

УДК 579.22, 573.6,615.017:616.079; 615.5/.3.001.37, 57.089.002.3;  
57.089:616-7].002.3, 535:621.373.826]:539

УКПШ

№ держреєстрації 0122U000784

Інв. №

**Міністерство освіти і науки України**  
Сумський державний університет (СумДУ)  
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2  
тел. (0542)33-53-39 факс (0542)33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р фіз.-мат.наук, професор

\_\_\_\_\_ А.М. Черноус

**ЗВІТ**  
**ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ**  
**Встановлення механізмів взаємодії МХене з біологічними системами**  
**ЗАЛЕЖНІСТЬ БІОСУМІСНОСТІ ВІД СТРУКТУРНИХ ТА ХІМІЧНИХ**  
**ВЛАСТИВОСТЕЙ МХЕНЕ**  
**(проміжний)**

Керівник НДР,  
доктор мед. наук, професор

М.В. Погорєлов

2022

Рукопис закінчено 15 грудня 2022 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від \_\_\_\_\_ грудня 2022 р. № \_\_\_\_\_

**СПИСОК АВТОРІВ**

Керівник НДР, д.мед.н.	(26.12.2022)	М.В. Погорелов (реферат; вступ; розділ 1, 3, висновки)
Відповідальний виконавець Провідний. наук. співроб. доктор фіз-мат. наук	(26.12.2022)	О.Д. Погребняк (розділи 1, 2)
Мол. наук. співроб. канд. фіз-мат. наук	(26.12.2022)	Р.В. Вітер (розділ 2)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 48 с., 1 табл., 10 рис., 66 джерел

MXene, БІОСУМІСНІСТЬ, ЛАЗЕРНЕ ОПРОМІНЕННЯ, ПУХЛИНИ

*Об'єкт дослідження* – процеси взаємодії Mxene з біологічними системами

*Предмет дослідження* – механізми токсичності, біосумісності, метаболізм та імуногенність Mxene в процесі взаємодії з біологічними системами.

Для досягнення поставленої мети упродовж виконання етапу були визначені наступні завдання:

1. Провести синтез Mxene складу  $Ti_3C_2T_x$  та визначити їх фізико-хімічні властивості,

2. Визначити біосумісність на культурах соматичних, мезенхімальних та стовбурових клітин.

3. Встановити ефект біля-інфрачервоного лазера на здатність Mxene викликати загибель клітин пухлини.

4. Встановити механізм дії Mxene на клітини.

В дослідженні використаний комплекс фізико-хімічних (сканувальна електронна мікроскопія, раманівська спектроскопія, рентгенівська дифракція) та біологічних (культура клітин, модель *in-vivo*) методів дослідження, що надало змогу встановити механізм взаємодії Mxene з клітинами та прослідкувати ефект лазерного випромінення.

Ми вперше демонструємо, що імпульсний лазер із довжиною хвилі 1064 нм можна використовувати для селективної абляції клітин, завантажених  $Ti_3C_2T_x$  Mxene. Ми демонструємо як низьку токсичність, так і гарну біосумісність цього типу Mxene *in vitro*, а також сприятливий профіль безпеки, що ґрунтується на експериментах *in vivo*. Крім того, ми аналізуємо взаємодію Mxene з клітинами в декількох клітинних лініях і обговорюємо можливі помилки в клітинних метаболічних аналізах, що зазвичай використовуються в експериментах з Mxenes. У цілому нині ці дослідження створюють основу розробки ефективних і безпечних протоколів для малоінвазивної терапії певних пухлин.

## ЗМІСТ

	с.
ВСТУП .....	5
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
2 Матеріали і методи.....	12
2.1 Синтез та характеристика МХене .....	12
2.2 Клітинні культури .....	13
2.3 Оцінка цитотоксичності МХenes in vitro .....	13
2.4 Оцінка асоціації МХenes із клітинами .....	14
2.5 Фототермічний ефект .....	15
2.6 Оцінка безпеки фототермічної обробки МХenes in vivo. ....	16
2.7 Гістологічна оцінка впливу МХenes та лазерного лікування на шкіру.....	17
2.8 Гістологічна оцінка органів-мішеней .....	17
3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	19
3.1 Токсичність МХenes .....	19
3.2 2Пряме (автокаталітичне) відновлення резазурину МХenes.....	21
3.3 Асоціація МХenes із клітинами .....	22
3.4 Фототермічний ефект імпульсного лазера .....	24
3.5 Локальні ефекти ін'єкції МХене .....	27
3.6 Локальні ефекти ін'єкції МХене .....	29
4 ОБГОВОРЕННЯ.....	31
ВИСНОВКИ.....	38
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ... ..	39

## ВСТУП

MXene – новий клас наноламінатів, які є карбідами та карбонітридами перехідних металів. Даний клас речовин відкритий у 2011 році вченим українського походження Юрієм Гогоці являє собою найперспективніший матеріал, який за своїми властивостями перевищує графен та використовується для створення акумуляторів, наносенсорів, засобів гнучкої електроніки, антен, тощо. Останніми роками відкриті перспективи використання MXene в медицині, зокрема як протипухлинного засобу, носія лікарських речовин, антибактеріального та антивірусного агента, медичних електродів, тощо. При цьому, фундаментальні механізми взаємодії MXene з біологічними системами, його біосумісність, іммуногенність, загальна токсичність та шляхи метаболізму до сьогодення системно не вивчалися.

Починаючи з 2018 року зростає кількість досліджень стосовно застосування MXene в біології та медицині. Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> був першим Mxene, який використали на моделі фото-термальної терапії раку. Продемонстровано їх біосумісність та можливість руйнування клітин лінії 4T41 (рак молочної залози) при опроміненні в ділянці 808 нм [1]. Пізніше, доведена можливість навантаження MXene протипухлинним засобом доксирубіцин, який підвищив ефективність терапії [2]. Доведена можливість застосування Nb<sub>2</sub>C в ділянках NIR-I NIR-II інфрачервоного світла по відношенню до ліній клітин U87 та 4T41. Існують також дослідження щодо використання V<sub>2</sub>C and Ta<sub>4</sub>C<sub>3</sub> MXenes як для протипухлинної терапії, так і для діагностики новоутворень. Основний механізм дії, описаний більшістю авторів, полягає у прямій ушкоджуючій дії теплової енергії при нагріві Mxene, проте є гіпотезі щодо активації апоптозу за умов формування окисних радикалів [3]. Аналіз робіт не показав чіткого визначення порога токсичності, механізмів взаємодії MXene з клітинною мембраною та внутрішньоклітинними органелами і шляхи метаболізму наноламінатів після лікування. Саме встановлення фундаментальних механізмів взаємодії MXene з біологічними системами на рівні клітини та організму дозволить наблизитись до

створення ефективної протипухлинної терапії. Окрім цього, існує можливість функціоналізації поверхні MXene соєвим протеїном, наночастинками та лікарськими засобами [4]. Це відкриває можливість отримання комплексу MXene-антитіло до відповідної пухлини і розробка таргетної доставки агенту до ракових клітин, що зменшить побічну дію. На сьогодні ця можливість не реалізована, що потребує особливої уваги.

2017 року з'явилась перша публікація щодо наявності антибактеріальних властивостей MXene ( $Ti_3C_2Tx$ ) відносно *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis* [5]. Автори довели пряму ушкоджуючу дію на цілісність бактеріальної стінки, при чому Ahmad Arabi Shamsabadi et al. довели залежність ефекту від латеральних розмірів наноламінатів [6]. Останні дослідження свідчать про можливість противірусної активності відносно деяких штамів SARS-Cov2 [7]. Ті ж самі автори довели безпеку MXene відносно клітин імунної системи *in-vitro* та зменшення секреції прозапальних цитокінів. При цьому, детального аналізу взаємодії MXene з компонентами імунної системи не проводилось, що потребує додаткових фундаментальних досліджень як на рівні культури клітин, так і організму.

Зважаючи на наявність електропровідності, яка перевищує показники графену, MXene може використовуватись для створення матеріалів для стимуляції (електроди) та лікування ушкоджень нервової системи (нервові кондуїти). Попередні дослідження чітко показали наявність переваг подібних матеріалів [8]. Проте системного вивчення впливу MXene для регенеративної медицини не проводилось.

Враховуючи відсутність фундаментальних основ взаємодії MXene з біологічними системами, наразі відсутнє достовірне обґрунтування їх застосування в медичній практиці. Даний проект покликаний поглибити існуючі знання та встановити основні механізми взаємодії MXene з клітинами, імунною системою та організмом в цілому, що створить передумови для широкого застосування матеріалів для лікування найрозповсюдженіших хвороб.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Рак, як і раніше, залишається однією з основних причин захворюваності та смертності в усьому світі спричинивши тільки у 2020 році близько 10 мільйонів смертей [1]. Злоякісні новоутворення шкіри, включаючи меланому та немеланоцитарний рак шкіри, є найбільш поширеними типами раку у людей зі світлою шкірою [2]. Лікування засновується на сучасних хірургічних методах, системної хіміотерапії та таргетної терапії, що впливає на окремі сигнальні шляхи. Однак частота рецидивів, прогресування захворювання та смертності, як і раніше, залишається надто високою. Крім того, вплив ультрафіолетового світла є серйозним фактором ризику розвитку цього захворювання, а рівень впливу ультрафіолетового випромінювання, що зростає через руйнування озонового шару і зміни клімату, ще більше погіршує ситуацію [3]. Незважаючи на останні досягнення у лікуванні злоякісних новоутворень шкіри, існує необхідність заміни традиційних терапевтичних методів менш інвазивними для більш ефективного лікування раку, підвищення рівня виживання та мінімізації побічних ефектів. Метою цих нових методів є набагато більш рання діагностика раку, збереження нормальних тканин під час втручання та зменшення побічних ефектів [4]. Нещодавно розроблені підходи, що ґрунтуються на нанотехнологіях, можуть виявитися ефективними у повномувилікуванні пухлинних захворювань [5].

Близьке інфрачервоне світло (БІЧ) 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 живими клітинами та тканинами. Таким чином, серед потенційних альтернатив традиційним клінічним методам лікування локалізована фотодинамічна терапія (ФДТ) і фототермічна терапія (ФТТ) є перспективними неінвазивними підходами, що базуються на дії світла [6]. Вони засновані на присутності оптичного поглинаючого агента, відомого як фотосенсибілізатор (ФС) [7] ФДТ — це форма фототерапії, спрямована на

досягнення загибелі клітин за допомогою утворення активних форм кисню [8], в той час як ФТТ базується на утворенні тепла за допомогою фототермічного ФС, здатного перетворювати БІЧ світло у теплову енергію, викликаючи гіпертермію пухлини мінімально інвазійним способом. На сьогодні понад 500 зареєстрованих клінічних випробувань використовують підходи ФДТ та ФТТ проти різних видів раку [9]. Завдяки своїй здатності реагувати на світло, сучасні наноматеріали, такі як наночастинки золота, оксид графену, дихалькогеніди перехідних металів, чорний фосфор та деякі органічні наносистеми стали перспективними агентами як для ФДТ, так і для ФТТ [10]. У зв'язку з цим все більше набирають обертів синтез нових двовимірні наноматеріалів [11]. З моменту відкриття двовимірних карбідів, нітридів і карбонітридів перехідних металів (MXenes) в 2011 році [12] понад 30 нових наноматеріалів з різним стехіометричним складом/поверхневим хімічним складом ( $Ti_3C_2$ ,  $Ta_4C_3$ ,  $V_2C$  і т. д.), а також більш ніж 20 твердих розчинів було синтезовано і багато інших були передбачені *in silico*. MXenes відповідають загальній формулі  $M_{n+1}X_nT_x$  ( $n = 1-4$ ), де  $M$  являє собою ранній перехідний метал,  $X$  являє собою вуглець або азот, а  $T$  являє собою поверхневі кінцеві сполуки (O, -OH, галогени або халькогени) [13]. Синтез MXenes зазвичай проводять шляхом селективного травлення елементів з групи А (наприклад Al) із шаруватих керамічних попередників [14]. На додаток до вже синтезованих MXenes, багато інших розробляються, включаючи тверді розчини та системи з високою ентропією, які дозволяють маніпулювати властивостями. MXenes привернули велику увагу в галузі біомедицини та нанотехнологій через їх виняткові фізико-хімічні властивості, включаючи металеву провідність, поверхневу активність, здатність піддаватися обробці у водних розчинах та модифікації властивостей [15]. Зокрема, MXenes демонструють сильне поглинання інфрачервоного світла в межах обох БІЧ біологічних вікон. Ця особливість, разом із чудовою ефективністю фототермічного перетворення, може бути застосована в ФТТ.  $Ti_3C_2$  MXenes нещодавно привернули увагу у зв'язку з їх потенційними біомедичними застосуваннями, такими як візуалізація клітин, антибактеріальне лікування та ФТТ меланоми, через його специфічну



поверхневу активність і поглинання світла в БІЧ діапазоні [16]. Найбільш відомими MXenes для ФТТ є  $Ti_3C_2$  and  $Ti_2C$ , які демонструють високу ефективність як *in vitro*, так і *in vivo* [17]. Ультратонкі нанолісти  $Ti_3C_2$  MXene демонструють винятково високий коефіцієнт екстинкції  $25,2 \text{ л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , що вище, ніж у традиційних наностержнів Au ( $13,9 \text{ л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [18], що вказує на сприятливу властивість поглинання лазера БІЧ діапазону. Це робить їх дуже перспективними як агенти для ФТТ. Фототермічна поведінка  $Ti_3C_2$  MXene пояснюється ефектом локалізованого поверхневого плазмонного резонансу (ЛППР), подібним до ефекту, що спостерігається в наночастинках золота, що описаний як встановлений стандарт для ФТТ [19].  $Ti_3C_2$  і  $Ti_2C$  мають піки поперечного поверхневого плазмонного резонансу близько 780 та 550 нм відповідно [20]. Останні дослідження демонструють високий ефект ФТТ як від  $Ti_3C_2$ , так і від  $Ti_2C$  MXene в діапазоні БІЧ-I. Lin та співавтори виявили, що нанопласти  $Ti_3C_2$ -SP (соеві фосфоліпіди) індукують високий відсоток загибелі клітин раку молочної залози 4T1 у мишей *in vitro* і значне зменшення розміру пухлини *in vivo* після впливу лазерного випромінювання БІЧ впродовж декількох хвилин [20]. Інша група дослідників використовувала комплекси  $Ti_3C_2$ -SP та  $Ti_3C_2$ -SP-DoX (доксорубіцин) з високою протираковою ефективністю з лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 808 нм як *in vitro*, так і *in vivo* для руйнування клітин 4T1 [22]. Bai et al. використовували систему  $Ti_3C_2$ -метформін-полісахарид проти клітинної лінії раку молочної залози людини MDA-MB-231 при опроміненні лазером з довжиною хвилі 808 нм. Вони продемонстрували синергічний терапевтичний ефект ФТТ/ФДТ/хіміотерапії на пухлини та активацію імунної системи за допомогою доставки полісахаридних імуномодулюючих сполук грибкового походження [23]. Вікно БІЧ-II має переваги кращої переносимості в біологічних тканинах і набагато більш високої максимально допустимої експозиції порівняно з вікном БІЧ-I через менше поглинання та меншу енергію фотонів на більш довгих хвилях. Ge et al. порівняли дані про різні режими ФТТ і дійшли висновку, що ефект від ФТТ у вікні БІЧ-II набагато кращий, ніж у вікні БІЧ-I [24]. На сьогоднішній день все ще

недостатньо повних даних про застосування  $Ti_3C_2$  MXene у вікні БЧ-П. Модифіковані  $Ti_3C_2$  MXene, наприклад, композити  $Ti_2C_3@Au$ , продемонстрували підвищену стабільність і біосумісність і були запропоновані як наноагенти для покращеної фоторадіокомбінованої терапії з використанням вікна БЧ-П [25]. Однак, наскільки нам відомо, досі немає даних про ефективність біомедичного застосування немодифікованого  $Ti_3C_2$  у вікні БЧ-П. Концентрація фотосенсибілізуючого агента має вирішальне значення для розробки нових протоколів лікування раку. Слід враховувати баланс між токсичністю та ефективністю, приділяючи особливу увагу локальній концентрації агента ФТТ у ракових пухлинах, здорових тканинах та рідинах організму. Було проведено кілька досліджень, які продемонстрували низьку токсичність та високу біосумісність MXene  $Ti_3C_2$ . Однак у цих дослідженнях переважно використовувалися органічні чи неорганічні сполуки MXene. Liu та співавтори продемонстрували, що наноплатформа MXene-DOX не була токсичною при концентраціях до 200 мкг/мл для клітинної лінії HCT-116 [26]. Гібриди  $Ti_3C_2$ -SP та  $Ti_3C_2$ -DOX продемонстрували низьку токсичність при концентраціях до 600 мкг/мл у клітинах 4T1 [22]. Більш складні композити, такі як гідрогель целюлоза/MXene-DOX, продемонстрували низьку токсичність у клітинних лініях HepA1-6, SMMC-7721, HepG2, U-118MG та U-251MG при концентрації 313,4 ppm [27]. Жодної очевидної цитотоксичності не спостерігалося при високій концентрації, 200 мкг/мл, для  $Ti_3C_2$  MXene, навантаженого метформіном та полісахаридами [23]. Деякі дослідження продемонстрували відсутність цитотоксичності MXene-неорганічних сполук по відношенню до пухлинних клітин. MXenes, навантажені суперпарамагнітними наночастинками оксиду заліза та декоровані фосфоліпідами сої ( $Ti_3C_2$ -IONPs-SP), а також композити Au/MXene та Au/ $Fe_3O_4$ /MXene, виявляли низьку цитотоксичність навіть при високій концентрації 200 мкг/мл [28-29]. Однак Liu продемонстрував, що нанодропи  $Ti_3C_2$ -кобальт ( $Ti_3C_2$ -CoNW) і DOX@ $Ti_3C_2$ -CoNW мають сприятливу гемосумісність при концентрації 100 мкг/мл, в той час як непокрите MXenes мають більш сильну гемолітичну дію при тій самій

концентрації. Вони припустили, що цей ефект виникає через сильнішу взаємодію між негативно зарядженими  $Ti_3C_2$  і позитивно зарядженими триметиламонієвими групами біліпідного слою червоних клітин крові [30]. Зважаючи на те, що після лікування ФТТ непокриті MXenes можуть накопичуватися всередині тканин або поширюватися через кровотік, потрібно краще розуміти біосумісність  $Ti_3C_2$  MXene. Встановлення оптимальних параметрів ФТТ є важливим моментом розробки терапевтичного підходу. Основна ідея цього лікування полягає у збереженні здорових тканин при знищенні ракових клітин. На сьогоднішній день більшість досліджень демонструють ефективну терапевтичну щільність потужності в діапазоні від 1 до 2 Вт/см<sup>2</sup> при часі опромінення від 5 до 10 хв у постійному лазерному режимі [31-32].

## 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### 2.1 Синтез та характеристика MXene

$Ti_3C_2T_x$  MXene, де T означає функціональні групи -OH, O, -Cl або -F ( $T_x$  буде опущений у подальшому для простоти і буде використовуватися формула  $Ti_3C_2$ ), був отриманий за допомогою методу синтезу MILD, як описано раніше [33]. Прекурсор MAX- фази  $Ti_3AlC_2$  був синтезований у Центрі матеріалознавства (MRC), Київ, Україна, з подальшим селективним видаленням шарів алюмінію плавиковою кислотою (HF), що утворюється *in situ* у суміші солі фториду літію (LiF) та соляної кислоти (HCl) [34]. Аліквоту вологого колоїду багатошарового MXene сушили у вакуумі для вимірювання сухої маси MXene у зразку, яка, як було показано, становила 50% від маси вологої суспензії. Концентрація MXene дана як суха маса порошку. Протруєні багатошарові порошки MXene розшаровували шляхом інкубації з 50 г/л LiCl у дистильованій воді при 35°C протягом ночі, при струшуванні з подальшим повторним центрифугуванням при 1160 g (3500 об/хв) протягом 10 хв у воді для вимивання солей. Після 2-3 циклів центрифугування при зниженні концентрації LiCl MXene починав переходити в одношаровий стан, що виявлялося в потемнінні супернатанту після центрифугування та різкому збільшенні (в 10 разів) обсягу осаду MXene за рахунок його розшарування та набухання. Промитий одношаровий MXene збирали центрифугуванням при 3420 g (6000 об/хв) впродовж 90 хв. Вміст сухого MXene у вологому осаді становив близько 15 %. Розчин MXene наносили краплями на підкладки та візуалізували за допомогою електронного мікроскопа Zeiss Supra 50VP. Зображення, отримані за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM), показали, що типовий розмір пластівців MXene становить 1-3 мкм. Дифрактометр Rigaku Miniflex використовувався для рентгеноструктурних досліджень (РСД) з використанням Cu, K $\alpha$ -випромінювання та наступних умов: (i) для порошку MAX: покрокове сканування 0,02°, 2 $\theta$  = 5-90° та час кроку 1 с; (ii) для плівок MXene: покрокове сканування 0,03 °, 2 $\theta$  = 3-70 ° і час кроку 0,5 с. РСД и після розшарування

показали лише типові (001) піки MXene, що свідчить про повне видалення залишкової MAX-фази. Було доведено, що свіжоприготовлений MXene є чистим та однофазним з використанням методу РСД, як показано у допоміжній інформації (рис. S1). В остаточному зразку  $Ti_3C_2$  не спостерігалось домішок LiF, яка могла б вплинути на дані про цитотоксичність. За допомогою SEM було підтверджено, що пластівці MXene переважно одношарові (рис. S2). Отриманий матеріал був аналогічний високоякісному MXene, детально описаному в нашому попередньому дослідженні [35].

## 2.2 Клітинні культури

Для оцінки *in vitro* ефектів MXene на різні типи клітин використовували ракові та неракові клітинні лінії. Клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) і клітини епітеліального раку шлунка MKN28, що стабільно експресують онкомаркер CEACAM1 (MKN28-CEACAM1-4L), використовували, як описано [36-37]. Для отримання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини (MSC) 5 см фрагмент пуповини людини був отриманий із Сумського обласного клінічного перинатального центру після нормальних пологів з проінформованої згоди батьків відповідно до етичного висновку, виданого Комісією з біоетики в експериментальних та клінічних дослідженнях Медичного Інституту Сумського державного університету. Культуру MSC отримували із Вартонових драглей, як описано раніше [38-39]. Клітини культивували в середовищі DMEM/F12 з 10 % ембріональної бичачої сироватки, 100 ОД пеніциліну, 100 ОД стрептоміцину та 0,25 мг амфотерицину на мл. у вологій атмосфері з 5%  $CO_2$  за 37 °C.

## 2.3 Оцінка цитотоксичності MXenes *in vitro*

Клітини висівали в 96-лункові планшети з густиною клітин 10 000 клітин/ $cm^2$  (3400 клітин на лунку у випадку планшетів TPP з площею 0,34  $cm^2$  на лунку) в об'ємі 100 мкл з поживним середовищем. Наступного дня додавали 100 мкл колоїду MXene у зазначених концентраціях, приготованих у вигляді

серійних розведень у поживному середовищі для культивування клітин. Оптичну мікроскопію проводили з використанням системи візуалізації клітин Evos XI Core (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Токсичність MXene оцінювали за допомогою тесту на відновлення резазурину, як описано [40]. Цей аналіз вимірює загальну метаболічну активність клітин у культурі. Для цього до клітин додавали резазурин у кінцевій концентрації 15 мкг/мл та інкубували протягом 8 годин. Потім сто мікролітрів середовища переносили в інший 96-лунковий планшет і вимірювали оптичну щільність (поглинання) за допомогою планшет-рідера Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при 570 і 595 нм. Результати були кількісно оцінені з використанням формули методу вимірювання цитотоксичності або проліферації з використанням AlamarBlue за допомогою спектрофотометрії (BioRad Laboratories). Щоб оцінити можливість прямого автокаталітичного відновлення резазурину MXenes, MXenes змішували з резазурином у поживному середовищі для вирощування клітин та залишали стояти в інкубаторі для клітинних культур при 37°C. Використовували аналогічні планшети для тканинних культур того ж походження, що і для експериментів з клітинами, і інкубували планшети в тому ж інкубаторі для клітинних культур CO<sub>2</sub> з тими ж параметрами.

#### **2.4 Оцінка асоціації MXenes із клітинами**

Для цитологічного дослідження клітини висівали на покривні скельця у шестилункові планшети і наступного дня до клітин додавали колоїд MXene. Після 1 дня інкубації з MXene, клітини одноразово промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і фіксували PBS, що містить 4% формальдегіду, протягом 10 хв при температурі навколишнього середовища з подальшим промиванням PBS. Клітини фарбували за допомогою набору для гематологічного фарбування Leucodif 200 (Erba Lachema s.r.o., Брно, Чехія) відповідно до протоколу виробника та досліджували за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (Carl Zeiss Jena, Єна, Німеччина) зі світлопільними лінзами Plan Achrom. Для трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) тонкі (20 нм)

вуглецеві плівки наносили на Pd-сітки для TEM.<sup>41</sup> Потім сітки поміщали в 96-лункові планшети; клітини висівали і наступного дня клітини, вирощені на вуглецевих плівках, завантажували MXene та інкубували протягом 1 дня, як описано вище. Потім клітини фіксували PBS, що містить 2,5 % глутарового альдегіду, зневоднювали в етанолі в зростаючій концентрації, сушили на повітрі і двічі контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю, як описано в роботі.<sup>42</sup> Клітини оцінювали з використанням TEM-125К мікроскопу (ВАТ «Сумські електронні мікроскопи», м. Суми, Україна) при розмірі плями 0,5 мкм та напрузі 90 кВ.

## 2.5 Фототермічний ефект

Клітини висівали в 96-лункові планшети з концентрацією 10 000 клітин/см<sup>2</sup> у 100 мкл поживного середовища для культивування клітин. Наступного дня додавали 100 мкл MXene у зазначених концентраціях, розведених у поживному середовищі. Через 24 години інкубації клітини опромінювали імпульсним Nd:YAG-лазером з довжиною хвилі 1064 нм на косметологічному лазерному устаткуванні EvoLINE-1 (Solar Laser Systems). Були використані такі параметри опромінення: щільність потужності 3,1 Дж/см<sup>2</sup>, тривалість імпульсу 200 мс, частота імпульсів 1 Гц, діаметр пучка 22 мм і зазначений час опромінення. Відстань від випромінюючого кінця лазера до пластини була стандартизована пластиковим прицілом довжиною 5 см, прикріпленою до випромінюючого кінця як частина обладнання (S3A). Оптимальні параметри було отримано з емпіричних випробувань до проведення експериментів. Експерименти проводились у чотириразовій повторності, при цьому чотири сусідні лунки опромінювалися одночасно, а інші лунки закривалися екраном з білого картону з квадратним отвором 19×19 мм<sup>2</sup> (рис. S3B). Щоб запобігти впливу температури між сусідніми групами лунок у чотирьох примірниках після опромінення, вони були розділені порожніми лініями/рядками (рис. S3C). Температуру опромінених ділянок контролювали за допомогою інфрачервоної камери Walcom HT-04 (рис. S4). Життєздатність

клітин вимірювали за допомогою тесту на відновлення резазурину, як описано вище у розділі оцінки клітинної токсичності.

## **2.6 Оцінка безпеки фототермічної обробки MXenes in vivo.**

Дорослих білих лабораторних щурів масою 180-200 г отримано із віварію Медичного інституту Сумського державного університету. Тварин було розміщено при температурі  $22 \pm 2$  °C з 12-годинним циклом світло/темрява з вільний доступ до їжі та води. Кожна тварина знаходилася в окремій клітці. Експерименти з лабораторними тваринами проводилися відповідно до Директиви 2010/63/ЄС Європейського Парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року щодо захисту тварин, які використовуються в наукових цілях. Дизайн дослідження схвалено Комісією з біоетики в експериментальних та клінічних дослідженнях (Інституційна наглядова рада) Медичного інституту Сумського державного університету. Тварин анестезували відповідними дозами кетаміну та ксилазину. Ділянку шкіри в міжлопатковій ділянці вибривали і щурам підшкірно вводили розчин MXene в PBS з концентрацією MXene 11,25 мкг/мл в об'ємі 0,1 мл з використанням інсулінового шприца з голкою 31 калібру довжиною 12,7 мм. Контрольним тваринам вводили відповідну кількість PBS. Наступного дня після ін'єкцій, зони, в які робилися ін'єкції, опромінювали імпульсним лазером з довжиною хвилі 1064 нм з тими ж параметрами, які використовувалися для експериментів in vitro (щільність потужності  $3,2$  Дж/см<sup>2</sup>, тривалість імпульсу 200 мс, частота імпульсів 1 Гц, діаметр пучка 22 мм) та тривалістю опромінення 60 с. Було сформовано чотири групи тварин: PBS, PBS/лазер, MXene та MXene/лазер. Тварин забивали шляхом декапітації тварин, під дією седативних засобів (70 мг/кг кетаміну), через 3, 7, 14 та 28 днів після опромінення. Зразки шкіри, печінки, селезінки, нирок, серця, легень та сечового міхура були взяті для подальших аналізів.



## **2.7 Гістологічна оцінка впливу MХenes та лазерного лікування на шкіру**

Зразки шкіри фіксували у 10% нейтральному забуференому формаліні. Для обробки тканин використовувалися стандартні процедури, що включають зневоднення спиртами з наступною заливкою парафіном. З отриманих парафінових блоків робилися зрізи завтовшки 4 мкм, фарбували гематоксиліном та еозином (ГЕ) за стандартними протоколами та оглядали за допомогою світлового мікроскопа Leica. Для оцінки потенційної токсичності введених MХenes та можливих ефектів лазерного опромінення було проведено оцінку уражень шкіри. Запальну реакцію оцінювали напівкількісно за наступною шкалою: 1 – легка; 2 – помірний та 3 – важка інфільтрація поліморфноядерними (ПМЯ) лейкоцитами та макрофагами. Оцінюючи поширення запальної реакції оцінювали уражений шар шкіри. Такий самий підхід застосовувався в оцінці відновлення шкіри шляхом оцінки грануляції тканини на місці втручання. Крім того, оцінювали придатки шкіри, такі як волосяні фолікули, що несуть епідермальні стовбурові клітини, в області опуклості, беручи до уваги функції циклу росту волосся та архітектуру шкіри. Останній оцінювали за відомими фазами циклу волосся (анаген, катаген, телоген) за морфологічними ознаками та глибиною залягання волосяних цибулин.

## **2.8 Гістологічна оцінка органів-мішеней**

Зразки тканин поміщали в гістологічні касети (ЕКА, Україна) та фіксували у нейтральному 10% розчині формаліну впродовж 24 годин. Після цього їх зневоднювали та заливали парафіном за допомогою автоматичного тканинного процесора АТ1010 (СЕО, Україна) згідно з інструкцією виробника. Серійні зрізи товщиною 5 мкм були виготовлені з тканин, залитих парафіном, з використанням ротаційного мікротому Shandon Finesse 325 (Thermo Fischer Scientific) і поміщені на предметні скельця, покриті 3-амінопропілтріетоксисіланом (Thermo Fischer S.). Після витримки в термостаті

при 50°C протягом ночі, зразки тканин депарафінізували та регідратували в серійних концентраціях спирту та ксилолу. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином перед установкою на кріплення Aqua-Mount (Thermo Fischer Scientific).  
Всі гістопатологічні дослідження проводилися з використанням мікроскопа Carl Zeiss Primo Star із цифровою камерою Zeiss AXioCam ERC 5s та пакетом програм ZEN 2 (blue edition, Німеччина).

### 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1 Токсичність МХenes

МХenes, як правило, не були токсичними і добре переносилися клітинами. Однак при концентраціях 96 мкг/мл або, починаючи з 24 мкг/мл у пізніші моменти часу, МХене викликав поступове припинення проліферації клітин, зміну морфології та погіршення зовнішнього вигляду (рисунок 3.1 А, D). МХenes мали тенденцію концентруватися на клітинах після першого дня інкубації, а не утворювати рівномірний осад на дні лунок (рисунок 3.1 В, Е). Клітини з МХenes ставали темнішими і ставали практично непрозорими при найвищих концентраціях МХене (48-96 мкг/мл) після другої доби. Клітини виявилися повністю покритими МХenes, які концентруються та прикріплюються до клітин. Вищі концентрації МХене були пов'язані з нижчою щільністю клітин.

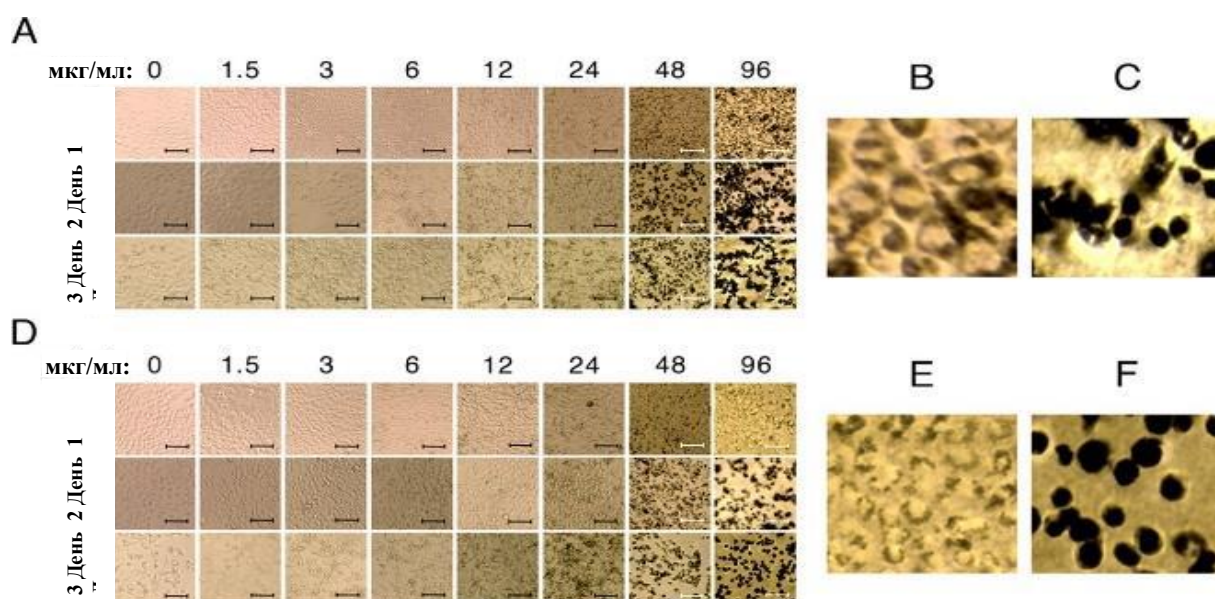


Рисунок 3.1 – Взаємодія МХене-клітина та цитотоксичність МХenes, вивчена за допомогою оптичної мікроскопії:

(А, D) МХenes у клітинах СНО та мезенхімальних стовбурових клітинах пуповини людини відповідно. (В, С) Збільшені фрагменти зображень з максимальною концентрацією МХене (96 мкг/мл) у клітинах СНО в 1-й та 3-й дні відповідно. (Е, F) Збільшені фрагменти зображень з максимальною концентрацією МХене (96 мкг/мл) у клітинах МСК в 1-й та 3-й дні відповідно. Шкала = 100 мкм.

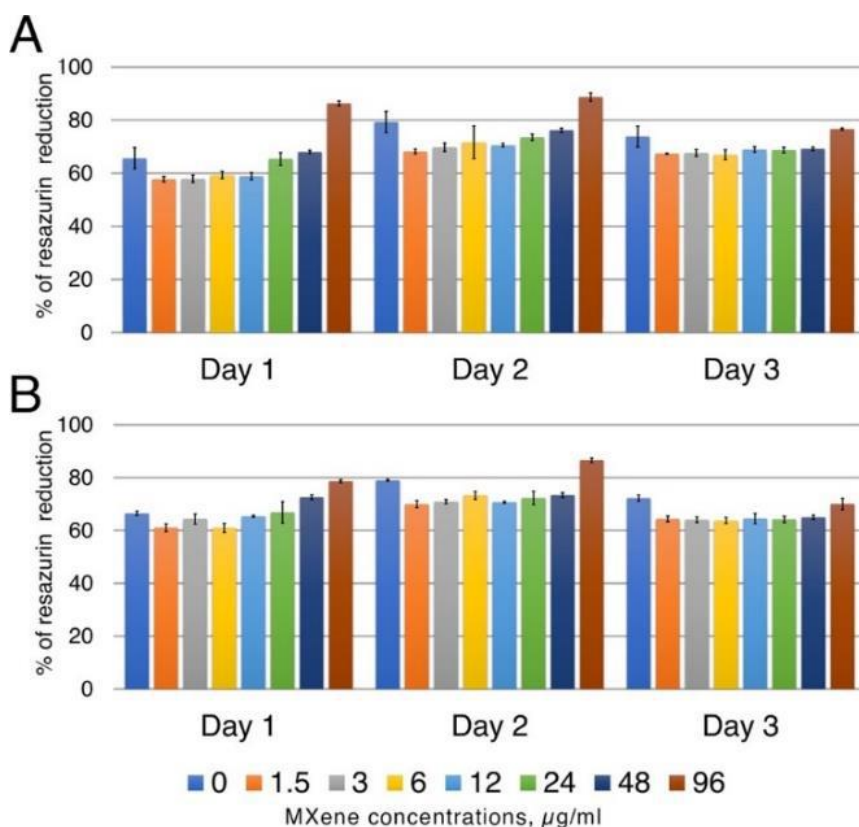


Рисунок 3.2 – Цитотоксичність МХене вивчена за допомогою тесту на відновлення резазурину: (А) Мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини, інкубовані з різними концентраціями МХенес у різний час. (В) Той самий експеримент із клітинами яєчника китайського хом'ячка (СНО) (відсоток відновлення резазурину представляє цитотоксичність МХенес і можливе автокаталітичне відновлення разом).

Токсичність МХене додатково оцінювали за допомогою аналізу відновлення резазурину як у клітинах MSC, так і в клітинах СНО (рисунок 3.2). Як і при спостереженні за допомогою оптичного мікроскопа, клітини переносили присутність МХене у широкому діапазоні концентрацій. Однак при високих концентраціях (12-24 мкг/мл і вище) показання тесту відновлення резазурину парадоксально зростали. Цікаво, що ці показання досягли рівня навіть вище, ніж у контрольних (необроблених) клітин, наприклад, 96 мкг/мл. Однак при цих концентраціях клітини були пошкодженими при дослідженні під світловою мікроскопією. Крім того, кількість клітин була нижчою, ніж у лунках з контрольними клітинами без МХене. Ми дійшли висновку, що на аналіз відновлення резазурину може впливати присутність самих МХенес, навіть якщо

метаболічно активні клітини не беруть участь. Це спонукало нас досліджувати відновну активність MXenes щодо резазурину у поживному середовищі без клітин.

### **3.2 Пряме (автокаталітичне) відновлення резазурину MXenes**

Щоб пояснити, як можливі підвищені показання тесту відновлення резазурину при явно меншій кількості клітин та їх порушеній морфології (а отже, зниженій метаболічній активності), ми поставили простий експеримент з резазурином у присутності MXene з концентраціями від 0,1 до 114 мкг/мл середовищі культивування клітин без клітин. Ми спостерігали помітне зниження резазурину лише після 24 годин інкубації при 37°C і лише за найвищих концентрацій MXene (рисунок 3.3). Однак ступінь відновлення резазурину був значно нижчим, ніж у присутності клітин. Тільки при тривалій інкубації до 5 діб і тільки при найвищих концентраціях MXene рівень відновлення резазурину досягав рівня, порівнянного з рівнем, що досягається метаболічно активними клітинами всього за кілька годин. Тим не менш, навіть тоді показання були нижчими, ніж рівні, отримані при найвищих концентраціях MXene у присутності клітин, хоча і з порушеним зовнішнім виглядом.

Ми дійшли висновку, що клітини з порушеною морфологією можуть активувати процес відновлення резазурину самими MXene за механізмом, відмінним від відновлення внутрішньоклітинними метаболічними шляхами в живих клітинах. Ми припустили, що клітини, що вмирають і лізуються, могли вивільняти речовину, яка могла сприяти прямому відновленню резазурину під дією MXene. Нами була спроба інкубувати резазурин в середовищі в присутності MXene з додаванням клітинного лізату, отриманого в результаті двох циклів заморожування-відтаювання клітин в поживному середовищі. Тим не менш, ми не спостерігали будь-якого посилення рівня відновлення резазурину клітинними лізатами (не показано).

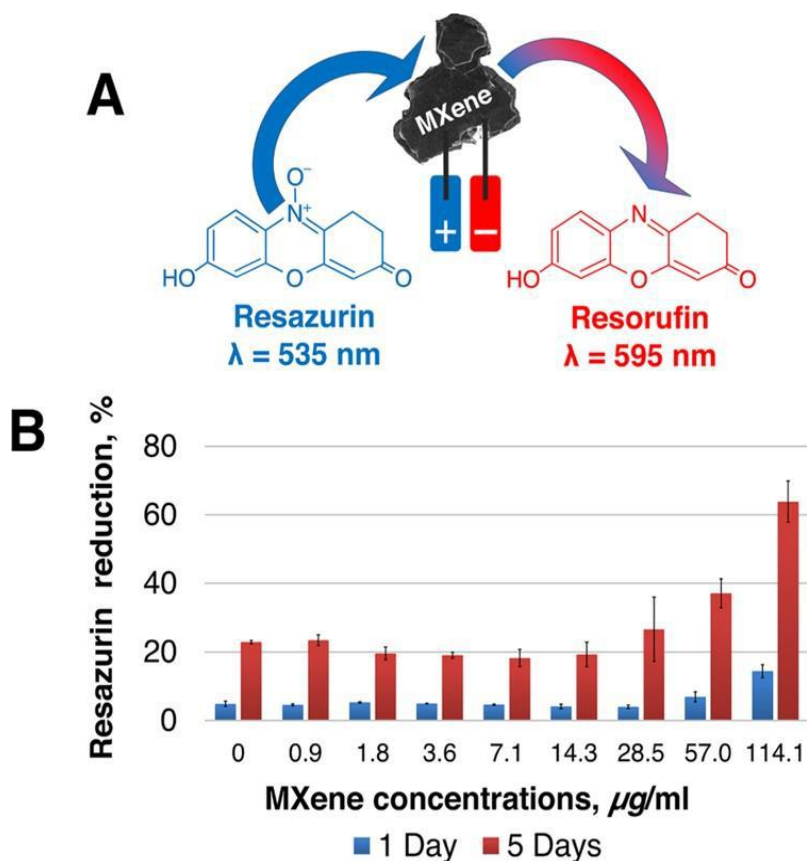


Рисунок 3.3 – MXenes можуть відновлювати резазурин безпосередньо у поживному середовищі без присутності клітин. (A) Схема автокаталітичного відновлення резазурину до резорурфіну за допомогою MXene. (B) Відновлення резазурину в присутності різних концентрацій MXene у безклітинному поживному середовищі

### 3.3 Асоціація MXenes із клітинами

MXene був виявлений у вигляді темних включень після фарбування мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини (рисунок 3.4 А-Ф). Як і у разі спостереження MXene під мікроскопом у живих клітинах (рисунок 3.1), частинки MXene мали тенденцію концентруватися на клітинах та асоціюватися з ними. Більш того, MXenes утворювали відносно великі агрегати, що добре видно під світловим мікроскопом. Ступінь агрегації залежав від концентрації MXene. Агрегати MXene були тісно пов'язані з клітинами, оскільки вони витримували суворі процедури промивання, фіксації та фарбування. Точна локалізація MXene усередині/на клітинах в даний час досліджується. Двовимірні



пластівці МХене, пов'язані з клітинами, також були візуалізовані за допомогою трансмісивної електронної мікроскопії. Для цього клітини СНО навантажували МХене протягом 1 дня і промивали PBS з наступними процедурами дегідратації та контрастування. МХене мав вигляд «розбитої шибки» (рисунок 3.4 Н-Ж). Дрібні клітинні структури було видно, як темні плями. Точне місцезнаходження МХенес усередині/на клітинах ще належить визначити. Однак ми дійшли висновку, що МХенес були тісно пов'язані з клітинами, оскільки вони чинили опір жорстким процедурам фіксації, зневоднення та контрастування.

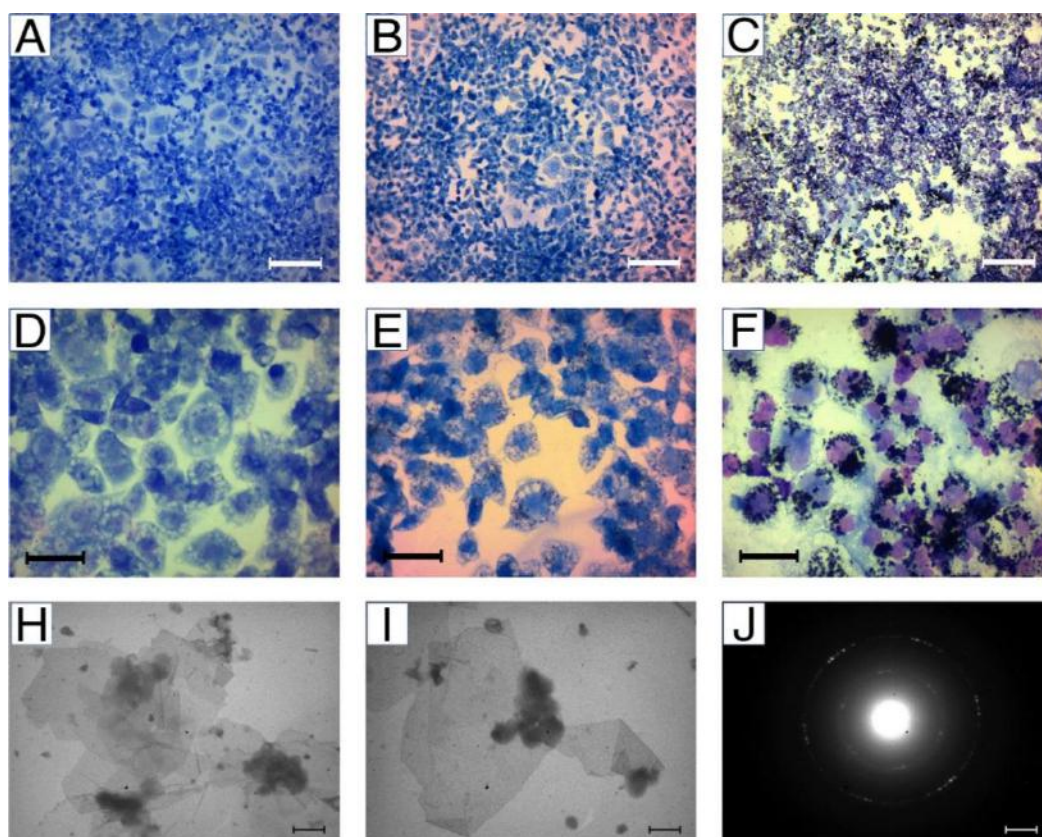


Рисунок 3.4 – Зображення оптичної та електронної мікроскопії, що показують асоціацію МХенес з мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини людини (клітинне поглинання МХене): (А-F) Цитологічне фарбування: (А, D) контрольні клітини, (В, Е) клітини, навантажені МХене у концентрації 0,75 мкг/мл, та (С, F) клітини, навантажені МХене у концентрації 6,75 мкг/мл. (Н-Ж) Трансмісивна електронна мікроскопія 2D пластівців МХене у клітинах СНО: (Н, I) пластівці МХене видно як напівпрозорі листи, що частково перекриваються. (J) зображення електронної дифракції, що підтверджує, що об'єкт дослідження має періодичну структуру. (А-С) Масштабні лінійки = 200 мкм, (D-F) масштабні лінійки = 50 мкм та (Н-Ж) масштабні лінійки = 1 мкм

### 3.4 Фототермічний ефект імпульсного лазера

MXenes In Vitro. Фототермічний ефект MXene Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> через опромінення лазером контролювали інфрачервоною камерою (рис. 5). Опромінення призводило до сильного підвищення температури в лунках з опроміненими культурами клітин. Таке підвищення залежало як від часу впливу, і від концентрації MXene. Хоча в контрольних лунках без MXene температура підвищувалася, фактичне підвищення температури у лунках, що містять MXene, було значно вищим (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1 – Дані фототермічного перетворення, отримані шляхом вимірювання розподілу температури інфрачервоною камерою, як показано на рисунку 3.5а.

Концентрація MXene (мкг/мл)	Час експозиції (с)	Температура (°C)		
		початок	кінець	$\Delta T$
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
	40	34.7	44.1	9.4
3.75	60	38.4	53.6	15.2
	80	40.6	60.2	19.6

Понад те, вона залежала від концентрації. Таким чином, підвищення температури продемонструвало фототермічний ефект MXene при опроміненні імпульсним лазером із довжиною хвилі 1064 нм залежно від концентрації та дози. Клітини змінили свою морфологію та метаболічну активність при лазерному опроміненні (рисунок 3.6). Метаболічну активність клітин контролювали за допомогою аналізу відновлення резазурину. Типові зображення, що демонструють перетворення резазурину на резорурфін живими клітинами, показані на малюнку S4. Ефекти сильно залежали від концентрації MXene та часу дії. При короткому часі опромінення (40 с) клітини з високою концентрацією MXene (3,75 мкг/мл) різко змінили зовнішній вигляд і набули



типової округлої морфології вмираючих клітин (рисунок 3.6А). Це було підтверджено низькими показниками відновлення резазурину, що відображає втрату їх метаболічної активності (рисунок 3.6В). Збільшення часу експозиції до 60 с призводило до подібних змін як морфології, так і метаболічної активності в клітинах з низькою концентрацією МХене (0,75 мкг/мл). Присутність МХене у кінцевих робочих розчинах поживного середовища при цій концентрації (0,75 мкг/мл) була ледь помітна на вигляд контрольного середовища. Цікаво, що після цього часу впливу і високої концентрації МХене клітини виглядали так, ніби вони були інтактними проліферуючими клітинами, хоча вони не були метаболічно активними.

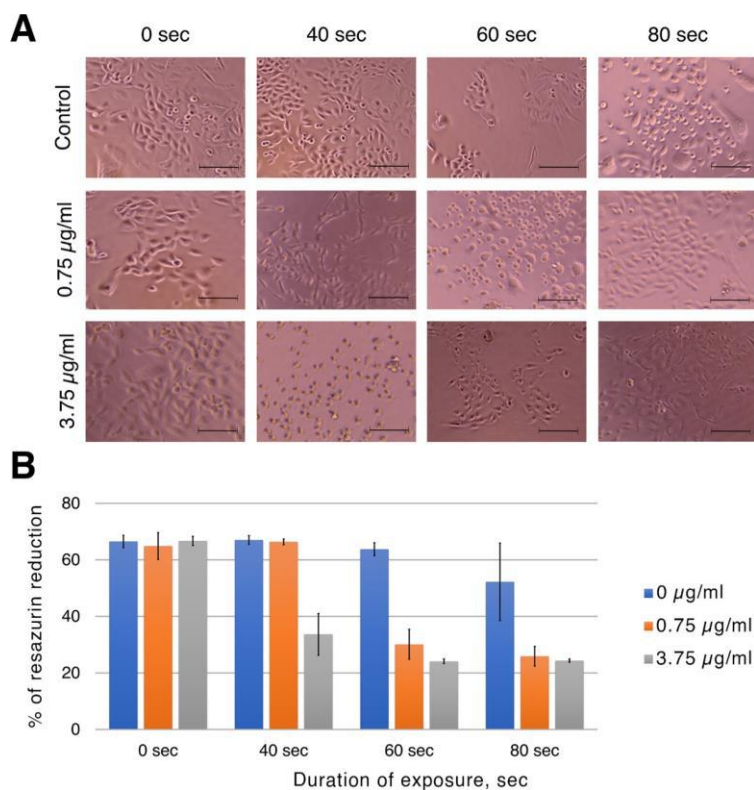


Рисунок 3.6 – Оцінка фототермічного ефекту у клітинах CHO з  $Ti_3C_2$  МХене за допомогою світлової мікроскопії (А) та аналізу відновлення резазурину (В). Використовували дві різні концентрації МХене (0,75 та 3,75 мкг/мл) та різний час впливу лазерного випромінювання (0, 40, 60 та 80 с). Шкала = 100 мкм.

Ці клітини не змінили свій «нормальний» зовнішній вигляд при тривалому спостереженні в інкубаторі для культивування клітин та не виявляли жодної проліферативної активності (не показано). Ми дійшли висновку, що ці клітини були миттєво знищені високою лазерною енергією, поглиненою MXene, та їх шляхи апоптозу були інактивовані. Ми назвали це явище "термофіксацією" клітин. З іншого боку, на контрольні клітини (без MXene) суттєвий був тільки лазерний вплив при найвищому часі (80 с). При такій експозиції як низькі, так і високі концентрації MXene призводили до того, що клітини виглядали як фіксовані, без метаболічної активності, зображеної в тесті на відновлення резазурину (рисунок 3.6В). Цікаво, що помірно уражені клітини, що мають округлу форму (3,75 мкг/мл-40 с; 0,75 мкг/мл-60 с), виявляли деяку метаболічну активність відразу після обробки, але втрачали її наступного дня. Ми дійшли висновку, що ці клітини отримали критичне ушкодження, що викликало програму апоптозу, яка поступово виконувалася протягом кількох годин після опромінення. Проте, деякі клітини в контрольних опромінених лунках (0 мкг/мл 80 с) також набували округлої форми; проте наступного дня вони повернулися до звичного метаболічно активного стану. Ми дійшли висновку, що ці клітини зазнали впливу опромінення, але доза не досягла критичного значення, щоб викликати масивний апоптоз. Ми підтвердили фототермічний ефект імпульсного лазера з MXene на інших клітинних лініях, включаючи ракові клітини (рисунок 3.7). Як з клітинами епітеліального раку шлунка MKN28-SEACAM1-4L (рисунок 3.7А), так і з мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини людини (рисунок 3.7В) ми спостерігали ефекти, подібні до таких у разі клітин СНО. В цілому, це показало, що імпульсний лазер 1064 нм має потенціал для розвитку терапевтичного лікування з використанням фототермічного ефекту.

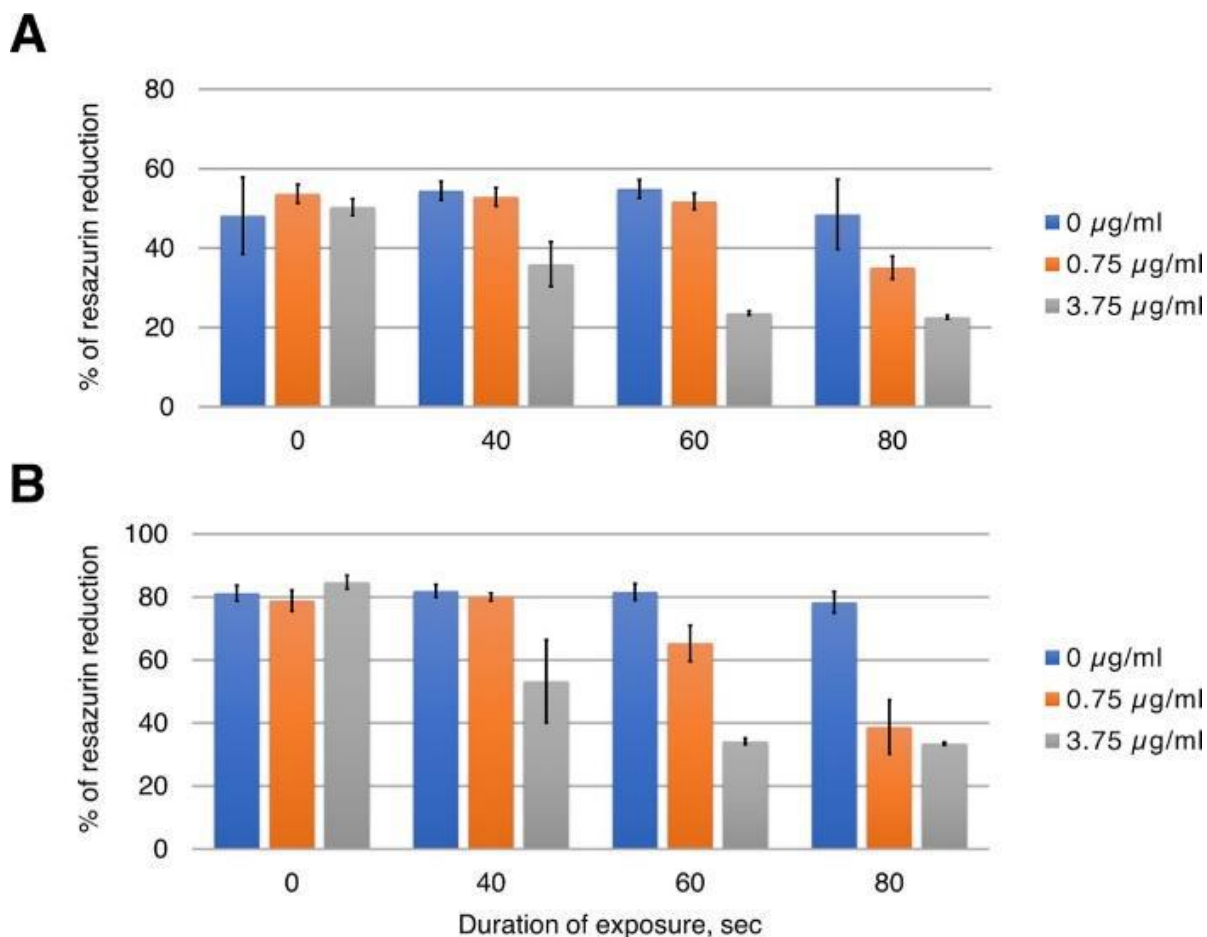


Рисунок 3.7 – Оцінка фототермічного ефекту на клітини раку шлунка MKN28-SEACAM1-4L (A) та на мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини (B) з  $Ti_3C_2$  MXene за допомогою аналізу відновлення резазурину. Концентрації MXene становили 0, 0,75 та 3,75 мкг/мл, застосовували лазерне опромінення протягом 0, 40, 60 та 80 с.

### 3.5 Локальні ефекти ін'єкції MXene

БІЧ лазеру на тканині шкіри *in vivo*. Оцінка тканини шкіри щурів через 3 дні після лікування виявила мінімальні структурні зміни в місці введення MXene, які можна порівняти з такими в контрольній групі. Спостерігалася легка запальна реакція, більш виражена у глибших шарах, між дермою та гіподермою. Поєднаний вплив MXene з лазерним впливом супроводжувався додатковою легкою зміною сосочкового шару дерми нахталт сонячного еластозу та легким гіперкератозом. При цьому в місці втручання та сусідніх ділянках спостерігалася редукція волосяних фолікулів, що свідчило про перехід у стадію катагену.

Примітно, що аналогічні зміни з'явилися в контрольній групі, що зазнала впливу лазерного випромінювання (рисунок 3.8).

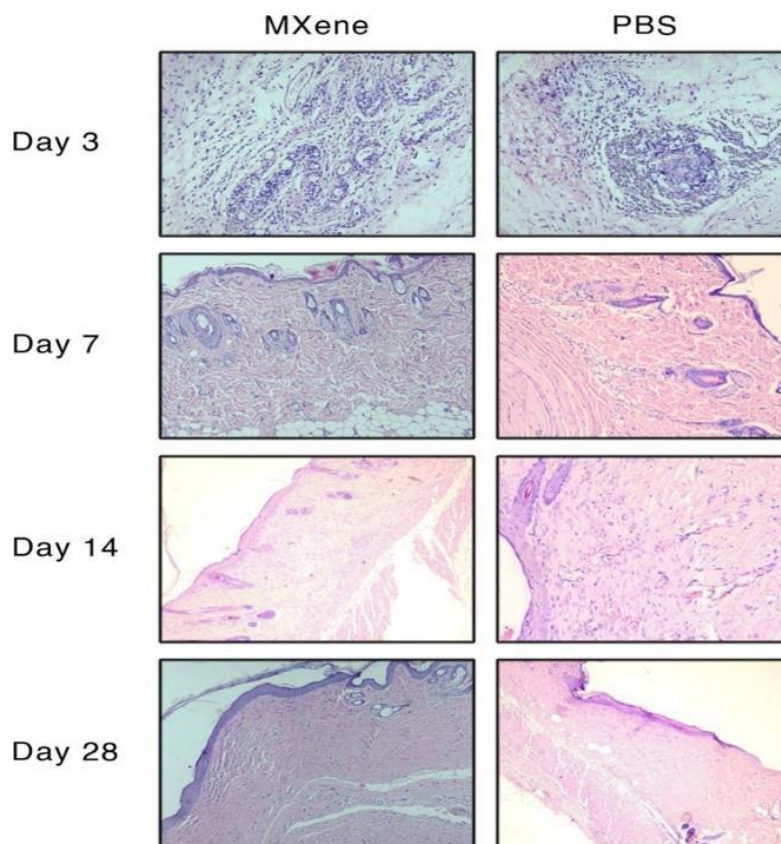


Рисунок 3.8 – Ін'єкції MXene у шкіру щура (n=6 на групу) з подальшим лазерним опроміненням. Знімки зліва демонструють динаміку структурних змін шкіри після ін'єкції MXene та лазерного опромінення, а праворуч – те саме в контрольній групі. Відмінностей у тканинах шкіри між двома групами не спостерігалось. У ранні терміни спостерігалася легка запальна реакція як у поверхневих, так і в глибоких шарах дерми та зменшення волосяних фолікулів.

Надалі у місці ін'єкції формувався локальний рубець, а відновлення гістоархітекτονіки у прилеглих зонах лазерного опромінення спостерігалось через 14 днів після експерименту.

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

тканини та вrostанням судин, яке тривало до 14-ї доби. Область втручання була покрита епідермісом і демонструвала відсутність волосяних фолікулів, хоча в сусідній опроміненій ділянці спостерігалася індукція анагену зі швидким відростанням фолікулів, що досягають глибоких шарів дерми та гіподермального шару. Через 7 діб після втручання на місці ін'єкції виявлено невеликий рубець із повним відновленням оточуючих тканин шкіри. Ці особливості були виявлені як у групах MXene + лазер, так і в групах PBS + лазер. Товщина шкіри в ділянках рубців, утворених колагеновою сполучною тканиною, була зменшена в порівнянні з прилеглою шкірою за рахунок відсутності шкірних придатків. Таким чином, не було специфічних змін або імуногенних реакцій у шкірі щурів після лікування MXene+лазером, що свідчить про безпеку цього втручання для нормальних тканин. Місцева запальна реакція у місці ін'єкції у зразку зменшилася на 7-й день внаслідок ремоделювання шкіри та утворення рубця у місці ін'єкції. Тимчасова незначна зміна поверхневих шарів шкіри та індукована фаза катагену волосяних фолікулів можуть бути інтерпретовані як дія лазера. У сукупності ці результати демонструють безпеку лікування підшкірною ін'єкцією MXene з наступним імпульсним опроміненням БІЧ-лазером із довжиною хвилі 1064 нм.

### **3.6 Локальні ефекти ін'єкції MXene**

Ми оцінили можливий вплив MXene на органи-мішені, зокрема на печінку, нирки, серце, селезінку, легені та сечовий міхур, через 3, 7, 14 та 28 днів після підшкірного введення MXene та лазерного опромінення. У всіх експериментальних групах змін не зареєстровано, що свідчить про безпеку комбінованого лікування MXene та впливом БІЧ-лазера (рис. 3.9). Ми дійшли висновку, що комбіноване лікування підшкірними ін'єкціями MXene та опроміненням імпульсним лазером NIR 1064 нм не викликає виражених патологічних змін у різних органах та тканинах експериментальних варин.



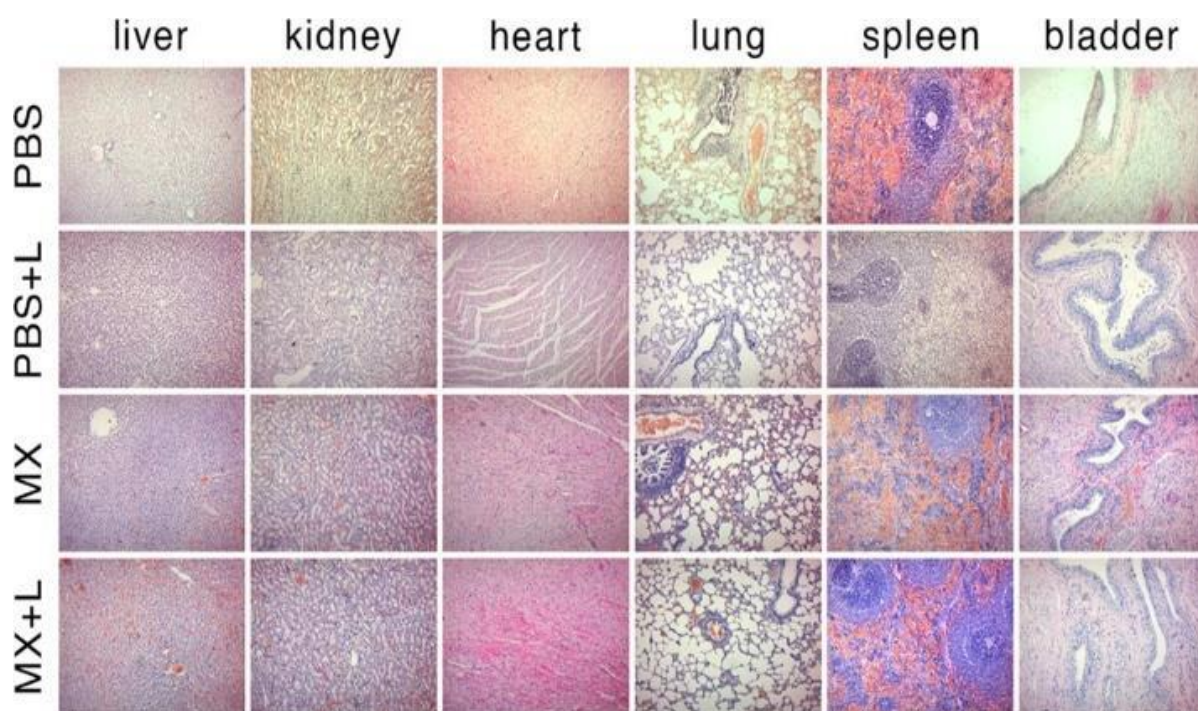


Рисунок 3.9 – Гістологічна панель внутрішніх органів через 28 днів після ін'єкції MXene та лазерного впливу (дані для 3, 7 та 14-денних часових точок представлені на малюнку S7). MX, MXene; L, лазерне опромінення (представник п'яти незалежних повторів аналізу). n = 6 на групу.

## 4 ОБГОВОРЕННЯ

MXenes різного складу і структури, як правило, виявляють достатню біологічну сумісність [43]. У цьому дослідженні Ті С Т MXene добре переносився як нормальними, так і раковими клітинами *in vitro*. Природа взаємодії MXene-клітина все ще потребує подальших досліджень. Однак пластівці MXene мають тенденцію локалізуватися разом із клітинами у клітинних культурах. Це вказує на те, що може бути задіяна або активна клітинна функція розпізнавання MXene, або будь-яка інша неспецифічна взаємодія. Негативно заряджені одношарові пластівці MXene утворюють стабільну колоїдну дисперсію. Проте у присутності білків вони схильні утворювати з ними асоціації, в основному за рахунок електростатичних взаємодій, що призводить до зміни  $\zeta$ -потенціалу MXenes [44], а це, в свою чергу, може вплинути на стабільність частинок в колоїдному сенсі [45]. Поживне середовище для культивування клітин містить велику кількість різних білків, зокрема, 10 % фетальної бичачої сироватки, яка, у свою чергу, може містити до 80 мг/мл білків [46]. Отже, в культуральному середовищі пластівці MXene можуть поглинати значну кількість білків. Стабільність MXenes у розчині з білками вимагає подальшого вивчення, але ми припускаємо, що одношарові пластівці MXene поступово агрегують з білками в поживному середовищі для клітинних культур та випадають у осад. Всі клітини, які ми використовували, були адгезивними клітинами, які прикріплювалися до дна лунок у планшеті для культивування клітин. Це призводить до їхнього тісного контакту із частково агрегованими MXenes. Більш того, зважаючи на здатність MXene поглинати білки, частково агреговані MXenes можуть мати внутрішню (електростатичну) спорідненість до клітин, оскільки клітинна поверхня містить багато білків та білкових структур. Це може пояснити утворення сферичних структур навколо клітин, що спостерігаються після інкубації з MXenes (рисунок 1В, Е). Цей механізм, однак, не виключає активного накопичення MXenes клітинами, наприклад,

шляхом ендоцитозу. Крім того, MXenes можуть утворювати асоціації з компонентами позаклітинного матриксу, оскільки було показано, що MXenes схильні до утворення білкових корон і, отже, можуть утворювати агрегати за цим механізмом [47]. Чи мають клітини, використані в цьому дослідженні, будь-які рецептори, які могли б специфічно розпізнавати MXenes, все ще вимагає подальших досліджень. Після безперервної інкубації з великою кількістю MXenes процес накопичення MXene на клітинах призводив до появи клітин, видимих як непрозорих темних структур сферичної форми. Надмірне накопичення MXene на клітинах призводило до зменшення кількості клітин. Вони також набули ненормального вигляду. Чи можуть ці клітини, як і раніше, виявляти якусь проліферативну та метаболічну активність у довгостроковій перспективі, ще вимагає подальшого докладного вивчення і є предметом нашого наступного дослідження. Однак з нашого попереднього досвіду клітини, вкриті великою кількістю MXene, втрачають свою життєздатність і не відновлюють проліферацію після тривалої інкубації (не показано). Біосумісність та цитотоксичність біоматеріалів зазвичай вимірюють в аналізах *in vitro* у клітинних культурах, наприклад, для оцінки загальної метаболічної активності клітин. Серед них часто використовуються аналіз MTT [48] та тест на відновлення резазурину [49], також відомий як аналіз AlamarBlue (BioRad Laboratories, Hercules, CA) [50]. Обидва аналізи засновані на відновлювальній активності мітохондріальних NAD(P)H-залежних оксидоредуктазних ферментів у життєздатних клітинах, які відновлюють жовту сіль тетразолію та синій барвник резазурин до пурпурових кристалів формазану та розчинного розуфіну відповідно. Кількість формазану або резоруфіну, що утворився, пропорційно кількості життєздатних, метаболічно активних клітин і вимірюється за допомогою оптичного поглинання або флуоресценції. Однак, повідомлялося про помилки при оптичному зчитуванні при використанні цих аналізів з наноматеріалами, такими як вуглецеві нанотрубки [51]. Ці потенційні похибки слід брати до уваги, щоб уникнути помилок під час інтерпретації даних. При відносно



низьких концентраціях MXene виявлялася незначна токсичність. Це відповідало іншим звітам, які продемонстрували чудову біосумісність MXenes [52]. За попередніми спостереженнями, при концентраціях нижче 1 мкг/мл MXene не зазначалося помітної токсичності (не показано). Ми прагнули оцінити токсичність MXene у широкому діапазоні концентрацій та спостерігали досить нетрадиційну поведінку динаміки токсичності MXene (рисунок 3.2). Зазвичай очікується типова сигмоподібна залежність доза-реакція. Фактично, ми виявили помітне зниження життєздатності клітин вже при найнижчій концентрації MXene (1,5 мкг/мл). Однак при збільшенні концентрації MXene показники резазурину залишалися на колишньому рівні і навіть починали підвищуватись при концентраціях 12 мкг/мл та вище. Ми припускаємо, що показники тесту на відновлення резазурину, який вимірює загальну метаболічну здатність клітин у культурі, можуть збільшуватися через відновлювальну здатність MXene, а не через біологічне відновлення резазурину живими клітинами. Це стає очевидним при високих концентраціях MXenes. Звіти інших груп, що вивчають токсичність MXenes, також зазвичай показують відсутність типової сигмоподібної залежності доза-реакція (наприклад, посилання [53-55]). Таким чином, клітини HaCat з MXene  $Ti_3C_2$  [53] показали помітне зниження життєздатності при збільшенні концентрації MXene від 0 до 1 мкг/мл. Однак подальше збільшення концентрації MXene до 10, а потім до 125 мкг/мл парадоксально не призвело до подальшого зниження показників МТТ. І тут для оцінки цитотоксичності використовували метаболічний аналіз МТТ. Проте аналіз МТТ по суті ґрунтується на аналогічному метаболічному відновленні кольорового субстрату що і резазурин, який використовується у нашому дослідженні. Зверніть увагу, що концентрація MXene у колоїді, яка використовується в нашому дослідженні, була визначена шляхом фільтрації та вимірювання сухої маси відкладення MXene, що може мати точність близько 10% через втрату найдрібніших частинок та води, захопленої між листами MXene. Хоча дослідні документи, що повідомляють про біомедичні дослідження з MXenes,

зазвичай не вказують, яким чином концентрація MXenes визначалася в їх дослідженнях. Jastrzebska та ін. повідомляли про контроль цитотоксичності MXenes, наприклад, шляхом поверхневого окиснення  $Ti_3C_2T_x$ . [56] Ми спробували дослідити які саме поверхневі групи (ОН, F, та інш.) якщо такі є, насамперед відповідальні за токсичний ефект MXenes у високих концентраціях. Ми припустили, що це можуть бути кінцеві сполуки фтору, які можуть гідролізуватися з утворенням HF, або сліди фтору після процедури травлення. Ми ретельно промили суспензію MXene лугом, щоб видалити будь-які кислотні залишки та слабо зв'язаний фтор, але не спостерігали будь-яких змін у токсичності очищених лугом MXenes (не показано). Ми припускаємо, що токсичність MXenes може бути пояснена їх неспецифічною механічною обструкцією та проникненням у клітини, а не їхньою специфічною біохімічною токсичністю. Аналіз опублікованих робіт з лікування раку ФТТ за допомогою лазерів БІЧ-I та БІЧ-II показав, що попередні експериментатори явно використовували опромінення безперервними лазерами. Переважно використовувався MXenes типу  $Ti_3C_2$ , також вивчалися MXenes  $Nb_2C$  та  $Ta_4C_3$  [57-63]. Примітно, що у всіх перерахованих дослідженнях використовувалися MXenes, що модифіковані різними сполуками для підвищення їхньої біологічної сумісності та ефективності. Тим не менш, не повідомлялося про пряме порівняння характеристик ФТТ ефекту різних MXenes. Більшість опублікованих експериментів з ФТТ були виконані з використанням безперервної лазерної дії з щільністю енергії від 1 до 1,5 Вт/см<sup>2</sup> і часом опромінення 5-10 хвилин (наприклад, посилення 27, 57). Сумарна енергія опромінення у цих дослідках досягала 900 Вт/см<sup>2</sup>. Тим часом у наших експериментах з імпульсним лазером частота становила 1 імпульс (200 мс) за секунду, а щільність потужності – 3,1 Дж/см<sup>2</sup>. Сумарна енергія опромінення становила від 24,8 до 49,6 Вт/см<sup>2</sup> за час експозиції 40-80 с. Це говорить про те, що енергія, необхідна для ефективного ФТТ ефекту за допомогою імпульсного лазера, може бути суттєво знижена, що обіцяє кращий рівень виживання оточуючих здорових

тканин та клітин. В цілому, імпульсні лазери мають перевагу за більшою кількістю параметрів для оптимізації процесу, наприклад, кількість імпульсів, тривалість імпульсів, пікова щільність потужності, час паузи між імпульсами і т. д. У більшості опублікованих статей про ФТТ використовували лазери з довжиною хвилі 808 нм. Лазер з довжиною хвилі 1064 нм, використаний у цьому дослідженні з  $\text{Ti}_3\text{C}_2$  MXene, може бути цінною альтернативою, оскільки ця довжина хвилі має нижчу енергію і, отже, може забезпечити краще виживання здорових клітин. Цей лазер може проникати глибше під шкіру.

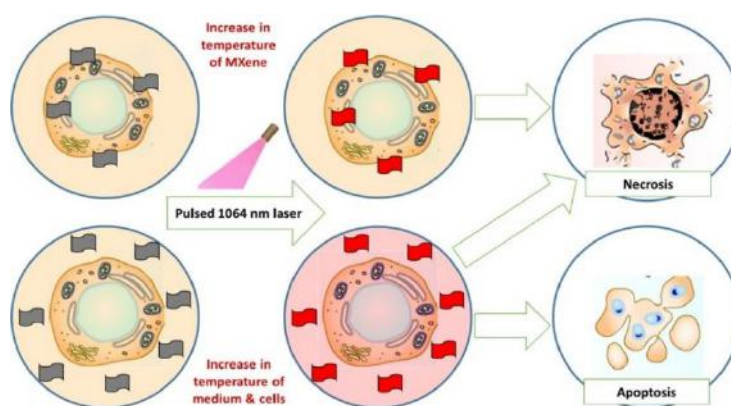


Рисунок 4.1 – Запропонований механізм фототермічної терапії з використанням  $\text{Ti}_3\text{C}_2$  MXene та знищення ракових клітин після дії імпульсного лазера БІЧ з довжиною хвилі 1064 нм.

При лазерному опроміненні біологічного матеріалу, навантаженого MXene, пластівці MXene поглинають енергію, перетворюючи ІЧ-світло на тепло. Це ініціює передачу тепла до навколишніх тканин, клітин або біологічних рідин. Для коректної інтерпретації результатів ми вимірювали розподіл температури в межах області, що опромінюється за допомогою тепловізора (рис. 5) для всього інтервалу експозиції (40, 60, 80 с) і різних концентрацій MXene (0, 0,75, 3,75 мкг/мл). На правій панелі представлена таблиця зі значеннями збільшення температури  $\Delta T$ . З таблиці видно, що максимальна температура могла досягати  $60,2^\circ\text{C}$ , а різниця температур між

зразками з MXene і без нього при різних концентраціях досягала 20 ° C. Таким чином, опромінені зразки з MXenes зазнавали сильного теплового ефекту. Важливо, що імпульсні лазери можуть забезпечити потенційно більш контрольовану та регульовану динаміку поглинання та передачі тепла порівняно з безперервними лазерами. При використанні імпульсних лазерів пікова щільність потужності може бути вищою, а тривалість дії може бути меншою, що призводить до менш серйозних побічних ефектів лікування і більш сприятливих протоколів лікування. Передбачуваний механізм ефекту ФТТ при імпульсному БЧ-лазерному випромінюванні з довжиною хвилі 1064 нм показаний на малюнку 10. Асоціація MXenes, що спостерігається, з клітинами передбачає, що він може проникати всередину клітин або залишатися локалізованим на їх поверхні. Після БЧ-опромінення можна було виділити дві можливі високотемпературні зони: (i) безпосередньо на пластівцях MXene, пов'язаних з клітинами, і (ii) в середовищі навколо клітин з пластівцями, що вільно плавають. Виходячи з цього припущення можна розглядати два типи механізмів пошкодження клітин. Після експозиції, підвищена температура пов'язаних з клітинами MXenes викликає пряме пошкодження клітин із руйнуванням мембран та денатурацією білків, що призводить до загибелі клітин шляхом некрозу. Цей механізм був запропонований деякими авторами на підставі експериментів *in vitro* та *in vivo* [43]. Другий механізм передбачає температурне пошкодження від підігрітого середовища: вільно плаваючі пластівці MXene викликають підвищення температури поживного культурального середовища і викликають температурно-залежний апоптоз [64]. Підвищена температура середовища може викликати некроз клітин, що сприяє загибелі ракових клітин. Зверніть увагу, що таке підвищення температури може викликати як апоптоз, так і некроз навколишніх здорових клітин, що може призвести до пошкодження тканин. Тому ми прагнули дослідити, як клітини здорової тканини реагують на завантаження MXene та опромінення імпульсним інфрачервоним лазером. MSC представляють нормальні клітини тканини і є

моделлю легко проліферуючих нормальних клітин, що широко використовується в експериментах *in vitro*. Результати показали, що нормальні клітини тканини можуть бути видалені так само, як і клітини пухлини. Це додатково наголошує на важливості селективного механізму направлення агента ФТТ на пухлинні клітини. Отже, для ефективного та безпечного лікування раку необхідна ретельна розробка протоколів опромінення та конкретних стратегій зв'язування МХене з раковими клітинами.

## ВИСНОВКИ

1. Імпульсний лазер з довжиною хвилі 1064 нм можна використовувати для розробки протоколів лікування раку за допомогою фототермічного ефекту  $Ti_3C_2$  MXene.
2. MXenes виявляють низьку токсичність *in vitro* і добре переносяться при комбінованому лікуванні з БЧ-лазерним опроміненням *in vivo*.
3. У високих концентраціях MXenes можуть накопичуватися на клітинах та всередині них, що призводить до зменшення кількості клітин та їхньої аномальної морфології.
4. MXenes можуть проявляти автокаталітичний ефект, знаходячись у субстратах, у клітинних метаболічних аналізах, які зазвичай використовуються для оцінки токсичності MXene *in vitro*. Тому результати таких аналізів слід інтерпретувати обережно.
5. Загалом імпульсні БЧ-лазери мають переваги перед лазерами безперервної дії при розробці безпечних та ефективних протоколів лікування раку ФТТ за допомогою MXenes.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

- (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* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- (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. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2021.04.029>.
- (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. Prim.* 2015, *1*, 15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>.
- (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* (1), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.013>.
- (5) Zhang, P.; Meng, J.; Li, Y.; Yang, C.; Hou, Y.; Tang, W.; McHugh, K. J.; Jing, L. Nanotechnology-Enhanced Immunotherapy for Metastatic Cancer. *The Innovation* 2021, 100174. <https://doi.org/10.1016/J.XINN.2021.100174>.
- (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* (4), 370–379. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.17>.
- (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* (48), 8210–8216. <https://doi.org/10.1002/adma.201404013>.

- (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. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00295>.
- (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, 5, 25. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.
- (10) Yang, K.; Feng, L.; Liu, Z. Stimuli Responsive Drug Delivery Systems Based on Nano-Graphene for Cancer Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier B.V. October 2016, pp 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.015>.
- (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 (12), 5435–5488. <https://doi.org/10.7150/thno.40068>.
- (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  $\text{Ti}_3\text{AlC}_2$ . *Adv. Mater.* 2011, 23 (37), 4248–4253. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201102306>.
- (13) VahidMohammadi, A.; Rosen, J.; Gogotsi, Y. The World of Two-Dimensional Carbides and Nitrides (MXenes). *Science* 2021, 372 (6547). <https://doi.org/10.1126/science.abf1581>.
- (14) Anasori, B.; Gogotsi, Y. *2D Metal Carbides and Nitrides (MXenes): Structure, Properties and Applications*; Springer International Publishing, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-19026-2>.
- (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  $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$  Composite Theranostic Nanosystem for Multi-Modality Tumor Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* 2015, 27 (17), 2775–2782. <https://doi.org/10.1002/adma.201500870>.



- (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 (1). <https://doi.org/10.1002/adma.201603276>.
- (17) Scheibe, B.; Wychowaniec, J. K.; Scheibe, M.; Peplińska, B.; Jarek, M.; Nowaczyk, G.; Przysiecka, Ł. Cytotoxicity Assessment of Ti-Al-C Based MAX Phases and Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXenes on Human Fibroblasts and Cervical Cancer Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5 (12), 6557–6569. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01476>.
- (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 (7), 2080–2088. <https://doi.org/10.1021/nl071008a>.
- (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 (1), 1054–1063. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07927>.
- (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 (4), 2001563. <https://doi.org/10.1002/ADOM.202001563>.
- (21) Lin, H.; Wang, X.; Yu, L.; Chen, Y.; Shi, J. Two-Dimensional Ultrathin MXene Ceramic Nanosheets for Photothermal Conversion. *Nano Lett.* 2017, 17 (1), 384–391. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b04339>.
- (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. Healthc. Mater.* 2018, 7 (9). <https://doi.org/10.1002/adhm.201701394>.
- (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 (30), 6402–6417. <https://doi.org/10.1039/d0tb01084g>.
- (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. <https://doi.org/10.1039/c9nj01402k>.
- (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 (1), 284–294. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05982>.
- (26) Supino, R. MTT Assays. *Methods Mol. Biol.* 1995, 43, 137–149. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>.
- (27) 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. *Methods Mol. Biol.* 2020, 2135, 213–221. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0463-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0463-2_12).
- (28) Alamar Blue - Cell Proliferation Assay | Bio-Rad <https://www.bio-rad-antibodies.com/alamarblue-cell-proliferation-assay.html> (accessed 2021 -10 -12).
- (29) 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 (1), 142–147. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2014.09.009>.
- (30) 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 (45), 17859–17864. <https://doi.org/10.1039/c7nr05997c>.
- (31) 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<sub>2</sub>C (MXene) as a Novel Highly Efficient and Selective Agent for Photothermal Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 98, 874–886. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.021>.
- (32) Alhabej, M.; Maleski, K.; Anasori, B.; Lelyukh, P.; Clark, L.; Sin, S.; Gogotsi, Y. Guidelines for Synthesis and Processing of Two-Dimensional Titanium Carbide (Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene). *Chem. Mater.* 2017, 29 (18), 7633–7644. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMMATER.7B02847>.
- (33) Kyrylenko, S.; Kornienko, V.; Gogotsi, O.; Oleshko, O.; Kolesnyk, M.; Mishchenko, O.; Zahorodna, V.; Buranich, V.; Pogrebnjak, A.; Zozulia, Y.; Balitskiy, V.; Pogorielov, M.; Baginskiy, I. Bio-Functionalization of Electrospun Polymeric Nanofibers by Ti<sub>3</sub>CT<sub>x</sub> MXene. *Proc. 2020 IEEE 10th Int. Conf. "Nanomaterials Appl. Prop. N. 2020* 2020. <https://doi.org/10.1109/NAP51477.2020.9309612>.
- (34) 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<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene. *Adv. Eng. Mater.* 2020, 22 (3), 1901241. <https://doi.org/10.1002/ADEM.201901241>.
- (35) Singer, B. B.; Scheffrahn, I.; Öbrink, B. The Tumor Growth-Inhibiting Cell Adhesion Molecule CEACAM1 (C-CAM) Is Differently Expressed in Proliferating and Quiescent Epithelial Cells and Regulates Cell Proliferation. *Cancer Res.* 2000, 60 (5), 1236–1244.
- (36) 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 (13), e98665. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201798665>.
- (37) 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 (3), 233–239. <https://doi.org/10.7124/bc.0008E5>.

- (38) Shuvalova, N.; Kordium, V. Morphological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Wharton Jelly, Cultivated under Physiological Oxygen Tensions, in Various Gas Mixtures. *Biopolym. Cell* 2016, 32 (4), 262–270. <https://doi.org/10.7124/bc.000928>.
- (39) Kyrylenko, S.; Warchoł, F.; Oleshko, O.; Husak, Y.; Kazek-Kęsik, A.; Korniienko, V.; Deineka, V.; Sowa, M.; Maciej, A.; Michalska, J.; Jakóbi-Kolon, A.; Matuła, I.; Basiaga, M.; Hulubnych, 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, 111607. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111607>.
- (40) 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<sub>3</sub>C<sub>2</sub>TX 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.
- (41) Graham, L.; Orenstein, J. M. Processing Tissue and Cells for Transmission Electron Microscopy in Diagnostic Pathology and Research. *Nat. Protoc.* 2007, 2 (10), 2439–2450. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.304>.
- (42) 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 (12), 3412. <https://doi.org/10.3390/NANO11123412>.
- (43) Rozmysłowska-Wojciechowska, A.; Wojciechowski, T.; Ziemkowska, W.; Chlubny, L.; Olszyna, A.; Jastrzębska, A. M. Surface Interactions between 2D Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>/Ti<sub>2</sub>C MXenes and Lysozyme. *Appl. Surf. Sci.* 2019, 473, 409–418. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2018.12.081>.
- (44) Doroszkowski, A. The Physical Chemistry of Dispersion. *Paint Surf. Coatings* 1999, 198–242. <https://doi.org/10.1533/9781855737006.198>.

- (45) Seredych, M.; Maleski, K.; Mathis, T. S.; Gogotsi, Y. Delamination of MXenes Using Bovine Serum Albumin. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2022, *641*, 128580. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2022.128580>.
- (46) 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* (10), 3777–3787. <https://doi.org/10.1039/D1NR08548D>.
- (47) 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*, 101136. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2021.101136>.
- (48) 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*, 110790. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110790>.
- (49) 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<sub>3</sub>C<sub>2</sub> Mxene Flakes on Human Cancer Cells and Their Photothermal Response. *Materials (Basel)*. 2021, *14* (16). <https://doi.org/10.3390/MA14164370>.
- (50) 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. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.06.021>.
- (51) 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<sub>3</sub>C<sub>2</sub> (MXene) Flakes to Cancerous and Benign Cells by Post-Delamination Surface Modifications. *2D Mater.* 2020, 7 (2). <https://doi.org/10.1088/2053-1583/AB6A60>.
- (52) Liu, G.; Zou, J.; Tang, Q.; Yang, X.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Huang, W.; Chen, P.; Shao, J.; Dong, X. Surface Modified Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> MXene Nanosheets for Tumor Targeting Photothermal/Photodynamic/Chemo Synergistic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9 (46), 40077–40086. [https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B13421/SUPPL\\_FILE/AM7B13421\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B13421/SUPPL_FILE/AM7B13421_SI_001.PDF).
- (53) 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. Healthc. Mater.* 2018, 7 (9), 1701394. <https://doi.org/10.1002/ADHM.201701394>.
- (54) 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<sub>3</sub>C<sub>2</sub>)-Integrated Cellulose Hydrogels: Toward Smart Three-Dimensional Network Nanoplatforms Exhibiting Light-Induced Swelling and Bimodal Photothermal/Chemotherapy Anticancer Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10 (33), 27631–27643. [https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B08314/SUPPL\\_FILE/AM8B08314\\_SI\\_002.AVI](https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B08314/SUPPL_FILE/AM8B08314_SI_002.AVI).
- (55) 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. Nanomedicine* 2019, 14, 4529–4539. <https://doi.org/10.2147/IJN.S202208>.
- (56) 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, 111212. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111212>.

- (57) 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 (30), 6402–6417. <https://doi.org/10.1039/D0TB01084G>.
- (58) 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 (21), 3541–3548. <https://doi.org/10.1039/C8TB00754C>.
- (59) 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. [https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C14752/SUPPL\\_FILE/AM0C14752\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C14752/SUPPL_FILE/AM0C14752_SI_001.PDF).
- (60) 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 (45), 16235–16247. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07818>.
- (61) Han, X.; Jing, X.; Yang, D.; Lin, H.; Wang, Z.; Ran, H.; Li, P.; Chen, Y. Therapeutic Mesopore Construction on 2D Nb<sub>2</sub>C MXenes for Targeted and Enhanced Chemo-Photothermal Cancer Therapy in NIR-II Biowindow. *Theranostics* 2018, 8 (16), 4491–4508. <https://doi.org/10.7150/thno.26291>.
- (62) Xiang, H.; Lin, H.; Yu, L.; Chen, Y. Hypoxia-Irrelevant Photonic Thermodynamic Cancer Nanomedicine. *ACS Nano* 2019, 13 (2), 2223–2235. [https://doi.org/10.1021/ACSNANO.8B08910/SUPPL\\_FILE/NN8B08910\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSNANO.8B08910/SUPPL_FILE/NN8B08910_SI_001.PDF).
- (63) 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 (2), 1901954. <https://doi.org/10.1002/ADVS.201901954>.
- (64) 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 (12), 12696–12712. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07241>.
- (65) 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 (6), 1648–1664. <https://doi.org/10.7150/thno.23369>.
- (66) 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 (1), 8720. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26978-1>.