

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА НАНОЕЛЕКТРОНІКИ І МОДИФІКАЦІЇ ПОВЕРХНІ

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА
зі спеціальності 153 – «Мікро- та наносистемна техніка»

на тему:

«Абляція клітин за допомогою МХе_п шляхом застосування імпульсного лазера
ближнього інфрачервоного діапазону»

Янчука Єгора Ігоровича

Завідувач кафедрою

_____ проф. Погребняк О.Д.

Науковий керівник

_____ Погребняк О.Д.

«___» _____ 2022 р.

«___» _____ 2022 р.

Суми 2022

РЕФЕРАТ

Об'єктом дослідження магістерської роботи є дослідження процесу абляція клітин за допомогою МХене шляхом застосування імпульсного лазера ближнього інфрачервоного діапазону.

Метою даного дослідження було вивчення впливу ІЧ-лазера на клітини в присутності МХене, їх взаємодію в пробірці та в природних умовах з ціллю визначення можливості використання лазера для лікування онкологічних захворювань.

Робота складається з вступу, опису методу, аналізу отриманих даних та висновку.

Робота викладена на 52 сторінках, у тому числі містить 20 рисунків, 1 формулу, 2 таблиці, список цитованої літератури із 64 джерел.

За результатами роботи зроблені висновки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: МХЕНЕ, ФОТОТЕРМІЧНА ТЕРАПІЯ, РАКОВА КЛІТИНА, ІМПУЛЬСНИЙ ЛАЗЕР БЛИЖНЬОГО ІНФРАЧЕРВОНОГО ДІАПАЗОНУ, БЕЗПЕКА В ПРИРОДНИХ УМОВАХ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

БІЧ - ближнє інфрачервоне світло

ФТТ - фототермічна терапія

ФДТ – фотодинамічна терапія

ФС – фотосенсибілізатор

ЛППР - локалізований поверхнево плазмонний резонанс

ЦДМ - центр досліджень матеріалів

ЯКХ – яєчник китайського хом'яка

МСК - мезенхімальні стовбурові клітини

ФБР - фосфатно-буферний розчин

ТЕМ – трансмісійний електронний мікроскоп

МТТ – аналіз оцінки метаболічної активності клітин

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. БЛИЖНЄ ІНФРАЧЕРВОНЕ СВІТЛО ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ	6
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	11
2.1 Синтез та характеристика МХене.....	11
2.2 Клітинні культури	13
2.3. Оцінка цитотоксичності МХене в пробірці.....	14
2.4. Оцінка зв'язку МХене з клітинами (взаємодія МХене з клітинами).....	14
2.5. Фототермічна дія	15
2.6. Оцінка безпеки фототермічної терапії з використанням МХенес в природних умовах.....	17
2.6.1. Гістологічна оцінка впливу МХене та лазерного опромінення на шкіру.	18
2.6.2. Гістологічна оцінка органів-мішеней.....	19
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	20
3.1 Токсичність МХенес.....	20
3.2. Пряме (автокаталітичне) відновлення резазурину МХенес.....	22
3.3. Зв'язок МХенес з клітинами (взаємодія МХене-Клітина).	23
3.4. Фототермічна дія імпульсного лазера на МХенес в умовах пробірки.....	25
3.5. Локальні ефекти ін'єкційного введення МХене та імпульсного ІЧ-лазерного опромінення на тканини шкіри в природних умовах.	31
3.6. Системна оцінка безпеки фототермічної терапії з використанням МХене та імпульсного інфрачервоного лазера в природних умовах.....	33
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ.....	35
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	45

ВСТУП

Для боротьби з онкологічними захворюваннями вкрай необхідні інноваційні методи лікування. Термічна абляція пухлинних клітин є перспективним малоінвазивним методом лікування. Інфрачервоне світло може проникати в тканини людини і досягати поверхневих злоякісних утворень.

MXenes - це клас 2D матеріалів, які складаються з карбідів/нітридів перехідних металів. Поперечні поверхневі плаزمони MXenes забезпечують ефективне поглинання світла і перетворення світла в тепло, що робить MXenes перспективними засобами для фототермальної терапії (ФТТ). На сьогоднішній день лазери ближнього інфрачервоного (БІЧ) діапазону світла використовуються в дослідженнях ФТТ лише в безперервному режимі. Вчені припустили, що імпульсні БІЧ-лазери мають певні переваги для розробки персоналізованої ФТТ спрямованої на пухлинні клітини. Імпульсні лазери мають широкий діапазон керованих параметрів, таких як щільність потужності, тривалість імпульсів, частота імпульсів тощо. Таким чином, вони можуть знизити загальну енергію, що застосовується, і забезпечити абляцію пухлинних клітин, не зачіпаючи при цьому прилеглі здорові тканини. Вперше показано, що імпульсний лазер з довжиною хвилі 1064 нм може бути використаний для селективної абляції клітин, навантажених $Ti_3C_2T_x$ MXene.

Вчені продемонстрували як низьку токсичність і добру біосумісність цього MXene в пробірці, так і сприятливий профіль безпеки на основі експериментів в природних умовах. Крім того, вони проаналізували взаємодію MXene з клітинами в декількох клітинних лініях і обговорили можливі помилки загальнозживаних аналізів клітинного метаболізму в експериментах з MXenes. Загалом ці дослідження створюють основу для розробки ефективних та безпечних протоколів малоінвазивної терапії певних видів пухлин.

РОЗДІЛ 1. БЛИЖНЄ ІНФРАЧЕРВОНЕ СВІТЛО ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

Рак залишається однією з основних причин захворюваності та смертності в усьому світі, відповідальною за близько 10 мільйонів смертей у 2020 році[1]. Злоякісні новоутворення шкіри, включаючи меланому та немеланоцитарний рак шкіри, є найбільш поширеними типами раку серед білошкірого населення[2]. Швидке поширення та висока агресивність меланоми шкіри призводять до несприятливого прогнозу та високого економічного тягаря. В основі лікування лежать сучасні хірургічні методи, системна хіміотерапія та таргетна терапія, що впливає на певні сигнальні шляхи.

Однак показники рецидивів, прогресування захворювання та смертності залишаються високими. Крім того, вплив ультрафіолетового випромінювання є серйозним фактором ризику для цього захворювання, а зростаючий рівень ультрафіолетового опромінення внаслідок виснаження озонового шару та зміни клімату, схоже, ще більше погіршує ситуацію[3]. Незважаючи на останні досягнення в стратегіях лікування злоякісних новоутворень шкіри, існує необхідність заміни традиційних терапевтичних стратегій менш інвазивними методами для більш ефективного лікування раку, підвищення виживання та мінімізації побічних ефектів. Мета цих новітніх методів - діагностувати рак набагато раніше, зберегти нормальні тканини під час втручання та зменшити побічні ефекти[4]. Нещодавно розроблені підходи на основі нанотехнологій можуть незабаром довести свою ефективність у викоріненні пухлинних захворювань[5].

Ближнє інфрачервоне (БІЧ) світло має здатність проникати в біологічні тканини в межах першого (650-950 нм) та другого (1000-1350 нм) біологічних вікон (БІЧ-I та БІЧ-II відповідно), що характеризуються низьким розсіюванням та поглинанням енергії в живих клітинах і тканинах. Тому серед потенційних альтернатив традиційним клінічним методам лікування раку локальна фотодинамічна терапія (ФДТ) та фототермічна терапія (ФТТ) постають як перспективні неінвазивні підходи до лікування світловим випромінюванням[6]. Вони покладаються на наявність оптичного поглинача, відомого як фотосенсибілізатор (ФС)[7].

ФДТ - це форма фототерапії, спрямована на досягнення загибелі клітин шляхом генерації активних форм кисню,[8] тоді як ФТТ виробляє тепло за допомогою фототермічного ФС, здатного трансформувати інфрачервоне світло в теплову енергію, викликаючи гіпертермію пухлини в мінімально інвазивний спосіб. В даний час більше 500 зареєстрованих клінічних досліджень використовують підходи ФДТ і ФТТ проти різних видів раку[9]. Завдяки своїй здатності реагувати на світло, передові наноінструменти, такі як наночастинки золота, оксид графена, дихалькогеніди перехідних металів, чорний фосфор і деякі органічні наносистеми, стали перспективними засобами як для ФДТ, так і для ФТТ[10]. У зв'язку з цим нові 2D наноматеріали набирають все більших обертів[11].

З моменту відкриття 2D карбідів, нітридів і карбонітридів перехідних металів (MXenes) у 2011 році[12], було синтезовано понад 30 таких нових наноматеріалів з різним стехіометричним складом/хімією поверхні (Ti_3C_2 , Ta_4C_3 , V_2C та ін.), а також понад 20 твердих розчинів, і ще більше було передбачено у стані комп'ютерної симуляції. MXenes відповідають загальній формулі $M_{n+1}X_nT_x$ ($n = 1 - 4$), де M - ранній перехідний метал, X - вуглець або азот, а T - поверхневі закінчення (=O, -OH, галогени або халькогени)[13]. Синтез MXenes зазвичай проводять шляхом селективного витравлювання елементів групи А (наприклад, Al) з шаруватих керамічних попередників[14]. Крім вже синтезованих MXenes, розробляється багато інших, включаючи тверді розчини та високоентропійні системи, що дозволяють регулювати властивості. MXenes привертають велику увагу в галузі біомедицини та нанотехнологій завдяки своїм надзвичайним фізико-хімічним властивостям, включаючи металеву провідність, поверхневу активність, здатність піддаватися обробці у водних суспензіях та модифікувати властивості[15]. Зокрема, MXenes демонструють сильне поглинання інфрачервоного світла в обох біологічних вікнах БІЧ-діапазону. Ця особливість, разом з чудовою ефективністю фототермічного перетворення, може бути застосована в ФТТ.

Ti_3C_2 Мхене нещодавно привернув інтерес до своїх потенційних біомедичних застосувань, таких як клітинна візуалізація, антибактеріальне лікування та ФТТ меланоми завдяки своїй питомій поверхневій активності та поглинанню світла в

інфрачервоному діапазоні[16]. Найбільш відомими МХenes для ФТТ є Ti_3C_2 і Ti_2C , які демонструють високу ефективність в умовах пробірки, так і в природних умовах[17]. Надтонкі нанолісти Ti_3C_2 МХене демонструють надзвичайно високий коефіцієнт екстинкції $25,2 \text{ Л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$, що перевищує коефіцієнт екстинкції традиційних нанострижнів Au ($13,9 \text{ Л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$)[18], що свідчить про сприятливі властивості поглинання інфрачервоного лазерного випромінювання. Це робить їх дуже перспективними в якості засобів ФТТ. Фототермічна поведінка Ti_3C_2 МХене пояснюється ефектом локалізованого поверхневого плазмонного резонансу (ЛППР), подібного до того, що спостерігається в наночастинках золота, описаного як встановлений стандарт для ФТТ[19]. Ti_3C_2 і Ti_2C мають піки поперечного поверхневого плазмонного резонансу приблизно 780 і 550 нм, відповідно[20].

Останні дослідження демонструють високий ефект ФТТ як Ti_3C_2 і Ti_2C МХenes в області БЧ-I. Автори виявили, що нанопластівці Ti_3C_2 -SP (соєвий фосфоліпід) індукують високий відсоток загибелі клітин 4T1 раку молочної залози мишей в пробірці та значне зменшення розміру пухлини в природних умовах після впливу лазерного опромінення в інфрачервоному діапазоні протягом декількох хвилин[21]. Інша група використовувала комплекси Ti_3C_2 -SP і Ti_3C_2 -SP-Dox (доксорубіцин) з високою протипухлинною ефективністю при опроміненні лазером 808 нм як в пробірці, так і в природних умовах для загибелі клітин 4T1[22].

Вчені використовували систему Ti_3C_2 - метформін-полісахарид проти клітинної лінії раку молочної залози людини MDA-MB-231 при опроміненні лазером 808 нм. Вони продемонстрували синергічний терапевтичний ефект ФТТ/ФДТ/хіміотерапії на пухлини та активацію імунної системи шляхом доставки імуномодулюючих сполук полісахаридів грибкового походження[23]. Перевагами БЧ-II є краща переносимість біологічними тканинами та значно вища максимально допустима експозиція порівняно з БЧ-I за рахунок меншого поглинання тканинами та меншої енергії фотонів на довших довжинах хвиль. Автори порівняли дані по різних режимах ФТТ і прийшли до висновку, що ефект ФТТ у вікні БЧ-II набагато кращий, ніж у вікні БЧ-I[24]. На сьогоднішній день все ще не вистачає вичерпних даних про застосування Ti_3C_2 МХене у БЧ-II. Модифікований Ti_3C_2 МХене, наприклад, композити

$Ti_2C_3@Au$, показали поліпшену стабільність і біосумісність і були запропоновані в якості наноагентів для посиленої фото-радіо-комбінованої терапії з використанням БЧ-II[25]. Однак, наскільки відомо, досі немає даних про ефективність не модифікованого Ti_3C_2 для біомедичного застосування БЧ-II.

Концентрація фотосенсибілізуючого засобу має вирішальне значення при розробці нових протоколів лікування раку. Необхідно враховувати баланс між токсичністю та ефективністю з особливим акцентом на локальну концентрацію ФТТ в пухлинах, здорових тканинах та біологічних рідинах. Існує декілька досліджень, які продемонстрували низьку токсичність та високу біосумісність Ti_3C_2 MXenes. Однак у цих дослідженнях здебільшого використовувалися органічні або неорганічні композити на основі MXenes.

Вчені продемонстрували, що наноплатформа MXene-доксорубіцин не є токсичною при концентраціях до 200 мкг/мл на клітинній лінії НСТ-116[26]. Ti_3C_2 -SP і Ti_3C_2 -SP-DOX продемонстрували низьку токсичність при концентраціях до 600 мкг/мл в клітинах 4T1[22]. Більш складні композити, такі як гідрогель целюлоза/MXene-DOX, показали низьку токсичність у клітинних лініях HepA1-6, SMMC-7721, HepG2, U-118MG та U-251MG при концентрації 313,4 мд[27]. Очевидної цитотоксичності при високій концентрації 200 мкг/мл для Ti_3C_2 MXene, навантаженого метформіном і полісахаридами, не спостерігалось[23].

Деякі дослідження продемонстрували відсутність цитотоксичності для неорганічних сполук MXene по відношенню до пухлинних клітин. MXenes, навантажені суперпарамагнітними наночастинками оксиду заліза та декоровані соєвими фосфоліпідами (Ti_3C_2 -IONPs-SP), а також композити Au/MXene та Au/ Fe_3O_4 /MXene демонстрували низьку цитотоксичність навіть при високій концентрації 200 мкг/мл[28,29]. Однак вчені продемонстрували, що Ti_3C_2 -кобальтові нанодропи (Ti_3C_2 -CoNWs) і DOX@ Ti_3C_2 -CoNWs мали сприятливу гемосумісність при концентрації 100 мкг/мл, в той час як MXenes без покриття мали більш сильну гемолітичну дію при тій же концентрації. Вони припустили, що цей ефект відбувається за рахунок більш сильної взаємодії між негативно зарядженими Ti_3C_2 і

позитивно зарядженими триметиламонієвими групами ліпідного бішару еритроцитів[30].

Всі перераховані вище дані свідчать про низьку цитотоксичність матеріалів на основі MXene при відсутності чітких даних для чистих первинних MXenes. Беручи до уваги той факт, що після ФТТ-обробки нерозчинені MXenes можуть накопичуватися в тканинах або поширюватися через кровотік, безумовно, необхідне більш глибоке розуміння біосумісності MXene Ti_3C_2 .

Встановлення оптимальних параметрів ФТТ є ключовим моментом для розробки терапевтичного підходу. Основна ідея такого лікування полягає в збереженні здорових тканин при руйнуванні ракових клітин. На сьогоднішній день більшість досліджень демонструють ефективні терапевтичні густини потужності в діапазоні від 1 до 2 Вт/см² з часом опромінення від 5 до 10 хв в постійному режимі лазера[31,32]. Дослідники припустили, що опромінення імпульсним лазером зможе зменшити несприятливі ефекти, такі як нагрівання, на здорові тканини і клітини з одночасною активацією фототермічних ефектів MXene.

Тут вчені повідомляють про використання імпульсного лазерного опромінення для розробки протоколу фототермічного ефекту з використанням Ti_3C_2 . MXene у БЧ-П (1064 нм). Протокол показує низьку клітинну токсичність і високий ефект ФТТ при короткочасному імпульсному лазерному опроміненні в пробірці. Він також демонструє безпеку Ti_3C_2 . MXene після підшкірного введення в природних умовах.

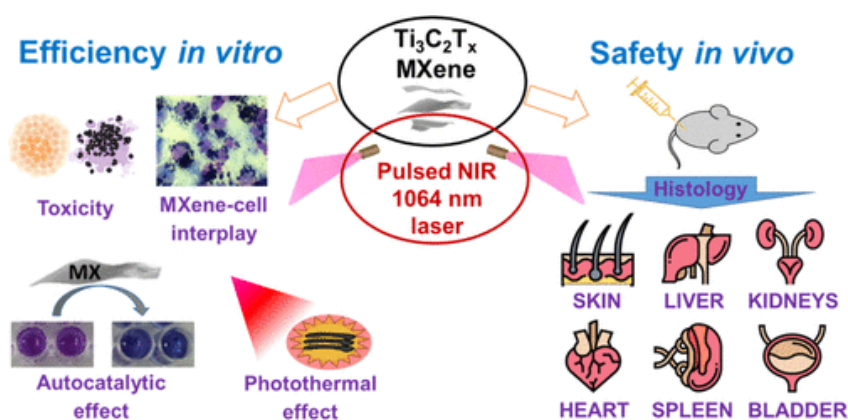


Рисунок 1.1 Метод дослідження в пробірці та в природних умовах

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Синтез та характеристика MXene

$Ti_3C_2T_x$ MXene, де T позначає або =O, -OH, або -Cl, або -F функціональні групи (T_x буде опущено в подальшому тексті для простоти і буде використовуватися формула Ti_3C_2), був отриманий за допомогою методу синтезу MILD, як описано раніше[33]. Попередник МАХ-фази Ti_3AlC_2 був синтезований Центром досліджень матеріалів (ЦДМ), м. Київ, Україна, з подальшим селективним видаленням шарів алюмінію фторидною кислотою (HF), утвореною на місці в суміші солі фториду літію (LiF) і соляної кислоти (HCl)[34]. Аліквота вологого колоїду багат шарового MXene була висушена у вакуумі для вимірювання сухої ваги MXene в зразку, яка, як було показано, становила 50% від ваги вологої суспензії. Концентрація MXene наведена як суха вага порошку.

Протравлені багат шарові порошки MXene були розшаровані за допомогою інкубації з 50 г/л LiCl у дистильованій воді при 35°C протягом ночі, з струшуванням та повторним центрифугуванням при 1160г (3500 об/хв) протягом 10 хв у воді, щоб вимити солі. Після 2-3 раундів центрифугування, коли концентрація LiCl зменшувалась, MXene починав переходити в одношаровий стан, що проявлялось потемнінням осаду рідини після центрифугування та різким збільшенням (в 10 разів) об'єму осаду MXene за рахунок його розшарування та набрякання. Відмитий одношаровий MXene збирали центрифугуванням при 3420г (6000 об/хв) протягом 90 хв. Ваговий вміст сухого MXene у вологому осаді становив близько 15%.

Розчин MXene наносили краплями на підкладки і досліджували за допомогою електронного мікроскопа Zeiss Supra 50VP. Зображення скануючої електронної мікроскопії (SEM) показали, що типовий розмір пластівців MXene становить 1-3 мкм. Дифрактометр Rigaku Miniflex використовувався для рентгеноструктурного аналізу (РСА) з використанням Cu K α випромінювання і наступних умов: 1) для порошку МАХ крок сканування 0,02°, 2 θ = 5-90° і час кроку 1 с; 2) для плівок MXene крок сканування 0,03°, 2 θ = 3-70° і час кроку 0,5 с. РСА-діаграми після розшарування показали тільки типові (001) піки MXene, що свідчить про повне видалення

залишкової фази MAX. За допомогою методу рентгеноструктурного аналізу було доведено, що отриманий MXene є чистим та однофазним. (Рисунок 2.1.1). У кінцевому зразку Ti_3C_2 не було виявлено домішок LiF, які могли б вплинути на дані цитотоксичності. За допомогою СЕМ було підтверджено, що пластівці MXene є переважно одношаровими (Рисунок 2.1.2). Отриманий матеріал був подібний до високоякісного MXene[35].

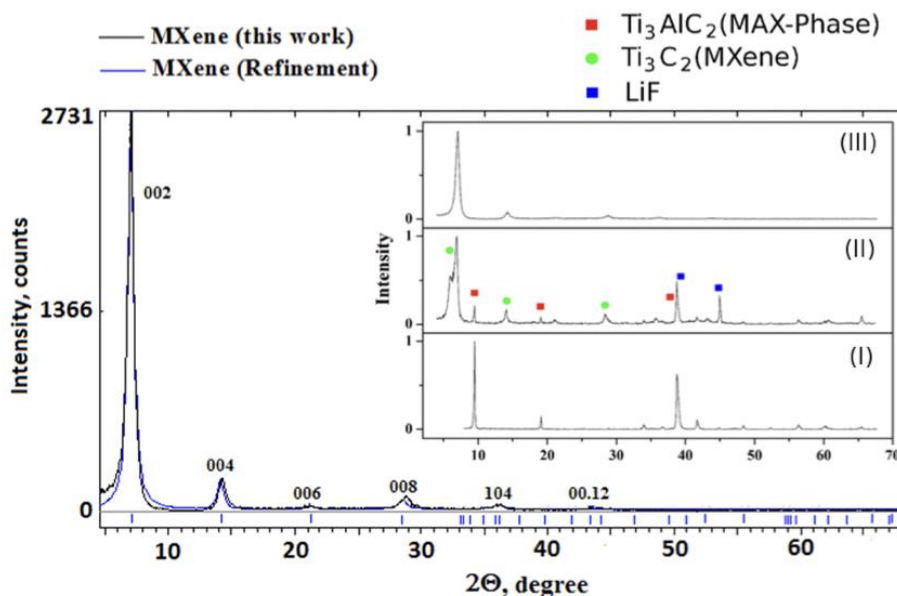


Рисунок 2.1.1 Уточнена рентгенограма кінцевого зразка $Ti_3C_2T_x$ MXene.

На вставці показано еволюцію рентгенограми на етапах синтезу (I) рентгенограма вихідної фази Ti_3AlC_2 MAX, (II) рентгенограма багатшарового MXene після травлення методом MILD, (III) рентгенограма кінцевого $Ti_3C_2T_x$ MXene після розшарування та очищення.

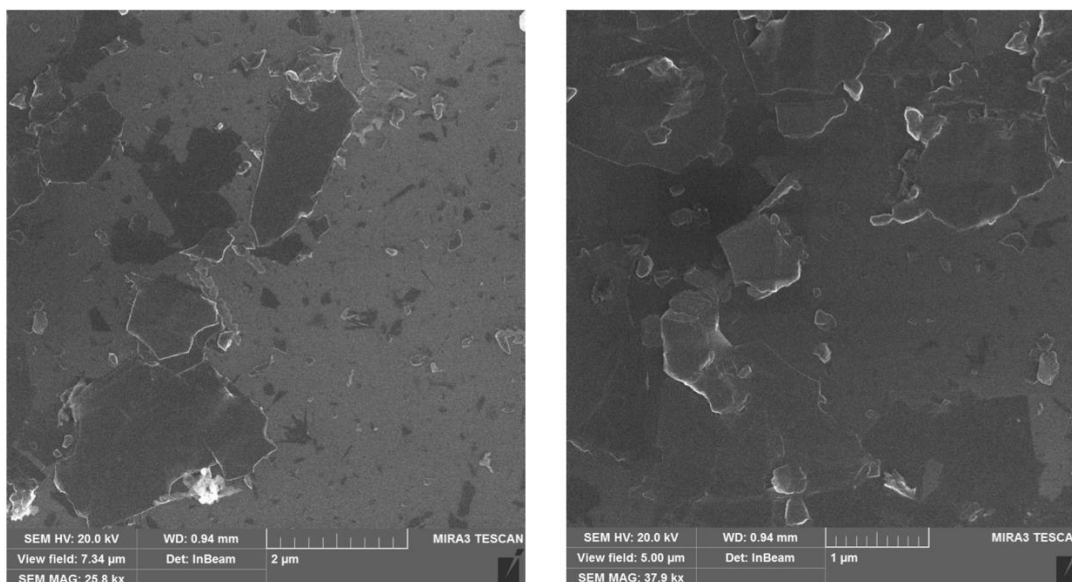


Рисунок 2.1.2 Репрезентативні СЕМ зображення пластівців $Ti_3C_2T_x$ MXene, що використовувались в роботі.

2.2 Клітинні культури

Для оцінки в пробірці впливу MXene на різні типи клітин були використані ракові та неракові клітинні лінії. Як описано, використовували клітини яєчників китайського хом'яка (ЯКХ) та клітини епітеліального раку шлунка MKN28, що стабільно гіперекспресують пухлинний маркер CEACAM1 (MKN28-CEACAM1-4L)[36,37]. Для отримання мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика (МСК) людини фрагмент пупкового канатика довжиною близько 5см отримували в Сумському обласному клінічному перинатальному центрі після нормальних пологів за інформованою згодою батьків відповідно до етичного дозволу, виданого Комісією з питань біоетики в експериментальних та клінічних дослідженнях (Інституційна комісія з питань етики) Медичного інституту Сумського державного університету. Культуру МСК отримували з суспензії Уортона[38,39]. Клітини культивували в середовищі DMEM/F12 з 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби, 100 одиниць пеніциліну, 100 одиниць стрептоміцину та 0,25 мг амфотерицину у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37°C.

2.3. Оцінка цитотоксичності MXene в пробірці

Клітини вносили у 96-лункові планшети з щільністю 10 000 клітин/см² (3400 клітин на лунку у випадку планшетів TЕС, які мають площу 0,34 см² на лунку) в об'ємі 100 мкл з повним середовищем. Наступного дня додавали 100 мкл колоїду MXene у вказаних концентраціях, приготованих у вигляді серійних розведень у повному середовищі для культивування клітин. Оптичну мікроскопію проводили за допомогою системи візуалізації клітин Evos X1 Core Cell Imaging System (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Токсичність MXene оцінювали за допомогою аналізу відновлення резазурину[40].

Цей аналіз вимірює загальну метаболічну здатність клітин у культурі. Для цього до клітин додавали резазурин у кінцевій концентрації 15 мкг/мл та інкубували протягом 8 годин. Потім 100 мкл середовища переносили в інший 96-лунковий планшет і вимірювали оптичну щільність (поглинання) за допомогою Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при 570 і 595 нм. Кількісну оцінку результатів проводили за формулою з «Методу вимірювання цитотоксичності або проліферації з використанням AlamarBlue методом спектрофотометрії» (BioRad Laboratories).

Для оцінки можливості прямого автокаталітичного відновлення резазурину MXenes, MXenes змішували з резазурином у повному живильному середовищі та витримували в інкубаторі клітинної культури при 37°C. Використовувалися аналогічні пластини культури тканин того ж походження, що і для експериментів з клітинами, і пластини інкубувалися в тому ж CO₂ інкубаторі культур клітин з тими ж параметрами.

2.4. Оцінка зв'язку MXene з клітинами (взаємодія MXene з клітинами).

Для цитологічних досліджень клітини наносили на покривні скельця в шестилункових планшетах і наступного дня додавали до клітин колоїд MXene. Після 1 доби інкубації з MXene клітини одноразово відмивали фосфатно-буферним розчином (ФБР) і фіксували в ФБР, що містить 4% формальдегіду, протягом 10 хв при

кімнатній температурі з подальшим відмиванням ФБР. Клітини забарвлювали гематологічним набором для фарбування Leucodif 200 (Erba Lachema s.r.o., м. Брно, Республіка Чехія) згідно з протоколом виробника та досліджували на світловому мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss Jena, м. Йена, Німеччина) з об'єктивами Plan Achromat з яскравим полем. Для трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) тонкі (20 нм) вуглецеві плівки наносили на Pd ТЕМ-сітки[41].

Потім сітки поміщали в 96-лункові планшети; клітини висівали, і наступного дня клітини, вирощені на вуглецевих плівках, завантажували МХене на 1 день, як описано вище. Потім клітини фіксували 2,5% глутаральдегідом в ФБР, зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу, висушували на повітрі і двічі контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю, як описано вище[42]. Клітини досліджували за допомогою мікроскопа ПЕМ-125К (Завод електронних мікроскопів, м. Суми, Україна) при розмірі плями 0,5 мкм і напрузі 90 кВ.

2.5. Фототермічна дія

Клітини вносили в 96-лункові планшети з концентрацією 10 000 клітин/см² в 100 мкл повного живильного середовища. Наступного дня додавали 100 мкл МХене в зазначених концентраціях у розведеному вигляді в повному середовищі. Через 24 години інкубації клітини опромінювали імпульсним Nd:YAG лазером з довжиною хвилі 1064 нм за допомогою косметологічного лазерного обладнання EvoLINE-1 (Solar Laser Systems). Використовували наступні параметри опромінення: густина потужності 3,1 Дж/см², тривалість імпульсу 200 мс, частота імпульсів 1 Гц, діаметр пучка 22 мм, тривалість опромінення згідно з інструкцією. Відстань від лазерного випромінюючого наконечника до пластини була стандартизована за допомогою пластикової направляючої довжиною 5 см, прикріпленої до випромінюючого наконечника як частини обладнання (Рисунок 2.5.1а).

Оптимальні параметри були отримані з емпіричних випробувань, що передували експериментам. Експерименти проводили в чотирикратній повторності, де чотири сусідні лунки опромінювали одночасно, тоді як інші лунки закривали білим

картонним екраном з квадратним отвором $19 \times 19 \text{ мм}^2$ (Рисунок 2.5.1b). Для запобігання температурного впливу між сусідніми чотирикратними групами лунок після опромінення їх розділяли порожніми лініями/рядками (Рисунок 2.5.1c). Температуру опромінених ділянок контролювали за допомогою інфрачервоної камери Walcom HT-04 (Рисунок 2.5.2). Життєздатність клітин вимірювали за допомогою аналізу відновлення резазурину, як описано в розділі оцінки клітинної токсичності вище.

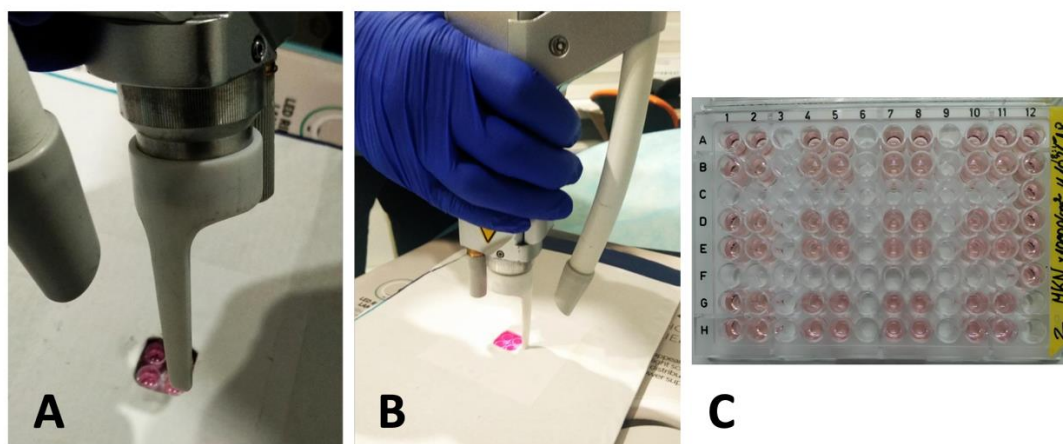


Рисунок 2.5.1 Установка для експериментів з лазерним опроміненням, як пояснюється в тексті. (А - стандартизація відстані від лазерного випромінюючого наконечника до пластини; В - процедура експерименту; С - загальний вигляд пластини з комірками для ФТТ)

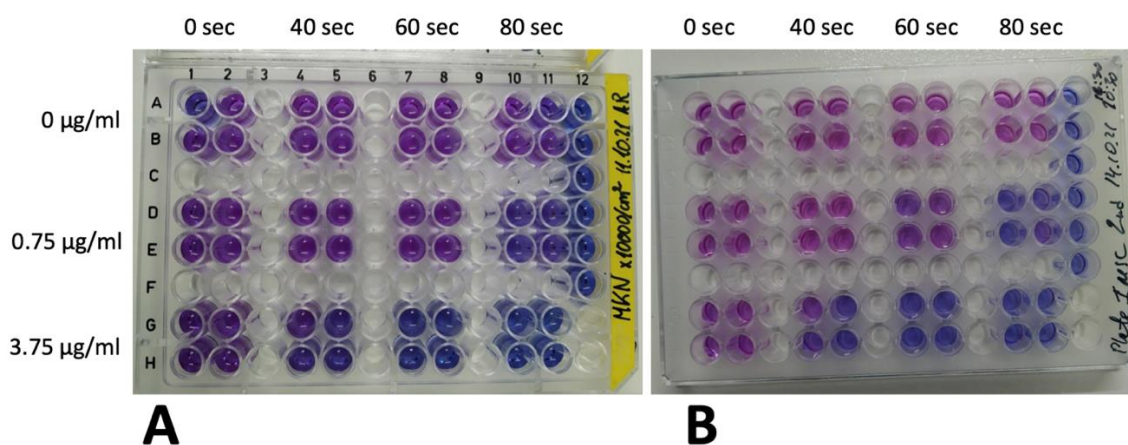


Рисунок 2.5.2 Клітини, вирощені в 96-лункових планшетах у 200 мкл повного культурального середовища, завантажували Mxenes та опромінювали імпульсним лазером 1064 нм, як зазначено, з подальшою інкубацією з резазурином у кінцевій концентрації 15 мкг/мл. А - стабільно трансформовані клітини раку шлунка MKN-28, що конститутивно гіперекспресують пухлинний маркер CEACAM-1 (MKN28-CEACAM1-4L); В - аліквоти по 100 мкл з планшета для культивування клітин з мезенхімальними стовбуровими клітинами пупкового канатика людини, оброблені аналогічно до А, переносять на свіжий планшет для вимірювання оптичної щільності (поглинання). Контрольні лунки без клітин (тільки середовище) були в правих колонках. Зверніть увагу на поступову зміну забарвлення від синього (резазурин) до рожевого (резорурфін) живими клітинами.

2.6. Оцінка безпеки фототермічної терапії з використанням Mxenes в природних умовах.

Дорослі білі лабораторні щури масою тіла 180-200 г були отримані з ветеринарної бази Медичного інституту Сумського державного університету. Тварини утримувались при температурі $22 \pm 2^\circ\text{C}$ за 12-годинного циклу "світло-темрява" та отримували доступ до їжі та води у вільному доступі. Кожна тварина утримувалася в окремій клітці. Експерименти з лабораторними тваринами проводили відповідно до Директиви 2010/63/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року про захист тварин, які використовуються для наукових цілей. Дизайн дослідження схвалено Комісією з питань біоетики при проведенні експериментальних та клінічних досліджень (Інституційна комісія з питань біоетики) Медичного інституту Сумського державного університету. Тварин знеболювали відповідними дозами кетаміну та ксилазину.

Ділянку шкіри в міжлопатковій ділянці виголювали, і щурам робили підшкірні ін'єкції розчину Mxene в ФБР з концентрацією 11,25 мкг/мл в об'ємі 0,1 мл за допомогою інсулінового шприца з голкою 31-го калібру довжиною 12,7 мм. Контрольним тваринам вводили відповідну кількість ФБР. Наступного дня після

ін'єкцій ділянки ін'єкцій опромінювали імпульсним лазером з довжиною хвилі 1064 нм з тими ж параметрами, що і для експериментів в пробірці (густина потужності 3,2 Дж/см², тривалість імпульсу 200 мс, частота імпульсів 1 Гц, діаметр пучка 22 мм) та тривалістю опромінення 60 с. Було сформовано чотири групи тварин: ФБР, ФБР/лазер, МХене та МХене/лазер. Забій тварин проводили шляхом декапітації тварин у стані седації (70 мг/кг кетаміну) на 3, 7, 14 та 28 добу після опромінення. Для подальших аналізів були відібрані зразки шкіри, печінки, селезінки, нирок, серця, легенів та сечового міхура.

2.6.1. Гістологічна оцінка впливу МХене та лазерного опромінення на шкіру.

Зразки шкіри фіксували в 10% нейтральному буферному формаліні. Для обробки тканин використовували стандартні процедури, включаючи зневоднення з подальшою заливкою в парафін. Парафінові блоки розрізали на зрізи товщиною 4 мкм, забарвлювали гематоксиліном та еозином відповідно до стандартних протоколів і спостерігали за допомогою світлового мікроскопа Leica.

Для оцінки потенційної токсичності введеного МХене та можливих наслідків лазерного опромінення проводили оцінку уражень шкіри. Запальну реакцію оцінювали напівкількісно за наступною шкалою: 1 - легка; 2 - помірна; 3 - виражена інфільтрація поліморфно-мононуклеарними лейкоцитами та макрофагами. При оцінці поширення запальної реакції оцінювали шар ураженої шкіри. Такий же підхід застосовувався при оцінці репарації шкіри шляхом оцінки грануляції тканини в місці втручання.

Додатково оцінювали придатки шкіри, такі як волосяні фолікули, які несуть стовбурові клітини епідермісу в області опуклості і відповідають за архітектуру шкіри, з урахуванням циклу росту волосся. Останній оцінювали відповідно до загальновідомих фаз волосяного циклу (анаген, катаген, телоген) за морфологічними ознаками та глибиною розташування волосяної цибулини.

2.6.2. Гістологічна оцінка органів-мішеней.

Зразки тканин поміщали в гістологічні касети (ЕКА, Україна) та фіксували в нейтральному 10% розчині формаліну протягом 24 годин. Після цього їх зневоднювали та заливали в парафін за допомогою автоматичного тканинного Processor AT1010 (SEO, Україна) згідно з інструкцією виробника. З парафінових тканин готували серійні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою ротаційного мікротома Shandon Finesse 325 (Thermo Fischer Scientific) та монтували на предметні скельця, покриті 3-амінопропілтриетоксисиланом (Thermo Fischer Scientific). Після експозиції в термостаті при 50°C протягом ночі зразки тканин депарафінували та регідратували в дистильованому спирті та ксилолі.

Зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином перед монтуванням в Aqua-Mount (Thermo Fischer Scientific). Всі гістопатологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Primo Star з цифровою камерою Zeiss AxioCam ERC 5s та пакетом програмного забезпечення ZEN 2 (синя версія, Німеччина).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 Токсичність МХenes

Загалом, МХenes не були токсичними і добре переносилися клітинами. Однак у концентраціях 96 мкг/мл або починаючи з 24 мкг/мл у більш пізні часові моменти МХене викликав поступове припинення проліферації клітин, зміну їх морфології та погіршення зовнішнього вигляду (рис. 3.1.1 А,D). МХenes мали тенденцію концентруватися на клітинах вже після першого дня інкубації, а не утворювати рівномірний осад на дні лунок (рис. 3.1.1 В,E). Клітини з МХenes ставали темнішими і в значній мірі непрозорими при найвищих концентраціях МХenes (48-96 мкг/мл) після 2-го дня інкубації. Клітини виглядали повністю вкритими МХenes, які концентрувалися і прилипали до клітин. Більш високі концентрації МХenes були пов'язані з більш низькою щільністю клітин.

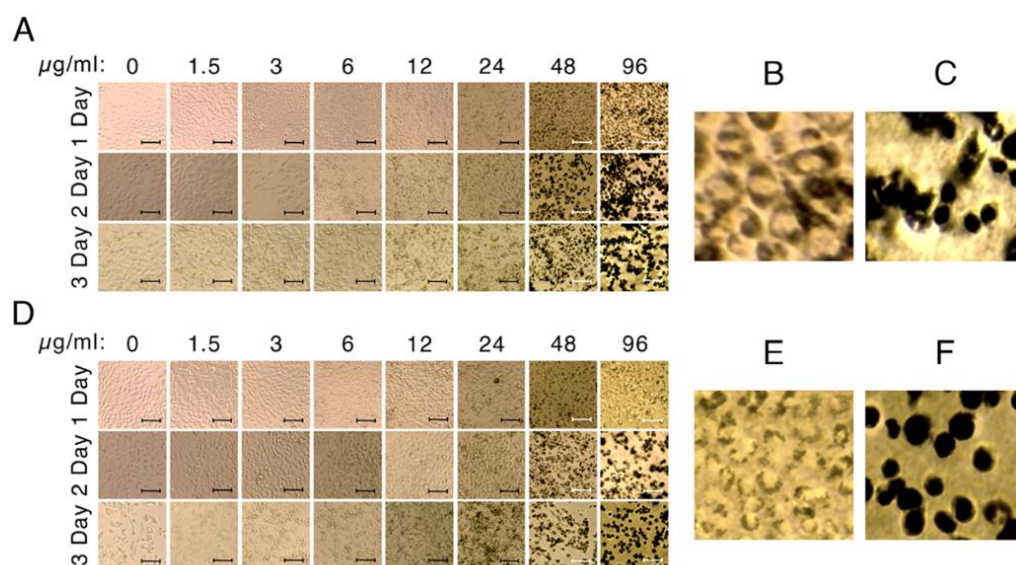


Рисунок 3.1.1. Взаємодія з клітинами та цитотоксичність МХене, досліджена за допомогою оптичної мікроскопії. (А, D) МХене в клітинах ЯКХ і мезенхімальних стовбурових клітинах пупкового канатика людини відповідно. (В, С) Збільшені фрагменти зображень з найвищою концентрацією МХене (96 мкг/мл) в клітинах ЯКХ на 1-шу та 3-тю добу відповідно. (Е, F) Збільшені фрагменти зображень з найвищою

концентрацією МХене (96 мкг/мл) в клітинах MSC на 1-шу та 3-тю добу відповідно. Масштабні штрихи = 100 мкм.

Токсичність МХене була додатково оцінена за допомогою аналізу відновлення резазурину в клітинах МСК та ЯКХ (рис. 3.1.2). Як і у випадку спостереження за допомогою оптичного мікроскопа, клітини витримували присутність МХене в широкому діапазоні концентрацій. Однак при високих концентраціях (12-24 мкг/мл і вище) показники тесту на відновлення резазурину парадоксальним чином зростали. Інтригуюче, що ці показники досягали рівнів, навіть вищих, ніж у контрольних (необроблених) клітин, наприклад, при 96 мкг/мл. Однак, при цих концентраціях клітини виглядали пошкодженими при огляді під світловою мікроскопією. Крім того, кількість клітин була меншою, ніж у лунках з контрольними клітинами без МХене.

Вчені дійшли висновку, що на аналіз відновлення резазурину може впливати присутність МХене, навіть якщо метаболічно активні клітини не були задіяні. Це спонукало дослідити відновлювальну активність МХенес по відношенню до резазурину в повному культуральному середовищі без клітин.

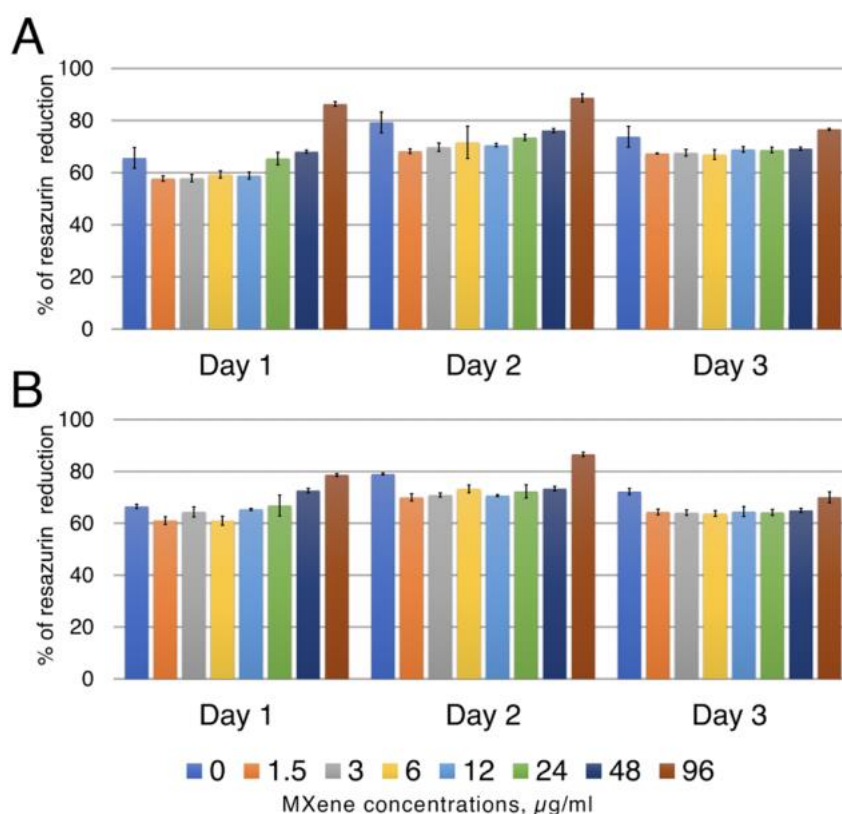


Рисунок 3.1.2. Цитотоксичність МХене, досліджена за допомогою методу відновлення резазурину. (А) Мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика людини, інкубовані з різними концентраціями МХене протягом різного часу. (Б) Той самий експеримент з клітинами яєчників китайського хом'яка (ЯКХ) (відсоток відновлення резазурину представляє цитотоксичність МХенес та можливе автокаталітичне відновлення разом узяті).

3.2. Пряме (автокаталітичне) відновлення резазурину МХенес.

Щоб пояснити, яким чином можливе збільшення показів тесту на відновлення резазурину при очевидно меншій кількості клітин та їх порушеній морфології (а отже, зниженій метаболічній активності), вчені поставили простий експеримент з резазурином у присутності МХене з концентраціями від 0,1 до 114 мкг/мл у середовищі без клітин. Вони спостерігали помітне відновлення резазурину лише через 24 год інкубації при 37 °С і лише за найвищих концентрацій МХене (рис. 3.2.1). При цьому ступінь відновлення резазурину був значно нижчим, ніж у присутності клітин.

Лише після тривалої інкубації до 5 діб і лише за найвищих концентрацій МХене ступінь відновлення резазурину досягав рівня, порівнянного з рівнем, що досягається метаболічно активними клітинами, лише за кілька годин. Проте, навіть тоді показники були нижчими за рівні, отримані при найвищих концентраціях МХене в присутності клітин, хоча і з порушеним зовнішнім виглядом. Автори прийшли до висновку, що клітини з порушеною морфологією можуть активувати процес відновлення резазурину МХене через механізм, відмінний від відновлення внутрішньоклітинними метаболічними шляхами в живих клітинах.

Вчені припустили, що клітини, які гинуть і лізуються, могли виділяти речовину, яка могла б сприяти прямому відновленню резазурину МХене. Вони спробували інкубувати резазурин у середовищі в присутності МХене з додаванням клітинного лізату, отриманого шляхом двох циклів заморожування-відтавання клітин у

живильному середовищі. Однак, ми не спостерігали будь-якого помітного підвищення рівня відновлення резазурину клітинними лізатами (не показано).

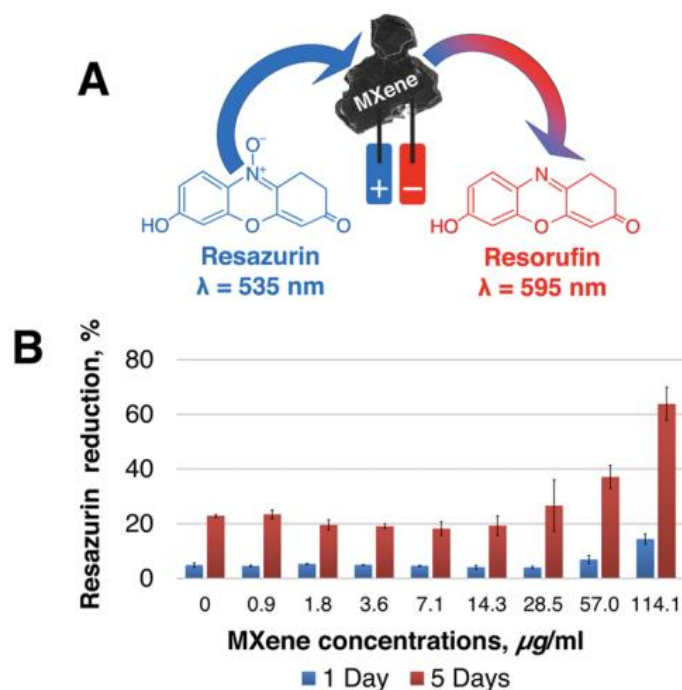


Рисунок 3.2.1. MXenes можуть відновлювати резазурин безпосередньо в середовищі клітинної культури без присутності клітин. (А) Принципова схема автокаталітичного відновлення резазурину до резорурфіну за допомогою MXene. (Б) Аналіз відновлення резазурину в присутності різних концентрацій MXene в безклітинному середовищі культивування клітин.

3.3. Зв'язок MXenes з клітинами (взаємодія MXene-Клітина).

MXene був виявлений у вигляді темних включень після того, як мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика людини, насичені MXene, були зафіксовані та забарвлені гематологічним барвником. (Рис. 3.3.1 А-F). Як і у випадку мікроскопічного спостереження за вмістом MXene в живих клітинах (Рис. 3.1.1), частинки MXene мали тенденцію концентруватися на клітинах і зв'язуватися з ними. При цьому MXene утворював відносно великі агрегати, добре видимі під світловим мікроскопом. Ступінь агрегації залежав від концентрації MXene. Агрегати MXene були міцно пов'язані з клітинами, оскільки вони витримували суворі процедури

відмивання, фіксації та фарбування. Точна локалізація МХене в/на клітинах наразі досліджується.

2D пластівці МХене, пов'язані з клітинами, також були візуалізовані за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. Для цього клітини яєчників китайських хом'яків завантажували МХене на 1 день і промивали ФБР з подальшим зневодненням і контрастуванням. МХене мав вигляд «розбитого віконного скла» (Рис. 3.3.1 Н-І). Дрібні клітинні структури були помітні як темні плями. Точне розташування МХенес в/на клітинах ще належить визначити. Однак вчені дійшли висновку, що МХенес були тісно пов'язані з клітинами, оскільки вони витримували жорстку фіксацію, дегідратацію та контрастні процедури.

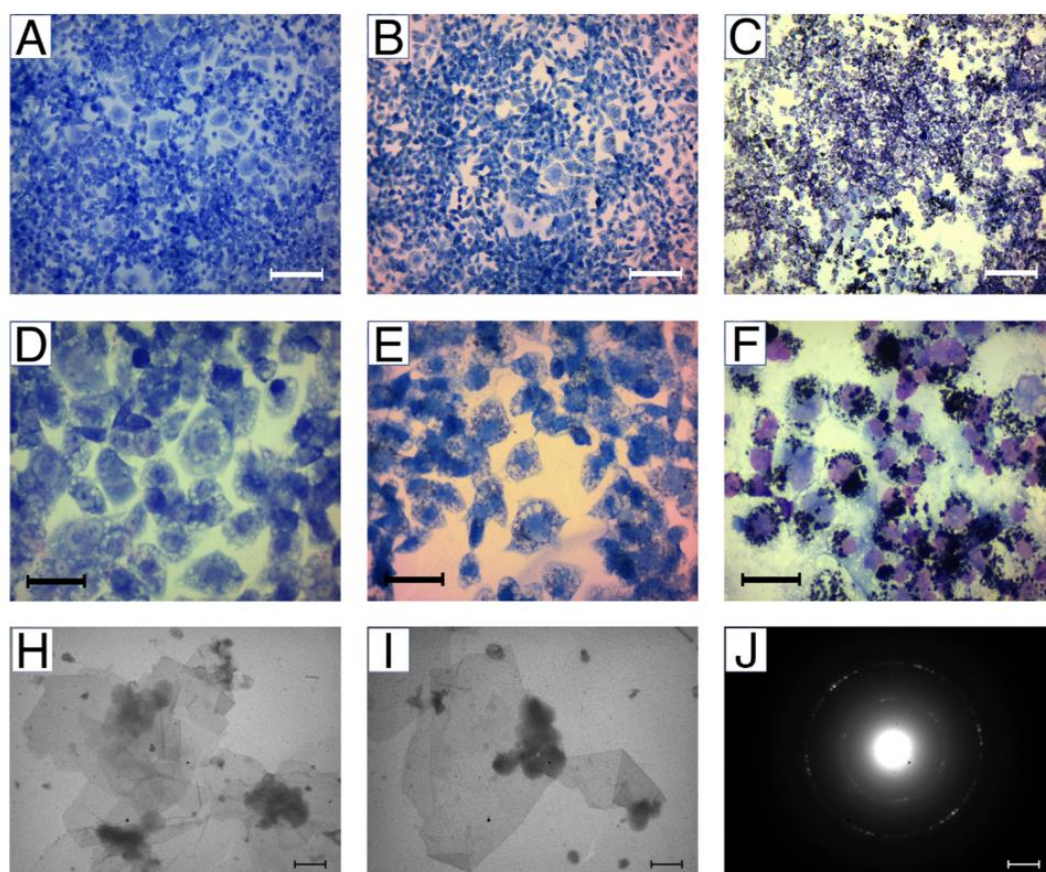


Рисунок 3.3.1. Зображення оптичної та електронної мікроскопії, що демонструють асоціацію МХене з мезенхімальними стовбуровими клітинами пупкового канатика людини (поглинання клітинами МХене). (А-І) Цитологічне забарвлення: (А, D) контрольні клітини, (В, Е) клітини, навантажені МХене в концентрації 0,75 мкг/мл, і (С, F) клітини, навантажені МХене в концентрації 6,75

мкг/мл. (Н-І) Зображення електронної мікроскопії 2D пластівців МХене в комітках ЯКХ: (Н, І) пластівці МХене виглядають як напівпрозорі частково перекриваючі один одного аркуші. (J) зображення електронної дифракції, яке підтверджує, що об'єкт дослідження має періодичну структуру. (А-С) Масштабні штрихи = 200 мкм, (D-F) масштабні штрихи= 50 мкм, (Н-І) масштабні штрихи = 1 мкм.

3.4. Фототермічна дія імпульсного лазера на МХенес в умовах пробірки.

Фототермічний ефект МХене Ti_3C_2 внаслідок опромінення лазером відстежувався за допомогою інфрачервоної камери (рис. 3.4.1). Опромінення призводило до значного підвищення температури в опромінюваних лунках культури клітин. Підвищення залежало як від часу експозиції, так і від концентрації МХене. Хоча температура зростала і в контрольних лунках, що не містили МХене, фактичне підвищення температури в лунках, що містили МХене, було значно вищим (табл. 1). Більше того, воно залежало від концентрації. Таким чином, підвищення температури свідчить про фототермічний ефект МХене при опроміненні імпульсним лазером з довжиною хвилі 1064 нм, який залежить від концентрації та дози.

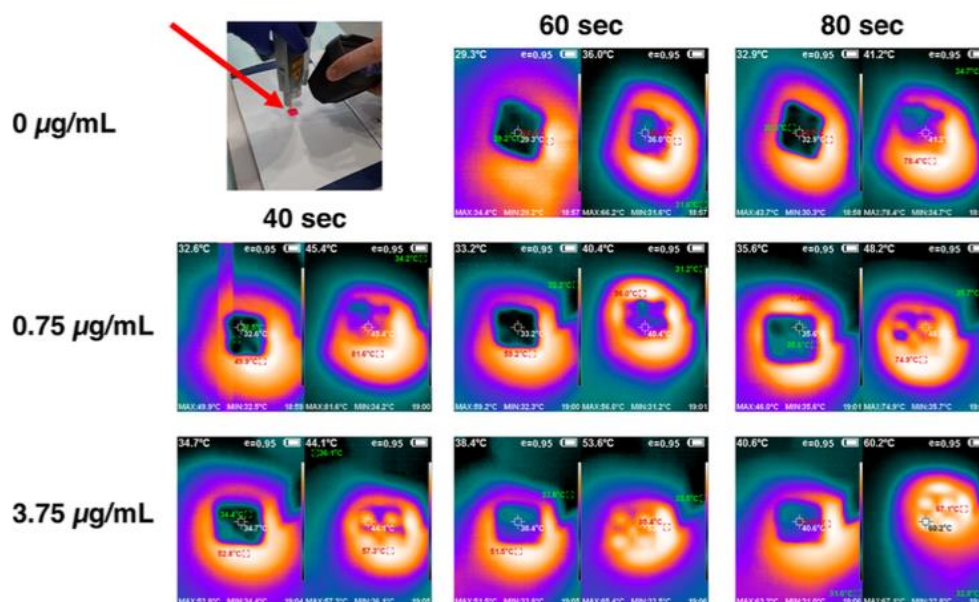


Рисунок 3.4.1. ІЧ-зображення динаміки прогріву планшету з культурою клітин з/без МХене під час опромінення імпульсним лазером з довжиною хвилі 1064 нм. На

верхній лівій фотографії показано установку для отримання тепловізійних зображень. Зліва показано концентрацію МХене. На ІЧ-зображеннях видно поступове підвищення температури в залежності від концентрації МХене та часу експозиції (фактичне підвищення температури, ΔT , наведено в таблиці 1).

МХене концентрація, (мкг/мл)	Час експозиції, (с)	Температура, (°C)		
		Початкова	Фінальна	ΔT
0	60	29,3	36,0	6,7
	80	32,9	41,2	8,3
0,75	40	32,6	45,4	12,8
	60	33,2	40,4	7,2
	80	35,6	48,2	12,6
3,75	40	34,7	44,1	9,4
	60	38,4	53,6	15,2
	80	40,6	60,2	19,6

^aЗначення ΔT показують фактичне підвищення температури при впливі 1064 імпульсного лазера.

Таблиця 1. Дані фототермічного перетворення, отримані шляхом вимірювання розподілу температури за допомогою інфрачервоної камери, як показано на рисунку 5^a

Під впливом лазерного опромінення клітини змінювали свою морфологію та метаболічну активність (рис. 3.4.4). Метаболічну активність клітин контролювали за допомогою тесту на відновлення резаурину. Типові картини, що демонструють зміни резаурину на резорурфін живими клітинами, показані на рисунку 2.5.2. Ефекти сильно залежали від концентрації МХене та часу експозиції. За низької експозиції (40 с) клітини з високою концентрацією МХене (3,75 мкг/мл) різко змінювали зовнішній вигляд і набували типової округлої морфології клітин, що гинуть (рис. 3.4.4 А). Це

підтверджувалося низьким рівнем відновлення резазурину, що відображало втрату ними метаболічної активності (рис. 3.4.4 Б). Збільшення часу експозиції до 60 с призводило до аналогічних змін як морфології, так і метаболічної активності в клітинах з низькою концентрацією MXene (0,75 мкг/мл). Присутність MXene в кінцевих робочих розчинах у середовищі культивування за цієї концентрації (0,75 мкг/мл) майже не відрізнялася за зовнішнім виглядом від контрольного середовища (рис. 3.4.2). Цікаво, що після цього часу експозиції та високої концентрації MXene клітини виглядали так, ніби це були інтактні клітини, що проліферують, при цьому вони не були метаболічно активними.

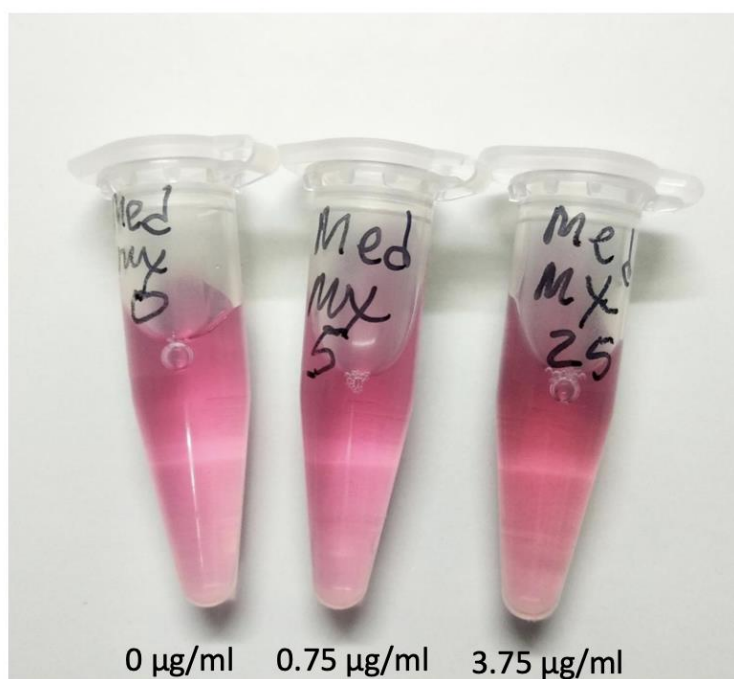


Рисунок 3.4.2. Порівнювали 1 мл розчинів MXene у кінцевій робочій концентрації у повному середовищі для культивування клітин, як зазначено. Зверніть увагу на темніший вигляд розчину при вищій концентрації MXenes (3,75 мкг/мл).

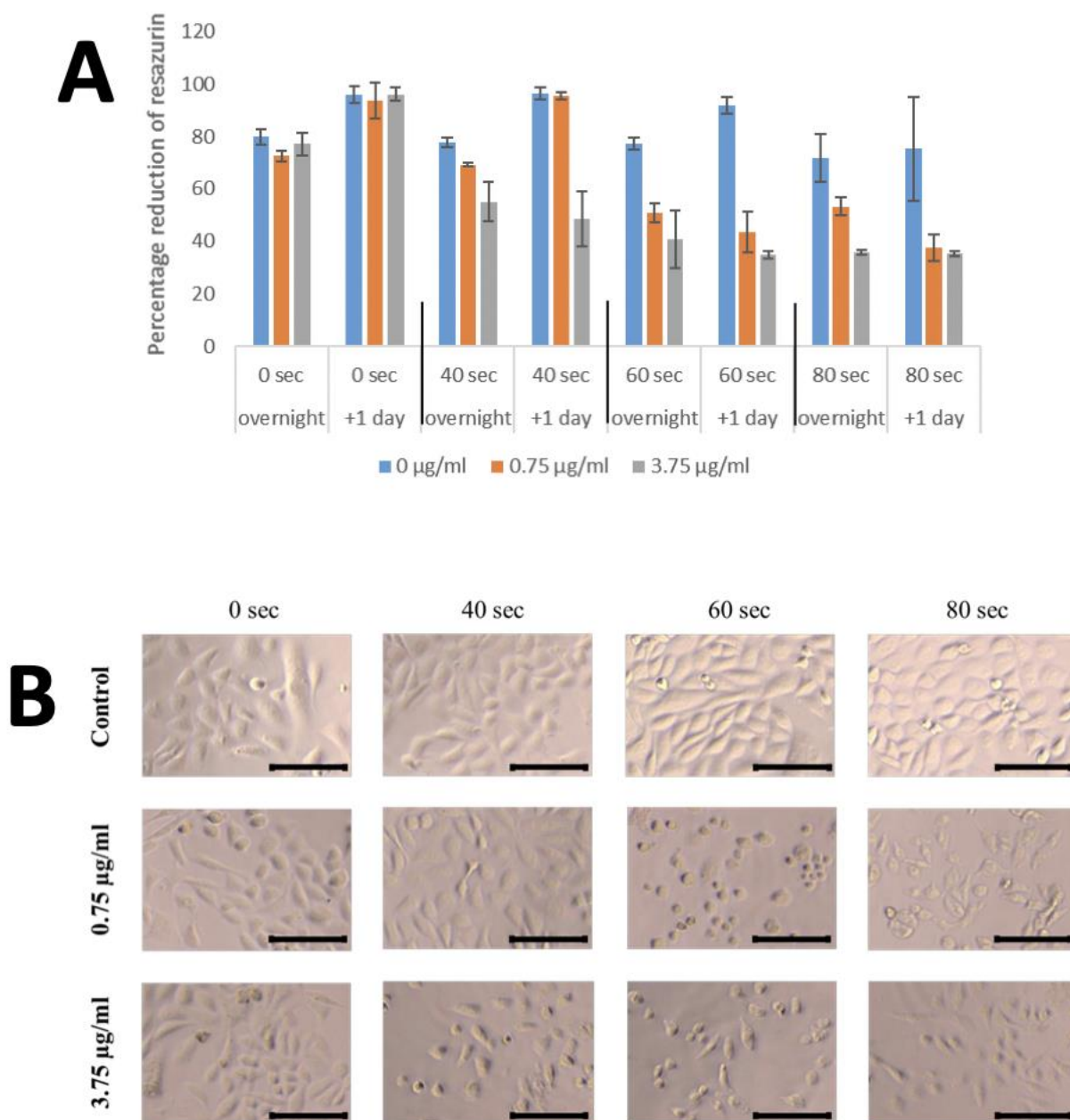


Рисунок 3.4.3. Порівняння фототермічного ефекту Ti_3C_2 MXenes в клітинах ЯКХ відразу після лазерного опромінення та через добу після лазерного опромінення. А, порівняння результатів аналізу відновлення резазурину відразу після лазерного опромінення (позначено ніч) та через день після лазерного опромінення (позначено +1 день); Б, оптичні зображення клітин, зроблені через один день після опромінення. Використовували дві різні концентрації MXenes (0,75 мкг/мл і 3,75 мкг/мл) і різний час експозиції лазерного опромінення (0 сек, 40 сек, 60 сек і 80 сек), як зазначено. Похибка = 100 мкм.

Ці клітини не змінили свого "нормального" вигляду при тривалому спостереженні в інкубаторі клітинної культури, а також не показали ніякої проліферативної активності (не показано). Вчені дійшли висновку, що ці клітини були миттєво вбиті високою лазерною енергією, поглиненою МХене, і їх апоптотичні шляхи були інактивовані. Вони назвали це явище "термофіксованими" клітинами. З іншого боку, контрольні клітини (без МХене) зазнали впливу лазерного випромінювання лише при найвищій дозі (80 с). При цій дозі як низькі, так і високі концентрації МХене призводили до того, що клітини виглядали "фіксованими" без метаболічної активності, показаної в аналізі відновлення резазурину (Рис. 3.4.4 В).

Цікаво, що помірно уражені клітини круглої форми (3,75 мкг/мл - 40с; 0,75 мкг/мл - 60 с) демонстрували деяку метаболічну активність відразу після обробки, але втрачали її на наступний день (Рис. 3.4.3 А). Вчені дійшли висновку, що ці клітини отримали критичне пошкодження для індукції апоптичної програми, яка поступово реалізовувалася протягом декількох годин після опромінення. Навпаки, деякі клітини в контрольних опромінених лунках (0 мкг/мл-80 с) також набували круглої морфології, але на наступний день вони поверталися до більш метаболічно активного стану (Рис. 3.4.3 В). Вони дійшли висновку, що ці клітини зазнали впливу опромінення, але доза не досягла критичного значення для масової індукції апоптозу.

Автори підтвердили фототермічний ефект імпульсного лазера з МХене на інших клітинних лініях, включаючи ракові клітини (Рис. 3.4.5). Як з клітинами епітеліального раку шлунка МKN28-СЕАСАМ1-4L (рис. 7А), так і з мезенхімальними стовбуровими клітинами пупкового канатика людини (рис. 3.4.5 В) ми спостерігали ефекти, подібні до тих, що спостерігалися у випадку з клітинами ЯКХ. В цілому, це показало, що імпульсний лазер з довжиною хвилі 1064 нм має потенціал для розвитку терапевтичного лікування з використанням фототермічного ефекту.

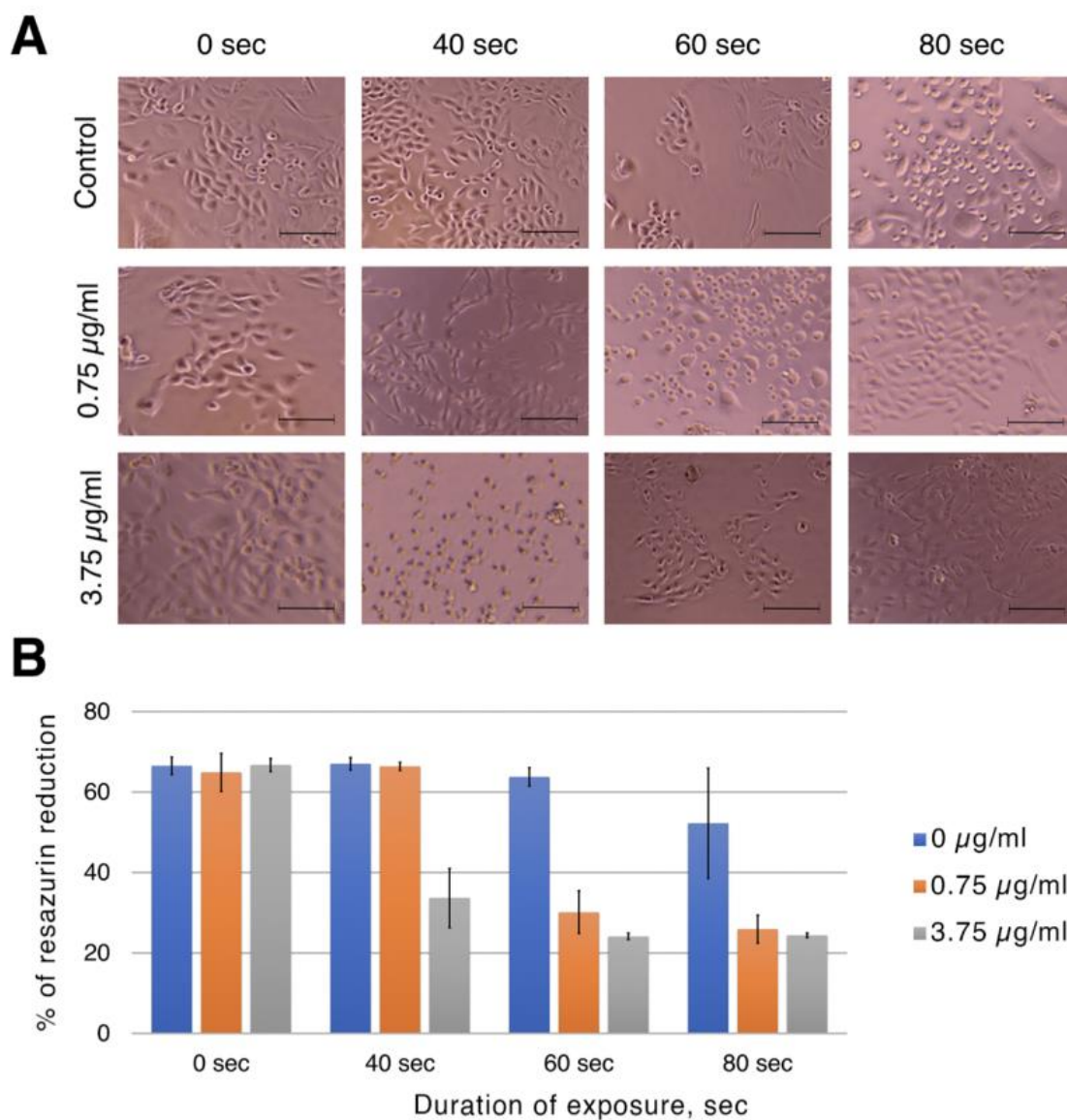


Рисунок 3.4.4. Оцінка фототермічного ефекту в клітинах ЯКХ з Ti_3C_2 МХене за допомогою світлової мікроскопії (А) та аналізу відновлення резазурину (Б). Як зазначено, використовували дві різні концентрації МХене (0,75 і 3,75 мкг/мл) і різний час експозиції лазерного опромінення (0, 40, 60 і 80 с). Шкала = 100 мкм.

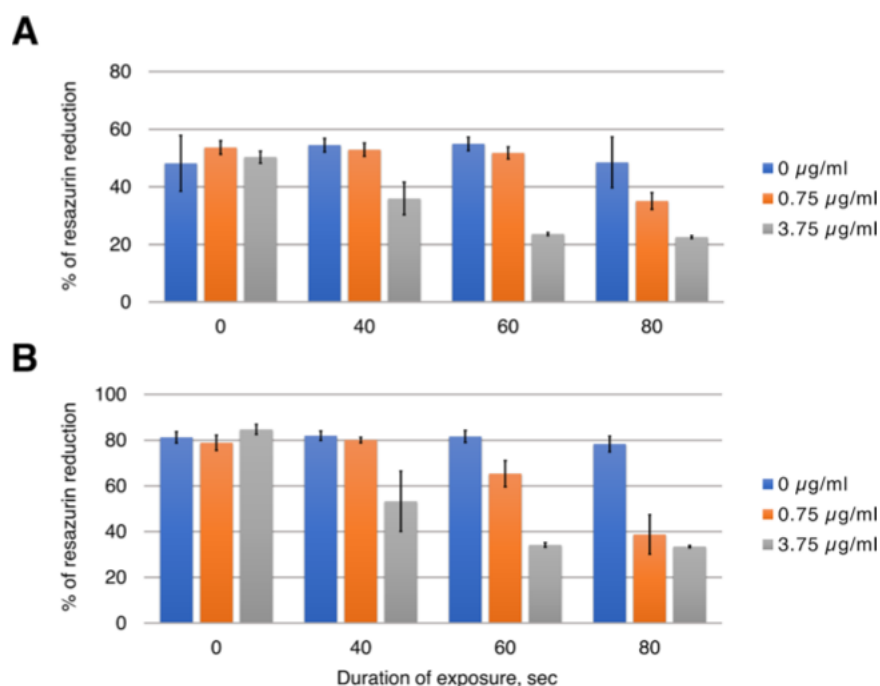


Рисунок 3.4.5. Оцінка фототермічної дії на клітини раку шлунка MKN28-SEACAM1-4L (А) та на мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика людини (Б) з Ti_3C_2 MXene за допомогою методу відновлення резазурину. Концентрації MXene становили 0, 0,75 та 3,75 мкг/мл, а лазерне опромінення використовували протягом 0, 40, 60 та 80 с.

3.5. Локальні ефекти ін'єкційного введення MXene та імпульсного ІЧ-лазерного опромінення на тканини шкіри в природних умовах.

Оцінка стану шкірної тканини щурів через 3 доби після лікування виявила мінімальні структурні зміни в місці введення MXene, які були співставні з такими в контрольній групі. Спостерігалася легка запальна реакція, більш виражена в глибоких шарах, між дермою і гіподермою. Комбінована дія MXene з лазерним впливом супроводжувалася додатковою незначною зміною сосочкового шару дерми, подібною до сонячного еластозу, та незначним гіперкератозом. При цьому в ділянці втручання та сусідніх ділянках спостерігалася редукція волосяних фолікулів, що свідчило про перехід до катагенної стадії. Примітно, що аналогічні зміни з'явилися і в контрольній групі, що піддавалася лазерному опроміненню (рис. 3.5.1).

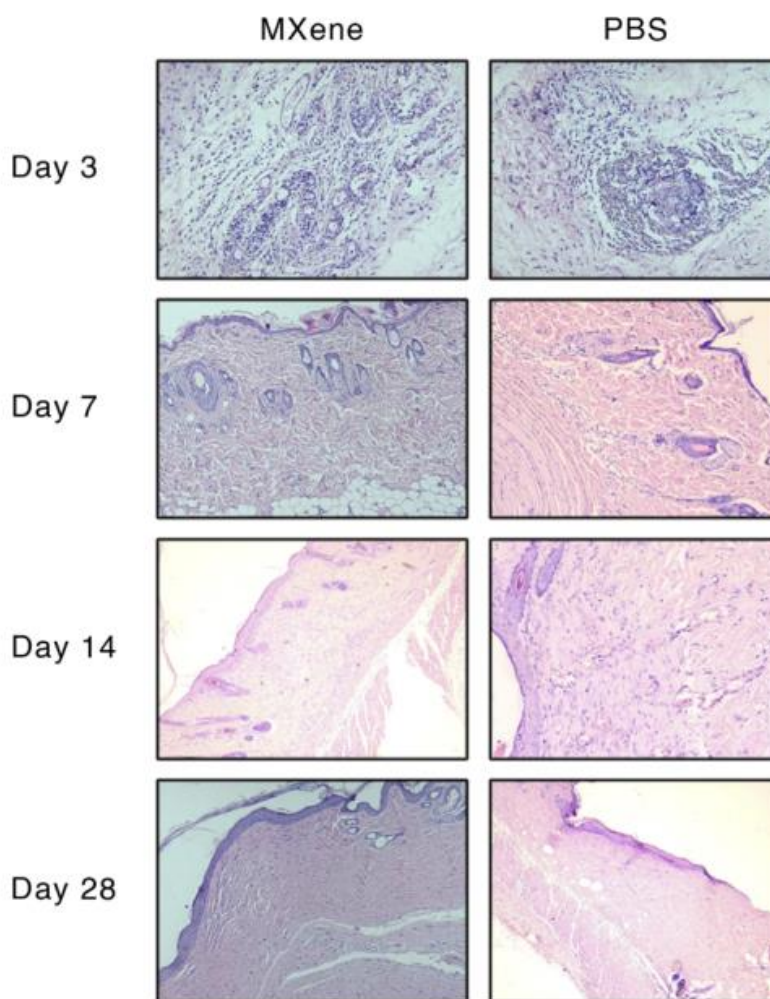


Рисунок 3.5.1. Безпечність ін'єкції MXene в шкіру щурів з подальшим лазерним опроміненням. Зображення зліва демонструють динаміку структурних змін у шкірі після ін'єкції MXene та лазерного опромінення, а праві панелі представляють те ж саме в контрольній групі. У тканинах шкіри не спостерігалось помітних відмінностей між двома групами. У ранні терміни спостерігалась легка запальна реакція як в поверхневих, так і в глибоких шарах дерми і зменшення кількості волосяних фолікулів. Пізніше на місці ін'єкції відбувалося формування локального рубця, а через 14 днів після експерименту спостерігалось відновлення гістоархітекtonіки в прилеглих до опромінених лазером ділянках.

Через тиждень після експерименту більшість волосяних фолікулів перебували у фазі телогена в обох групах лазерного впливу. У місці ін'єкції спостерігалось активне ремоделювання дерми з утворенням незрілої сполучної тканини та

проростанням кровоносних судин, що тривало до 14-ї доби. Зона втручання була покрита епідермісом і демонструвала відсутність волосяних фолікулів, хоча в сусідній опроміненій ділянці спостерігалася індукція анагену з швидким відростанням фолікулів, що досягало глибокої дерми і гіподермального шару.

Через сім днів після втручання на місці ін'єкції виявлявся невеликий рубець з повним відновленням сусідніх тканин шкіри. Ці особливості були виявлені як в групі МХене+лазер, так і в групі ФБР+лазер. Товщина шкіри в ділянках рубців, утворених колагеновою сполучною тканиною, була зменшена порівняно з прилеглою шкірою за рахунок відсутності шкірних придатків. Таким чином, специфічної альтерації або імуногенної реакції в шкірі щурів після лікування МХене+лазером не виявлено, що свідчить про безпечність даного втручання для нормальних тканин. Місцева запальна реакція в місці ін'єкції зменшувалася в пробі на 7 добу, внаслідок ремоделювання шкіри та формування рубця в місці ін'єкції. Тимчасові незначні зміни поверхневих шарів шкіри та індукована катагенова фаза волосяних фолікулів можуть бути інтерпретовані як вплив лазера. У сукупності ці результати свідчать про безпеку лікування підшкірним введенням препарату МХене з подальшим імпульсним опроміненням БІЧ лазером з довжиною хвилі 1064 нм.

3.6. Системна оцінка безпеки фототермічної терапії з використанням МХене та імпульсного інфрачервоного лазера в природних умовах.

Вчені оцінили можливий вплив МХене на органи-мішені, зокрема печінку, нирки, серце, селезінку, легені та сечовий міхур, через 3, 7, 14 та 28 днів після підшкірного введення МХене та лазерного опромінення. У всіх піддослідних групах не було зафіксовано жодних змін, що свідчить про безпечність комбінованого лікування із застосуванням МХене та ІЧ-лазерного випромінювання (рис. 3.6.1).

Дійшли висновку, що комбіноване лікування підшкірними ін'єкціями МХене та опроміненням імпульсним БІЧ-лазером з довжиною хвилі 1064 нм не викликає явних патологічних змін у різних органах і тканинах піддослідних тварин.

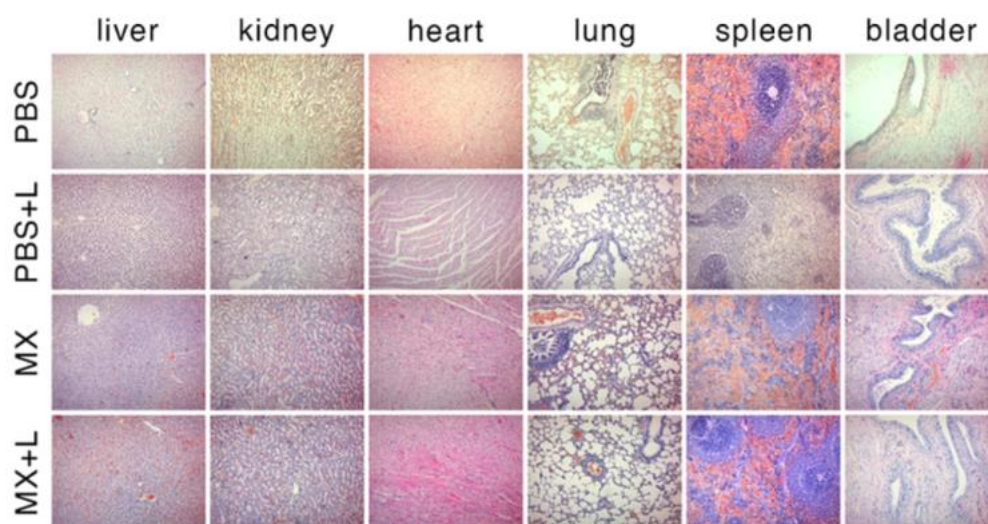


Рисунок 3.6.1. Гістологічна панель вісцеральних органів через 28 днів після ін'єкції МХене та лазерного опромінення (дані для 3, 7 та 14 днів представлені на рисунку 3.5.2). МХ - МХене; Л - лазерне опромінення (репрезентативно для п'яти незалежних повторень аналізу). $n = 6$ на групу.

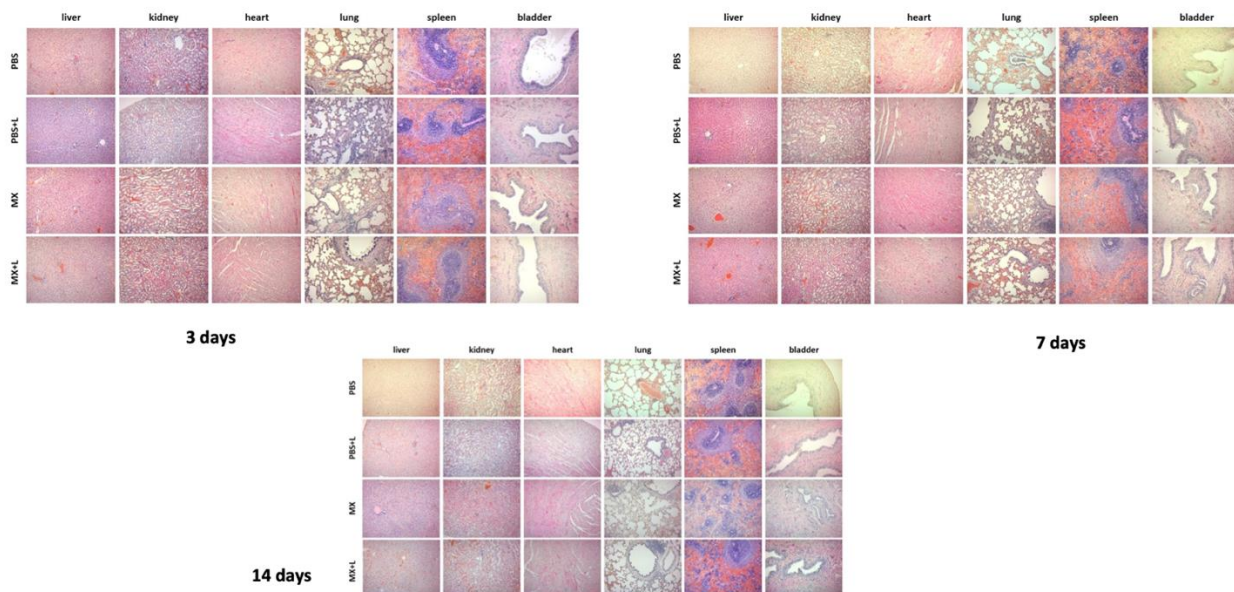


Рисунок 3.5.2. Гістологічна панель органів-мішеней через 3, 7 та 14 днів після ін'єкції МХене та лазерного опромінення. Цифри днів вказують на час після ін'єкції з подальшим лазерним опроміненням

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ

MXene різного складу і структури, як правило, демонструють розумну біологічну сумісність [43]. У даному дослідженні MXene $Ti_3C_2T_x$ добре переносився як нормальними, так і раковими клітинами в умовах пробірки. Природа взаємодії MXene з клітинами все ще потребує подальших досліджень. Однак, пластівці MXene мають тенденцію до колокалізації з клітинами в культурах клітин. Це дозволяє припустити, що тут може бути задіяна або активна клітинна функція розпізнавання MXene, або будь-яка інша неспецифічна взаємодія.

Негативно заряджені одношарові пластівці MXene утворюють стабільну колоїдну дисперсію. Однак у присутності білків вони мають тенденцію утворювати асоціації з білками, головним чином через електростатичні взаємодії, що призводить до зміни ζ -потенціалу MXenes[44]. Це, в свою чергу, може впливати на стабільність частинок у колоїдному сенсі[45]. Повне середовище для культивування клітин містить велику кількість різних білків, оскільки воно містить 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби, яка, в свою чергу, може містити до 80 мг/мл білків.

Тому в середовищі для культивування клітин пластівці MXene можуть поглинати значну кількість білків[46]. Стабільність MXene в розчині з білками потребує подальшого дослідження, але вчені припускають, що одношарові пластівці MXene в середовищі для культивування клітин поступово агрегують з білками і випадають в осад. Всі клітини, які вони використовували, були адгезивними клітинами, які ростуть прикріпленими до дна лунок у планшеті для культивування клітин. Це приводить їх у тісний контакт з частково агрегованими MXenes. Крім того, враховуючи здатність MXenes поглинати білки, частково агреговані MXenes могли мати внутрішню (електростатичну) спорідненість до клітин, оскільки поверхня клітин містить багато білків і білкових структур. Це могло б пояснити утворення сферичних структур навколо клітин, що спостерігається після інкубації з MXene (рис. 3.1.1 В,Е).

Цей механізм, однак, не виключає активного накопичення MXene клітинами, наприклад, шляхом ендоцитозу. Крім того, MXene може також утворювати асоціації з компонентами позаклітинного матриксу, оскільки було показано, що MXene мають

тенденцію до утворення білкових корон і, отже, можуть утворювати агрегати через цей механізм[47]. Чи мають клітини, використані в цьому дослідженні, рецептори, які могли б специфічно розпізнавати MXenes, все ще потребує подальших досліджень.

Після тривалої інкубації з великою кількістю MXene процес накопичення MXene на клітинах призводив до того, що клітини ставали видимими у вигляді непрозорих темних структур сферичної форми. Надмірне накопичення MXene на клітинах призводило до зменшення кількості клітин. Вони також набували аномального вигляду. Чи здатні ці клітини зберігати проліферативну та метаболічну активність у довгостроковій перспективі, поки що потребує подальших детальних досліджень і є предметом наступного дослідження. Однак, з попереднього досвіду, клітини, покриті великою кількістю MXene, втрачають життєздатність і не відновлюють проліферацію після тривалої інкубації.

Біосумісність та цитотоксичність біоматеріалів регулярно вимірюють в аналізах пробірки в культурах клітин, наприклад, для оцінки загальної метаболічної активності клітин. Серед них часто використовують тест МТТ[48] та тест відновлення резазурину[49], також відомий як тест AlamarBlue (BioRad Laboratories, м. Геркулес, штат Каліфорнія, США)[50]. Обидва аналізи базуються на відновлювальній активності мітохондріальних ферментів NAD(P)H-залежної оксидоредуктази у життєздатних клітинах, які відновлюють жовту тетразолієву сіль та синій барвник резазурин до фіолетових кристалів формагану та розчинного рожевого резорурфіну відповідно. Кількість формагану або резорурфіну, що утворюється, пропорційна кількості життєздатних, метаболічно активних клітин і вимірюється за допомогою оптичного поглинання або флуоресценції. Однак, повідомлялося про артефакти оптичного зчитування при використанні цих аналізів з наноматеріалами, такими як вуглецеві нанотрубки[51]. Ці потенційні артефакти слід брати до уваги, щоб уникнути помилок в інтерпретації даних.

При відносно низьких концентраціях, MXene виявив незначну токсичність. Це узгоджувалося з іншими повідомленнями, які демонстрували відмінну біосумісність MXenes[52]. За нашими попередніми спостереженнями, при концентраціях нижче 1мкг/мл MXene не виявляв жодної помітної токсичності. Вчені мали на меті оцінити

токсичність МХене в широкому діапазоні концентрацій, і вони спостерігали досить нетрадиційну поведінку динаміки токсичності МХене (рис. 3.1.2). Зазвичай очікується типова сигмоїдна залежність "доза-відповідь" (рис. 4.1). Насправді, було виявлено помітне зниження життєздатності клітин вже при найнижчій використовуваній концентрації МХене (1,5 мкг/мл). Однак зі збільшенням концентрації МХене показники резазурину залишалися на тому ж рівні і навіть починали зростати при концентраціях 12 мкг/мл і вище. Вони припускали, що показники тесту на відновлення резазурину, який вимірює загальну метаболічну здатність клітин в культурі, можуть зростати за рахунок відновлювальної здатності МХенес, а не за рахунок біологічного відновлення резазурину живими клітинами. Це стає очевидним при високих концентраціях МХенес.

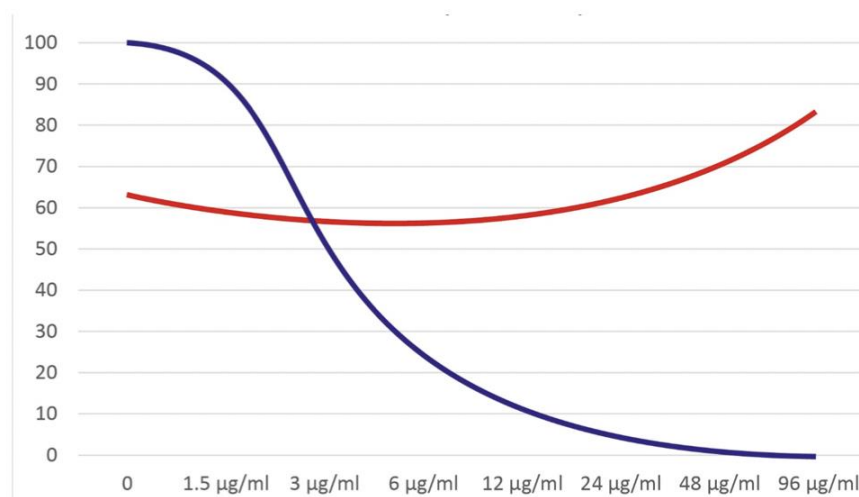


Рисунок 4.1. Порівняння ідеальної апроксимації типової сигмоїдної залежності "доза-відповідь" (крива токсичності) (■) та квадратичної лінії тренду графіка для точки даних 1-го дня з клітинами МСК, показаними на рис. 2 (■).

Звіти інших груп вчених, які вивчали токсичність МХене, також в цілому показують відсутність типової сигмоїдної залежності "доза-відповідь" (наприклад, [53-55]). Так, клітини HaCat з Ti_3C_2 МХене[53] показали помітне зниження життєздатності при збільшенні концентрації МХенес від 0 до 1 мкг/мл. Однак подальше збільшення концентрації МХену до 10, а потім до 125 мкг/мл, як не парадоксально, не призвело до подальшого зниження показників МТТ (рис. 3А в

роботі [53]). У цьому випадку[53] для оцінки цитотоксичності використовувався метаболічний аналіз МТТ. Однак аналіз МТТ покладається, по суті, на подібне метаболічне відновлення забарвленого субстрату до резазурину, що використовувався в дослідженні.

Матеріал	Довжина хвилі лазера(нм)	Щільність потужності лазера(Вт/см ²)	Час експозиції	Концентрація	Посилання
Ti ₃ C ₂ -Dox	808	0.8	10 хв	2мг/кг	26
Ti ₃ C ₂ -SP	808	1,1.5	5 хв	38-300мкг/мл	22
Ti ₃ C ₂ -cellulose	808	1	5 хв	313.4 мд	27
Ti ₃ C ₂ /Au/Fe ₃ O ₄	808	0.3, 0.5, 1, 1.5	5 хв	50, 100, 200 мкг/мл	29
Ti ₃ C ₂ - CoNWs	808	0.55, 0.77, 1, 1.2, 1.5	10 хв	50 мкг/мл	30
Ti ₃ C ₂ @Met@CP	808	1.5	10 хв	50, 100, 200 мкг/мл	23
		1 (пр. умови)	10 хв	20 мг/кг	
Ti ₃ C ₂ -IONPs-SPs	808	1.5	10 хв	12.5, 25, 50, 100, 200 мкг/мл	28
Ti ₃ C ₂ -TOB/GelMA	808	1.5	10 хв	25, 50, 100 мкг/мл	57

Nb ₂ C-PVP	808	0.5, 1, 1.5, 2	5 хв	100 мкг/мл	58
	1064	0, 0.5, 1, 1.5, 2	5 хв	100 мкг/мл	
CTAC@ Nb ₂ C- MSN-PEG-RGD	808	1, 1.5	5 хв	100 мкг/мл	59
	1064	1, 1.5	5 хв	100 мкг/мл	
Nb ₂ C@miSiO ₂	1064	0.5, 0.7, 1, 1.5	10 хв	25, 50, 100, 200 мд	60
Nb ₂ C-MSNs-SNO	1064	0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5	10 хв	12.5, 25, 50, 100, 200 мкг/мл [Nb]	61
		1 (пр. умови)		10 мг/кг [Nb]	
MnO _x /Ta ₄ C ₃ -SP	808	0.5, 1, 1.5, 2	5 хв	12.5, 25, 50, 100, 200 мкг/мл	62
Ta ₄ C ₃ -IONP-SP	808	1.5	5 хв	25, 50, 100, 200 мд	63
		1.5 (пр. умови)	10 хв	20 мг/кг	
Ti ₃ C ₂	1064	3.1 Дж/см ² , 200 мс імпульсів, 1Гц	20, 40, 60, 80 с	0.75, 3.75 мкг/мл	

^aКонцентрація Ti_3C_2 визначалася зважуванням висушених зразків.

Таблиця 2. Параметри в ФТТ експериментах з MXenes, що використовувалися в попередніх дослідженнях.

Концентрація MXene в колоїді, який використовувався в цьому дослідженні, визначалася шляхом фільтрації та вимірювання сухої ваги осаду MXene, що може мати похибку близько 10% через втрату найдрібніших частинок і води, що потрапила між листами MXene. До того ж, у наукових роботах, в яких повідомляється про біомедичні дослідження з MXenes, як правило, не вказується, яким саме способом визначалася концентрація MXene в їхніх дослідженнях.

Вчені спробували дослідити, які саме поверхневі закінчення (ОН, F і т.д.), якщо такі є, в першу чергу відповідають за токсичну дію MXenes у високих концентраціях. Вони припустили, що це можуть бути фторовмісні закінчення, які можуть гідролізуватись з утворенням HF, або сліди фтору, що залишаються після процедури травлення. Вони ретельно промили суспензію MXene лугом, щоб видалити будь-які кислотні залишки та щотижневий зв'язаний фтор, але не спостерігали жодних змін у токсичності очищених лугом MXenes. Припустили, що токсичність MXenes можна пояснити їх неспецифічною механічною обструкцією та вторгненням у клітини, а не їх специфічною біохімічною токсичністю.

Аналіз опублікованих робіт, присвячених ФТТ-терапії раку за допомогою БЧ-I та БЧ-II лазерів, показав, що попередні експериментатори однозначно використовували опромінення лазерами безперервної дії. У таблиці 2 наведені параметри експериментів з ФТТ, включаючи густину потужності, час експозиції та концентрацію в деяких попередніх дослідженнях. Переважно використовувався MXene Ti_3C_2 , хоча вивчалися також MXenes Nb_2C і Ta_4C_3 . Слід зазначити, що в усіх перерахованих дослідженнях використовувалися MXenes, модифіковані різними сполуками для підвищення їх біологічної сумісності та ефективності. Проте, прямого порівняння ефективності ФТТ різних MXenes не проводилося.

Більшість опублікованих експериментів з ФТТ виконувалися з лазерами безперервної дії з густиною енергії від 1 до 1,5 Вт/см² при часі опромінення 5-10 хв (наприклад, [27, 57]). Сумарна енергія опромінення в цих експериментах досягала 900 Вт/см². В той же час, в експериментах з імпульсним лазером частота становила 1 імпульс (200 мс) за секунду, а густина потужності - 3,1 Дж/см². Сумарна енергія опромінення становила від 24,8 до 49,6 Вт/см² за часу експозиції 40-80 с. Це свідчить про те, що енергія, необхідна для ефективною ФТТ імпульсним лазером, може бути суттєво знижена, що обіцяє краще виживання оточуючих здорових тканин і клітин. В цілому, імпульсні лазери мають переваги за більшою кількістю параметрів для оптимізації процесу, наприклад, за кількістю імпульсів, тривалістю імпульсів, піковою щільністю потужності, часом паузи між імпульсами тощо.

Більшість опублікованих робіт з ФТТ використовували лазери з довжиною хвилі 808 нм. Лазер з довжиною хвилі 1064 нм, що використовується в даному дослідженні з Ti₃C₂ MXene, може запропонувати цінну альтернативу, оскільки ця довжина хвилі має меншу енергію і, отже, може забезпечити краще виживання здорових клітин. Цей лазер також може проникати глибше під шкіру. Оскільки опромінення матеріалу з клітинами і без них проводилося в імпульсному режимі, то в нашому випадку основним механізмом взаємодії з лазерним випромінюванням є світлоіндукована дифузія, швидкість якої можна оцінити за допомогою наближеної формули (рівняння 1)

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2}{\partial x^2} \quad (1)$$

де C - концентрація [моль/м³], t - час [с], D - коефіцієнт дифузії [м²/с], x - положення. Під час лазерного опромінення біологічного матеріалу, завантаженого MXene, пластівці MXene поглинають енергію, перетворюючи ІЧ-світло в тепло. Це ініціює передачу тепла навколишнім тканинам, клітинам або біологічним рідидам. Для адекватної інтерпретації результатів було проведено вимірювання розподілу температури в межах опроміненої ділянки за допомогою тепловізора (рис. 3.4.1) для

всього інтервалу експозиції (40, 60, 80 с) та різних концентрацій МХене (0, 0,75, 3,75 мкг/мл).

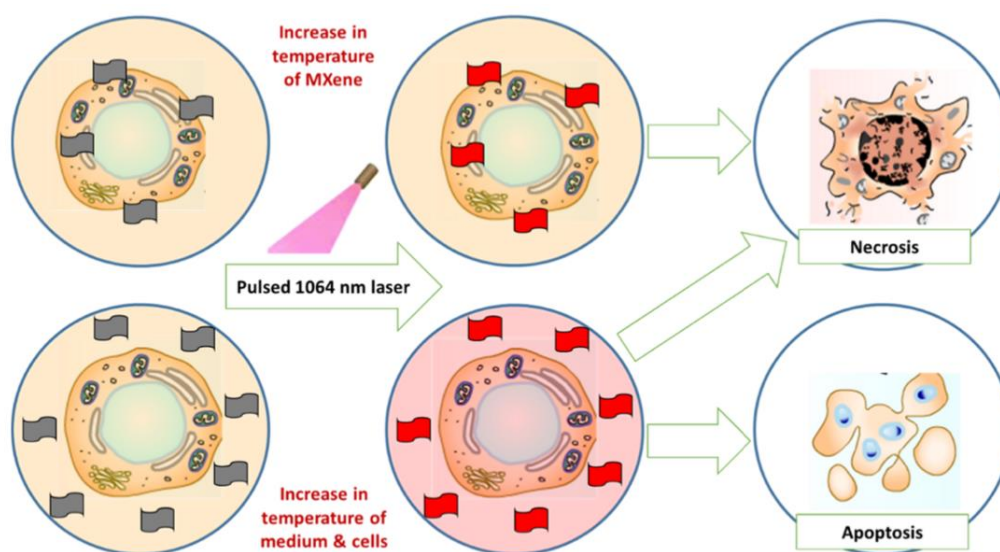


Рисунок 4.2 Запропонований механізм фототермічної терапії та ерадикації ракових клітин за допомогою Ti₃C₂ МХене після впливу імпульсного 1064 нм БІЧ лазера.

В стовбці 5 таблиці 1 представлені значення приросту температури ΔT . З таблиці видно, що максимальна температура могла досягати 60,2 °С, а різниця температур між зразками з МХене і без нього при різних концентраціях досягала 20 °С. Таким чином, опромінені зразки з МХене зазнали сильного теплового ефекту. Важливо, що імпульсні лазери можуть забезпечити потенційно більш керовану і регульовану динаміку поглинання і передачі тепла в порівнянні з лазерами безперервної дії. З імпульсними лазерами пікова щільність потужності може бути вищою, в той час як тривалість впливу може бути меншою, що призводить до менш серйозних побічних ефектів лікування і більш переносимих протоколів лікування.

Запропонований механізм ефекту ФТТ при імпульсному лазерному опроміненні з довжиною хвилі 1064 нм наведено на (рис. 4.2) Спостережуваний зв'язок МХене з клітинами дозволяє припустити, що він може проникати всередину клітин або локалізуватися на їх поверхні. Після опромінення в інфрачервоному

діапазоні можна виділити дві можливі високотемпературні зони: 1) безпосередньо на пластівцях MXene, пов'язаних з клітинами, і 2) в середовищі навколо клітин з вільно плаваючими пластівцями. Виходячи з цього припущення, можна розглядати два типи механізмів пошкодження клітин. Після експозиції підвищена температура зв'язаних з клітинами MXenes викликає пряме пошкодження клітин з руйнуванням мембран і денатурацією білків, що призводить до загибелі клітин шляхом некрозу.

Цей механізм був запропонований деякими авторами на основі експериментів в пробірці та в природних умовах[43]. Другий механізм передбачає температурне пошкодження від нагрітого середовища: вільно плаваючі пластівці MXene викликають підвищення температури живильного середовища та індукують термозалежний апоптоз[64]. Підвищена температура середовища може також викликати некроз клітин, що сприяє загибелі ракових клітин. Слід зазначити, що таке підвищення температури може також викликати як апоптоз, так і некроз оточуючих нормальних здорових клітин, що призводить до пошкодження тканин. Тому ми поставили собі за мету дослідити, як клітини нормальної тканини реагують на навантаження MXene та опромінення імпульсним інфрачервоним лазером.

МСК представляють собою клітини нормальної тканини і є широко використовуваною моделлю нормальних клітин, що легко проліферують в експериментах в пробірці. Результати показали, що клітини нормальної тканини можуть бути видалені аналогічно пухлинним клітинам. Це ще раз підкреслює важливість селективного механізму для спрямування агента ФТТ на пухлинні клітини. Таким чином, для ефективного та безпечного лікування раку необхідна ретельна розробка протоколів опромінення та специфічних стратегій зв'язування MXene з раковими клітинами.

ВИСНОВКИ

Імпульсний лазер з довжиною хвилі 1064 нм може бути використаний для розробки протоколів лікування онкологічних захворювань з використанням фототермічного ефекту Ti_3C_2 MXene. MXene проявляє низьку токсичність в пробірці і добре переноситься при комбінованому лікуванні з ІЧ-лазерним опроміненням в природних умовах. У високих концентраціях MXene може накопичуватися на клітинах і в них, що призводить до зменшення кількості клітин та їх аномальної морфології.

MXene може проявляти автокаталітичний ефект на субстрати клітинних метаболічних аналізів, які зазвичай використовуються для оцінки токсичності MXene в пробірці. Тому результати таких аналізів слід інтерпретувати з обережністю. В цілому, імпульсні ІЧ-лазери мають переваги перед лазерами безперервного випромінювання в розробці безпечних та ефективних протоколів ФТТ лікування раку із застосуванням MXene.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021, 71, 209–249.
2. Garbe, C.; Keim, U.; Gandini, S.; Amaral, T.; Katalinic, A.; Hollezcek, B.; Martus, P.; Flatz, L.; Leiter, U.; Whiteman, D. Epidemiology of Cutaneous Melanoma and Keratinocyte Cancer in White Populations 1943-2036. *Eur. J. Cancer* 2021, 152, 18–25.
3. Schadendorf, D.; Fisher, D. E.; Garbe, C.; Gershenwald, J. E.; Grob, J.-J.; Halpern, A.; Herlyn, M.; Marchetti, M. A.; McArthur, G.; Ribas, A.; Roesch, A.; Hauschild, A. Melanoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2015, 1, 15003.
4. Ji, Z.; Lin, G.; Lu, Q.; Meng, L.; Shen, X.; Dong, L.; Fu, C.; Zhang, X. Targeted Therapy of SMMC-7721 Liver Cancer in Vitro and in Vivo with Carbon Nanotubes Based Drug Delivery System. *J. Colloid Interface Sci.* 2012, 365, 143–149.
5. Zhang, P.; Meng, J.; Li, Y.; Yang, C.; Hou, Y.; Tang, W.; McHugh, K. J.; Jing, L. Nanotechnology-Enhanced Immunotherapy for Metastatic Cancer. *Innovation* 2021, 2, No. 100174.
6. Kotagiri, N.; Sudlow, G. P.; Akers, W. J.; Achilefu, S. Breaking the Depth Dependency of Phototherapy with Cerenkov Radiation and Low-Radiance-Responsive Nanophotosensitizers. *Nat. Nanotechnol.* 2015, 10, 370–379.
7. Chen, M.; Tang, S.; Guo, Z.; Wang, X.; Mo, S.; Huang, X.; Liu, G.; Zheng, N. Core-Shell Pd@Au Nanoplates as Theranostic Agents for in-Vivo Photoacoustic Imaging, CT Imaging, and Photothermal Therapy. *Adv. Mater.* 2014, 26, 8210–8216.
8. Gazzi, A.; Fusco, L.; Khan, A.; Bedognetti, D.; Zavan, B.; Vitale, F.; Yilmazer, A.; Delogu, L. G. Photodynamic Therapy Based on Graphene and MXene in Cancer Theranostics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 295.

9. Dos Santos, A. F.; De Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. S.; Labriola, L. Photodynamic Therapy in Cancer Treatment - an Update Review. *J. Cancer Metastasis Treat.* 2019, 2019, 25.
10. Yang, K.; Feng, L.; Liu, Z. Stimuli Responsive Drug Delivery Systems Based on Nano-Graphene for Cancer Therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2016, 105, 228–241.
11. Fusco, L.; Gazzi, A.; Peng, G.; Shin, Y.; Vranic, S.; Bedognetti, D.; Vitale, F.; Yilmazer, A.; Feng, X.; Fadeel, B.; Casiraghi, C.; Delogu, L. G. Graphene and Other 2D Materials: A Multidisciplinary Analysis to Uncover the Hidden Potential as Cancer Theranostics. *Theranostics* 2020, 10, 5435–5488.
12. Naguib, M.; Kurtoglu, M.; Presser, V.; Lu, J.; Niu, J.; Heon, M.; Hultman, L.; Gogotsi, Y.; Barsoum, M. W. Two-Dimensional Nanocrystals Produced by Exfoliation of Ti_3AlC_2 . *Adv. Mater.* 2011, 23, 4248–4253.
13. VahidMohammadi, A.; Rosen, J.; Gogotsi, Y. The World of Two-Dimensional Carbides and Nitrides (MXenes). *Science* 2021, 372, No. eabf1581.
14. Anasori, B.; Gogotsi, Y. 2D Metal Carbides and Nitrides (MXenes): Structure, Properties and Applications; Springer International Publishing, 2019.
15. Wang, S.; Li, X.; Chen, Y.; Cai, X.; Yao, H.; Gao, W.; Zheng, Y.; An, X.; Shi, J.; Chen, H. A Facile One-Pot Synthesis of a Two-Dimensional MoS_2/Bi_2S_3 Composite Theranostic Nanosystem for Multi-Modality Tumor Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* 2015, 27, 2775–2782.
16. Tao, W.; Zhu, X.; Yu, X.; Zeng, X.; Xiao, Q.; Zhang, X.; Ji, X.; Wang, X.; Shi, J.; Zhang, H.; Mei, L. Black Phosphorus Nanosheets as a Robust Delivery Platform for Cancer Theranostics. *Adv. Mater.* 2017, 29, No. 1603276.
17. Scheibe, B.; Wychowaniec, J. K.; Scheibe, M.; Peplinska, B.; Jarek, M.; Nowaczyk, G.; Przysiecka, Ł. Cytotoxicity Assessment of Ti-Al-C Based MAX Phases and $Ti_3C_2T_x$ MXenes on Human Fibroblasts and Cervical Cancer Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5, 6557–6569.

18. Jain, P. K.; Huang, W.; El-Sayed, M. A. On the Universal Scaling Behavior of the Distance Decay of Plasmon Coupling in Metal Nanoparticle Pairs: A Plasmon Ruler Equation. *Nano Lett.* 2007, 7, 2080–2088.
19. Cai, Y.; Liang, P.; Tang, Q.; Yang, X.; Si, W.; Huang, W.; Zhang, Q.; Dong, X. Diketopyrrolopyrrole-Triphenylamine Organic Nanoparticles as Multifunctional Reagents for Photoacoustic Imaging-Guided Photodynamic/Photothermal Synergistic Tumor Therapy. *ACS Nano* 2017, 11, 1054–1063.
20. Maleski, K.; Shuck, C. E.; Fafarman, A. T.; Gogotsi, Y. The Broad Chromatic Range of Two-Dimensional Transition Metal Carbides. *Adv. Opt. Mater.* 2021, 9, No. 2001563.
21. Lin, H.; Wang, X.; Yu, L.; Chen, Y.; Shi, J. Two-Dimensional Ultrathin MXene Ceramic Nanosheets for Photothermal Conversion. *Nano Lett.* 2017, 17, 384–391.
22. Han, X.; Huang, J.; Lin, H.; Wang, Z.; Li, P.; Chen, Y. 2D Ultrathin MXene-Based Drug-Delivery Nanoplatform for Synergistic Photothermal Ablation and Chemotherapy of Cancer. *Adv. Healthcare Mater.* 2018, 7, No. 1701394.
23. Bai, L.; Yi, W.; Sun, T.; Tian, Y.; Zhang, P.; Si, J.; Hou, X.; Hou, J. Surface Modification Engineering of Two-Dimensional Titanium Carbide for Efficient Synergistic Multitherapy of Breast Cancer. *J. Mater. Chem. B* 2020, 8, 6402–6417.
24. Ge, X.; Fu, Q.; Bai, L.; Chen, B.; Wang, R.; Gao, S.; Song, J. Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy in the Second Near-Infrared Window. *New J. Chem.* 2019, 43, 8835.
25. Tang, W.; Dong, Z.; Zhang, R.; Yi, X.; Yang, K.; Jin, M.; Yuan, C.; Xiao, Z.; Liu, Z.; Cheng, L. Multifunctional Two-Dimensional Core-Shell MXene@Gold Nanocomposites for Enhanced Photo- Radio Combined Therapy in the Second Biological Window. *ACS Nano* 2019, 13, 284–294.
26. Liu, G.; Zou, J.; Tang, Q.; Yang, X.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Huang, W.; Chen, P.; Shao, J.; Dong, X. Surface Modified Ti₃C₂ MXene Nanosheets for Tumor

Targeting Photothermal/Photo- dynamic/Chemo Synergistic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 40077–40086.

27. Xing, C.; Chen, S.; Liang, X.; Liu, Q.; Qu, M.; Zou, Q.; Li, J.; Tan, H.; Liu, L.; Fan, D.; Zhang, H. Two-Dimensional MXene (Ti_3C_2)-Integrated Cellulose Hydrogels: Toward Smart Three- Dimensional Network Nanoplatfoms Exhibiting Light-Induced Swelling and Bimodal Photothermal/Chemotherapy Anticancer Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 27631–27643.

28. Liu, Z.; Zhao, M.; Lin, H.; Dai, C.; Ren, C.; Zhang, S.; Peng, W.; Chen, Y. 2D Magnetic Titanium Carbide MXene for Cancer Theranostics. *J. Mater. Chem. B* 2018, 6, 3541–3548.

29. Hussein, E. A.; Zagho, M. M.; Rizeq, B. R.; Younes, N. N.; Pintus, G.; Mahmoud, K. A.; Nasrallah, G. K.; Elzatahry, A. A. Plasmonic MXene-Based Nanocomposites Exhibiting Photothermal Therapeutic Effects with Lower Acute Toxicity than Pure MXene. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 4529–4539.

30. Liu, Y.; Han, Q.; Yang, W.; Gan, X.; Yang, Y.; Xie, K.; Xie, L.; Deng, Y. Two-Dimensional MXene/Cobalt Nanowire Heterojunction for Controlled Drug Delivery and Chemo-Photothermal Therapy. *Mater. Sci. Eng., C* 2020, 116, No. 111212.

31. Yu, X.; Cai, X.; Cui, H.; Lee, S. W.; Yu, X. F.; Liu, B. Fluorine- Free Preparation of Titanium Carbide MXene Quantum Dots with High near-Infrared Photothermal Performances for Cancer Therapy. *Nanoscale* 2017, 9, 17859–17864.

32. Szuplewska, A.; Kulpińska, D.; Dybko, A.; Jastrzębska, A. M.; Wojciechowski, T.; Rozmysłowska, A.; Chudy, M.; Grabowska- Jadach, I.; Ziemkowska, W.; Brzózka, Z.; Olszyna, A. 2D Ti_2C (MXene) as a Novel Highly Efficient and Selective Agent for Photothermal Therapy. *Mater. Sci. Eng., C* 2019, 98, 874–886.

33. Alhabeab, M.; Maleski, K.; Anasori, B.; Lelyukh, P.; Clark, L.; Sin, S.; Gogotsi, Y. Guidelines for Synthesis and Processing of Two- Dimensional Titanium Carbide ($\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ MXene). *Chem. Mater.* 2017, 29, 7633–7644.

34. Kyrylenko, S.; Kornienko, V.; Gogotsi, O.; Oleshko, O.; Kolesnyk, M.; Mishchenko, O.; Zahorodna, V.; Buranich, V.; Pogrebnyak, A.; Zozulia, Y.; Balitskiy, V.; Pogorielov, M.; Baginskiy, I. Bio-Functionalization of Electrospun Polymeric Nanofibers by $Ti_3C_2T_x$ MXene, In Proceedings of the 2020 IEEE 10th International Conference on “Nanomaterials: Applications and Properties”, NAP 2020; Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.: Odesa, 2020.
35. Shuck, C. E.; Sarycheva, A.; Anayee, M.; Levitt, A.; Zhu, Y.; Uzun, S.; Balitskiy, V.; Zahorodna, V.; Gogotsi, O.; Gogotsi, Y. Scalable Synthesis of $Ti_3C_2T_x$ MXene. *Adv. Eng. Mater.* 2020, 22, No. 1901241.
36. Singer, B. B.; Scheffrahn, I.; Öbrink, B. The Tumor Growth- Inhibiting Cell Adhesion Molecule CEACAM1 (C-CAM) Is Differ- ently Expressed in Proliferating and Quiescent Epithelial Cells and Regulates Cell Proliferation. *Cancer Res.* 2000, 60, 1236–1244.
37. Moonens, K.; Hamway, Y.; Neddermann, M.; Reschke, M.; Tegtmeyer, N.; Kruse, T.; Kammerer, R.; Mejías-Luque, R.; Singer, B. B.; Backert, S.; Gerhard, M.; Remaut, H. Helicobacter Pylori Adhesin HopQ Disrupts Trans Dimerization in Human CEACAMs. *EMBO J.* 2018, 37, No. e98665.
38. Shuvalova, N. S.; Kordium, V. A. Comparison of Proliferative Activity of Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells in Cultures under Various Gas Conditions. *Biopolym. Cell* 2015, 31, 233–239.
39. Shuvalova, N. S.; Kordium, V. A. Morphological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Wharton Jelly, Cultivated under Physiological Oxygen Tensions, in Various Gas Mixtures. *Biopolym. Cell* 2016, 32, 262–270.
40. Kyrylenko, S.; Warchoł, F.; Oleshko, O.; Husak, Y.; Kazek- Kęsik, A.; Kornienko, V.; Deineka, V.; Sowa, M.; Maciej, A.; Michalska, J.; Jakóbi-Kolon, A.; Małucha, I.; Basiaga, M.; Hulubnycha, V.; Stolarczyk, A.; Pisarek, M.; Mishchenko, O.; Pogorielov, M.; Simka, W. Effects of the Sources of Calcium and Phosphorus on the Structural and Functional Properties of Ceramic Coatings on Titanium Dental Implants Produced by Plasma Electrolytic Oxidation. *Mater. Sci. Eng., C* 2021, 119, No. 111607.

41. Ekpe, P. O.; Husak, Y.; Yanko, I.; Roshchupkin, A.; Stepanenko, A.; Gogotsi, O.; Zahorodna, V.; Burduli, D.; Baginskyi, I.; Balitskyi, V.; Pogorielov, M.; Kyrylenko, S. Visualisation of $Ti_3C_2T_x$ MXenes in Eukaryotic Cells by Transmission Electron Microscopy, In *Nanomaterials: Application & Properties*, 2021 IEEE 11th International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP- 2021); Odesa, 2021.
42. Graham, L.; Orenstein, J. M. Processing Tissue and Cells for Transmission Electron Microscopy in Diagnostic Pathology and Research. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2439–2450.
43. Pogorielov, M.; Smyrnova, K.; Kyrylenko, S.; Gogotsi, O.; Zahorodna, V.; Pogrebnjak, A. MXenes - A New Class of Two- Dimensional Materials: Structure, Properties and Potential Applications. *Nanomaterials* 2021, 11, 3412.
44. Rozmysłowska-Wojciechowska, A.; Wojciechowski, T.; Ziemkowska, W.; Chlubny, L.; Olszyna, A.; Jastrzębska, A. M. Surface Interactions between 2D Ti_3C_2/Ti_2C MXenes and Lysozyme. *Appl. Surf. Sci.* 2019, 473, 409–418.
45. Doroszkowski, A. The Physical Chemistry of Dispersion. *Paint Surf. Coat.* 1999, 198–242.
46. Seredych, M.; Maleski, K.; Mathis, T. S.; Gogotsi, Y. Delamination of MXenes Using Bovine Serum Albumin. *Colloids Surf., A* 2022, 641, No. 128580.
47. Wu, X.; Tan, F.; Cheng, S.; Chang, Y.; Wang, X.; Chen, L. Investigation of Interaction between MXene Nanosheets and Human Plasma and Protein Corona Composition. *Nanoscale* 2022, 14, 3777– 3787.
48. Supino, R. MTT Assays. *Methods Mol. Biol.* 1995, 43, 137–149.
49. Pereira, M. I. A.; Monteiro, C. A. P.; de Oliveira, W. F.; Santos, B. S.; Fontes, A.; Cabral Filho, P. E. Resazurin-Based Assay to Evaluate Cell Viability After Quantum Dot Interaction. In *Quantum Dots; Methods in Molecular Biology; Humana: New York, NY, 2020; Vol. 2135, pp 213–221.*
50. Alamar Blue - Cell Proliferation Assay | Bio-Rad. <https://www.bio-rad-antibodies.com/alarablue-cell-proliferation-assay.html> (accessed Oct 12, 2021).

51. Breznan, D.; Das, D.; MacKinnon-Roy, C.; Simard, B.; Kumarathanan, P.; Vincent, R. Non-Specific Interaction of Carbon Nanotubes with the Resazurin Assay Reagent: Impact on in Vitro Assessment of Nanoparticle Cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro* 2015, 29, 142–147.

52. Unal, M. A.; Bayrakdar, F.; Fusco, L.; Besbinar, O.; Shuck, C. E.; Yalcin, S.; Erken, M. T.; Ozkul, A.; Gurcan, C.; Panatli, O.; Summak, G. Y.; Gokce, C.; Orecchioni, M.; Gazzi, A.; Vitale, F.; Somers, J.; Demir, E.; Yildiz, S. S.; Nazir, H.; Grivel, J.-C.; Bedognetti, D.; Crisanti, A.; Akcali, K. C.; Gogotsi, Y.; Delogu, L. G.; Yilmazer, A. 2D MXenes with Antiviral and Immunomodulatory Properties: A Pilot Study against SARS-CoV-2. *Nano Today* 2021, 38, No. 101136.

53. Rozmysłowska-Wojciechowska, A.; Szuplewska, A.; Wojciechowski, T.; Poźniak, S.; Mitrzak, J.; Chudy, M.; Ziemkowska, W.; Chlubny, L.; Olszyna, A.; Jastrzębska, A. M. A Simple, Low-Cost and Green Method for Controlling the Cytotoxicity of MXenes. *Mater. Sci. Eng., C* 2020, 111, No. 110790.

54. Rashid, B.; Anwar, A.; Shahabuddin, S.; Mohan, G.; Saidur, R.; Aslfattahi, N.; Sridewi, N. A Comparative Study of Cytotoxicity of PPG and PEG Surface-Modified 2-D Ti_3C_2 MXene Flakes on Human Cancer Cells and Their Photothermal Response. *Materials* 2021, 14, 4370.

55. Li, G.; Zhong, X.; Wang, X.; Gong, F.; Lei, H.; Zhou, Y.; Li, C.; Xiao, Z.; Ren, G.; Zhang, L.; Dong, Z.; Liu, Z.; Cheng, L. Titanium Carbide Nanosheets with Defect Structure for Photothermal- Enhanced Sonodynamic Therapy. *Bioact. Mater.* 2022, 8, 409.

56. Jastrzębska, A. M.; Szuplewska, A.; Rozmysłowska- Wojciechowska, A.; Chudy, M.; Olszyna, A.; Birowska, M.; Popielski, M.; Majewski, J. A.; Scheibe, B.; Natu, V.; Barsoum, M. W. On Tuning the Cytotoxicity of Ti_3C_2 (MXene) Flakes to Cancerous and Benign Cells by Post-Delamination Surface Mod- ifications. *2D Mater.* 2020, 7, No. 025018.

57. Yin, J.; Han, Q.; Zhang, J.; Liu, Y.; Gan, X.; Xie, K.; Xie, L.; Deng, Y. MXene-Based Hydrogels Endow Polyetheretherketone with Effective Osteogenicity

and Combined Treatment of Osteosarcoma and Bacterial Infection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12, 45891–45903.

58. Lin, H.; Gao, S.; Dai, C.; Chen, Y.; Shi, J. A Two-Dimensional Biodegradable Niobium Carbide (MXene) for Photothermal Tumor Eradication in NIR-I and NIR-II Biowindows. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 16235–16247.

59. Han, X.; Jing, X.; Yang, D.; Lin, H.; Wang, Z.; Ran, H.; Li, P.; Chen, Y. Therapeutic Mesopore Construction on 2D Nb₂C MXenes for Targeted and Enhanced Chemo-Photothermal Cancer Therapy in NIR-II Biowindow. *Theranostics* 2018, 8, 4491–4508.

60. Xiang, H.; Lin, H.; Yu, L.; Chen, Y. Hypoxia-Irrelevant Photonic Thermodynamic Cancer Nanomedicine. *ACS Nano* 2019, 13, 2223–2235.

61. Yin, H.; Guan, X.; Lin, H.; Pu, Y.; Fang, Y.; Yue, W.; Zhou, B.; Wang, Q.; Chen, Y.; Xu, H. Nanomedicine-Enabled Photonic Thermogaseous Cancer Therapy. *Adv. Sci.* 2020, 7, No. 1901954.

62. Dai, C.; Chen, Y.; Jing, X.; Xiang, L.; Yang, D.; Lin, H.; Liu, Z.; Han, X.; Wu, R. Two-Dimensional Tantalum Carbide (MXenes) Composite Nanosheets for Multiple Imaging-Guided Photothermal Tumor Ablation. *ACS Nano* 2017, 11, 12696–12712.

63. Liu, Z.; Lin, H.; Zhao, M.; Dai, C.; Zhang, S.; Peng, W.; Chen, Y. 2D Superparamagnetic Tantalum Carbide Composite MXenes for Efficient Breast-Cancer Theranostics. *Theranostics* 2018, 8, 1648–1664.

64. Zhang, Y.; Zhan, X.; Xiong, J.; Peng, S.; Huang, W.; Joshi, R.; Cai, Y.; Liu, Y.; Li, R.; Yuan, K.; Zhou, N.; Min, W. Temperature-Dependent Cell Death Patterns Induced by Functionalized Gold Nanoparticle Photothermal Therapy in Melanoma Cells. *Sci. Rep.* 2018, 8, No. 8720.