

ГОЛЬТЯЕВ МИХАИЛ ВИКТОРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА,
СОРАФЕНИБА И ИХ КОМПЛЕКСА НА КЛЕТКИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ
КАРЦИНОМЫ HEPG2 IN VITRO И НА ФИБРОЗ ПЕЧЕНИ IN VIVO**

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, **Варламова Елена Геннадьевна**

Официальные оппоненты:

Михаил Васильевич Дубинин, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет» кафедра биохимии, клеточной биологии и микробиологии, профессор.

Игорь Александрович Дьяченко, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, лаборатория биологических испытаний, главный научный сотрудник.

Ведущая организация:

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Защита диссертации состоится __ ноября 2026 г. в 14 ч. 00 мин. на заседании Диссертационного совета 24.1.232.01 (Д 002.285.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Серпухов, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3. и на сайте <https://www.pbcras.ru/>

Автореферат разослан __ сентября 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н.

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Заболевания печени представляют серьезную опасность для здоровья человека: цирроз и рак печени (гепатоцеллюлярная карцинома, ГЦК) в совокупности являются причиной 3,5% всех смертей в мире. Разрабатываются различные подходы к лечению и профилактике указанных заболеваний, при этом наиболее перспективным является терапия на ранних стадиях. Фиброз печени является важным маркером патологических процессов, происходящих в данном органе: разрастание соединительной ткани может свидетельствовать о наличии у пациента хронических заболеваний и в дальнейшем приводить к циррозу, раку печени. В настоящее время существует ряд препаратов для лечения заболеваний печени, например, сорафениб (Со) – таргетный противоопухолевый препарат, действующий как мультикиназный ингибитор. Однако, Со обладает высокой токсичностью в отношении здоровых тканей и органов и вызывает формирование резистентности раковых клеток к нему. Для нивелирования этих побочных эффектов в последние десятилетия большое внимание уделяется созданию наноконструктов, содержащих известные противораковые препараты. В этом плане хорошо зарекомендовали себя наночастицы и наноконструкты на основе селена, поскольку неоднократно показано, что данный микроэлемент и соединения различного происхождения на его основе обладают широким спектром эффектов, в том числе противораковых. Однако, по сравнению с неорганическими и органическими селенсодержащими соединениями, наночастицы селена (НС) и наноконструкты на его основе обладают рядом существенных преимуществ: более высокой биодоступностью, селективностью и эффективностью, низкой цитотоксичностью по отношению к здоровым тканям и клеткам, окружающим очаг заболевания. В связи с этим, в рамках данной работы мы поставили задачу исследовать свойства нового наноконструкта, состоящего из НС, покрытых Со, на двух моделях, характеризующих различные патологические процессы: модель *in vitro*, представляющая собой монослой раковых клеток линии HepG2 (ГЦК человека), и модель *in vivo* – индуцированный химическим способом фиброз печени у мышей.

Степень разработанности темы. Исследования противораковых свойств селенсодержащих препаратов идут уже достаточно давно, если в более ранних исследованиях использовались неорганические соединения селена (в первую очередь, селенит натрия, а также селенаты и селениды), то затем наметился тренд на изучение органических соединений (метилселениновая кислота, селенометионин, метилселеноцистеин) и в последнее время – селенсодержащих наночастиц, в том числе, благодаря их значительно более низкой токсичности и лучшей биодоступности. Способы получения наночастиц селена также прошли путь от простого химического восстановления до «зеленого» синтеза и физических методов. Биологическое восстановление элементарного селена из неорганических и органических соединений в клетках растений, грибов и бактерий получило широкое распространение ввиду своей простоты и дешевизны. Однако недостатком данного подхода является необходимость очистки от всех биомолекул, находящихся в растворе. Данных недостатков лишены физические методы, в частности, лазерная абляция – способ удаления вещества с поверхности при помощи лазерного импульса. При этом возможно получение наночастиц заданного размера.

Литературные данные позволяют, с одной стороны, говорить о противораковой активности наночастиц и наноконструктов селена, а с другой – об их защитном, противовоспалительном действии. Активно разрабатываются комплексы наночастиц селена с различными противораковыми препаратами. При этом остаются достаточно слабо исследованными механизмы как противоракового, так и противовоспалительного действия селена в клетке.

Цель исследования. Оценить эффективность цитотоксического действия наночастиц селена, сорафениба и комплекса селен-сорафениб на клетки гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro* и их противопрофиброзного действия в модели фиброза печени *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Оценить эффективность цитотоксического действия наночастиц селена, сорафениба и комплекса селен-сорафениб на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека *in vitro*.

2. Оценить эффективность противofiброзных свойств наночастиц селена, сорафениба и комплекса селен-сорафениб на модели тиаоацетамид-индуцированного фиброза печени у мышей *in vivo*.

3. Определить ключевые молекулярные мишени, опосредующие цитотоксическое и противofiброзное действие наночастиц селена, сорафениба и их комплекса.

Новизна научной работы. В рамках данной работы впервые показаны биологические эффекты наноконплекса НС-Со на примере двух моделей: цитотоксический в отношении раковых клеток печени *in vitro* и противofiброзный в печени *in vivo*. При этом впервые проведен анализ цитотоксических и противofiброзных свойств НС, Со и НС-Со. По результатам исследований, представленных в работе, впервые установлены цитотоксические концентрации НС-Со, НС и Со для клеток HepG2, способные активировать различные механизмы, приводящие к апоптозу этих раковых клеток. Показано снижение уровней маркеров фиброза, апоптоза, стресса эндоплазматического ретикулума и провоспалительных цитокинов под действием НС и комплекса НС-Со при тиаоацетамид-индуцированном фиброзе печени у мышей.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в данной работе, расширяют теоретические представления о молекулярных и клеточных механизмах регуляции НС как в комплексе с Со, так и без него, патологических процессов: фиброза печени и ГЦК. Показана активация проапоптотических маркеров и маркеров стресса эндоплазматического ретикулума в раковых клетках *in vitro* под воздействием наночастиц селена и комплекса селен-сорафениб. Также в работе показано увеличение экспрессии маркеров фиброза, апоптоза, стресса эндоплазматического ретикулума и провоспалительных цитокинов под действием тиаоацетамида, и снижение уровней данных маркеров под действием наночастиц селена и комплекса селен-сорафениб. С практической точки зрения, результаты данного исследования создают предпосылки для разработки противораковых и противofiброзных препаратов на основе НС.

Методология и методы диссертационного исследования. Выбор объектов исследования был обусловлен необходимостью анализа двух различных моделей: ГЦК и фиброза печени. Раковые клетки человека HepG2 являются классической и часто используемой моделью ГЦК *in vitro*. Индукция фиброза печени при помощи тиаоацетамида также часто используется при необходимости исследования фиброзных изменений и последующего развития ГЦК. Инбредная линия мышей C57BL/6J, по данным литературы, является подходящей для данных исследований. Исследование выполнено с использованием современных биохимических, цитологических, молекулярных, биофизических, статистических и биоинформационных методов. Для визуализации результатов диссертации неоднократно применялись разные виды световой микроскопии (флуоресцентная и конфокальная). С целью, экстракции РНК из клеток и тканей, проведения реакции обратной транскрипции, полуколичественной и количественной оценок содержания мРНК в образцах использовались методы молекулярной биологии, такие как ПЦР, ПЦР в реальном времени, горизонтальный электрофорез. Для определения относительного содержания различных белков в исследуемых образцах применялись биохимические подходы, такие как СДС-электрофорез, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ. Для, оценки цитотоксичности в отношении раковых клеток и детекции маркеров клеточной гибели использовались цитологические методы (МТТ-анализ, цитохимический анализ). С целью выявления патологических нарушений в печени, их локализации и для оценки эффектов в этом органе применялся гистохимический метод. Анализ достоверности полученных результатов проводился с помощью стандартных статистических подходов (метод Шапиро-Уилка, парный t-тест, тест с критерием Манна-Уитни). Для конструирования олигонуклеотидов, анализа статистических данных использовались биоинформационные подходы (программное обеспечение ImageJ, GraphPad Prism 7, Gene Runner).

Положения, выносимые на защиту:

1. Наночастицы селена и наноконплекс селен-сорафениб вызывают апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 *in vitro*.

2. Конплекс наночастиц селена и сорафениба до двух раз усиливает их противовоспалительное действие в экспериментальной модели *in vivo*.

3. Действие наночастиц селена и наноконплекса селен-сорафениб обусловлено модуляцией сигнальных путей, сопряженных со стрессом ЭПР, регуляцией кальциевого гомеостаза и уровней экспрессии широкого спектра маркеров воспаления, апоптоза и фиброгенеза.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием сертифицированного научного оборудования, современных методик при проведении экспериментов и высококачественных расходных материалов. Представленные в диссертации результаты, прошли этап обязательного рецензирования и опубликованы в научных журналах, которые входят в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Научные положения и выводы диссертации обоснованы, достоверны и основываются на экспериментальных данных, полученных автором.

Апробация результатов. Основные результаты диссертационного исследования представлены на конференциях: IV Белорусский биохимический конгресс «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии», Гродно, 2024; XIII Всероссийская научная конференция «Современные проблемы естественных наук и фармации», Йошкар-Ола, 2024.

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 5 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК и 2 публикации в материалах конференций.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в определении целей и задач работы, постановке и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных. Публикация результатов исследования проводилась совместно с соавторами при непосредственном участии соискателя.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 137 страницах машинописного текста с использованием 28 рисунков и 5 таблиц. Включает: введение, обзор литературы, методическую часть, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы. Список литературы содержит 301 ссылку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тест-объекты. В работе использовали клеточную линию НерG2 (ГЦК человека), происхождение: АТСС (США), клетки выращивали в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе, в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки до достижения конфлюэнтности 80–95%. Использовали клеточные культуры из третьего пассажа. В работе использовали мышей-самцов инбредной линии C57BL/6J (масса 15 г, возраст 2 – 3 недели), приобретенных в филиале «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Россия). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с протоколами экспериментов, утвержденными Комитетом по биоэтике Института биофизики клетки (номер утверждения: 1/092022, дата: 08.09.2022).

Наночастицы селена, сорафениб и комплекс селен-сорафениб были получены методом лазерной абляции и охарактеризованы в Институте общей физики им. А. М. Прохорова РАН (Москва) под руководством д.б.н., проф. С.В. Гудкова без участия соискателя. Диаметр НС около 100 нм, комплекса НС-Со – около 120 нм. Дзета-потенциал НС около –30 мВ, НС-Со – около –20...–25 мВ. Форма наночастиц сферическая.

Оценка цитотоксичности и типа гибели клеток. Для оценки цитотоксичности исследуемых агентов использовали МТТ-анализ. Для определения типа гибели клеток в культуре клеток после обработки НС, Со и НС-Со в течение 24 часов, окрашивали клетки аннексином V и пропидиум иодидом. Использовали набор Annexin V-AF 488 Apoptosis Detection Kit with Propidium Iodide (Lumiprobe, Россия). Использовали конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica, Германия). Подсчет клеток проводили при помощи программы ImageJ, использовали 3 поля зрения для каждого образца (10⁴ – 10⁵ клеток на лунку).

ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинг. Выделяли тотальную РНК при помощи реагента ExtractRNA, затем проводили реакцию обратной транскрипции при помощи обратной

транскриптазы MMLV, полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с использованием смеси qPCRmix–HS SYBR, с красителем SYBR Green I. Реакцию амплификации проводили при: 95°C – 1 мин; 95°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 15 с (35 циклов). Референсный ген: GAPDH. Иммуноблоттинг: белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле, после чего переносили на PVDF-мембрану. Мембраны блокировали и инкубировали с первичными антителами, после промывки мембраны инкубировали со вторичными антителами, иммунореактивные полосы визуализировали с помощью окрашивания DAB.

Флуоресцентные измерения концентрации ионов кальция. Измерения внутриклеточной концентрации ионов кальция проводили на микроскопе Carl Zeiss Cell Observer (Carl Zeiss, Германия) при помощи зонда Fura-2AM. Возбуждение проводили при 340 нм для связанного с кальцием зонда и при 380 нм – для свободного, эмиссию регистрировали при 510 нм. Для анализа и обработки данных использовалось программное обеспечение ImageJ. Количество покровных стекол с клеточными культурами в каждом анализе $n = 4$.

Индукция фиброза и обработка исследуемыми агентами. Для индукции фиброза печени мышам внутрибрюшинно вводили тиоацетамид (ТАА) 150 мкг/г (мг/кг) веса мыши, два раза в неделю в течение трех месяцев. Контрольная группа получала инъекции эквивалентного объема 0,9% NaCl. Использовали концентрации 1 и 5 мкг/г (мг/кг). Инъекции проводились в течение месяца; указанные концентрации HС, Со и HС-Со вводили мышам через день. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 7.

Гистологический анализ печени мыши. Образцы печени фиксировали и заключали в парафин, делали срезы толщиной 3 мкм при помощи микротомы Thermo Scientific Microm HM 325 (США), срезы депарафинировали и окрашивали красителями: гематоксилин-эозин (hematoxylin-eosin) (HistoPoint, Россия) и пикро-сириус красный (picrosirius red) (ab246832, Abcam, Великобритания). Съемку проводили на микроскопе Leica DM6000B (Leica, Германия). Для подсчета относительной площади коллагеновых волокон использовали программу ImageJ. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 7.

Измерение активности аминотрансфераз. Анализ активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови проводили колориметрическим методом Рейтмана-Франкеля. К образцу сыворотки добавляли определенное количество аспартата (AST/GOT) или аланина (ALT/GPT), затем добавляли фенилгидразин, чтобы остановить ферментативные реакции, оптические измерения видимого цветового поглощения фенилгидразона проводили на микропланшетном ридере при длине волны 490 нм. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 7.

Статистическая обработка результатов. In vitro: Соответствие нормальному распределению было проверено методом Шапиро-Уилка. Все значения даны как среднее $\pm$ стандартная ошибка (SEM). Статистический анализ проводился с помощью парного t-теста. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. In vivo: статистический анализ проводился с использованием непарного непараметрического теста с критерием Манна-Уитни. Сравнение достоверности проводилось относительно контрольной группы. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Количество животных в каждой группе составило 7. Для анализа данных и статистического анализа использовали программное обеспечение ImageJ и Prism GraphPad 7 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование цитотоксичности HС, Со и HС-Со в отношении клеток НерG2. Для анализа цитотоксического действия HС, Со и HС-Со на клетки НерG2 инкубировались с указанными препаратами в концентрациях 0,5; 1; 2,5 и 5 мкг/мл в течение 24 часов. Результаты МТТ-анализа (Рисунок 1) показали, что инкубирование клеток линии НерG2 с HС приводило к дозозависимой цитотоксичности и гибели 37 – 51% клеток, тогда как инкубирование с Со – 9 – 22%. Нанокмплес HС-Со также вызывал дозозависимую гибель 28 – 43% клеток, что достоверно менее эффективно, по сравнению с HС.

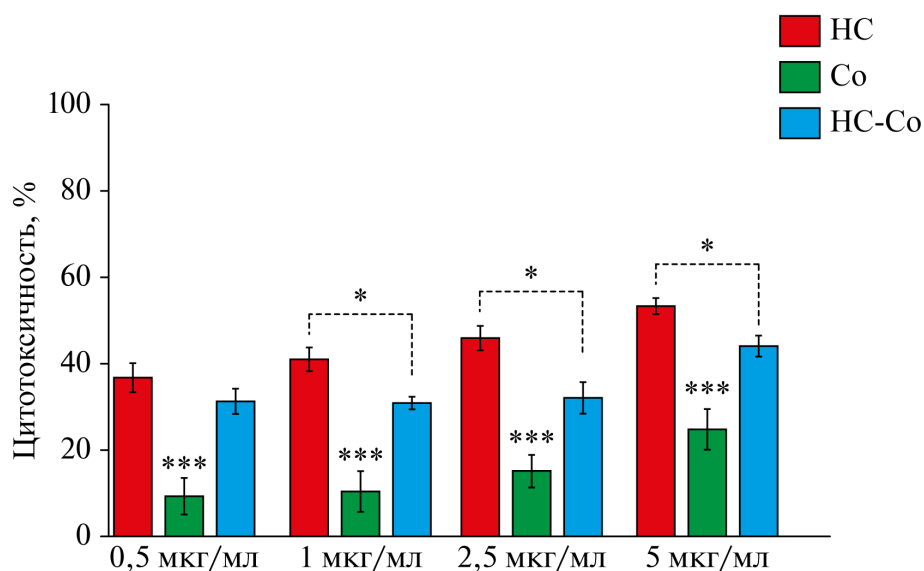


Рисунок 1. Цитотоксичность НС, Со и НС-Со в отношении клеток НерG2 после 24-часового воздействия, определенная с помощью МТТ-анализа. Значения для соответствующих контрольных клеток принимали за 0%. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2022].

Таким образом, обработка клеток НерG2 Со в диапазоне концентраций 0,5–5 мкг/мл Со не показывала существенной цитотоксичности, такой, как НС и НС-Со.

Установление типа клеточной гибели раковых клеток НерG2, активируемой 24-часовым воздействием на них НС, Со и НС-Со. Индукцию апоптоза наблюдали путем окрашивания клеток аннексином V, наличие некротических изменений детектировали с помощью окраски пропидиум иодидом. Согласно результатам, представленным на Рисунке 2, можно заключить, что во всех исследуемых образцах количество клеток, в которых наблюдался апоптоз, увеличивалось пропорционально концентрации НС, Со и НС-Со. При этом НС и НС-Со оказались более эффективными в индукции апоптотической гибели клеток, чем Со. Следует отметить, что даже при минимальной исследуемой нами концентрации (0,5 мкг/мл) НС и наноконкомплекс способствовали развитию апоптоза у более чем 20% раковых клеток, что втрое больше, чем после обработки клеток Со: Рисунок 2А.

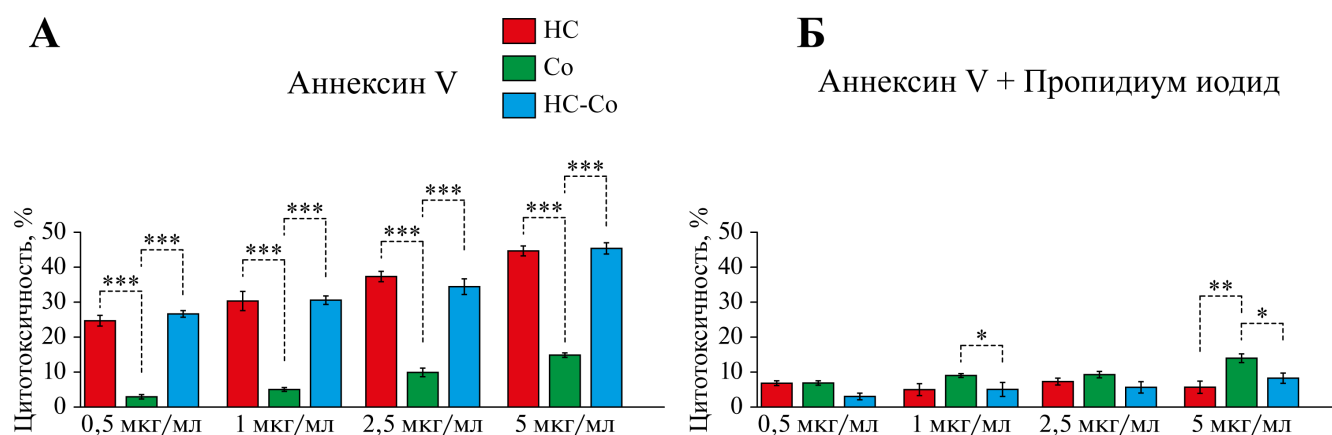


Рисунок 2. Статистический анализ подсчета клеток НерG2, окрашенных аннексином V (А) и пропидиум иодидом (Б), с помощью программы ImageJ относительного количества клеток, окрашенных аннексином V и пропидиум иодидом. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Более детальный анализ клеток НерG2, представленный на Рисунке 3, показал, что морфология клеток, окрашенных аннексином V, соответствует апоптотической гибели клеток, поскольку, как известно, он окрашивает только мембраны клеток, находящиеся в процессе апоптоза. Также можно наблюдать процесс пузырения клеточных мембран или мембранный блеббинг, что свидетельствует о наличии поздних стадий апоптоза. Кроме того, в поле зрения достаточно часто встречаются клетки с одновременным окрашиванием аннексином V и пропидиум иодидом Рисунок 2, 3, что свидетельствует о наличии вторичного некроза в этих клетках. При этом важно отметить, что мы не наблюдали клетки, окрашенные только пропидиум иодидом, то есть ни один из исследуемых в работе агентов не вызывал некротическую гибель раковых клеток.

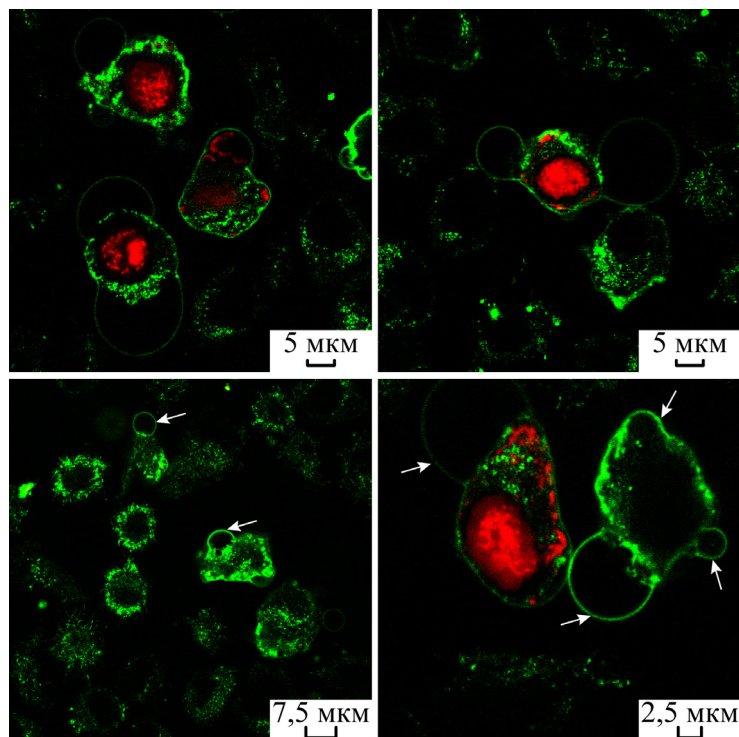


Рисунок 3. Апоптоз и некроз в клетках НерG2. Зеленая флуоресценция – аннексин V, красная флуоресценция – пропидиум иодид. Стрелками показан мембранный блеббинг.

Таким образом, показано, что НС, Со и НС-Со вызывают индукцию апоптоза в клетках НерG2, что согласуется с ранее полученными нами данными об индукции апоптоза при воздействии НС на различные линии опухолевых клеток человека, а также с крайне низкой цитотоксичностью в отношении нераковых клеток (L-929). При этом значимых отличий в эффективности между НС и НС-Со зафиксировано не было.

Влияние НС, Со и НС-Со на экспрессию про- и антиапоптотических маркеров. Использование ПЦР в реальном времени позволило обнаружить усиление экспрессии ряда ключевых проапоптотических генов в 2 и более раз в клетках НерG2 после 24-часового воздействия НС и НС-Со, тогда как проапоптотический эффект 24-часового воздействия Со оказался менее выраженным, достоверно не меняя экспрессию генов *GADD34*, *BAK*, *BAX* и *PUMA*, а в случае гена *BIM* было характерно даже снижение экспрессии (Рисунок 4А). В то же время, Со вызывал в клетках рост экспрессии *CASP-3*, что может свидетельствовать об активации апоптоза в раковых клетках. Однако, более низкий процент апоптотических клеток, зафиксированный после их обработки Со, может объясняться, в том числе, и параллельным ростом экспрессии антиапоптотического маркера *BCL-2*. Влияние Со на экспрессию проапоптотических генов был более очевиден только спустя 48 часов с момента добавления его в культуральную среду, когда наблюдался существенный рост уровней экспрессии всех исследуемых проапоптотических маркеров. Увеличение времени инкубирования клеток НерG2 с НС и НС-Со приводило к сохранению тренда на усиление экспрессии проапоптотических генов (Рисунок 4В).

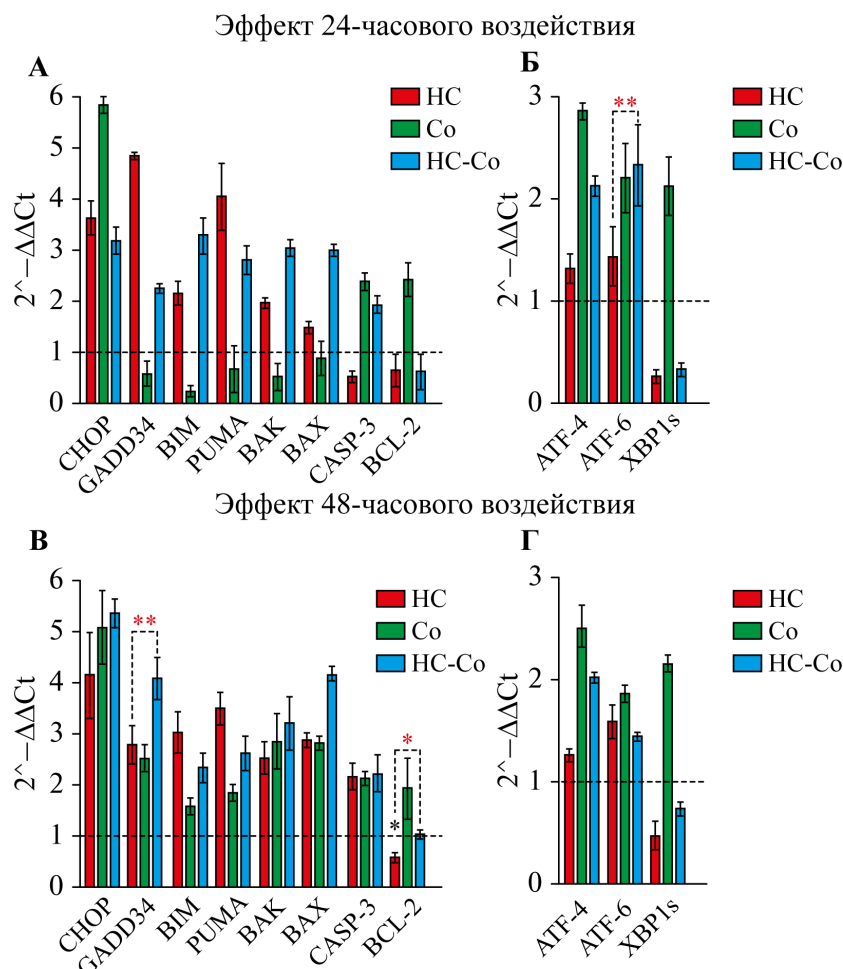


Рисунок 4. А, В. Паттерны экспрессии генов, кодирующих про- и антиапоптотические белки; **Б, Г.** Паттерны экспрессии генов, кодирующих белки стресса ЭПР. Клетки линии HepG2 после инкубирования с 2,5 мкг/мл HC, Co и HC-Co. За 1 принят уровень экспрессии в контрольных клетках. Сравнения достоверности между HC и HC-Co обозначены красным. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2022].

При оценке уровней экспрессии ключевых маркеров трех путей ответа на стресс ЭПР – unfolded protein response (UPR) в клетках HepG2 установлено изменение экспрессии всех исследуемых транскрипционных факторов (ATF-4, ATF-6, и XBP1s). Принимая во внимание тот факт, что наряду с усилением экспрессии этих генов наблюдался рост транскриптов проапоптотических маркеров, можно с уверенностью говорить, что в клетках HepG2 происходила активация не только адаптивного, но и пролонгированного стрессов ЭПР. Согласно результатам анализа ПЦР в реальном времени, представленным на Рисунке 4Б, Г, очевиден различный характер паттернов экспрессии всех трех маркеров UPR в зависимости от природы исследуемых агентов. Так, Co способствовал росту уровней экспрессии всех трех факторов транскрипции и маркеров UPR более, чем в два раза. Тогда как наноконкомплекс HC-Co повлиял на экспрессию только двух факторов транскрипции ATF-4 и ATF-6, усилив их приблизительно вдвое. В свою очередь HC не вызвали рост ни одного из вышеперечисленных маркеров стресса ЭПР, а, наоборот, наряду с HC-Co способствовал снижению экспрессии сплайсированной формы XBP1s.

Влияние сорафениба, наночастиц селена и наноконкомплекса селен-сорафениб на систему кальциевой сигнализации клеток HepG2. Процессы активации апоптоза тесно связаны с внутриклеточной кальциевой сигнализацией и могут быть инициированы ионами Ca^{2+} . Для регистрации динамики внутриклеточной концентрации ионов кальция клетки были загружены чувствительным к кальцию зондом Fura-2, и с помощью флуоресцентной микроскопии регистрировалось изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция при воздействии на клетки HC, Co и HC-Co.

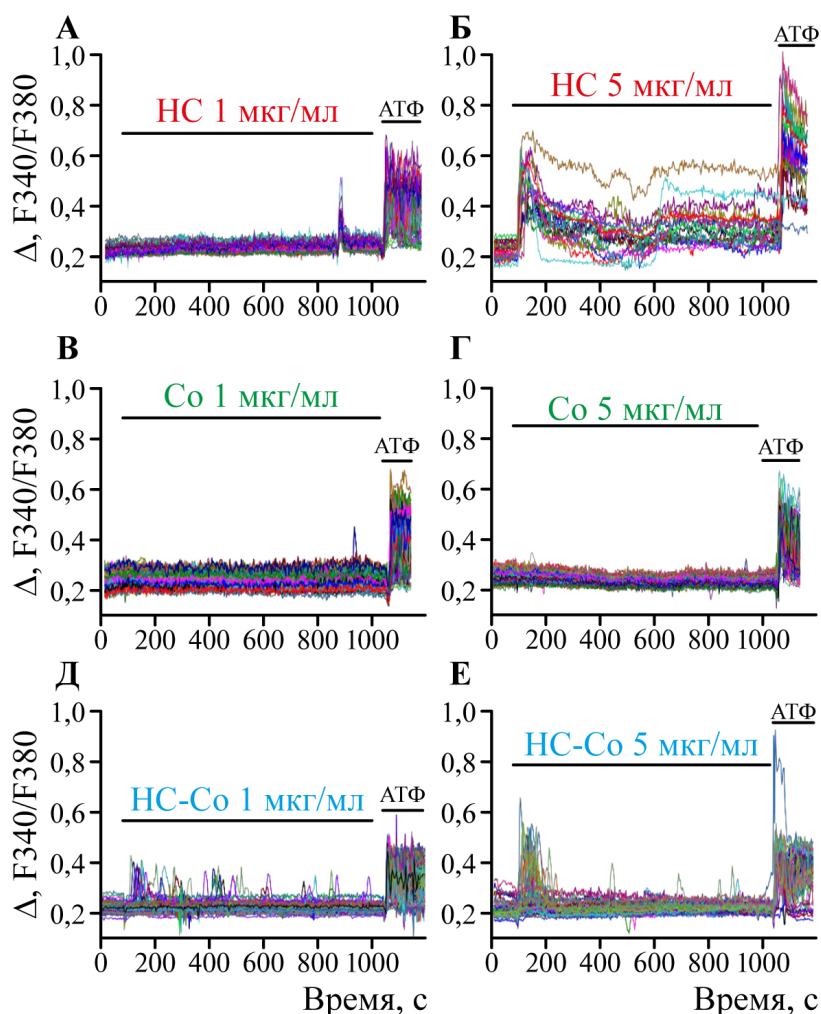


Рисунок 5. Регистрация Ca^{2+} -динамики в клетках HepG2 при аппликации различных концентраций НС (А, Б), Со (В, Г) и НС-Со (Д, Е). В конце эксперимента добавляли 10 мкМ АТФ. На рисунке показаны Ca^{2+} -сигналы отдельных клеток. Количество покровных стекол с клеточными культурами в каждом анализе = 4 [Goltyaev, 2022].

Добавление в культуральную среду НС в концентрации 1 мкг/мл через 10–12 мин вызывало генерацию кальциевых сигналов в клетках HepG2 (Рисунок 5 А) в виде одиночного импульса с последующим возвращением уровня внутриклеточной концентрации ионов кальция к базальным значениям. Увеличение концентрации НС до 5 мкг/мл (Рисунок 5 Б) приводило к быстрой генерации Ca^{2+} -ответов клетками, разнообразию сигналов Ca^{2+} (одиночные импульсы Ca^{2+} и колебания Ca^{2+}). Подобные эффекты наблюдались при обработке клеток НС-Со уже в концентрации 1 мкг/мл (Рисунок 5 Д), тогда как увеличение концентрации наноконплекса до 5 мкг/мл (Рисунок 5 Е) способствовало росту амплитуды кальциевых сигналов, которые в среднем были выше, чем кальциевые ответы при воздействии на клетки НС. В свою очередь, Со в обеих исследуемых концентрациях не вызывал генерации кальциевых сигналов, однако система кальциевой сигнализации клеток была абсолютно функциональной, и добавление 10 мкМ АТФ приводило к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция за счет активации пуринергических рецепторов и мобилизации ионов Ca^{2+} из ЭПР (Рисунок 5 В, Г).

Полученные в экспериментах *in vitro* результаты послужили весомой предпосылкой для исследования свойств НС, Со и НС-Со и сравнения их эффективности на широко используемой модели *in vivo* – химически индуцированному фиброзу печени мышей C57BL/6J, вызванному внутрибрюшинными инъекциями тиацетамидом (ТАА). Фиброз печени — это динамический процесс и результат устойчивого заживления ран в ответ на хроническое повреждение органа, включающий взаимодействие гепатоцитов, звездчатых клеток печени, синусоидальных

эндотелиальных клеток и иммунных клеток. Если не лечить фиброз своевременно, это может привести к прогрессирующему циррозу печени и ГЦК. Поэтому важно исследовать потенциал НС и НС-Со уже на стадии фиброза с целью предупреждения последующего прогрессирования ГЦК и сравнить его с действием Со. Использовались НС, Со и НС-Со в концентрациях 1 и 5 мкг/г.

Действие ТАА, НС, Со и НС-Со на массу тела и печени животных. При сравнении массы тела мышей контрольных групп с массой мышей после трехмесячного введения ТАА (150 мкг/г) было замечено ее снижение в среднем на 2,7 г по сравнению с контрольной группой (Рисунок 6А), тогда как средний вес печени у животных обеих групп был одинаковым (Рисунок 6Б). Это свидетельствует о том, что показатель отношения массы печени к массе животного увеличился в среднем на 12% после инъекций ТАА относительно контроля (Рисунок 6В). Измерения средней массы животных после курса инъекций НС двумя исследуемыми концентрациями, а также Со и НС-Со в концентрациях 1 мкг/г не выявили достоверных отличий от средней массы животных контрольной группы. Тогда как после инъекций Со и НС-Со в концентрации 5 мкг/г наблюдалось достоверное снижение массы тела в среднем на 4 и 3 г. соответственно. Результаты, представленные на Рисунке 6Д, свидетельствуют о том, что лишь после инъекций каждым из агентов в концентрации 5 мкг/г наблюдалось статистически значимое снижение массы печени по сравнению с контролем, тогда как при низкой дозировке ни один из них не вызвал достоверных отличий от массы печени здоровых мышей. Однако в данной серии экспериментов более важным являлось измерение соотношения массы тела к массе печени животных, поскольку инъекции ТАА увеличили данный параметр в среднем на 12% Рисунок 6Д. Согласно результатам статистической обработки, представленным на Рисунке 6Е, можно говорить о том, что все три исследуемых агента нормализовали данный показатель, поскольку его средние значения достоверно не отличались от контрольных. Лишь после инъекций высокими дозами наноконплекса мы можем наблюдать статистически значимое снижение данного соотношения.

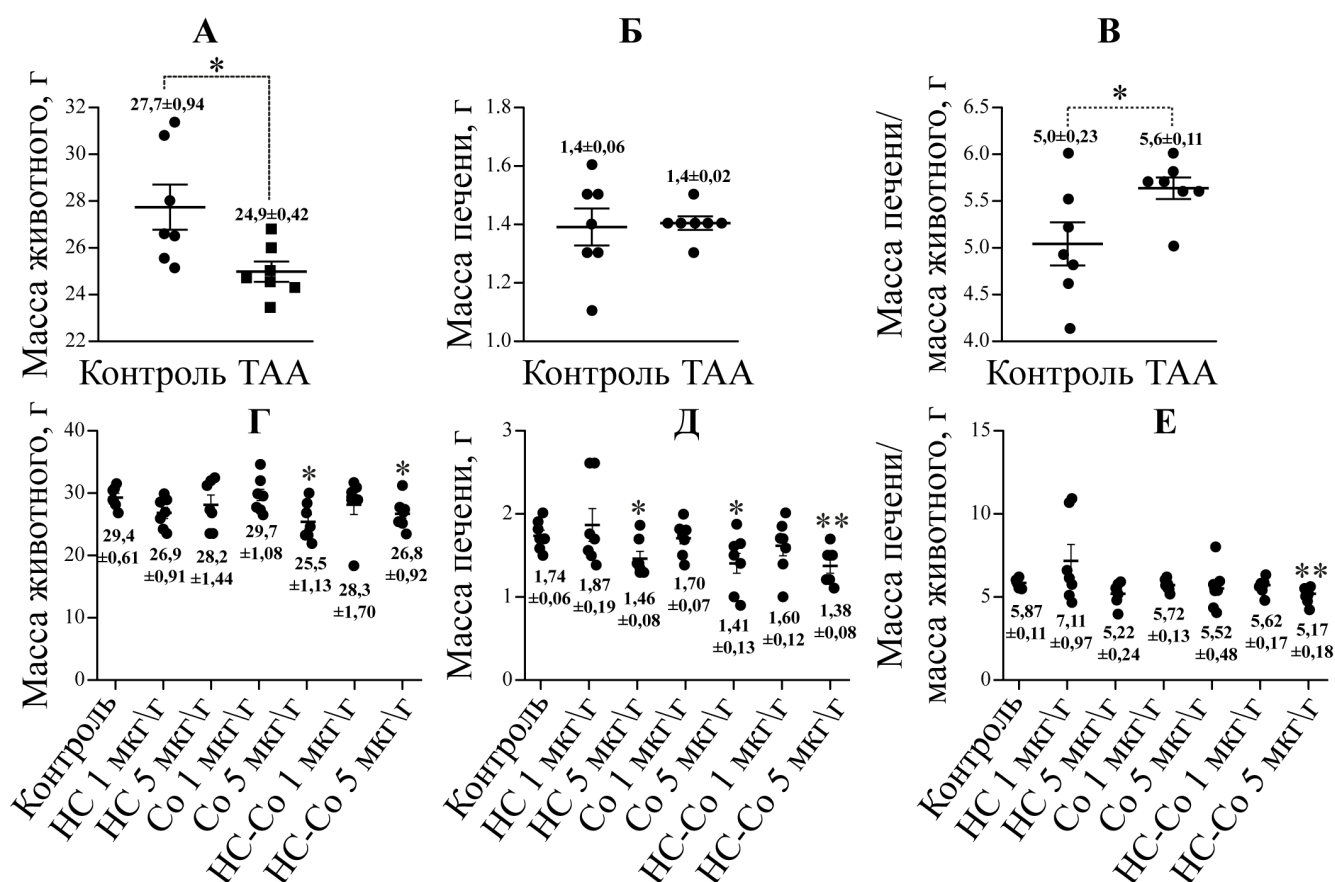


Рисунок 6. Статистический анализ массы животных, их печени и соотношение этих показателей в различных группах. **А.** Вес животного, г.; **Б.** Масса печени, г.; **В.** Отношение массы печени к

массе животного (%) до и после обработки животных ТАА (150 мкг/г); Г. Масса животного, г.; Д. Масса печени, г.; Е. Отношение массы печени к массе животного (%) после внутрибрюшинного введения НС, Со и НС-Со в концентрациях 1 и 5 мкг/г. Сравнение с контрольной группой. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 7 [Goltyaev, 2023].

Таким образом, нами показано, что НС уже в минимальной концентрации (1 мкг/г) способны нормализовать средние показатели веса животных, при этом, сохраняя данный эффект и при увеличении разовой дозировки до 5 мкг/г. Тогда как Со и НС-Со имели тот же эффект лишь в высокой дозировке. Учитывая этот факт можно предполагать, что только инъекции НС в случае наличия побочных эффектов при высоких дозировках каждого из агентов, позволят уйти в более низкий диапазон концентраций (вплоть до 1 мкг/г), сохраняя их эффект. Менее эффективными в нормализации всех трех исследуемых показателей оказались Со и наноконкомплекс НС-Со.

Противофиброзный эффект НС, Со и НС-Со. На Рисунке 7 показана морфология печени контрольной группы мышей (окраска гематоксилином и эозином) с нормальной архитектоникой тканей, при которой печеночные пластинки радиально расходятся от центральной вены, паренхима печени однородная и мелкозернистая, признаки фиброза отсутствуют. Микроскопический анализ гистологических образцов печени после трехмесячных инъекций ТАА подтвердил патологические изменения в данном органе, сопровождающиеся глобальными архитектурными искажениями (Рисунок 7). Фиброзные изменения на микрофотографиях выглядят как темные полосы на ткани, разделяющие печень на септы, что приводит к нарушению долькового строения печени. Сформированы ложные дольки разных размеров, окруженные фиброзной тканью. Выражены некроз, фиброз, вакуолизация и баллонная дегенерация гепатоцитов.

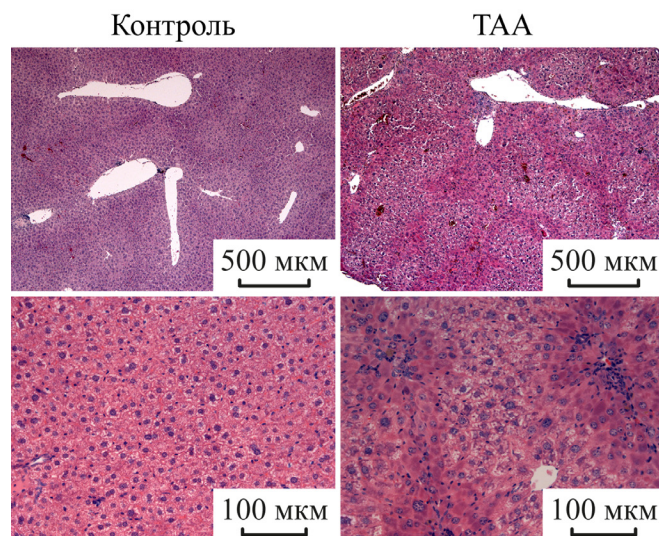


Рисунок 7. Микроскопический анализ гистологических образцов печени до и после воздействия ТАА. Окрашивание гематоксилином и эозином [Goltyaev, 2023].

В срезах печени из групп НС, Со и НС-Со описанные морфологические изменения присутствуют в меньшей степени. В группах НС, Со и НС-Со заметны легкие некротические поражения с менее выраженным фиброзом и воспалением. Для выявления коллагеновых структур в печени применяли краситель пикро-сириус красный (Picrosirius Red), который селективно окрашивает коллаген I и III типов. Микроскопия препаратов контрольной группы (здоровая печень) показала окрашивание в красный цвет только стенок сосудов, что является нормальным местом отложения коллагена: Рисунок 8.

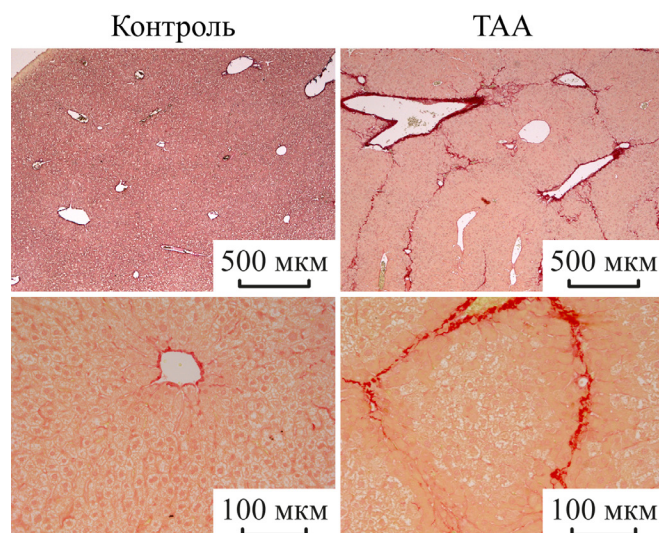


Рисунок 8. Микроскопический анализ гистологических образцов печени, окрашенных красителем пикро-сириус красный [Goltyaev, 2023].

После воздействия ТАА в срезах печени мышей обнаруживается широкий диапазон морфологических стадий патологического процесса. На Рисунке 8 показан слабо выраженный очаговый портальный и перипортальный фиброз, расширенные портальные триады. Наблюдается ярко выраженное концентрическое разрастание коллагена вокруг желчных протоков (перидуктальный фиброз). Чаше встречаются участки умеренно выраженного веноулярного и перивеноулярного фиброза, структура паренхимы печени нарушена, начинают ярко прорисовываться некоторые фиброзные перегородки, соединяющие центрлобулярные вены с портальными трактами. Тяжелая степень фиброза характеризуется широкими соединительнотканными септами, формирующими порто-портальные и центрло-портальные септы, образуя ложные долики печени и регенеративные узелки, которые нарушают архитектуру печени. Таким образом, при обработке печени ТАА наблюдается смешанная форма фиброза, при которой одновременно представлены различные стадии прогрессирования данного заболевания. Площадь окрашенного коллагена была подсчитана при помощи программы ImageJ, показано достоверное ее увеличение в группе ТАА и снижение в группах НС, Со и НС-Со, однако между группами НС, Со и НС-Со отличия недостоверны. (Рисунок 9).

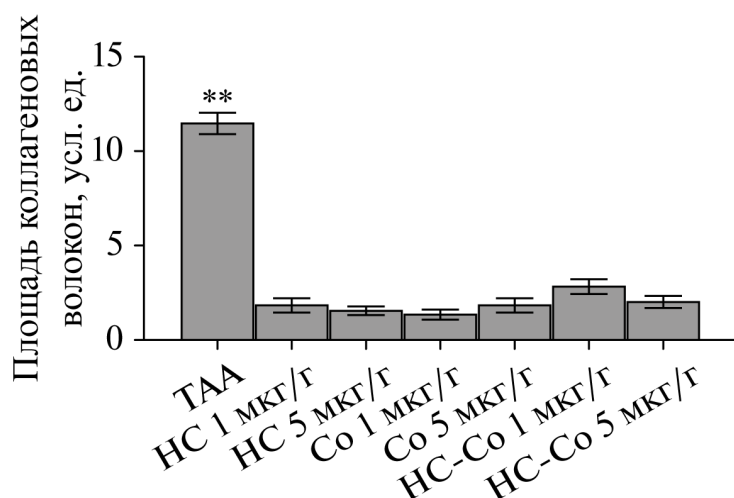


Рисунок 9. Относительная площадь коллагеновых волокон, рассчитанная с помощью программы ImageJ. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Площадь волокон для контрольной группы принимали за 0 [Goltyaev, 2023].

Таким образом, последствия вызванного инъекциями ТАА тяжелого токсического фиброза печени у мышей существенно снижались на фоне применения препаратов НС, Со и НС-Со. Показан противотоксический эффект НС и НС-Со, сопоставимый с действием Со.

Нормализация уровней аминотрансфераз в крови животных и снижение цитолиза под действием НС, Со и НС-Со. АЛТ и АСТ являются ферментами, преимущественно встречающимися в клетках печени, а важнейшими индикаторами поражения этого органа является их активность в крови, поэтому мы проанализировали уровень этих ферментов в сыворотке подопытных животных. Измерения активностей АЛТ и АСТ (Рисунок 10А, Б) показали, что инъекции ТАА приводили к увеличению этих показателей более чем в 13 раз относительно контроля. Повышение уровней АЛТ и АСТ в сыворотке крови при введении ТАА обусловлено разрушением гепатоцитов вследствие воздействия продуктов метаболизма ТАА. Известно, что референсные значения уровней данных аминотрансфераз для мышей линии C57BL/6 находятся в пределах (≤ 30 МЕ/л АЛТ и ≤ 50 МЕ/л АСТ). Помимо сильного повышения сывороточного уровня АЛТ (что типично при поражении печени) был зафиксирован сильный рост активности АСТ в сыворотке, что вызвано, вероятно, поражением не только печени, но и других органов под действием ТАА. Согласно результатам, представленным на Рисунке 10А, Б, в сыворотке крови животных, получавших инъекции НС в дозах 1 и 5 мкг/г, наблюдалось снижение активности АЛТ и АСТ в восемь и более раз по сравнению с инъекциями ТАА. После введения наночастиц НС-Со в концентрациях 1 и 5 мкг/г наблюдалось снижение активности АЛТ более чем в 9 и 11 раз соответственно. Сорafenиб в тех же концентрациях снижал активность АЛТ в 6,8 и 7,5 раза соответственно, тогда как активность фермента АСТ снижалась лишь в 2,8 и 4,4 раза по сравнению с группой животных, которым вводили ТАА.

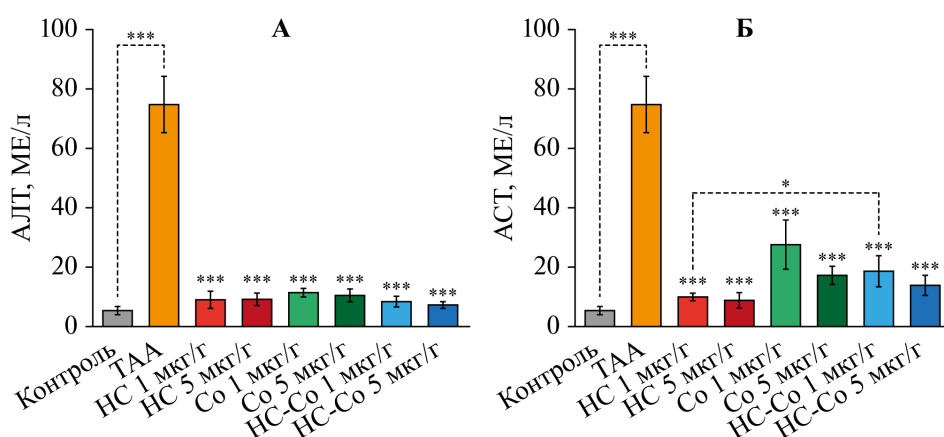


Рисунок 10. А. Анализ активности АЛТ. **Б.** Анализ активности АСТ в сыворотке крови подопытных животных. Анализ активности ферментов проводили колориметрическим методом Рейтмана–Франкеля. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

Таким образом, НС, Со и НС-Со способствовали нормализации активности ферментов АЛТ и АСТ в крови животных, что являлось показателем снижения повреждения клеток печени (цитолита). Однако наибольший эффект был установлен для НС: активность ферментов АЛТ и АСТ в сыворотке крови исследуемых мышей снизилась до контрольных значений.

Сравнительный анализ паттернов экспрессии маркеров воспаления и фиброза в гепатоцитах после инъекций ТАА и последующей терапии НС, Со и НС-Со. Согласно результатам ПЦР в реальном времени, представленным на Рисунке 11А, можно сказать, что инъекции ТАА привели к пятикратному увеличению экспрессии гена TGF- β , который является мощным стимулятором накопления рубцовой ткани, пролиферации, активации мезенхимальных клеток и биосинтеза коллагена 1 типа. Кроме того, экспрессия генов Colla1 и Colla2,

кодирующих 1 или 2 α -цепи коллагена I типа, увеличилась почти в четыре и семь раз соответственно. При этом наблюдалось восьмикратное увеличение экспрессии α -актина гладкомышечных клеток (α -SMA).

Согласно полученным нами результатам, наблюдался рост экспрессии IL-17 в два раза по сравнению с контролем (Рисунок 11А). Уровни экспрессии провоспалительных интерлейкинов IL-1 β и IL-6 также имели тенденцию к росту. Кроме того, активный воспалительный ответ в печени после инъекций ТАА был подтвержден сильным увеличением уровня экспрессии CASP-1, которая играет центральную роль в клеточном иммунитете как инициатор воспалительного ответа. Можно предположить, что повышенная экспрессия CASP-1 и IL-1 β в наших экспериментах может приводить к пироптозу гепатоцитов и иммунных клеток.

Кроме того, курс инъекций ТАА способствовал повышению экспрессии провоспалительного цитокина TNF- α , секретируемого макрофагами. Известно, что IL-17 взаимодействует с TNF- α , увеличивая синергическую секрецию IL-6 в различных типах клеток, включая гепатоциты, что также согласуется с нашими данными.

Таким образом, ТАА-индуцированное прогрессирование фиброза печени сопровождалось ростом воспалительного статуса в гепатоцитах, даже при наличии достоверного увеличения экспрессии IL-10, представляющего собой плеiotропный цитокин, который может обладать противовоспалительными и противомышечными эффектами. Кроме того, инъекции ТАА в значительной степени стимулировали накопление рубцовой ткани, пролиферации и активации мезенхимальных клеток, а также биосинтеза коллагена.

Последующие инъекции НС, Со и НС-Со в концентрациях 1 и 5 мкг/г существенно повлияли на характер экспрессии большинства вышеперечисленных генов. Стоит отметить, что для большинства маркеров фиброза и воспаления, исследуемых в данной работе, все агенты вызывали изменения их паттернов экспрессии уже в концентрации 1 мкг/г (Рисунок 11Б – Г).

НС в концентрации 1 мкг/г достоверно даже ниже контрольных показателей снизили экспрессию генов TGF- β , IL-10, IL-22, TNF- α , тогда как в концентрации 5 мкг/г- TGF- β , IL-1 β , IL-17, IL-22, TNF- α . Также НС способствовали снижению экспрессии ряда маркеров по сравнению с таковой после инъекций ТАА, но не нормализовали эти показатели до контрольных значений: 1 мкг/г- Colla2 и IL-6, 5 мкг/г- Colla2 и Casp-1. Кроме того, НС в обеих дозировках смогли нормализовать экспрессию следующих генов: 1 мкг/г- α -SMA, Colla1, IL-1 β , CASP-1, IL-17 и IL-33, 5 мкг/г- α -SMA, Colla1, IL-6, IL-10 и IL-33.

Инъекции Со в обеих дозировках достоверно снизили экспрессию следующих генов IL-10, IL-17, IL-22 и TNF- α . Тренд на снижение экспрессии но не до контрольных значений также был характерен для генов CASP-1, IL-1 β и IL-6 (1 мкг/г), а также TGF- β , Colla2, CASP-1, IL-1 β и IL-6 (5 мкг/г). Кроме того, Со в концентрации 1 мкг/г нормализовал уровни экспрессии TGF- β , α -SMA, Colla1, Colla2 и IL-33, а в концентрации 5 мкг/г- α -SMA, Colla1 и IL-33.

НС-Со в концентрации 1 мкг/г достоверно снизил ниже контрольных показателей экспрессию генов TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-22 и TNF- α , тогда как в концентрации 5 мкг/г- TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и TNF- α . Также инъекции НС-Со способствовали снижению экспрессии α -SMA, но не до контрольных показателей. При этом наноконкомплекс в концентрации 1 мкг/г нормализовал уровни экспрессии генов Colla1, Colla2, IL-10, IL-17, IL-33 и CASP-1, а в концентрации 5 мкг/г- Colla1, Colla2, IL-33 и CASP-1.

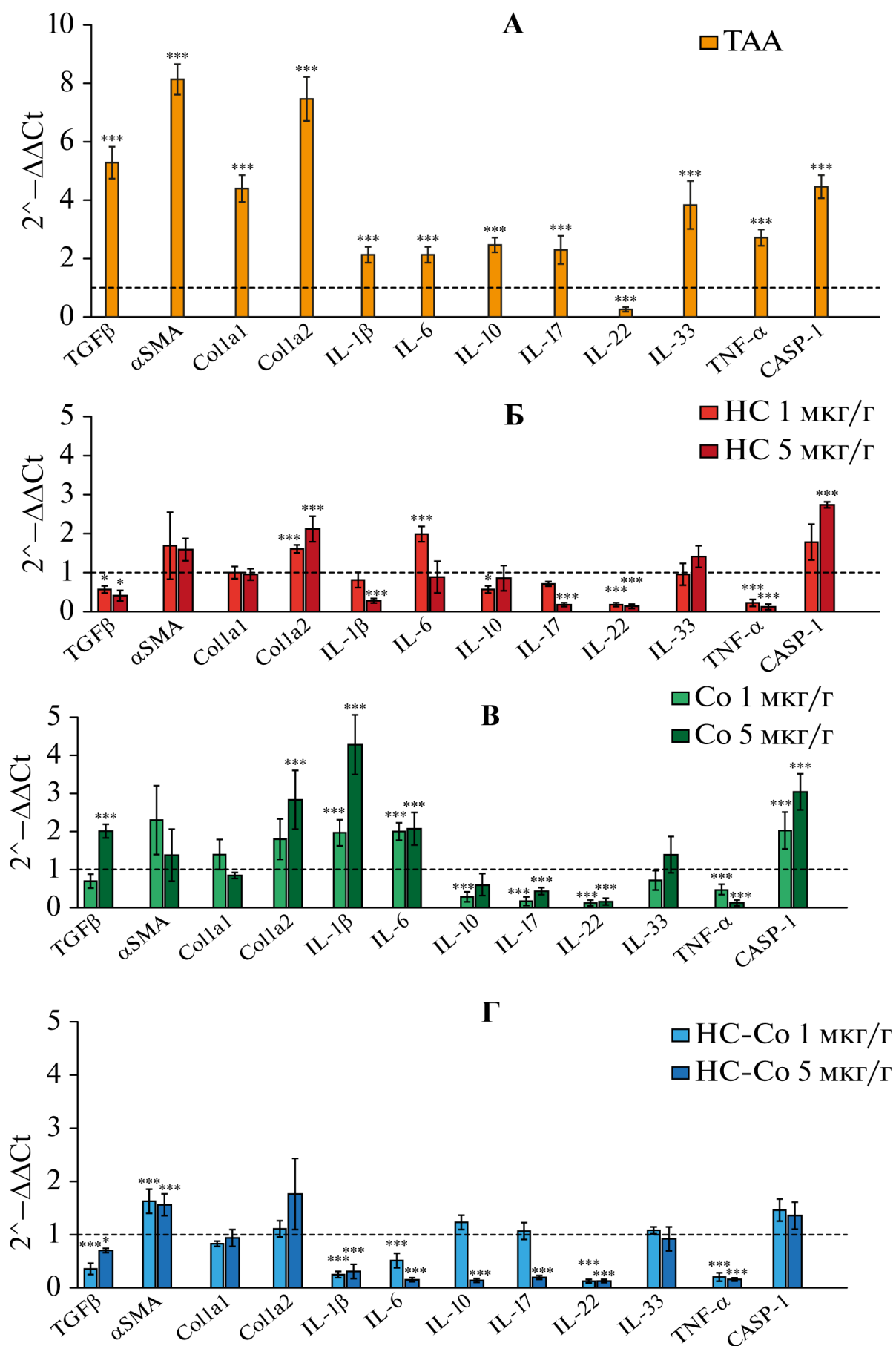


Рисунок 11. Относительные уровни экспрессии про- и противовоспалительных, и генов, связанных с фиброзом, полученные методом ПЦР в реальном времени. **А.** Группа ТАА; **Б.** Группа

НС; В. Группа Со; Г. Группа НС-Со. Данные относительно контроля (интактные здоровые животные). Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

Полученные нами данные об экспрессии для некоторых исследуемых генов были подтверждены результатами иммуноблоттинга, представленными на Рисунке 12.

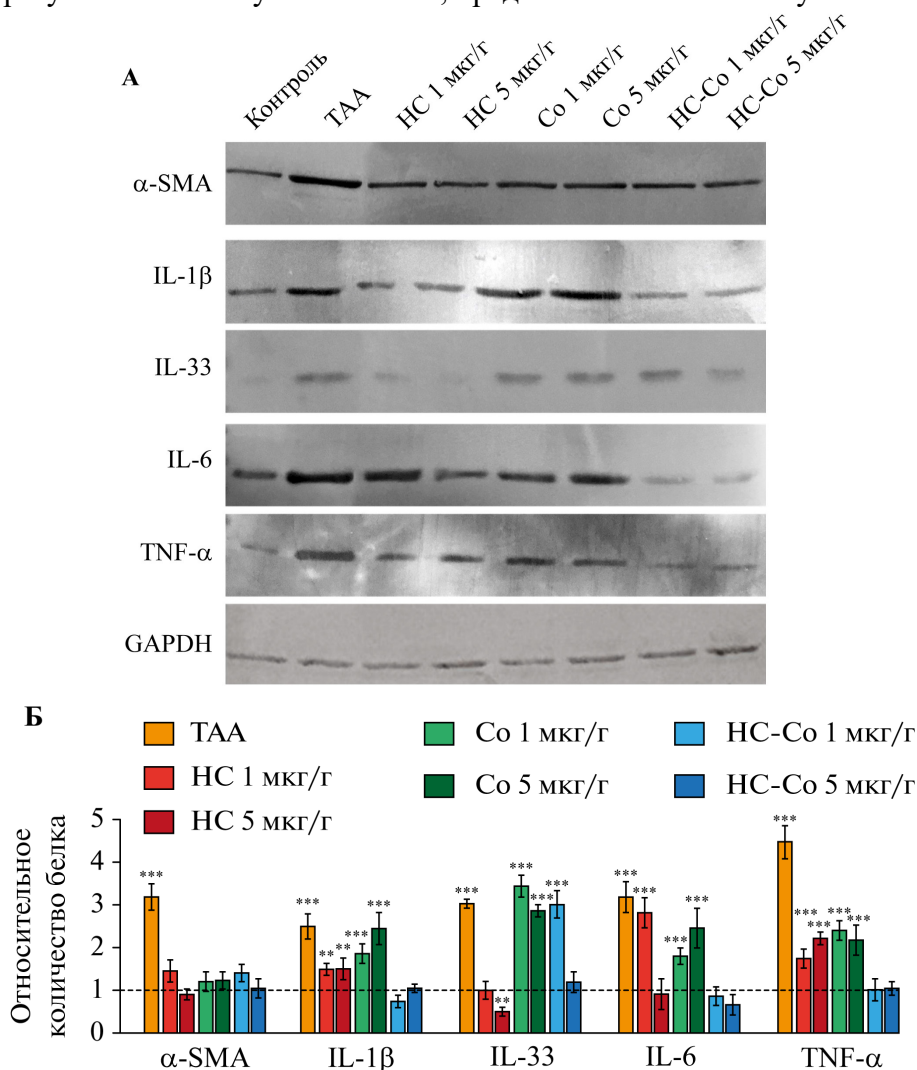


Рисунок 12. Относительные уровни исследуемых белков в печени. **А.** Результаты иммуноблоттинга; **Б.** Количественная оценка изучаемых белков в образцах, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ, представленная как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов. GAPDH использовали в качестве контроля для нормализации. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

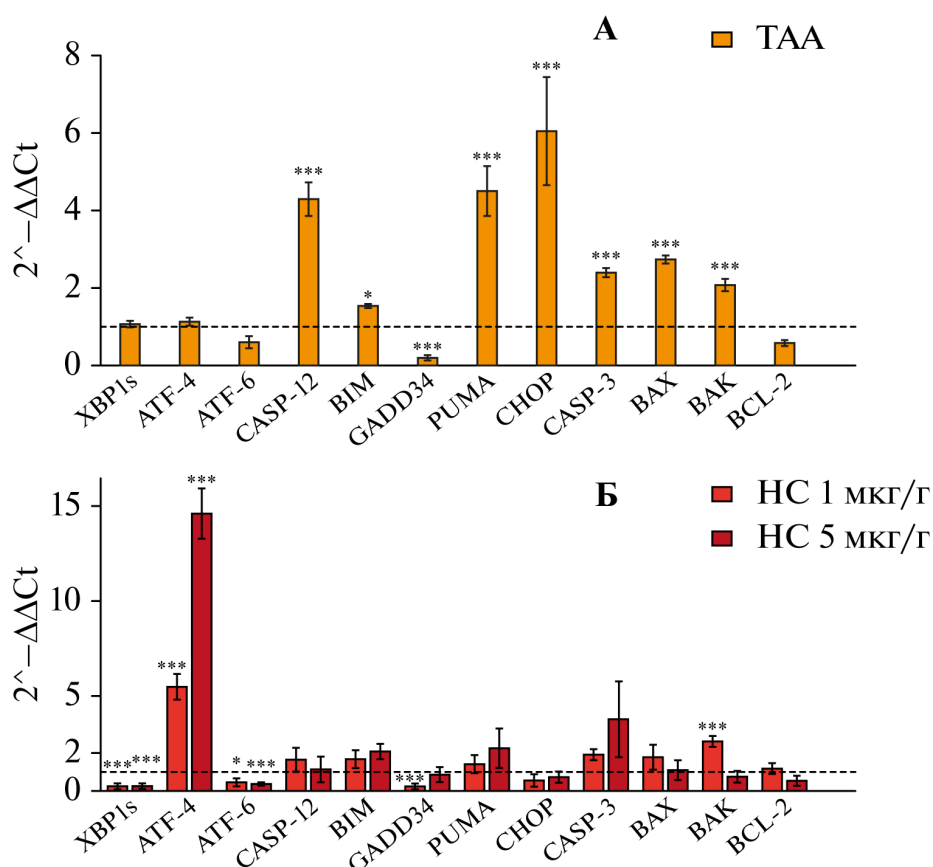
Таким образом, можно уверенно говорить о выраженном эффекте каждого из исследуемых агентов: НС, Со и НС-Со, который направлен на подавление уровней экспрессии широкого спектра профиброзных маркеров и провоспалительных цитокинов. Противовоспалительное действие НС-Со усиливается в два раза по сравнению с НС и Со на примере IL-1β и TNF-α.

Сравнение эффективности нивелирования последствий ТAA-индуцированных эффектов длительного стресса ЭПР и апоптоза в клетках печени после их обработки НС, Со и НС-Со. Чтобы понять молекулярные механизмы эффекта всех исследуемых агентов, мы изучили изменения в характере экспрессии и количестве кодируемого ими белка, уделяя особое внимание маркерам стресса ЭПР. Основываясь на наших предыдущих результатах, мы проверили, как изменилась экспрессия ключевых маркеров трех сигнальных путей UPR: PERK

(ATF-4), IRE1 α (XBP1s) и ATF-6 (ATF-6). Кроме того, были проверены паттерны экспрессии ряда генов, участвующих в адаптивном ответе и проапоптотических сигнальных каскадах, связанных со стрессом ЭПР.

Согласно результатам ПЦР в реальном времени, показанным на Рисунке 13А, мы можем заключить, что ТАА вызывает увеличение экспрессии CASP-12, CASP-3, PUMA, CHOP, BAX и BAK на фоне снижения экспрессии антиапоптотического гена BCL-2, однако достоверно не влияет на экспрессию ключевых маркеров стресса ЭПР. Это свидетельствует о том, что ТАА способствует прогрессированию апоптоза в гепатоцитах. Несмотря на то, что паттерны экспрессии ключевых мишеней, активируемых при стрессе ЭПР (ATF-4, XBP1s и ATF-6) достоверно не отличаются от контроля, увеличение количества транскриптов CASP-12, CHOP и относительного количества белков CASP-12, CHOP в гепатоцитах может указывать на другие сигнальные пути, сопряженные со стрессом ЭПР.

К настоящему времени накоплено достаточно информации о сложной регуляции активации CHOP, влияющей на различные сигнальные пути. Этот белок, также известный как GADD153, является транскрипционным фактором, индуцируемым острым или длительным стрессом ЭПР, способствует снижению экспрессии антиапоптотического белка BCL2, одновременно повышая экспрессию проапоптотических белков, таких как BIM, BAX и BAK. CHOP является центральным компонентом реакции на неправильное сворачивание белков (UPR). Поскольку инъекции ТАА в наших экспериментах вызвали существенный рост экспрессии CHOP, что служит дополнительным подтверждением прогрессирования стресса ЭПР и апоптоза.



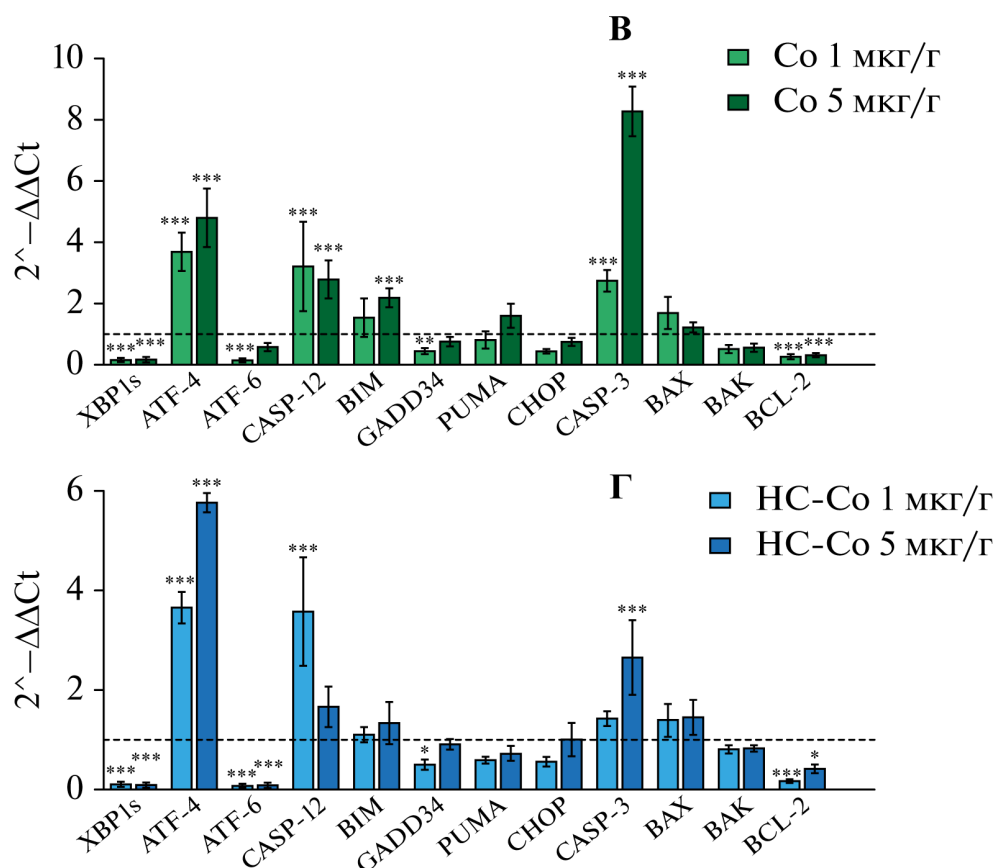


Рисунок 13. Относительные уровни экспрессии маркеров стресса ЭПР и апоптоза, полученные методом ПЦР в реальном времени. **А.** Группа ТАА; **Б.** Группа НС; **В.** Группа Со; **Г.** Группа НС-Со. Данные относительно контроля (интактные здоровые животные). Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

Последующие инъекции НС в концентрации 1 мкг/г существенно снизили уровни экспрессии генов *XBP1s*, *ATF-6* и *GADD34*, нормализовали уровни экспрессии для генов *CASP-12*, *BIM*, *PUMA*, *CHOP*, *CASP-3*, *BAX* и *BCL-2*. В то же время экспрессия *ATF-4*, *BAK* была достаточно высокой по сравнению с контролем. Повышение дозировки наночастиц до 5 мкг/г способствовало нормализации паттернов экспрессии большего количества генов *CASP-12*, *GADD34*, *BIM*, *PUMA*, *CHOP*, *CASP-3*, *BAX*, *BAK* и *BCL-2*, значительному подавлению экспрессии *XBP1s* и *ATF-6*, при этом также существенно повысилась экспрессия *ATF-4*.

Инъекции Со в концентрации 1 мкг/г способствовали снижению уровней экспрессии ниже контрольных значений для генов *XBP1s*, *ATF-6*, *GADD34* и *BCL-2*, нормализовали экспрессию генов *BIM*, *PUMA*, *CHOP**, *BAX* и *BAK*, однако наблюдался рост экспрессии *ATF-4*, *CASP-12* и *CASP-3*. Увеличение дозировки Со в пять раз способствовало значительному ингибированию экспрессии генов *XBP1s* и *BCL-2*, нормализации уровней экспрессии генов *ATF-6*, *GADD34*, *PUMA*, *CHOP*, *BAX*, *BAK* и росту уровней *ATF-4*, *CASP-12*, *BIM*, *CASP-3*.

НС-Со в дозировке 1 мкг/г снижал паттерны экспрессии *XBP1s*, *ATF-6*, *GADD34* и *BCL-2*, нормализовал эти показатели для генов *BIM*, *PUMA*, *CHOP*, *BAX*, *BAK* и *CASP-3*, при этом достоверно повысил уровни экспрессии генов *ATF-4* и *CASP-12*. Инъекции животным НС-Со в концентрации 5 мкг/г привели к снижению уровней экспрессии *XBP1s*, *ATF-6* и *BCL-2*, нормализации уровней транскриптов для генов *CASP-12*, *BIM*, *PUMA*, *CHOP*, *BAX*, *BAK* и *GADD34*, росту уровней экспрессию *ATF-4* и *CASP-3*.

Полученные нами данные об экспрессии исследуемых генов были подтверждены результатами иммуноблоттинга, представленными на Рисунке 14.

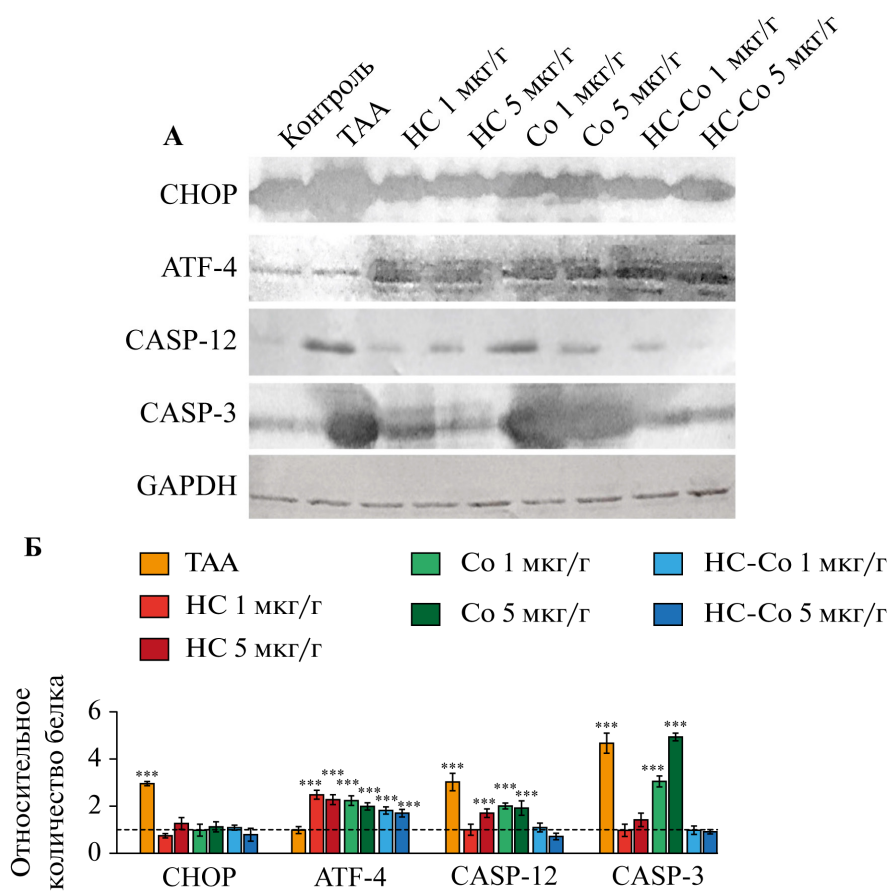


Рисунок 14. Относительные уровни исследуемых белков в печени. **А.** Результаты иммуноблоттинга; **Б.** Количественная оценка изучаемых белков в образцах, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ, представленная как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов. GAPDH использовали в качестве контроля для нормализации. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено сравнительное исследование свойств наночастиц селена (НС), сорафениба (Со) и нового наноконплекса (НС-Со), состоящего из НС, покрытых Со, на двух экспериментальных моделях. Первая модель представляет собой монослой клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека линии НерG2 *in vitro*, вторая – мыши с индуцированным тиацетамидом фиброзом печени *in vivo*. В первом случае показано цитотоксическое действие НС и НС-Со, во втором – их защитное действие.

Выявлено, что цитотоксическая активность НС и НС-Со в отношении клеток НерG2 существенно превышала таковую для Со. Цитотоксическое действие НС на раковые клетки согласуется с данными литературы, цитотоксическая активность комплекса НС-Со показана впервые. Установлено, что в диапазоне концентраций 1 – 5 мкг/мл наиболее эффективными оказались НС и НС-Со. Показано, что гибель клеток НерG2 при воздействии всех исследуемых агентов идет по пути апоптоза, при этом НС и НС-Со более эффективны в сравнении с Со. Установлены молекулярные пути регуляции цитотоксического действия НС и НС-Со на клетки НерG2: Со индуцирует апоптоз раковых клеток преимущественно через активацию сигнальных путей стресса ЭПР: PERK, IRE1 α и ATF-6, а наноконплекс: PERK и ATF-6. НС и НС-Со, в отличие от Со, вызывают дозозависимое увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, что также может активировать апоптоз клеток НерG2.

Полученные нами на модели *in vitro* данные послужили основанием для изучения и сравнения эффективности всех трех исследуемых агентов на модели фиброза печени мыши *in vivo*. Поскольку фиброз печени часто предшествует гепатоцеллюлярной карциноме, важно понять, возможно ли предотвратить развитие рака печени, оказывая воздействие селенсодержащими веществами на стадии фиброза. На модели фиброза печени мыши нами установлены защитные свойства НС и НС-Со сопоставимые с эффектами Со, и по ряду показателей превосходящие их. Противовоспалительное и противофиброзное действие комплекса НС-Со показано впервые, аналогичное установленное действие НС согласуется с литературными данными. Выявлено, что НС и НС-Со более эффективно, по сравнению с Со, нейтрализуют последствия тяжелого фиброза печени: снижают уровни экспрессии большого количества проапоптотических, профиброзных, провоспалительных генов, маркеров стресса ЭПР. Показано, что на молекулярном уровне действие НС, Со и НС-Со связано с ингибированием сигнальных путей стресса ЭПР: IRE1 α и ATF-6. При этом НС и НС-Со способны ингибировать апоптоз гепатоцитов, индуцированный пролонгированным стрессом ЭПР, путем инактивации каспазы-12.

Таким образом, установленные в данной работе преимущества НС и НС-Со перед Со (как в цитотоксическом действии на раковые клетки, так и в защитном действии на клетки печени) могут в перспективе помочь в создании препаратов, которые составят конкуренцию Со при лечении патологий печени.

Обобщающая схема действия НС, Со и НС-Со на моделях ГЦК *in vitro* и фиброза печени *in vivo* представлена на Рисунке 15.

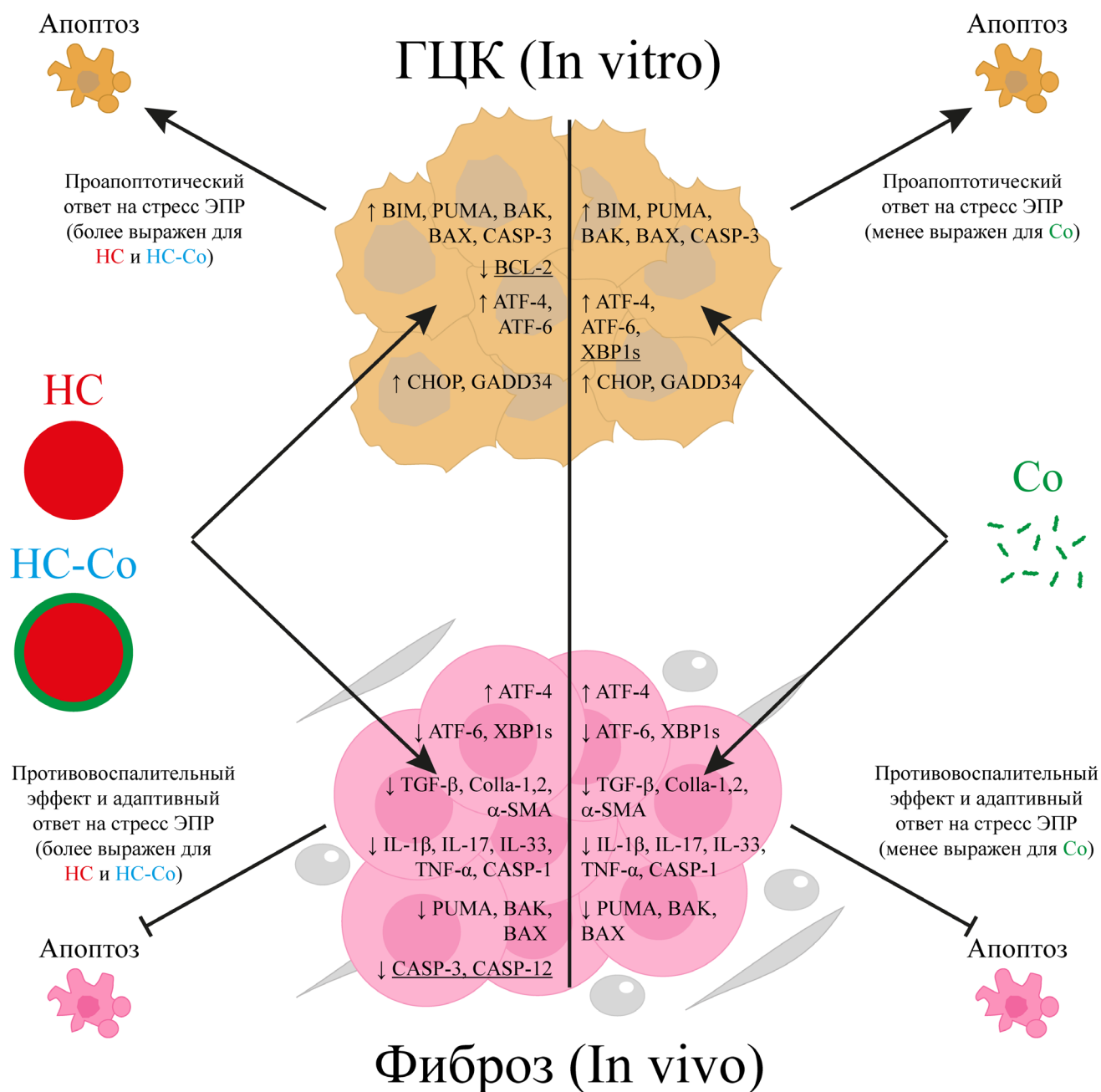


Рисунок 15. Схема действия НС, Со и НС-Со на моделях ГЦК *in vitro* и фиброза печени *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Наночастицы селена и комплекс селен-сорафениб вызывают апоптотическую гибель клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 *in vitro*. Нагрузка наночастиц селена сорафенибом не усиливает их цитотоксическое действие.

2. Наночастицы селена, сорафениб и их комплекс в равной степени вызывают подавление фиброза печени в экспериментальной модели *in vivo*.

3. Комплекс наночастиц селена и сорафениба до двух раз усиливает их противовоспалительное действие в экспериментальной модели *in vivo*.

4. Установлено, что наночастицы селена и наноконплекс селен-сорафениб в клетках HepG2 более эффективно, чем сорафениб усиливают экспрессию проапоптотических генов. Сорафениб индуцирует апоптоз раковых клеток, активируя сигнальные пути стресса ЭПР: PERK, IRE1 α и ATF-6, тогда как наночастицы селена и наноконплекс: PERK и ATF-6. Наночастицы селена и наноконплекс, в отличие от сорафениба, вызывают увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, что также можно рассматривать в качестве механизма активации апоптоза клеток HepG2.

5. Антифиброзное действие наночастиц селена, сорафениба и их комплекса связано с подавлением апоптоза клеток печени, индуцированного тиацетамидом, а также с ингибированием сигнальных путей стресса ЭПР: IRE1 α и ATF-6. Наночастицы селена и наноконплекс способны инактивировать каспазу-12, что также может ингибировать апоптоз клеток печени.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Varlamova EG, **Goltyaev MV**, Simakin AV, Gudkov SV, Turovsky EA. Comparative Analysis of the Cytotoxic Effect of a Complex of Selenium Nanoparticles Doped with Sorafenib, "Naked" Selenium Nanoparticles, and Sorafenib on Human Hepatocyte Carcinoma HepG2 Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 14;23(12):6641. doi: 10.3390/ijms23126641. PMID: 35743086; PMCID: PMC9223423.

2. **Goltyaev MV**, Varlamova EG. The Role of Selenium Nanoparticles in the Treatment of Liver Pathologies of Various Natures. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 23;24(13):10547. doi: 10.3390/ijms241310547. PMID: 37445723; PMCID: PMC10341905.

3. Varlamova EG, **Goltyaev MV**, Rogachev VV, Gudkov SV, Karaduleva EV, Turovsky EA. Antifibrotic Effect of Selenium-Containing Nanoparticles on a Model of TAA-Induced Liver Fibrosis. *Cells.* 2023 Nov 28;12(23):2723. doi: 10.3390/cells12232723. PMID: 38067151; PMCID: PMC10706216.

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

1. **Гольтяев М.В.** «Противофиброзная активность наночастиц селена, сорафениба и комплекса селен-сорафениб на модели тиацетамид-индуцированного поражения печени мыши» Тезисы докладов IV Белорусского биохимического конгресса «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» 17 мая 2024, Гродно, С. 22–23.

2. Варламова Е.Г., **Гольтяев М.В.**, Рогачев В.В., Туровский Е.А. «Молекулярные механизмы действия наночастиц селена, допированных сорафенибом, на моделях фиброза у мышей» Сборник статей Всероссийской научной конференции «Современные проблемы естественных наук и фармации», 22–24 мая 2024 г., Йошкар-Ола, Выпуск 13 С. 14–16.