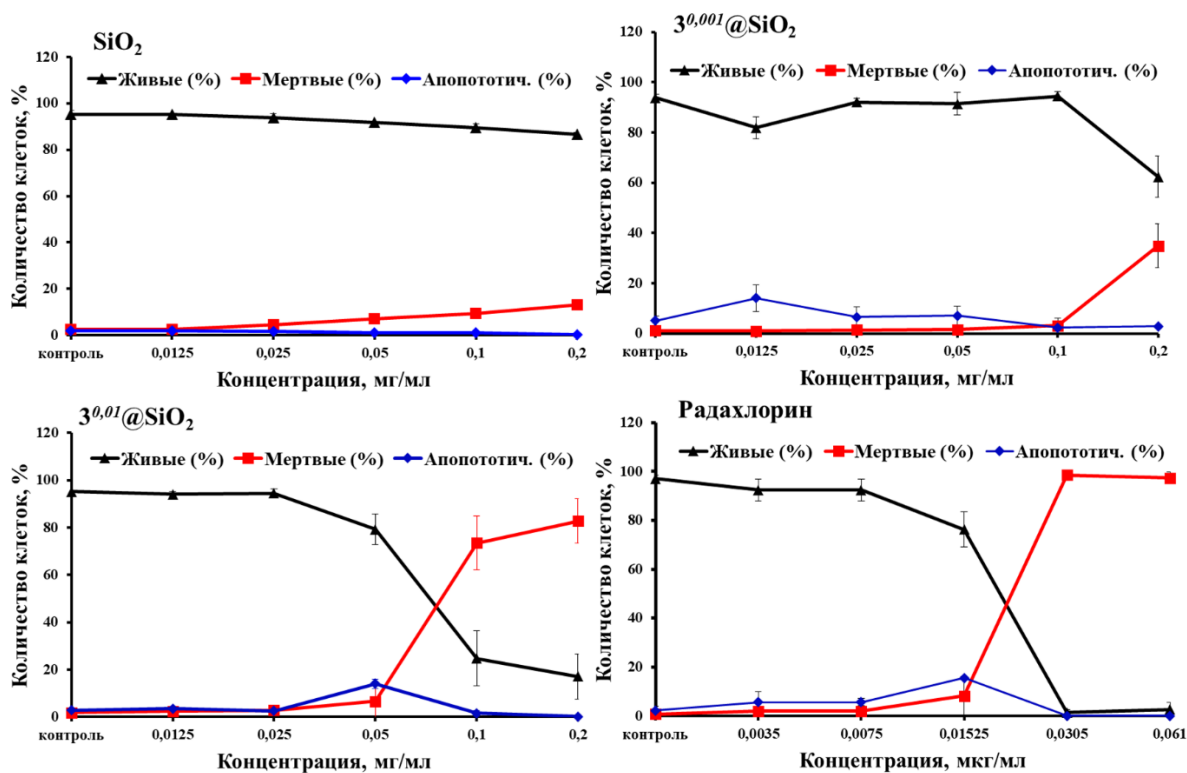


Рис. 49. Жизнеспособность клеток, инкубированных с чистыми SiO₂, 3^x@SiO₂ NPs (x = 0,001 и 0,01) и Радахлорином, после облучения светом с длиной волны $\lambda \geq 400$ нм. Данные получены с использованием метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.

Подводя итог, можно сказать, что биологические эксперименты подтвердили, что наночастицы являются более эффективными фотосенсибилизаторами по сравнению с микрочастицами. Сочетание низкой темновой токсичности с высокой фотоиндуцированной токсичностью, сравнимой с коммерческим фотосенсибилизатором Радахлорином, говорят о высоком потенциале подобных материалов в областях, связанных с генерацией синглетного кислорода *in vivo*, например ФДТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы получено три типа люминесцентных кластер-содержащих материалов на основе комплексов $(\text{Cu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$ ($\text{X} = \text{Cl}$ (1), Br (2) или I (3)). В качестве матриц было использовано три различных по своей природе соединения – металл-органический координационный полимер MIL-101-Cr, органический водорастворимый полимер полистиролсульфонат натрия (PSS) и неорганическая матрица аморфного диоксида кремния (SiO_2). Все полученные материалы были охарактеризованы широким рядом физико-химических методов анализа. Было подробно изучено взаимодействие комплекса с матрицей в материалах. Показано, что в случае использования MIL-101 происходит образование соединения включения без изменения состава комплекса. При использовании матриц, содержащих функциональные группы, таких как MIL-101-ruz или PSS происходит замещение лабильных нитратных лигандов на группы матриц с образованием ковалентных связей. В случае SiO_2 в процессе получения материалов происходит полный либо частичный гидролиз комплексов, приводящий к образованию как водородных ($\text{Mo}-\text{OH}_2 \cdots \text{HO}-\text{Si}$), так и ковалентных связей ($\text{Si}-\text{O}-\text{Mo}$). В случае PSS и SiO_2 была подробно изучена зависимость люминесцентных и фотосенсибилизационных свойств от состава кластерного ядра и количества кластерного комплекса. Было показано, что для всех материалов наилучшие свойства наблюдаются в случае включения комплекса 3.

Ввиду различности природы матрицы, свойства финальных материалов сильно различались и каждый из них имеет разную концепцию биомедицинских применений. Для материалов на основе MIL-101 было показано, что при инкубации с клеточными культурами происходит высвобождение комплекса и его последующее поглощение клетками. Также была продемонстрирована генерация АФК внутри клеток. Таким образом, материалы такого типа перспективны в качестве доставщиков биомолекул и агентов для ФДТ. Материалы на основе PSS являются водорастворимыми и проявляют низкую токсичность, ввиду чего они интересны с точки зрения биовизуализации. В случае SiO_2 было получено два типа материалов – микро- и наноразмерные. Показано, что оба вида частиц проявляют низкую темновую цитотоксичность, в то время как при облучении светом наночастицы являются высокотоксичными. Данное свойство делает наноразмерные материалы превосходными кандидатами на роль агентов для биовизуализации и ФДТ. В тоже время было показано, что конъюгация микрочастиц с биомолекулами, которые не способны проникать в клетку самостоятельно, позволяет доставлять их внутрь клеток без разрушения.

Это делает микроразмерные материалы перспективными доставщиками биомолекул с возможностью отслеживания их местоположения посредством люминесценции.

Полученные данные о закономерностях образования кластер-содержащих материалов и их свойствах не только вносят существенный вклад в развитие координационной химии кластерных комплексов и в область материаловедения, но и позволяют варьировать свойства материалов в зависимости от необходимого применения.

Стоит отметить, что в работе продемонстрирована высокая перспективность кластерных комплексов молибдена в качестве компонентов материалов для биомедицинских применений. Кроме того, продемонстрирована высокая универсальность системы «матрица-кластерный комплекс». Все это показывает перспективу дальнейшего развития данного направления.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Предложены методики и оптимизированы условия получения материалов на основе галогенидных октаэдрических кластерных комплексов молибдена $(\text{Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{NO}_3)_6]$, где $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ или I , и трех типов матриц различной природы – органической (PSS), неорганической (микро- и наноразмерные частицы SiO_2) и металл-органической (MIL-101 и его модифицированное пирaziном производное – MIL-101-puz).

2. Показано, что включение кластерного комплекса в MIL-101 и MIL-101-puz не приводит к изменению кристаллической структуры координационных полимеров. В случае SiO_2 использование большого избытка комплексов приводит к образованию крупных частиц неправильной формы, которые являются смесью фаз диоксида кремния и аква-гидроко комплекса состава $[\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Показано, что в зависимости от типа используемой матрицы реализуются различные типы взаимодействий между комплексом и матрицей: MIL-101 – гость-хозяин, MIL-101-puz и PSS – ковалентная связь, SiO_2 – водородная и ковалентная связи.

3. При изучении люминесцентных свойств полученных материалов выявлено, что во всех случаях наилучшие свойства наблюдаются для образцов, содержащих комплекс с кластерным ядром $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}$. Показано, что при увеличении количества комплекса в частицах SiO_2 , не зависимо от размера, наблюдается сначала повышение фотофизических характеристик, а затем их снижение вплоть до нуля.

4. Показано, что для материалов на основе MIL-101 наблюдается повышение токсичности после модификации пирaziном, в то время как включение комплекса не вызывает повышения токсических показателей. Полимерные материалы на основе PSS в экспериментально достижимых концентрациях (3,3 мг/мл) не оказывают существенного влияния на жизнеспособность клеточной культуры Нер-2, однако токсичны по отношению к культуре HeLa. Материалы на основе SiO_2 проявляют достаточно низкую токсичность вплоть до концентрации 0,18 мг/мл независимо от размера частиц. Исследования клеточного проникновения материалов на основе MIL-101 показало, что сам координационный полимер не проникает в клетки, однако наблюдается постепенное высвобождение комплекса из пор и его поглощение клетками. В случае материалов на основе PSS проникновение в клетку наблюдалось только в случае комплекса с кластерным ядром $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}$. Материалы на основе SiO_2 хорошо проникают в клетки независимо от размера частиц. Показано, что возможным механизмом проникновения микрочастиц является фагоцитоз, а наночастиц – эндоцитоз.

5. Показано, что материалы на основе MIL-101 и наноразмерные частицы SiO₂ способны фотосенсибилизировать процесс генерации активных форм кислорода внутри клеток. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности показало, что наночастицы SiO₂, содержащие комплекс с кластерным ядром {Mo₆I₈}⁴⁺, проявляют высокий фотодинамический эффект, сравнимый с коммерческим фотосенсибилизатором Радахлорином. Для микрочастиц продемонстрирована возможность их использования в качестве доставщиков биомолекул в клетку (включая биомолекулы неспособные проникать в клетку в свободной форме).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Stöber W., Fink A., Bohn E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range // *J. Colloid Interf. Sci.* - 1968. - V. 26, No. 1. - P. 62-69.
- [2] Bunzli J.-C. G., On the design of highly luminescent lanthanide complexes // *Coord. Chem. Rev.* - 2015. - V. 293, - P. 19-47.
- [3] Foucault-Collet A., Gogick K. A., White K. A., Villette S., Pallier A., Collet G., Kieda C., Li T., Geib S. J., Rosi N. L., Petoud S., Lanthanide near infrared imaging in living cells with Yb³⁺ nano metal organic frameworks // *P. Natl. Acad. Sci. USA* - 2013. - V. 110, No. 43. - P. 17199-17204.
- [4] Sava Gallis D. F., Rohwer L. E. S., Rodriguez M. A., Barnhart -Dailey M. C., Butler K. S., Luk T. S., Timlin J. A., Chapman K. W., Multifunctional, tunable metal-organic framework materials platform for bioimaging applications // *ACS Appl. Mater. Inter.* - 2017. - V. 9, No. 27. - P. 22268-22277.
- [5] Tang G. G., Gao J., Wang C. H., Tan H. L., Luminescent lanthanide coordination polymer as a platform for DNA colorimetric detection // *Sensor. Actuat. B-Chem.* - 2017. - V. 244, - P. 571-576.
- [6] Xia T. F., Zhu F. L., Jiang K., Cui Y. J., Yang Y., Qian G. D., A luminescent ratiometric pH sensor based on a nanoscale and biocompatible Eu/Tb-mixed MOF // *Dalton Trans.* - 2017. - V. 46, No. 23. - P. 7549-7555.
- [7] Shen X., Yan B., Photofunctional hybrids of lanthanide functionalized bio-MOF-1 for fluorescence tuning and sensing // *J. Colloid Interf. Sci.* - 2015. - V. 451, - P. 63-68.
- [8] Shen X., Yan B., Barcoded materials based on photoluminescent hybrid system of lanthanide ions-doped metal organic framework and silica via ion exchange // *J. Colloid Interf. Sci.* - 2016. - V. 468, - P. 220-226.
- [9] Dao X. Y., Ni Y. H., Al-Based coordination polymer nanotubes: simple preparation, post-modification and application in Fe³⁺ ions sensing // *Dalton Trans.* - 2017. - V. 46, No. 16. - P. 5373-5383.
- [10] Zhang Y. H., Li B., Ma H. P., Zhang L. M., Zheng Y. X., Rapid and facile ratiometric detection of an anthrax biomarker by regulating energy transfer process in bio-metal-organic framework // *Biosens. Bioelectron.* - 2016. - V. 85, - P. 287-293.
- [11] Lu G., Li S. Z., Guo Z., Farha O. K., Hauser B. G., Qi X. Y., Wang Y., Wang X., Han S. Y., Liu X. G., DuChene J. S., Zhang H., Zhang Q. C., Chen X. D., Ma J., Loo S. C. J., Wei W. D., Yang Y. H., Hupp J. T., Huo F. W., Imparting functionality to a metal-organic framework

material by controlled nanoparticle encapsulation // *Nat. Chem.* - 2012. - V. 4, No. 4. - P. 310-316.

[12] Rocha J., Brites C. D. S., Carlos L. D., Lanthanide organic framework luminescent thermometers // *Chem. Eur. J.* - 2016. - V. 22, No. 42. - P. 14782-14795.

[13] Lustig W. P., Mukherjee S., Rudd N. D., Desai A. V., Li J., Ghosh S. K., Metal-organic frameworks: functional luminescent and photonic materials for sensing applications // *Chem. Soc. Rev.* - 2017. - V. 46, No. 11. - P. 3242-3285.

[14] Escudero A., Becerro A. I., Carrillo-Carrion C., Nunez N. O., Zyuzin M. V., Laguna M., Gonzalez-Mancebo D., Ocana M., Parak W. J., Rare earth based nanostructured materials: synthesis, functionalization, properties and bioimaging and biosensing applications // *Nanophotonics* - 2017. - V. 6, No. 5. - P. 881-921.

[15] Vancaeyzeele C., Ornatsky O., Baranov V., Shen L., Abdelrahman A., Winnik M. A., Lanthanide-containing polymer nanoparticles for biological tagging applications: Nonspecific endocytosis and cell adhesion // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129, No. 44. - P. 13653-13660.

[16] Desbiens J., Bergeron B., Patry M., Ritcey A. M., Polystyrene nanoparticles doped with a luminescent europium complex // *J. Colloid Interf. Sci.* - 2012. - V. 376, - P. 12-19.

[17] Davydov N., Zairov R., Mustafina A., Syakayev V., Tatarinov D., Mironov V., Eremin S. A., Konovalov A., Mustafin M., Determination of fluoroquinolone antibiotics through the fluorescent response of Eu(III) based nanoparticles fabricated by layer-by-layer technique // *Anal. Chim. Acta.* - 2013. - V. 784, - P. 65-71.

[18] Li Z. J., Zhang H. W., Shen J. S., Preparation of stable luminescent poly(methyl methacrylate)-europium complex nanospheres and application in the detection of hydrogen peroxide with the biocatalytic growth of gold nanoparticles // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2013. - V. 128, No. 1. - P. 845-850.

[19] Zheng Z. C., Daniel A., Yu W., Weber B., Ling J., Muller A. H. E., Rare-earth metal cations incorporated silica hybrid nanoparticles templated by cylindrical polymer brushes // *Chem. Mater.* - 2013. - V. 25, No. 22. - P. 4585-4594.

[20] Foucault-Collet A., Shade C. M., Nazarenko I., Petoud S., Eliseeva S. V., Polynuclear Sm-III polyamidoamine-based dendrimer: A single probe for combined visible and near-infrared live-cell imaging // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2014. - V. 53, No. 11. - P. 2927-2930.

[21] Li Q., Zhang J. A., Sun W., Yu J. B., Wu C. F., Qin W. P., Chiu D. T., Europium-complex-grafted polymer dots for amplified quenching and cellular imaging applications // *Langmuir* - 2014. - V. 30, No. 28. - P. 8607-8614.

- [22] Zairov R., Zhilkin M., Mustafina A., Nizameev I., Tatarinov D., Konovalov A., Impact of polyelectrolyte coating in fluorescent response of Eu(III)-containing nanoparticles on small chelating anions including nucleotides // *Surf. Coat. Tech.* - 2015. - V. 271, - P. 242-246.
- [23] Yan B., Shao Y. F., Multifunctional nanocomposites of lanthanide (Eu³⁺, Tb³⁺) complexes functionalized magnetic mesoporous silica nanospheres covalently bonded with polymer modified ZnO // *Dalton Trans.* - 2013. - V. 42, No. 26. - P. 9565-9573.
- [24] Nichkova M., Dosev D., Gee S. J., Hammock B. D., Kennedy I. M., Microarray immunoassay for phenoxybenzoic acid using polymer encapsulated Eu:Gd₂O₃ nanoparticles as fluorescent labels // *Anal. Chem.* - 2005. - V. 77, No. 21. - P. 6864-6873.
- [25] Wang F., Chatterjee D. K., Li Z. Q., Zhang Y., Fan X. P., Wang M. Q., Synthesis of polyethylenimine/NaYF₄ nanoparticles with upconversion fluorescence // *Nanotechnology* - 2006. - V. 17, No. 23. - P. 5786-5791.
- [26] Ju Q. A., Luo W. Q., Liu Y. S., Zhu H. M., Li R. F., Chen X. Y., Poly (acrylic acid)-capped lanthanide-doped BaFCl nanocrystals: synthesis and optical properties // *Nanoscale* - 2010. - V. 2, No. 7. - P. 1208-1212.
- [27] Jin J. F., Gu Y. J., Man C. W. Y., Cheng J. P., Xu Z. H., Zhang Y., Wang H. S., Lee V. H. Y., Cheng S. H., Wong W. T., Polymer-coated NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ upconversion nanoparticles for charge-dependent cellular imaging // *Acs Nano* - 2011. - V. 5, No. 10. - P. 7838-7847.
- [28] Shan J. N., Budijono S. J., Hu G. H., Yao N., Kang Y. B., Ju Y. G., Prud'homme R. K., Pegylated composite nanoparticles containing upconverting phosphors and meso-tetraphenyl porphine (TPP) for photodynamic therapy // *Adv. Funct. Mater.* - 2011. - V. 21, No. 13. - P. 2488-2495.
- [29] Sun C., Pratz G., Carpenter C. M., Liu H. G., Cheng Z., Gambhir S. S., Xing L., Synthesis and radioluminescence of pegylated Eu³⁺-doped nanophosphors as bioimaging probes // *Adv. Mater.* - 2011. - V. 23, No. 24. - P. H195-H199.
- [30] Wang J. S., Li Y. X., Ge Q. Q., Yao H. C., Li Z. J., Preparation and luminescence of water soluble poly (N-vinyl-2-pyrrolidone)/LaF₃:Eu³⁺ nanocrystals // *Appl. Surf. Sci.* - 2011. - V. 257, No. 9. - P. 4100-4104.
- [31] Chen Y. C., Wu Y. C., Wang D. Y., Chen T. M., Controlled synthesis and luminescent properties of monodispersed PEI-modified YVO₄:Bi³⁺,Eu³⁺ nanocrystals by a facile hydrothermal process // *J. Mater. Chem.* - 2012. - V. 22, No. 16. - P. 7961-7969.
- [32] Esipova T. V., Ye X. C., Collins J. E., Sakadzic S., Mandeville E. T., Murray C. B., Vinogradov S. A., Dendritic upconverting nanoparticles enable in vivo multiphoton microscopy

- with low-power continuous wave sources // *P. Natl. Acad. Sci. USA* - 2012. - V. 109, No. 51. - P. 20826-20831.
- [33] Liu Y. X., Zhan S. P., Yang Q. B., Yan M. L., Synthesis of biocompatible uniform NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ nanocrystals and their characteristic photoluminescence // *J. Lumin.* - 2012. - V. 132, No. 11. - P. 3042-3047.
- [34] Ju Q., Campbell P. S., Mudring A. V., Interface-assisted ionothermal synthesis, phase tuning, surface modification and bioapplication of Ln³⁺-doped NaGdF₄ nanocrystals // *J. Mater. Chem. B* - 2013. - V. 1, No. 2. - P. 179-185.
- [35] Kang X. J., Yang D. M., Dai Y. L., Shang M. M., Cheng Z. Y., Zhang X., Lian H. Z., Ma P. A., Lin J., Poly(acrylic acid) modified lanthanide-doped GdVO₄ hollow spheres for up-conversion cell imaging, MRI and pH-dependent drug release // *Nanoscale* - 2013. - V. 5, No. 1. - P. 253-261.
- [36] Liu Z., Dong K., Liu J. H., Han X. L., Ren J. S., Qu X. G., Anti-biofouling polymer-decorated lutetium-based nanoparticulate contrast agents for in vivo high-resolution trimodal imaging // *Small* - 2014. - V. 10, No. 12. - P. 2429-2438.
- [37] Sarkar S., Dash A., Mahalingam V., Strong Stokes and upconversion luminescence from ultrasmall Ln³⁺-doped BiF₃ (Ln=Eu³⁺, Yb³⁺/Er³⁺) nanoparticles confined in a polymer matrix // *Chem. Asian J.* - 2014. - V. 9, No. 2. - P. 447-451.
- [38] Yi Z. G., Lu W., Xu Y. R., Yang J., Deng L., Qian C., Zeng T. M., Wang H. B., Rao L., Liu H. R., Zeng S. J., PEGylated NaLuF₄: Yb/Er upconversion nanophosphors for in vivo synergistic fluorescence/X-ray bioimaging and long-lasting, real-time tracking // *Biomaterials* - 2014. - V. 35, No. 36. - P. 9689-9697.
- [39] Cheng Z. Y., Lin J., Synthesis and application of nanohybrids based on upconverting nanoparticles and polymers // *Macromol. Rapid. Comm.* - 2015. - V. 36, No. 9. - P. 790-827.
- [40] Nuñez N. O., Zambrano P., García-Sevillano J., Cantelar E., Rivera-Fernández S., de la Fuente J. M., Ocaña M., Uniform poly(acrylic acid)-functionalized lanthanide-doped LaVO₄ nanophosphors with high colloidal stability and biocompatibility // *Eur. J. Inorg. Chem.* - 2015. - No. 27. - P. 4546-4554.
- [41] Jeyaraman J., Shukla A., Sivakumar S., Targeted stealth polymer capsules encapsulating Ln³⁺-doped LaVO₄ nanoparticles for bioimaging applications // *ACS Biomater. Sci. Eng.* - 2016. - V. 2, No. 8. - P. 1330-1340.
- [42] Li X. L., Xue Z. L., Liu H. R., Hydro-thermal synthesis of PEGylated Mn²⁺ dopant controlled NaYF₄: Yb/Er up-conversion nano-particles for multi-color tuning // *J. Alloys Compd.* - 2016. - V. 681, - P. 379-383.

- [43] Chen F., Wang Z. Y., Zhang Y. Y., Yu K. H., Weng L. X., Wei W., Synthesis of poly(acrylic acid)-functionalized $\text{La}_{1-x}\text{Eu}_x\text{F}_3$ nanocrystals with high photoluminescence for cellular imaging // *Acta. Phys.-Chim. Sin.* - 2017. - V. 33, No. 7. - P. 1446-1452.
- [44] Qin Q. S., Zhang P. Z., Sun L. D., Shi S., Chen N. X., Dong H., Zheng X. Y., Li L. M., Yan C. H., Ultralow-power near-infrared excited neodymium-doped nanoparticles for long-term in vivo bioimaging // *Nanoscale* - 2017. - V. 9, No. 14. - P. 4660-4664.
- [45] Yan K., Yu J. N., Zhang B. B., Wu L. M., Novel fluorinated polymer-mediated upconversion nanoclusters for pH/redox triggered anticancer drug release and intracellular imaging // *Macromol. Chem. Phys.* - 2017. - V. 218, No. 11. - Art. №1700090.
- [46] Ungun B., Prud'homme R. K., Budijono S. J., Shan J. N., Lim S. F., Ju Y. G., Austin R., Nanofabricated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy // *Opt. Express* - 2009. - V. 17, No. 1. - P. 80-86.
- [47] Sivakumar S., Diamente P. R., van Veggel F. C., Silica-coated Ln^{3+} -doped LaF_3 nanoparticles as robust down- and upconverting biolabels // *Chem. Eur. J.* - 2006. - V. 12, No. 22. - P. 5878-5884.
- [48] Shan J. N., Ju Y. G., Controlled synthesis of lanthanide-doped NaYF_4 upconversion nanocrystals via ligand induced crystal phase transition and silica coating // *Appl. Phys. Lett.* - 2007. - V. 91, No. 12. - P. 123103.
- [49] Ehlert O., Thomann R., Darbandi M., Nann T., A four-color colloidal multiplexing nanoparticle system // *Acs Nano* - 2008. - V. 2, No. 1. - P. 120-124.
- [50] Jiang S., Zhang Y., Lim K. M., Sim E. K. W., Ye L., NIR-to-visible upconversion nanoparticles for fluorescent labeling and targeted delivery of siRNA // *Nanotechnology* - 2009. - V. 20, No. 15. - Art. №155101.
- [51] Wang F., Wang J. A., Xu J., Xue X. J., Chen H. Y., Liu X. G., Tunable upconversion emissions from lanthanide-doped monodisperse- NaYF_4 nanoparticles // *Spectrosc. Lett.* - 2010. - V. 43, No. 5. - P. 400-405.
- [52] Ocaña M., Cantelar E., Cussó F., A facile single-step procedure for the synthesis of luminescent $\text{Ln}^{3+}:\text{YVO}_4$ ($\text{Ln}=\text{Eu}$ or $\text{Er}+\text{Yb}$)-silica nanocomposites // *Mater. Chem. Phys.* - 2011. - V. 125, No. 1-2. - P. 224-230.
- [53] Wang L. L., Chen H. A., Zhang D. S., Zhao D., Qin W. P., Dual-mode luminescence from lanthanide tri-doped NaYF_4 nanocrystals // *Mater. Lett.* - 2011. - V. 65, No. 3. - P. 504-506.
- [54] Xia A., Chen M., Gao Y., Wu D. M., Feng W., Li F. Y., Gd^{3+} complex-modified NaLuF_4 -based upconversion nanophosphors for trimodality imaging of NIR-to-NIR upconversion

luminescence, X-ray computed tomography and magnetic resonance // *Biomaterials* - 2012. - V. 33, No. 21. - P. 5394-5405.

[55] Chien Y. H., Chou Y. L., Wang S. W., Hung S. T., Liao M. C., Chao Y. J., Su C. H., Yeh C. S., Near-infrared light photocontrolled targeting, bioimaging, and chemotherapy with caged upconversion nanoparticles in vitro and in vivo // *ACS Nano* - 2013. - V. 7, No. 10. - P. 8516-8528.

[56] Liu F. Y., He X. X., Liu L., You H. P., Zhang H. M., Wang Z. X., Conjugation of NaGdF₄ upconverting nanoparticles on silica nanospheres as contrast agents for multi-modality imaging // *Biomaterials* - 2013. - V. 34, No. 21. - P. 5218-5225.

[57] Liu Q., Feng W., Yang T. S., Yi T., Li F. Y., Upconversion luminescence imaging of cells and small animals // *Nat. Protoc.* - 2013. - V. 8, No. 10. - P. 2033-2044.

[58] Kim T., Lee N., Park Y. I., Kim J., Kim J., Lee E. Y., Yi M., Kim B. G., Hyeon T., Yu T., Na H. B., Mesoporous silica-coated luminescent Eu³⁺ doped GdVO₄ nanoparticles for multimodal imaging and drug delivery // *RSC Adv.* - 2014. - V. 4, No. 86. - P. 45687-45695.

[59] Sun L. N., Ge X. Q., Liu J. L., Qiu Y. N., Wei Z. W., Tian B., Shi L. Y., Multifunctional nanomesoporous materials with upconversion (in vivo) and downconversion (in vitro) luminescence imaging based on mesoporous capping UCNPs and linking lanthanide complexes // *Nanoscale* - 2014. - V. 6, No. 21. - P. 13242-13252.

[60] Zhao L. Z., Peng J. J., Huang Q., Li C. Y., Chen M., Sun Y., Lin Q. N., Zhu L. Y., Li F. Y., Near-infrared photoregulated drug release in living tumor tissue via yolk-shell upconversion nanocages // *Adv. Funct. Mater.* - 2014. - V. 24, No. 3. - P. 363-371.

[61] Kostiv U., Janoušková O., Šlouf M., Kotov N., Engstová H., Smolková K., Ježek P., Horák D., Silica-modified monodisperse hexagonal lanthanide nanocrystals: synthesis and biological properties // *Nanoscale* - 2015. - V. 7, No. 43. - P. 18096-18104.

[62] Liu L. N., Xiao H. Y., An X. Y., Zhang Y. S., Qin R. F., Liu L. S., Zhang D. M., Sun R. R., Chen L. F., Synthesis and photoluminescence properties of core-shell structured YVO₄:Eu³⁺@SiO₂ nanocomposites // *Chem. Phys. Lett.* - 2015. - V. 619, - P. 169-173.

[63] Lu S., Tu D. T., Hu P., Xu J., Li R. F., Wang M., Chen Z., Huang M. D., Chen X. Y., Multifunctional nano-bioprobes based on rattle-structured upconverting luminescent nanoparticles // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2015. - V. 54, No. 27. - P. 7915-7919.

[64] Saif M., Shebl M., Nabeel A. I., Shokry R., Hafez H., Mbarek A., Damak K., Maalej R., Abdel-Mottaleb M. S. A., Novel non-toxic and red luminescent sensor based on Eu³⁺:Y₂Ti₂O₇/SiO₂ nano-powder for latent fingerprint detection // *Sensor. Actuat. B-Chem.* - 2015. - V. 220, - P. 162-170.

- [65] Wang Y. H., Song S. Y., Liu J. H., Liu D. P., Zhang H. J., ZnO-functionalized upconverting nanotheranostic agent: Multi-modality imaging-guided chemotherapy with on-demand drug release triggered by pH // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2015. - V. 54, No. 2. - P. 536-540.
- [66] Yang D. M., Ma P. A., Hou Z. Y., Cheng Z. Y., Li C. X., Lin J., Current advances in lanthanide ion (Ln^{3+})-based upconversion nanomaterials for drug delivery // *Chem. Soc. Rev.* - 2015. - V. 44, No. 6. - P. 1416-1448.
- [67] van Hest J. J. H. A., Blab G. A., Gerritsen H. C., Donega C. D., Meijerink A., Incorporation of Ln-doped LaPO_4 nanocrystals as luminescent markers in silica nanoparticles // *Nanoscale Res. Lett.* - 2016. - V. 11, - P. 261.
- [68] Kalluru P., Vankayala R., Chiang C. S., Hwang K. C., Unprecedented "all-in-one" lanthanide-doped mesoporous silica frameworks for fluorescence/MR imaging and combination of nir light triggered chemo-photodynamic therapy of tumors // *Adv. Funct. Mater.* - 2016. - V. 26, No. 43. - P. 7908-7920.
- [69] Szczeszak A., Ekner-Grzyb A., Runowski M., Szutkowski K., Mrówczyńska L., Kaźmierczak Z., Grzyb T., Dąbrowska K., Giersig M., Lis S., Spectroscopic, structural and in vitro cytotoxicity evaluation of luminescent, lanthanide doped core@shell nanomaterials $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}5\%@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ // *J. Colloid Interf. Sci.* - 2016. - V. 481, - P. 245-255.
- [70] Kowalik P., Elbaum D., Mikulski J., Fronc K., Kamińska I., Morais P. C., de Souza P. E., Nunes R. B., Veiga-Souza F. H., Gruzęł G., Minikayev R., Wojciechowski T., Mosiniewicz-Szablewska E., Szewczyk M., Pawlyta M., Sienkiewicz A., Łapiński M., Zajdel K., Stępień P., Szczepkowski J., Jastrzębski W., Frontczak-Baniewicz M., Paszkowicz W., Sikora B., Upconversion fluorescence imaging of HeLa cells using ROS generating SiO_2 -coated lanthanide-doped NaYF_4 nanoconstructs // *RSC Adv.* - 2017. - V. 7, No. 48. - P. 30262-30273.
- [71] Choi J., Kim J. C., Lee Y. B., Kim I. S., Park Y. K., Hur N. H., Fabrication of silica-coated magnetic nanoparticles with highly photoluminescent lanthanide probes // *Chem. Commun.* - 2007. - No. 16. - P. 1644-1646.
- [72] Zhang H., Xu Y., Yang W., Li Q. G., Dual-lanthanide-chelated silica nanoparticles as labels for highly sensitive time-resolved fluorometry // *Chem. Mater.* - 2007. - V. 19, No. 24. - P. 5875-5881.
- [73] Ai K. L., Zhang B. H., Lu L. H., Europium-based fluorescence nanoparticle sensor for rapid and ultrasensitive detection of an anthrax biomarker // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2009. - V. 48, No. 2. - P. 304-308.

- [74] Yu S. Y., Fu L. S., Zhou Y. J., Su H. Q., Novel bifunctional magnetic-near-infrared luminescent nanocomposites: near-infrared emission from Nd and Yb // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2011. - V. 10, No. 4. - P. 548-553.
- [75] Pinho S. L. C., Faneca H., Geraldes C. F. G. C., Delville M. H., Carlos L. D., Rocha J., Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents // *Biomaterials* - 2012. - V. 33, No. 3. - P. 925-935.
- [76] Pinho S. L. C., Faneca H., Geraldes C. F. G. C., Rocha J., Carlos L. D., Delville M. H., Silica nanoparticles for bimodal MRI-optical imaging by grafting Gd^{3+} and Eu^{3+}/Tb^{3+} complexes // *Eur. J. Inorg. Chem.* - 2012. - No. 16. - P. 2828-2837.
- [77] Weng Y. R., Zhao J., Yu S. Y., Song S. Y., Multifunctional visible/near-infrared luminescent core-shell magnetic silica structured nanocomposites // *Crystengcomm* - 2014. - V. 16, No. 27. - P. 6257-6262.
- [78] Liu Y., Sun L. N., Liu J. L., Peng Y. X., Ge X. Q., Shi L. Y., Huang W., Multicolor (Vis-NIR) mesoporous silica nanospheres linked with lanthanide complexes using 2-(5-bromothiophen)imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline for in vitro bioimaging // *Dalton Trans.* - 2015. - V. 44, No. 1. - P. 237-246.
- [79] Wu J., Ye Z. Q., Wang G. L., Jin D. Y., Yuan J. L., Guan Y. F., Piper J., Visible-light-sensitized highly luminescent europium nanoparticles: preparation and application for time-gated luminescence bioimaging // *J. Mater. Chem.* - 2009. - V. 19, No. 9. - P. 1258-1264.
- [80] Jiang H. F., Wang G. L., Zhang W. Z., Liu X. Y., Ye Z. Q., Jin D. Y., Yuan J. L., Liu Z. G., Preparation and time-resolved luminescence bioassay application of multicolor luminescent lanthanide nanoparticles // *J. Fluoresc.* - 2010. - V. 20, No. 1. - P. 321-328.
- [81] Guo X. M., Canet J. L., Boyer D., Gautier A., Mahiou R., Sol-gel emulsion synthesis of biphotonic core-shell nanoparticles based on lanthanide doped organic-inorganic hybrid materials // *J. Mater. Chem.* - 2012. - V. 22, No. 13. - P. 6117-6122.
- [82] Tian L., Dai Z. C., Zhang L., Zhang R. Y., Ye Z. Q., Wu J., Jin D. Y., Yuan J. L., Preparation and time-gated luminescence bioimaging applications of long wavelength-excited silica-encapsulated europium nanoparticles // *Nanoscale* - 2012. - V. 4, No. 11. - P. 3551-3557.
- [83] Lapadula G., Bourdolle A., Allouche F., Conley M. P., del Rosal I., Maron L., Lukens W. W., Guyot Y., Andraud C., Brasselet S., Copéret C., Maury O., Andersen R. A., Near-IR two photon microscopy imaging of silica nanoparticles functionalized with isolated sensitized Yb(III) centers // *Chem. Mater.* - 2014. - V. 26, No. 2. - P. 1062-1073.

- [84] Francis B., Neuhaus B., Reddy M. L. P., Epple M., Janiak C., Amine-functionalized silica nanoparticles incorporating covalently linked visible-light-excitable Eu^{3+} complexes: Synthesis, characterization, and cell-uptake studies // *Eur. J. Inorg. Chem.* - 2017. - No. 25. - P. 3205-3213.
- [85] Eliseeva S. V., Song B., Vandevyver C. D. B., Chauvin A. S., Wacker J. B., Bunzli J. C. G., Increasing the efficiency of lanthanide luminescent bioprobes: bioconjugated silica nanoparticles as markers for cancerous cells // *New J. Chem.* - 2010. - V. 34, No. 12. - P. 2915-2921.
- [86] Granadeiro C. M., Ferreira R. A. S., Soares-Santos P. C. R., Carlos L. D., Trindade T., Nogueira H. I. S., Lanthanopolyoxotungstates in silica nanoparticles: multi-wavelength photoluminescent core/shell materials // *J. Mater. Chem.* - 2010. - V. 20, No. 16. - P. 3313-3318.
- [87] Philippot C., Bourdolle A., Maury O., Dubois F., Boury B., Brustlein S., Brasselet S., Andraud C., Ibanez A., Doped silica nanoparticles containing two-photon luminescent Eu(III) complexes for the development of water stable bio-labels // *J. Mater. Chem.* - 2011. - V. 21, No. 46. - P. 18613-18622.
- [88] Gaillard C., Adumeau P., Canet J. L., Gautier A., Boyer D., Beaudoin C., Hesling C., Morel L., Mahiou R., Monodisperse silica nanoparticles doped with dipicolinic acid-based luminescent lanthanide(III) complexes for bio-labelling // *J. Mater. Chem. B* - 2013. - V. 1, No. 34. - P. 4306-4312.
- [89] Wu Y. Q., Shi M., Zhao L. Z., Feng W., Li F. Y., Huang C. H., Visible-light-excited and europium-emissive nanoparticles for highly-luminescent bioimaging in vivo // *Biomaterials* - 2014. - V. 35, No. 22. - P. 5830-5839.
- [90] Azevedo C. B., Batista T. M., de Faria E. H., Rocha L. A., Ciuffi K. J., Nassar E. J., Nanospherical silica as luminescent markers obtained by sol-gel // *J. Fluoresc.* - 2015. - V. 25, No. 2. - P. 433-440.
- [91] Chan M. H., Lin H. M., Preparation and identification of multifunctional mesoporous silica nanoparticles for in vitro and in vivo dual-mode imaging, theranostics, and targeted tracking // *Biomaterials* - 2015. - V. 46, - P. 149-158.
- [92] Zhao Q., Liu Y. H., Cao Y. F., Lv W., Yu Q., Liu S. J., Liu X. M., Shi M., Huang W., Rational design of nanoparticles with efficient lanthanide luminescence sensitized by iridium(III) complex for time-gated luminescence bioimaging // *Adv. Opt. Mater.* - 2015. - V. 3, No. 2. - P. 233-240.
- [93] Chen Y., Ai K. L., Liu J. H., Sun G. Y., Yin Q., Lu L. H., Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery and magnetic resonance imaging // *Biomaterials* - 2015. - V. 60, - P. 111-120.

- [94] Aguilera-Sigalat J., Bradshaw D., Synthesis and applications of metal-organic framework-quantum dot (QD@MOF) composites // *Coord. Chem. Rev.* - 2016. - V. 307, - P. 267-291.
- [95] Buso D., Jasieniak J., Lay M. D. H., Schiavuta P., Scopece P., Laird J., Amenitsch H., Hill A. J., Falcaro P., Highly luminescent metal-organic frameworks through quantum dot doping // *Small* - 2012. - V. 8, No. 1. - P. 80-88.
- [96] Kaur R., Paul A. K., Deep A., Nanocomposite of europium organic framework and quantum dots for highly sensitive chemosensing of trinitrotoluene // *Forensic Sci. Int.* - 2014. - V. 242, - P. 88-93.
- [97] Wang K., Li N., Zhang J., Zhang Z. Q., Dang F. Q., Size-selective QD@MOF core-shell nanocomposites for the highly sensitive monitoring of oxidase activities // *Biosens. Bioelectron.* - 2017. - V. 87, - P. 339-344.
- [98] Gao X. H., Yang L. L., Petros J. A., Marshal F. F., Simons J. W., Nie S. M., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots // *Curr. Opin. Biotech.* - 2005. - V. 16, No. 1. - P. 63-72.
- [99] Jorge P. A. S., Martins M. A., Trindade T., Santos J. L., Farahi F., Optical fiber sensing using quantum dots // *Sensors* - 2007. - V. 7, No. 12. - P. 3489-3534.
- [100] Anderson R. E., Chan W. C. W., Systematic investigation of preparing biocompatible, single, and small ZnS-capped CdSe quantum dots with amphiphilic polymers // *Acs Nano* - 2008. - V. 2, No. 7. - P. 1341-1352.
- [101] Behrendt J. M., Sutherland A. J., Quantum Dot–Polymer Bead Composites for Biological Sensing Applications, in: A. Merkoçi (Ed.), *Biosensing Using Nanomaterials*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, - 2009, PP. 291-331.
- [102] Sun T., Li K., Li Y. P., Li C. J., Zhao W. O., Chen L., Chang Y. L., Optimizing conditions for encapsulation of QDs by varying PEG chain density of amphiphilic centipede-like copolymer coating and exploration of QDs probes for tumor cell targeting and tracking // *New J. Chem.* - 2012. - V. 36, No. 11. - P. 2383-2391.
- [103] Ostermann J., Merkl J. P., Flessau S., Wolter C., Kornowski A., Schmidtke C., Pietsch A., Kloust H., Feld A., Weller H., Controlling the physical and biological properties of highly fluorescent aqueous quantum dots using block copolymers of different size and shape // *Acs Nano* - 2013. - V. 7, No. 10. - P. 9156-9167.
- [104] Bazylińska U., Drozdek S., Nyk M., Kulbacka J., Samoć M., Wilk K. A., Core/shell quantum dots encapsulated in biocompatible oil-core nanocarriers as two-photon fluorescent markers for bioimaging // *Langmuir* - 2014. - V. 30, No. 49. - P. 14931-14943.

- [105] Zvaigzne M. A., Martynov I. L., Samokhvalov P. S., Nabiev I. R., Fabrication of composite materials from semiconductor quantum dots and organic polymers for optoelectronics and biomedicine: role of surface ligands // *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* - 2016. - V. 65, No. 11. - P. 2568-2577.
- [106] Kas R., Sevinc E., Topal U., Acar H. Y., A universal method for the preparation of magnetic and luminescent hybrid nanoparticles // *J. Phys. Chem. C* - 2010. - V. 114, No. 17. - P. 7758-7766.
- [107] Beaune G., Tamang S., Bernardin A., Bayle-Guillemaud P., Fenel D., Schoehn G., Vinet F., Reiss P., Texier I., Luminescence of polyethylene glycol coated CdSeTe/ZnS and InP/ZnS nanoparticles in the presence of copper cations // *Chemphyschem* - 2011. - V. 12, No. 12. - P. 2247-2254.
- [108] Clift M. J. D., Brandenberger C., Rothen-Rutishauser B., Brown D. M., Stone V., The uptake and intracellular fate of a series of different surface coated quantum dots in vitro // *Toxicology* - 2011. - V. 286, No. 1-3. - P. 58-68.
- [109] Higuchi Y., Wu C., Chang K. L., Irie K., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells // *Biomaterials* - 2011. - V. 32, No. 28. - P. 6676-6682.
- [110] Lou L., Yu K., Zhang Z. L., Li B., Zhu J. Z., Wang Y. T., Huang R., Zhu Z. Q., Functionalized magnetic-fluorescent hybrid nanoparticles for cell labelling // *Nanoscale* - 2011. - V. 3, No. 5. - P. 2315-2323.
- [111] Mthethwa T. P., Moloto M. J., De Vries A., Matabola K. P., Properties of electrospun CdS and CdSe filled poly(methyl methacrylate) (PMMA) nanofibres // *Mater. Res. Bull.* - 2011. - V. 46, No. 4. - P. 569-575.
- [112] Thiry M., Boldt K., Nikolic M. S., Schulz F., Ijeh M., Panicker A., Vossmeier T., Weller H., Fluorescence properties of hydrophilic semiconductor nanoparticles with tridentate polyethylene oxide ligands // *ACS Nano* - 2011. - V. 5, No. 6. - P. 4965-4973.
- [113] Li Y., Shen B., Liu L., Xu H., Zhong X. H., Stable water-soluble quantum dots capped by poly(ethylene glycol) modified dithiocarbamate // *Colloid. Surf. A* - 2012. - V. 410, - P. 144-152.
- [114] Mansur A. A. P., Ramanery F. P., Mansur H. S., Water-soluble quantum dot/carboxylic-poly (vinyl alcohol) conjugates: Insights into the roles of nanointerfaces and defects toward enhancing photoluminescence behavior // *Mater. Chem. Phys.* - 2013. - V. 141, No. 1. - P. 223-233.

- [115] Susumu K., Oh E., Delehanty J. B., Pinaud F., Gemmill K. B., Walper S., Breger J., Schroeder M. J., Stewart M. H., Jain V., Whitaker C. M., Huston A. L., Medintz I. L., A new family of pyridine-appended multidentate polymers as hydrophilic surface ligands for preparing stable biocompatible quantum dots // *Chem. Mater.* - 2014. - V. 26, No. 18. - P. 5327-5344.
- [116] Zaba C., Bixner O., Part F., Zafiu C., Tan C. W., Sinner E. K., Preparation of water-soluble, PEGylated, mixed-dispersant quantum dots, with a preserved photoluminescence quantum yield // *RSC Adv.* - 2016. - V. 6, No. 32. - P. 27068-27076.
- [117] Zhang R., Deng T., Wang J., Wu G., Li S. R., Gu Y. Q., Deng D. W., Organic-to-aqueous phase transfer of Zn-Cu-In-Se/ZnS quantum dots with multifunctional multidentate polymer ligands for biomedical optical imaging // *New J. Chem.* - 2017. - V. 41, No. 13. - P. 5387-5394.
- [118] Tan W. B., Huang N., Zhang Y., Ultrafine biocompatible chitosan nanoparticles encapsulating multi-coloured quantum dots for bioapplications // *J. Colloid. Interf. Sci.* - 2007. - V. 310, No. 2. - P. 464-470.
- [119] Behrendt J. M., Afzaal M., Alexander L. M., Bradley M., Hine A. V., Nagel D., O'Brien P., Presland K., Sutherland A. J., Thiol-containing microspheres as polymeric ligands for the immobilisation of quantum dots // *J. Mater. Chem.* - 2009. - V. 19, No. 2. - P. 215-221.
- [120] Yordanov G., Simeonova M., Alexandrova R., Yoshimura H., Dushkin C., Quantum dots tagged poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for bioimaging applications // *Colloid. Surf. A* - 2009. - V. 339, No. 1-3. - P. 199-205.
- [121] Vaidya S. V., Couzis A., Maldarelli C., Reduction in aggregation and energy transfer of quantum dots incorporated in polystyrene beads by kinetic entrapment due to cross-linking during polymerization // *Langmuir* - 2015. - V. 31, No. 10. - P. 3167-3179.
- [122] Onoshima D., Yukawa H., Baba Y., Multifunctional quantum dots-based cancer diagnostics and stem cell therapeutics for regenerative medicine // *Adv. Drug Deliver. Rev.* - 2015. - V. 95, - P. 2-14.
- [123] Pisanello F., Martiradonna L., Sileo L., Brunetti V., Vecchio G., Malvindi M. A., Morello G., Zanella M., Pompa P. P., Manna L., De Vittorio M., Highly luminescent, flexible and biocompatible cadmium-based nanocomposites // *Microelectron. Eng.* - 2013. - V. 111, - P. 299-303.
- [124] Shi Y. F., Liu L., Pang H., Zhou H. L., Zhang G. Q., Ou Y. Y., Zhang X. Y., Du J. M., Xiao W. C., Facile preparation of highly luminescent CdTe quantum dots within hyperbranched poly(amidoamine)s and their application in bio-imaging // *Nanoscale Res. Lett.* - 2014. - V. 9, - Art. №115.

- [125] Li M., Xu C. Y., Wu L., Wu P., Hou X. D., Dually enriched Cu: CdS@ZnS QDs with both polyvinylpyrrolidone twisting and SiO₂ loading for improved cell imaging // Chem. Commun. - 2015. - V. 51, No. 17. - P. 3552-3555.
- [126] Shi Y. F., Wang Z. Y., Weng X. F., Zhou L. Z., Yuan B. Q., Deng J. M., Yang H. L., Wu H. K., Du W. M., Du J. M., Tong G. S., Zhu X. Y., Preparation of highly fluorescent and pH responsive CdTe quantum dots within dynamic covalent hyperbranched polymers and their in vitro application as fluorescence probe // Sci. Adv. Mater. - 2015. - V. 7, No. 4. - P. 615-622.
- [127] Radenkovic D., Kobayashi H., Ramsey-Semmelweis E., Seifalian A. M., Quantum dot nanoparticle for optimization of breast cancer diagnostics and therapy in a clinical setting // Nanomedicine: NBM - 2016. - V. 12, No. 6. - P. 1581-1592.
- [128] Zhu J. H., Wei S. Y., Patil R., Rutman D., Kucknoor A. S., Wang A., Guo Z. H., Ionic liquid assisted electrospinning of quantum dots/elastomer composite nanofibers // Polymer - 2011. - V. 52, No. 9. - P. 1954-1962.
- [129] Li Z. S., Wan S. L., Xu W., Wang Y. T., Shah B. R., Jin W. P., Chen Y. J., Li B., Highly luminescent film functionalized with CdTe quantum dots by layer-by-layer assembly // J. Appl. Polym. Sci. - 2015. - V. 132, No. 17. - Art. №41893.
- [130] Ye L., Yong K. T., Liu L. W., Roy I., Hu R., Zhu J., Cai H. X., Law W. C., Liu J. W., Wang K., Liu J., Liu Y. Q., Hu Y. Z., Zhang X. H., Swihart M. T., Prasad P. N., A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots // Nat. Nanotechnol. - 2012. - V. 7, No. 7. - P. 453-458.
- [131] Liu J. W., Erogbogbo F., Yong K. T., Ye L., Liu J., Hu R., Chen H. Y., Hu Y. Z., Yang Y., Yang J. H., Roy I., Karker N. A., Swihart M. T., Prasad P. N., Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: Studies in mice and monkeys // ACS Nano - 2013. - V. 7, No. 8. - P. 7303-7310.
- [132] Darbandi M., Thomann R., Nann T., Single quantum dots in silica spheres by microemulsion synthesis // Chem. Mater. - 2005. - V. 17, No. 23. - P. 5720-5725.
- [133] Yang H. S., Santra S., Walter G. A., Holloway P. H., Gd^{III}-functionalized fluorescent quantum dots as multimodal imaging probes // Adv. Mater. - 2006. - V. 18, No. 21. - P. 2890-2894.
- [134] Darbandi M., Thomann R., Nann T., Hollow silica nanospheres: In situ, semi-in situ, and two-step synthesis // Chem. Mater. - 2007. - V. 19, No. 7. - P. 1700-1703.

- [135] Selvan S. T., Patra P. K., Ang C. Y., Ying J. Y., Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2007. - V. 46, No. 14. - P. 2448-2452.
- [136] Tan T. T., Selvan S. T., Zhao L., Gao S. J., Ying J. Y., Size control, shape evolution, and silica coating of near-infrared-emitting PbSe quantum dots // *Chem. Mater.* - 2007. - V. 19, No. 13. - P. 3112-3117.
- [137] Koole R., van Schooneveld M. M., Hilhorst J., Donegá C. D., 't Hart D. C., van Blaaderen A., Vanmaekelbergh D., Meijerink A., On the incorporation mechanism of hydrophobic quantum dots in silica spheres by a reverse microemulsion method // *Chem. Mater.* - 2008. - V. 20, No. 7. - P. 2503-2512.
- [138] Koole R., Mulder W. J. M., van Schooneveld M. M., Strijkers G. J., Meijerink A., Nicolay K., Magnetic quantum dots for multimodal imaging // *Wires Nanomed. Nanobiol.* - 2009. - V. 1, No. 5. - P. 475-491.
- [139] Bardi G., Malvindi M. A., Gherardini L., Costa M., Pompa P. P., Cingolani R., Pizzorusso T., The biocompatibility of amino functionalized CdSe/ZnS quantum-dot-Doped SiO₂ nanoparticles with primary neural cells and their gene carrying performance // *Biomaterials* - 2010. - V. 31, No. 25. - P. 6555-6566.
- [140] Yang Y. H., Gao M. Y., Preparation of fluorescent SiO₂ particles with single CdTe nanocrystal cores by the reverse microemulsion method // *Adv. Mater.* - 2005. - V. 17, No. 19. - P. 2354-2357.
- [141] Yang Y. H., Jing L. H., Yu X. L., Yan D. D., Gao M. Y., Coating aqueous quantum dots with silica via reverse microemulsion method: Toward size-controllable and robust fluorescent nanoparticles // *Chem. Mater.* - 2007. - V. 19, No. 17. - P. 4123-4128.
- [142] Kumar R., Ding H., Hu R., Yong K. T., Roy I., Bergey E. J., Prasad P. N., In vitro and in vivo optical imaging using water-dispersible, noncytotoxic, luminescent, silica-coated quantum rods // *Chem. Mater.* - 2010. - V. 22, No. 7. - P. 2261-2267.
- [143] Zrazhevskiy P., Sena M., Gao X. H., Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery // *Chem. Soc. Rev.* - 2010. - V. 39, No. 11. - P. 4326-4354.
- [144] Zhelev Z., Ohba H., Bakalova R., Single quantum dot-micelles coated with silica shell as potentially non-cytotoxic fluorescent cell tracers // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - V. 128, No. 19. - P. 6324-6325.

- [145] Bakalova R., Zhelev Z., Kokuryo D., Spasov L., Aoki I., Saga T., Chemical nature and structure of organic coating of quantum dots is crucial for their application in imaging diagnostics // *Int. J. Nanomed.* - 2011. - V. 6, - P. 1719-1732.
- [146] Parak W. J., Gerion D., Zanchet D., Woerz A. S., Pellegrino T., Micheel C., Williams S. C., Seitz M., Bruehl R. E., Bryant Z., Bustamante C., Bertozzi C. R., Alivisatos A. P., Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots // *Chem. Mater.* - 2002. - V. 14, No. 5. - P. 2113-2119.
- [147] Zhang T. T., Stilwell J. L., Gerion D., Ding L. H., Elboudwarej O., Cooke P. A., Gray J. W., Alivisatos A. P., Chen F. F., Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements // *Nano Lett.* - 2006. - V. 6, No. 4. - P. 800-808.
- [148] Han L., Lv Y. Y., Asiri A. M., Al-Youbi A. O., Tu B., Zhao D. Y., Novel preparation and near-infrared photoluminescence of uniform core-shell silver sulfide nanoparticle@mesoporous silica nanospheres // *J. Mater. Chem.* - 2012. - V. 22, No. 15. - P. 7274-7279.
- [149] Veerananarayanan S., Poulouse A. C., Mohamed M. S., Nagaoka Y., Iwai S., Nakagame Y., Kashiwada S., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D. S., Synthesis and application of luminescent single CdS quantum dot encapsulated silica nanoparticles directed for precision optical bioimaging // *Int. J. Nanomed.* - 2012. - V. 7, - P. 3769-3786.
- [150] Kobayashi Y., Matsudo H., Nakagawa T., Kubota Y., Gonda K., Ohuchi N., In-vivo fluorescence imaging technique using colloid solution of multiple quantum dots/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticles // *J. Sol-Gel Sci. Techn.* - 2013. - V. 66, No. 1. - P. 31-37.
- [151] Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., Cancer Statistics, 2015 // *CA Cancer J. Clin.* - 2015. - V. 65, No. 1. - P. 5-29.
- [152] Miller K. D., Siegel R. L., Lin C. C., Mariotto A. B., Kramer J. L., Rowland J. H., Stein K. D., Alteri R., Jemal A., Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 // *CA Cancer J. Clin.* - 2016. - V. 66, No. 4. - P. 271-289.
- [153] Hartinger C. G., Jakupec M. A., Zorbas-Seifried S., Groessl M., Egger A., Berger W., Zorbas H., Dyson P. J., Keppler B. K., KP1019, a new redox-active anticancer agent - preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients // *Chem. Biodivers.* - 2008. - V. 5, No. 10. - P. 2140-2155.
- [154] Trondl R., Heffeter P., Kowol C. R., Jakupec M. A., Berger W., Keppler B. K., NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application // *Chem. Sci.* - 2014. - V. 5, No. 8. - P. 2925-2932.

- [155] Heinemann F., Karges J., Gasser G., Critical overview of the use of Ru(II) polypyridyl complexes as photosensitizers in one-photon and two-photon photodynamic therapy // *Accounts Chem. Res.* - 2017. - V. 50, No. 11. - P. 2727-2736.
- [156] Kent C. A., Liu D. M., Ma L. Q., Papanikolas J. M., Meyer T. J., Lin W. B., Light harvesting in microscale metal-organic frameworks by energy migration and interfacial electron transfer quenching // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - V. 133, No. 33. - P. 12940-12943.
- [157] Liu D. M., Huxford R. C., Lin W. B., Phosphorescent nanoscale coordination polymers as contrast agents for optical imaging // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2011. - V. 50, No. 16. - P. 3696-3700.
- [158] Barrett S. M., Wang C., Lin W. B., Oxygen sensing via phosphorescence quenching of doped metal-organic frameworks // *J. Mater. Chem.* - 2012. - V. 22, No. 20. - P. 10329-10334.
- [159] Maza W. A., Morris A. J., Photophysical characterization of a ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridine)-doped zirconium UiO-67 metal organic framework // *J. Phys. Chem. C* - 2014. - V. 118, No. 17. - P. 8803-8817.
- [160] Maza W. A., Ahrenholtz S. R., Epley C. C., Day C. S., Morris A. J., Solvothermal growth and photophysical characterization of a ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridine)-doped zirconium UiO-67 metal organic framework thin film // *J. Phys. Chem. C* - 2014. - V. 118, No. 26. - P. 14200-14210.
- [161] Xiong C. Y., Wang H. J., Liang W. B., Yuan Y. L., Yuan R., Chai Y. Q., Luminescence-functionalized metal-organic frameworks based on a ruthenium(II) complex: A signal amplification strategy for electrogenerated chemiluminescence immunosensors // *Chem. Eur. J.* - 2015. - V. 21, No. 27. - P. 9825-9832.
- [162] Sen R., Koner S., Bhattacharjee A., Kusz J., Miyashita Y., Okamoto K. I., Entrapment of $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ in the anionic metal-organic framework: Novel photoluminescence behavior exhibiting dual emission at room temperature // *Dalton Trans.* - 2011. - V. 40, No. 26. - P. 6952-6960.
- [163] Larsen R. W., Wojtas L., Photophysical studies of Ru(II)tris(2,2'-bipyridine) confined within a Zn(II)-trimesic acid polyhedral metal-organic framework // *J. Phys. Chem. A* - 2012. - V. 116, No. 30. - P. 7830-7835.
- [164] Kent C. A., Liu D. M., Ito A., Zhang T., Brennaman M. K., Meyer T. J., Lin W. B., Rapid energy transfer in non-porous metal-organic frameworks with caged $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ chromophores: oxygen trapping and luminescence quenching // *J. Mater. Chem. A* - 2013. - V. 1, No. 47. - P. 14982-14989.

- [165] Tang Y. Q., He W. H., Lu Y. L., Fielden J., Xiang X., Yan D. P., Assembly of ruthenium-based complex into metal-organic framework with tunable area-selected luminescence and enhanced photon-to-electron conversion efficiency // *J. Phys. Chem. C* - 2014. - V. 118, No. 44. - P. 25365-25373.
- [166] Whittington C. L., Wojtas L., Larsen R. W., Ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridine)-templated zinc(II) 1,3,5-tris(4-carboxyphenyl)benzene metal organic frameworks: Structural characterization and photophysical properties // *Inorg. Chem.* - 2014. - V. 53, No. 1. - P. 160-166.
- [167] Whittington C. L., Wojtas L., Gao W. Y., Ma S. Q., Larsen R. W., A new photoactive Ru(II)tris(2,2'-bipyridine) templated Zn(II) benzene-1,4-dicarboxylate metal organic framework: Structure and photophysical properties // *Dalton Trans.* - 2015. - V. 44, No. 12. - P. 5331-5337.
- [168] Zhang W. X., Li B., Ma H. P., Zhang L. M., Guan Y. L., Zhang Y. H., Zhang X. D., Jing P. T., Yue S. M., Combining ruthenium(II) complexes with metal-organic frameworks to realize effective two-photon absorption for singlet oxygen generation // *ACS Appl. Mater. Inter.* - 2016. - V. 8, No. 33. - P. 21465-21471.
- [169] Larsen R. W., Wojtas L., Photophysical properties of $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_3]^{2+}$ encapsulated within the UiO-66 zirconium based metal organic framework // *J. Solid State Chem.* - 2017. - V. 247, - P. 77-82.
- [170] Rojas S., Quartapelle-Procopio E., Carmona F. J., Romero M. A., Navarro J. A. R., Barea E., Biophysical characterisation, antitumor activity and MOF encapsulation of a half-sandwich ruthenium(II) mitoxantronato system // *J. Mater. Chem. B* - 2014. - V. 2, No. 17. - P. 2473-2477.
- [171] Chen R., Zhang J. F., Chelora J., Xiong Y., Kershaw S. V., Li K. F., Lo P. K., Cheah K. W., Rogach A. L., Zapien J. A., Lee C. S., Ruthenium(II) complex incorporated UiO-67 metal-organic framework nanoparticles for enhanced two-photon fluorescence imaging and photodynamic cancer therapy // *ACS Appl. Mater. Inter.* - 2017. - V. 9, No. 7. - P. 5699-5708.
- [172] Coogan M. P., Court J. B., Gray V. L., Hayes A. J., Lloyd S. H., Millet C. O., Pope S. J. A., Lloyd D., Probing intracellular oxygen by quenched phosphorescence lifetimes of nanoparticles containing polyacrylamide-embedded $[\text{Ru}(\text{dpp}(\text{SO}_3\text{Na})_2)_3]\text{Cl}_2$ // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2010. - V. 9, No. 1. - P. 103-109.
- [173] Feng Y. Q., Sun F., Wang N. N., Lei J. P., Ju H. X., Ru(bpy) $_3^{2+}$ incorporated luminescent polymer dots: Double-enhanced electrochemiluminescence for detection of single-nucleotide polymorphism // *Anal. Chem.* - 2017. - V. 89, No. 14. - P. 7659-7666.

- [174] Maggioni D., Fenili F., D'Alfonso L., Donghi D., Panigati M., Zanoni I., Marzi R., Manfredi A., Ferruti P., D'Alfonso G., Ranucci E., Luminescent rhenium and ruthenium complexes of an amphoteric poly(amidoamine) functionalized with 1,10-phenanthroline // *Inorg. Chem.* - 2012. - V. 51, No. 23. - P. 12776-12788.
- [175] Wang X. D., Achatz D. E., Hupf C., Sperber M., Wegener J., Bange S., Lupton J. M., Wolfbeis O. S., Imaging of cellular oxygen via two-photon excitation of fluorescent sensor nanoparticles // *Sensor. Actuat. B-Chem.* - 2013. - V. 188, - P. 257-262.
- [176] Bandyopadhyay S., Métivier R., Pallavi P., Preis E., Nakatani K., Landfester K., Patra A., Scherf U., Conjugated polymer nanoparticle-triplet emitter hybrids in aqueous dispersion: Fabrication and fluorescence quenching behavior // *Macromol. Rapid. Comm.* - 2016. - V. 37, No. 3. - P. 271-277.
- [177] Huang L.-L., Xu J., Jin Y.-J., Zhao D.-X., Xie H.-Y., Ru(II) polypyridyl complex-incorporated and folate-conjugated vehicle for cancer cell imaging and photoinduced inactivation // *Analyst* - 2016. - V. 141, No. 10. - P. 2948-2954.
- [178] Linares E. M., Formiga A., Kubota L. T., Galembeck F., Thalhammer S., One-step synthesis of polymer core-shell particles with a carboxylated ruthenium complex: a potential tool for biomedical applications // *J. Mater. Chem. B* - 2013. - V. 1, No. 17. - P. 2236-2244.
- [179] He X. X., Wang K. M., Tan W. H., Xiao D., Li J., Yang X. H., A novel fluorescent label based on biological fluorescent nanoparticles and its application in cell recognition // *Chinese Sci. Bull.* - 2001. - V. 46, No. 23. - P. 1962-1965.
- [180] Zhang P., Guo J. H., Wang Y., Pang W. Q., Incorporation of luminescent tris(bipyridine)ruthenium(II) complex in mesoporous silica spheres and their spectroscopic and oxygen-sensing properties // *Mater. Lett.* - 2002. - V. 53, No. 6. - P. 400-405.
- [181] Rossi L. M., Shi L. F., Quina F. H., Rosenzweig Z., Stöber synthesis of monodispersed luminescent silica nanoparticles for bioanalytical assays // *Langmuir* - 2005. - V. 21, No. 10. - P. 4277-4280.
- [182] Santra S., Bagwe R. P., Dutta D., Stanley J. T., Walter G. A., Tan W., Moudgil B. M., Mericle R. A., Synthesis and characterization of fluorescent, radio-opaque, and paramagnetic silica nanoparticles for multimodal bioimaging applications // *Adv. Mater.* - 2005. - V. 17, No. 18. - P. 2165-2169.
- [183] Rossi L. M., Shi L. F., Rosenzweig N., Rosenzweig Z., Fluorescent silica nanospheres for digital counting bioassay of the breast cancer marker HER2/nue // *Biosens. Bioelectron.* - 2006. - V. 21, No. 10. - P. 1900-1906.

- [184] Bottini M., Cerignoli F., Mills D. M., D'Annibale F., Leone M., Rosato N., Magrini A., Pellicchia M., Bergamaschi A., Mustelin T., Luminescent silica nanobeads: Characterization and evaluation as efficient cytoplasmatic transporters for T-lymphocytes // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129, No. 25. - P. 7814-7823.
- [185] Hun X., Zhang Z. J., Fluoroimmunoassay for tumor necrosis factor- α in human serum using $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ -doped fluorescent silica nanoparticles as labels // *Talanta* - 2007. - V. 73, No. 2. - P. 366-371.
- [186] Kim J. S., Rieter W. J., Taylor K. M. L., An H., Lin W. L., Lin W. B., Self-assembled hybrid nanoparticles for cancer-specific multimodal imaging // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129, No. 29. - P. 8962-8963.
- [187] Rieter W. J., Kim J. S., Taylor K. M. L., An H. Y., Lin W. L., Tarrant T., Lin W. B., Hybrid silica nanoparticles for multimodal Imaging // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 2007. - V. 46, No. 20. - P. 3680-3682.
- [188] Fent K., Weisbrod C. J., Wirth-Heller A., Pielek U., Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages // *Aquat. Toxicol.* - 2010. - V. 100, No. 2. - P. 218-228.
- [189] Wang S. L., Li B., Zhang L. M., Liu L., Wang Y. H., Photoluminescent and oxygen sensing properties of core-shell nanospheres based on a covalently grafted ruthenium(II) complex // *Appl. Organomet. Chem.* - 2011. - V. 25, No. 1. - P. 21-26.
- [190] Babu E., Mareeswaran P. M., Rajagopal S., Highly sensitive optical biosensor for thrombin based on structure switching aptamer-luminescent silica nanoparticles // *J. Fluoresc.* - 2013. - V. 23, No. 1. - P. 137-146.
- [191] Lipani E., Laurent S., Surin M., Elst L. V., Leclere P., Muller R. N., High-relaxivity and luminescent silica nanoparticles as multimodal agents for molecular imaging // *Langmuir* - 2013. - V. 29, No. 10. - P. 3419-3427.
- [192] Mirenda M., Levi V., Bossi M. L., Bruno L., Bordoni A. V., Regazzoni A. E., Wolosiuk A., Temperature response of luminescent tris(bipyridine)ruthenium(II)-doped silica nanoparticles // *J. Colloid Interf. Sci.* - 2013. - V. 392, - P. 96-101.
- [193] Yang L., Peng H. S., Ding H., You F. T., Hou L. L., Teng F., Luminescent $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -doped silica nanoparticles for imaging of intracellular temperature // *Microchim. Acta* - 2014. - V. 181, No. 7-8. - P. 743-749.
- [194] Huang X. N., Jiang H., Li Y. X., Sang L. J., Zhou H. P., Shahzad S. A., Ibupoto Z. H., Yu C., Synthesis of silica nanoparticles doped with $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ and decorated with silver

nanoclusters for the ratiometric photoluminescent determination and intracellular imaging of Cu(II) ions // *Microchim. Acta* - 2017. - V. 184, No. 7. - P. 2325-2331.

[195] Santoro S., Sebastian V., Moro A. J., Portugal C. A. M., Lima J. C., Coelho I. M., Crespo J. G., Mallada R., Development of fluorescent thermoresponsive nanoparticles for temperature monitoring on membrane surfaces // *J. Colloid Interf. Sci.* - 2017. - V. 486, - P. 144-152.

[196] Li M. J., Chen Z. F., Yam V. W. W., Zu Y. B., Multifunctional ruthenium(II) polypyridine complex-based core-shell magnetic silica nanocomposites: Magnetism, luminescence, and electrochemiluminescence // *Acs Nano* - 2008. - V. 2, No. 5. - P. 905-912.

[197] Song C. H., Ye Z. Q., Wang G. L., Jin D. Y., Yuan J. L., Guan Y. F., Piper J., Preparation and time-gated luminescence bioimaging application of ruthenium complex covalently bound silica nanoparticles // *Talanta* - 2009. - V. 79, No. 1. - P. 103-108.

[198] Wang Y. Y., Li B., Zhang L. M., Song H., Multifunctional mesoporous nanocomposites with magnetic, optical, and sensing features: Synthesis, characterization, and their oxygen-sensing performance // *Langmuir* - 2013. - V. 29, No. 4. - P. 1273-1279.

[199] Liang W. B., Zhuo Y., Xiong C. Y., Zheng Y. N., Chai Y. Q., Yuan R., Ultrasensitive cytosensor based on self-enhanced electrochemiluminescent ruthenium-silica composite nanoparticles for efficient drug screening with cell apoptosis monitoring // *Anal. Chem.* - 2015. - V. 87, No. 24. - P. 12363-12371.

[200] Sábio R. M., Gressier M., Caiut J. M. A., Menu M. J., Ribeiro S. J. L., Luminescent multifunctional hybrids obtained by grafting of ruthenium complexes on mesoporous silica // *Mater. Lett.* - 2016. - V. 174, - P. 1-5.

[201] Lechevallier S., Mauricot R., Gros-Dagnac H., Chevreux S., Lemercier G., Phonesouk E., Golzio M., Verelst M., Silica-based nanoparticles as bifunctional and bimodal imaging contrast agents // *Chempluschem* - 2017. - V. 82, No. 5. - P. 770-777.

[202] Frascioni M., Liu Z. C., Lei J. Y., Wu Y. L., Strelakova E., Malin D., Ambrogio M. W., Chen X. Q., Botros Y. Y., Cryns V. L., Sauvage J. P., Stoddart J. F., Photoexpulsion of surface-grafted ruthenium complexes and subsequent release of cytotoxic cargos to cancer cells from mesoporous silica nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2013. - V. 135, No. 31. - P. 11603-11613.

[203] Cotton F. A., Wing R. M., A. Z. R., Far-infrared spectra of metal atom cluster compounds. I. $\text{Mo}_6\text{X}_8^{4+}$ derivatives // *Inorg. Chem.* - 1967. - V. 6, No. 1. - P. 11-15.

[204] Kirakci K., Kubát P., Fejfarová K., Martinčík J., Nikl M., Lang K., X-ray inducible luminescence and singlet oxygen sensitization by an octahedral molybdenum cluster compound: A new class of nanoscintillators // *Inorg. Chem.* - 2016. - V. 55, No. 2. - P. 803-809.

- [205] Evtushok D. V., Melnikov A. R., Vorotnikova N. A., Vorotnikov Y. A., Ryadun A. A., Kuratieva N. V., Kozyr K. V., Obedinskaya N. R., Kretov E. I., Novozhilov I. N., Mironov Y. V., Stass D. V., Efremova O. A., Shestopalov M. A., A comparative study of optical properties and X-ray induced luminescence of octahedral molybdenum and tungsten cluster complexes // Dalton Trans. - 2017. - V. 46, No. 35. - P. 11738-11747.
- [206] Kirakci K., Kubát P., Kučeráková M., Šícha V., Gbelcová H., Lovecká P., Grznárová P., Ruml T., Lang K., Water-soluble octahedral molybdenum cluster compounds $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{N}_3)_6]$ and $\text{Na}_2[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{NCS})_6]$: Syntheses, luminescence, and in vitro studies // Inorg. Chim. Acta - 2016. - V. 441, - P. 42-49.
- [207] Dybtsev D. N., Kovalenko K. A., Mironov Y. V., Fedin V. P., Ferey G., Yakovleva N. A., Berdonosova E. A., Klyamkin S. N., Kogan E. V., Reversible sorption of hydrogen on the novel hybrid material based on mesoporous chromium(III) terephthalate with included rhenium clusters // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. - 2009. - V. 58, No. 8. - P. 1623-1626.
- [208] Dybtsev D., Serre C., Schmitz B., Panella B., Hirscher M., Latroche M., Llewellyn P. L., Cordier S., Molard Y., Haouas M., Taulelle F., Ferey G., Influence of $[\text{Mo}_6\text{Br}_8\text{F}_6]^{2-}$ cluster unit inclusion within the mesoporous solid MIL-101 on hydrogen storage performance // Langmuir - 2010. - V. 26, No. 13. - P. 11283-11290.
- [209] Kovalenko K. A., Dybtsev D. N., Lebedkin S. F., Fedin V. P., Luminescence properties of mesoporous chromium(III) terephthalate and inclusion compounds of cluster complexes // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. - 2010. - V. 59, No. 4. - P. 741-744.
- [210] Klyamkin S. N., Berdonosova E. A., Kogan E. V., Kovalenko K. A., Dybtsev D. N., Fedin V. P., Influence of MIL-101 doping by ionic clusters on hydrogen storage performance up to 1900 bar // Chem. Asian J. - 2011. - V. 6, No. 7. - P. 1854-1859.
- [211] Cheplakova A. M., Kovalenko K. A., Shestopalov M. A., Brylev K. A., Fedin V. P., Rhenium octahedral clusters in mesoporous MIL-101: luminescence and sorption properties // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. - 2014. - V. 63, No. 7. - P. 1487-1492.
- [212] Litvinova Y. M., Gayfulin Y. M., Kovalenko K. A., Samsonenko D. G., van Leusen J., Korolkov I. V., Fedin V. P., Mironov Y. V., Multifunctional metal-organic frameworks based on redox-active rhenium octahedral clusters // Inorg. Chem. - 2018. - V. 57, No. 4. - P. 2072-2084.
- [213] Jackson J. A., Newsham M. D., Worsham C., Nocera D. G., Efficient singlet oxygen generation from polymers derivatized with hexanuclear molybdenum clusters // Chem. Mater. - 1996. - V. 8, No. 2. - P. 558-564.

- [214] Robinson L. M., Shriver D. F., Synthesis and photophysical properties of polymer-bound hexanuclear molybdenum clusters // *J. Coord. Chem.* - 1996. - V. 37, No. 1-4. - P. 119-129.
- [215] Ghosh R. N., Baker G. L., Ruud C., Nocera D. G., Fiber-optic oxygen sensor using molybdenum chloride cluster luminescence // *Appl. Phys. Lett.* - 1999. - V. 75, No. 19. - P. 2885-2887.
- [216] Ghosh R. N., Askeland P. A., Kramer S., Loloee R., Optical dissolved oxygen sensor utilizing molybdenum chloride cluster phosphorescence // *Appl. Phys. Lett.* - 2011. - V. 98, - Art. №221103.
- [217] Garreau A., Massuyeau F., Cordier S., Molard Y., Gautron E., Bertoncini P., Faulques E., Wery J., Humbert B., Bulou A., Duvail J. L., Color control in coaxial two-luminophore nanowires // *Acs Nano* - 2013. - V. 7, No. 4. - P. 2977-2987.
- [218] Zhao Y., Lunt R. R., Transparent luminescent solar concentrators for large-area solar windows enabled by massive stokes-shift nanocluster phosphors // *Adv. Energy Mater.* - 2013. - V. 3, No. 9. - P. 1143-1148.
- [219] Elistratova J., Mikhailov M., Burilov V., Babaev V., Rizvanov I., Mustafina A., Abramov P., Sokolov M., Konovalov A., Fedin V., Supramolecular assemblies of triblock copolymers with hexanuclear molybdenum clusters for sensing antibiotics in aqueous solutions via energy transfer // *RSC Adv.* - 2014. - V. 4, No. 53. - P. 27922-27930.
- [220] Kirakci K., Šícha V., Holub J., Kubát P., Lang K., Luminescent hydrogel particles prepared by self-assembly of beta-cyclodextrin polymer and octahedral molybdenum cluster complexes // *Inorg. Chem.* - 2014. - V. 53, No. 24. - P. 13012-13018.
- [221] Elistratova J., Burilov V., Mustafina A., Mikhailov M., Sokolov M., Fedin V., Konovalov A., Triblock copolymer-based luminescent organic-inorganic hybrids triggered by heating and fluoroquinolone antibiotics // *Polymer* - 2015. - V. 72, - P. 98-103.
- [222] Robin M., Kuai W. L., Amela-Cortes M., Cordier S., Molard Y., Mohammed-Brahim T., Jacques E., Harnois M., Epoxy based ink as versatile material for inkjet-printed devices // *ACS Appl. Mater. Inter.* - 2015. - V. 7, No. 39. - P. 21975-21984.
- [223] Nguyen T. K. N., Dierre B., Grasset F., Dumait N., Cordier S., Lemoine P., Renaud A., Fudouzi H., Ohashi N., Uchikoshi T., Electrophoretic coating of octahedral molybdenum metal clusters for UV/NIR light screening // *Coatings* - 2017. - V. 7, No. 8. - Art. №114.
- [224] Adamenko O. A., Loukova G. V., Smirnov V. A., Luminescence of salts and copolymers containing the $(\text{Mo}^{\text{II}}\text{C}_8)^{4+}$ cluster // *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* - 2002. - V. 51, No. 6. - P. 994-997.

- [225] Molard Y., Dorson F., Brylev K. A., Shestopalov M. A., Le Gal Y., Cordier S., Mironov Y. V., Kitamura N., Perrin C., Red-NIR luminescent hybrid poly(methyl methacrylate) containing covalently linked octahedral rhenium metallic clusters // *Chem. Eur. J.* - 2010. - V. 16, No. 19. - P. 5613-5619.
- [226] Efremova O. A., Shestopalov M. A., Chirtsova N. A., Smolentsev A. I., Mironov Y. V., Kitamura N., Brylev K. A., Sutherland A. J., A highly emissive inorganic hexamolybdenum cluster complex as a handy precursor for the preparation of new luminescent materials // *Dalton Trans.* - 2014. - V. 43, No. 16. - P. 6021-6025.
- [227] Vorotnikova N. A., Efremova O. A., Tsygankova A. R., Brylev K. A., Edeleva M. V., Kurskaya O. G., Sutherland A. J., Shestopalov A. M., Mironov Y. V., Shestopalov M. A., Characterization and cytotoxicity studies of thiol-modified polystyrene microbeads doped with $[\{Mo_6X_8\}(NO_3)_6]^{2-}$ (X=Cl, Br, I) // *Polym. Adv. Technol.* - 2016. - V. 27, No. 7. - P. 922-928.
- [228] Elistratova J. G., Brylev K. A., Solovieva A. O., Pozmogova T. N., Mustafina A. R., Shestopalova L. V., Shestopalov M. A., Syakayev V. V., Karasik A. A., Sinyashin O. G., Supporting effect of polyethylenimine on hexarhenium hydroxo cluster complex for cellular imaging applications // *J. Photochem. Photobiol. A* - 2017. - V. 340, - P. 46-52.
- [229] Vorotnikova N. A., Edeleva M. V., Kurskaya O. G., Brylev K. A., Shestopalov A. M., Mironov Y. V., Sutherland A. J., Efremova O. A., Shestopalov M. A., One-pot synthesis of $\{Mo_6I_8\}^{4+}$ -doped polystyrene microspheres via a free radical dispersion copolymerisation reaction // *Polym. Int.* - 2017. - V. 66, No. 12. - P. 1906-1912.
- [230] Amela-Cortes M., Garreau A., Cordier S., Faulques E., Duvail J. L., Molard Y., Deep red luminescent hybrid copolymer materials with high transition metal cluster content // *J. Mater. Chem. C* - 2014. - V. 2, No. 8. - P. 1545-1552.
- [231] Amela-Cortes M., Paofai S., Cordier S., Folliot H., Molard Y., Tuned red NIR phosphorescence of polyurethane hybrid composites embedding metallic nanoclusters for oxygen sensing // *Chem. Commun.* - 2015. - V. 51, No. 38. - P. 8177-8180.
- [232] Amela-Cortes M., Molard Y., Paofai S., Desert A., Duvail J. L., Naumov N. G., Cordier S., Versatility of the ionic assembling method to design highly luminescent PMMA nanocomposites containing $[M_6Q_8^iL_6^a]^{n-}$ octahedral nano-building blocks // *Dalton Trans.* - 2016. - V. 45, No. 1. - P. 237-245.
- [233] Loulergue P., Amela-Cortes M., Cordier S., Molard Y., Lemiegre L., Audic J. L., Polyurethanes prepared from cyclocarbonated broccoli seed oil (PUcc): New biobased organic matrices for incorporation of phosphorescent metal nanocluster // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2017. - V. 134, No. 45. - P. 45339.

- [234] Efremova O. A., Brylev K. A., Vorotnikov Y. A., Vejsadova L., Shestopalov M. A., Chimonides G. F., Mikes P., Topham P. D., Kim S. J., Kitamura N., Sutherland A. J., Photoluminescent materials based on PMMA and a highly-emissive octahedral molybdenum metal cluster complex // *J. Mater. Chem. C* - 2016. - V. 4, No. 3. - P. 497-503.
- [235] Beltrán A., Mikhailov M., Sokolov M. N., Perez-Laguna V., Rezusta A., Revillo M. J., Galindo F., A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* // *J. Mater. Chem. B* - 2016. - V. 4, No. 36. - P. 5975-5979.
- [236] Felip-León C., del Valle C. A., Pérez-Laguna V., Millán-Lou M. I., Miravet J. F., Mikhailov M., Sokolov M. N., Rezusta-López A., Galindo F., Superior performance of macroporous over gel type polystyrene as a support for the development of photo-bactericidal materials // *J. Mater. Chem. B* - 2017. - V. 5, No. 30. - P. 6058-6064.
- [237] Grasset F., Dorson F., Molard Y., Cordier S., Demange V., Perrin C., Marchi-Artzner V., Haneda H., One-pot synthesis and characterizations of bi-functional phosphor-magnetic @SiO₂ nanoparticles: controlled and structured association of Mo₆ cluster units and gamma-Fe₂O₃ nanocrystals // *Chem. Commun.* - 2008. - No. 39. - P. 4729-4731.
- [238] Grasset F., Dorson F., Cordier S., Molard Y., Perrin C., Marie A. M., Sasaki T., Haneda H., Bando Y., Mortier M., Water-in-oil microemulsion preparation and characterization of Cs₂[Mo₆X₁₄]@SiO₂ phosphor nanoparticles based on transition metal clusters (X = Cl, Br, and I) // *Adv. Mater.* - 2008. - V. 20, No. 1. - P. 143-148.
- [239] Aubert T., Cabello-Hurtado F., Esnault M. A., Neaime C., Leuret-Chauvel D., Jeanne S., Pellen P., Roiland C., Le Polles L., Saito N., Kimoto K., Haneda H., Ohashi N., Grasset F., Cordier S., Extended investigations on luminescent Cs₂[Mo₆Br₁₄]@SiO₂ nanoparticles: Physico-structural characterizations and toxicity studies // *J. Phys. Chem. C* - 2013. - V. 117, No. 39. - P. 20154-20163.
- [240] Dechézelles J. F., Aubert T., Grasset F., Cordier S., Barthou C., Schwob C., Maître A., Vallee R. A. L., Cramail H., Ravaine S., Fine tuning of emission through the engineering of colloidal crystals // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2010. - V. 12, No. 38. - P. 11993-11999.
- [241] Gao L., Peay M. A., Gray T. G., Encapsulation of phosphine-terminated rhenium(III) chalcogenide clusters in silica nanoparticles // *Chem. Mater.* - 2010. - V. 22, No. 23. - P. 6240-6245.
- [242] Aubert T., Ledneva A. Y., Grasset F., Kimoto K., Naumov N. G., Molard Y., Saito N., Haneda H., Cordier S., Synthesis and characterization of A₄[Re₆Q₈L₆]@SiO₂ red-emitting silica

nanoparticles based on Re_6 metal atom clusters ($A = \text{Cs}$ or K , $Q = \text{S}$ or Se , and $L = \text{OH}$ or CN) // *Langmuir* - 2010. - V. 26, No. 23. - P. 18512-18518.

[243] Neaime C., Amela-Cortes M., Grasset F., Molard Y., Cordier S., Dierre B., Mortier M., Takei T., Takahashi K., Haneda H., Verelst M., Lechevallier S., Time-gated luminescence bioimaging with new luminescent nanocolloids based on $[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{C}_2\text{F}_5\text{COO})_6]^{2-}$ metal atom clusters // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2016. - V. 18, No. 43. - P. 30166-30173.

[244] Pellen-Mussi P., Tricot-Doleux S., Neaime C., Nerambourg N., Cabello-Hurtado F., Cordier S., Grasset F., Jeanne S., Evaluation of functional SiO_2 nanoparticles toxicity by a 3D culture model // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2018. - V. 18, No. 5. - P. 3148-3157.

[245] Ge X. Q., Sun L. N., Ma B. B., Jin D., Dong L., Shi L. Y., Li N., Chen H. G., Huang W., Simultaneous realization of Hg^{2+} sensing, magnetic resonance imaging and upconversion luminescence in vitro and in vivo bioimaging based on hollow mesoporous silica coated UCNPs and ruthenium complex // *Nanoscale* - 2015. - V. 7, No. 33. - P. 13877-13887.

[246] Molard Y., Labbe C., Cardin J., Cordier S., Sensitization of Er^{3+} infrared photoluminescence embedded in a hybrid organic-inorganic copolymer containing octahedral molybdenum clusters // *Adv. Funct. Mater.* - 2013. - V. 23, No. 38. - P. 4821-4825.

[247] He S. Q., Krippes K., Ritz S., Chen Z. J., Best A., Butt H. J., Mailänder V., Wu S., Ultralow-intensity near-infrared light induces drug delivery by upconverting nanoparticles // *Chem. Commun.* - 2015. - V. 51, No. 2. - P. 431-434.

[248] Braack P., Simsek M. K., Preetz W., Synthesis, crystal structures, and vibrational spectra of $[(\text{Mo}_6\text{X}_8^i)\text{Y}_6^a]^{2-}$; $\text{X}^i = \text{Cl}, \text{Br}$; $\text{Y}^a = \text{NO}_3, \text{NO}_2$ // *Z. Anorg. Allg. Chem.* - 1998. - V. 624, No. 3. - P. 375-380.

[249] Férey G., Mellot-Draznieks C., Serre C., Millange F., Dutour J., Surblé S., Margiolaki I., A chromium terephthalate-based solid with unusually large pore volumes and surface area // *Science* - 2005. - V. 309, No. 5743. - P. 2040-2042.

[250] Summerbell R. K., R. B. D., Rearrangements of α -halogenated ethers. II. The preparation and some reactions of 2,3-diphenyl-p-dioxene // *J. Am. Chem. Soc.* - 1959. - V. 81, - P. 633-639.

[251] Jackson J. A., Turro C., Newsham M. D., Nocera D. G., Oxygen quenching of electronically excited hexanuclear molybdenum and tungsten halide clusters // *J. Phys. Chem.* - 1990. - V. 94, No. 11. - P. 4500-4507.

[252] Dahne L., Leporatti S., Donath E., Mohwald H., Fabrication of micro reaction cages with tailored properties // *J. Am. Chem. Soc.* - 2001. - V. 123, No. 23. - P. 5431-5436.

- [253] Kim B. S., Fan T. H., Lebedeva O. V., Vinogradova O. I., Superswollen ultrasoft polyelectrolyte microcapsules // *Macromolecules* - 2005. - V. 38, No. 19. - P. 8066-8070.
- [254] Mikhailov M. A., Brylev K. A., Abramov P. A., Sakuda E., Akagi S., Ito A., Kitamura N., Sokolov M. N., Synthetic tuning of redox, spectroscopic, and photophysical properties of $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}$ core cluster complexes by terminal carboxylate ligands // *Inorg. Chem.* - 2016. - V. 55, No. 17. - P. 8437-8445.
- [255] Efremova O. A., Vorotnikov Y. A., Brylev K. A., Vorotnikova N. A., Novozhilov I. N., Kuratieva N. V., Edeleva M. V., Benoit D. M., Kitamura N., Mironov Y. V., Shestopalov M. A., Sutherland A. J., Octahedral molybdenum cluster complexes with aromatic sulfonate ligands // *Dalton Trans.* - 2016. - V. 45, No. 39. - P. 15427-15435.
- [256] Sokolov M. N., Mihailov M. A., Peresyphkina E. V., Brylev K. A., Kitamura N., Fedin V. P., Highly luminescent complexes $[\text{Mo}_6\text{X}_8(\text{n-C}_3\text{F}_7\text{COO})_6]^{2-}$ (X = Br, I) // *Dalton Trans.* - 2011. - V. 40, No. 24. - P. 6375-6377.
- [257] Kirakci K., Kubát P., Dušek M., Fejfarová K., Šícha V., Mosinger J., Lang K., A highly luminescent hexanuclear molybdenum cluster - a promising candidate toward photoactive materials // *Eur. J. Inorg. Chem.* - 2012. - No. 19. - P. 3107-3111.
- [258] Mikhaylov M. A., Abramov P. A., Komarov V. Y., Sokolov M. N., Cluster aqua/hydroxocomplexes supporting extended hydrogen bonding networks. Preparation and structure of a unique series of cluster hydrates $[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{nH}_2\text{O}$ (n=2, 12, 14) // *Polyhedron* - 2017. - V. 122, - P. 241-246.
- [259] Vorotnikov Y. A., Efremova O. A., Novozhilov I. N., Yanshole V. V., Kuratieva N. V., Brylev K. A., Kitamura N., Mironov Y. V., Shestopalov M. A., Hexaazide octahedral molybdenum cluster complexes: Synthesis, properties and the evidence of hydrolysis // *J. Mol. Struct.* - 2017. - V. 1134, - P. 237-243.
- [260] Cheplakova A. M., Solovieva A. O., Pozmogova T. N., Vorotnikov Y. A., Brylev K. A., Vorotnikova N. A., Vorontsova E. V., Mironov Y. V., Poveshchenko A. F., Kovalenko K. A., Shestopalov M. A., Nanosized mesoporous metal-organic framework MIL-101 as a nanocarrier for photoactive hexamolybdenum cluster compounds // *J. Inorg. Biochem.* - 2017. - V. 166, - P. 100-107.
- [261] Svezhentseva E. V., Solovieva A. O., Vorotnikov Y. A., Kurskaya O. G., Brylev K. A., Tsygankova A. R., Edeleva M. V., Gyrylova S. N., Kitamura N., Efremova O. A., Shestopalov M. A., Mironov Y. V., Shestopalov A. M., Water-soluble hybrid materials based on $\{\text{Mo}_6\text{X}_8\}^{4+}$ (X = Cl, Br, I) cluster complexes and sodium polystyrene sulfonate // *New J. Chem.* - 2017. - V. 41, No. 4. - P. 1670-1676.

- [262] Vorotnikov Y. A., Efremova O. A., Vorotnikova N. A., Brylev K. A., Edeleva M. V., Tsygankova A. R., Smolentsev A. I., Kitamura N., Mironov Y. V., Shestopalov M. A., On the synthesis and characterisation of luminescent hybrid particles: Mo₆ metal cluster complex/SiO₂ // RSC Adv. - 2016. - V. 6, No. 49. - P. 43367-43375.
- [263] Solovieva A. O., Vorotnikov Y. A., Trifonova K. E., Efremova O. A., Krasilnikova A. A., Brylev K. A., Vorontsova E. V., Avrorov P. A., Shestopalova L. V., Poveshchenko A. F., Mironov Y. V., Shestopalov M. A., Cellular internalisation, bioimaging and dark and photodynamic cytotoxicity of silica nanoparticles doped by {Mo₆I₈}⁴⁺ metal clusters // J. Mater. Chem. B - 2016. - V. 4, No. 28. - P. 4839-4846.
- [264] Kovalenko K. A., Fedin V. P., Mesoporous chromium(III) oxoterephthalate MIL-101: modification and applications // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. - 2016. - V. 65, No. 6. - P. 1406-1417.
- [265] Kovalenko K. A., Cheplakova A. M., Burlak P. V., Fedin V. P., Coordination modification and sorption properties of mesoporous chromium(III) terephthalate // Russ. J. Inorg. Chem. - 2015. - V. 60, No. 7. - P. 790-794.
- [266] Roy S., Choubey S., Bhar K., Khan S., Mitra P., Ghosh B. K., Syntheses, structures, and luminescence behavior of terephthalate bridged lead(II) complexes with tetradentate N-donor Schiff bases // J. Mol. Struct. - 2013. - V. 1051, - P. 328-335.
- [267] Sapchenko S. A., Dybtsev D. N., Samsonenko D. G., Fedin V. P., Synthesis, crystal structures, luminescent and thermal properties of two new metal-organic coordination polymers based on zinc(II) carboxylates // New J. Chem. - 2010. - V. 34, No. 11. - P. 2445-2450.
- [268] Allendorf M. D., Bauer C. A., Bhakta R. K., Houk R. J. T., Luminescent metal-organic frameworks // Chem. Soc. Rev. - 2009. - V. 38, No. 5. - P. 1330-1352.
- [269] Forster L. S., Excited state relaxation of Cr(III) in oxygen environments // Coord. Chem. Rev. - 2004. - V. 248, No. 3-4. - P. 261-272.
- [270] Mikhailov M. A., Brylev K. A., Virovets A. V., Gallyamov M. R., Novozhilov I., Sokolov M. N., Complexes of {Mo₆I₈} with nitrophenolates: synthesis and luminescence // New J. Chem. - 2016. - V. 40, No. 2. - P. 1162-1168.
- [271] Sokolov M. N., Mikhailov M. A., Brylev K. A., Virovets A. V., Vicent C., Kompankov N. B., Kitamura N., Fedin V. P., Alkynyl complexes of high-valence clusters. Synthesis and luminescence properties of [Mo₆I₈(C≡CC(O)OMe)₆]²⁻, the first complex with exclusively organometallic outer ligands in the family of octahedral {M₆X₈} clusters // Inorg. Chem. - 2013. - V. 52, No. 21. - P. 12477-12481.

- [272] Jensen A., Basolo F., Neumann H. M., The binding of metal complexes by polystyrene sulfonate ion // *J. Am. Chem. Soc.* - 1959. - V. 81, No. 3. - P. 509–512.
- [273] Nguyen T., Ondrik D., Zhufyak O., To W., He S., Hyperkalemia and potential pitfalls of sodium polystyrene sulfonate // *JAAPA-J. Am. Acad. Phys.* - 2015. - V. 28, No. 3. - P. 41-45.
- [274] Shestopalov M. A., Zubareva K. E., Khripko O. P., Khripko Y. I., Solovieva A. O., Kuratieva N. V., Mironov Y. V., Kitamura N., Fedorov V. E., Brylev K. A., The first water-soluble hexarhenium cluster complexes with a heterocyclic ligand environment: Synthesis, luminescence, and biological properties // *Inorg. Chem.* - 2014. - V. 53, No. 17. - P. 9006-9013.
- [275] Basiji D. A., Ortyń W. E., Liang L., Venkatachalam V., Morrissey P., Cellular image analysis and imaging by flow cytometry // *Clin. Lab. Med.* - 2007. - V. 27, No. 3. - P. 653-670.
- [276] Sheldon J. C., Polynuclear complexes of molybdenum (II) // *Nature* - 1959. - V. 184, - P. 1210-1213.
- [277] Sheldon J. C., Bromo- and iodo-molybdenum(II) compounds // *J. Chem. Soc.* - 1962. - P. 410-415.
- [278] Sheldon J. C., Chloromolybdenum(II) compounds // *J. Chem. Soc.* - 1960. - P. 1007-1014.
- [279] Brosset C., On the structure of complex compounds of bivalent molybdenum. I. X-ray analysis of $(\text{Mo}_6\text{Cl}_8)(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_{14}$ // *Ark. Kemi, Mineral. Geol.* - 1945. - V. 20, - P. 1-16.
- [280] Sheldon J. C., Hydroxochloro-molybdenum(II) compounds // *Chem. Ind.* - 1961. - P. 323.
- [281] Sheldon J. C., $\text{S}_\text{N}2$ hydroxide attack on chloromolybdate(II) group // *J. Chem. Soc.* - 1963. - P. 4183-4186.
- [282] Sheldon J. C., Sterically hindered $\text{S}_\text{N}2$ hydroxide attack of the bromomolybdenum(II) group // *J. Chem. Soc.* - 1964. - P. 1287-1291.
- [283] Zhang B. P., Masumoto H., Someno Y., Goto T., Optical properties of Au/SiO₂ nanocomposite films prepared by induction-coil-coupled plasma sputtering // *Mater. Trans.* - 2003. - V. 44, No. 2. - P. 215-219.
- [284] Zhang X. J., Zheng H. G., Synthesis of TiO₂-doped SiO₂ composite films and its applications // *Bull. Mater. Sci.* - 2008. - V. 31, No. 5. - P. 787-790.
- [285] Nuñez C. D., Valente A. A., Pillinger M., Rocha J., Gonçalves I. S., Molecular structure - activity relationships for the oxidation of organic compounds using mesoporous silica catalysts derivatised with bis(halogeno)dioxomolybdenum (VI) complexes // *Chem. Eur. J.* - 2003. - V. 9, - P. 4380-4390.
- [286] Hu L., Ji S., Xiao T., Guo C., Wu P., Nie P., Preparation and characterization of tungsten carbide confined in the channels of SBA-15 mesoporous silica // *J. Phys. Chem. B* - 2007. - V. 111, - P. 3599-3608.

- [287] Watson R. B., Ozkan U. S., Spectroscopic and structural characterization of low-level alkali doping effects on Mo/silica-titania catalysts // *J. Phys. Chem. B* - 2002. - V. 106, - P. 6930-6941.
- [288] Botar B., Ellern A., Kogerler P., Mapping the formation areas of giant molybdenum blue clusters: a spectroscopic study // *Dalton Trans.* - 2012. - V. 41, No. 29. - P. 8951-8959.
- [289] Jonca J., Barus C., Giraud W., Thouron D., Garcon V., Comtat M., Electrochemical behaviour of isopoly- and heteropolyoxomolybdates formed during anodic oxidation of molybdenum in seawater // *Int. J. Electrochem. Sci.* - 2012. - V. 7, No. 8. - P. 7325-7348.
- [290] Napierska D., Thomassen L. C. J., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Martens J. A., Hoet P. H., Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells // *Small* - 2009. - V. 5, No. 7. - P. 846-853.
- [291] Ariano P., Zamburlin P., Gilardino A., Mortera R., Onida B., Tomatis M., Ghiazza M., Fubini B., Lovisolo D., Interaction of spherical silica nanoparticles with neuronal cells: Size-dependent toxicity and perturbation of calcium homeostasis // *Small* - 2011. - V. 7, No. 6. - P. 766-774.
- [292] Al-Rawi M., Diabate S., Weiss C., Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells // *Arch. Toxicol.* - 2011. - V. 85, No. 7. - P. 813-826.
- [293] Nagel D., Behrendt J. M., Chimonides G. F., Torr E. E., Devitt A., Sutherland A. J., Hine A. V., Polymeric microspheres as protein transduction reagents // *Mol. Cell. Proteomics* - 2014. - V. 13, No. 6. - P. 1543-1551.
- [294] Ishihara M., Kishimoto S., Takikawa M., Hattori H., Nakamura S., Shimizu M., Biomedical application of low molecular weight heparin/protamine nano/micro particles as cell- and growth factor-carriers and coating matrix // *Int. J. Mol. Sci.* - 2015. - V. 16, No. 5. - P. 11785-11803.
- [295] Flinterman M., Farzaneh F., Habib N., Malik F., Gaken J., Tavassoli M., Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products // *Mol. Ther.* - 2009. - V. 17, No. 2. - P. 334-342.
- [296] Mateo C., Torres R., Fernandez-Lorente G., Ortiz C., Fuentes M., Hidalgo A., Lopez-Gallego F., Abian O., Palomo J. M., Betancor L., Pessela B. C. C., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method // *Biomacromolecules* - 2003. - V. 4, No. 3. - P. 772-777.
- [297] Pesce D., Wu Y. Z., Kolbe A., Weil T., Herrmann A., Enhancing cellular uptake of GFP via unfolded supercharged protein tags // *Biomaterials* - 2013. - V. 34, No. 17. - P. 4360-4367.

- [298] Meissner J., Prause A., Bharti B., Findenegg G. H., Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: Influence of pH and ionic strength // *Colloid Polym. Sci.* - 2015. - V. 293, No. 11. - P. 3381-3391.
- [299] Ansari A. M., Ahmed A. K., Matsangos A. E., Lay F., Born L. J., Marti G., Harmon J. W., Sun Z. L., Cellular GFP toxicity and immunogenicity: Potential confounders in in vivo cell tracking experiments // *Stem Cell Rev. Rep.* - 2016. - V. 12, No. 5. - P. 553-559.
- [300] Bauer A. T., Strozyk E. A., Gorzelanny C., Westerhausen C., Desch A., Schneider M. F., Schneider S. W., Cytotoxicity of silica nanoparticles through exocytosis of von willebrand factor and necrotic cell death in primary human endothelial cells // *Biomaterials* - 2011. - V. 32, No. 33. - P. 8385-8393.
- [301] Ryabchikova E. I., Chelobanov B. P., Parkhomenko R. G., Korchagina K. V., Basova T. V., Degradation of core-shell Au@SiO₂ nanoparticles in biological media // *Microporous Mesoporous Mater.* - 2017. - V. 248, - P. 46-53.
- [302] Vernon P. J., Tang D. L., Eat-me: Autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling // *Antioxid. Redox Signal.* - 2013. - V. 18, No. 6. - P. 677-690.
- [303] Lim J. P., Gleeson P. A., Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large gulps // *Immunol. Cell Biol.* - 2011. - V. 89, No. 8. - P. 836-843.
- [304] Cho K. J., Wang X., Nie S. M., Chen Z., Shin D. M., Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer // *Clin. Cancer Res.* - 2008. - V. 14, No. 5. - P. 1310-1316.
- [305] Kim I.-Y., Joachim E., Choi H., Kim K., Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type // *Nanomedicine: NBM* - 2015. - V. 11, No. 6. - P. 1407-1416.
- [306] Lesniak A., Fenaroli F., Monopoli M. R., Aberg C., Dawson K. A., Salvati A., Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells // *Acs Nano* - 2012. - V. 6, No. 7. - P. 5845-5857.
- [307] Shapero K., Fenaroli F., Lynch I., Cottell D. C., Salvati A., Dawson K. A., Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells // *Mol. Biosyst.* - 2011. - V. 7, No. 2. - P. 371-378.
- [308] Adjei I. M., Sharma B., Labhassetwar V., Nanoparticles: Cellular uptake and cytotoxicity // *Nanomaterials* - 2014. - V. 811, - P. 73-91.
- [309] Mirzaei H., Djavid G. E., Hadizadeh M., Jahanshiri-Moghadam M., Hajian P., The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells // *J. Photochem. Photobiol. B* - 2015. - V. 142, - P. 86-91.

[310] Prasmickaite L., Høgset A., Selbo P. K., Engesæter B. Ø., Hellum M., Berg K., Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy // Br. J. Cancer - 2002. - V. 86, - P. 652-657.

[311] Selbo P. K., Weyergang A., Høgset A., Norum O.-J., Berstad M. B., Vikdal M., Berg K., Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules // J. Control. Release - 2010. - V. 148, No. 1. - P. 2-12.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.х.н. Шестопалову Михаилу Александровичу за помощь в постановке цели и задач при выполнении работы и обсуждении полученных результатов, Центрам коллективного пользования ИНХ СО РАН, ИЦиГ и ИХБФМ СО РАН за проведение экспериментов по характеристике кластерных комплексов и материалов на их основе. Коллегам из ИНХ СО РАН: асп. Чеплаковой Анастасии Михайловне за получение координационных полимеров МП-101 и МП-101-руз и помощь в охарактеризации материалов, к.х.н. Зубаревой Анне Петровне за проведение СНН анализа, к.х.н. Цыганковой Альфии Рафаэлевне за проведение элементного анализа АЭС-ИСП, к.х.н. Куратьевой Наталье Владимировне за проведение рентгеноструктурного анализа, к.х.н. Коваленко Константину Александровичу за проведение экспериментов по сорбции газов и определению удельной площади поверхности, к.х.н. Брылеву Константину Александровичу за проведение исследований люминесцентных свойств, к.х.н. Воротниковой Наталье Андреевне за проведение экспериментов по определению эффективности генерации синглетного кислорода, к.х.н. Еделева Марии Владимировне (НИОХ СО РАН) за проведение характеристики полимерных материалов методом гелепроникающей хроматографии, к.ф.-м.н. Яньшолу Вадиму Владимировичу за проведение масс-спектрометрических исследований, к.б.н. Байбородину Сергею Ивановичу за помощь в проведении микроскопических исследований, к.б.н. Соловьевой Анастасии Олеговне и Позмоговой Татьяне Николаевне (НИИКЭЛ - филиал ИЦиГ СО РАН) за проведение биологических исследований. Также автор благодарит Dr. Olga A. Efremova (University of Hull, UK) за неоценимую помощь в обсуждении результатов и поддержку на всех этапах выполнения работы.

ПРИЛОЖЕНИЕ

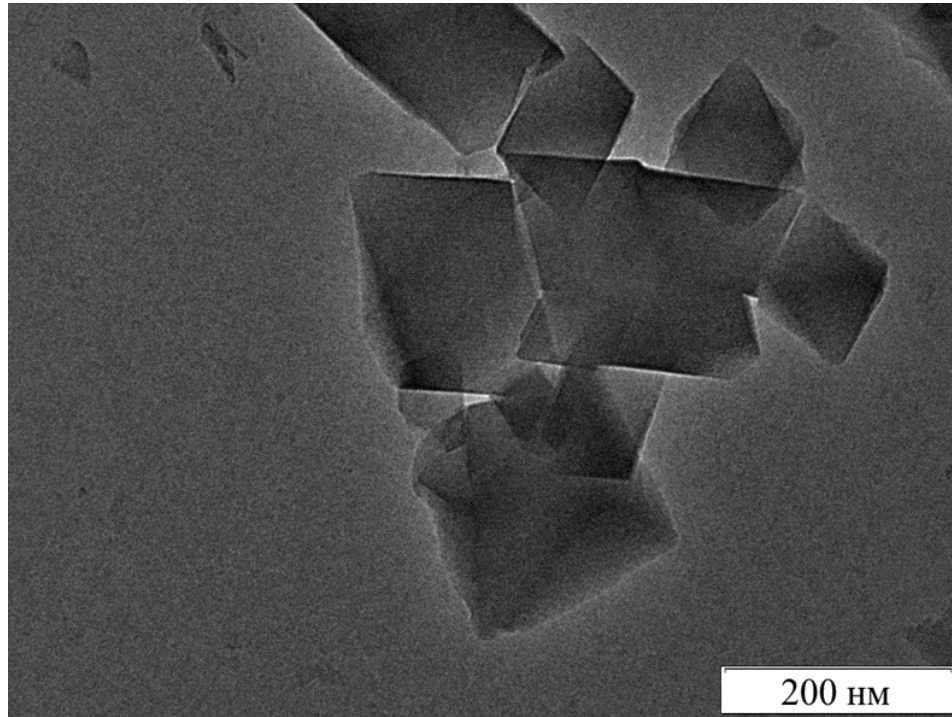


Рис. П1. Изображения наночастиц MIL-101, полученные с помощью ПЭМ.

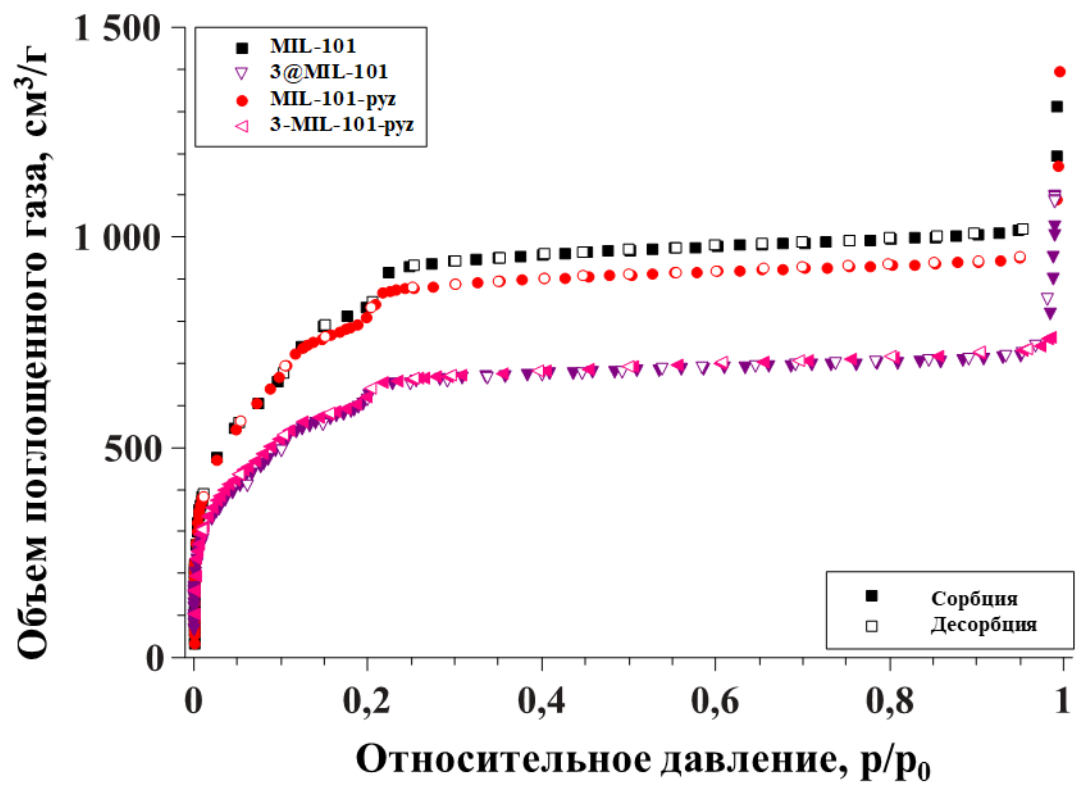


Рис. П2. Изотермы сорбции азота при 77 К.

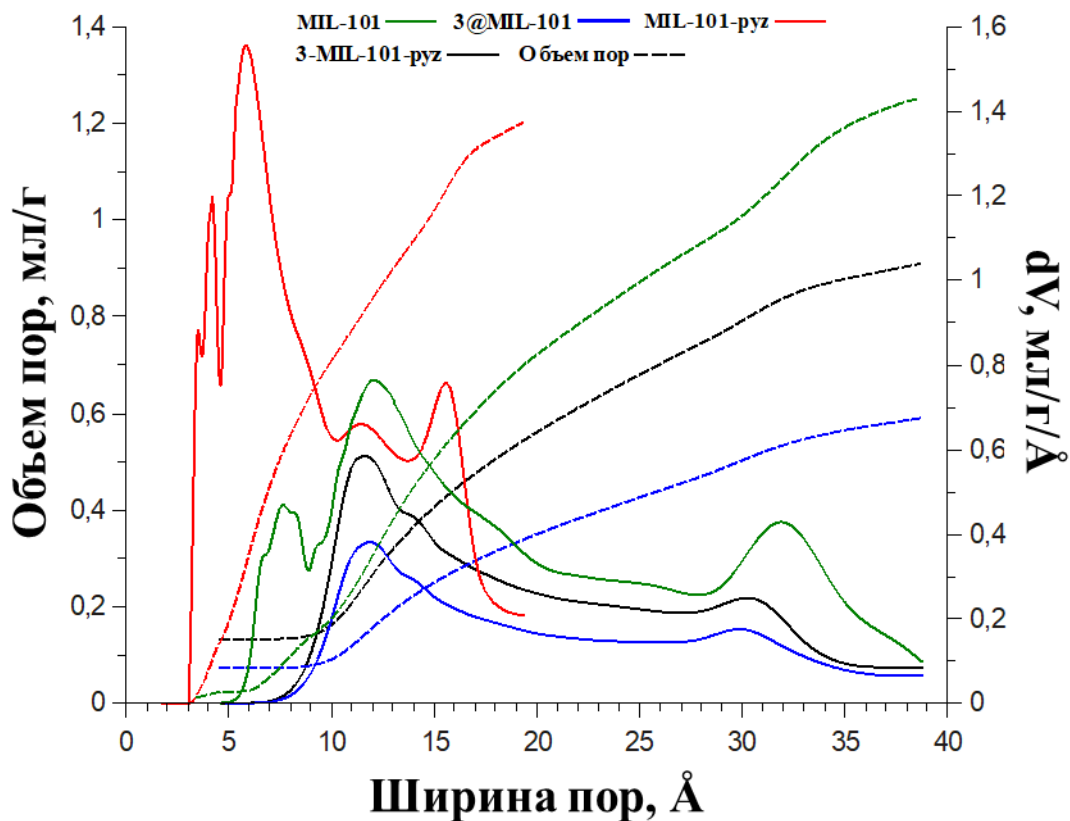


Рис. ПЗ. Кривые распределения размера пор, рассчитанные по методу Сайто-Фоули.

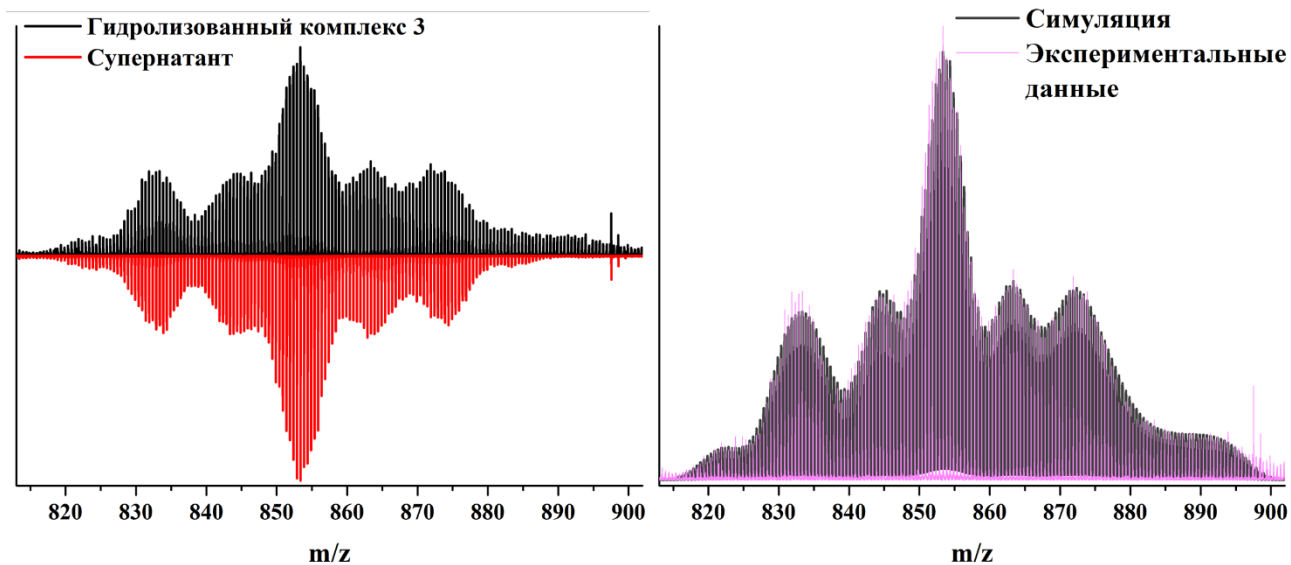


Рис. П4. Сравнение масс-спектров гидролизованного комплекса **3** и раствора, полученного после экстракции **3**@MIL-101 (слева); сравнение масс-спектра супернатанта и спектра, полученного сложением набора пиков от форм $(\{Mo_6I_8\}(OH)_2 \cdot xH_2O)^{2+}$ и $(\{Mo_6I_8\}(OH)(NO_3) \cdot yH_2O)^{2+}$ ($x = 1-9$ и $y = 0-6$) (справа).

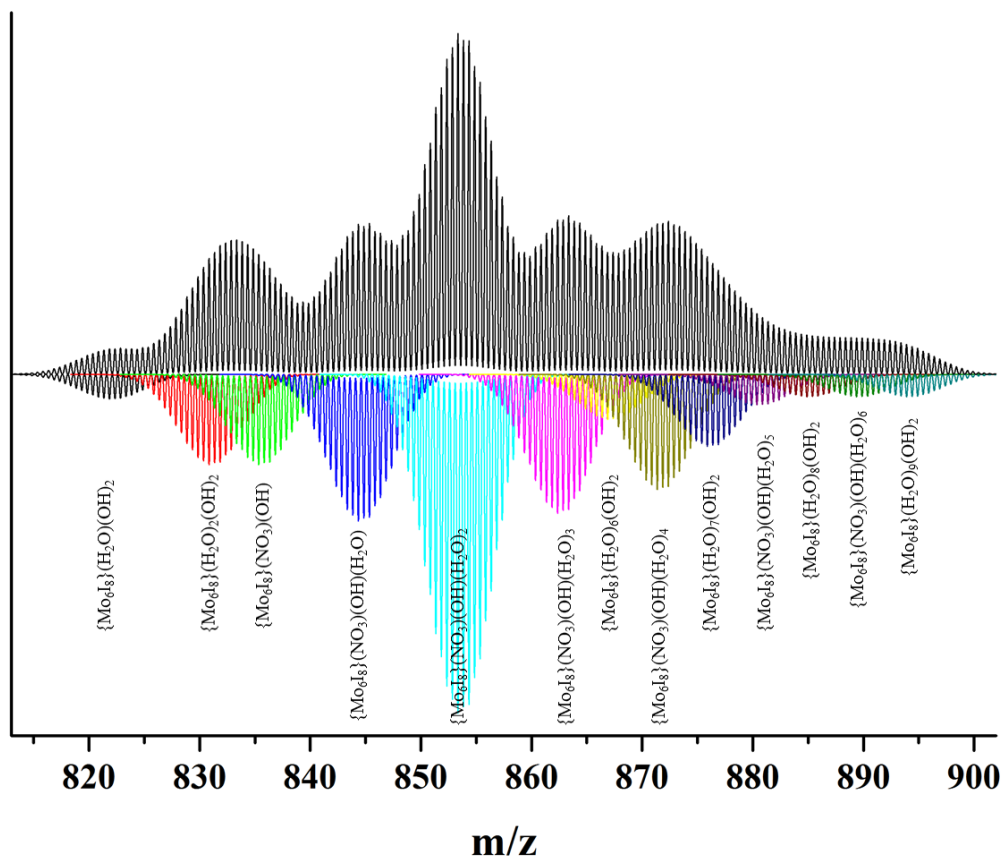


Рис. П5. Масс-спектр, полученный сложением набора пиков от форм $(\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O})^{2+}$ и $(\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{OH})(\text{NO}_3) \cdot y\text{H}_2\text{O})^{2+}$ ($x = 1-9$ и $y = 0-6$).

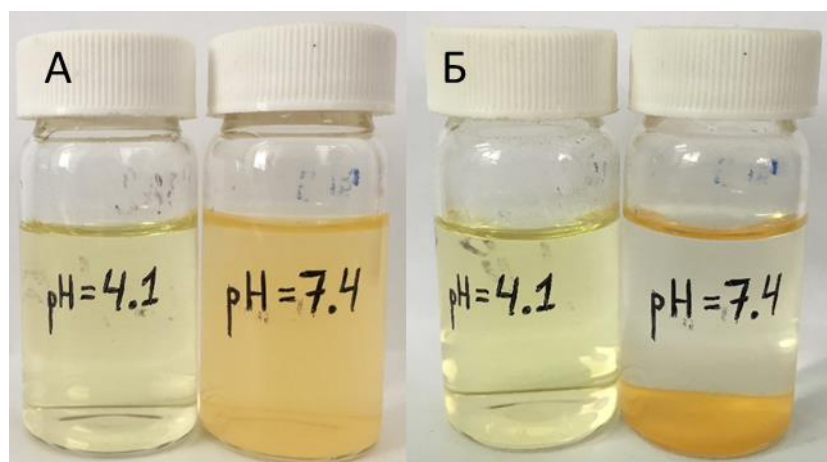


Рис. П6. Растворы комплекса 3 в воде после гидролиза при разных pH: сразу после доведения pH до 7,4 добавлением KOH (А) и по прошествии 12 часов (Б).

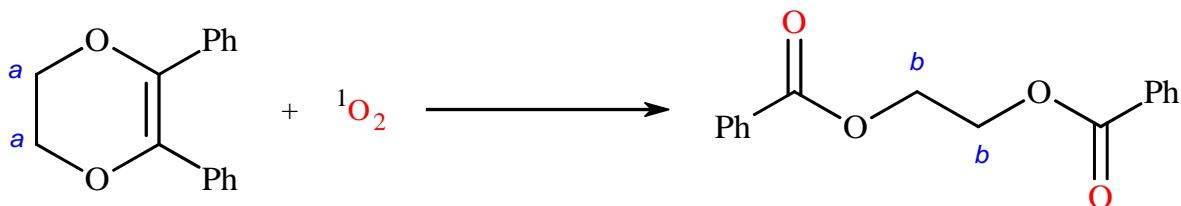


Схема П1. Окисление 2,3-дифенил-*para*-диоксена синглетным кислородом ($^1\text{O}_2$).

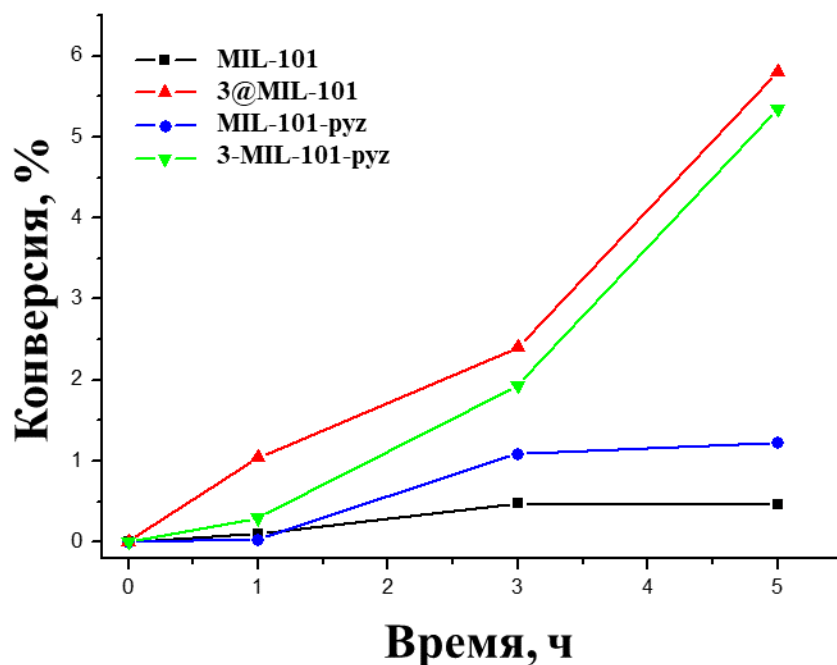


Рис. П7. Конверсия 2,3-дифенил-*para*-диоксена в присутствии материалов в зависимости от времени облучения.

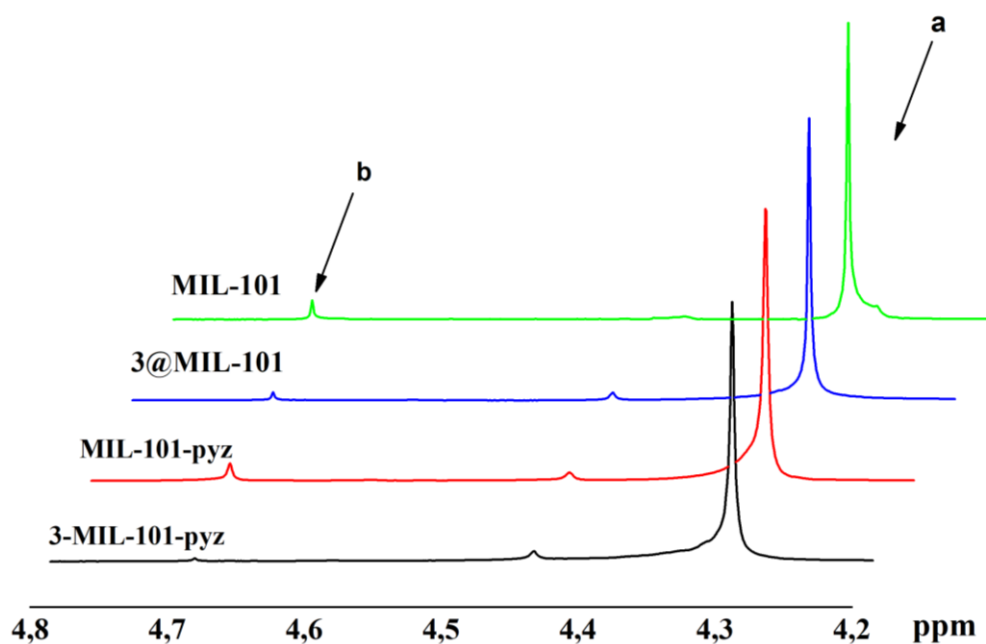


Рис. П8. Фрагменты ^1H -ЯМР спектров растворов 2,3-дифенил-*para*-диоксена и MIL-101, MIL-101-pyz 3@MIL-101 или 3-MIL-101-pyz в ацетоне- d_6 через 5 часов облучения светом с длиной волны > 400 нм.

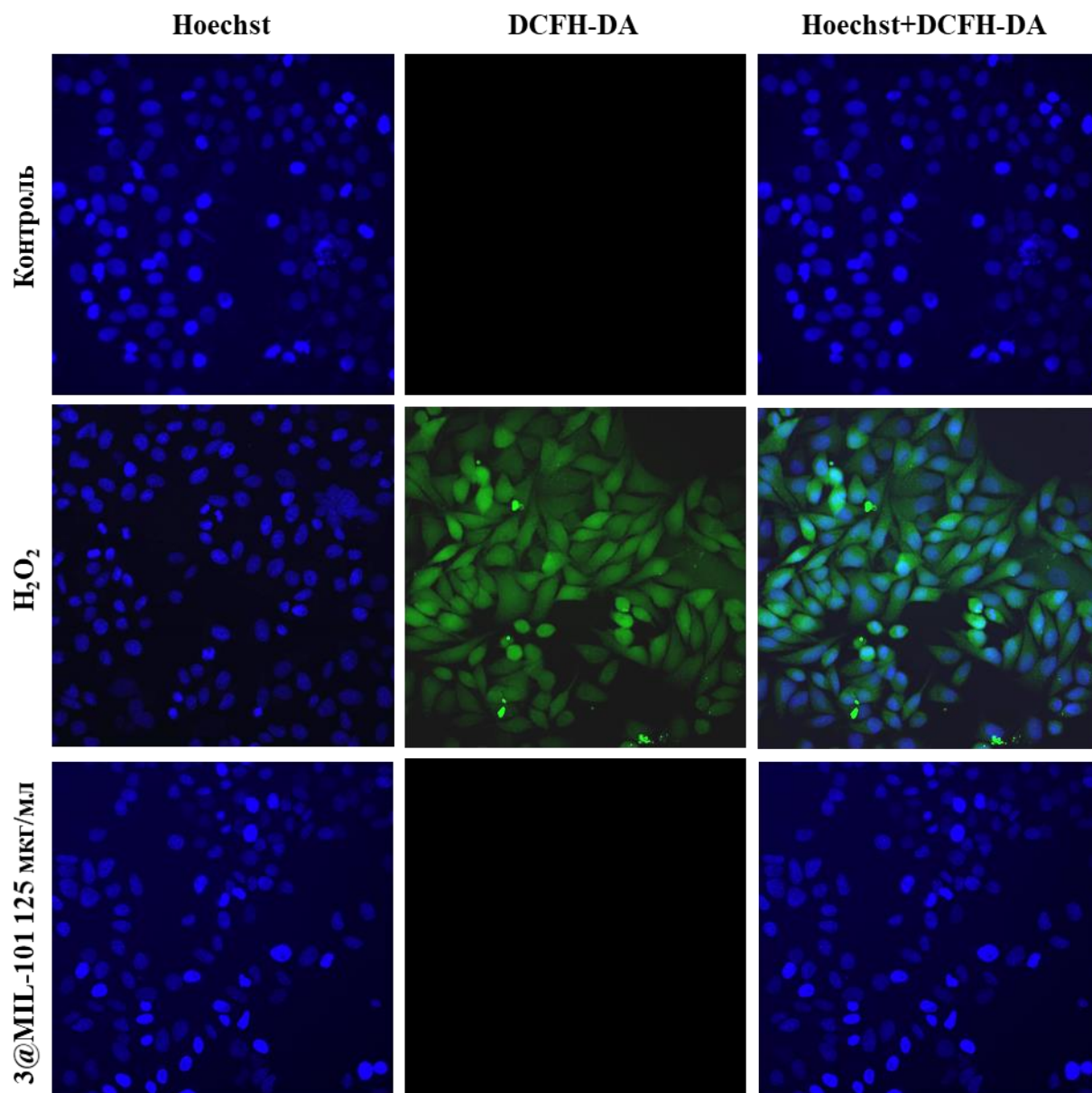


Рис. П9. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК внутри клеток Нер-2, инкубированных с H₂O₂ и 3@MIL-101 до облучения. Клетки окрашивали Hoechst 33342.

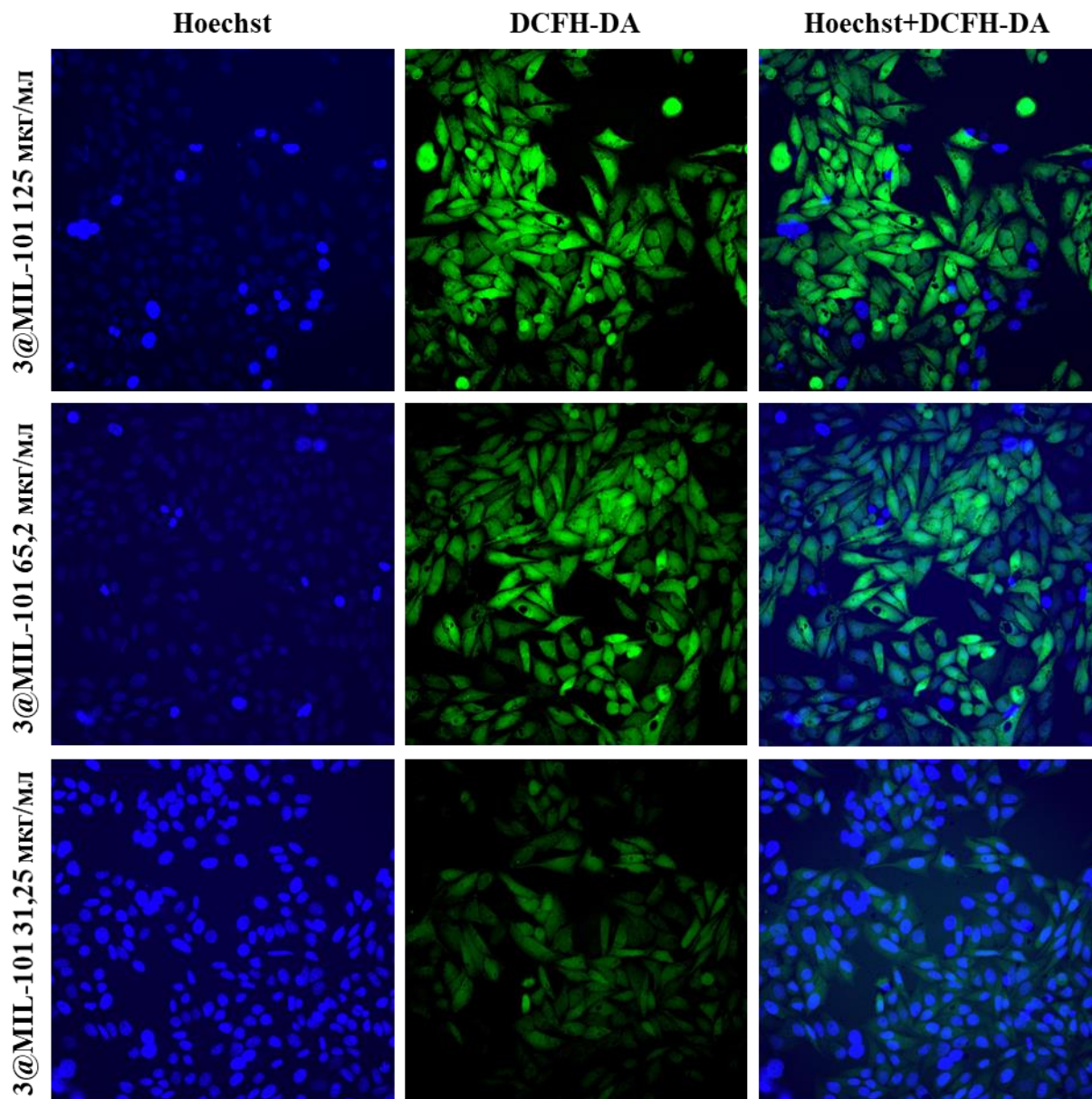


Рис. П10. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК внутри клеток Нер-2, инкубированных 3@MIL-101 после облучения. Клетки окрашивали Hoechst 33342.

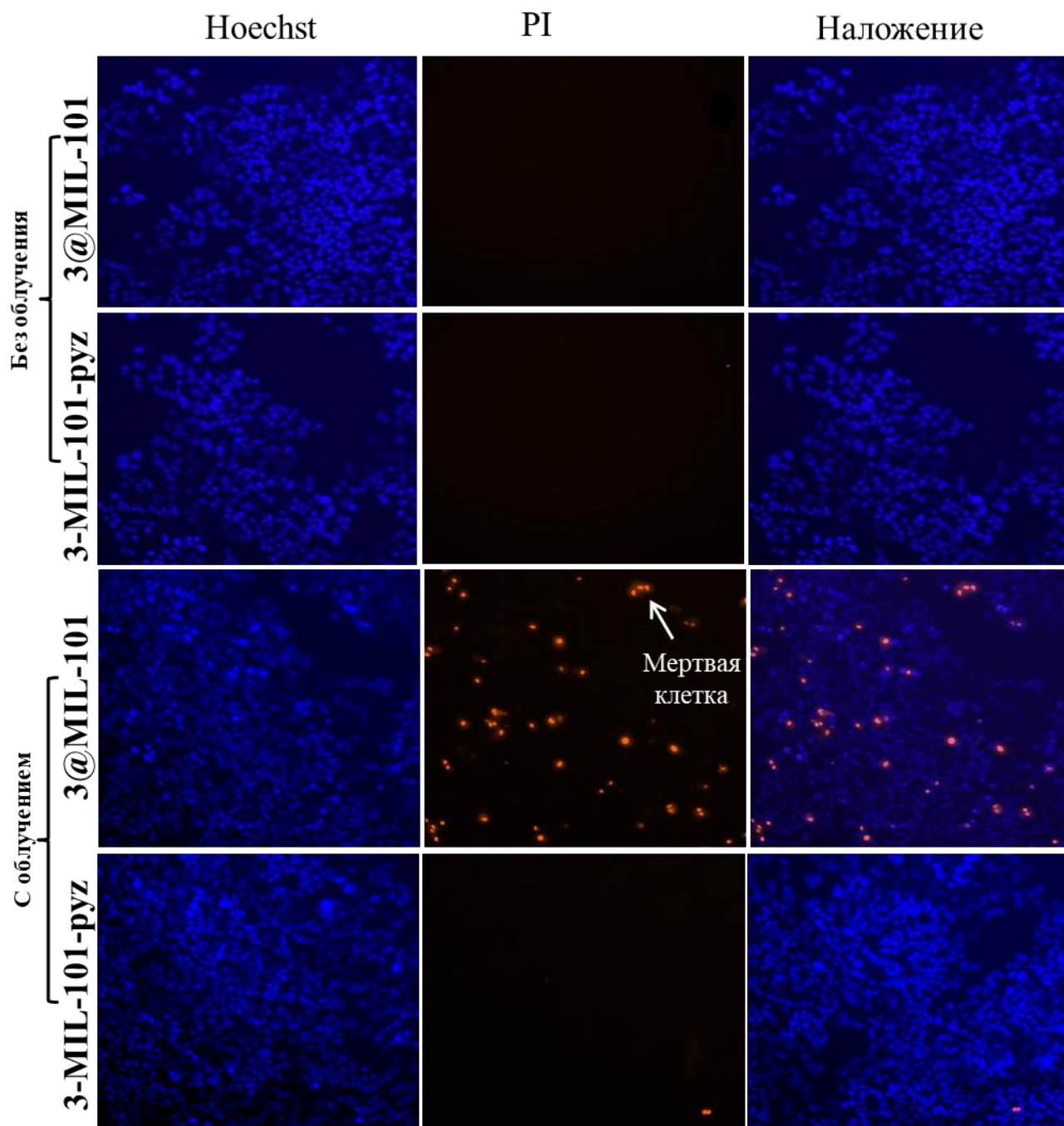


Рис. П11. Изображение, демонстрирующее действие 3@MIL-101 и 3-MIL-101-puz на клетки линии Нер-2 до и после облучения. Анализ проводили с использованием метода двойного окрашивания Ноеchst 33342/PI.

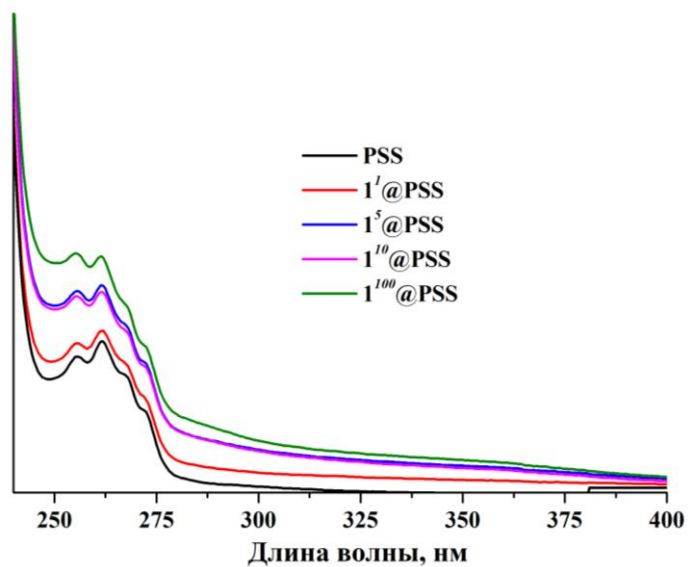


Рис. П12. Электронные спектры поглощения водных растворов PSS и $1^x@PSS$ ($x = 1, 5, 10, 100$).

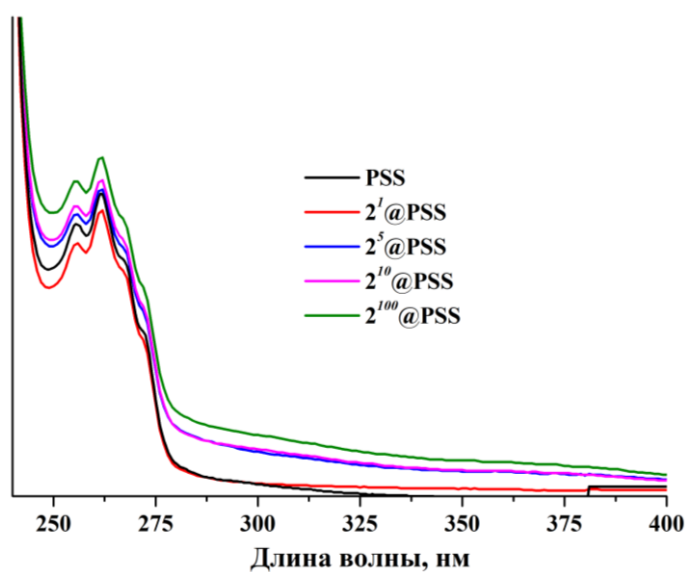


Рис. П13. Электронные спектры поглощения водных растворов PSS и $2^x@PSS$ ($x = 1, 5, 10, 100$).

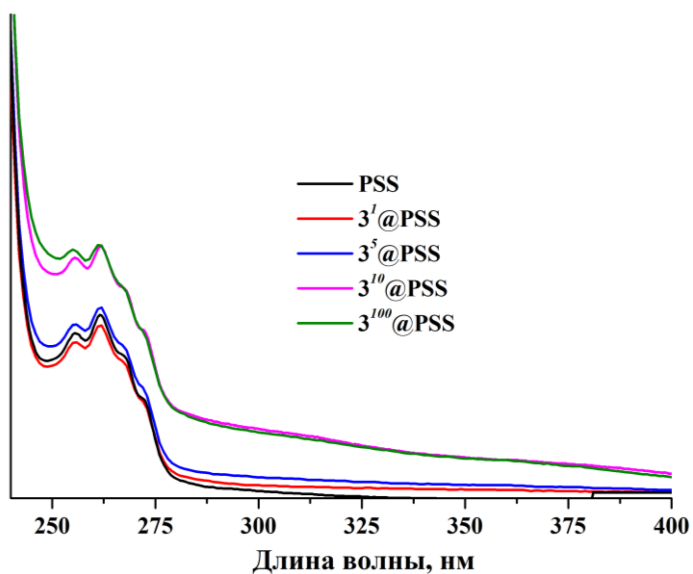


Рис. П14. Электронные спектры поглощения водных растворов PSS и $3^x@PSS$ ($x = 1, 5, 10, 100$).

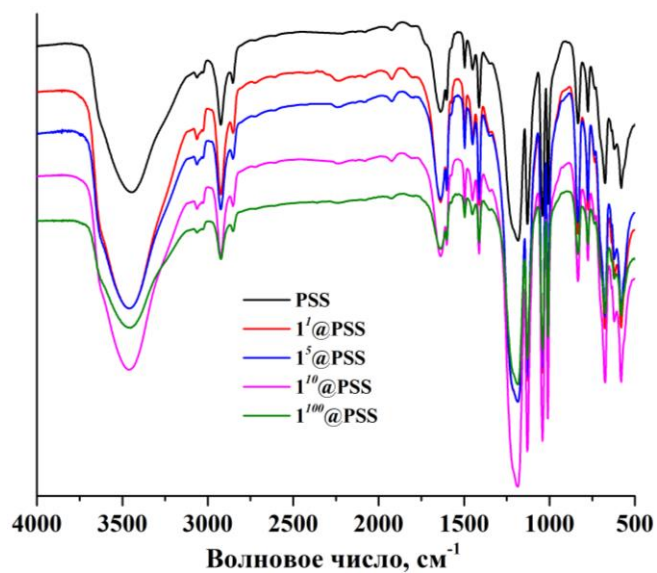


Рис. П15. ИК-спектры PSS и 1^x@PSS ($x = 1, 5, 10, 100$).

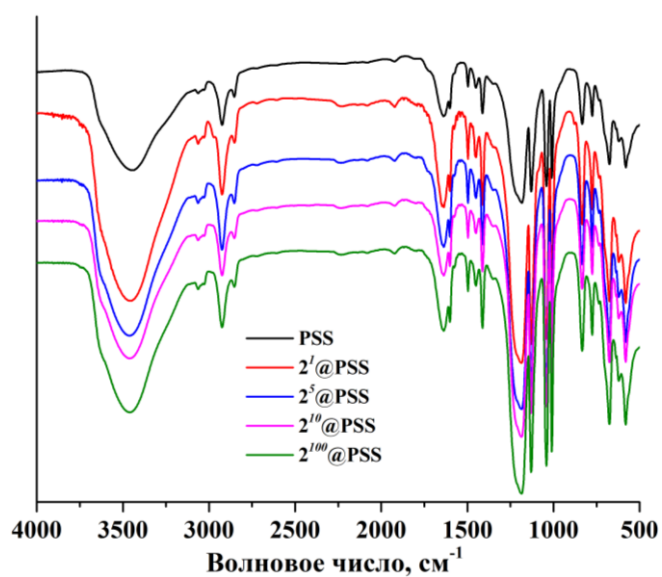


Рис. П16. ИК-спектры PSS и 2^x@PSS ($x = 1, 5, 10, 100$).

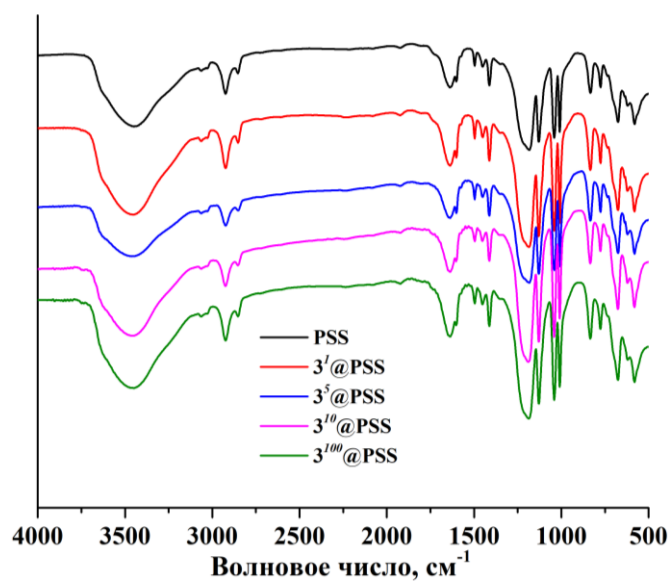


Рис. П17. ИК-спектры PSS и 3^x@PSS ($x = 1, 5, 10, 100$).

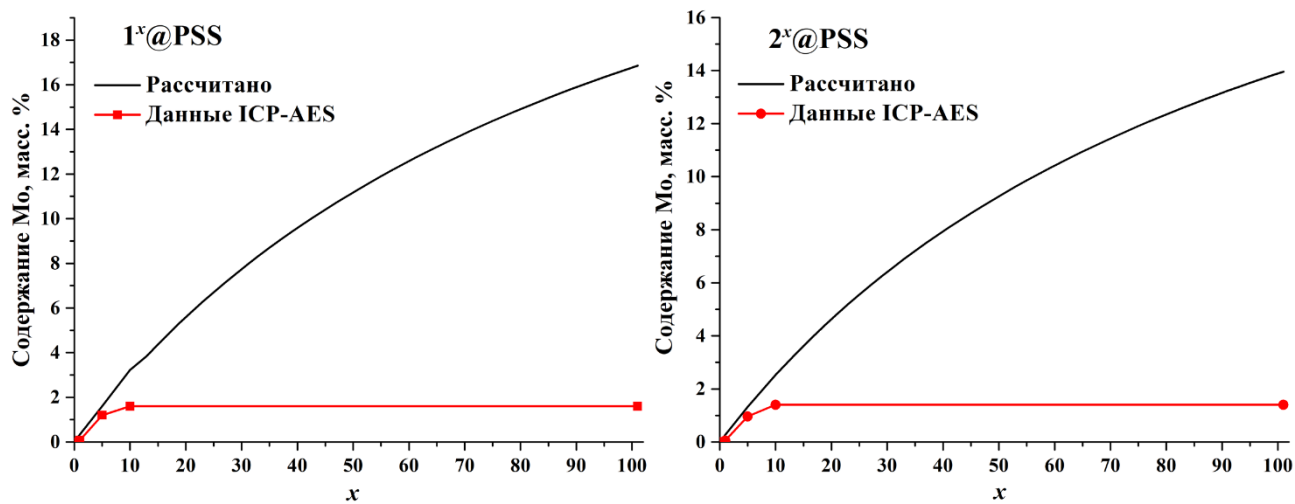


Рис. П18. Зависимость рассчитанного (чёрная линия) и реального (красная линия) содержания Мо от x (где $x = 1, 5, 10$ и 100) для $n^x@PSS$ ($n = 1, 2$).

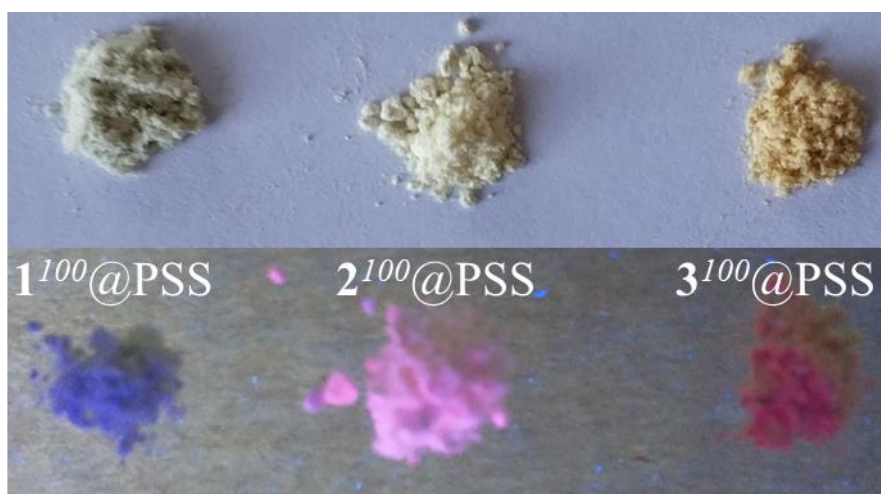


Рис. П19. Фотографии материалов $n^{100}@PSS$ при видимом и УФ свете.

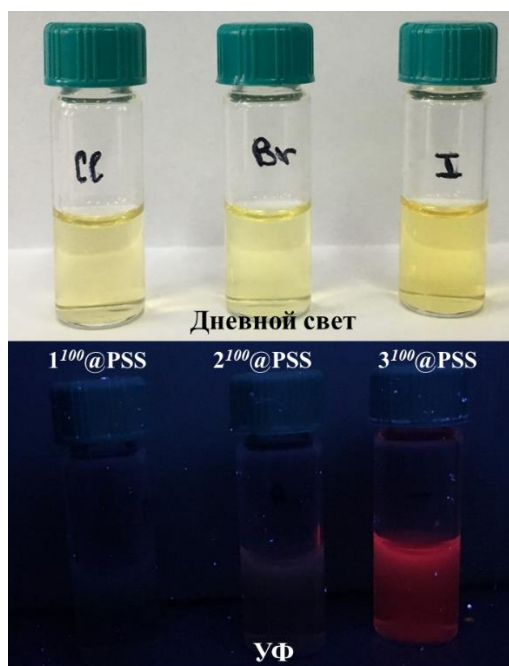


Рис. П20. Фотографии водных растворов $n^{100}@PSS$ при видимом и УФ свете.

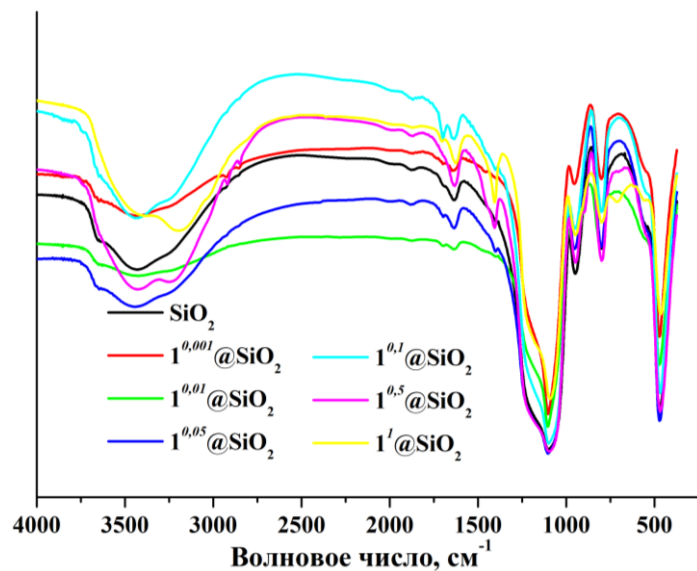


Рис. П21. ИК-спектры SiO_2 и $1^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1$).

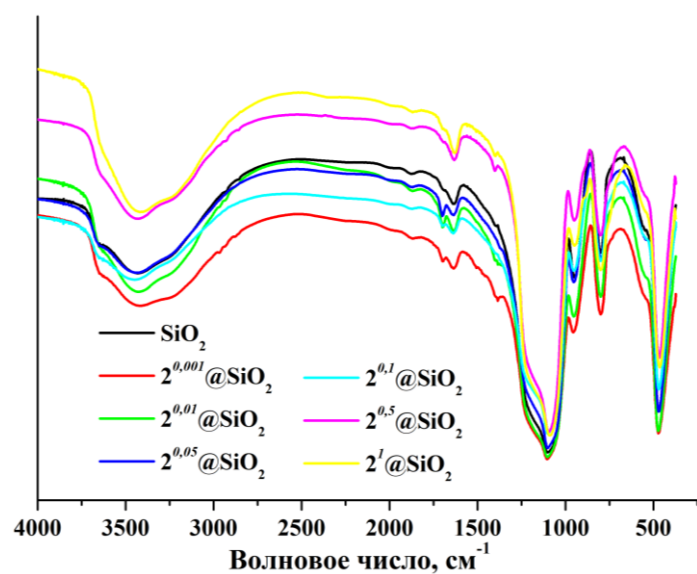


Рис. П22. ИК-спектры SiO_2 и $2^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1$).

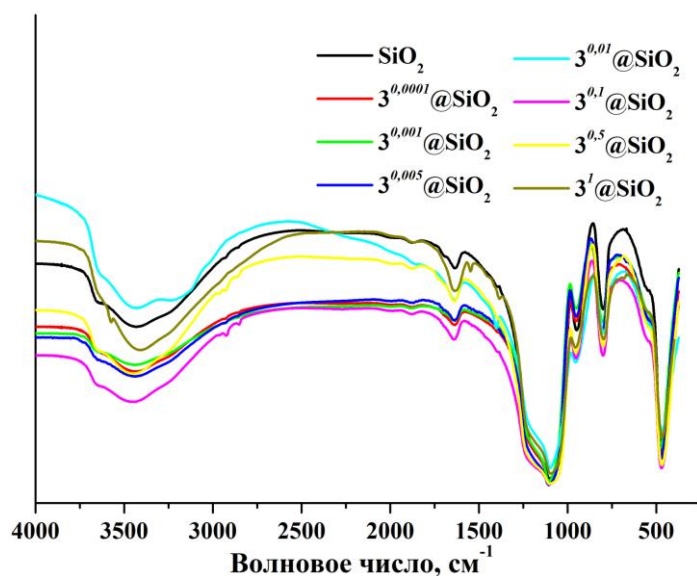


Рис. П23. ИК-спектры SiO_2 и $3^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1$).

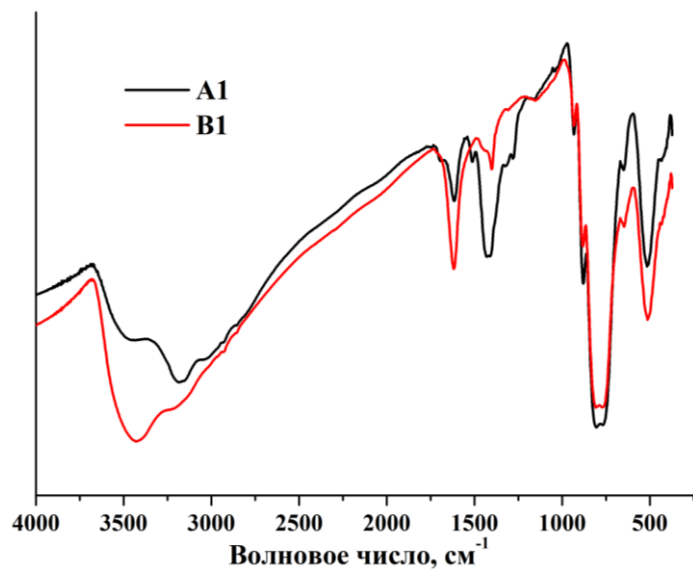


Рис. П24. ИК-спектры соединений А1 и В1.

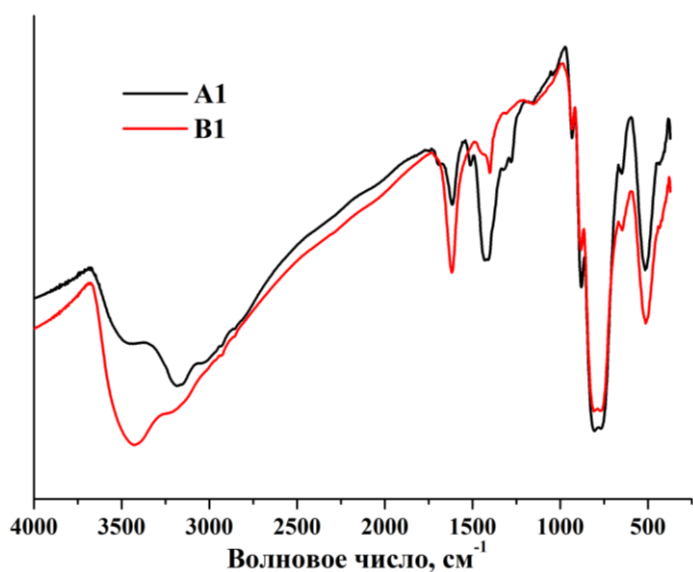


Рис. П25. ИК-спектры соединений А2 и В2.

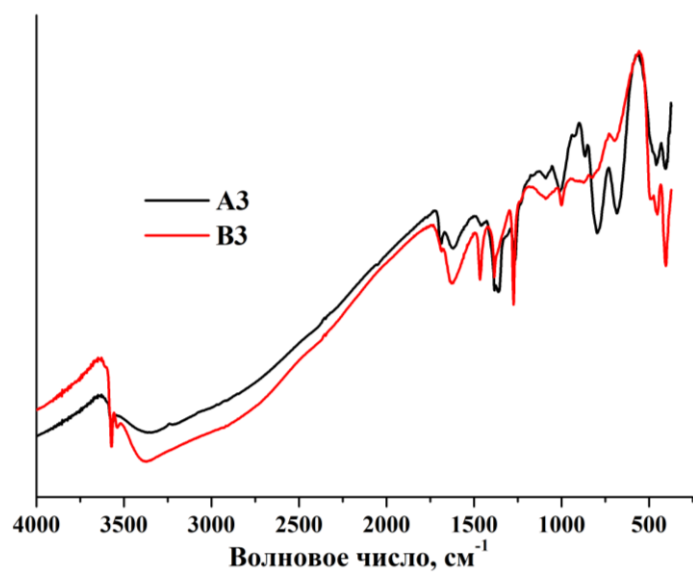


Рис. П26. ИК-спектры соединений А3 и В3.

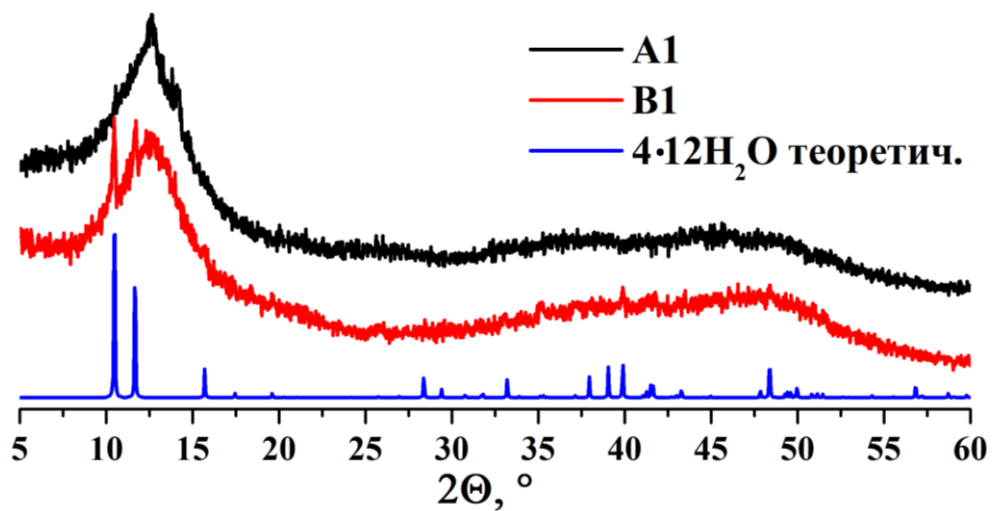


Рис. П27. Дифрактограммы соединений А1 и В1 и теоретическая дифрактограмма 4·12Н₂О.

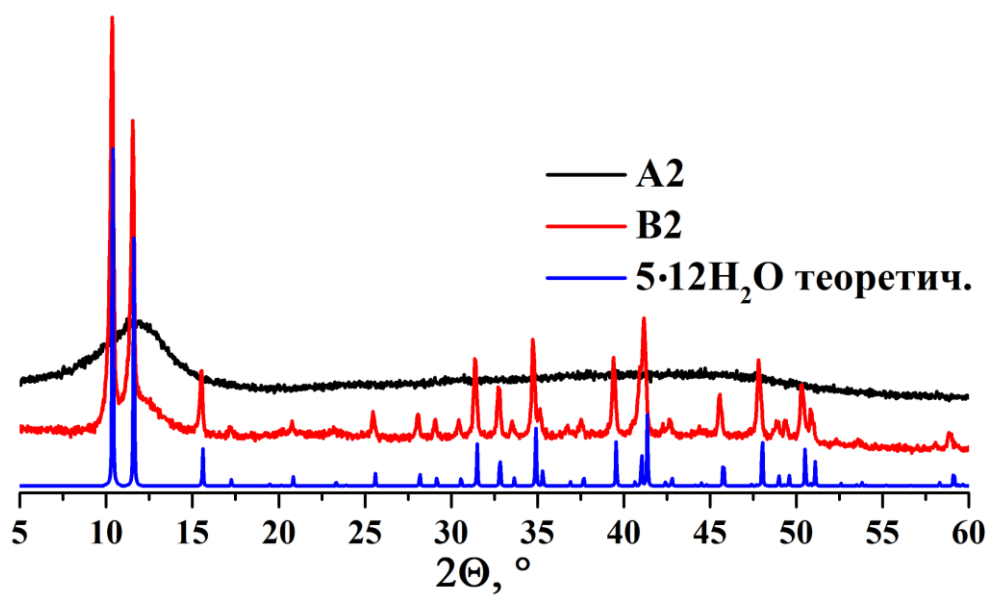


Рис. П28. Дифрактограммы соединений А2 и В2 и теоретическая дифрактограмма 5·12Н₂О.

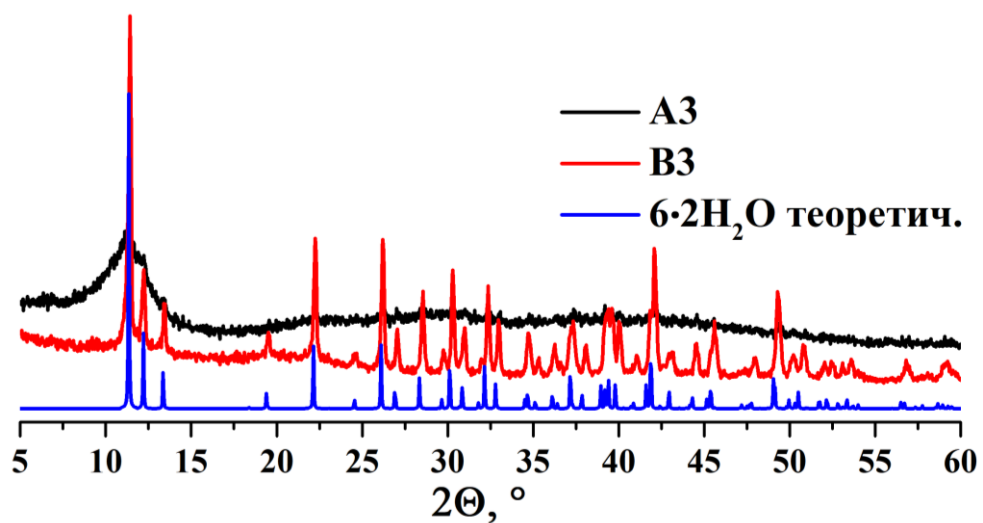


Рис. П29. Дифрактограммы соединений А3 и В3 и теоретическая дифрактограмма 6·2Н₂О.

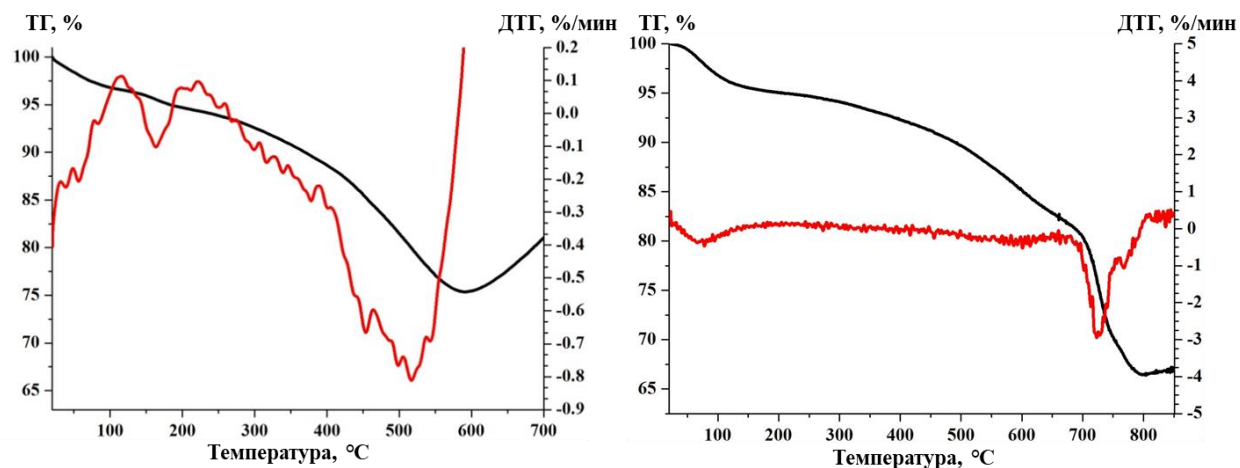


Рис. П30. Кривые ТГ и ДТГ соединений А1 (слева) и В1 (справа).

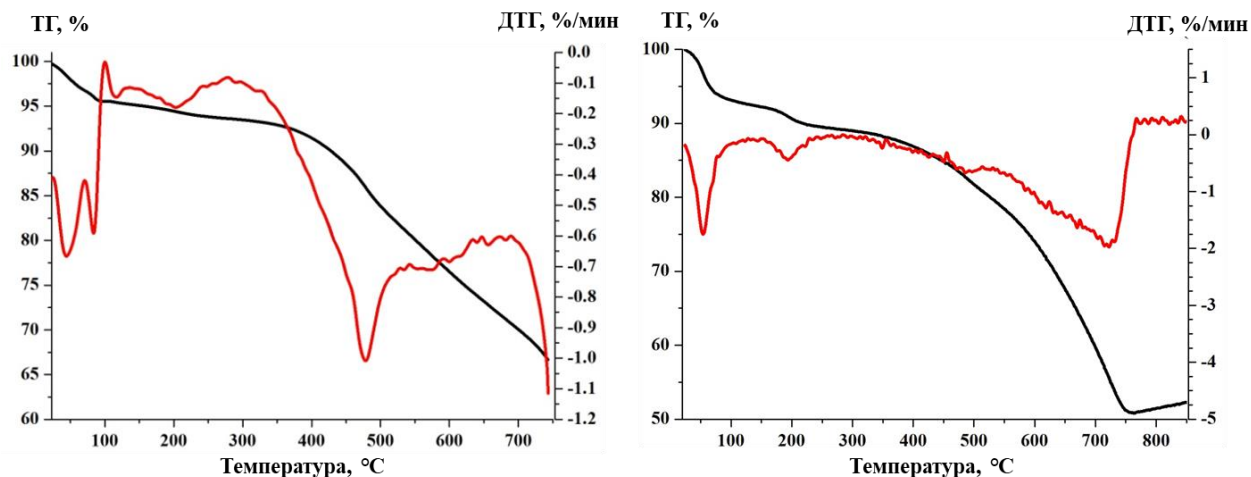


Рис. П31. Кривые ТГ и ДТГ соединений А2 (слева) и В2 (справа).

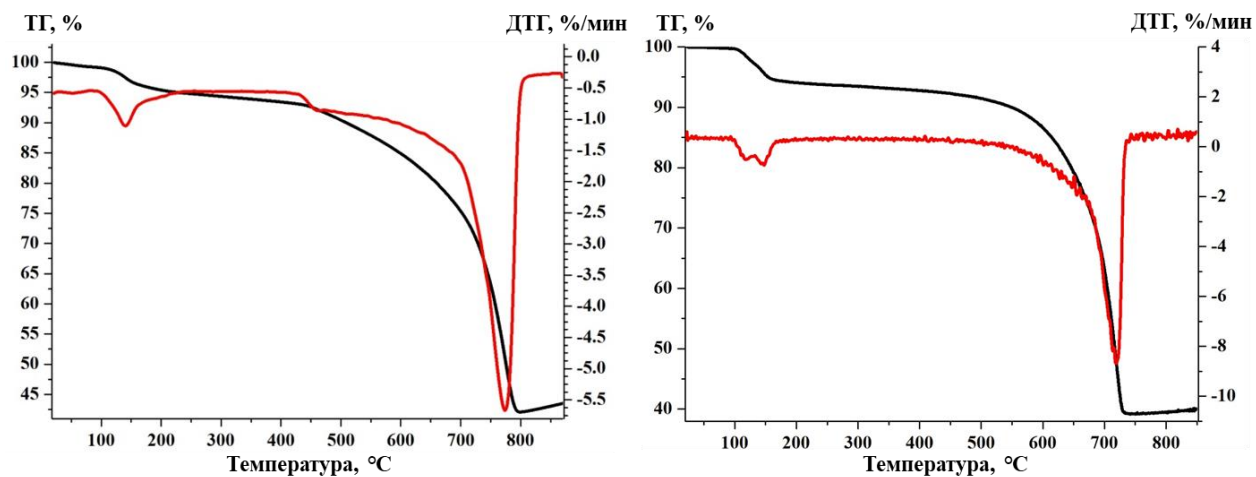


Рис. П32. Кривые ТГ и ДТГ соединений А3 (слева) и В3 (справа).

Структурные данные кластерных комплексов $5 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и $6 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

| Параметр | $5 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | $6 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ |
|--|--|---|
| Эмпирическая формула | $\text{Br}_8\text{H}_{32}\text{Mo}_6\text{O}_{18}$ | $\text{H}_{32}\text{I}_8\text{Mo}_6\text{O}_{18}$ |
| Молекулярная масса | 1535,18 | 1911,10 |
| Температура, К | 150(2) | 150(2) |
| Размер кристалла, мм^3 | $0,18 \times 0,16 \times 0,14$ | $0,14 \times 0,10 \times 0,10$ |
| Сингония | Тригональная | Тригональная |
| Пр. гр. | $R \bar{3}m$ | $R \bar{3}m$ |
| Z | 3 | 3 |
| a , Å | 15,2397(4) | 15,7382(11) |
| c , Å | 11,1438(3) | 11,3109(7) |
| V , Å ³ | 2241,39(10) | 2426,3(3) |
| $\rho_{\text{выч}}$, г/см ³ | 3,412 | 3,924 |
| μ , мм ⁻¹ | 13,198 | 9,947 |
| Диапазон θ , ° | 2,39 – 29,99 | 2,34 – 29,98 |
| Пределы по h, k, l | $-21 \leq h \leq 14;$ $-21 \leq k \leq 21;$ $-12 \leq l \leq 15$ | $-22 \leq h \leq 8;$ $-8 \leq k \leq 21;$ $-15 \leq l \leq 5$ |
| $F(000)$ | 2124 | 2556 |
| Число измеренных отражений | 5856 | 2389 |
| Число независимых отражений ($I > 2\sigma(I)$) | 785 | 831 |
| R_{int} | 0,0180 | 0,0159 |
| Число уточняемых параметров | 50 | 50 |
| $R(F^2 > 2\sigma(F^2)), wR(F^2)$ | 0,0107, 0,0259 | 0,0166, 0,0366 |
| GOOF | 1,124 | 1,163 |
| $\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$, e Å ⁻³ | 0,348, -0,519 | 0,780, -0,873 |

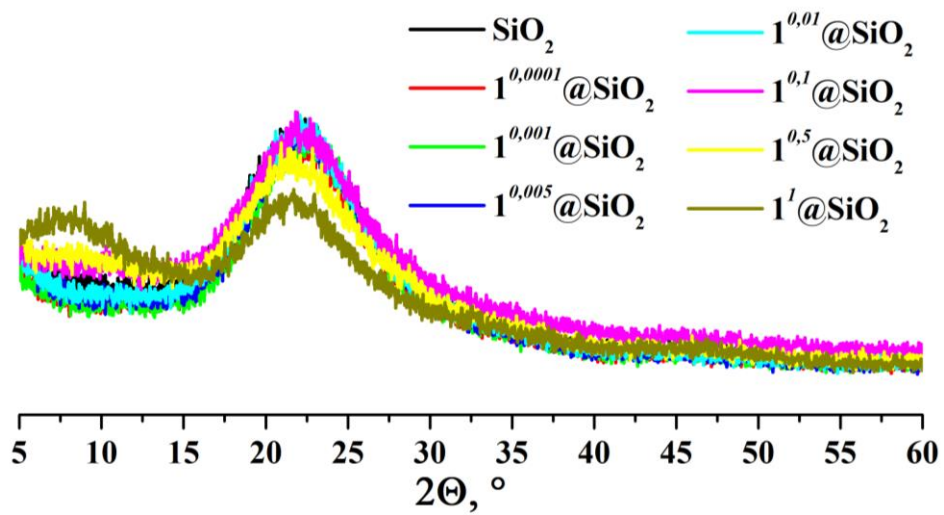


Рис. ПЗЗ. Дифрактограммы SiO_2 и $1^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 0,5, 1$).

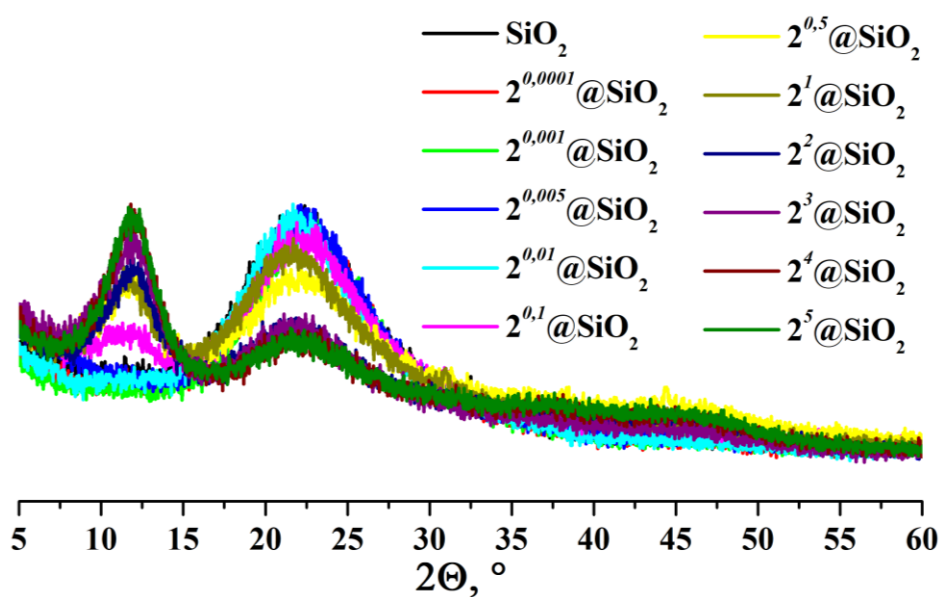


Рис. ПЗ4. Дифрактограммы SiO_2 и $2^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5$).

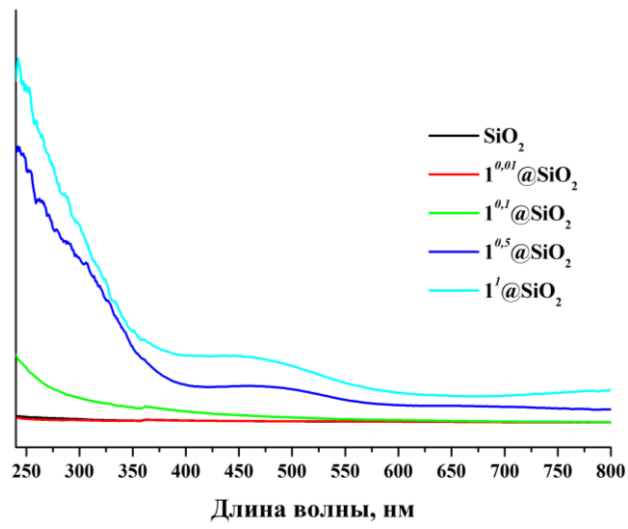


Рис. ПЗ5. Спектры диффузного отражения, преобразованные с помощью функции Кубелки-Мунка, SiO_2 и $1^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,01, 0,1, 0,5, 1$).

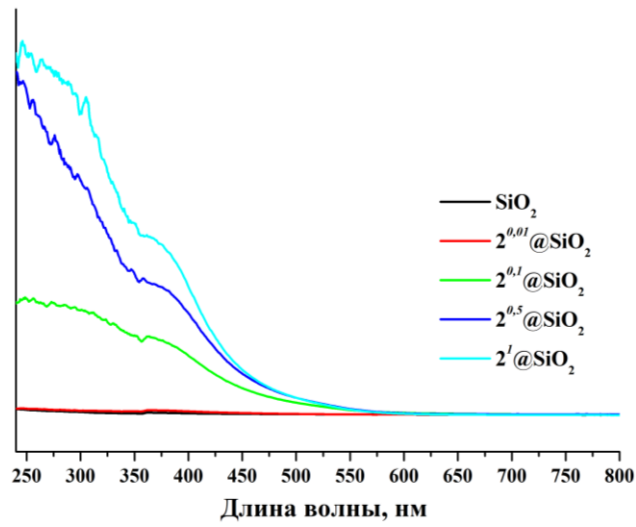


Рис. ПЗ6. Спектры диффузного отражения, преобразованные с помощью функции Кубелки-Мунка, SiO_2 и $2^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,01, 0,1, 0,5, 1$).

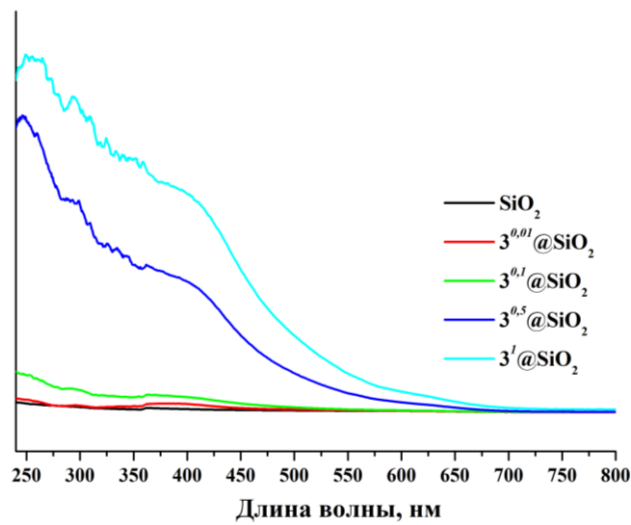


Рис. ПЗ7. Спектры диффузного отражения, преобразованные с помощью функции Кубелки-Мунка, SiO_2 и $3^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,01, 0,1, 0,5, 1$).

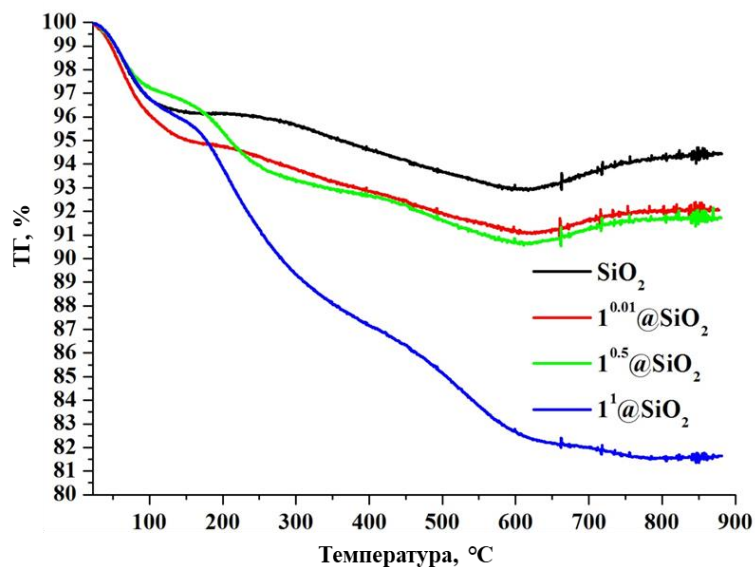


Рис. П38. Кривые ТГ SiO_2 и $1^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,01, 0,5, 1$).

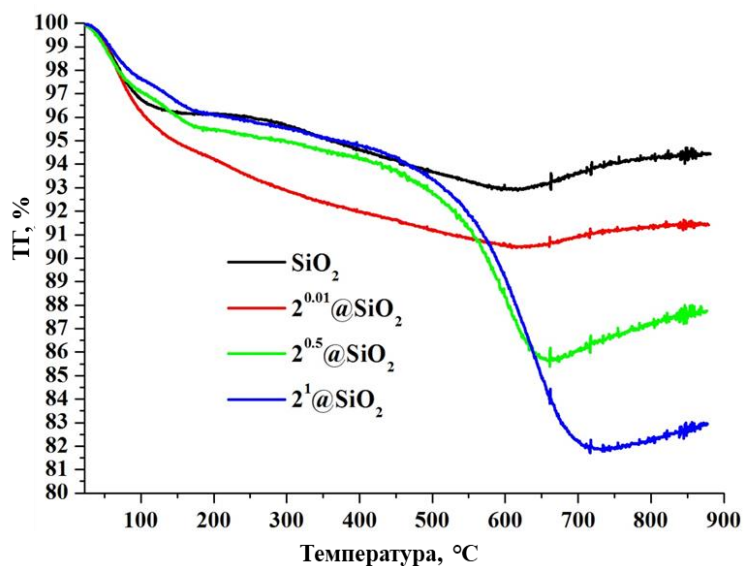


Рис. П39. Кривые ТГ SiO_2 и $2^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,01, 0,5, 1$).

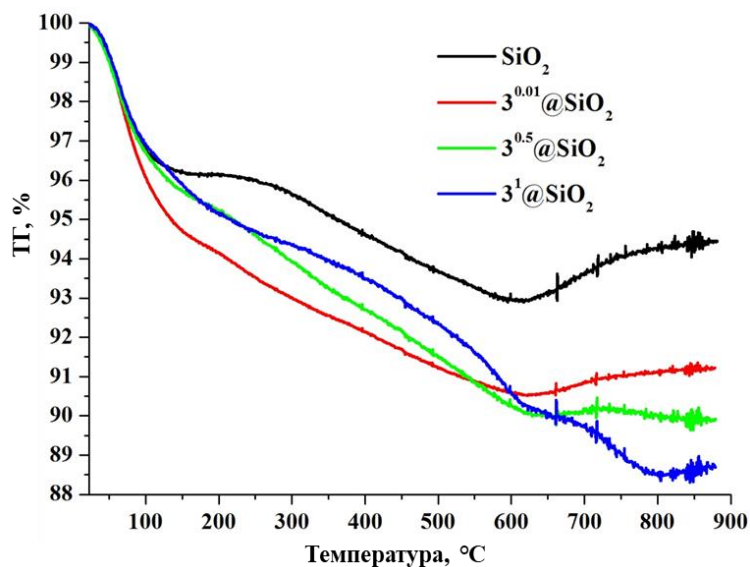


Рис. П40. Кривые ТГ SiO_2 и $3^x@\text{SiO}_2$ MPs ($x = 0,01, 0,5, 1$).

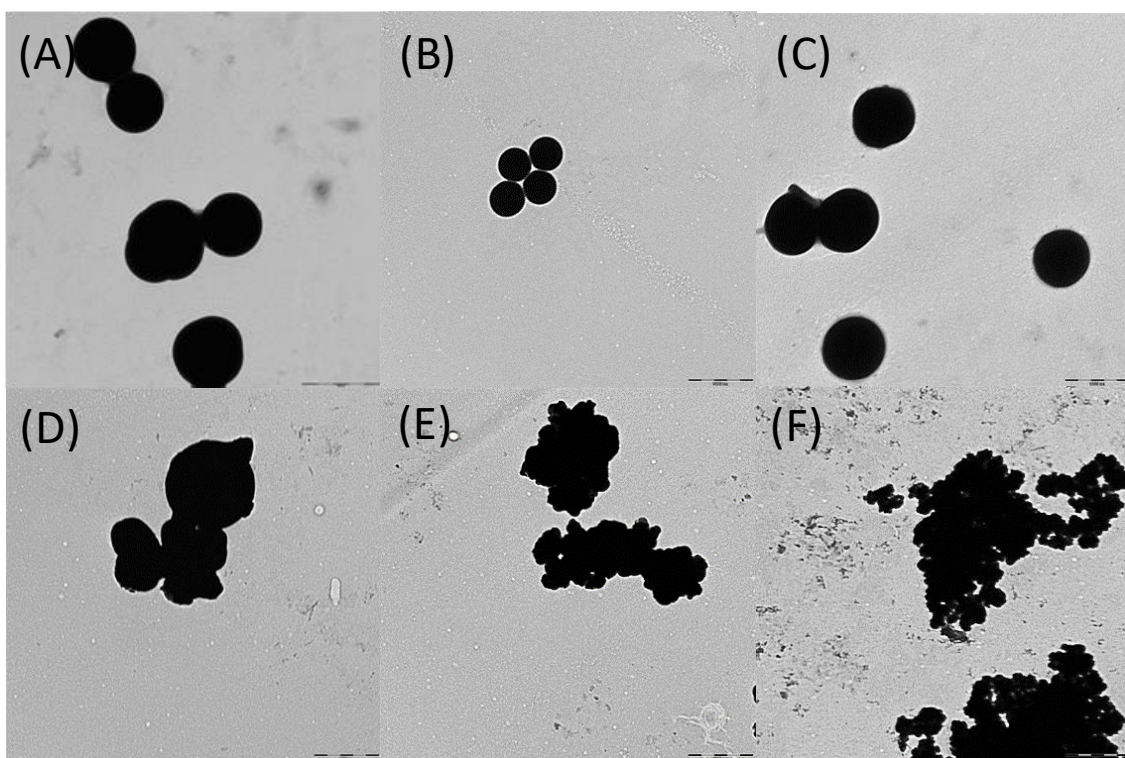


Рис. П41. Изображения $1^x@SiO_2$ MPs, полученные с помощью ПЭМ: (A) – $x = 0,001$; (B) – $x = 0,01$; (C) – $x = 0,05$; (D) – $x = 0,1$; (E) – $x = 0,5$; (F) – $x = 1$.

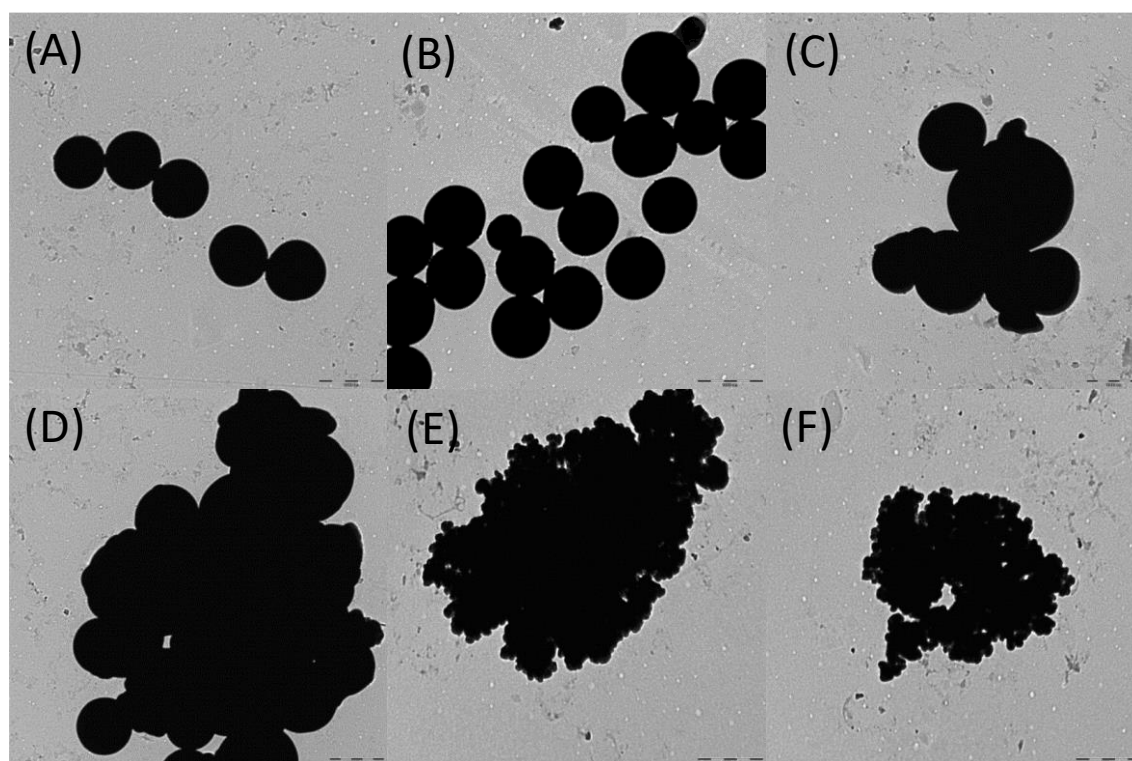


Рис. П42. Изображения $2^x@SiO_2$ MPs, полученные с помощью ПЭМ: (A) – $x = 0,001$; (B) – $x = 0,01$; (C) – $x = 0,05$; (D) – $x = 0,1$; (E) – $x = 0,5$; (F) – $x = 1$.

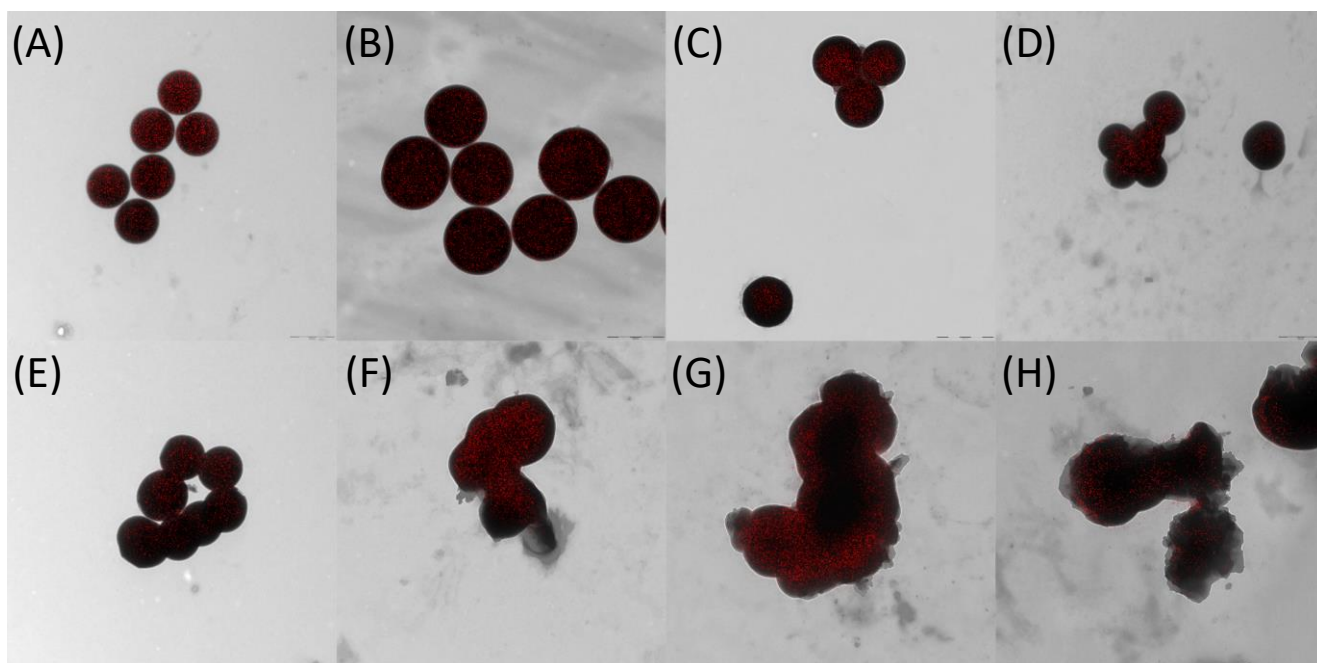


Рис. П43. Изображения $3^x@SiO_2$ MPs, полученные с помощью ПЭМ, и распределение Mo: (A) – $x = 0.001$; (B) – $x = 0.005$; (C) – $x = 0.01$; (D) – $x = 0.05$; (E) – $x = 0.1$; (F) – $x = 0.5$; (G) – $x = 1$; (H) – $x = 2$.

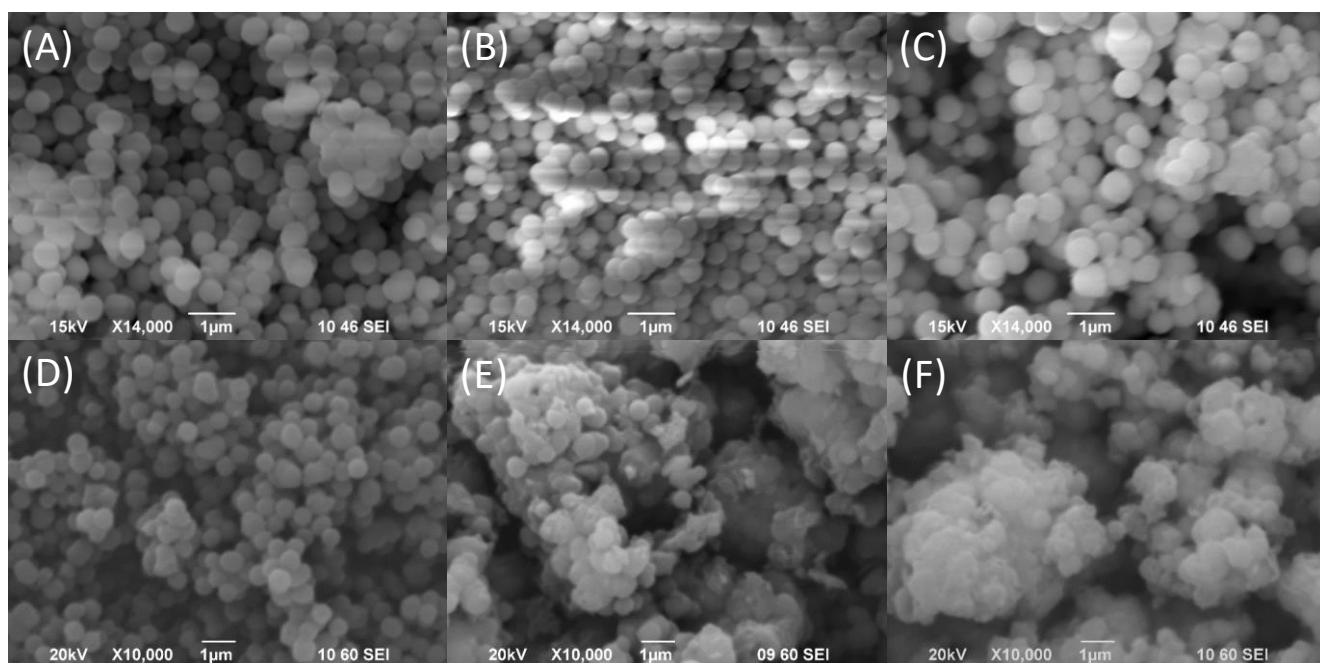


Рис. П44. Изображения $3^x@SiO_2$ MPs, полученные с помощью СЭМ: (A) – $x = 0.001$; (B) – $x = 0.01$; (C) – $x = 0.05$; (D) – $x = 0.1$; (E) – $x = 0.5$; (F) – $x = 1$.

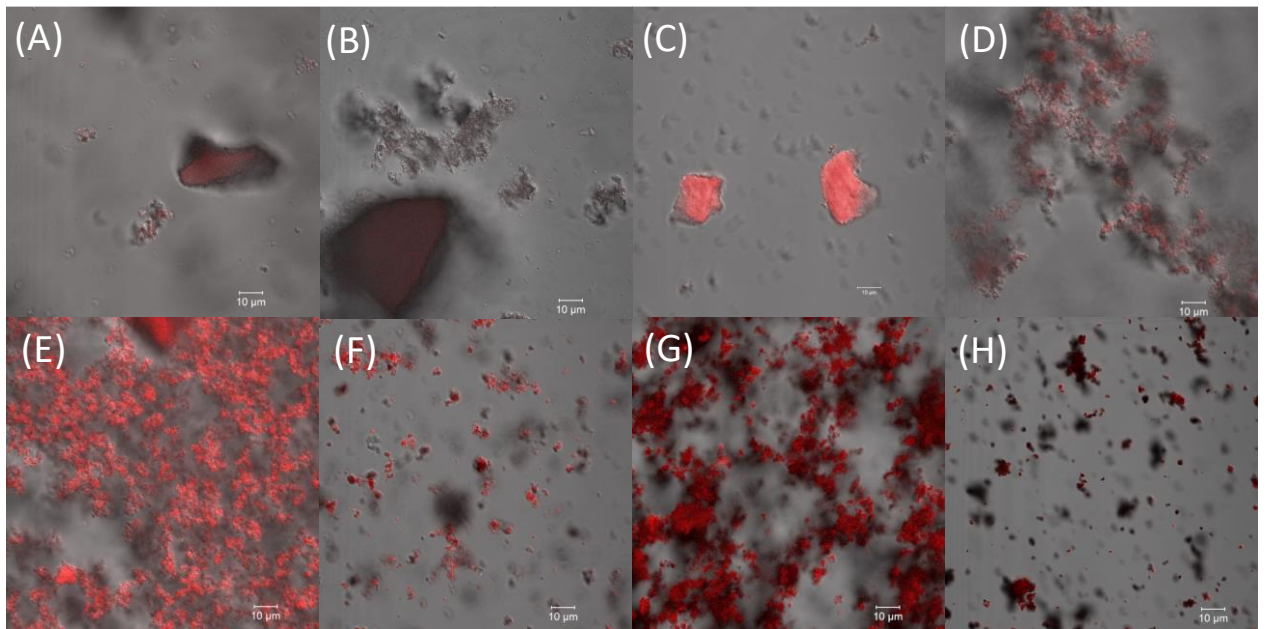


Рис. П45. Изображения $3^x@SiO_2$ MPs, полученные с помощью КЛСМ: (A) – $x = 0,001$; (B) – $x = 0,005$; (C) – $x = 0,01$; (D) – $x = 0,05$; (E) – $x = 0,1$; (F) – $x = 0,5$; (G) – $x = 1$; (H) – $x = 2$.

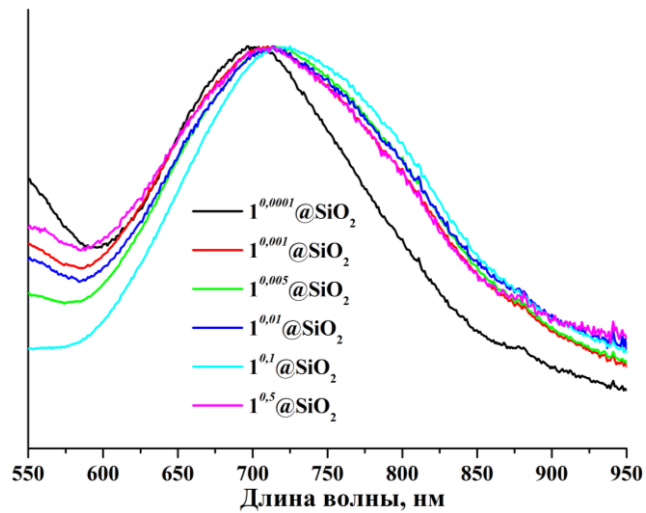


Рис. П46. Нормированные спектры эмиссии $1^x@SiO_2$ MPs ($x = 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 0,5$).

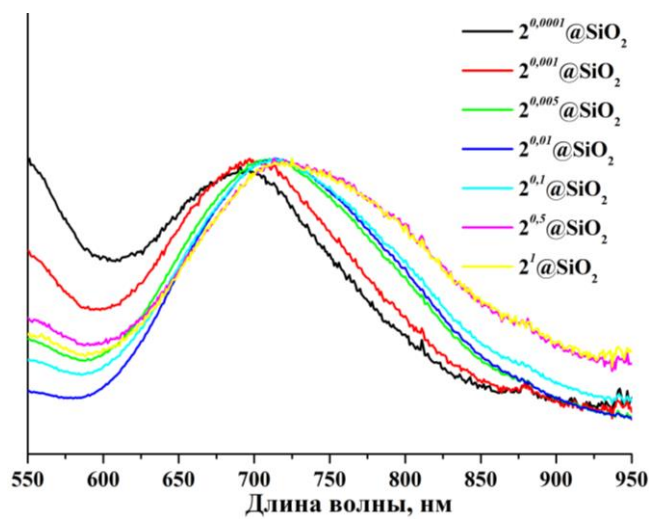


Рис. П47. Нормированные спектры эмиссии $2^x@SiO_2$ MPs ($x = 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 0,5, 1$).

Фотофизические и спектроскопические характеристики $n^x@SiO_2$ MPs и NPs

| Образец | $\lambda_{эм}$, нм | $\Phi_{эм}$ | $\tau_{эм}$, мкс (А) |
|--------------------|---------------------|-------------|------------------------------------|
| <i>MPs</i> | | | |
| $1^{0,0001}@SiO_2$ | ~ 700 | < 0,01 | 92 (0,04), 14 (0,15), 1,3 (0,81) |
| $1^{0,001}@SiO_2$ | ~ 710 | < 0,01 | 63 (0,05), 15 (0,12), 1,0 (0,83) |
| $1^{0,005}@SiO_2$ | ~ 715 | < 0,01 | 63 (0,11), 15 (0,33), 2,5 (0,56) |
| $1^{0,01}@SiO_2$ | ~ 715 | < 0,01 | 62 (0,07), 15 (0,27), 2,3 (0,66) |
| $1^{0,1}@SiO_2$ | ~ 720 | < 0,01 | 59 (0,07), 19 (0,30), 5,0 (0,63) |
| $1^{0,5}@SiO_2$ | ~ 710 | < 0,01 | 62 (0,07), 17 (0,31), 3,1 (0,62) |
| $2^{0,0001}@SiO_2$ | ~ 695 | < 0,01 | 94 (0,04), 13 (0,14), 1,3 (0,82) |
| $2^{0,001}@SiO_2$ | ~ 700 | < 0,01 | 93 (0,04), 13 (0,11), 1,5 (0,86) |
| $2^{0,005}@SiO_2$ | ~ 710 | < 0,01 | 85 (0,05), 13 (0,15), 2,2 (0,80) |
| $2^{0,01}@SiO_2$ | ~ 715 | < 0,01 | 88 (0,06), 15 (0,15), 2,6 (0,79) |
| $2^{0,1}@SiO_2$ | ~ 715 | < 0,01 | 47 (0,04), 5,3 (0,15), 0,7 (0,81) |
| $2^{0,5}@SiO_2$ | ~ 725 | < 0,01 | 468 (0,03), 6,2 (0,14), 1,2 (0,83) |
| $2^1@SiO_2$ | ~ 725 | < 0,01 | 49 (0,04), 6,6 (0,13), 1,3 (0,83) |
| $3^{0,0001}@SiO_2$ | ~ 700 | 0,04 | 135 (0,15), 31 (0,13), 4,0 (0,72) |
| $3^{0,001}@SiO_2$ | ~ 702 | 0,08 | 134 (0,51), 47 (0,21), 5,2 (0,28) |
| $3^{0,005}@SiO_2$ | ~ 702 | 0,04 | 135 (0,50), 48 (0,20), 5,4 (0,30) |
| $3^{0,01}@SiO_2$ | ~ 702 | 0,04 | 134 (0,50), 45 (0,23), 6,6 (0,27) |
| $3^{0,1}@SiO_2$ | ~ 703 | 0,02 | 114 (0,35), 41 (0,25), 5,2 (0,40) |
| $3^{0,5}@SiO_2$ | ~ 704 | 0,02 | 112 (0,20), 29 (0,21), 4,4 (0,59) |
| $3^1@SiO_2$ | ~ 708 | 0,01 | 98 (0,14), 34 (0,19), 5,7 (0,67) |
| <i>NPs</i> | | | |
| $3^{0,001}@SiO_2$ | ~ 702 | 0,12 | 165 (0,31), 95 (0,53), 21 (0,16) |
| $3^{0,005}@SiO_2$ | ~ 701 | 0,06 | 160 (0,13), 91 (0,26), 11 (0,61) |
| $3^{0,01}@SiO_2$ | ~ 700 | 0,03 | 133 (0,06), 41 (0,04), 2,2 (0,90) |
| $3^{0,05}@SiO_2$ | ~ 703 | < 0,01 | 107 (0,04), 26 (0,04), 1,9 (0,92) |
| $3^{0,1}@SiO_2$ | ~ 704 | < 0,01 | 106 (0,06), 18 (0,14), 3,4 (0,80) |

Фотофизические и спектроскопические характеристики 1-3 и An и Bn

| Образец | $\lambda_{эм}$, нм | $\Phi_{эм}$ | $\tau_{эм}$, мкс (А) |
|-------------------------------|---------------------|-------------|--------------------------------|
| Деаэрированный р-р в ацетоне | | | |
| 1 | ~ 770 | 0,01 | 160(0,39), 10(0,61) |
| 2 | - | - | - |
| 3[226] | ~ 760 | 0,25 | 185 |
| Порошок | | | |
| 1 | ~ 765 | <0,005 | 17(0,14), 9,3(0,02), 1,9(0,84) |
| 2 | ~ 785 | < 0,01 | 19(0,25), 11(0,20), 0,9(0,55) |
| 3[226] | ~ 666 | 0,26 | 96(0,71), 26(0,29) |
| A1 (4·2H₂O) | ~ 745 | < 0,01 | 17(0,14), 4,2(0,4), 0,8(0,46) |
| 2 (5·2H₂O) | ~ 715 | 0,01 | 62(0,04), 12(0,13), 2,7(0,83) |
| A3 (6·2H₂O) | - | - | - |
| B1 (4·2H₂O) | ~ 745 | < 0,01 | 20(0,16), 5,6(0,46), 1,2(0,38) |
| B2 (5·6H₂O) | ~ 705 | 0,02 | 66(0,16), 32(0,24), 6,1(0,60) |
| B3 (6·2H₂O) | - | - | - |

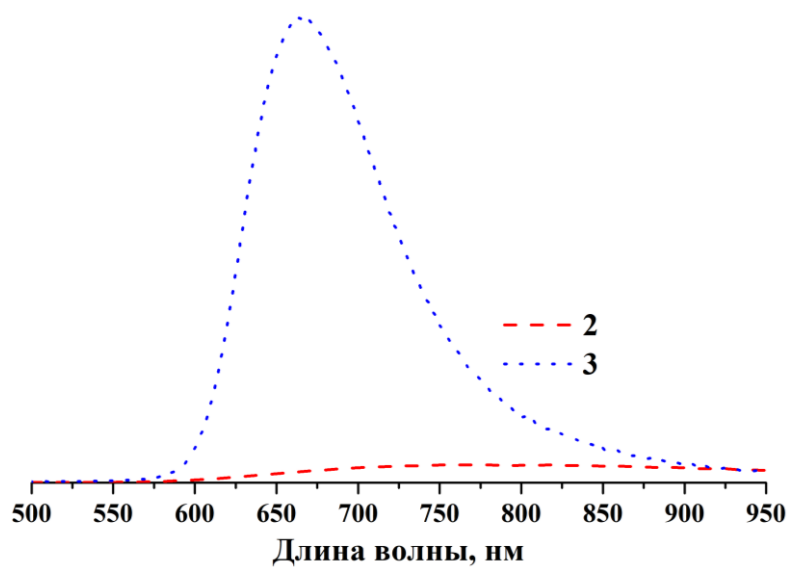


Рис. П48. Спектры эмиссии порошковых образцов 1 и 2.

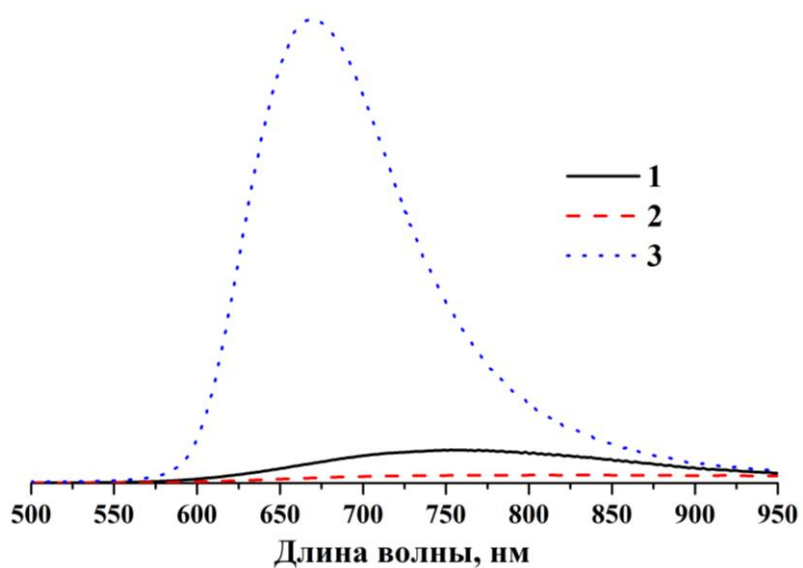


Рис. П49. Спектры эмиссии 1, 2 и 3 в деаэрированном растворе в ацетоне.

Т а б л и ц а П4

Фотофизические и спектроскопические характеристики $Z^x@SiO_2$ MPs

| Образец | $\Phi_{эм}$ | Образец | $\Phi_{эм}$ | Образец | $\Phi_{эм}$ |
|--------------------|-------------|-------------------|-------------|------------------|-------------|
| $Z^{0,0001}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,002}@SiO_2$ | 0,08 | $Z^{0,03}@SiO_2$ | 0,02 |
| $Z^{0,0002}@SiO_2$ | 0,07 | $Z^{0,003}@SiO_2$ | 0,06 | $Z^{0,04}@SiO_2$ | 0,03 |
| $Z^{0,0003}@SiO_2$ | 0,08 | $Z^{0,004}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,05}@SiO_2$ | 0,02 |
| $Z^{0,0004}@SiO_2$ | 0,07 | $Z^{0,005}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,06}@SiO_2$ | 0,03 |
| $Z^{0,0005}@SiO_2$ | 0,08 | $Z^{0,006}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,07}@SiO_2$ | 0,03 |
| $Z^{0,0006}@SiO_2$ | 0,09 | $Z^{0,007}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,08}@SiO_2$ | 0,02 |
| $Z^{0,0007}@SiO_2$ | 0,07 | $Z^{0,008}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,09}@SiO_2$ | 0,02 |
| $Z^{0,0008}@SiO_2$ | 0,06 | $Z^{0,009}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,1}@SiO_2$ | 0,02 |
| $Z^{0,0009}@SiO_2$ | 0,08 | $Z^{0,01}@SiO_2$ | 0,04 | $Z^{0,5}@SiO_2$ | 0,02 |
| $Z^{0,001}@SiO_2$ | 0,08 | $Z^{0,02}@SiO_2$ | 0,03 | $Z^1@SiO_2$ | 0,01 |

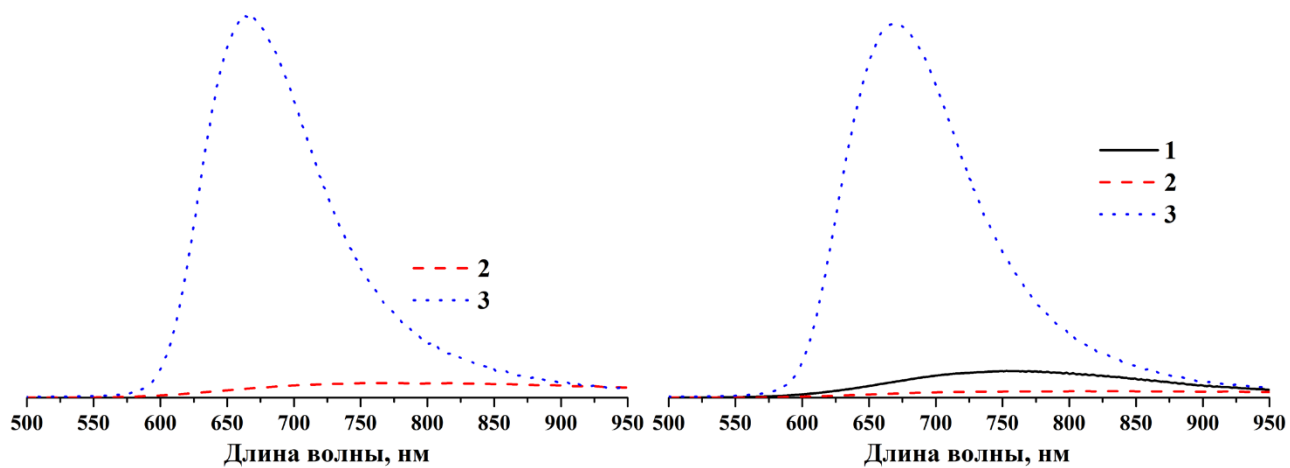


Рис. П50. Спектры эмиссии An и Bn.

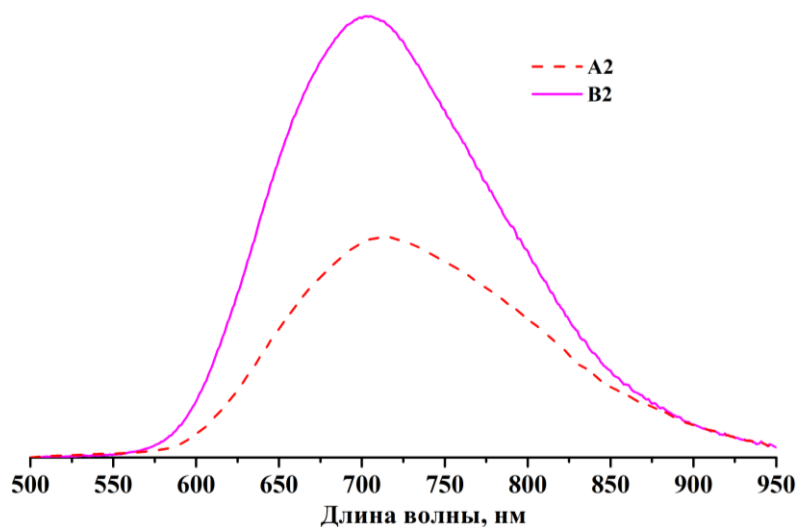


Рис. П51. Спектры эмиссии A2 и B2.

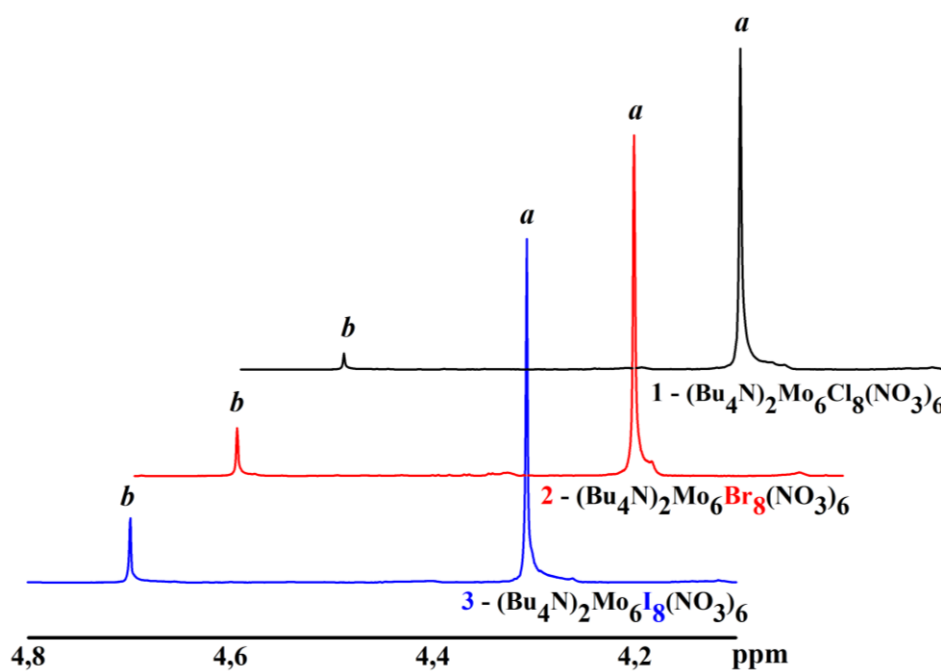
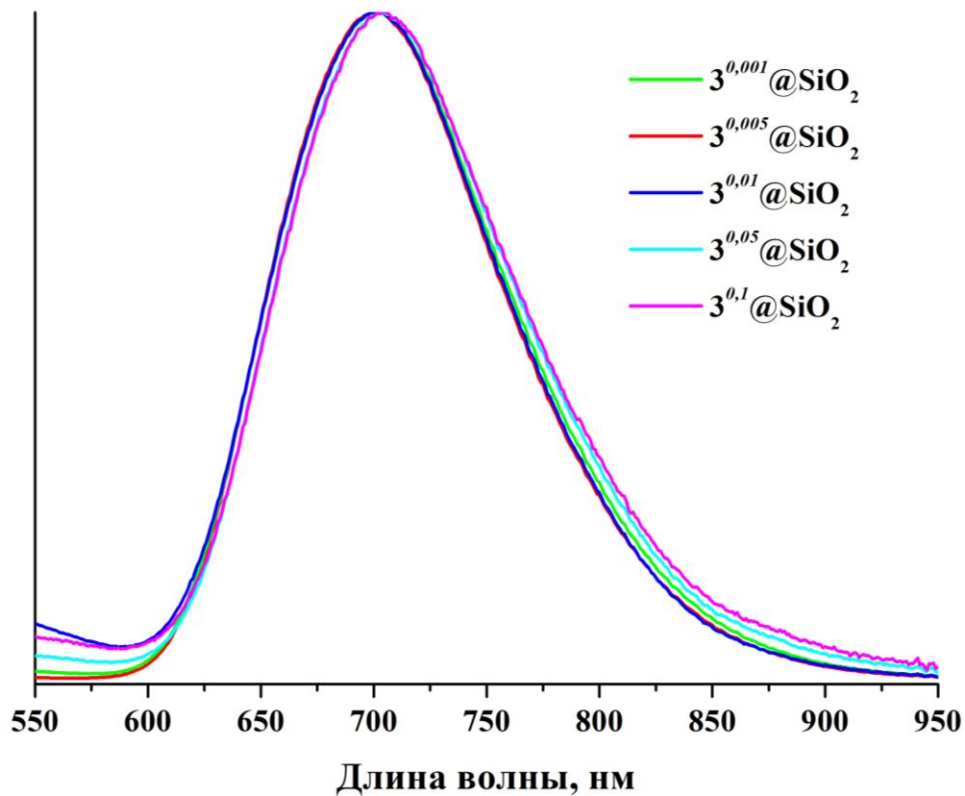
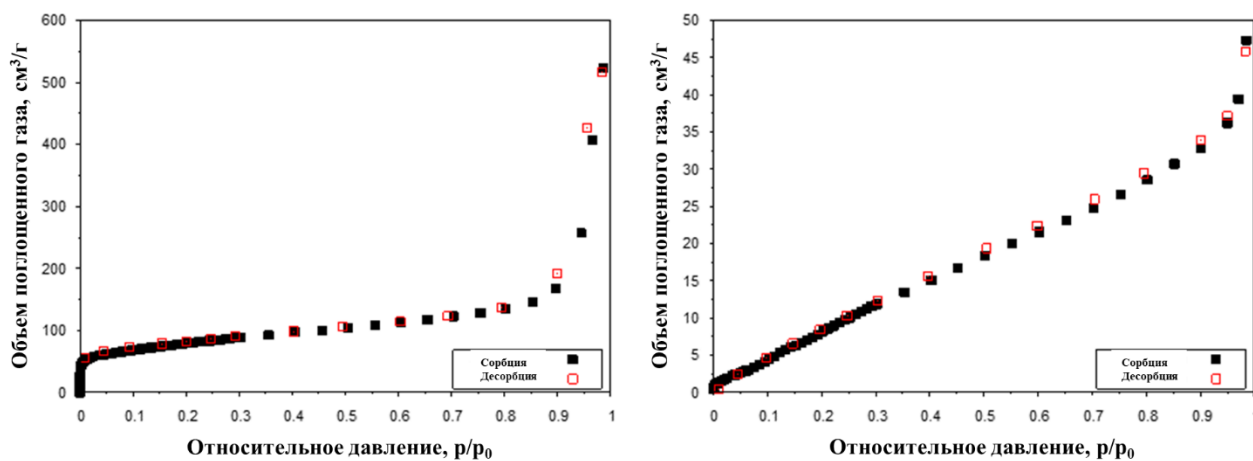


Рис. П52. Фрагменты ^1H -ЯМР спектров растворов 2,3-дифенил-*пара*-диоксена и 1, 2 или 3 в ацетоне- d_6 через 3 часа облучения светом с длиной волны > 400 нм.

Показатели эффективности генерации синглетного кислорода

| | С, М | Конверсия, % |
|---|-------|--------------|
| 1 | 0,008 | 4 |
| 2 | 0,024 | 12 |
| 3 | 0,032 | 16 |

Рис. П53. Нормированные спектры эмиссии $3^x@SiO_2$ NPs ($x = 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1$).Рис. П54. Изотермы сорбции азота при 77 К $3^{0,001}@SiO_2$ MPs (слева) и $3^{0,001}@SiO_2$ NPs (справа).

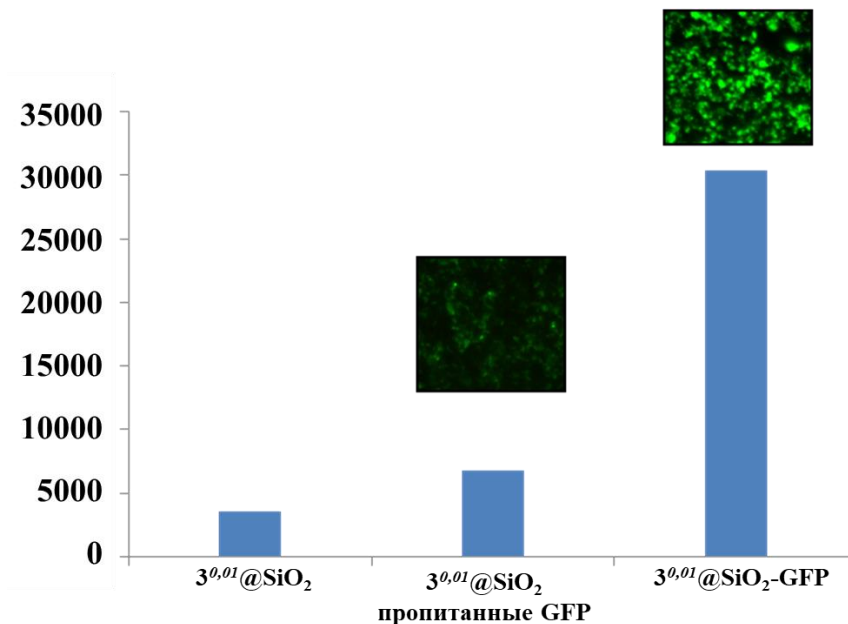


Рис. П55. Средние значения интенсивности люминесценции, определенные с помощью проточной цитометрии ($\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм}} = 530 \pm 30 \text{ нм}$), и соответствующие изображения КЛСМ.

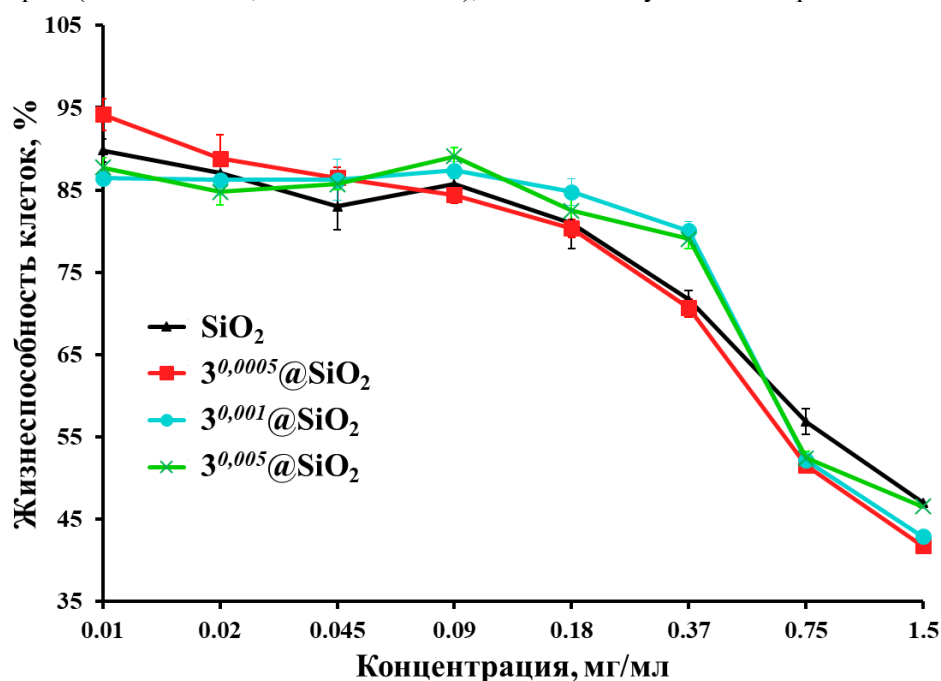


Рис. П56. Влияние $3^x@SiO_2$ MPs ($x = 0,0005, 0,001, 0,005$) на жизнеспособность клеток линии Нер-2

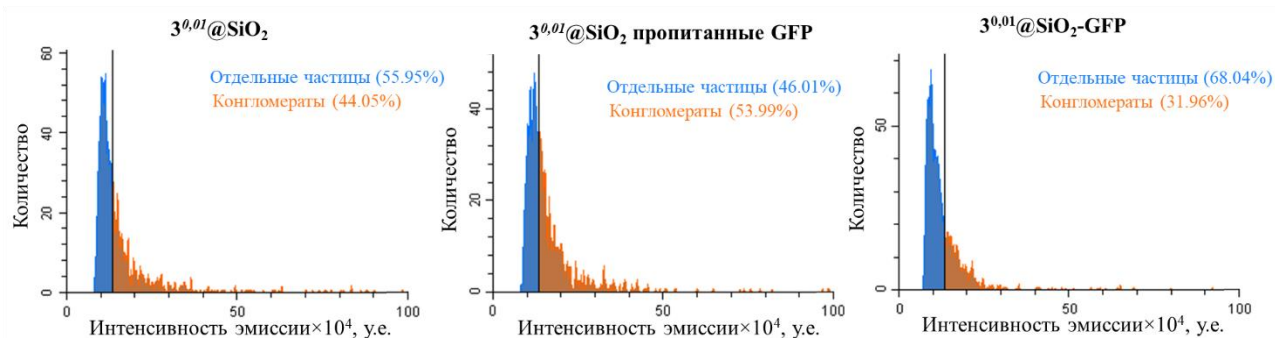


Рис. П57. Уровень аггломерации частиц, определенный с помощью проточной цитометрии.

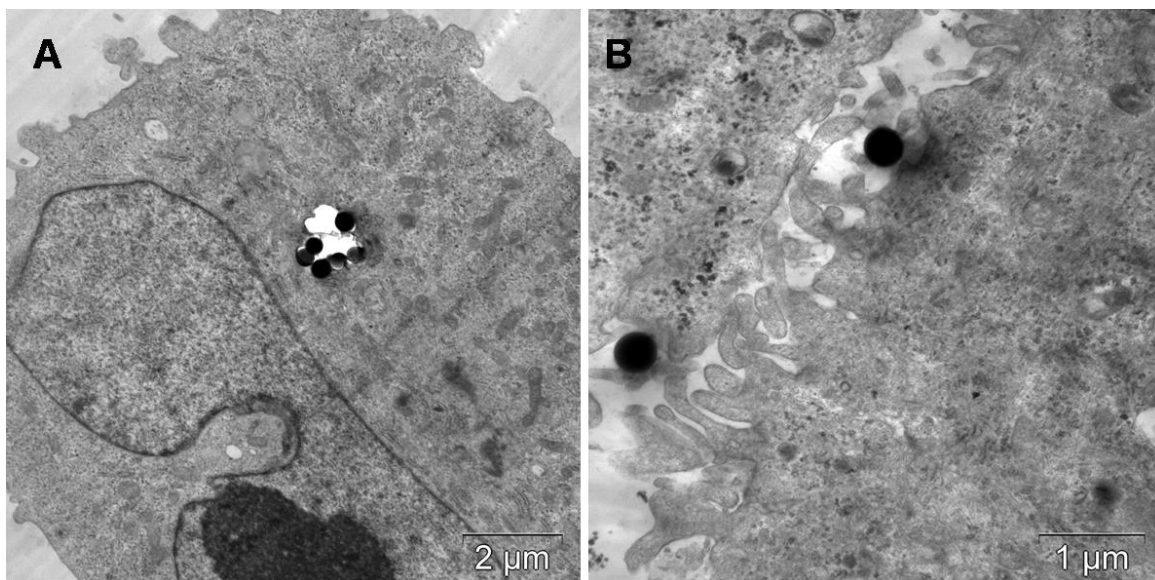


Рис. П58. Изображения клеток линии Нер-2, инкубированных с $3^{0,01}@SiO_2$ MPs в течение 12 часов, полученные с помощью ПЭМ.

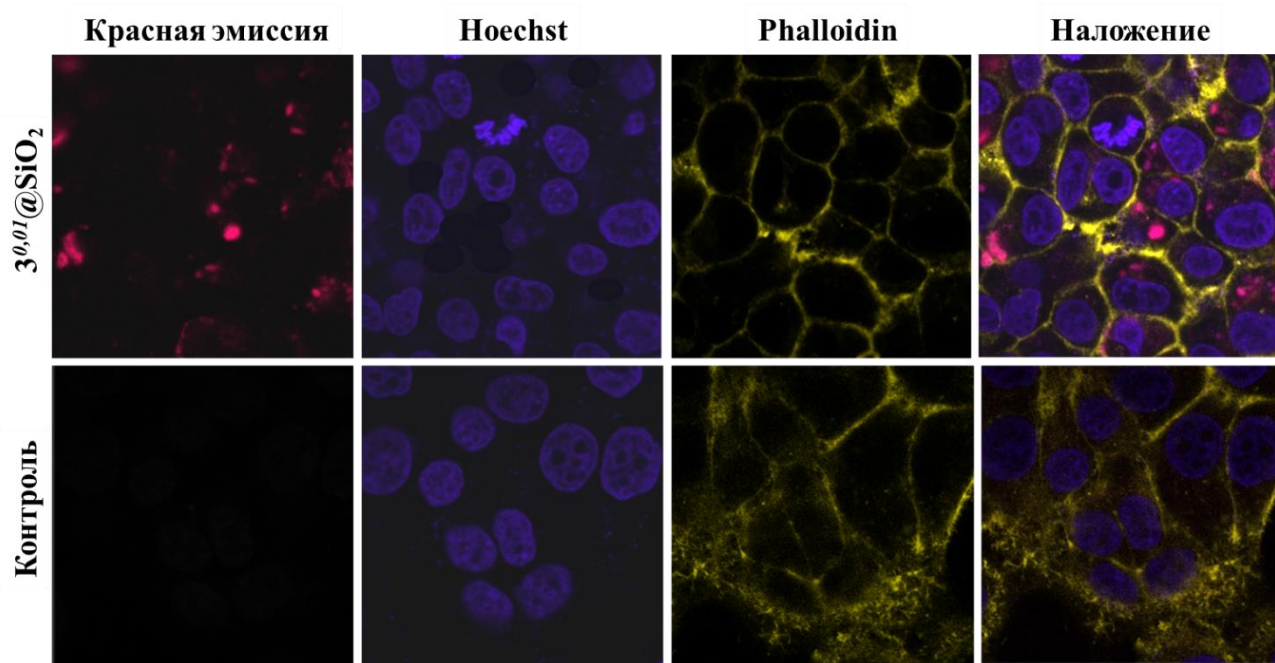


Рис. П59. Изображения, демонстрирующие поглощение частиц клетками и их распределение внутри клеток, полученные с помощью КЛСМ. Цитоскелет окрашен Alexa Fluore-532 phalloidin (желтый), ядра окрашены Hoechst (фиолетовый).

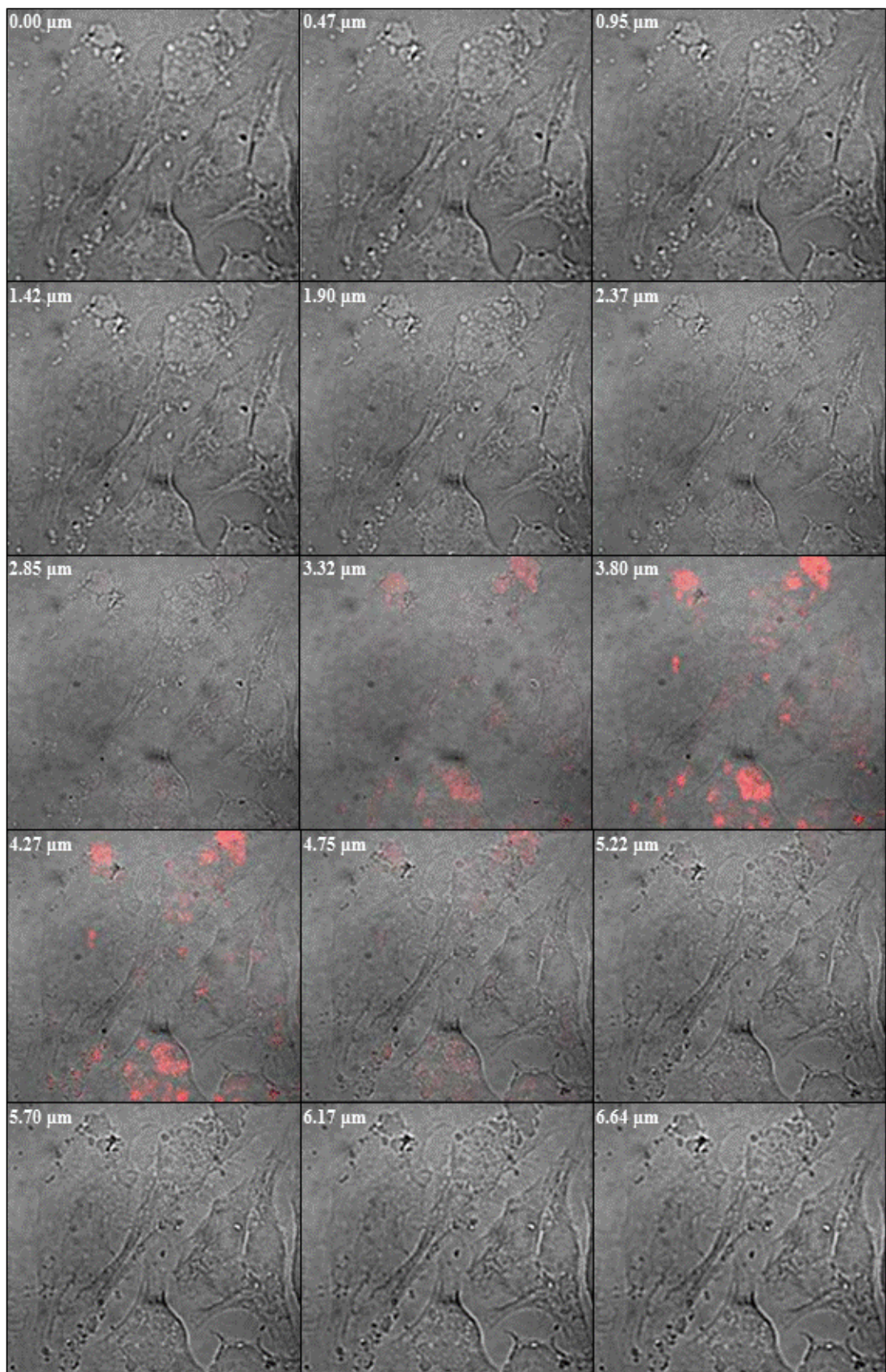
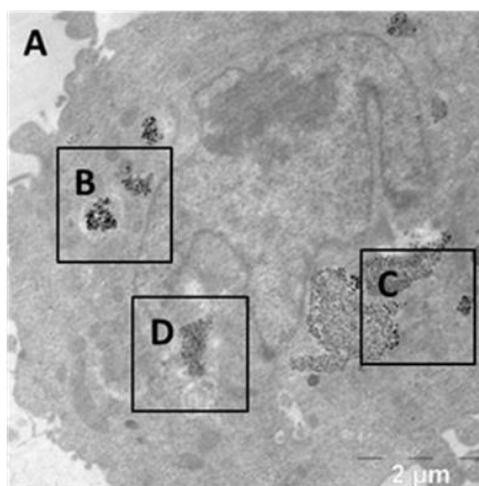


Рис. П60. Псевдо-3D изображение (Z-stack) клеток линии Нер-2, инкубированных с $3^{0,001}@SiO_2$ NPs.



Светлопольные
изображения

Распределение
элементов

Наложение

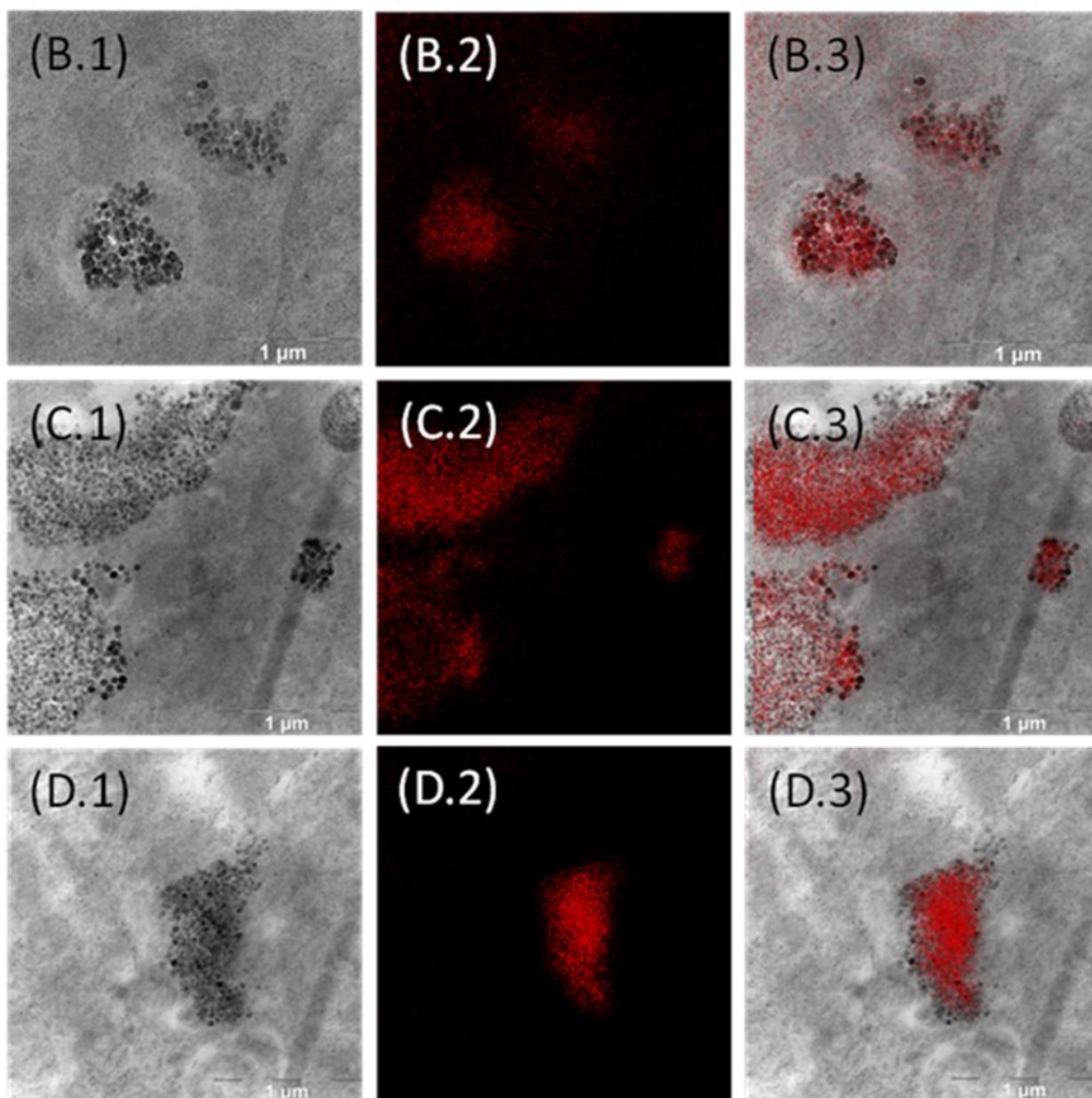
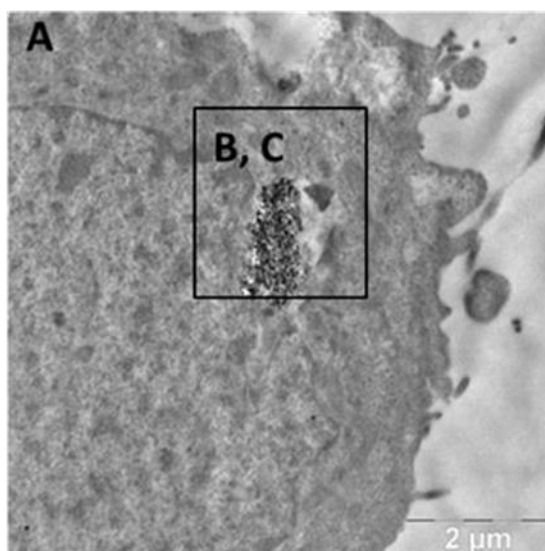


Рис. П61. Изображения клеток линии Hep-2, инкубированных с SiO₂ NPs в течение 24 часов, и распределение Si, полученные с помощью ПЭМ.



Светлопольные
изображения

Распределение
элементов

Наложение

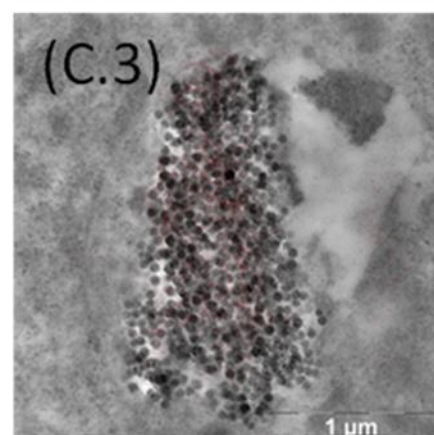
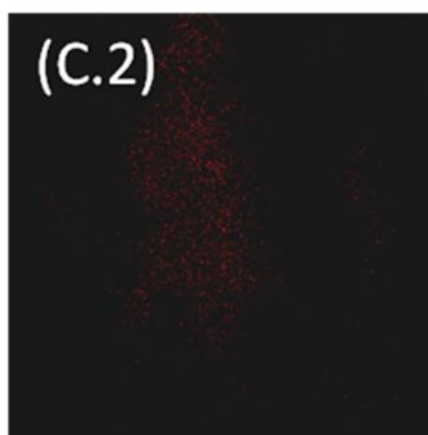
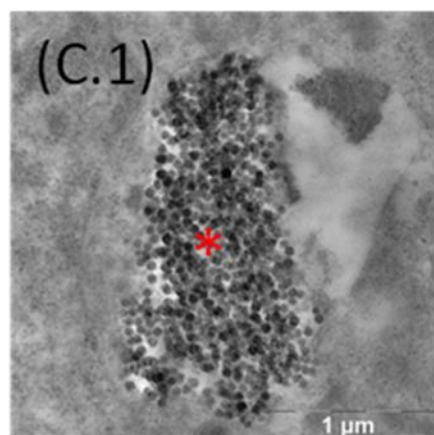
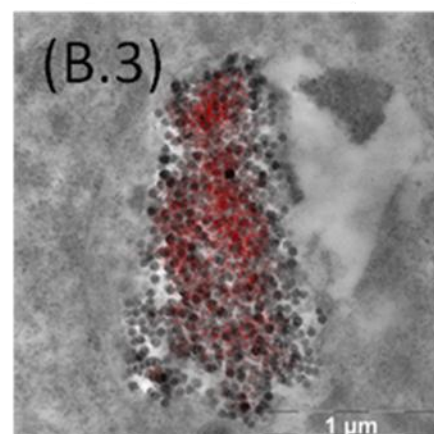
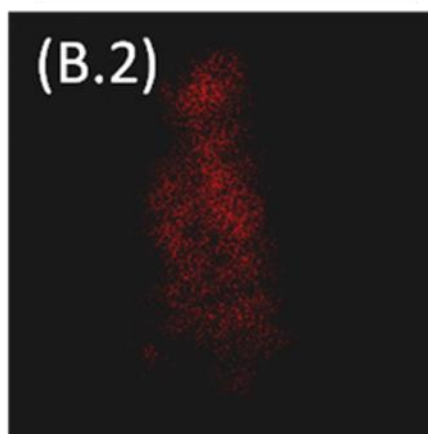
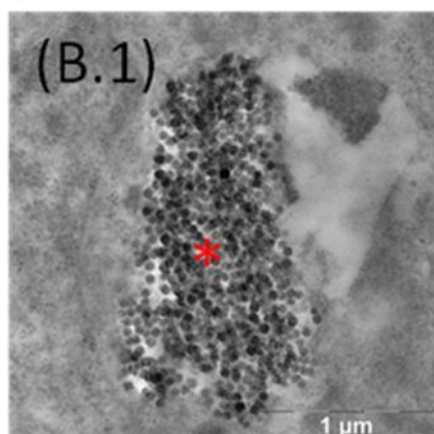


Рис. П62. Изображения клеток линии Нер-2, инкубированных с $Z^{0,01}@SiO_2$ NPs в течение 24 часов, и распределение Si (B2-B3) и Mo (B2-B3), полученные с помощью ПЭМ.

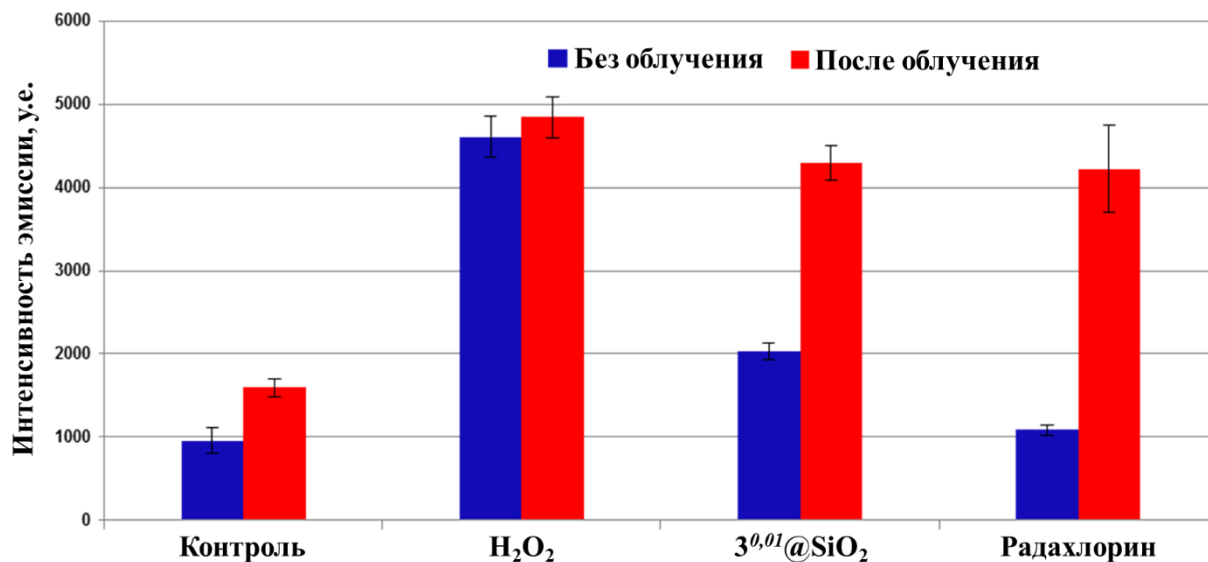


Рис. П63. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК внутри клеток Нер-2, инкубированных с H₂O₂, 3^{0,01}@SiO₂ NPs и Радахлорином до (А) и после (Б) облучения.

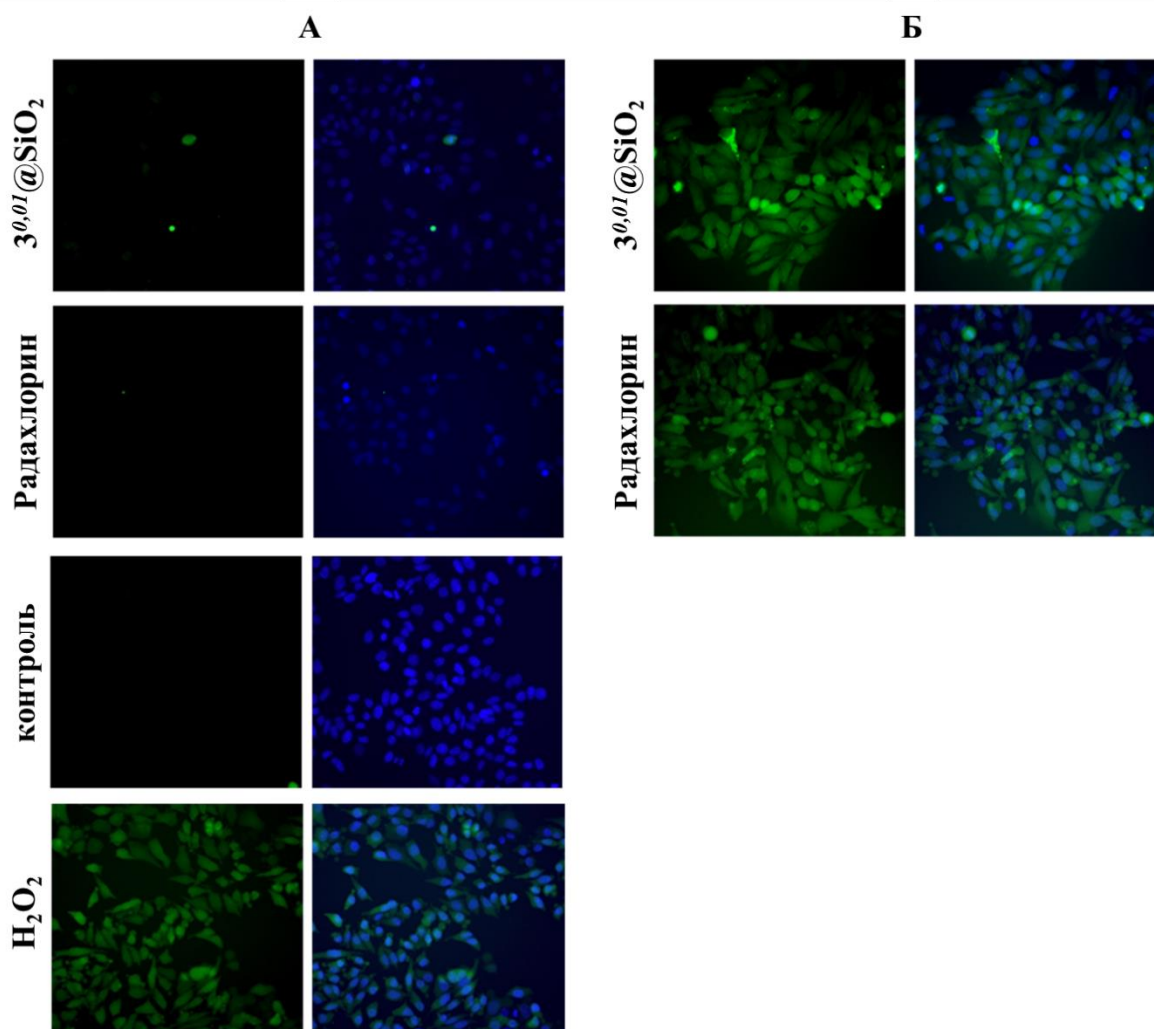


Рис. П64. Детектирование и количественное определение уровня генерации АФК внутри клеток Нер-2, инкубированных с H₂O₂, 3^{0,01}@SiO₂ NPs и Радахлорином до (А) и после (Б) облучения. Клетки окрашивали Ноеchst 33342.

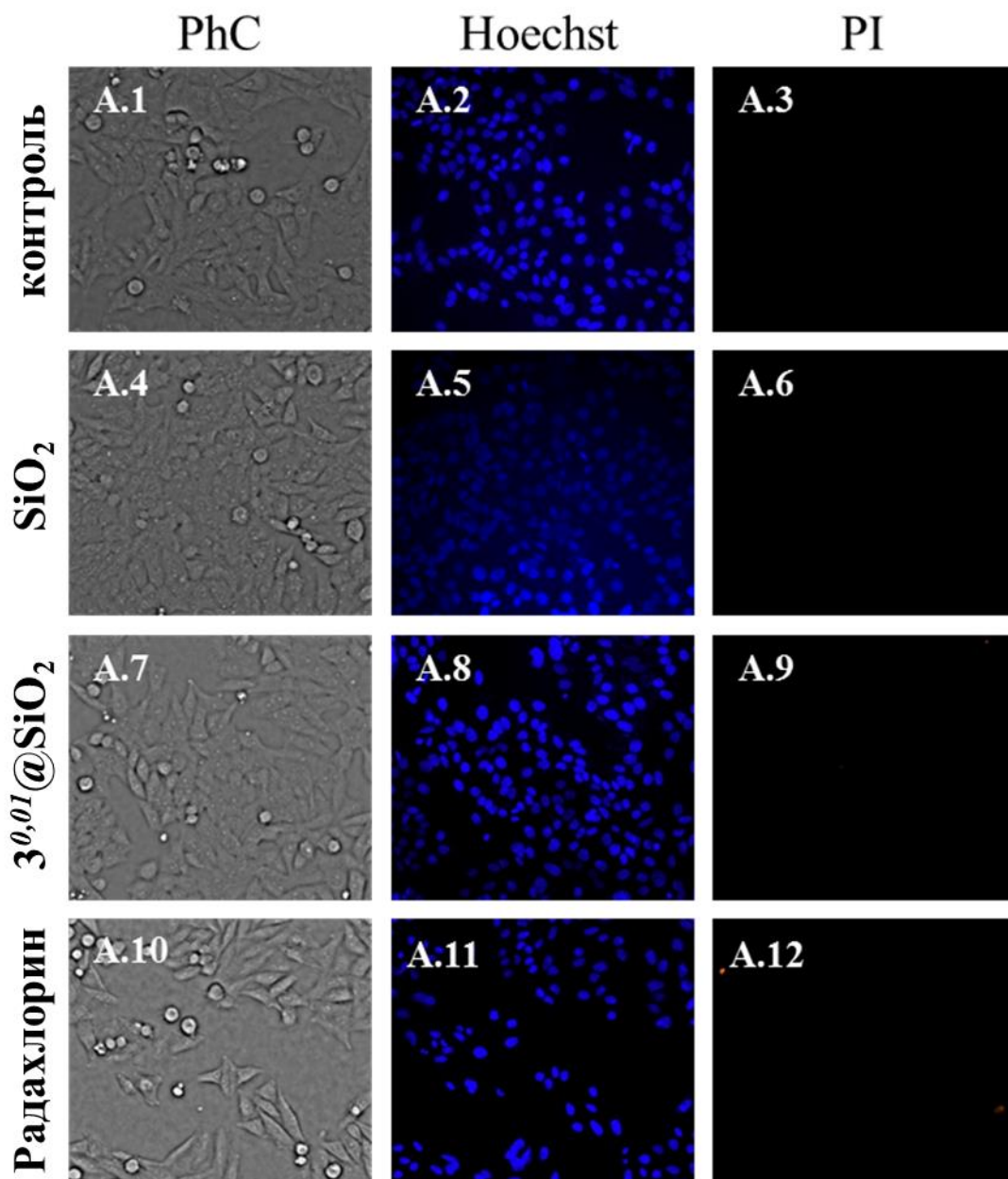


Рис. П65. Изображение, демонстрирующее действие $3^{0,01}@SiO_2$ и Радахлорина на клетки линии Нер-2 до облучения. Анализ проводили с использованием метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.

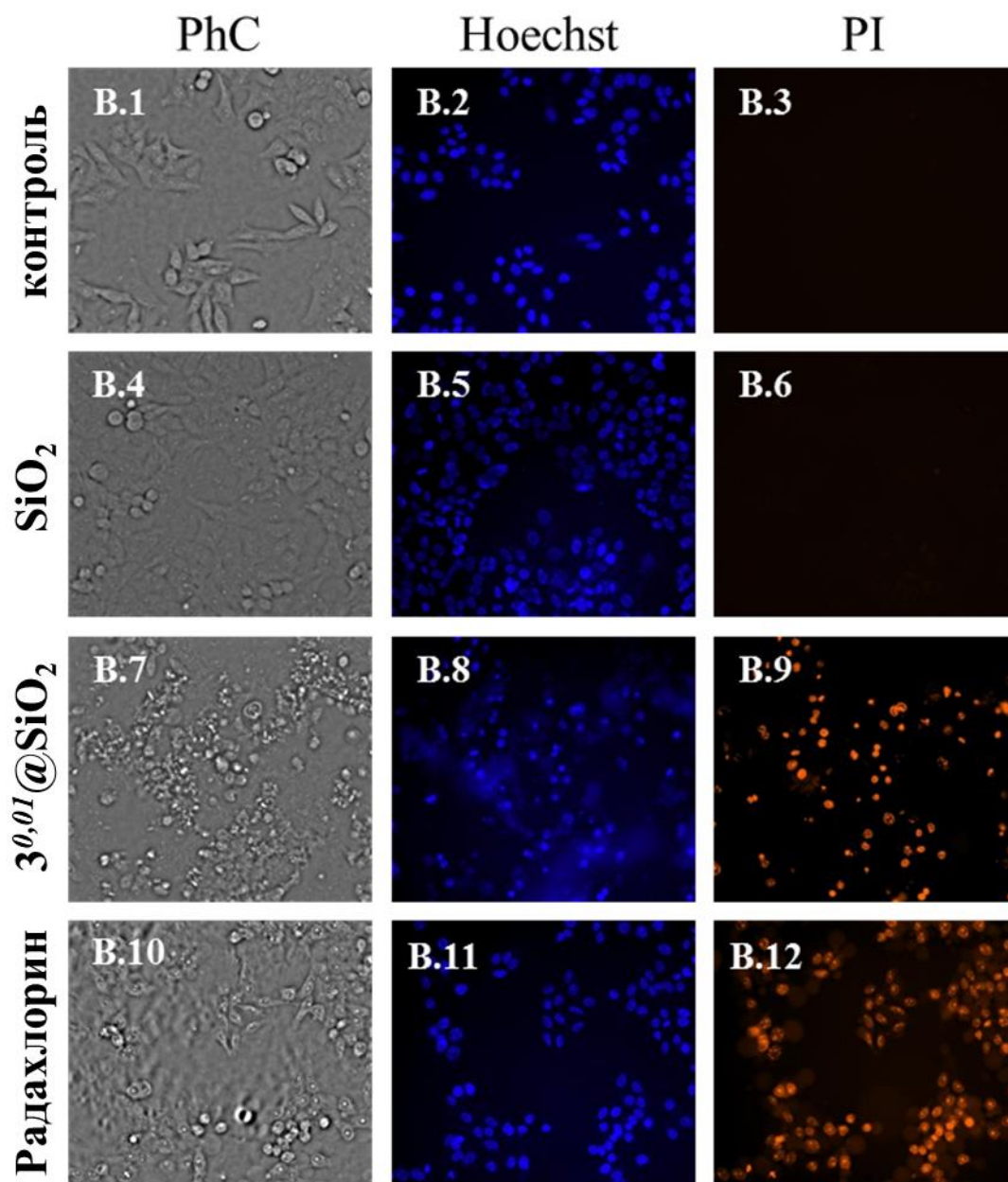


Рис. П66. Изображение, демонстрирующее действие $3^{0,01}@SiO_2$ и Радахлорина на клетки линии Нер-2 после облучения. Анализ проводили с использованием метода двойного окрашивания Hoechst 33342/PI.