

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Варламова Е.Г.

Пушино – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 Нанотехнологии в биомедицине. Наночастицы селена: способы получения, основные характеристики	11
1.1.1 Способы получения НС	12
1.1.2 Физико-химические свойства НС	13
1.2 Использование НС в терапии патологий печени различной природы. 15	
1.2.1 Гепатопротекторная функция НС при остром или хроническом воздействии на печень агентов различной природы.....	15
1.2.2 Химиопротекторная и химиосенсибилизирующая активность НС, доставка лекарств.....	19
1.2.3 Противораковая активность НС.....	21
1.2.4 Селективное действие НС по отношению к раковым клеткам.....	27
1.3 Фиброз печени.....	30
1.3.1 Молекулярные и клеточные механизмы индукции фиброза печени	30
1.3.2 Современные подходы к лечению фиброза печени.....	34
1.4 Гепатоцеллюлярная карцинома.....	35
1.4.1 Молекулярные и клеточные механизмы развития ГЦК.....	36
1.4.2 Подходы к терапии ГЦК. Сорафениб.....	38
1.5 Виды клеточной гибели.....	43
1.5.1 Программируемая клеточная гибель. Апоптоз.....	44
1.5.2 Клеточный ответ на стресс ЭПР	49
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1 Оборудование и реактивы.....	52

2.2 Получение НС и НС-Со.....	53
2.3 Характеристика наночастиц	54
2.4 Объекты исследования	56
2.5 Оценка цитотоксичности	56
2.6 Оценка апоптоза и некроза	57
2.7 Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в реальном времени ..	57
2.8 Вестерн-блоттинг (белковый иммуноблоттинг).....	59
2.9 Флуоресцентные измерения концентрации ионов кальция	60
2.10 Индукция фиброза и обработка исследуемыми агентами.....	60
2.11 Гистологический анализ печени мыши	60
2.12 Измерение активности аминотрансфераз.....	61
2.13 Статистический анализ.....	62
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1 Оценка эффективности цитотоксического действия НС, Со и НС-Со на клетки ГЦК человека HepG2 in vitro	63
3.1.1 Исследование цитотоксичности НС, Со и НС-Со в отношении клеток HepG2 in vitro	63
3.1.2. Установление типа клеточной гибели раковых клеток HepG2, активируемой 24-часовым воздействием на них НС, Со и НС-Со.....	63
3.1.3 Влияние НС, Со и НС-Со на экспрессию про- и антиапоптотических маркеров.....	67
3.1.4. Влияние сорафениба, наночастиц селена и наноконплекса селен- сорафениб на систему кальциевой сигнализации клеток HepG2	70
3.2 Оценка эффективности эффективности действия НС, Со и НС-Со на модели ТАА-индуцированного фиброза печени у мышей.....	74

3.2.1. Действие ТАА, НС, Со и НС-Со на массу тела и печени животных	74
3.2.2 Противофиброзный эффект НС, Со и НС-Со	77
3.2.3 Нормализация уровней аминотрансфераз в крови животных и снижение цитолиза под действием НС, Со и НС-Со	84
3.2.4 Сравнительный анализ паттернов экспрессии маркеров воспаления и фиброза в гепатоцитах после инъекций ТАА и последующей терапии НС, Со и НС-Со	86
3.2.5 Сравнение эффективности нивелирования последствий ТАА-индуцированных эффектов длительного стресса ЭПР и апоптоза в клетках печени после их обработки НС, Со и НС-Со	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	136
БЛАГОДАРНОСТИ	137

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. 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 (алкогольной болезни печени, гепатита), 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 наноконплексов, содержащих известные противораковые препараты [2–12].

В этом плане хорошо зарекомендовали себя наночастицы и наноконпозиты на основе селена, поскольку неоднократно показано, что данный микроэлемент и соединения различного происхождения на его основе обладают широким спектром эффектов, в том числе противораковых [13–25]. Однако, по сравнению с неорганическими и органическими селенсодержащими соединениями, наночастицы селена (НС) и наноконплексы 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 [26, 27]. Кроме того, существует большое количество работ, свидетельствующих о том, что допирование НС известными противораковыми препаратами способствует не только улучшению селективности и эффективности их действия, но и ингибированию лекарственной устойчивости

раковых клеток за счет снижения терапевтических доз препаратов в составе наноконплексов [28, 29].

Эти работы послужили весомой предпосылкой для решения актуальных проблем, связанных с нивелированием побочных эффектов Со в терапии различных патологий печени. В связи с чем, в рамках данной работы мы поставили задачу исследовать свойства нового наноконплекса, 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. Наночастицы селена и наноконплексы на их основе обладают как противораковой, так и протекторной активностью в отношении печени, что в перспективе может позволить разработать препараты двойного действия.

Степень разработанности темы. Исследования противораковых свойств селеносодержащих 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 – селеносодержащих 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 наноконплексов селена, а с другой – об их защитном, противовоспалительном действии. Сказанное в полной мере применимо к исследованиям печени как *in vitro*, так и *in vivo*. 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 противofiброзного 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 тиацетамид-индуцированного фиброза печени у мышей *in vivo*.
3. Определить ключевые молекулярные мишени, опосредующие цитотоксическое и противofiброзное действие наночастиц селена, сорафениба и их комплекса.

Научная новизна 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 НерG2, 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 тиацетамид-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 тиацетамида, 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 противофиброзных препаратов на основе НС.

Методология и методы 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 тиацетамида 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 биоинформатических 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 биологических 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 уровнем экспрессии широкого спектра маркеров воспаления, апоптоза и фиброгенеза.

Достоверность полученных результатов подтверждается их воспроизводимостью и статистической достоверностью. Представленные в диссертации результаты, прошли этап обязательного рецензирования и опубликованы в научных журналах, которые входят в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

Связь темы исследования с планом научных работ

Исследования проводились в рамках госзадания 122041200025-3 «Роль физических и химических факторов в дифференцировке соматических и

эмбриональных клеток позвоночных и беспозвоночных животных. Стрессовые белки, ферменты-антиоксиданты, регуляторные белки и пептиды в развитии патологий. Повышение устойчивости клеток и организмов к неблагоприятным воздействиям» и при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00030 «Молекулярные механизмы действия наночастиц селена, допированных сорафенибом, на моделях фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы у мышей» 2023 – 2024 гг.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на IV Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 2024) и XIII Всероссийской научной конференции «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. Основной объем экспериментальной работы (работы по клеточной и тканевой биологии) выполнен лично соискателем. Отдельные этапы работы (ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинг, анализ кальциевой сигнализации) выполнены с участием сотрудников Группы молекулярных и клеточных механизмов канцерогенеза ИБК РАН (Варламовой Е.Г. и Туровским Е.А.). Публикация результатов исследования проводилась совместно с соавторами при непосредственном участии соискателя.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Нанотехнологии в биомедицине. Наночастицы селена: способы получения, основные характеристики

Термин «наночастица» подразумевает, что ее диаметр находится в диапазоне 1–100 нм [30], что позволяет частице легко проникать в клетку посредством эндоцитоза и повышает ее реакционную способность [31]. Наночастицы различаются по происхождению (естественное и искусственное), форме (наносферы, нанозвезды, наностержни, нановолокна), способу получения (физический, химический, биологический), составу (металлы, диэлектрики, полупроводники), могут быть внутренне однородными или гетерогенными. Уникальные физические свойства наночастиц, их многообразие, высокая реакционная способность, биодоступность и относительно низкая токсичность предопределили использование нанотехнологии в биомедицине. Исторически первые исследования наночастиц были сосредоточены в области физики, позднее нанотехнологии были применены в области здравоохранения человека с многообещающими результатами, особенно в области лечения рака [32]. Последние десятилетия активно исследуются наночастицы золота, серебра, диоксида кремния, диоксида титана, диоксида циркония в медицине [33]. Поскольку хорошо известно, что селен обладает антиоксидантными и противораковыми свойствами [34], большое внимание уделяется изучению действия наночастиц селена (НС).

Противораковая активность селена хорошо известна [35], селенсодержащие препараты находят свое применение в терапии различных форм рака. Однако, 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. Для НС характерна более медленная метаболизация, при этом они легко проникают в клетку посредством эндоцитоза.

1.1.1 Способы получения НС

Публикации работ, описывающих способы получения НС и посвященные исследованием их свойств появляются в печати с начала 2000-х годов [36, 37]. В последние годы количество публикаций статей, связанных с использованием НС растет и с 2020 года превышает 300 работ в год (из индексируемых в базе данных MEDLINE, поисковая система PubMed, США). Такое количество статей обусловлено большим разнообразием способов получения и модификаций НС, однако можно выделить три основных способа: химические, биологические и физические.

Наиболее простым способом получения НС является химическое восстановление селена из его неорганических соединений: оксидов, кислот и солей. В качестве источников селена (селеновых прекурсоров) могут использоваться: диоксид селена (оксид селена (IV), SeO_2) [38], селенистая кислота (H_2SeO_3) [39], селенит натрия (Na_2SeO_3) [40], а в качестве восстановителей - любые реагенты, способные снижать степень окисления селена и приводить его в ноль-валентное состояние: аскорбиновая кислота [41], меркаптоэтанол [40], тиосульфат натрия [42]. Для получения частиц заданного размера и их стабилизации используются поверхностно-активные вещества: поливиниловый спирт [43], поливинилпирролидон [44], хитозан [45], полисорбат [41]. Альтернативным химическим способом, используемым для получения НС, является термическое разложение селенсодержащего предшественника – так называемый гидротермальный способ, который также представляет собой восстановление элементарного селена, но проходящее в водной среде при высоких температурах [46]. Однако следует отметить, что НС, полученные химическим способом, могут содержать компоненты химической реакции, что требует дополнительной очистки с целью снижения их токсичности. Поэтому часто предпочтение отдается физическим и биологическим способам синтеза НС.

Так, в последнее время большую популярность получили способы «зеленого» – биологического (биогенного) синтеза НС, основа которых – восстановление элементарного селена из селенсодержащего субстрата бактериями

(*Bacillus* sp. [47], *Paraburkholderia fungorum* [48]), растениями (*Aloe vera* [49], *Diospyros montana* [50]) или грибами (*Penicillium* sp. [51, 52]). Данные методы являются одноступенчатыми и считаются недорогими и экологически чистыми. Растительные экстракты: терпены, флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, фенольная кислота, витамины, стеролы, полисахариды, ферменты, белки могут выступать как в качестве восстанавливающих агентов, так и в качестве стабилизаторов НС, при этом данные биомолекулы, значительно менее токсичны, чем продукты химического синтеза НС. Однако, с данным преимуществом методов «зеленого» синтеза НС связаны и их недостатки: при необходимости получения чистых наночастиц следует провести очистку от всех биомолекул, находящихся в растворе.

Основными физическими способами получения НС являются: микроволновое облучение (быстрый и равномерный нагрев предшественника с последующим образованием НС) [53] и лазерная абляция [54, 55]. Лазерная абляция - способ удаления вещества с поверхности при помощи лазерного импульса. В зависимости от характеристик лазерного излучения возможно получение коллоидных растворов НС с заданным размером. Метод лазерной абляции при получении НС является наиболее перспективным, поскольку позволяет получать наночастицы в одну стадию, экологически безопасно, с низким расходом субстрата и не загрязненными ненужными химическими компонентами, а значит, не требующими дополнительной очистки. Из недостатков метода можно выделить высокую стоимость.

После синтеза НС необходимо определить физико-химические свойства наночастиц, которые непосредственно влияют на их биологическую активность.

1.1.2 Физико-химические свойства НС

Поскольку наночастицы имеют размер меньше дифракционного предела видимого света, необходимо использование электронной микроскопии: просвечивающая электронная микроскопия и сканирующая зондовая микроскопия позволяют определить форму и размеры отдельных наночастиц с высокой точностью, однако, для определения характеристик НС необходимо измерить

большое количество отдельных частиц. Для определения размера частиц применяются также спектроскопические методы рассеяния света с использованием лазера, рентгеновских лучей или рассеяния нейтронов, причем каждый метод подходит для разных диапазонов размеров и типа частиц. При определении профиля распределения НС по размерам в суспензии и их дзета-потенциала часто используется метод динамического рассеяния света (светорассеяния), (dynamic light scattering). Этот метод значительно быстрее и дешевле просвечивающей электронной микроскопии, однако, не способен определить форму наночастиц (определяет эквивалентный диаметр сферы). Таким образом, чаще всего при определении свойств НС используется комбинация методов микроскопии и спектроскопии.

Основными физическими характеристиками НС являются размер, форма и дзета-потенциал. Размер НС позволяет им проникать в клетки посредством эндоцитоза [56]. В зависимости от размера наночастицы могут проникать в клетку через клатрин-опосредованный эндоцитоз (~ 120 нм), кавеолин-опосредованный эндоцитоз (~ 60 нм), или клатрин/кавеолин независимый эндоцитоз (~ 90 нм) [57]. Подавляющее большинство НС, характеризованных в научных работах, имеют сферическую форму, значительно реже встречаются нанопроволоки [58], структуры типа «ядро-оболочка» [59, 60]. Важной характеристикой является дзета-потенциал наночастиц. Дзета-потенциал или электрокинетический потенциал, обозначаемый греческой буквой ζ (дзета) – это разность потенциалов между дисперсионной средой и неподвижным слоем жидкости, прикрепленным к диспергированной частице. Величина дзета-потенциала указывает на степень электростатического отталкивания между соседними, одинаково заряженными частицами в дисперсии. Если значение потенциала низкое, силы притяжения могут превышать силу отталкивания, и дисперсия может разрушаться и флокулировать. Таким образом, коллоиды с высоким дзета-потенциалом (по модулю) электрически стабилизированы, в то время как коллоиды с низким (по модулю) дзета-потенциалом имеют тенденцию к коагуляции и флокуляции. Считается, что значения дзета-потенциала больше -30 мВ и меньше $+30$ мВ указывают на

нестабильные условия, которые способствуют агрегации, коагуляции и флокуляции. В то же время, значения дзета-потенциала $\geq |30 \text{ мВ}|$ указывают на стабильность коллоидных растворов. При этом наночастицы с дзета-потенциалом от -10 до $+10 \text{ мВ}$ считаются примерно нейтральными, а наночастицы, дзета-потенциал которых более $+30 \text{ мВ}$ или менее -30 мВ , считаются сильно катионными или сильно анионными соответственно. Поскольку большинство клеточных мембран заряжены отрицательно, катионные частицы обычно проявляют большую токсичность, связанную с разрушением клеточной стенки [61].

1.2 Использование НС в терапии патологий печени различной природы

Печень является важнейшим метаболическим органом человека. При всем многообразии патологий печени (острое и хроническое токсическое поражение, паразитарные, инфекционные, онкологические заболевания) НС в различных исследованиях показывают хорошие результаты, подтверждающие их гепатопротекторное и противораковое действие на моделях *in vitro* и *in vivo*.

1.2.1 Гепатопротекторная функция НС при остром или хроническом воздействии на печень агентов различной природы

Показана гепатопротекторная роль НС при воздействии токсических концентраций ацетаминофена на печень крыс [62]. Ацетаминофен (парацетамол) является одним из самых широко распространенных безрецептурных жаропонижающих препаратов, при этом его токсичность является распространенной причиной отравлений во всем мире [63], в США ацетаминофен занял первое место среди причин острой печеночной недостаточности [64]. Опасность использования ацетаминофена связана с его гидроокислением цитохромом P450 и образованием токсического метаболита N-ацетил-p-бензохинонимина (NAPQI) [65]. Введение ацетаминофена крысам ожидаемо привело к значительному повышению уровня печеночных ферментов в крови: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы по сравнению с крысами в контрольной группе. Введение НС нормализовало уровни указанных ферментов, вызвало значительное повышение содержания глутатиона в печени. Кроме того, НС способствовали значительному

снижению фрагментации ДНК и восстановлению нормальной морфологии клеток. Выявлена эффективность действия НС, нагруженных лактоферрином, при печеночной недостаточности крыс, вызванной антибиотиком блеомицином [66]. Блеомицин вызывал значительное увеличение перекисного окисления липидов и уровня оксида азота (NO) в печени, уровней АСТ, АЛТ и γ -глутамилтранспептидазы в сыворотке, а также уровни фактора некроза опухоли (TNF- α), интерлейкина-1 β (IL-1 β), трансформирующего ростового фактора бета-1 (TGF- β 1), каспазы-3 (CASP-3), триглицеридов и холестерина. Последующая обработка НС во многом нивелировала указанные побочные эффекты. Показано защитное действие биогенных НС в ответ на повреждение печени у мышей, индуцированное четыреххлористым углеродом (CCl₄) [67–70]. Данное хлорорганическое соединение вызывает окислительный стресс и перекисное окисление липидов за счет опосредованной цитохромом P450 2E1 (CYP2E1) генерации высокоактивных радикалов, что в конечном итоге приводит к некрозу клеток печени [71]. НС ингибировали повышение активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы у мышей, получавших CCl₄, увеличилась активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы; уменьшились гистопатологические повреждения печени мышей. Проведены исследования защитных свойств НС на модели повреждения печени мыши, индуцированного конканавалином А [72]. Конканавалин А – белок растительного происхождения, который вызывает TNF-опосредованный апоптоз гепатоцитов [73]. В работе использовались НС, стабилизированные хитозаном – катионным полисахаридом природного происхождения [74]. Присутствие НС ингибировало некроз гепатоцитов, снижало повышенный уровень АЛТ, АСТ и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови у мышей из опытных групп, повышало активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы. Также обнаружено, что НС, стабилизированные хитозаном, облегчают течение неалкогольной жировой болезни печени, вызванной диетой с высоким содержанием жиров, путем модуляции барьерной функции кишечника и микробиоты [75]. Показано ингибирование НС патулин-индуцированного

поражения печени [76]. Патулин - водорастворимый и термостабильный микотоксин, продуцируемый плесневыми грибами родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Byssoschlamys*, обладающий токсичностью в отношении желудочно-кишечного тракта, почек, легких и печени [77, 78]. Добавление НС до введения патулина значительно увеличило процент жизнеспособных клеток, снизило производство активных форм кислорода, нормализовало уровень малонового диальдегида и супероксиддисмутазы.

В ряде исследований показана активность НС при отравлении печени тяжелыми металлами. Так, было изучена способность НС, полученных «зеленым» способом с использованием молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei*, противостоять гепатотоксическим эффектам, вызванным кадмием [79]. Известно, что кадмий вызывает структурные и функциональные нарушения в клетках за счет увеличения перекисного окисления липидов, повышает уровень печеночных трансаминаз (АЛТ и АСТ) в крови и нарушает проницаемость клеточных мембран [80]. Классическое лечение последствий токсического воздействия тяжелых металлов и, в частности, кадмия основано на хелатной терапии с использованием различных химических хелаторов, которые могут иметь ряд побочных эффектов, таких как перегрузка почек, остановка сердца, дефицит минералов и анемия [81]. Альтернативным лечением в данных случаях может стать использование питания с содержанием НС. Терапия НС снизила уровни АЛТ, АСТ, увеличила активность каталазы, предотвратила появление патологических изменений в структуре клеток печени, снижала экспрессию *BAX* и восстанавливала экспрессию *BCL-2*, тем самым подавляя апоптоз. Кроме того, снижалась экспрессия *TNF-α*, *IL-6*, ядерного фактора *κB* (NF-κB) и *p65*, что снижало воспаление и повышало выживаемость клеток. Также описано защитное действие НС, биосинтезированных в *Lactobacillus plantarum*. Введение обогащенной селеном *L. plantarum* снизило накопление кадмия в печени почти на 50% и восстановило маркеры повреждения, вызванного кадмием, до нормальных уровней [82]. Кроме того, было показано, что хлорид кадмия индуцирует повреждение гепатоцитов мыши, вызывая ферроптоз, в то время как НС, стабилизированные хитозаном, оказывали противоположный

эффект, ингибируя ферроптоз и снижая степень повреждения гепатоцитов. Хлорид кадмия вызывал значительное увеличение содержания малонового диальдегида в печени, АЛТ и АСТ в сыворотке, а также вызвал существенное снижение активности глутатионпероксидазы в сыворотке. Действие НС повысило уровень экспрессии глутатионпероксидазы 4, снизило экспрессию генов, связанных с ферроптозом, и подавило выработку активных форм кислорода [83]. Другим хорошо известным тяжелым металлом является свинец, который в больших концентрациях способен накапливаться в печени и почках [84], при этом классическим способом быстро снизить его высокое содержание в крови остается хелатная терапия. Наиболее часто среди хелатирующих агентов используются этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) [85], дитиоловые препараты [86], однако они обладают побочными эффектами, поскольку кроме свинца связывают микроэлементы, вызывая их дефицит в организме. Данные эффекты привели к необходимости поиска альтернативных препаратов, в том числе и среди наночастиц.

Было проведено исследование, демонстрирующее роль биогенных НС и *Lacticaseibacillus rhamnosus*, обогащенных НС (лакто-НС) в нивелировании последствий токсического воздействия свинца на печень. Введение лакто-НС снизило уровень ферментов: АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, γ -глутамилтранспептидазы до контрольного, а использование НС приводило лишь к восстановлению уровней АЛТ и γ -глутамилтранспептидазы. Также снижались уровни общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови, повышался уровень глутатиона в клетках. В результате ионы свинца переходили в нерастворимую форму и выводились из организма [87]. Выявлена защитная роль НС при воздействии свинца и высокотемпературного стресса на рыб *Pangasianodon hypophthalmus* [88]. Добавление в рацион НС в дозах 1 мг/кг рациона значительно снизило уровни лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в печени, более того, диетические добавки НС значительно повысили активность пируваткиназы, глюкокиназы, гексокиназы, щелочной фосфатазы, АТФазы, протеазы, амилазы, липазы и соотношение РНК/ДНК у рыб.

Показана защитная антиоксидантная роль НС против гепатотоксического действия акриламида, который способен вызывать снижение уровня восстановленного глутатиона в печени, увеличение сывороточного уровня печеночных ферментов (АЛТ, АСТ) и малонового диальдегида, а также снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы [89]. Действие НС приводило к значительному снижению экспрессии *TNF-α*, нормализовало уровни каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы. Наблюдалось улучшение гистологической картины тканей печени [90].

Есть данные об ослаблении НС повреждений печени, вызванных микропластиком [91, 92]: НС препятствуют сигнальному пути воспалительных везикул NF-κB/NLRP3, что имеет решающее значение для уменьшения воспаления, вызванного полистирольным микропластиком.

Показано снижение окислительного стресса и воспаления при тиацетамид (ТАА)-индуцированном фиброзе печени в результате применения НС, при этом защитный эффект НС превосходил эффект Se в свободной форме [93, 94]. ТАА представляет собой сероорганическое соединение с формулой C_2H_5NS , способное вызывать острый или хронический фиброз и цирроз печени у экспериментальных животных [95]. Введение ТАА крысам вызывает печеночную энцефалопатию, метаболический ацидоз, повышение уровня трансаминаз, аномальную коагулопатию и центрилобулярный некроз. ТАА подвергается биоактивации в печени цитохромом P450 (CYP450 2E1), что приводит к образованию ТАА-S-оксида и ТАА-S-диоксида. ТАА-S-диоксид индуцирует окислительный стресс посредством перекисного окисления липидов гепатоцеллюлярной мембраны [96]. Описанные выше процессы способны приводить к развитию ГЦК [97, 98].

1.2.2 Химиопротекторная и химиосенсибилизирующая активность НС, доставка лекарств

В настоящее время идет поиск путей применения НС для снижения негативных последствий химиотерапии, и одновременно — повышения эффективности химических противораковых препаратов и их направленной доставки к очагу заболевания. Так известно, что одним из важных побочных

эффектов химиотерапии является окислительный стресс в здоровых клетках и тканях. Например, циклофосфамид - широко используемый цитостатический противоопухолевый препарат алкилирующего типа действия, обладает подобным побочным действием. Введение НС перед инъекциями циклофосфамида способствовало снижению уровней активных форм кислорода, перекисного окисления липидов, активности АЛТ и АСТ в сыворотке; росту концентрации восстановленного глутатиона, активности глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы, уровня гемоглобина в крови; также в группе, получавшей НС, не наблюдался гепатоцеллюлярный некроз [99, 100].

Окислительный стресс также вызывает доксорубин, антрациклиновый антибиотик, выделенный из *Streptomyces peucetius* или *Streptomyces coeruleorubidus* и обладающий хорошо известной противоопухолевой активностью, при этом основным механизмом токсичности доксорубина является образование активных форм кислорода, влияющих на макромолекулы [101]. Кроме того, данный препарат способен интеркалировать в ДНК и ингибировать последующий синтез белков [102], кроме того присутствует и органная токсичность, в том числе и в отношении печени [103]. Было установлено, что доксорубин, конъюгированный с НС, снижал фрагментацию ДНК, уровни активных форм кислорода, концентрацию нитратов/нитритов, вызывал рост активности антиоксидантных ферментов [104, 105]. Показано противодействие гепатотоксичности, вызванной доксорубином, комплекса НС с экстрактом куркумы [105]. Так, высокие уровни АЛТ, АСТ в сыворотке, и общего билирубина, были значительно снижены терапией НС. Кроме того, НС противодействовали окислительному стрессу печени, на что указывало снижение уровней малонового диальдегида и NO, а также повышение уровней супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и восстановленного глутатиона. Снижение уровней IL-1 β , TNF- α , NF- κ B и p65 в печени, обработанных НС, указало на их мощное противовоспалительное воздействие.

Описано использование НС в качестве агента для доставки полипиридила рутения [15]. Полипиридил рутения - комплекс, обладающий противораковой активностью, в том числе, в отношении рака печени [106]. Поскольку ранее была показана способность НС выступать в роли транспортера противораковых препаратов [107, 22], эту функцию НС, допированных фолиевой кислотой, использовали для доставки полипиридила рутения в клетки R-НерG2 и НерG2 для активации их апоптотической гибели.

Продemonстрировано использование НС в качестве транспортера в клетки НерG2 малой интерферирующей РНК (миРНК, siRNA) [108]. Возможность применения генной противораковой терапии с использованием технологии малых интерферирующих РНК активно исследуется в последнее время [109], при этом, как правило, в качестве средства доставки используются вирусы [110]. Однако из-за иммуногенности и риска инсерционного мутагенеза в последнее время идет разработка способов невирусной доставки генов [111]. В работе использовали миРНК, направленную на подавление гена *HES5*, кодирующего фактор транскрипции, который играет важную роль в инициации и развитии рака [112]. Полученный комплекс эффективно подавлял экспрессию *HES5*, что сопровождалось ингибированием пролиферации клеток НерG2 и остановкой клеточного цикла в фазе G0/G1 и вызывало ингибирование роста опухоли, что было продемонстрировано в исследованиях *in vivo*.

1.2.3 Противораковая активность НС

В целом ряде работ продемонстрирована противораковая активность НС как самих по себе, так и в составе различных комплексов.

Противоопухолевый эффект на модели клеток НерG2 показан для биогенных НС [113]. Установлено, что НС даже в низких концентрациях обладают сильным ингибирующим действием на пролиферацию, миграцию и инвазию клеток НерG2. Описан апоптоз клеток НерG2 под действием экзополисахарид-НС через внутренние митохондриально-опосредованные и внешние пути, опосредованные рецепторами смерти [114]. Экзополисахарид-НС эндоцитировались клетками НерG2 через клатрин-опосредованный путь и увеличивали экспрессию *BAХ*,

цитохрома с, активных форм *CASP-9*, *CASP-3*, *CASP-8*, а также опухолевого супрессора – белка *p53* (*p53*) и одновременно снижали экспрессию *BCL-2*. Зафиксирована противораковая активность НС в клетках НерG2 посредством регуляции HIF-1 α и HIF-2 α (фактора 1, индуцируемый гипоксией) в условиях гипоксии [115]. Было обнаружено, что НС вызывают гибель клеток НерG2 как в физиологических, так и в гипоксических условиях пропорционально их концентрации. Внутриклеточное накопление селена не зависело от гипоксии, гибель клеток НерG2, вызванная НС, была обусловлена повреждением ДНК, конденсацией хроматина и нарушением мембранного потенциала митохондрий. Кроме того, было обнаружено, что НС снижают транслокацию HIF из цитозоля в ядро. Описано эффективное ингибирование клеток НерG2 комплексом сезамол-полиэтиленгликоль-НС [116]. Сезамол (3,4-метилendioксифенол) обладает противовоспалительной [117] и противораковой [118] активностью, однако его применение ограничено низкой стабильностью и быстрым выведением из организма, поэтому существует необходимость разработки комплексов для доставки и повышения его эффективности. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) представляет собой амфифильную молекулу и широко используется для доставки лекарств и стабилизации наночастиц [119]. Апоптотическая активность комплекса сезамол-ПЭГ-НС была связана с подавлением *BCL-2*, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), повышением активности BAX и выбросом цитохрома с в цитозоль. ПЭГ-НС проявляли дозозависимую цитотоксичность как в отношении клеток НерG2, так и R-НерG2 [120], при этом наночастицы показали гораздо более низкую цитотоксичность по отношению к здоровым клеткам (клетки НК-2 почки человека). Зафиксирована индукция апоптоза в клетках R-НерG2 и НерG2, что подтверждалось фрагментацией ДНК, конденсацией хроматина и митохондриальной дисфункцией. НС, полученные путем восстановления селена из селенита натрия водным экстрактом боярышника *Crataegus hupehensis*, также вызвали апоптоз клеток НерG2 после 24 часов воздействия на клетки 5, 10 и 20 мкг/мл НС [121]. Молекулярный механизм апоптотической гибели этих клеток заключался в повышении наночастицами внутриклеточных уровней активных

форм кислорода, снижении митохондриального мембранного потенциала, повышении уровня *CASP-9* и снижении экспрессии *BCL-2*. Также было показано, что наноконплекс НС со спирторастворимым полисахаридом астрагала проявлял цитотоксичность в отношении раковых клеток линии HepG2 [122]. Ранее описана его противоопухолевая активность: полисахарид астрагала ингибировал рост солидных опухолей H22 (ГЦК) у мышей за счет повышения уровня сывороточных цитокинов (TNF- α и IL-2) и активности иммунных клеток (макрофагов, лимфоцитов и NK-клеток), индуцируя апоптоз опухолевых клеток [123]. В данном наноконплексе НС активировали в клетках HepG2 митохондриально-опосредованный апоптоз, индуцируя накопление внутриклеточных активных форм кислорода, повышая соотношение BAX/BCL-2 и способствуя высвобождению цитохрома c. В другой работе также был продемонстрирован значительный антипролиферативный эффект НС, стабилизированных полисахаридом гриба *Morchella sextelata*, на клетки HepG2 и HeLa in vitro [124]. Гибель клеток HepG2 была вызвана активацией митохондриально-зависимого пути апоптоза, поскольку уровни экспрессии *p53*, *BAX*, цитохрома c, *CASP-3* и *CASP-9* были повышены в клетках HepG2 после обработки НС, в то время как экспрессия *BCL-2* была снижена. Похожее цитотоксическое действие на клетки HepG2 было установлено и при исследовании комплекса берберин-НС [125], который вызывал апоптоз раковых клеток посредством повышения уровня *p53*, *BAX*, цитозольного цитохрома c и активности *CASP-3*, а также снижения уровня *BCL-2*. Кроме этого наблюдалось значительное дозозависимое повышение уровня воспалительных маркеров (TNF- α , NF- κ B и COX-2) и остановка клеточного цикла в фазе G1 из-за уменьшения экспрессии циклина D1 и CDK-2. Также данный наноконплекс вызвал значительное дозозависимое увеличение активности лактатдегидрогеназы и усиление окислительного стресса в клетках HepG2. Описана активация апоптоза (как рецептор-опосредованного, так и митохондриально-опосредованного) в клетках HepG2 при действии НС, стабилизированных трехспиральным β -глюканом [126]. Проведен анализ действия химически синтезированных НС разного размера in vivo на клетки ГЦК мыши H22 [23]. НС при дозировке 0,7 мг Se/кг ингибировали

рост раковых клеток H22 на 82% и 99% для НС большого и малого размера соответственно. Таким образом, НС малого размера показали значительно большую эффективность, очевидно, вследствие большей площади поверхности. В работе других авторов была зафиксирована противораковая активность комплекса селен-замещенного гидроксиапатита [18], который является основным неорганическим минералом в твердых тканях человека и животных, включая кости и зубную эмаль, ранее было установлено, что его наночастицы индуцируют апоптоз и ингибируют клетки ГЦК [127]. Полученный наноконплекс показал противоопухолевую активность в отношении клеток ГЦК человека HSCLM9 путем снижения выросшей ферментативной активности АЛТ, АСТ и лактатдегидрогеназы в сыворотке и метастатической активности. Описано действие НС на ГЦК крыс, вызванную N-нитрозодиэтиламино [128], который, как известно, обладает мутагенной и канцерогенной активностями в том числе в отношении печени [129]. Скорость некроза/апоптоза в клетках опухоли была максимальной в группе, получавшей НС, полученные данные подтверждаются гистопатологическим исследованием.

Описано подавление ТАА-индуцированной ГЦК, наноконплексом, состоящем из НС и кверцетина [130]. Кверцетин представляет собой полифенольный флавоноид растительного происхождения, обладающий антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [131]. Также кверцетин продемонстрировал высокую эффективность в отношении различных видов рака, в том числе ГЦК [132]. Внутривентрикулярные инъекции НС, содержащими кверцетин и без него, способствовали снижению в сыворотке уровней АЛТ, АСТ, общего билирубина, снижению уровней IL-33, IL-1 β и IL-6, малонового диальдегида в печени, и росту уровней восстановленного глутатиона и глутатионпероксидазы, подавляло прогрессирование ГЦК у крыс за счет усиления окислительного стресса и предотвращения нарушения регуляции пути p53/ β -катенин/циклин D [130]. Показано преодоление при помощи НС резистентности к сорафенибу у крыс с ГЦК, индуцированной ТАА [133]. В группе, получавшей ТАА были повышены сывороточные уровни АСТ, АЛТ, γ -глутамилтранспептидазы и малонового

диальдегида и снижен уровень глутатионпероксидазы. Пероральное введение НС, сорафениба и их комбинации в значительной степени устраняло негативные эффекты, вызванные ТАА. Воздействие комбинацией НС+сорафениб вернуло сывороточные уровни АСТ, γ -глутамилтранспептидазы и глутатионпероксидазы к нормальным значениям, чего не наблюдалось в группе животных, получавших только сорафениб. НС способствовали прекращению ингибирования экспрессии *p53*, активировали апоптотический путь CASP-3 и BAX и подавляли антиапоптотический эффект BCL-2. Было установлено, что комбинированная терапия НС+сорафениб уменьшает резистентность клеток ГЦК к сорафенибу за счет воздействия на пути мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) и NF- κ B, а также снижает уровни CD34 и, таким образом, уменьшает ангиогенез и метастазирование [133].

Таким образом, в целом ряде работ показано гепатопротекторное действие НС, их противовирусная, антибактериальная и антипаразитарная активность (как в чистом и стабилизированном различными агентами виде, так и в форме бактерий, обогащенных НС). Гепатопротекторный механизм действия НС основан, преимущественно, на их антиоксидантном потенциале. При терапии наночастицами происходит снижение уровня печеночных ферментов в крови (в первую очередь АЛТ, АСТ), повышенного в результате действия гепатотоксина. Кроме того, терапия НС снижает уровень щелочной фосфатазы, малонового диальдегида, лактатдегидрогеназы в крови, повышает активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы и тиоредоксинредуктазы (TXNRD), снижается уровень внутриклеточных активных форм кислорода, соотношение восстановленный глутатион/дисульфид глутатиона возвращается в норму. Воздействие НС приводит к снижению экспрессии *TNF- α* , *IL-6*, *NF- κ B*, *BAX*, увеличению экспрессии *BCL-2*. В ряде работ по изучению противораковой активности НС показана их прооксидантная активность в отношении раковых клеток. На фоне сохраняющейся нормализации уровней АЛТ, АСТ, γ -глутамилтранспептидазы, глутатионпероксидазы, лактатдегидрогеназы, малонового диальдегида происходит рост синтеза активных

форм кислорода, активация антиопухолевых факторов (TNF- α) и факторов апоптоза (повышение уровня BAX, снижение BCL-2) в раковых клетках.

Суммарная информация об активности НС по литературным данным представлена на Рисунке 1 и в Таблице 1.

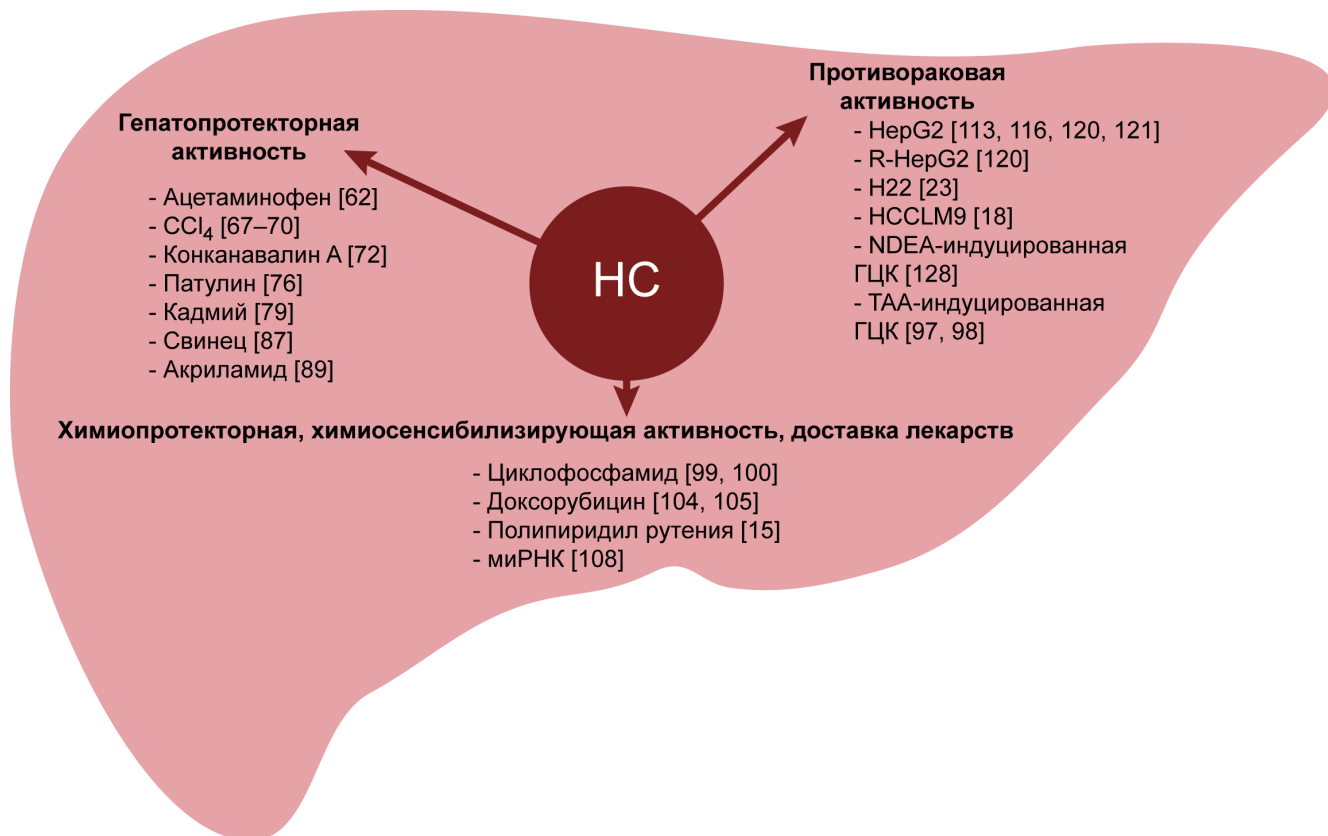


Рисунок 1. Роль НС в лечении патологий печени различной природы [Goltyaev, 2023].

	Гепатотоксические эффекты	Активность НС
Гепатотоксические агенты	АЛТ, АСТ	АЛТ, АСТ
	BAX, TNF- α , IL-6 BCL-2	BCL-2 BAX, TNF- α , IL-6
Химиопротекция и химиосенсибилизация	АЛТ, АСТ	АЛТ, АСТ
	BCL-2	BCL-2
ГЦК	АЛТ, АСТ	АЛТ, АСТ
	IL-33, IL-1 β , IL-6	TNF- α , BAX, CASP-3 BCL-2, IL-33, IL-1 β , IL-6

Таблица 1. Активность НС в отношении различных агентов. Показатели, которые выросли, выделены красным, показатели, которые снизились, выделены синим.

1.2.4 Селективное действие НС по отношению к раковым клеткам

Из приведенных в Таблице 1 данных видно, что при терапии НС после воздействия гепатотоксических агентов понижаются или нормализуются уровни многих ферментов, НС проявляют антиоксидантную активность, снижая уровень активных форм кислорода, снижается уровень провоспалительных цитокинов. При этом при воздействии на раковые клетки ГЦК, НС напротив, демонстрируют прооксидантное поведение. Данный парадоксальный эффект проявляется как *in vitro*, так и *in vivo* и характерен не только для НС, но и для других соединений селена. Чем он может быть вызван? НС проникают в клетку через механизмы эндоцитоза и в дальнейшем покидают эндосомы и происходит метаболизация неорганического селена, аналогичная селениту/селениду с той разницей, что метаболизация селена из наночастиц происходит медленнее, что в частности обуславливает их меньшую цитотоксичность [134]. Ключевым метаболитом селеновых соединений является селенид водорода, который впоследствии превращается в селенофосфат с помощью селенофосфатсинтетазы-2, что является ключевым этапом биосинтеза селеноцистеина и селенопротеинов (в том числе антиоксидантов) [135]. При этом существует строгая физиологическая регуляция способности биосинтеза селенопротеинов в клетках эукариот при добавлении селена в любой химической форме. Эффект ферментативного и белкового

насыщения обнаруживается при оптимальном уровне поступления селенсодержащих компонентов. При этом условии любое избыточное поступление селена приводит к усилению метаболизма, но незначительному увеличению биосинтеза селенопротеина или его полному отсутствию. Многие из этих метаболитов, включая селенид водорода и метилселенол, обладают высокой окислительно-восстановительной активностью и генерируют активные формы кислорода при реакции с тиолами и их окислении. Следовательно, добавление сверхфизиологических уровней соединений селена может приводить к индукции окислительного стресса.

Раковые клетки обычно демонстрируют более высокий базовый уровень активных форм кислорода по сравнению с здоровыми клетками. Повышение базового уровня активных форм кислорода и сопутствующая активация систем антиоксидантной защиты являются патофизиологическими адаптациями раковых клеток, способствующими малигнизации. Однако раковые клетки имеют более низкую толерантность к повышенным уровням активных форм кислорода по сравнению с здоровыми клетками, что обеспечивает окно для терапевтических вмешательств с помощью окислительно-восстановительных соединений селена (Рисунок 2).

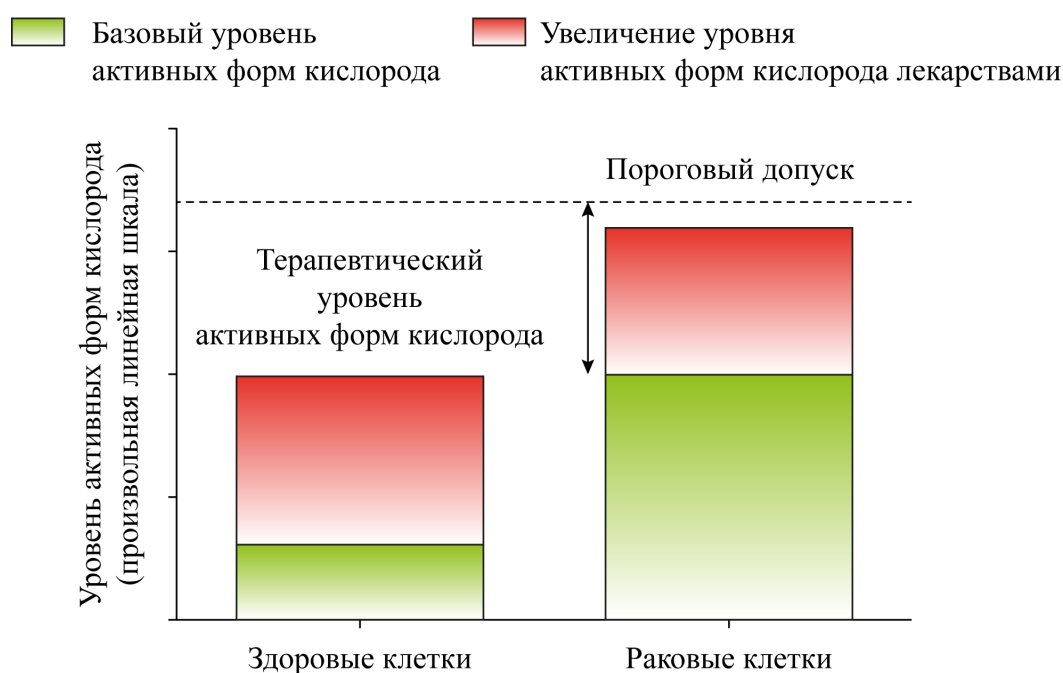


Рисунок 2. Влияние повышенного уровня активных форм кислорода на здоровые и раковые клетки (рисунок адаптирован из статьи [136]).

Этот эффект применим не только к наночастицам, но и к соединениям селена вообще, что подтверждается противораковой активностью как органических, так и неорганических соединений селена. Достижение порога толерантности к активным формам кислорода в раковых клетках с одной стороны вызывает нарушение целостности митохондриальной мембраны, вызывая утечку митохондриальных белков, а с другой стороны приводит к стрессу эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Разрушение мембраны митохондрий приводит к утечке различных белков и запускает апоптоз посредством активации каспаз. Это стрессовое состояние клетки координирует активацию нескольких молекулярных сигнальных путей, включая MAPK/Erk, PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, Wnt/ β -катенин и пути апоптоза. Путь NF- κ B запускает окислительный стресс и нарушает клеточный гомеостаз посредством воспаления. Сигнальные пути PI3K/Akt/mTOR, MAPK/Erk, VEGF и Wnt/ β -катенин важны для онкогенной передачи сигналов, и их модуляция с помощью НС нарушает клеточную пролиферацию и препятствует передаче сигналов, стимулирующих рост, в микроокружении раковых клеток. Кроме того, НС снижают передачу ангиогенных сигналов в опухолевых клетках, дополнительно ингибируя пролиферацию и рост. Консолидация этих разрушительных клеточных событий начинается с разрушения ДНК, что приводит к остановке клеточного цикла и, в конечном итоге, к гибели клеток [134].

Следует отметить, что метилселенол, один из ключевых метаболитов селена в клетке, обладает противораковой активностью [137], что также может быть одной из причин противораковой активности НС.

Селективность НС по отношению к раковым клеткам *in vivo* может быть вызвана эффектом повышенной проницаемости и удерживания (the enhanced permeability and retention effect, EPR) [138]. Существует концепция, согласно которой молекулы определенных размеров (обычно липосомы, наночастицы и макромолекулярные препараты) склонны накапливаться в опухолевой ткани в гораздо большей степени, чем в здоровых тканях. Для быстрого роста опухолевых клеток необходим активный ангиогенез, агрегаты опухолевых клеток начинают зависеть от кровоснабжения, осуществляемого новой сосудистой сетью. Кроме

того, в опухолевых тканях обычно отсутствует эффективный лимфодренаж. Все эти факторы приводят к аномальной динамике молекулярного и жидкостного транспорта, особенно для макромолекулярных препаратов. Кроме того, показано, что в брюшной полости скорость клиренса НС была ниже, чем в плазме, поэтому они могут повышать концентрацию лекарственного средства вблизи перитонеальной полости[139].

1.3 Фиброз печени

Множеству заболеваний печени предшествует или сопутствует фиброз. Фиброз печени, представляющий собой разрастание соединительной ткани с последующим рубцеванием и замещением паренхимальной ткани, не считается отдельной болезнью, однако может присутствовать при многих заболеваниях печени: инфекции различной природы, острое или хроническое токсическое поражение, аутоиммунная болезнь печени. Агенты, вызывающие фиброз, могут в дальнейшем вызвать образование опухолей, малигнизацию клеток и формирование рака печени [140].

1.3.1 Молекулярные и клеточные механизмы индукции фиброза печени

Активация процесса фиброза в печени связана с клетками Купфера - макрофагами, располагающимися во внутреннем пространстве синусоидов печеночной дольки. Клетки Купфера обладают пролиферативной способностью и в норме участвуют в метаболизации веществ липидной природы, переработке гемоглобина, удалении апоптотических клеток из кровотока. Популяция клеток Купфера неоднородна: клетки в перипортальной зоне печеночной дольки в большей степени подвергаются воздействию кровотока и проявляют большую лизосомную активность для более эффективной обработки поступающих чужеродных веществ. Клетки в перицентральной зоне меньше подвержены действию перфузии и обладают большими запасами супероксида для борьбы с глубоко проникающими инфекционными и токсическими агентами. Клетки Купфера способны активироваться двумя различными путями (Рисунок 3А) и, соответственно, выполнять различные функции в разном микроокружении: M1 (классическая активация) и M2 (альтернативная активация) [141]. Клетки в M1-

состоянии продуцируют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли (TNF- α), IL-6, IL-12; M2-поляризованные клетки напротив – продуцируют большое количество противовоспалительных медиаторов, например, интерлейкин-10 (IL-10). Экстраклеточные везикулы, секретируемые M1-макрофагами, могут активировать воспалительный путь NLRP3 у гепатоцитов, пролиферацию гепатоцитов, способствовать фиброзу печени и секреции воспалительных факторов, включая iNOS, IL-6 и TNF- α , вызывая повреждение печени. В то же время, гепатоциты, подвергшиеся стрессу, могут секретировать экстраклеточные везикулы, содержащие miR-192-5p, TRAIL и CD40L, что, в свою очередь, способствует M1 поляризации макрофагов [141] (Рисунок 3Б).

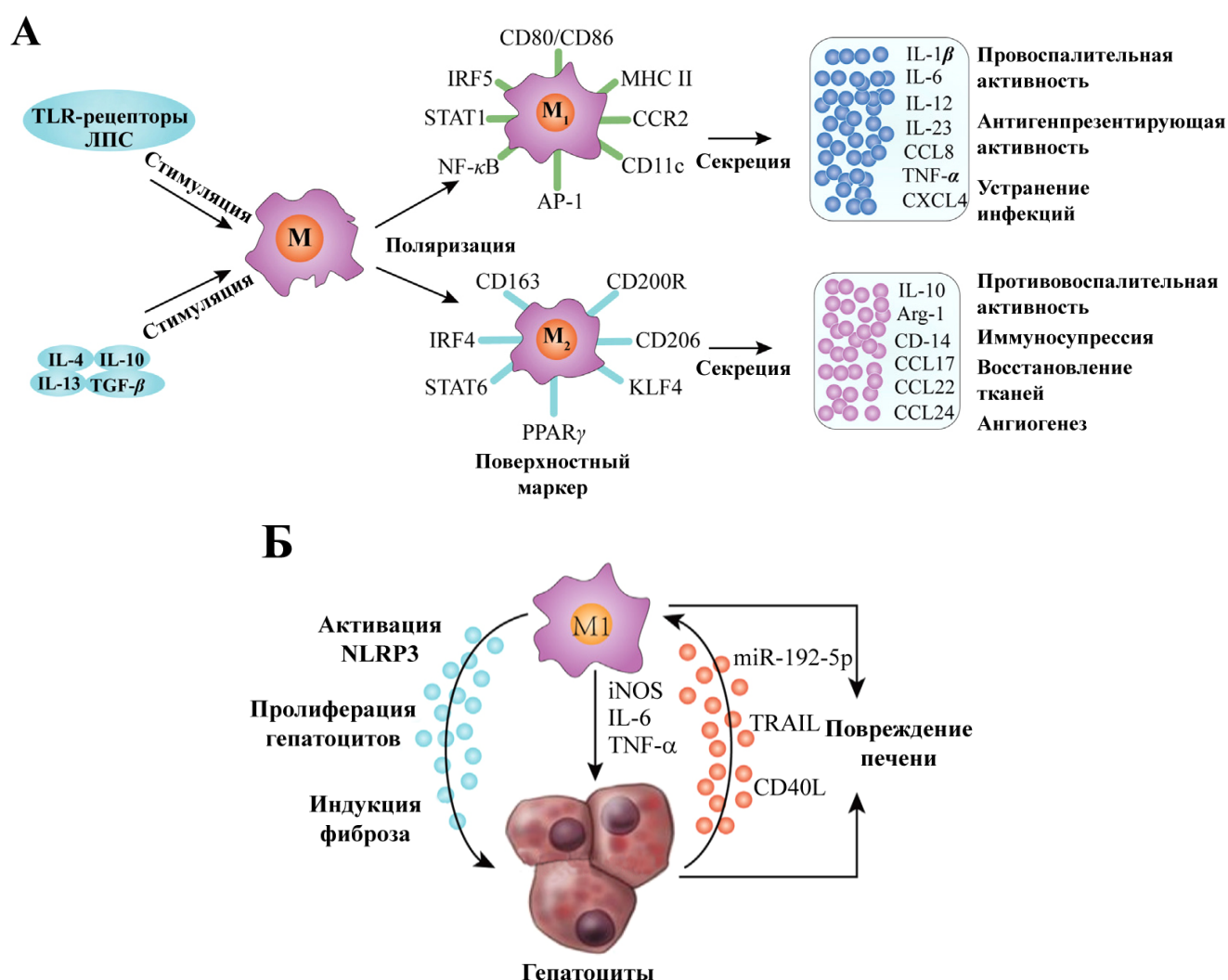


Рисунок 3. А. Поляризация и фенотипы макрофагов. Стимуляция передачей сигналов рецептора TLR или воздействием IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- β побуждает макрофаги принимать фенотипы M1 или M2 соответственно, что заставляет эти подтипы макрофагов секретировать различные наборы цитокинов и хемокинов,

которые оказывают провоспалительный или противовоспалительный эффект. Б. Экстраклеточные везикулы М1-макрофагов, активируют воспалительный путь NLRP3 и вызывают фиброз печени, при этом сами гепатоциты, секретируют экстраклеточные везикулы, содержащие miR-192-5p, TRAIL и CD40L, что способствует М1 поляризации макрофагов. (рисунок адаптирован из статьи [141]).

Механизм активации фиброза можно рассмотреть на примере действия этанола, который увеличивает проницаемость кишечного эпителия, в результате чего эндотоксины, продуцируемые кишечной флорой, поступают из просвета кишечника в печень через воротную (портальную) вену. В ответ на поступление эндотоксина на клетках Купфера активируются рецепторы TLR4 и CD14 которые распознают и интернализируют эндотоксин [142]. Активация данных рецепторов вызывает избыточное поглощение токсинов (в том числе эндотоксинов кишечных бактерий) и сильную М1-поляризацию клеток Купфера. Активированные клетки Купфера продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли (TNF- α) с одновременным производством супероксидов. Если провоспалительные цитокины и супероксиды продолжают вызывать воспаление и окислительное повреждение соответственно, то TNF- α активирует звездчатые клетки печени (клетки Ито), находящиеся в пространстве Диссе и представляющие собой перициты (отростчатые клетки соединительной ткани) [143]. В норме звездчатые клетки печени накапливают жирорастворимые витамины (витамин А в виде эфира ретинола), при активации клеток количество депонированного витамина А постепенно снижается. Активированные клетки Ито являются основным источником внеклеточного коллагенового матрикса при фиброзе печени [144].

Первичное накопление компонентов внеклеточного матрикса (в первую очередь коллагена), синтезируемого звездчатыми клетками, происходит в районе портальных триад (портальный фиброз) (Рисунок 4А). Далее соединительная ткань распространяется в перипортальном пространстве, начинается перипортальный фиброз (Рисунок 4Б). В дальнейшем, если воздействие гепатотоксического агента продолжается, могут образовываться мостики (перегородки, септы) из соединительной ткани: сначала соединяющие портальные триады (портально-

портальные), а затем и соединяющие портальные триады с центральной веней (портально-центральные) - мостовидный (септальный) фиброз (Рисунок 4В). При дальнейшем прогрессировании заболевания или поступлении агента, вызывающего фиброз образуются узлы из соединительной ткани, их размер увеличивается, происходит необратимое замещение паренхимы печени фиброзной соединительной тканью - цирроз печени (Рисунок 4Г).

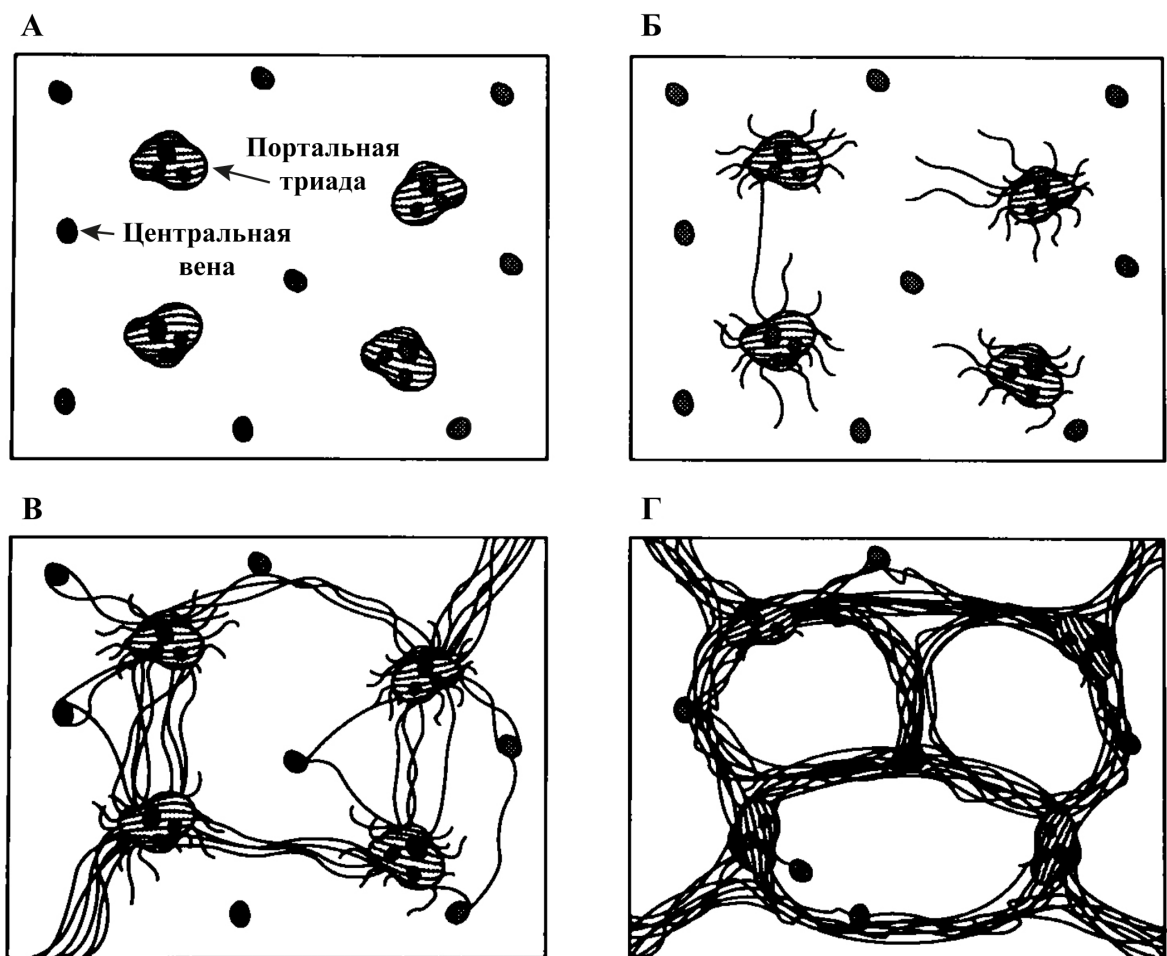


Рисунок 4. Схема стадий фиброза печени А. Портальный фиброз. Б. Перипортальный фиброз. В. Септальный фиброз. Г. Цирроз (рисунок адаптирован из статьи [145]).

В зависимости от размера узлов различают три макроскопических типа цирроза печени: микронодулярный (цирроз Лаеннека или портальный цирроз, регенерирующие узелки имеют размер менее 3 мм), макронодулярный (постнекротический цирроз, узлы имеют размер более 3 мм) и смешанный цирроз (присутствуют узелки разного размера). Некротическое поражение печени

происходит по сходному сценарию: частичный (фрагментарный) некроз начинается с разрушения гепатоцитов по краям портального тракта и связан с инфильтрацией лимфы в прилежащую паренхиму. При развитии заболевания некроз может перейти в сливной. При распространении от одной доли к другой возникает мостовидный некроз, он также может иметь как портально-портальный центрально-центральный характер.

1.3.2 Современные подходы к лечению фиброза печени

Повреждения печени, вызванные фиброзом и, особенно, циррозом невозможно нивелировать полностью, однако своевременное лечение может задержать или полностью остановить прогрессирование заболевания и уменьшить сопутствующие осложнения. В первую очередь необходимо исключить дальнейшее воздействие агента, вызвавшего фиброз. В случае с поражением инфекционной природы – уничтожение возбудителя антибиотиками, противовирусными препаратами прямого действия, антипаразитарными препаратами; в случае алкогольной болезни печени – прекращение приема алкоголя; при неалкогольной жировой болезни печени – снижение веса; при фиброзе и циррозе, вызванным болезнью Вильсона – исключение дальнейшего поступления меди в организм. Однако часто только прекращения воздействия агента, вызвавшего фиброз недостаточно, необходим прием специализированных препаратов. В случаях тяжелого поражения применяется трансплантация печени, однако она может лишить проблему широко распространенного фиброза и цирроза лишь частично, поскольку, во-первых, доступна лишь небольшому числу пациентов, во-вторых, требует применения иммуносупрессоров.

В настоящее время исследуется ряд специализированных антифиброзных и антициррозных препаратов. Для потенциальной терапии алкогольной болезни печени исследуется силимарин [146], S-аденозил-L-метионин [147], пропилтиоурацил [148], пентоксифиллин [149, 150], кортикостероиды [150], инфликсимаб [151]. Однако все указанные препараты имеют множество недостатков: описан их токсический эффект, кроме того в ряде случаев сведения об их терапевтическом эффекте противоречивы. Считается, что в настоящее время

не существует эффективного препарата для терапии алкогольной болезни печени. В случае с неалкогольной жировой болезнью печени исследуются ланифибранор [152], семаглутид [153] – агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), который является эффективным препаратом для лечения ожирения, значительно снижающим массу тела), обетихолева кислота [154], тиромиметик ресметиром [154], описано увеличение выживаемости людей с циррозом печени и портальной гипертензией при использовании карведилола [155], потенциальный антифибротический эффект при использовании комбинации цилофексора и фирсоколата у людей с мостовидным фиброзом и циррозом печени [156]. В настоящее время эффективного препарата для лечения неалкогольной жировой болезни печени не разработано. Для лечения болезни Вильсона используется хелатная терапия, обычно в первую очередь применяется пеницилламин. Он связывает медь и приводит к ее выведению с мочой, при этом около 20% пациентов испытывают побочные эффекты при лечении пеницилламином, такие как лекарственная волчанка, миастения, что рассматривается как показание к отмене пеницилламина [157]. Альтернативой является прием триентина гидрохлорида, который также обладает хелатирующими свойствами [158] или тетратиомолибдата [159]. Указанные препараты имеют преимущества перед пеницилламином, однако, как и любые хелатирующие агенты, обладают побочными эффектами. Таким образом, отсутствие высокоэффективных препаратов для лечения фиброза печени побуждает к поиску новых путей терапии.

Важность разработки новых высокоэффективных методов лечения фиброза заключается в его последствиях – развитии цирроза и рака печени, так более 80% ГЦК развиваются в фиброзной или цирротической печени [160].

1.4 Гепатоцеллюлярная карцинома

ГЦК является наиболее распространенным типом первичной злокачественной опухоли печени и наиболее частой причиной смерти людей с циррозом печени [161]. Развитие ГЦК часто сопутствует фиброзу и циррозу печени, при этом причиной, вызывающей ГЦК, может быть как прогрессирующий

фиброз и цирроз [162], так и действие гепатоканцерогенов, таких, как афлатоксин [163].

1.4.1 Молекулярные и клеточные механизмы развития ГЦК

Одним из путей развития ГЦК является M2-поляризация макрофагов, при которой они выделяют иммуносупрессоры, чтобы блокировать иммунную активность типа Th1, а также усиливать иммунную активность типа Th2. Эта активность снижает контроль над воспалительными реакциями, одновременно способствуя росту опухолевых клеток, лекарственной устойчивости и ангиогенезу. Альтернативный путь развития ГЦК – через M1-поляризацию макрофагов, воспаление (преимущественно хронического характера), фиброз и цирроз. Воспаление и фиброз вызывают гипоксию, которая также способствует ангиогенезу, кроме того процесс заживления ран, типичный для хронического заболевания печени, способствует высвобождению проангиогенных цитокинов и факторов роста [164].

Клеточная провоспалительная онкотрансформация, предшествующая развитию ГЦК как правило, протекает по следующим двум механизмам (Рисунок 5).

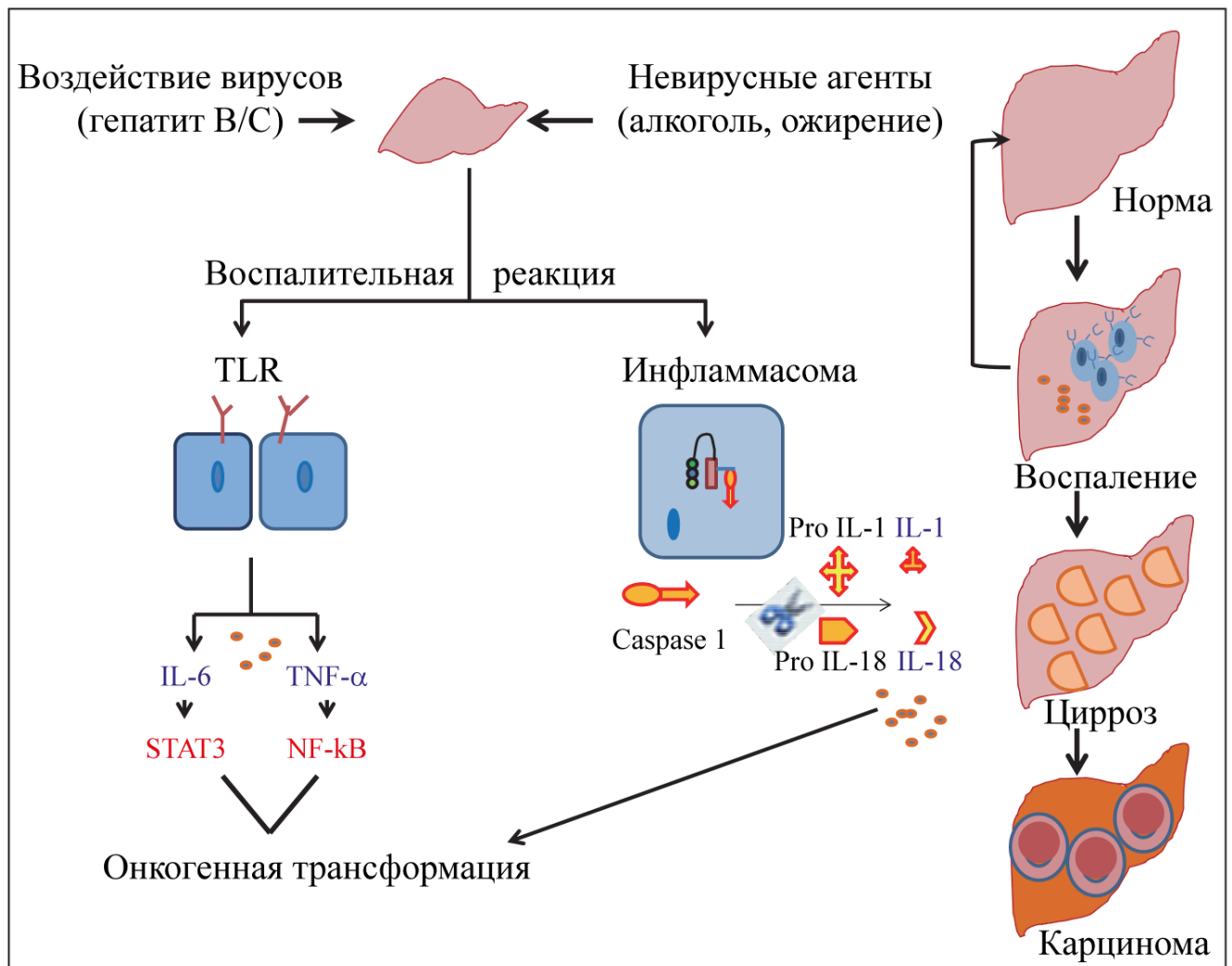


Рисунок 5. Воздействие возбудителей (чаще всего вирусов гепатита В/С) или невирусных агентов (в первую очередь алкоголя) приводит к выработке провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, TNF-α, IL-1 и IL-18 через независимые или зависимые от воспаления пути. Провоспалительные цитокины посредством активации факторов транскрипции приводят к клеточной онкотрансформации (рисунок адаптирован из статьи [165]).

В первом случае – происходит классическая воспалительная реакция: мембраносвязанные Toll-подобные рецепторы (TLR) и лектины С-типа, активируются, чтобы включить сигнальный каскад, который запускает выработку провоспалительных цитокинов. В свою очередь, IL-6 и TNF-α активируют активатор транскрипции STAT3 и NF-κB, что приводит к развитию воспаления [166].

Во втором случае – специализированный внутриклеточный мультипротеиновый комплекс, называемый инфламмасомой, способствует

созреванию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-18, необходимых для врожденного иммунного ответа и тканевого гомеостаза [167]. Инфламмасомы функционируют как сенсоры, отслеживая сигналы, вызванные повреждением тканей или умирающими клетками, распознавая внутриклеточные сигналы опасности через NOD-подобные рецепторы (NLR) [168]. Как только сигнал опасности воспринимается NLR, он олигомеризуется, активируя CASP-1. Таким образом, инфламмасомы действуют как специализированные платформы для активной CASP-1, расщепляющей Pro-IL-1 β и Pro-IL-18 до IL-1 β и IL-18. Секреция IL-1 β и IL-18 вызывает пироптоз, при этом хотя пироптоз раковых клеток может вызывать противоопухолевое действие, длительное образование воспалительных телец способствует формированию микроокружения, что приводит к росту опухоли. Независимо от пути возникновения, воспаление вызывает онкотрансформацию клеток в случае своего хронического характера. Таким образом, описанные выше процессы – цирроз, а за ним и развитие ГЦК могут стать следствием провоспалительных реакций и M1-поляризации макрофагов, иногда считающейся противоопухолевой (ввиду, например, синтеза TNF- α). При этом сохраняется возможность развития ГЦК через M2-поляризацию макрофагов [164].

1.4.2 Подходы к терапии ГЦК. Сорафениб

Существуют различные подходы к терапии ГЦК. Трансплантация печени является наиболее радикальным методом борьбы с раком печени. Несмотря на то, что в последнее время растет выживаемость после трансплантации печени [169], у данного метода также существует ряд недостатков. Необходим прием иммуносупрессивных препаратов для предотвращения отторжения донорской печени, кроме того, трансплантация не поможет в случае внепеченочного метастазирования. Стоит отметить и низкую доступность процедуры для пациентов из большинства стран мира.

Хирургическая резекция (частичная гепатэктомия) проводится в тех случаях, когда опухоль можно удалить целиком, при этом сохранив функциональную активность у оставшейся части печени. При этом для поддержания функций печени ее остаточный объем должен превышать 25% от ее общего объема в

нецирротической печени и более 40% в цирротической печени [170]. Таким образом, лишь небольшое число пациентов подходит для резекции, кроме того, существует высокий риск рецидива после операции. Перед резекцией иногда применяют метод эмболизации воротной вены для увеличения объема здоровой части печени, чтобы повысить шансы на выживание после хирургического удаления пораженной ее части [171].

Для местного разрушения опухоли применяется как радиочастотная абляция (использование высокочастотных радиоволн для разрушения опухоли путем нагрева), так и криоабляция (разрушение опухоли при помощи низкой температуры). Метод подходит для небольших опухолей (менее 5 см). В первом случае электроды вводятся в опухоль печени с использованием чрескожного, лапароскопического или открытого хирургического доступа. Во втором – зонд, по которому циркулирует жидкий азот, помещается в опухоль для ее криодеструкции. Криохирургия часто используется в сочетании с резекцией печени, однако даже комбинация указанных методов не является гарантией от рецидива рака. После проведения радиочастотной абляции также существует риск рецидива ГЦК [172]. Также применяется высокоинтенсивная фокусированная ультразвуковая абляция опухолей печени [173]. Помимо описанных методик, для местной деструкции опухоли применяется чрескожная инъекция этанола и чрескожная инъекция уксусной кислоты [174].

Существует ряд методов артериальной катетерной терапии. Транскатетерная артериальная химиоэмболизация проводится при неоперабельных опухолях или в качестве временного лечения в ожидании трансплантации печени. Осуществляется инъекция противоопухолевого препарата (например, цисплатина), смешанного с рентгеноконтрастным препаратом (например, липиодолом) и эмболическим агентом (например, гelfoамом), в правую или левую печеночную артерию через паховую артерию. Целью процедуры является ограничение кровоснабжения опухоли при одновременной подаче таргетного химиотерапевтического агента [175]. Радиотерапевтический аналог процедуры, сочетающий лучевую терапию с эмболизацией, – радиоэмболизация или селективная внутренняя лучевая терапия.

Трансартериальная радиоэмболизация стеклянными микросферами иттрия-90 (^{90}Y) является вариантом перевода пациентов с пограничной резектабельной ГЦК в кандидаты на хирургическое вмешательство [176].

Дистанционная лучевая терапия: радиационная терапия [177] и протонная терапия [178] используется в случаях метастазов для паллиативной помощи и для улучшения выживаемости пациентов с неоперабельной ГЦК.

Все указанные методы терапии ГЦК становятся неэффективными при метастазировании за пределами печени, в данном случае необходима системная терапия. Первым системным препаратом, одобренным для лечения ГЦК (в США одобрен FDA в 2007 году), а также самым популярным в настоящее время является сорафениб. Сорафениб выпускается в форме тозилата сорафениба под торговой маркой Нексавар (Nexavar) фармацевтической компанией Bayer AG (Германия) и предназначен для перорального приёма, кроме того существует дженерик индийского производства «Сорафениб-натив». Сорафениб – низкомолекулярный мультикиназный ингибитор, который подавляет как внутриклеточные изоформы серин/треониновой киназы RAF, (RAF-1 (или C-RAF), B-RAF дикого типа и мутантный B-RAF), так и рецепторные тирозинкиназы: рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR): VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, рецептор фактора роста тромбоцитов PDGFR- β , рецептор фактора стволовых клеток c-KIT, FMS-подобный, рецептор Fms-подобной тирозинкиназы-3 FLT-3 и рецептор нейротрофического глиального фактора RET [179]. Таким образом, сорафениб способен подавлять опухолевый ангиогенез (Рисунок 6).

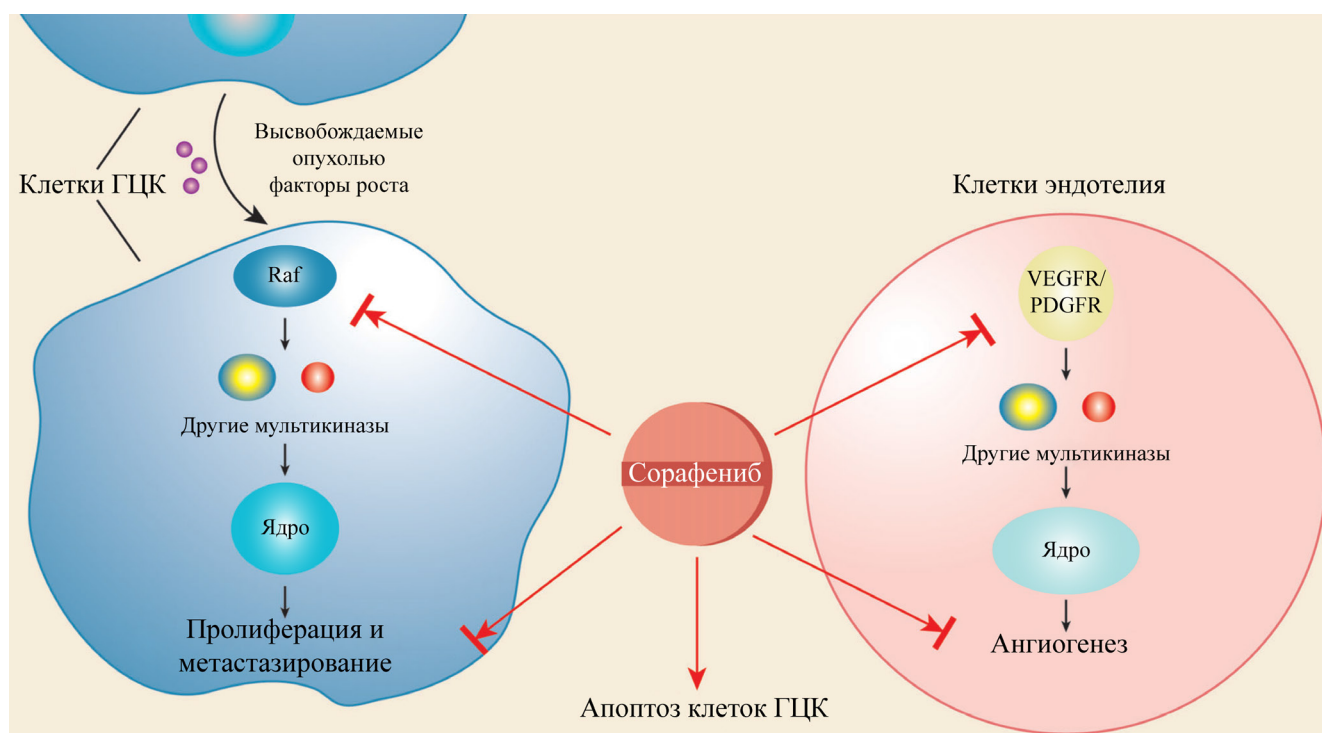


Рисунок 6. Механизм действия сорафениба. Сорафениб подавляет действие тирозинкиназы RAF и других факторов, участвующих в васкулогенезе (рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста – VEGFR и рецептор тромбоцитарного фактора роста – PDGFR), что в свою очередь подавляет активацию других нижестоящих мультикиназ, которые обычно необходимы для роста клеток, ангиогенеза, пролиферации и метастазирования клеток ГЦК (рисунок адаптирован из статьи [180]).

Есть данные о том, что сорафениб вызывает гибель клеток ГЦК через активацию апоптоза [181]. Индукция сорафенибом ферроптоза, описанная ранее, в настоящее время подвергается сомнению: по некоторым данным [182] сорафениб не может быть квалифицирован как полноценный индуктор ферроптоза. Кроме того, ферроптозное повреждение может также вызвать иммуносупрессию, связанную с воспалением в микроокружении опухоли, тем самым способствуя росту опухоли [183]. Сорафениб эффективен даже при прогрессирующей ГЦК [184], однако обладает низкой биодоступностью, быстрым метаболизмом и рядом побочных эффектов [185–187]. Среди наиболее часто встречающихся: повышение артериального давления, кровотечения, диарея, тошнота, рвота, боли в животе, кожная сыпь, ладонно-подошвенная эритродизэстезия, эритема, кожный зуд [188]. Кроме того, поскольку метаболизм сорафениба происходит за счёт окисления, опосредованного изоферментом CYP3A4 и глюкуронирования, опосредованного

изоферментом UGT1A9 [189], потенциальные индукторы изофермента CYP3A4 (дексаметазон, карбамазепин, рифампицин, фенитоин, фенобарбитал) способны снижать концентрацию сорафениба в плазме крови. Также сорафениб обладает тератогенным действием и эмбриотоксичностью [190], поскольку эффективно подавляет ангиогенез не только в опухоли, но и при развитии плода. Под вопросом находится и безопасность применения препарата для детей и кормящих матерей. Зафиксирован случай острой гепатотоксичности сорафениба [191]. Существуют другие препараты, применяемые в терапии ГЦК, также представляющие собой мультикиназные ингибиторы (например, сунитиниб) с теми же побочными эффектами, что и у сорафениба. Кроме того, в последнее время исследуются и применяются препараты на основе моноклональных антител (атезолизумаб, бевацизумаб, ипилимумаб, тремелиумаб). Однако, терапия такими препаратами может разбалансировать иммунную систему и привести к широкому спектру нежелательных явлений, связанных с иммунитетом, которые могут вызвать летальный исход [192]. Следовательно, поиск новых средств терапии ГЦК остается актуальным и на сегодняшний день.

Таким образом, фиброз и последующий цирроз является одной из главных причин развития ГЦК по провоспалительному пути – через M1-поляризацию клеток Купфера и продукцию провоспалительных цитокинов. Лечение фиброза предупреждает развитие ГЦК, однако, течение фиброза часто остается незаметным. Кроме того, важно отсутствие действительно эффективных средств терапии алкогольной болезни печени и НАЖБП. В свою очередь, терапия ГЦК сопряжена с массой проблем: крайне низкая доступность органов для трансплантации в нашей стране, токсичность противораковых средств и препаратов для здоровых клеток организма, побочные эффекты существующих лекарств (сорафениб, сунитиниб). В то же время использование интенсивно развивающейся наномедицины позволяет получать препараты с новыми химическими свойствами, низкой токсичностью и без побочных эффектов. Применение препаратов на основе селена в терапии ГЦК ранее сталкивалось с той же проблемой токсичности, однако в настоящее время появление НС делает возможным ее решение. Следовательно, несовершенство

методов терапии ГЦК (возникающей как следствие фиброза и цирроза, так и по другим причинам) с одной стороны и масса исследований, подтверждающих противовоспалительную и противораковую активность НС – с другой, дает основания считать НС перспективным терапевтическим средством для борьбы как с фиброзом, так и с ГЦК.

1.5 Виды клеточной гибели

Для лучшего понимания молекулярных и клеточных механизмов действия НС, Со и НС-Со, необходимо кратко рассмотреть виды гибели клеток, их причины и различия. Виды клеточной гибели можно подразделить, в первую очередь, на непрограммируемые и программируемые. Программируемые, в свою очередь, можно разделить на зависимые и независимые от протеолитических ферментов – каспаз (Рисунок 7).

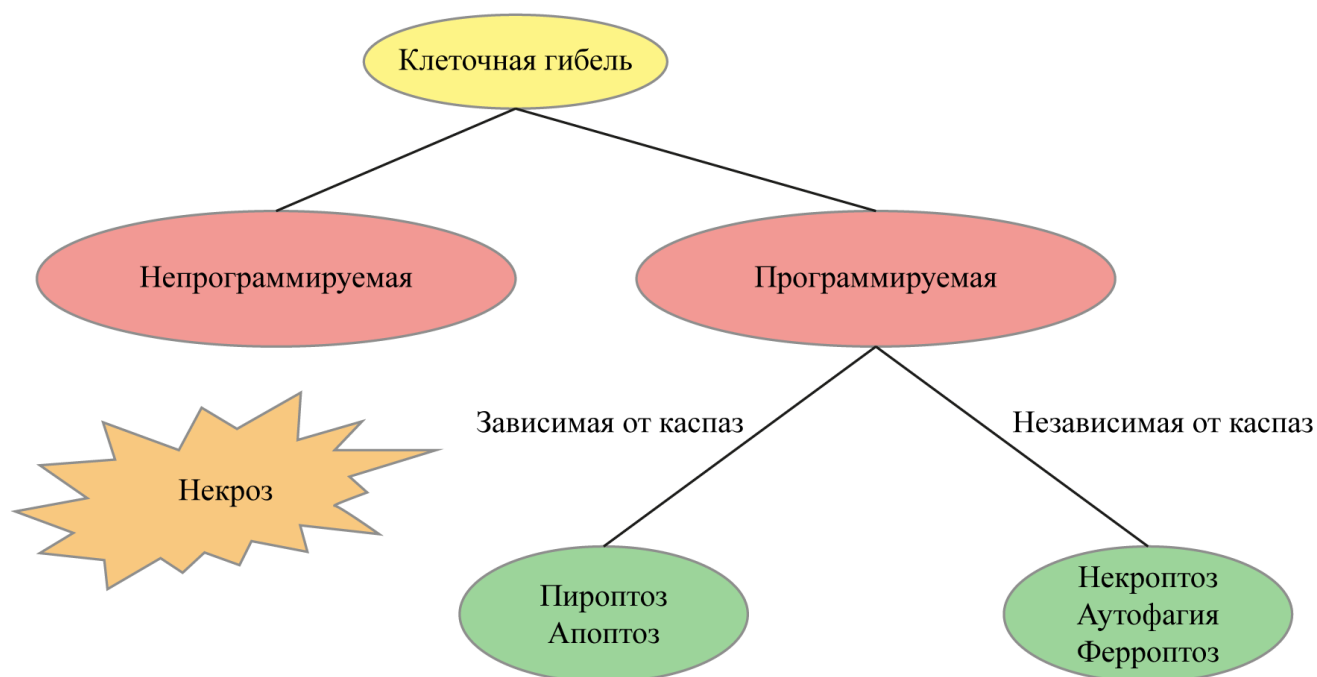


Рисунок 7. Виды клеточной гибели (рисунок адаптирован из статьи [193]).

К непрограммируемым видам относится некроз, в результате которого происходит разрыв клеточной мембраны и неконтролируемый выход содержимого клетки во внеклеточное пространство. В некоторых случаях некроз может быть нормальным физиологическим и регулируемым (программируемым) событием

[194], однако в большинстве случаев некроз приводит к накоплению фрагментов клеток и продуктов деятельности лейкоцитов и фагоцитов, что может привести к гангрене [195]. Некроз может быть инициирован как внешними, так и внутренними факторами. В первом случае этими факторами могут быть травматические повреждения, термическое воздействие, ишемия [196]. Во втором – недостаточная секреция цитокинов, гибель первичных Т-лимфоцитов, избыток активных форм кислорода [197]. В любом случае некроз является негативным сценарием для дальнейшего функционирования ткани, органа или организма.

1.5.1 Программируемая клеточная гибель. Апоптоз

Программируемая гибель клеток, как правило, не несет таких драматических последствий для организма, как непрограммируемая.

Некроптоз – это программируемая некротическая гибель клетки. Данный процесс запускается при связывании TNF- α с TNFR, далее происходит активация протеинкиназы-3 и, при условии инактивации CASP-8, происходит некротический процесс [198]. Морфологически процесс некроптоза близок к некрозу, в частности происходит высвобождение содержимого клетки во внеклеточное пространство, в частности при развитии ишемии, атеросклероза и инфаркта миокарда [199]. Существуют данные, что некроптоз способствует развитию некоторых видов рака [200], с другой стороны разрабатываются подходы антираковой терапии при помощи некроптоза [201].

Аутофагия – деградация внутренних компонентов клетки внутри ее лизосом, по сути данный процесс близок к апоптозу, независимому от каспаз. Этот вид клеточной гибели активируется при недостатке питательных веществ, когда менее нужные белки расщепляются до аминокислот, из которых синтезируются жизненно необходимые для клетки [202]. Кроме того, у высших эукариот аутофагия индуцируется в ответ на истощение питательных веществ у животных при рождении после прекращения трансплацентарного питания [203]. Аутофагия может вызывать развитие рака, способствуя выживанию опухолевых клеток при разрушении апоптотических медиаторов посредством аутофагии [204]. Аутофагия начинается при инактивации киназы mTOR, далее действуют киназы ULK1, ULK2

и UKL3, которые в комплексе с белками ATG участвуют в формировании аутофагосомы – структуры, которая доставляет цитоплазматические компоненты в лизосомы [205].

Ферроптоз (окситоз) – вид клеточной гибели, при котором происходит железозависимое накопление перекисей липидов на клеточных мембранах [206]. Поскольку основной клеточный механизм защиты от ферроптоза опосредован глутатионпероксидазой 4, которая перерабатывает липидные перекиси в нетоксичные липидные спирты, ингибирование глутатионпероксидазы 4 активирует ферроптоз, что может быть использовано для селективного воздействия на раковые клетки [206].

Пироптоз – вид программируемой гибели клеток, обусловленный формированием надмолекулярного комплекса – инфламмосомы (пироптосомы), активацией CASP-1, выделением клеткой интерлейкинов IL-1 β и IL-18, и дальнейшей воспалительной реакцией. Помимо CASP-1, обладающей эволюционной консервативностью, в процессе пироптоза принимают участие CASP-4 и -5 у человека и их ортолог – CASP-11 (у мышей) [207] или CASP-13 (у крупного рогатого скота) [208]. Пироптоз является важным защитным механизмом врождённого иммунитета, он вызывает воспаление, действующее как защитный механизм от инфекций. В частности, IL-18 стимулирует выработку интерферона-гамма и развитие Th1 ответа, однако постоянно развивающееся воспаление способно вызвать серьезные заболевания и повреждения печени [209]. В настоящее время обнаружено три пути активации пироптоза: канонический инфламмосомный путь (через активацию CASP-1 и синтез IL-1 β и IL-18) [210], неканонический инфламмосомный путь (через активацию CASP 4/5 или 11) [211], и альтернативный (через активацию CASP-3 и образование пор в клеточной мембране при помощи гасдермина E) [212].

Кроме того, существуют другие варианты программируемой гибели клеток: параптоз – независимая от каспаз цитоплазматическая вакуолизация клетки, опосредованная сигнальными путями MAPK с использованием IGF-IR на уровне рецептора [213] (при этом сам термин «параптоз» подвергается критике [214]);

партанатоз – форма программируемой клеточной смерти, вызываемая накоплением поли-АДФ рибозы (PAR) и транслокацией фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), из митохондрий в ядро, регулируется поли-АДФ-рибоза-полимеразой 1 (PARP-1), [215]; эриптоз – программируемая гибель эритроцитов [216]; немоз – процесс активации и гибели фибробластов [217]; энтоз – поглощение одной (как правило эпителиальной клетки) другой с последующим лизированием первой, энтоз встречается также в раковых клетках и коррелирует с онкогенезом [218]; нетоз – форма гибели клеток, описанная у нейтрофилов, при которой происходит выброс сети (NET) из ДНК нейтрофилов, связывающей патогены [219]; паноптоз – это важный иммунный воспалительный литический путь гибели клеток, который инициируется иммунными сенсорами и управляется каспазами и протеинкиназами (RIPK) через мультипротеиновые комплексы-паноптосомы [220]; аноикис – частный случай апоптоза, активируется неправильной адгезией клеток или ее утратой [221].

Важнейшим видом программируемой гибели клетки является апоптоз, в процессе которого клетка распадается на апоптотические тельца без разрушения мембраны и высвобождения содержимого клетки, а значит, без сопутствующего воспаления. Сигнальная фаза апоптоза представляет собой его активацию двумя возможными путями: рецептор-зависимым (внешним) и митохондриальным (внутренним) [222] (Рисунок 8).

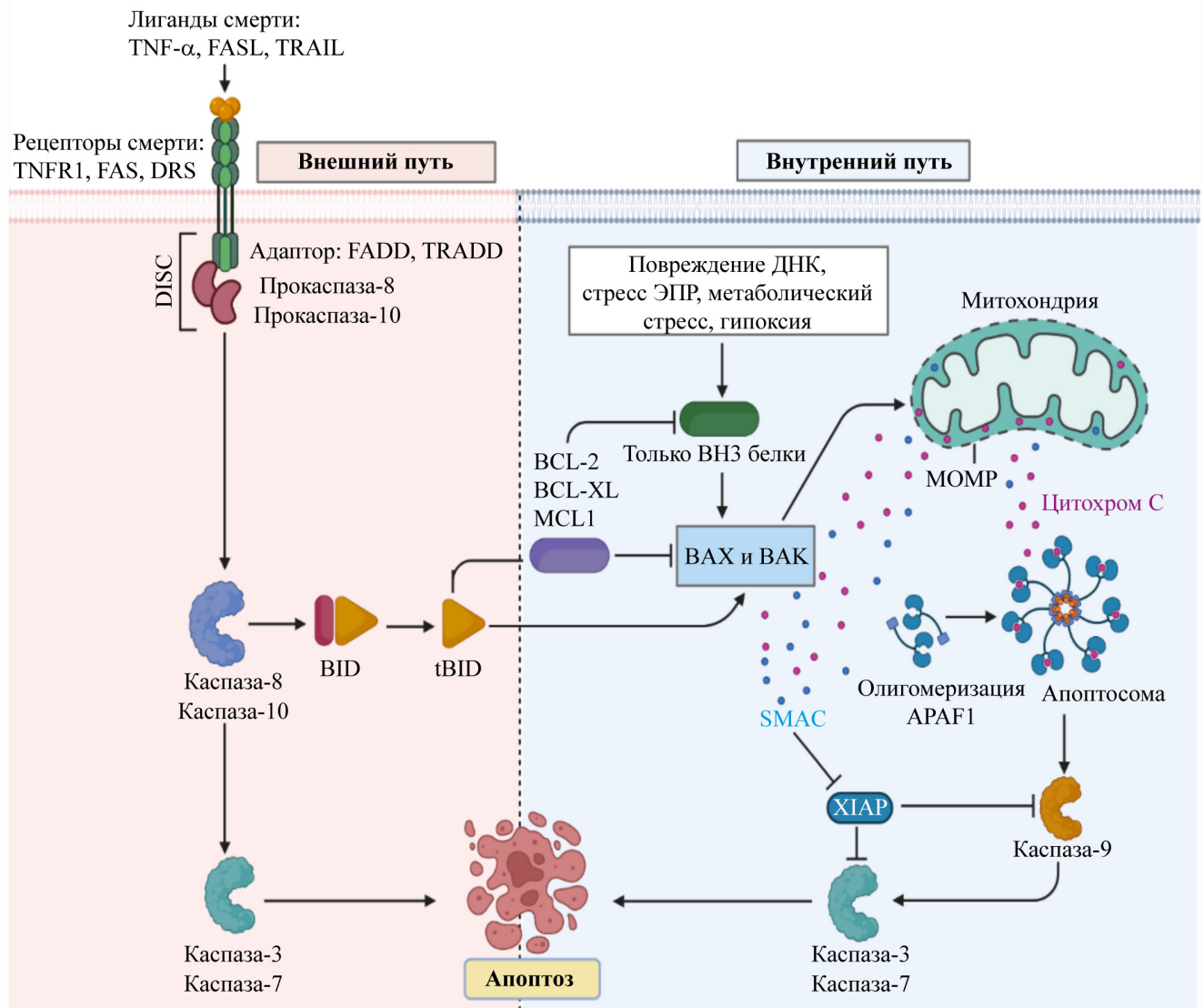


Рисунок 8. Молекулярные механизмы внешнего и внутреннего пути апоптоза (рисунок адаптирован из статьи [223]).

Ресептор-зависимый путь предполагает взаимодействие специфических лигандов с трансмембранными белками-ресепторами клеточной гибели. Были предложены два пути прямого запуска апоптоза: TNF-опосредованный и Fas-опосредованный. TNF- α образуется преимущественно при M1 поляризации макрофагов и далее взаимодействует с ресепторами TNFR, а TNFR1 (p55 или CD120a) взаимодействует с адаптером TRADD. В свою очередь лиганд fasL взаимодействует с fas-ресептором (Apo-1 или CD95), а тот – с адаптером FADD [224]. Далее ресептор смерти, ассоциированный с соответствующим адаптером, взаимодействует с предшественниками инициирующих каспаз – прокаспазами-8 и -10, что приводит к образованию сигнального комплекса, индуцирующего смерть

(death-inducing signaling complex, DISC). Данные комплексы (апоптосомы) активируют каспазы из соответствующих прокаспаз.

В случае митохондриального пути активации апоптоза происходит повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) и выход апоптогенных белков (цитохром с, прокаспазы -2, -3, -9, AIF) из межмембранного пространства митохондрий за счет образования пор во внешней мембране или разрыва митохондриальной мембраны. Ключевую роль в увеличении проницаемости мембран митохондрий играют белки BCL-2-семейства: BAX и BAK [225]. Белки семейства BCL-2 являются основными регуляторами внутреннего пути апоптоза, их разделяют на три группы: проапоптотические – содержащие BH-домены 1–3 (BAX, BAK, Bok/Mtd;), антиапоптотические – содержащие BH-домены 1–4 (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1, Boo/Diva) и содержащие только BH3-домен (BID, BAD, BIM, BMF, BIK, HRK, BLK, NIP3, BNIP3/NIX, PUMA, NOXA). BAX и BAK активируются белками, содержащих только BH3-домен [226]. После нарушения целостности мембраны в цитоплазму выходят активаторы апоптоза: SMAC и цитохром с. Цитохром с напрямую связывается с фактором Araf-1 и АТФ и прокаспазой-9, образуя апоптосому. Апоптосома расщепляет прокаспазу-9 до CASP-9, которая, расщепляет и активирует прокаспазу-3, превращая ее в эффекторную CASP-3 [227]. SMAC связывает белки XIAP и cIAP, чтобы ингибировать их связывание с каспазой и обеспечить активацию апоптоза [228].

Существуют альтернативные пути апоптоза: CASP-8 может вызывать выход из лизосом катепсина В, который активирует регуляторный белок BID до t-Bid, активирующий в свою очередь BAX [229]. Флавопротеин AIF может участвовать в запуске каспазо-независимого пути апоптоза: AIF может выходить через митохондриальную мембрану и, перемещаясь в ядро, вызывать конденсацию хромосом и фрагментацию ДНК [230]. Апоптоз может активироваться в результате стресса ЭПР, что сопровождается выходом локализованной в нем прокаспазы-12, ее активацией в CASP-12 и последующей активацией CASP-9 и -3 [231].

После сигнальной фазы апоптоза, в которой происходит его активация одним или несколькими путями, начинается эффекторная фаза, в которой инициаторные каспазы (-2, -8, -9, -10 и -12) активируют как друг друга, так и эффекторные каспазы (-3, -6, -7) – запускается каспазный каскад [232].

Далее следует деградиционная стадия апоптоза: происходит организованное разрушение клеточных органелл каспазами, происходит сжатие и округление клетки за счет распада цитоскелета, конденсация хроматина, распад ядра. Начинается миграция фосфатидилсерина с внутренней на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны [233], что маркирует клетку для фагоцитоза макрофагами, происходит мембранный блеббинг (образование пузырей на клеточной мембране) [234], образование мембранных выступов и, в конечном итоге, фрагментация клетки на отдельные апоптотические тельца, которые подвергаются фагоцитозу.

1.5.2 Клеточный ответ на стресс ЭПР

Как указано выше, индукция апоптоза может быть вызвана стрессом ЭПР (вызванным неправильно свернутыми белками) и клеточным ответом на этот стресс – unfolded protein response (UPR). UPR активируется при накоплении несвернутых или неправильно свернутых белков в просвете ЭПР, ответом клетки является сначала остановка трансляции белков, активация продукции шаперонов и переработка неправильно свернутых белков, а затем, если данные процессы не устранили стресс ЭПР – индукция апоптоза.

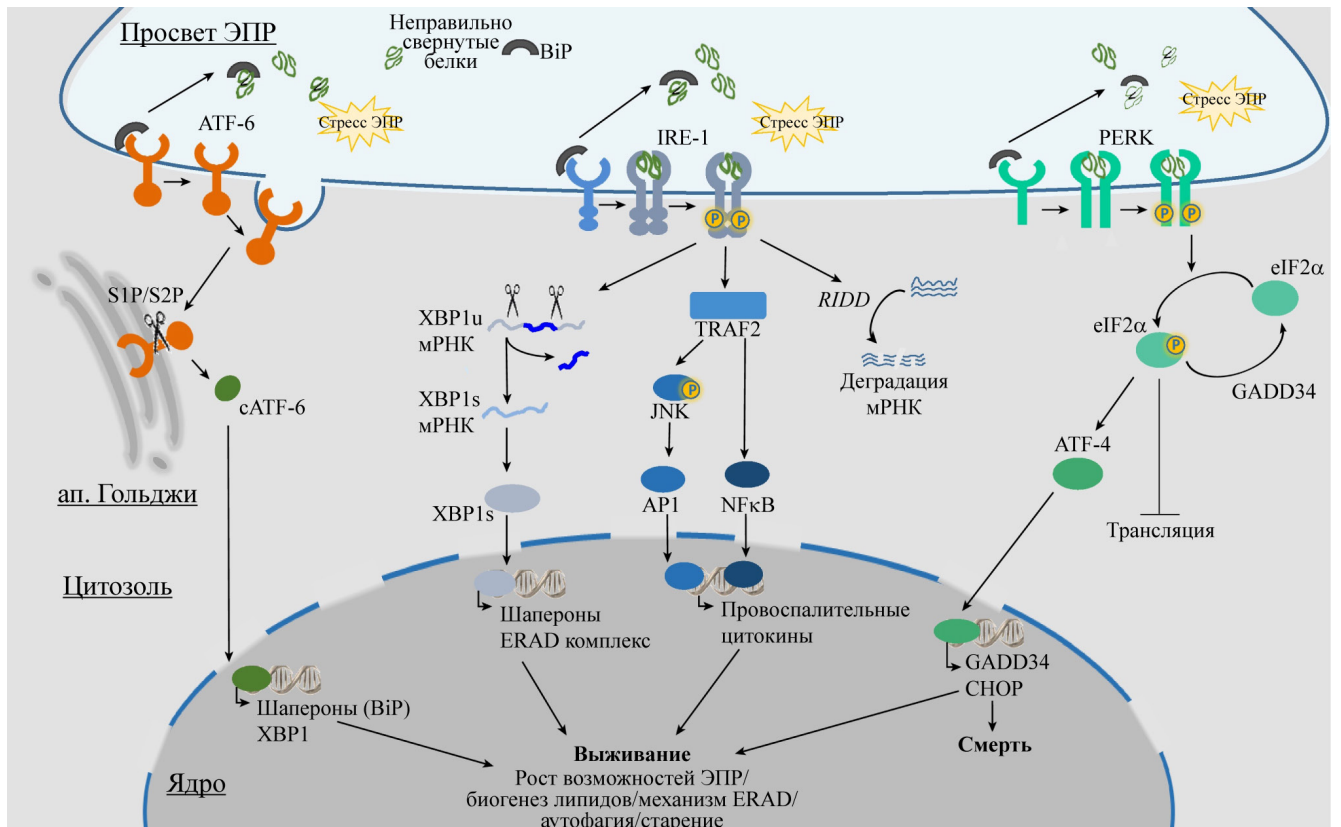


Рисунок 9. Клеточный ответ на стресс ЭПР (рисунок адаптирован из статьи [235]).

Три сигнальных пути UPR связаны с тремя трансмембранными белками ЭПР: активирующий фактор транскрипции 6 (ATF-6); инозитол-требующий фермент 1α (IRE1α) и протеинкиназа ЭПР (PERK) (Рисунок 9). При накоплении в просвете ЭПР неправильно свернутых белков шаперон BiP диссоциирует от ATF-6, IRE1α и PERK, чем вызывает их активацию [236], предполагается также прямая активация несвернутыми белками IRE1α и PERK [237, 235]. При протеолитическом расщеплении ATF-6 в аппарате Гольджи двумя протеазами S1P и S2P его цитозольная часть перемещается в ядро и активирует транскрипцию BiP и XBP1 [238]. Активированный цитозольный домен IRE1α сплайсирует мРНК фактора транскрипции XBP1u до XBP1s. Далее сплайсированная форма транслируется в транскрипционный фактор, который мигрирует в ядро и активирует транскрипцию молекулярных шаперонов ЭПР (BiP), ферментов фолдинга и компонентов комплекса деградации белков, ассоциированных с ЭПР (ERAD), снижая стресс ЭПР [239]. Также IRE1α расщепляет РНК, локализованные в ЭПР (процесс RIDD), кроме того IRE1α способен через TRAF2 активировать JNK1 (MAPK8) и NF-κB.

Активная форма PERK фосфорилирует эукариотический фактор инициации 2 альфа ($eIF2\alpha$), вызывая общее снижение трансляции белка, это также позволяет транслировать ATF-4 – фактор транскрипции, регулирующий транскрипцию гомологичного белка C/EBP (*CHOP* или *GADD153*) и белок, индуцирующий остановку роста и повреждение ДНК (*GADD34*), при этом *GADD34* контролирует дефосфорилирование $eIF2\alpha$, что приводит к повторной инициации трансляции [240]. Помимо пути PERK– $eIF2\alpha$ –ATF-4 экспрессия *CHOP* может быть активирована ATF-6, а XBP1 может повышать экспрессию *CHOP* [241]. Кроме того, IRE1 α может как повышать экспрессию *CHOP* через XBP1, так и вызывать апоптоз через активацию апоптотической сигнальной киназы-1 (ASK1), которая активирует JNK1 и митоген-активируемую протеинкиназу p38, которые участвуют в апоптозе вместе с *CHOP* [242]. *CHOP* увеличивает экспрессию проапоптотических генов (*BAK*, *BAX*, *BIM*, *PUMA*), подавляет экспрессию антиапоптотических генов (*BCL-2*, *BCL-XL*) [243], вызывает апоптоз посредством повышения экспрессии ER-редуктазы (ERO1 α), которая катализирует выработку перекиси водорода в ЭПР [244], а также *CHOP* может индуцировать апоптоз, повышая экспрессию рецепторов смерти DR4 и DR5 [245, 246].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Оборудование и реактивы

Гистологические срезы выполняли на микротоме Thermo Scientific Microm HM 325 (Thermo FS, США). Для определения характеристик наночастиц использовали гальваномеханический сканер LScanH (Ateko-ТМ, Россия), Zetasizer Ultra Red Label (Malvern, Великобритания) и просвечивающий электронный микроскоп 200FE (Carl Zeiss, Германия). ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора DTprime 5, ДНК-Технология (Россия). Активность АЛТ и АСТ измеряли с помощью абсорбент-ридера iMark Microplate (Biorad, Россия). Для анализа апоптоза и некроза использовали микроскопы: проходящий свет – Leica DM 6000B, флуоресценция – флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss Cell Observer, конфокальный микроскоп Leica TCS SP5.

В исследовании были использованы следующие реактивы:

Sigma-Aldrich (США): Аденозин-5'-трифосфат динатриевая соль гидрат (АТФ, А1852), среда DMEM (D6429), сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS, H4641), HEPES натриевая соль (H7006), тиацетамид, 98%, (172502).

Lumiprobe (Россия): Annexin V-AF 488 Apoptosis Detection Kit with Propidium Iodide (21172).

Thermo Fisher Scientific (США): Fura-2AM (Cat. F1221), фетальная бычья сыворотка (10099141), PVDF мембраны (LC2005) для переноса белков, белковые концентраты (88517) для концентрирования белков в лизатах печени.

Наночастицы селена, сорафениб и комплекс селен-сорафениб любезно предоставлены д.б.н., проф. С.В. Гудковым, Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, (Россия).

«Евроген» (Россия): синтез геноспецифичных олигонуклеотидов, ExtractRNA реагент (BC032), MMLV обратная транскриптаза для синтеза кДНК (SK021), qPCRmix-HS SYBR Green смесь для ПЦР в реальном времени (PK147S), маркеры для определения длины ДНК (NL001, NL002).

ДНКзаI (DNaseI) (Invitrogen, 18047019), Пикро-сириус красный (Picrosirius red) (Abcam, ab246832), Гематоксилин-эозин (Hematoxylin-eosin) (HistoPoint,

Россия), Сорафениб (Bayer HealthCare AG, Германия), набор MTT Cell Proliferation Assay Kit (Abcam, ab211091, США).

Первичные антитела (*in vitro*): анти-GAPDH (437000, Invitrogen), анти-BAX (33-6400, Invitrogen), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (656120, Invitrogen).

Первичные антитела (*in vivo*): анти-GAPDH (Thermo FS, 14-9523-82), анти-CHOP (Thermo FS, MA1-250), анти-CASP-3 (Abcam, ab184787), анти-CASP-12 (Abcam, ab235180), анти-IL-1 β (Abcam, ab205924), анти-IL-6 (Abcam, ab290735), анти-IL-33 (Abcam, ab187060), анти-TNF α (Abcam, ab307164), анти ATF-4 (Abcam, ab216839), анти- α -SMA (Abcam, ab7817).

Вторичные антитела: кролик-анти-мышь (Abcam, 6728), мышь-анти-кролик (Abcam, 99697).

Для фиксации окрашенных гистологических срезов использовали синтетическую заливочную среду Витрогель («БиоВитрум», Россия), анализ активности АЛТ и АСТ проводили с использованием коммерческих наборов (Е-ВС-K235-М и Е-ВС-K236-М соответственно, «Белки-Антитела», Россия).

2.2 Получение НС и НС-Со

Наночастицы селена были получены методом лазерной абляции в деионизированной воде с удельным сопротивлением 18 МОм $\times$ см. Твердая мишень помещалась на дно кюветы под тонкий слой воды (не толще 2–3 мм) и облучалась лазерным лучом через тонкий слой воды ($\lambda = 532$ нм; $T = 8$ нс; $f = 10$ кГц; $P = 20$ Вт; $E_p = 5$ мДж). Смещение лазерного луча на мишени осуществлялось по заданной траектории в виде параллельных прямых, вписанных в квадрат с шагом 10 мкм с помощью гальваномеханического сканатора LScanH (Атеко-ТМ, Россия) [247]. В зависимости от характеристик лазерного излучения, скорости и траектории лазерного луча возможно получение коллоидных растворов наночастиц селена с заданными геометрическими параметрами. Размер наночастиц характеризовали с помощью аналитической центрифуги DC24000 (CPSInstruments, США). Концентрацию наночастиц и гидродинамический радиус оценивали с помощью метода динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Ultra Red Label

(Malvern, Великобритания) [248]. Для экспериментов получен препарат НС с мономодальным распределением по размерам и концентрацией частиц 10^{11} /мл. Противораковое соединение Сорафениб (Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Germany) наносили на наночастицы селена. Сорафениб до конечной концентрации 30 мг/мл растворяли в 0,1 М цитратном буфере (pH 4,1), так как растворимость Со в воде зависит от pH – при низких pH растворимость сорафениба увеличивается. В водный раствор сорафениба в цитратном буфере добавляли наночастицы селена, инкубировали в течение 30 минут. После этого для отделения наночастиц от исходного раствора, проводили центрифугирование. Использовали центрифугу Sigma 3-18KS, температуру 4 °C, скорость вращения ротора 18000 об/мин, при включенной системе управления Spincontrol S [249]. Процедуру проводили трижды. Количество Со ассоциированного с наночастицами определяли по изменению спектра поглощения раствора до добавления наночастиц и после осаждения наночастиц. Препарат НС с концентрацией 10^{11} /мл может содержать на поверхности наночастиц порядка 12 мг/мл Со.

2.3 Характеристика наночастиц

Измерение среднего гидродинамического диаметра наночастиц селена методом динамического светорассеяния показало значения порядка 100 нм, полуширина находится в пределах 70–130 нм (Рисунок 10А). После присоединения Со к НС наблюдается увеличение гидродинамического диаметра комплекса НС-Со на 10–20 нм. Средний дзета-потенциал НС был порядка –30 мВ (Рисунок 10Б). Дзета потенциал НС-Со был несколько больше, порядка –20...–25 мВ. Нужно отметить, что водный коллоидный раствор наночастиц селена имел слабый рыже-красноватый оттенок и довольно слабо поглощал в диапазоне длин волны 240–300 нм (Рисунок 10В). При этом комплекс НС-Со интенсивно поглощает в диапазоне длин волн 240–300 нм. Спектр поглощения НС-Со довольно характерный, имеет 4 локальных максимума, такой спектр придают комплексу молекулы сорафениба, при этом характер спектра качественно не изменился при присоединении Со к НС. Морфологию наночастиц изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа 200FE (Carl Zeiss, Германия). Согласно данным электронной

микроскопии наночастицы имеют сферическую форму (Рисунок 10Г). Данные по просвечивающей электронной микроскопии наночастиц с сорбированными молекулами сорафениба не проводятся, так как «шуба» из сорафениба имеет малый контраст. С помощью данного метода показано, что наночастицы состоят из селена в нульвалентном состоянии.

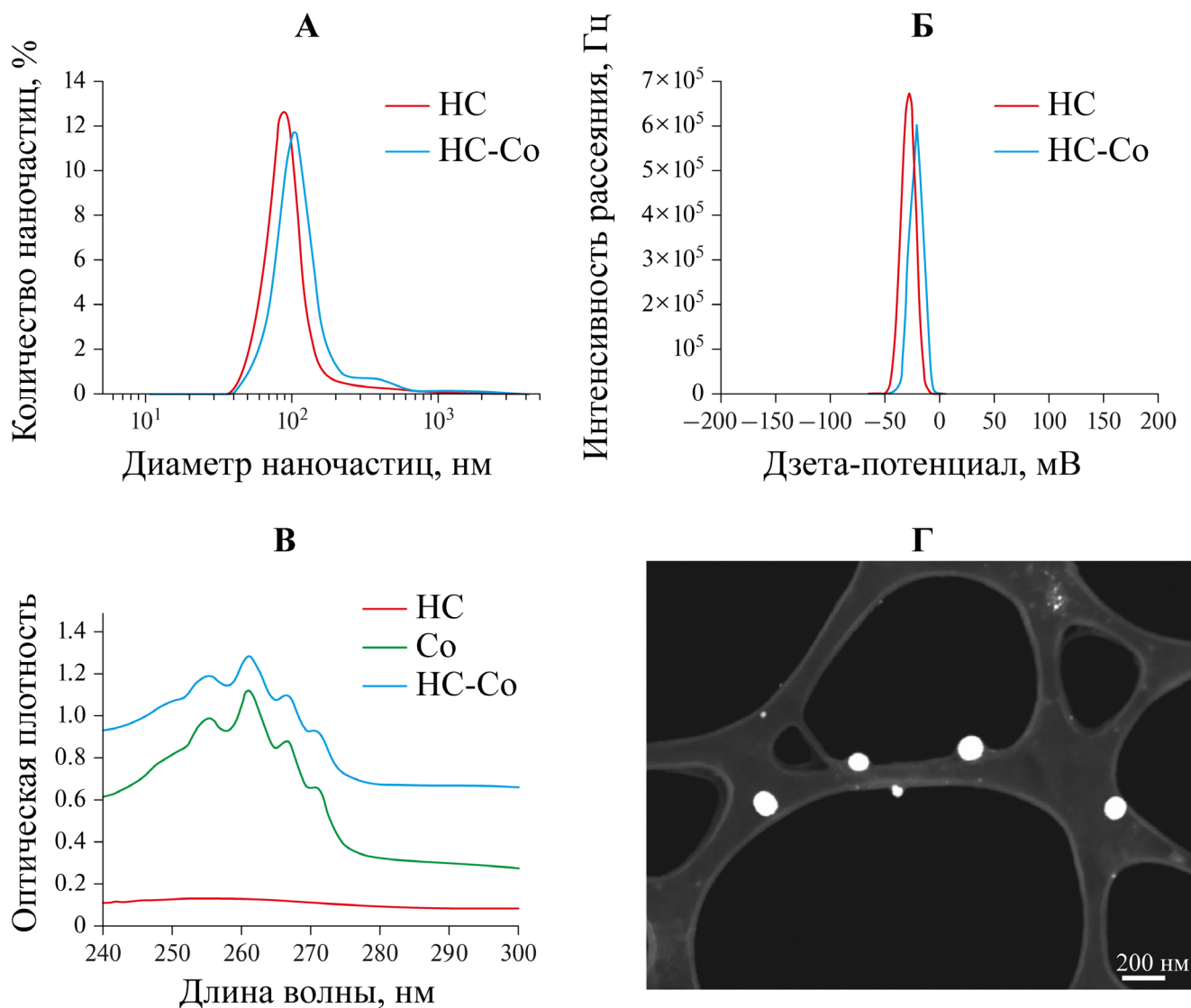


Рисунок 10. Основные физико-химические характеристики коллоидного раствора НС и НС-Со. **А.** Гидродинамический диаметр НС и НС-Со. **Б.** Электрокинетический потенциал НС и НС-Со. **В.** Спектральные свойства НС, НС-Со и химически чистого Со. **Г.** Электронные микрофотографии НС на подложке [Goltyaev, 2022].

Работы по получению и определению характеристик НС и комплекса селен-сорафениб проводились в Институте общей физики им. Прохорова РАН (Москва) под руководством д.б.н., проф. С.В. Гудкова без участия соискателя.

2.4 Объекты исследования

В работе использовали клеточную линию HepG2 (ГЦК человека), происхождение: ATCC (США) выращивалась 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. Мы проверяли нашу непрерывную клеточную культуру на загрязнение микоплазмой каждые три месяца с помощью ПЦР [250]. Загрязнения микоплазмой не было обнаружено.

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). Эксперименты проводились в соответствии с Правилами лабораторной практики по уходу и использованию лабораторных животных и Директивой 2010/63 ЕС Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях. 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» (Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментальных биологических клиник (вивариев).

2.5 Оценка цитотоксичности

Для оценки цитотоксичности исследуемых агентов использовали МТТ-анализ. Применяли набор MTT Cell Proliferation Assay Kit (Abcam ab211091, США). Для этого клетки выращивали на 96-луночных планшетах в количестве примерно 5500 клеток на лунку и проводили инкубацию в течение 24 часов с различными концентрациями НС, Со или НС-Со, после чего добавляли 50 мкл рабочего

раствора МТТ (5 мг/мл), осторожно пипетировали и инкубировали 3 часа при 37°C и 5% CO₂. Далее среду удаляли и для быстрого и равномерного растворения формазана в каждую лунку добавляли по 150 мкл растворителя, инкубировали на планшетном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем с помощью планшет-ридера измеряли оптическую плотность растворов в каждой тестовой лунке при OD=590 нм. Процедуру повторяли трижды.

2.6 Оценка апоптоза и некроза

Гибель клеток (процессы апоптоза или некроза) в культуре после обработки НС, Со и НС-Со в течение 24 часов, оценивали путем одновременного окрашивания клеток аннексином V и пропидиум иодидом. Использовали набор Annexin V-AF 488 Apoptosis Detection Kit with Propidium Iodide (Lumiprobe, Россия). Аннексин V (A5), меченый флуоресцентной меткой, связывается с фосфатидилсерином, который мигрирует на внешнюю сторону плазматической мембраны в процессе апоптоза. Пропидиум иодид не проникает через целую плазматическую мембрану и лишь в случае ее повреждения (например, в результате некроза) связывается с ДНК в ядре. Таким образом, можно различить популяции апоптотических и некротических клеток. В качестве положительного контроля некроза использовали дигитонин 1 мкл/мл, 15 минут перед окрашиванием. Подсчет клеток проводили при помощи программы ImageJ, использовали 3 поля зрения для каждого образца (10⁴ – 10⁵ клеток на лунку).

2.7 Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в реальном времени

Образцы гомогенизировали пипетированием в 1 мл реагента ExtractRNA, затем выделяли тотальную РНК согласно протоколу производителя. Качество выделения РНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, а также с помощью спектрофотометра при длине волны 260 нм. Для предотвращения контаминации образцов РНК геномной ДНК их обрабатывали ДНКазой I при 37°C в течение 1 ч, после чего фермент инактивировали добавлением к смеси 50 мМ ЭДТА и нагреванием до 60°C в течение 10 мин. Реакцию обратной транскрипции проводили в соответствии с протоколом и с использованием набора реагентов для синтеза первой цепи кДНК, содержащего обратную транскриптазу вируса

мышинного лейкоза (MMLV). Содержание тотальной РНК (0,5–2 мкг) контролировали путем проведения параллельной реакции амплификации с использованием праймеров, специфичных к референсному гену. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с использованием смеси qPCRmix–HS SYBR, содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green I. Реакцию амплификации проводили при следующих температурных условиях: 95°C – 1 мин; 95°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 15 с (35 циклов). Относительный уровень экспрессии гена (RUE – уровень экспрессии исследуемого гена относительно экспрессии эталонного гена) в каждой клеточной линии определяли по формуле. Изменение уровня экспрессии исследуемых генов до и после обработки определяли по формуле $TUE = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, где $\Delta\Delta Ct$ – разница значений ΔCt для каждого гена до и после обработки клеток. Каждый экспериментальный цикл повторялся три и более раз. При проведении ПЦР в реальном времени использовали референсный ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*GAPDH*). Последовательности всех праймеров, используемых в ПЦР в реальном времени, приведены в Таблице 2.

In vitro (человек)

Ген	Прямой праймер 5'→3'	Обратный праймер 5'→3'
<i>GAPDH</i>	ACATCGCTCAGACACCATG	GCCAGTGAGCTTCCCGTT
<i>ATF-4</i>	GTGTTCTCTGTGGGTCTGCC	GACCCTTTTCTTCCCCCTTG
<i>ATF-6</i>	AACCCTAGTGTGAGCCCTGC	GTTCAGAGCACCCCTGAAGA
<i>BAK</i>	GAGAGTGGCATCAATTGGGG	CAGCCACCCCTCTGTGCAATCCA
<i>BAX</i>	GGGCTGGACATTGGACTTC	AACACAGTCCAAGGCAGCTG
<i>BCL-2</i>	GGTGAAGTGGGGGAGGATTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAG
<i>BIM</i>	GGACGACCTCAACGCACAGTACGAG	GTAAGGGCAGGAGTCCCA
<i>CASP-3</i>	GCATTGAGACAGACAGTGGTG	AATAGAGTTCTTTTGTGAGCATG
<i>CHOP</i>	GCTCTGATTGACCGAATGG	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
<i>GADD34</i>	CTCCGAGAAGGTCACTGTCC	GACGAGCGGGAAGGTGTGG
<i>PUMA</i>	CAGATATGCGCCCAGAGAT	CCATTTCGTGGGTGGTCTTC
<i>XBPIs</i>	CTGAGTCCGCAGCGGTGCAGG	GGTCCAAGTTGTCCAGAATG

In vivo (мышь)

Ген	Прямой праймер 5'→3'	Обратный праймер 5'→3'
<i>GAPDH</i>	GTAAAGACCTCTATGCCAACAC	GGTGCACGATGGAGGGGC
<i>ATF-4</i>	TCGGGTTTGGGGGCTGAAG	AAACAGAGCATCGAAGTCAAAC
<i>ATF-6</i>	AGGAGGGGAGATACGTTTTAC	CGAGGAGCTTTTGATGTGGAG
<i>BAK</i>	CAGATGGATCGCACAGAGAG	GCGTCTTTGCCCTGGGGAG
<i>BAX</i>	TAAAGTGCCCGAGCTGATCAGAAC	CTTCCCAGCCACCCTGGTCTT
<i>BCL-2</i>	AAGTCAACACAAACCCCAAGTCCTC	GCAGATCTTCAGGTCCTCCTGAGA
<i>BIM</i>	AATGGCCGGCTATGGATGATG	GCCAATTGGGTTCACTGTCTG
<i>CASP-12</i>	TGTTGGTGTTATCATTTGGAGG	TTTTCTTTTCTTCTCAGCTACAG
<i>CASP-3</i>	CTCTTCATCATTCAGGCCTGC	GACCCGTCCTTTGAATTTCTC
<i>CHOP</i>	CAGCTGGGAGCTGGAAGCCTG	GACCACTCTGTTTCCGTTTCC
<i>Colla1</i>	CATCACCTATCACTGCAAGAAC	AGGTCTTGGTGGTTTTGTTATTC
<i>Colla2</i>	TCTCAGAACATCACCTACCAC	CACGGAATTCTTGGTCAGCAC
<i>GADD34</i>	GAGTCCCATGAAGAGATTGTAC	ACCAGCCCAGCAGCCACTTAG
<i>IL-10</i>	AGCATGGCCCAGAAATCAAGG	AGACTCAATACACACTGCAGG
<i>IL-17</i>	CCCTCAAAGCTCAGCGTGTC	CCAGCTTTCCCTCCGCATTG
<i>IL-1β</i>	CGTGCTGTCGGACCCATATG	GCTCTTGACTTCTATCTTGTTG
<i>IL-22</i>	GCTCCCCCAGTCAGACAGG	TAGAAGGCAGGAAGGAGCAG
<i>IL-33</i>	TTTTGGAGAATGGATGTTATGTG	TTTGTGAAGGACGAAGAAGGC
<i>IL-6</i>	TCCAGAGATACAAAGAAATGATG	TTGGAATTGGGGTAGGAAGG
<i>PUMA</i>	TGAAGATCTGCGCCGGGAG	GAGAGGGACATGACGCGTG
<i>TGF-β</i>	ATGCAATGGGCTTAGTGTTCTG	TCCTGTTGGCTGAGTTGTGAC
<i>TNF-α</i>	TGGAAAGACAGAGGGTGACAG	TTGTCCCTTGAAGAGAACCTG
<i>XBPIs</i>	AGTCCGCAGCACAGCAGGT	AGAGAAAGGGAGGCTGGTAAG
<i>α-SMA</i>	AGGAAGGATCTCTATGCTAACAAC	ACTTAGAAGCATTGCGGTGG

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в ПЦР в реальном времени.

2.8 Вестерн-блоттинг (белковый иммуноблоттинг)

Образцы гомогенизировали в лизирующем буфере (20 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1% Тритон-X100), инкубировали на льду в течение 15 минут, затем центрифугировали в течение 30 минут при 20 000 g при 4°C и концентрировали супернатант. В каждую лунку добавляли 70 мкг общего белка из каждого образца. Белки разделяли электрофорезом ПААГ в 12,5%

полиакриламидном геле, после чего переносили на PVDF-мембрану. Мембраны блокировали в 5% БСА в течение 5 часов при комнатной температуре или 15 часов при 4°C, затем мембраны инкубировали с первичными антителами в 3% БСА в течение 2 часов при комнатной температуре или 15 часов при 4°C. После тщательной промывки мембран в 1х PBST их инкубировали со вторичными антителами в течение 2 часов при комнатной температуре, затем тщательно промывали, иммунореактивные полосы визуализировали путем определения пероксидазной активности с помощью окрашивания DAB (0,05% DAB в 1х PBS + 10 мкл 30% пероксида водорода).

2.9 Флуоресцентные измерения концентрации ионов кальция

Измерения внутриклеточной концентрации ионов кальция – проводили методом флуоресцентной микроскопии на микроскопе Carl Zeiss Cell Observer (Carl Zeiss, Германия) при помощи зонда Fura-2AM. Возбуждение проводили при 340 нм для определения зонда, связанного с кальцием, и при 380 нм для определения несвязанного зонда, эмиссию регистрировали при 510 нм. Для анализа и обработки данных использовалось программное обеспечение ImageJ.

2.10 Индукция фиброза и обработка исследуемыми агентами

Для индукции фиброза печени мышам-самцам C57BL/6J (вес 15 г, возраст 2-3 недели) внутрибрюшинно вводили ТАА (150 мкг/г (мг/кг) веса мыши) два раза в неделю в течение трех месяцев. Контрольная группа получала инъекции эквивалентного объема физиологического раствора (0,9% NaCl). После этого животных разделили на группы. В предварительной серии экспериментов использовали НС, Со и НС-Со в концентрациях 0,1 и 1 мкг/г (мг/кг) массы тела, в дальнейшем концентрации были увеличены до 1 и 5 мкг/г (мг/кг). Инъекции проводились внутрибрюшинно в течение месяца; указанные концентрации НС, Со и НС-Со вводили мышам через день. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 7.

2.11 Гистологический анализ печени мыши

Образцы печени фиксировали раствором 10% формалина и 0,05% глутарового альдегида в 0,9% NaCl, проводили через растворы этилового спирта в

порядке возрастания концентрации и о-ксилол. Затем образцы заключали в парафин, делали срезы толщиной 3 мкм при помощи микротомы Thermo Scientific Microm HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы депарафинировали при помощи о-ксилола и растворов этилового спирта в порядке убывания концентрации, затем окрашивали срезы растворами красителей: гематоксилин-эозин (hematoxylin-eosin) (HistoPoint, Россия) и пикро-сириус красный (picrosirius red) (ab246832, Abcam, Великобритания) согласно протоколам окрашивания указанных наборов. Фиксировали окрашенные срезы на стеклах при помощи синтетической монтирующей среды Витрогель (BioVitrum, Россия). Съемку срезов проводили на микроскопе Leica DM6000B (Leica, Германия). Для подсчета относительной площади коллагеновых волокон использовали программу ImageJ по указанной методике: <https://imagej.net/ij/docs/examples/stained-sections/index.html>

2.12 Измерение активности аминотрансфераз

Анализ активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови проводили колориметрическим методом Рейтмана-Франкеля. Для этого животных сначала усыпляли при помощи препаратов Рометар/Телазол (5 мг/кг и 50 мг/кг соответственно), после чего животных забивали посредством декапитации. Образцы крови инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре до свертывания крови, полученный сгусток центрифугировали при 2000 g в течение 15 минут при 4°C. Сыворотку собирали и использовали для анализа активности ферментов АЛТ и АСТ с использованием коммерческих наборов реагентов. К образцу добавляли определенное количество аспартата (AST/GOT) или аланина (ALT/GPT), инкубировали в течение 30 минут при 37 °C, затем добавляли фенилгидразин, чтобы остановить ферментативные реакции, и далее образцы инкубировали в течение 20 минут при 37°C, после чего добавляли раствор 0,4 М NaOH и инкубировали с ним 10 мин при комнатной температуре. Далее проводили оптические измерения видимого цветового поглощения фенилгидразона на микропланшетном ридере при длине волны 490 нм.

2.13 Статистический анализ

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 $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Для анализа данных и статистического анализа использовали программное обеспечение ImageJ и Prism GraphPad 7 (GraphPad Software, США).

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).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка эффективности цитотоксического действия НС, Со и НС-Со на клетки ГЦК человека НерG2 *in vitro*

3.1.1 Исследование цитотоксичности НС, Со и НС-Со в отношении клеток НерG2 *in vitro*

Для анализа цитотоксического действия НС, Со и НС-Со 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 11) показали, что инкубирование клеток линии НерG2 с НС приводило к дозозависимой цитотоксичности и гибели 37 – 51% клеток, тогда как инкубирование с Со – 9 – 22%. Наноконплекс НС-Со также вызывал дозозависимую гибель 28 – 43% клеток, что достоверно менее эффективно, по сравнению с НС.

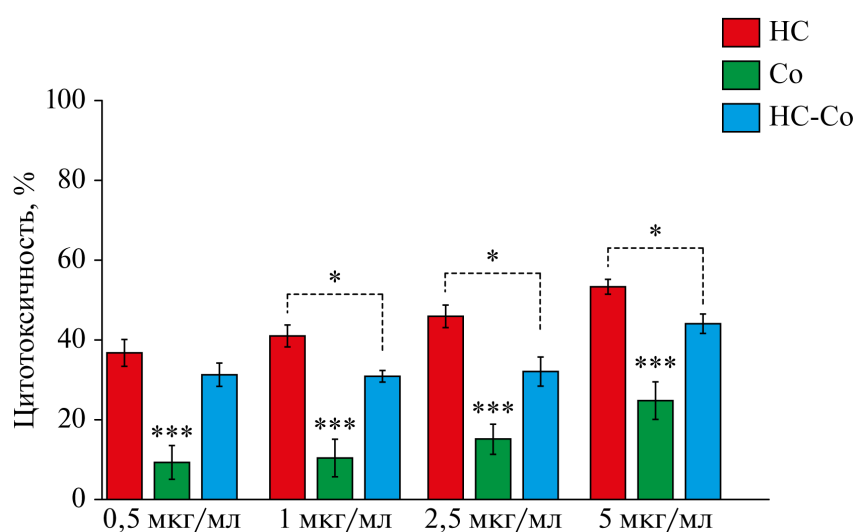


Рисунок 11. Цитотоксичность НС, Со и НС-Со в отношении клеток НерG2 после 24-часового воздействия, определенная с помощью МТТ-анализа. Значения для соответствующих контрольных клеток принимали за 0%. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 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.

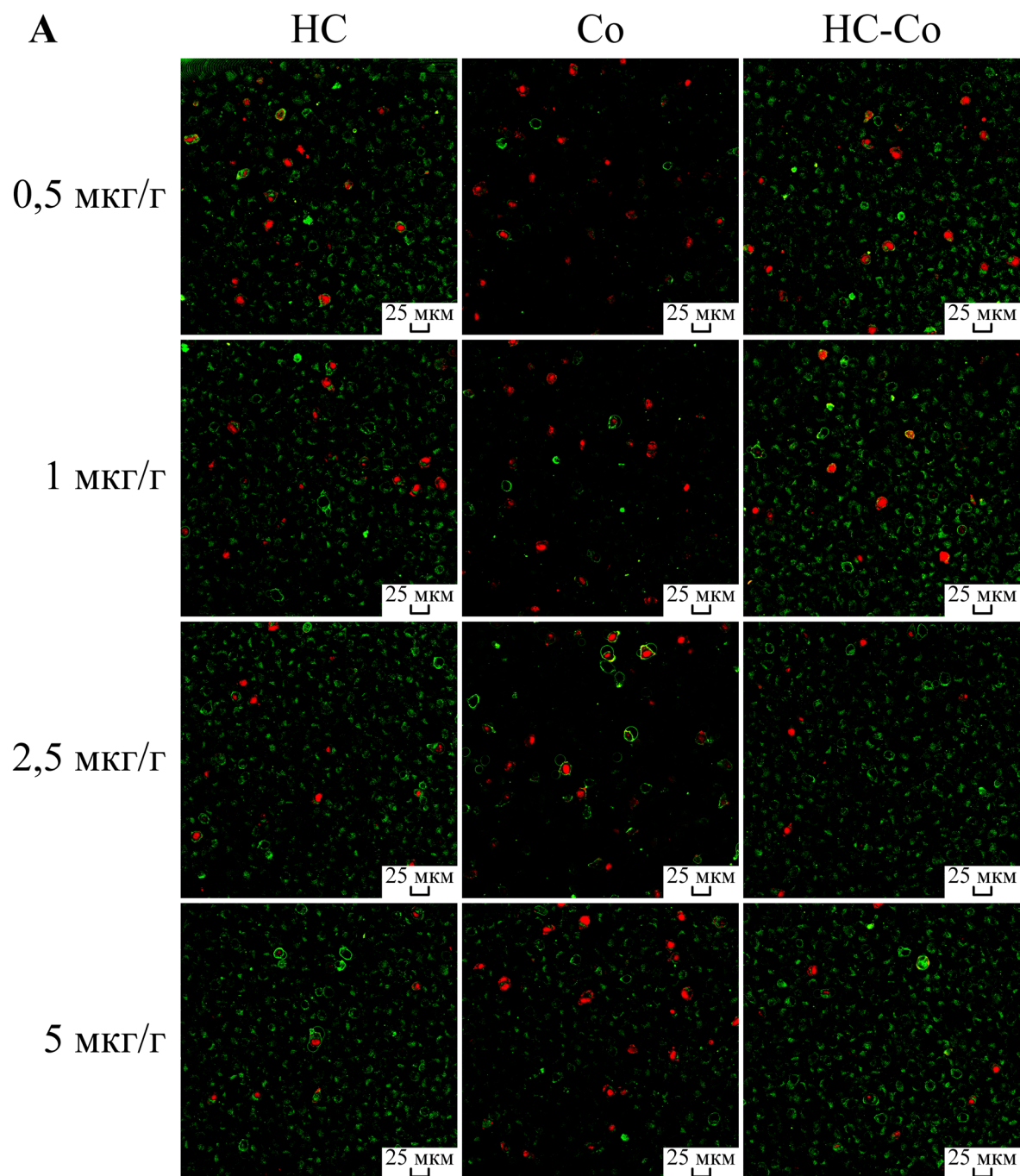
3.1.2. Установление типа клеточной гибели раковых клеток НерG2, активируемой 24-часовым воздействием на них НС, Со и НС-Со

Ранее в наших исследованиях показана индукция апоптоза в клетках HepG2 под воздействием НС, Со и НС-Со методом окрашивания Hoechst 33342 и пропидиум иодидом [Goltyaev 2022]. Для более точного определения индукции процессов апоптоза и некроза проведена серия экспериментов по окрашиванию данных клеток аннексином V и пропидиум иодидом.

Согласно результатам, представленным на Рисунке 12, 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 нанокмплес способствовали развитию апоптоза у более чем 20% раковых клеток, что втрое больше, чем после обработки клеток Со: Рисунок 12Б-В.

Более детальный анализ клеток HepG2, представленный на Рисунке 13, показал, что морфология клеток, окрашенных аннексином V, соответствует апоптотической гибели клеток, поскольку, как известно, он окрашивает только мембраны клеток, находящиеся в процессе апоптоза [251]. 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 12, 13), что свидетельствует о наличии вторичного некроза в этих клетках. Явление вторичного некроза характеризуется как процесс естественного завершения апоптоза у одноклеточных эукариот, а также в культурах клеток *in vitro* при отсутствии фагоцитирующих агентов [252]. Поэтому клетки с двойным окрашиванием мы справедливо рассматривали как находящиеся на поздних стадиях апоптоза раковые клетки. При этом важно отметить, что мы не наблюдали клетки, окрашенные только пропидиум йодидом, то есть ни один из исследуемых в работе агентов не вызывал некротическую гибель раковых клеток.

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) [253]. При этом значимых отличий в эффективности между НС и НС-Со зафиксировано не было.



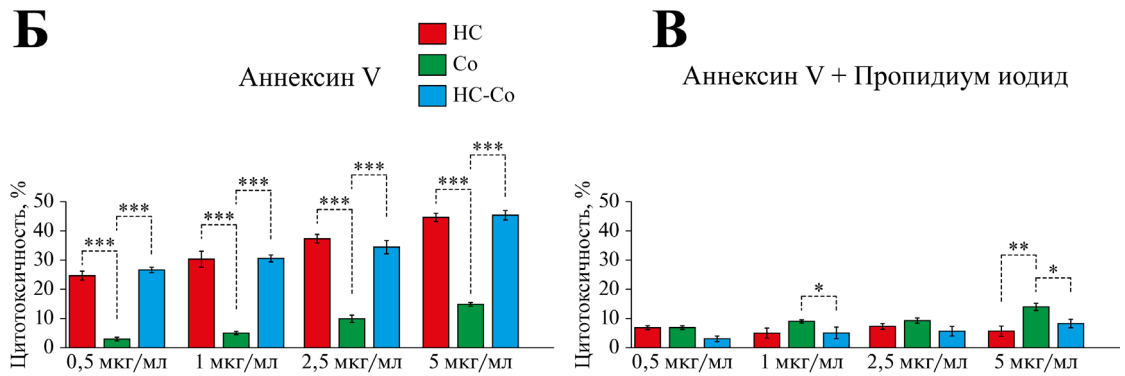


Рисунок 12. Установление типа клеточной гибели раковых клеток HepG2, активируемой 24-часовым воздействием на них HC, Co и HC-Co.

А. Полученные с помощью конфокальной микроскопии фотографии клеток HepG2, окрашенных аннексином V (зеленая флуоресценция) и пропидиум иодидом (красная флуоресценция); **Б-В.** Статистический анализ подсчета клеток HepG2, окрашенных аннексином V и пропидиум иодидом, с помощью программы ImageJ относительного количества клеток, окрашенных аннексином V и пропидиум иодидом. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

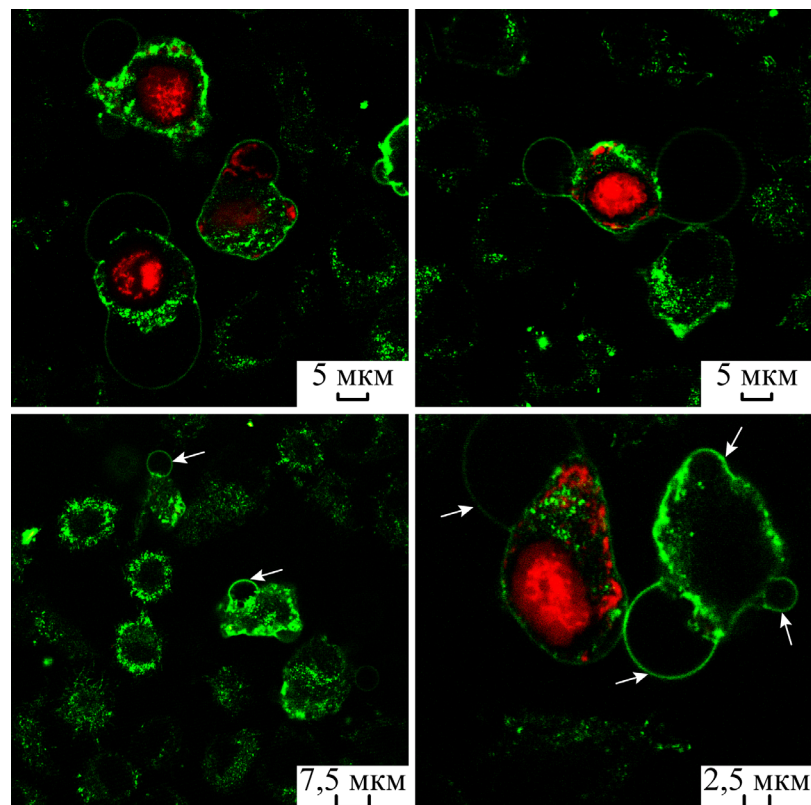


Рисунок 13. Апоптоз и некроз в клетках HepG2. Зеленая флуоресценция – аннексин V, красная флуоресценция – пропидиум иодид. Стрелками показан мембранный блеббинг.

Известно, что терапевтические дозы Со при лечении рака печени находятся в диапазоне высоких концентраций (200–400 мг при двухразовом приеме два раза в день), что обуславливает его токсичность по отношению к здоровым тканям и органам и серьезные побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы, кожных покровов и почек [254, 255]. Полученные нами данные показывают более эффективную сильную индукцию апоптоза НС и НС-Со по сравнению с Со в том же диапазоне концентраций, что может потенциально указывать на существенные преимущества селенсодержащих агентов при дальнейшем исследовании их терапевтических свойств на моделях *in vivo*.

3.1.3 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 14А). В то же время, Со вызывал в клетках рост экспрессии *CASP-3*, что может свидетельствовать об активации апоптоза в раковых клетках, как мы и наблюдали в предыдущих исследованиях (Рисунок 12, 13). 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 14В).

Следует отметить, что уровень *CASP-3* после 24-часовой обработки клеток НС не только не усилился, а даже почти вдвое снизился по отношению к

контрольным значениям. При этом нами установлено, что спустя 24 часа НС в концентрации 2,5 мкг/мл более цитотоксичны в отношении раковых клеток по сравнению с наноконкомплексом и особенно с Со (Рисунок 11).

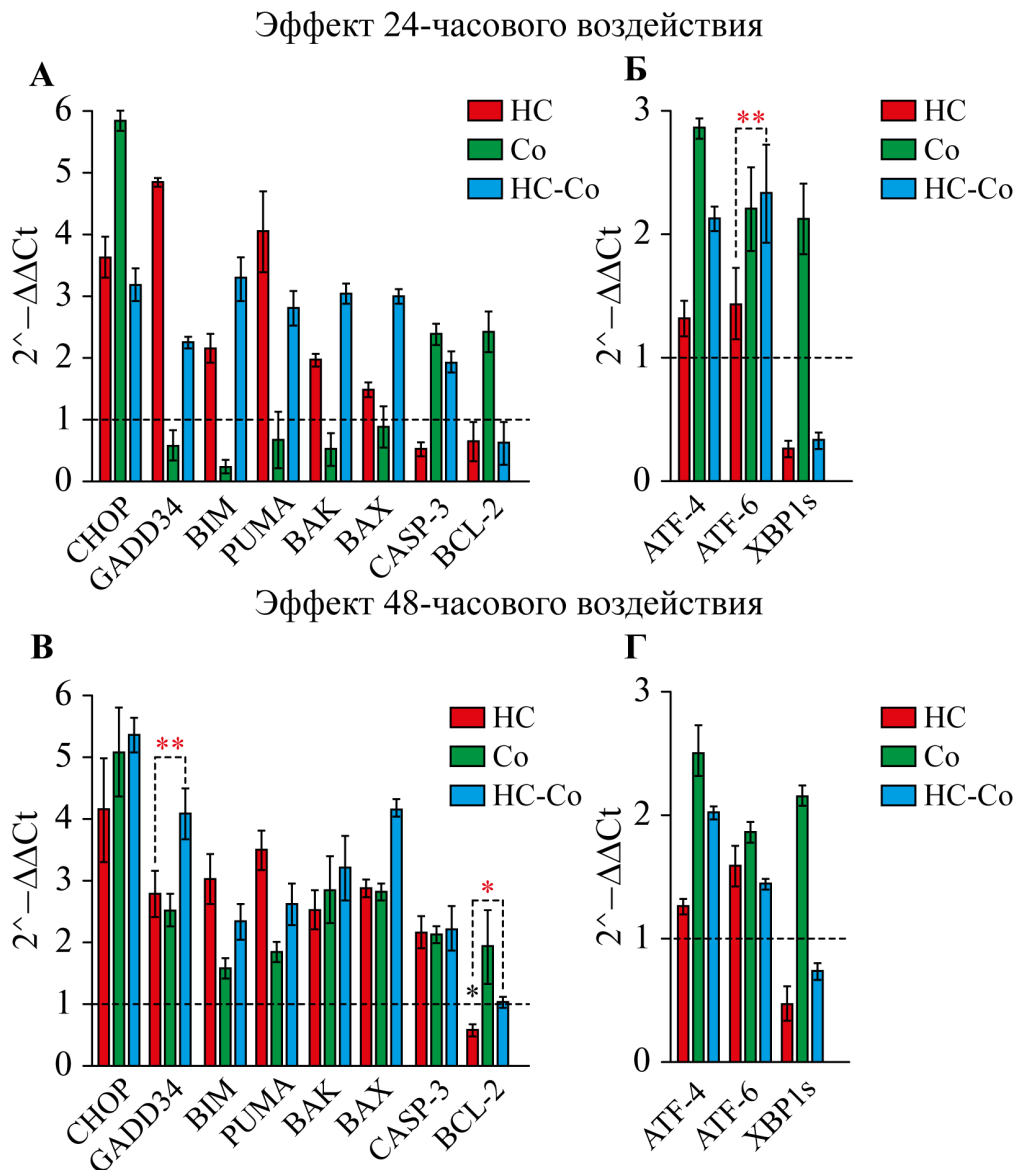


Рисунок 14. А, В. Паттерны экспрессии генов, кодирующих про- и антиапоптотические белки; Б, Г. Паттерны экспрессии генов, кодирующих белки стресса ЭПР. Клетки линии НерG2 после инкубирования с 2,5 мкг/мл НС, Со и НС-Со. За 1 принят уровень экспрессии в контрольных клетках. Сравнения достоверности между НС и НС-Со обозначены красным. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2022].

В связи с этим, мы предполагаем, что НС сравнительно быстро проникают в раковые клетки в силу малых размеров и в первые же часы вызывают пролонгированный стресс ЭПР, а также рост уровней экспрессии проапоптотических маркеров, в том числе и *CASP-3*. Поэтому ко времени детекции

результатов (спустя 24 часа) мы можем наблюдать больший процент клеток с апоптозом, высокие показатели цитотоксичности и тренд на снижение экспрессии эффекторной *CASP-3*, а также не меняющиеся, а в случае *XBP1s* даже снижающиеся, уровни экспрессии маркеров стресса ЭПР. Однако для утверждения этих предположений, требуется исследовать паттерны экспрессии всех вышеперечисленных генов в первые часы после воздействия на клетки НС, а также подтвердить полученные данные с помощью Вестерн-блоттинга.

Важно было исследовать, как меняется экспрессия хорошо известных маркеров адаптивного и пролонгированного стрессов ЭПР, активация которых является распространенным сценарием при воздействии на раковые клетки селенсодержащих соединений различной природы, что было показано нами и другими авторами [256, 257]. Важно отметить, что адаптивный стресс ЭПР это временная реакция на неправильное сворачивание белков, приводящая к восстановлению процесса фолдинга и выживанию клеток [258]. Происходит увеличение синтеза шаперонов, снижение трансляции белков (под действием $eIF2\alpha$), активация компонентов комплекса деградации белков ERAD. В случае продолжительного или более сильного воздействия агента, вызывающего стресс ЭПР, может развиваться пролонгированная форма данного процесса, что перегружает адаптивные системы, смещая процесс в сторону проапоптотических путей (таких как CHOP). При этом экспрессия *CHOP* может активировать не только ATF-4 (путь PERK), но и XBP1 (пути IRE1 α и ATF-6) [241]. CHOP, а также GADD34 запускают процесс апоптоза, как результат пролонгированного стресса ЭПР.

При оценке уровней экспрессии ключевых маркеров трех путей ответа на стресс ЭПР (UPR) в клетках НерG2 установлено изменение экспрессии всех исследуемых транскрипционных факторов (ATF-4, ATF-6, и сплайсированной формы XBP1). Принимая во внимание тот факт, что наряду с усилением экспрессии этих генов наблюдался рост транскриптов проапоптотических маркеров, можно с уверенностью говорить, что в клетках НерG2 происходила активация не только адаптивного, но и пролонгированного стрессов ЭПР. Согласно результатам анализа

ПЦР в реальном времени, представленным на Рисунке 14Б, Г, очевиден различный характер паттернов экспрессии всех трех маркеров UPR в зависимости от природы исследуемых агентов. Так, Со способствовал росту уровней экспрессии всех трех факторов транскрипции и маркеров UPR более, чем в два раза. Тогда как наноконкомплекс НС-Со повлиял на экспрессию только двух факторов транскрипции *ATF-4* и *ATF-6*, усилив их приблизительно вдвое. В свою очередь НС не вызвали рост ни одного из вышеперечисленных маркеров стресса ЭПР, а, наоборот, наряду с НС-Со способствовал снижению экспрессии сплайсированной формы *XBP1s*.

Суммарная информация по экспрессии исследуемых генов представлена в Таблице 3.

Агент	Маркеры стресса ЭПР и апоптоза	
	24 часа	48 часов
НС	<i>CHOP, GADD34, PUMA</i> <i>XBP1s</i>	<i>CHOP, GADD34, BIM, PUMA, BAK, BAX</i>
Со	<i>CHOP, CASP-3, BCL-2, ATF-4</i> <i>BIM</i>	<i>CHOP, GADD34, BAK, BAX, ATF-4, XBP1s</i>
НС-Со	<i>CHOP, GADD34, BIM, PUMA, BAK, BAX, ATF-4</i> <i>XBP1s</i>	<i>CHOP, GADD34, BIM, PUMA, BAK, BAX</i>

Таблица 3. Активность НС, Со и НС-Со в отношении экспрессии маркеров стресса ЭПР и апоптоза. Гены, уровни экспрессии которых выросли, выделены красным, снизились – выделены синим

3.1.4. Влияние сорафениба, наночастиц селена и наноконкомплекса селен-сорафениб на систему кальциевой сигнализации клеток НерG2

Процессы активации апоптоза тесно связаны с внутриклеточной кальциевой сигнализацией и могут быть инициированы ионами Ca^{2+} [137, 259].

Поскольку ранее нами были зафиксированы кальциевые колебания под действием НС в различных раковых клетках (А-172 – глиобластома, Сасо-2 – аденокарцинома толстой кишки, DU-145 – рак предстательной железы, MCF-7 – аденокарцинома молочной железы), 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 НС, Со и НС-Со.

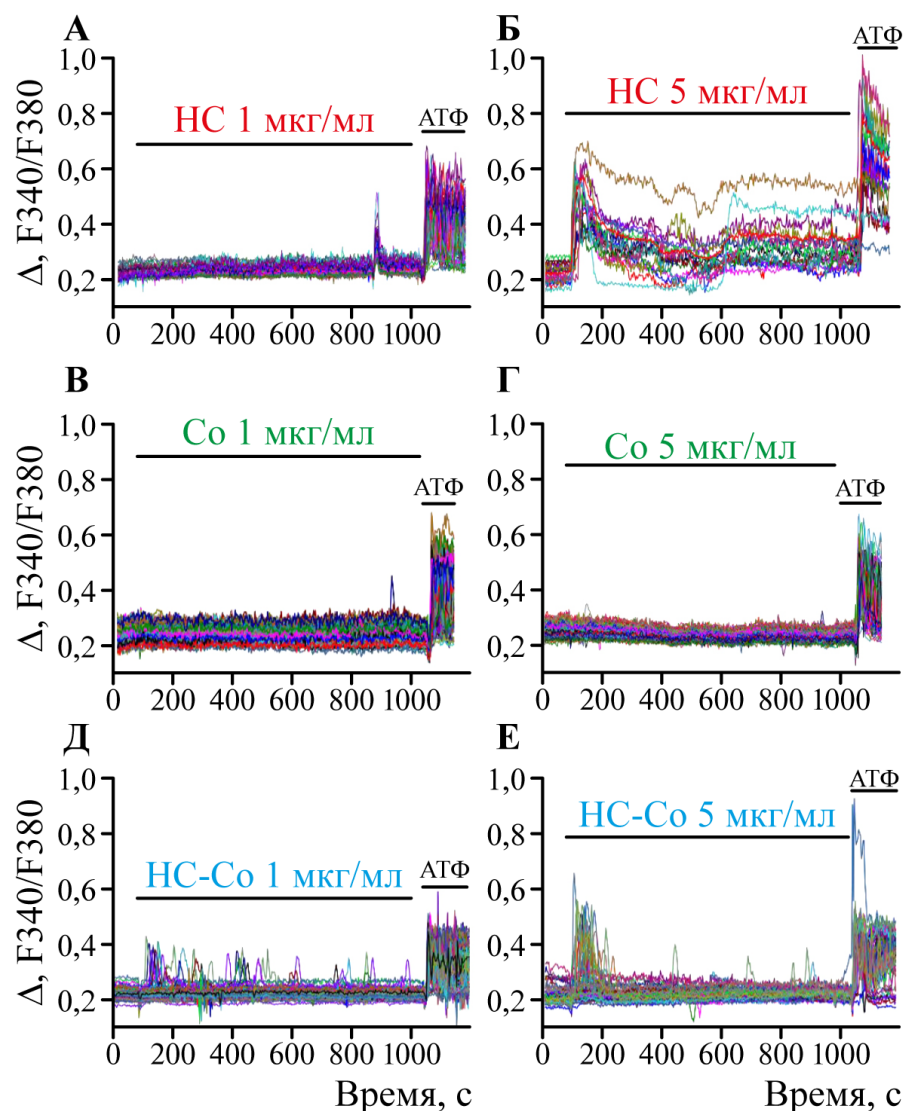


Рисунок 15. Регистрация Ca^{2+} -динамики в клетках НерG2 при аппликации различных концентраций НС (А, Б), Со (В, Г) и НС-Со (Д, Е). В конце эксперимента добавляли 10 мкМ АТФ. На рисунке показаны Ca^{2+} -сигналы отдельных клеток. Количество покровных стекол с клеточными культурами в каждом анализе = 4 [Goltyaev, 2022].

Добавление в культуральную среду НС в концентрации 1 мкг/мл через 10–12 мин вызывало генерацию кальциевых сигналов в клетках НерG2 (Рисунок 15 А) в виде одиночного импульса с последующим возвращением уровня внутриклеточной концентрации ионов кальция к базальным значениям. Увеличение концентрации НС до 5 мкг/мл (Рисунок 15 Б) приводило к быстрой генерации Ca^{2+} -ответов клетками, разнообразию сигналов Ca^{2+} (одиночные

импульсы Ca^{2+} и колебания Ca^{2+}) и дозозависимому росту амплитуды сигналов (Рисунок 16).

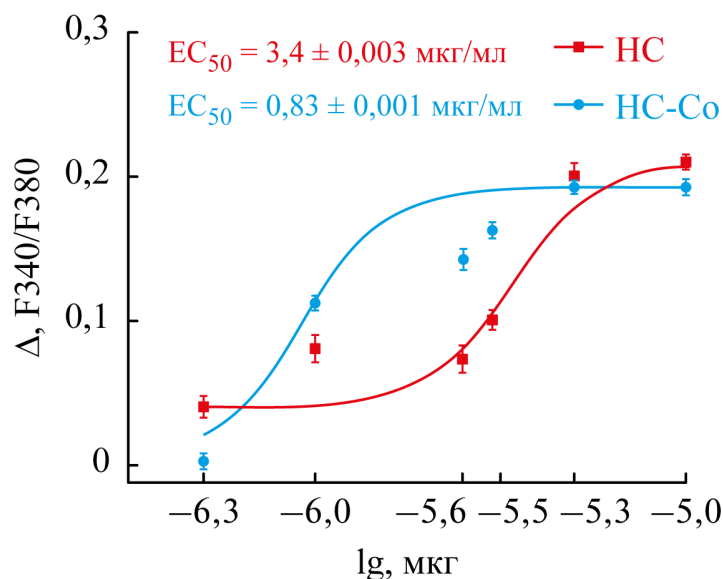


Рисунок 16. Дозозависимое изменение амплитуды сигналов Ca^{2+} в ответ на воздействие НС или НС-Со на клетки НерG2. Зависимость амплитуды Ca^{2+} -ответов клеток НерG2 от роста концентрации НС или НС-Со и ее аппроксимация сигмовидной функцией. Каждая точка представляет собой среднее значение измерения Ca^{2+} -сигнальной клетки в одном эксперименте $\pm$ SE. Для построения дозовых зависимостей использовались результаты Ca^{2+} -динамических измерений на трех независимых культурах клеток [Goltyaev, 2022].

Подобные эффекты наблюдались при обработке клеток НС-Со уже в концентрации 1 мкг/мл (Рисунок 15 Д), тогда как увеличение концентрации наноконплекса до 5 мкг/мл (Рисунок 15 Е) способствовало росту амплитуды кальциевых сигналов, которые в среднем были выше (Рисунок 16), чем кальциевые ответы при воздействии на клетки НС.

В свою очередь, Со в обеих исследуемых концентрациях не вызывал генерации кальциевых сигналов Ca^{2+} , 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 15 В, Г).

Подводя итог серии экспериментов, выполненных на модели *in vitro*, можно выделить основные результаты. Установлено, что для экспрессии проапоптотических генов в клетках НерG2 требуются высокие дозы Со и 48-

часовая обработка клеток, тогда как НС и наноконплекс НС-Со способны индуцировать гибель этих же раковых клеток уже через 24 часа, при этом НС-Со оказался более эффективным в этих процессах. Однако, следует отметить, что данные ПЦР в реальном времени после 24-часовой обработки раковых клеток Со, все же свидетельствуют о существенном росте уровня мРНК эффекторной CASP-3. Принимая во внимание синхронное усиление экспрессии всех трех маркеров UPR, мы можем предположить, что быстрый транскрипционный рост CASP-3 обусловлен более выраженной активацией стресса ЭПР. С другой стороны, по результатам только ПЦР в реальном времени достаточно сложно оценить уровень активной CASP-3 в исследуемых образцах, требуются дальнейшие исследования с использованием других независимых подходов, в частности Вестерн-блоттинга. На примере клеток НерG2 нами было установлено, что все три исследуемые агента по-разному модулируют экспрессию не только про- и антиапоптотических генов, но и маркеров стресса ЭПР. Опираясь на результаты ПЦР анализа, мы можем лишь предполагать, что Со участвует в активации всех трех путей UPR (PERK, IRE1 α и ATF-6), тогда как наноконплекс НС-Со-только двух (PERK и ATF-6), при этом последний наряду с НС ингибируют IRE1 α сигнальный путь. Кроме того, нами показано, что Со в исследованных концентрациях не вызывает быстрых реакций в виде увеличения кальциевых ответов в клетках НерG2, тогда как НС и НС-Со вызывают дозозависимое увеличение с генерацией различных форм кальциевых сигналов. При этом наноконплекс вызывал подобные эффекты уже в дозировке 1 мкг/мл, тогда как НС только при 5 мкг/мл.

Таким образом, показано, что НС 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 [253]. При этом по ряду исследуемых параметров, НС-Со оказался более эффективным, чем НС.

Продemonстрированное нами на модели клеток НерG2 проапоптотическое действие НС и НС-Со согласуется с массивом данных о цитотоксическом действии наночастиц селена *in vitro* в отношении раковых клеток, при этом присутствует

другой массив информации – о защитном действии НС в отношении печени *in vivo*. Для определения защитных эффектов исследуемых агентов (НС, Со и НС-Со) в отношении клеток печени *in vivo* была проведена серия экспериментов на животной модели.

3.2 Оценка эффективности действия НС, Со и НС-Со на модели ТАА-индуцированного фиброза печени у мышей

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 внутривенными инъекциями тиацетамидом. 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 препараты НС, Со и НС-Со в концентрациях 1 и 5 мкг/г. Предварительно, нами была проверена эффективность исследуемых агентов в концентрации 0,1 мкг/г, однако ввиду низкой эффективности, данная дозировка в дальнейших экспериментах не использовалась.

3.2.1. 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 17А), тогда как средний вес печени у животных обеих групп был одинаковым (Рисунок 17Б). Это свидетельствует о том, что показатель отношения массы печени к массе животного

увеличился в среднем на 12% после инъекций ТАА относительно контроля (Рисунок 17В).

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. Поскольку ТАА достоверно не изменил массу печени животных, мы решили проверить повлияют ли на этот показатель все три исследуемых агента. Результаты, представленные на Рисунке 17Д, 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 17Д. Согласно результатам статистической обработки, представленным на Рисунке 17Е, 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 наноконцентрации мы можем наблюдать статистически значимое снижение данного соотношения.

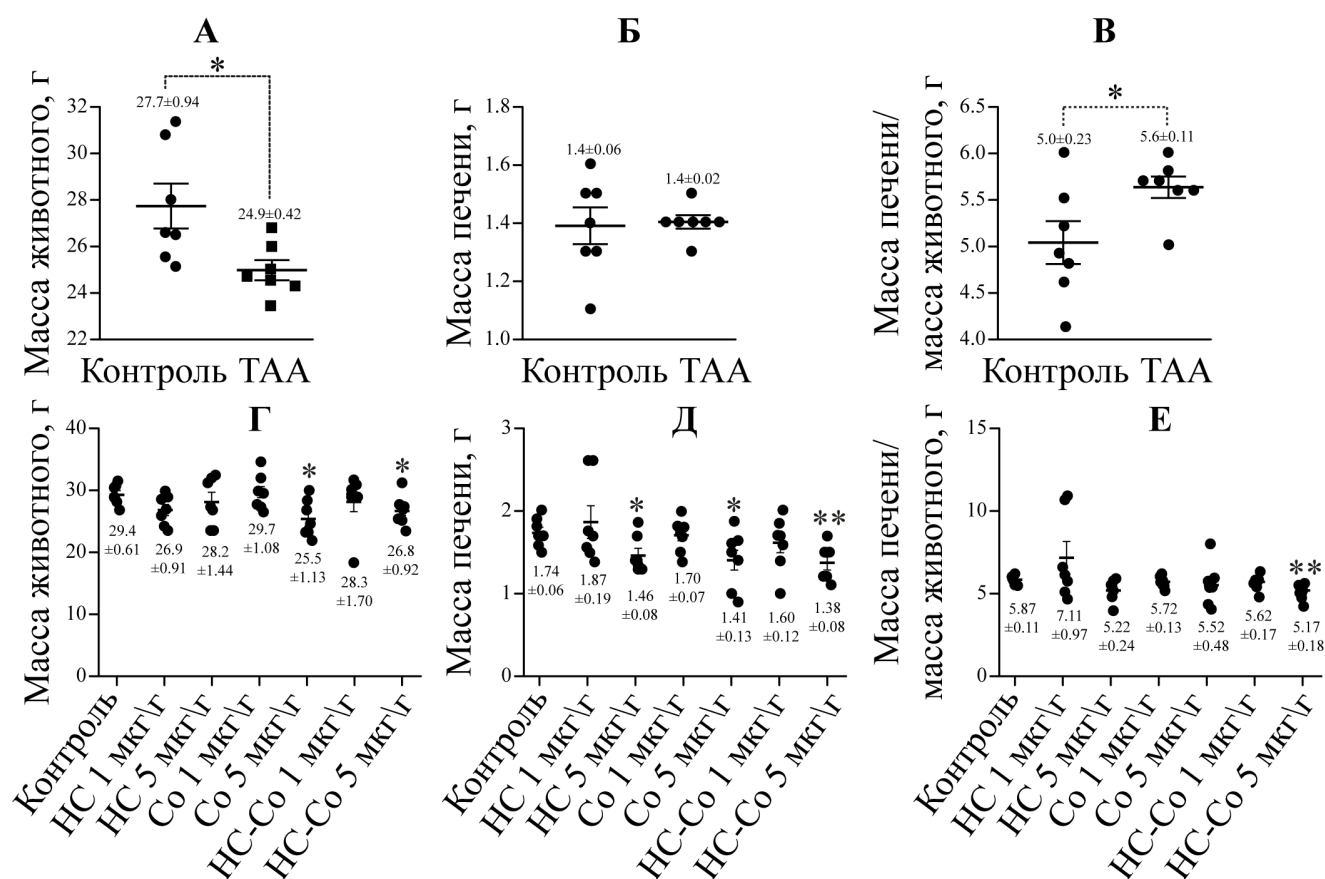


Рисунок 17. Статистический анализ массы животных, их печени и соотношение этих показателей в различных группах. **А.** Вес животного, г.; **Б.** Масса печени, г.; **В.** Отношение массы печени к массе животного (%) до и после обработки животных ТАА (150 мкг/г); **Г.** Масса животного, г.; **Д.** Масса 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 массы 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.

3.2.2 Противовирусный эффект НС, Со и НС-Со

Макроскопический анализ печени животных, получавших ТАА в течение трех месяцев, показал многочисленные включения соединительной ткани, что указывает на патологическое нарушение архитектоники печени и формирование фиброзных изменений в данном органе (Рисунок 18).

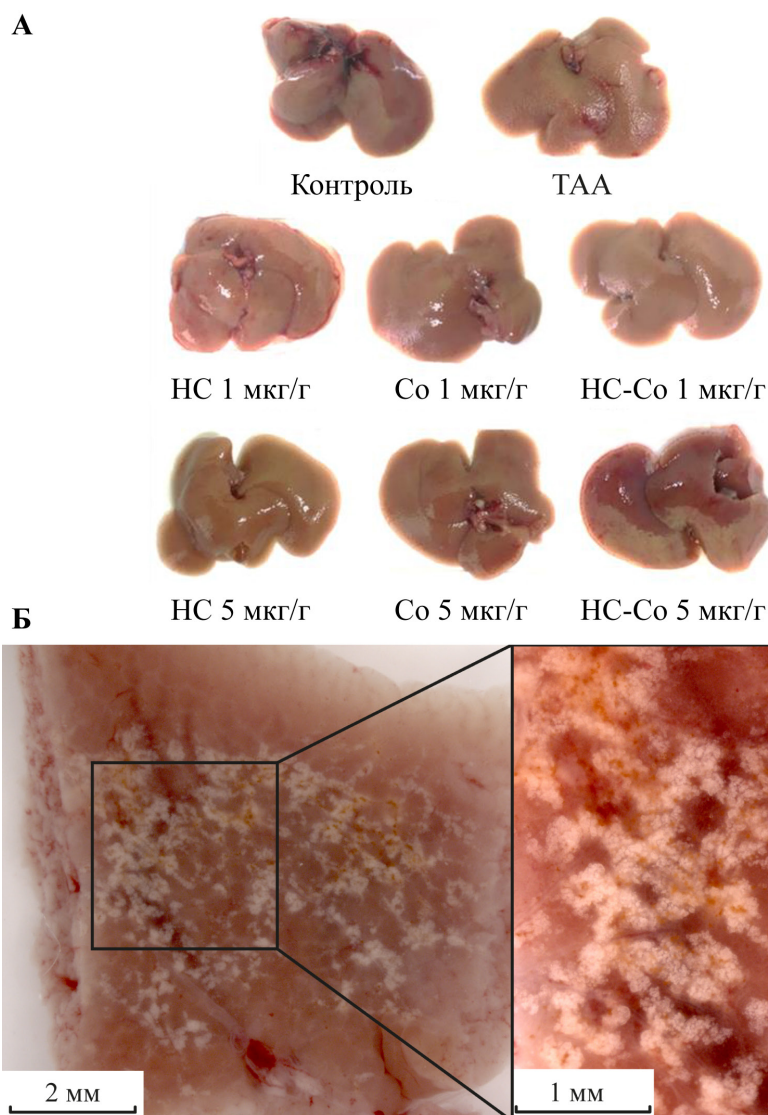


Рисунок 18. Макроскопический анализ образцов печени мышей линии C57BL/6J. **А.** Фотографии печени мышей до инъекций и после инъекций ТАА, НС, Со и НС-Со в различных концентрациях; **Б.** Фотографии участка печени мыши после инъекции ТАА [Goltyaev, 2023].

На Рисунке 19 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. Тогда как микроскопический анализ гистологических образцов печени после трехмесячных инъекций ТАА подтвердил патологические изменения в данном органе, сопровождающиеся глобальными архитектурными искажениями (Рисунок 19). 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, что согласуется с литературными данными при воздействии ТАА на клетки печени [130, 133].

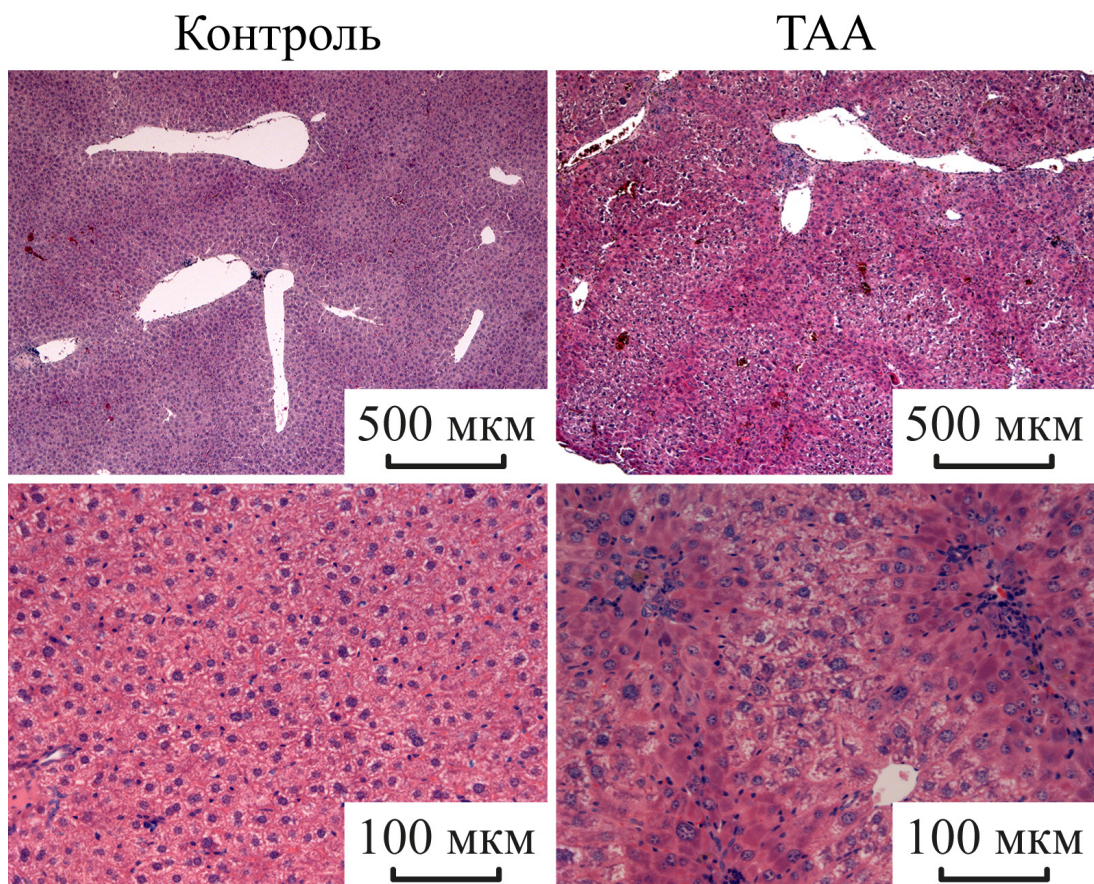


Рисунок 19. Микроскопический анализ гистологических образцов печени до и после воздействия ТАА. Окрашивание гематоксилином и эозином [Goltyaev, 2023].

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 некрвоспалительные поражения с менее выраженным фиброзом и

воспалением. Баллонная дегенерация гепатоцитов значительно ниже, чем в группе ТАА и наиболее заметна при обработке сорафенибом (Рисунок 20) Улучшение морфологической картины ТАА-индуцированного фиброза после введения НС, показанное при окрашивании гематоксилином и эозином, также описано в литературе [130, 133].

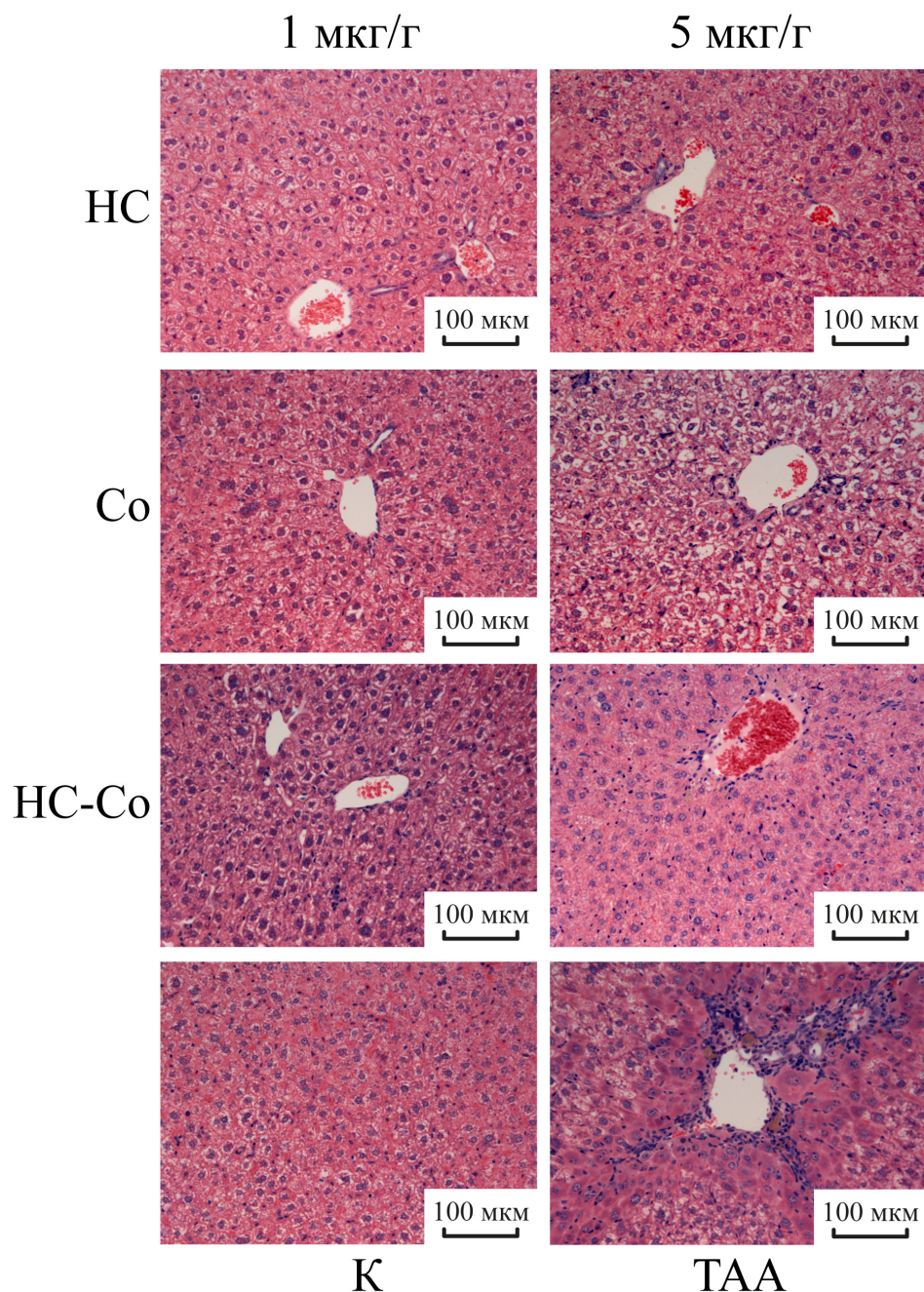


Рисунок 20. Микроскопический анализ гистологических образцов печени мышей в разных группах. Окраска гематоксилином и эозином [Goltyaev, 2023].

Для выявления коллагеновых структур в печени применяли краситель пикросириус красный (Picrosirius Red), который селективно окрашивает коллаген I и III

типов [260]. Микроскопия препаратов контрольной группы (здоровая печень) показала окрашивание в красный цвет только стенок сосудов, что является нормальным местом отложения коллагена: Рисунок 21.

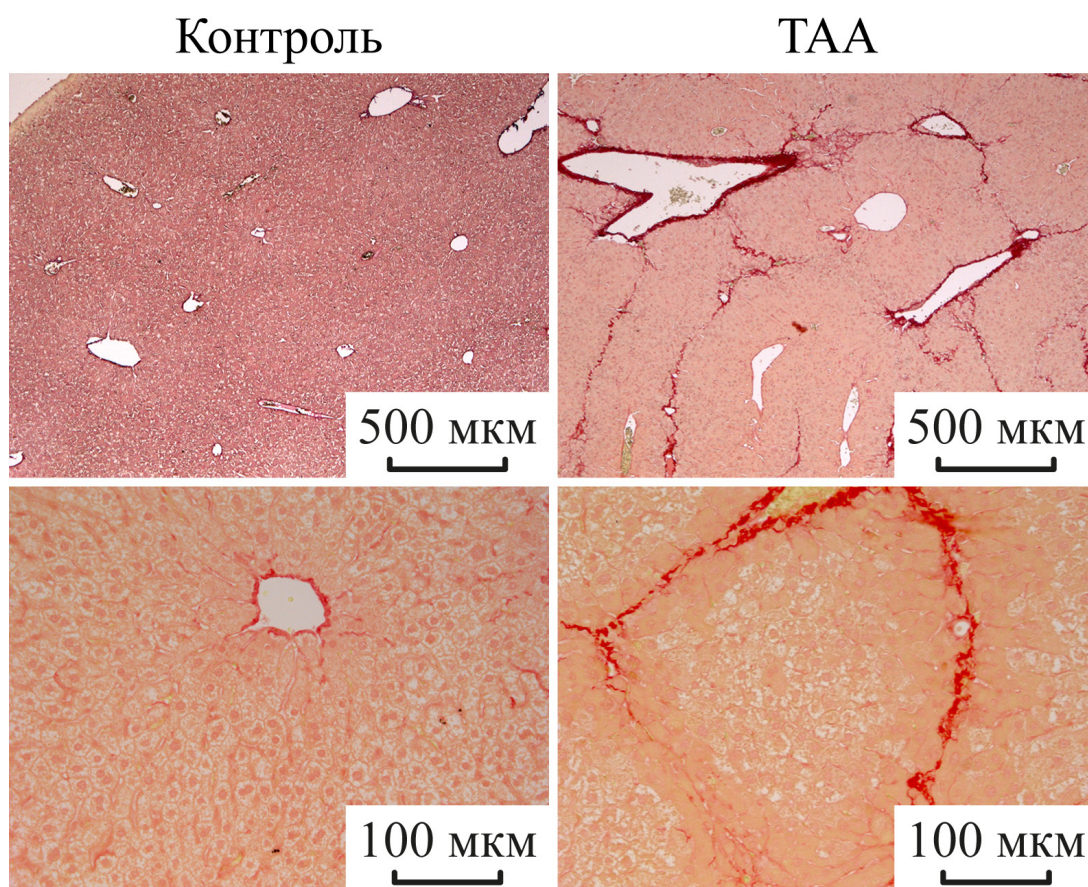
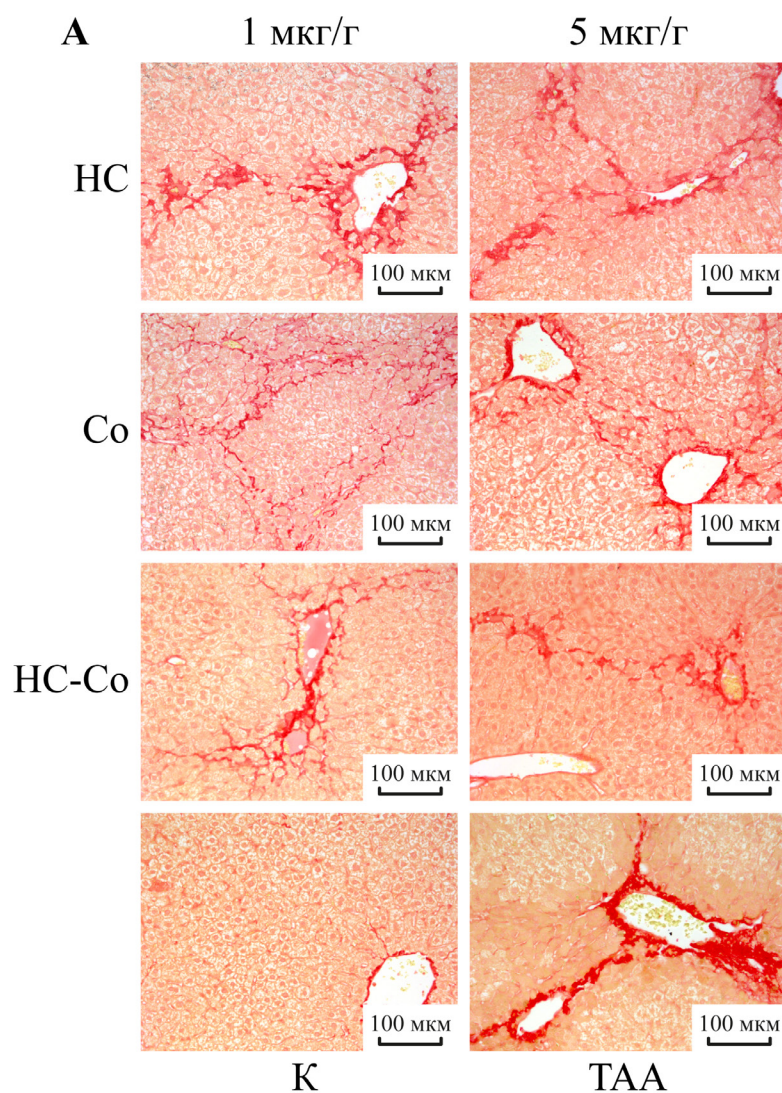


Рисунок 21. Микроскопический анализ гистологических образцов печени, окрашенных красителем пикро-сириус красный [Goltyaev, 2023].

После воздействия ТАА в срезах печени мышей обнаруживается широкий диапазон морфологических стадий патологического процесса. На Рисунке 21 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 центрo-портальные септы, образуя ложные дольки печени и регенеративные узелки, которые нарушают архитектуру печени, что согласуется с данными литературы о воздействии ТАА на печень [261, 262]. Таким образом, при обработке печени ТАА наблюдается смешанная – самая частая форма фиброза, при которой одновременно представлены различные стадии прогрессирования данного заболевания. Окрашивание срезов печени красителем пикро-сириус красный показано на Рисунке 22А. Площадь окрашенного коллагена была подсчитана при помощи программы ImageJ, показано достоверное ее увеличение в группе ТАА, однако в группах НС, Со и НС-Со отличия недостоверны. (Рисунок 22Б).



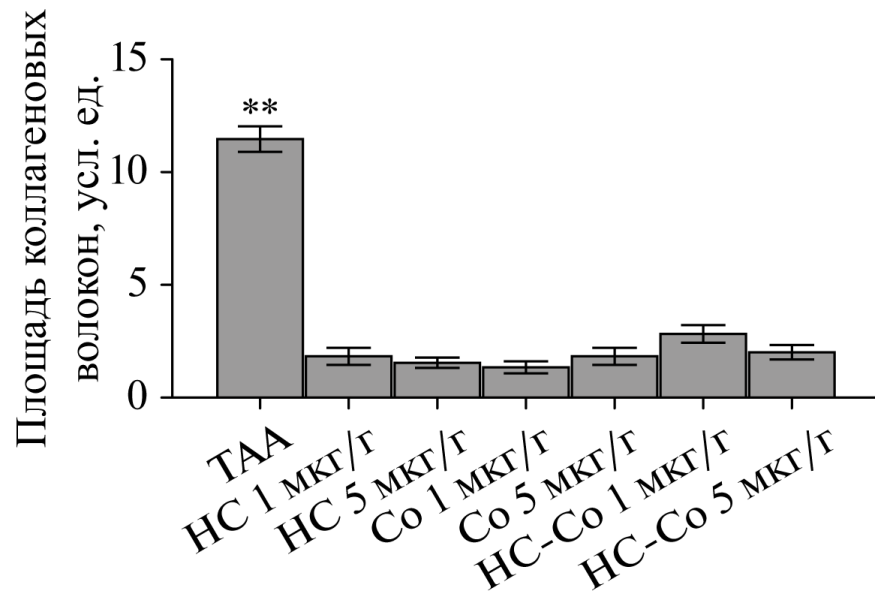


Рисунок 22. А. Микроскопический анализ гистологических образцов печени мышей в разных группах. Окраска красителем пикро-сириус красный. **Б.** Площадь коллагеновых волокон, рассчитанная с помощью программы ImageJ. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Площадь волокон для контрольной группы принимали за 0 [Goltyaev, 2023].

Различия между группами НС, Со и НС-Со были незначительны. Воздействие препаратов в разных концентрациях (1 и 5 мкг/г) практически не отличалось по оказанному эффекту. В группах НС, Со и НС-Со наблюдали уменьшение отека (что отражалось в более равномерном просвете синусоид), восстановление целостности печеночных балок, в перипортальной зоне отмечалось значительное число регенерирующих гепатоцитов в состоянии митоза, возросло количество функционально активных клеток печени. По сравнению с группой ТАА, выраженная воспалительно-клеточная инфильтрация портальных трактов практически полностью сменилась на умеренную диффузную инфильтрацию паренхимы печени.

Использование пары красителей гематоксилин-эозин выдержало испытание временем как стандартная окраска для гистологического исследования тканей человека [263]. Эта простая комбинация красителей способна выделить тонкие структуры клеток и тканей. В то же время пикро-сириус красный (полиазокраситель, используемый в методах окрашивания коллагена и амилоида)

– обеспечивает красное окрашивание всех типов коллагена [264]. Данный краситель обладает хорошим сродством к коллагеновым волокнам, причем имеет более высокое сродство связывания с фибриллярным коллагеном из-за его удлиненной химической структуры, что подтверждено иммунодетекцией [265]. Использование указанных методов окраски позволило надежно установить факт развития фиброза в ткани печени мыши, а также оценить его интенсивность. Окраска показала, что инъекции ТАА вызывали выраженные фиброзные изменения в печени мышей, что согласуется с предыдущими исследованиями [266–268]. В литературе мы встретили два способа введения животным ТАА: 1) внутрибрюшинное введение 150 мкг/г ТАА три раза в неделю в течение 11 недель у крыс и 2) введение ТАА с питьевой водой в концентрации 300 мкг/мл в течение 2–4 месяцев у мышей [266]. Наша модель близка к первой, с той разницей, что в мы использовали мышей и вводили 150 мкг/г два раза в неделю в течение трех месяцев.

Противофиброзный эффект Со (1,25; 5; 7 мкг/г/день) показан на звездчатых клетках печени человека (LX-2) *in vitro* и на крысах *in vivo* [269]. Лечение данным препаратом значительно подавляло пролиферацию клеток LX-2 на 75%, снижая экспрессию *TGF-β1*, *TIMP-1*, коллагена I и *MMP2*, но не *β-PDGFR* или *TGF-βR* типа I. При этом значительное подавление фиброза печени наблюдалось при введении Со одновременно с ТАА, однако, не было никакого существенного влияния Со на экспрессию маркеров фиброза или индукцию фиброза, когда он вводился после развития цирроза печени. Также описано, что Со (10 мкг/г) облегчал течение фиброза печени в клинических исследованиях и способствовал апоптозу звездчатых клеток печени *in vitro* посредством ингибирования STAT3 [270]. Показано, что ослабление фиброза печени крыс *in vivo*, и апоптоз звездчатых клеток печени *in vitro* связаны со снижением уровня циклина D1 и циклинзависимой киназы 4 (Cdk-4), увеличением экспрессии *Fas*, *Fas-L* и *CASP-3* и снижением соотношения BCL-2 к BAX [271].

В наших экспериментах также зафиксировано противофиброзное действие Со, при этом достоверных отличий в снижении относительной площади коллагеновых волокон в печени в группах НС, Со и НС-Со не наблюдалось.

Противофиброзная активность НС также описана: в отношении фиброза легких [272], и печени. Показаны противофиброзные свойства НС (на модели печени крыс *in vivo*), способность наночастиц стабилизировать мембрану, удалять свободные радикалы, антиоксидантный потенциал и противовоспалительное действие [273].

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

3.2.3 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 23А, 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 соответствует литературным данным [274] и 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), при этом эти значения могут меняться в том числе из-за различных методов забора крови [275].

Помимо ожидаемого 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 23А, 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.

Сорафениб 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.

Полученные нами результаты находят подтверждение в работах других авторов. Так, показано, что ТАА в концентрации 200 мкг/г также вызывал рост АЛТ и АСТ у крыс в 4 и 3 раза, соответственно, тогда как последующие инъекции Со (10 мкг/г) и НС (5 мкг/г) снижали уровни данных аминотрансфераз (в 1,5 раза), но при этом не нормализовали их. Лучшие результаты были получены путем одновременного введения животным Со и НС – показатели возвращались к нормальным значениям [133].

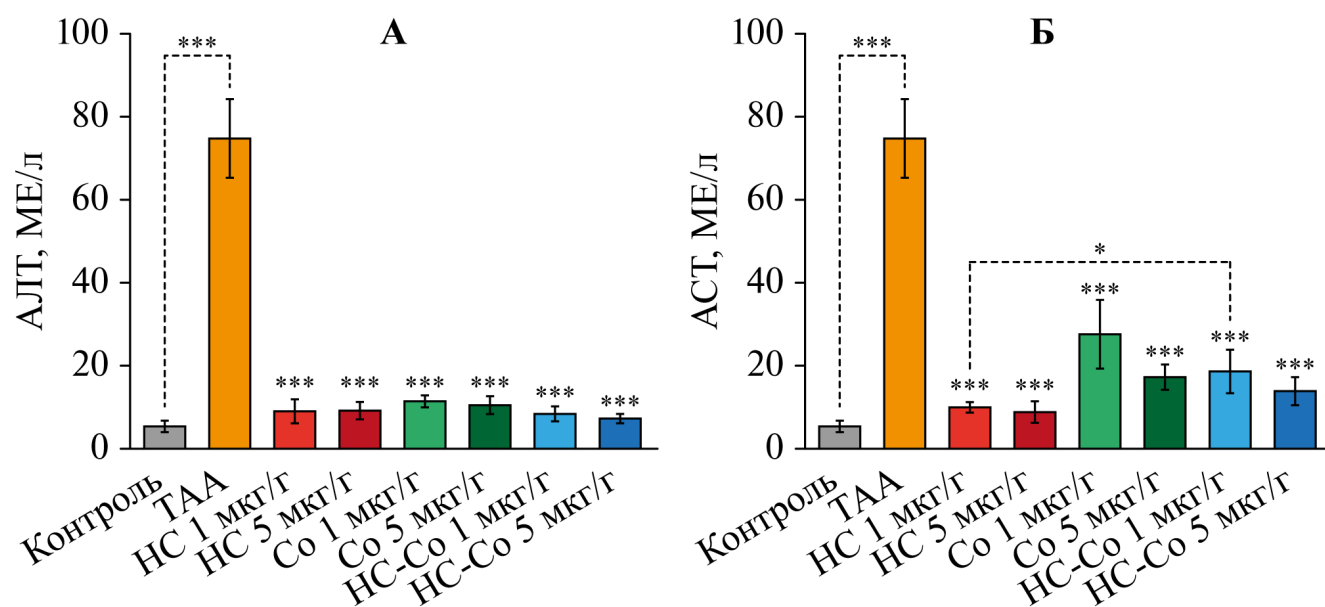


Рисунок 23. А. Анализ активности АЛТ. Б. Анализ активности АСТ в сыворотке крови подопытных животных. Анализ активности ферментов проводили колориметрическим методом Рейтмана–Франкеля. Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

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

исследуемых мышей снизилась до контрольных значений, что согласуется с литературными данными (Таблица 1).

3.2.4 Сравнительный анализ паттернов экспрессии маркеров воспаления и фиброза в гепатоцитах после инъекций ТАА и последующей терапии НС, Со и НС-Со

Как правило, прогрессирование фиброза печени сопряжено с ростом воспалительного статуса, накоплением коллагена, нарастанием соединительной ткани, поэтому важно было установить как меняется экспрессия и активность ряда хорошо известных провоспалительных маркеров и маркеров, сигнализирующих о прогрессировании фиброза [266–268].

Согласно результатам ПЦР в реальном времени, представленным на Рисунке 24А, 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 [276–279]. 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), что также указывает на усиление синтеза коллагена [280].

Известно, что различные цитокины, выделяемые иммунными клетками, играют огромную роль в регуляции фиброгенеза печени. IL-17 секретируется при фиброзе печени Т-хелперными клетками (Th17), нейтрофилами и тучными клетками и представляет собой профиброзный цитокин, который стимулирует звездчатые клетки печени к увеличению уровней коллагена I типа, α -гладкомышечного актина и TGF- β [281, 282]. Согласно полученным нами результатам, наблюдался рост экспрессии *IL-17* в два раза по сравнению с контролем (Рисунок 24А). Ряд исследований показал, что высокие уровни экспрессии *IL-22* наблюдаются в крови пациентов с циррозом печени и ГЦК [283, 284], тогда как IL-22 способен ингибировать фиброз печени у мышей [285]. На Рисунке 24А показано, что инъекции ТАА вызывали сильное ингибирование

экспрессии *IL-22* (почти в 5 раз), что может косвенно указывать на активацию фиброгенеза. Кроме того, ТАА вызывал почти четырехкратное увеличение экспрессии *IL-33*, что также является свидетельством прогрессирования фиброза, поскольку известно, что этот интерлейкин у мышей высвобождается из поврежденных гепатоцитов во время фиброгенеза [286].

Уровни экспрессии провоспалительных интерлейкинов *IL-1β* 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. Известно, что активация воспалительных комплексов расщепляет про-*CASP-1* и запускает созревание и секрецию *IL-1β* и *IL-18*, которые являются критическими цитокинами, участвующими в иммунных ответах и запускают воспалительный каскад [287]. Недавние исследования показали, что пироптоз участвует в фиброгенезе печени [288] и является типом запрограммированной гибели клеток, зависящим от *CASP-1*, которая расщепляет гасдермины с образованием мембранных пор [289]. Можно предположить, что повышенная экспрессия *CASP-1* и *IL-1β* в наших экспериментах может приводить к пироптозу гепатоцитов и иммунных клеток [290].

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 [291], 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 противофиброзными эффектами [292, 293]. 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 24Б – 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*.

Наноконплекс 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 наноконплекс 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*.

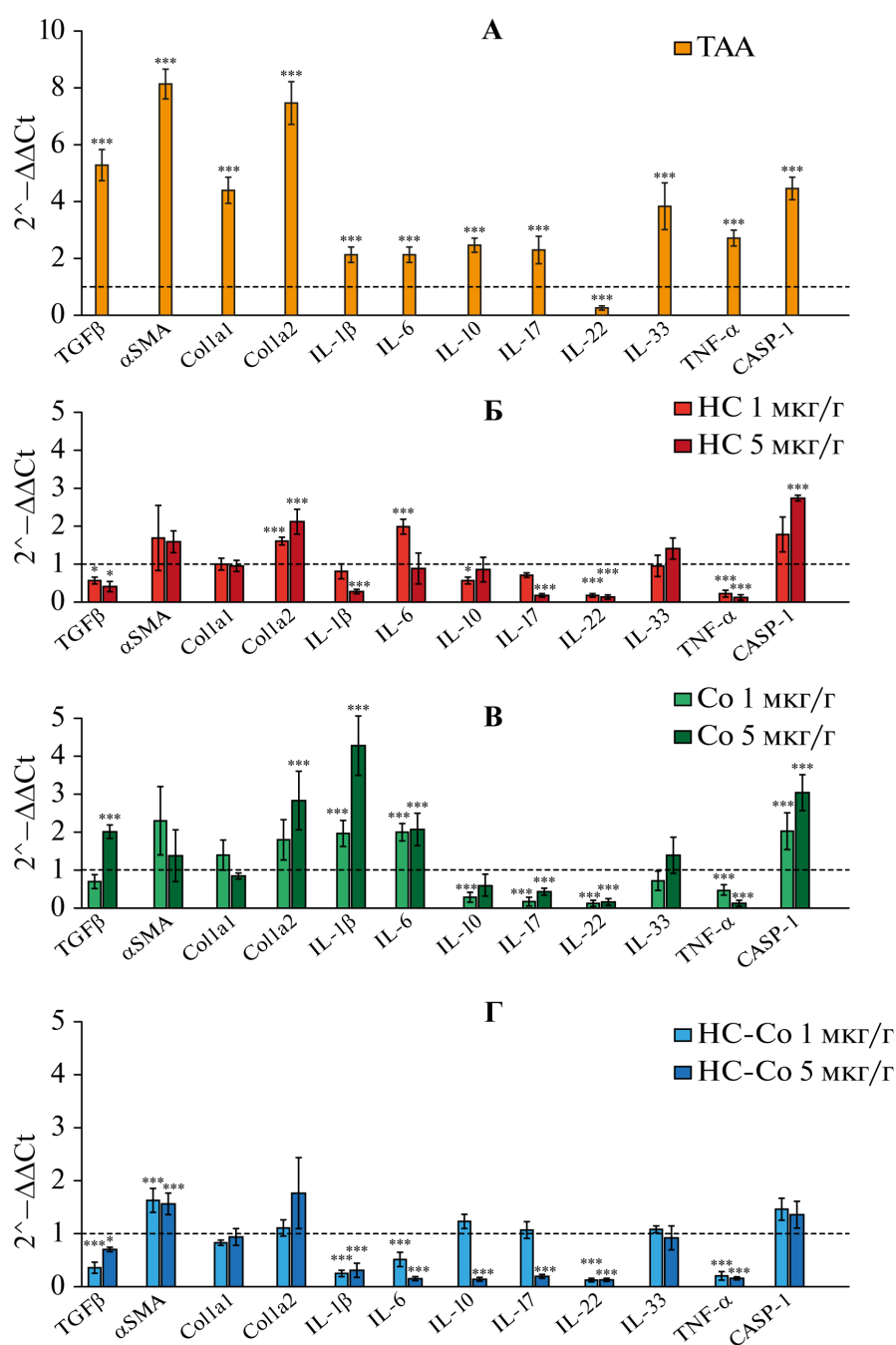


Рисунок 24. Относительные уровни экспрессии про- и противовоспалительных, и генов, связанных с фиброзом, полученные методом ПЦР в реальном времени. **А.** Группа ТАА; **Б.** Группа НС; **В.** Группа Со; **Г.** Группа НС-Со. Данные относительно контроля (интактные здоровые животные). Различия статистически 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 25.

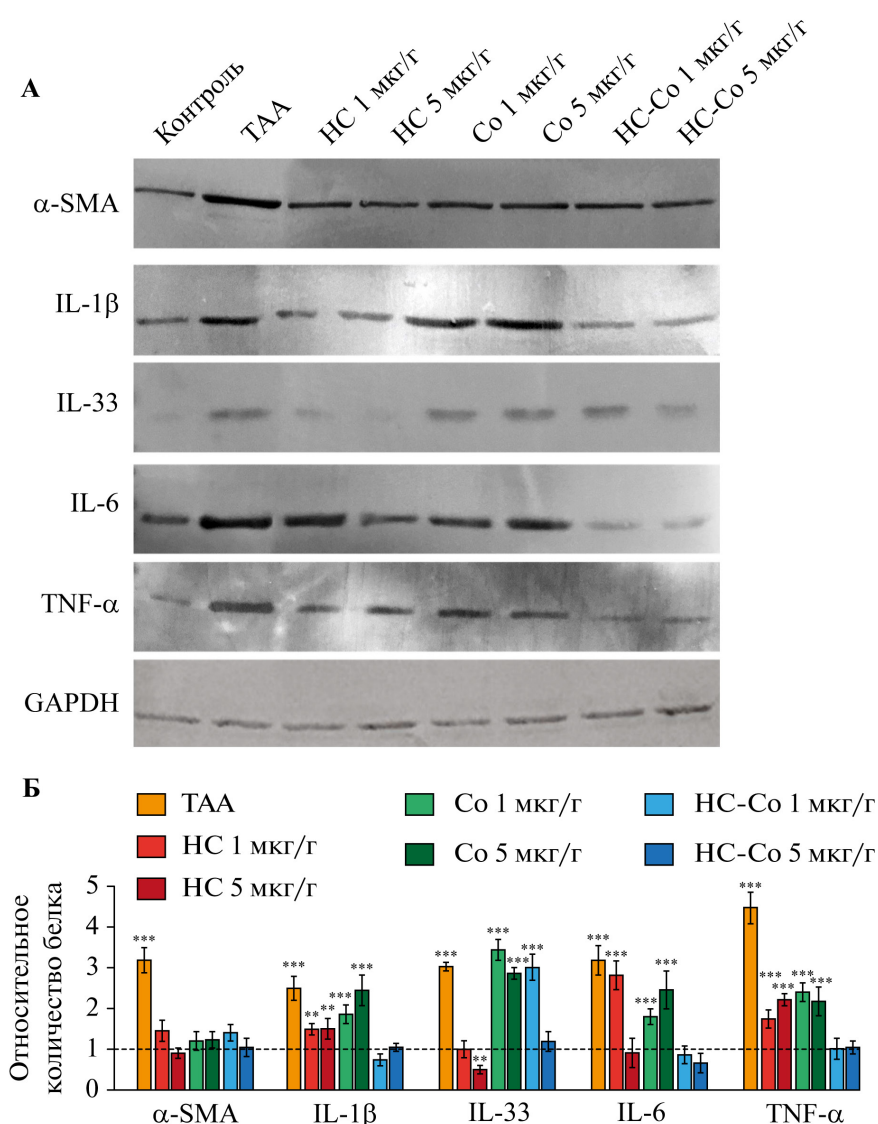


Рисунок 25. Относительные уровни исследуемых белков в печени. **А.** Результаты иммуноблоттинга; **Б.** Количественная оценка изучаемых белков в образцах, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ, представленная как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов. 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].

Результаты данной серии экспериментов относительно паттернов экспрессии маркеров воспаления и фиброза после инъекций ТАА и последующих инъекций НС, Со и НС-Со в концентрациях 1 и 5 мкг/г по сравнению с паттернами экспрессии этих маркеров в гепатоцитах здоровых животных суммированы в Таблице 4.

Паттерны экспрессии маркеров воспаления и фиброза		
ТАА (150 мкг/г)	<i>TGF-β, α-SMA*, Colla1, Colla2, IL-10, IL-33*, TNF-α*, CASP-1 IL-22</i>	
Агент	1 мкг/г	5 мкг/г
НС	<i>Colla2, IL-6 α-SMA*, Colla1, IL-1β*, CASP-1, IL-17, IL-33* TGF-β, IL-10, IL-22, TNF-α*</i>	<i>Colla2, CASP-1* α-SMA, Colla1, IL-6, IL-10, IL-33 TGF-β, IL-1β, IL-17, IL-22, TNF-α</i>
Со	<i>CASP-1*, IL-1β*, IL-6* TGF-β, α-SMA*, Colla1, Colla2, IL-33* IL-10, IL-17, IL-22, TNF-α*</i>	<i>TGF-β, Colla2, CASP-1*, IL-1β*, IL-6* α-SMA*, Colla1, IL-33* IL-10, IL-17, IL-22, TNF-α*</i>
НС-Со	<i>α-SMA* Colla1, Colla2, IL-10, IL-17, IL-33*, CASP-1* TGF-β, IL-1β*, IL-6*, IL-22, TNF-α*</i>	<i>α-SMA* Colla1, Colla2, IL-33*, CASP-1* TGF-β, IL-1β*, IL-6*, IL-10, IL-17, IL-22, TNF-α*</i>

Таблица 4. Изменение относительного содержания транскриптов и белков-маркеров фиброза и воспалительного статуса в печени всех экспериментальных групп относительно здоровых животных. Красным выделены гены, экспрессия которых усилилась, синим- снизилась, зеленым- достоверно не отличается от контрольных значений после воздействия ТАА и последующей терапии НС, Со и НС-Со. * – данные подтверждены результатами вестерн-блоттинга.

Таким образом, анализируя паттерны экспрессии и относительное содержание вышеперечисленных маркеров фиброгенеза в гепатоцитах после инъекций НС, Со и НС-Со, можно уверенно говорить о выраженном эффекте каждого из исследуемых агентов, который направлен на подавление уровней экспрессии широкого спектра профиброзных маркеров и провоспалительных цитокинов. Однако, если проводить сравнительный анализ, взяв за критерий количество генов, уровни экспрессии которых восстановились до контрольных значений (обозначены зеленым в Таблице 4), то эффективность каждого из исследуемых агентов отличается. Суммируя данные ПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга после инъекций обеими дозировками НС, Со и НС-Со, можно заключить, что НС нормализовали уровни экспрессии восьми генов, Со-пяти генов, а НС-Со-шести генов. Кроме того, после инъекций НС наблюдалось резкое снижение ниже контрольных значений экспрессии шести маркеров фиброгенеза и воспаления, после инъекций Со-четырех, тогда как после инъекций НС-Со- семи (данная группа генов обозначена синим в Таблице 4). Противовоспалительное

действие НС-Со усиливается в два раза по сравнению с НС и Со на примере *IL-1 β* и *TNF- α* . Со в выбранном диапазоне концентраций уступает по эффективности НС и НС-Со, что также подтверждается бóльшим количеством генов, уровни экспрессии которых остались высокими по сравнению с контролем (выделены красным в Таблице 4) даже после инъекций Со в дозировке 5 мкг/г.

3.2.5 Сравнение эффективности нивелирования последствий ТАА-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. Известно, что НС, а также другие органические и неорганические селенсодержащие соединения способны оказывать цитотоксическое действие на раковые клетки посредством регуляции экспрессии этих маркеров [294]. Такая регуляция разнообразна и во многом определяется природой селенсодержащих агентов, используемой концентрацией и происхождением раковых клеток [295, 296]. 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 26А, 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.

Так, известно, что активация каспаз проапоптотического пути при стрессе ЭПР происходит при помощи двух механизмов. Во-первых, было обнаружено, что у мышей в условиях стресса ЭПР TRAF2 взаимодействует с прокаспазой-12 [297], а во-вторых, что CASP-12 активируется при стрессе ЭПР, по-видимому, через сигнальный путь Ca^{2+} . При активации стресса на мембране ЭПР происходят конформационные изменения и/или олигомеризация проапоптотических белков BAX и BAK (белки семейства BCL-2), что приводит к выходу Ca^{2+} в цитозоль. Повышенный поток Ca^{2+} активирует m-кальпаин, который является членом семейства Ca^{2+} -зависимых цистеиновых протеаз [298]. Кальпаин, в свою очередь, расщепляет прокаспазу-12 до каспазы-12, что приводит к апоптотической гибели клеток.

К настоящему времени накоплено достаточно информации о сложной регуляции активации CHOP, влияющей на различные сигнальные пути [299–301]. 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*, *BAK* и *BAX*. CHOP является центральным компонентом реакции на неправильное сворачивание белков (UPR). Поскольку инъекции ТАА в наших экспериментах вызвали существенный рост экспрессии *CHOP*, это служит дополнительным подтверждением прогрессирования стресса ЭПР и апоптоза.

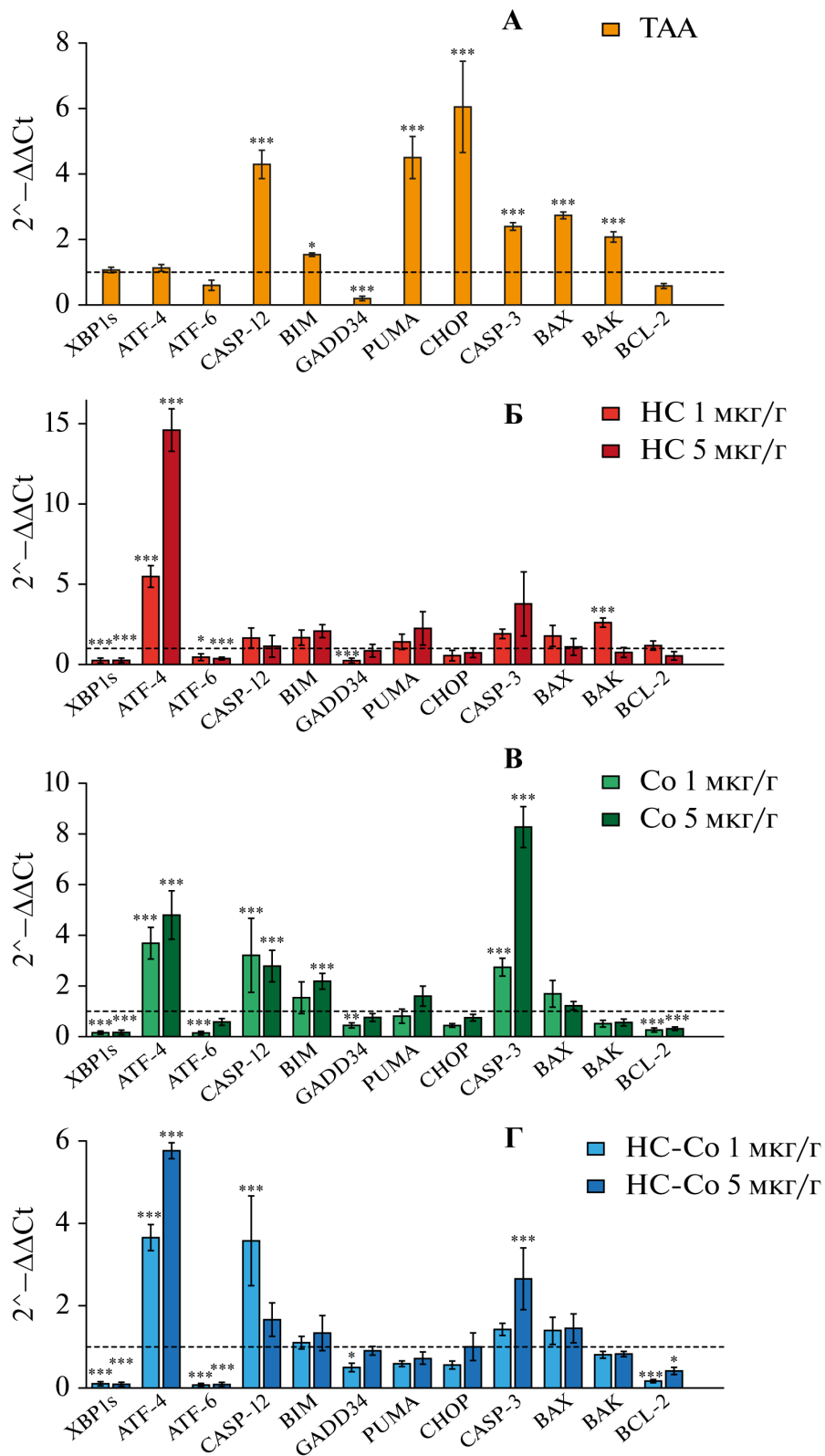


Рисунок 26. Относительные уровни экспрессии маркеров стресса ЭПР и апоптоза, полученные методом ПЦР в реальном времени. **А.** Группа ТАА; **Б.** Группа HC; **В.** Группа Co; **Г.** Группа HC-Co. Данные относительно контроля (интактные здоровые животные). Различия статистически не значимы $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [Goltyaev, 2023].

Полученные нами данные об экспрессии исследуемых генов были подтверждены результатами иммуноблоттинга, представленными на Рисунке 27.

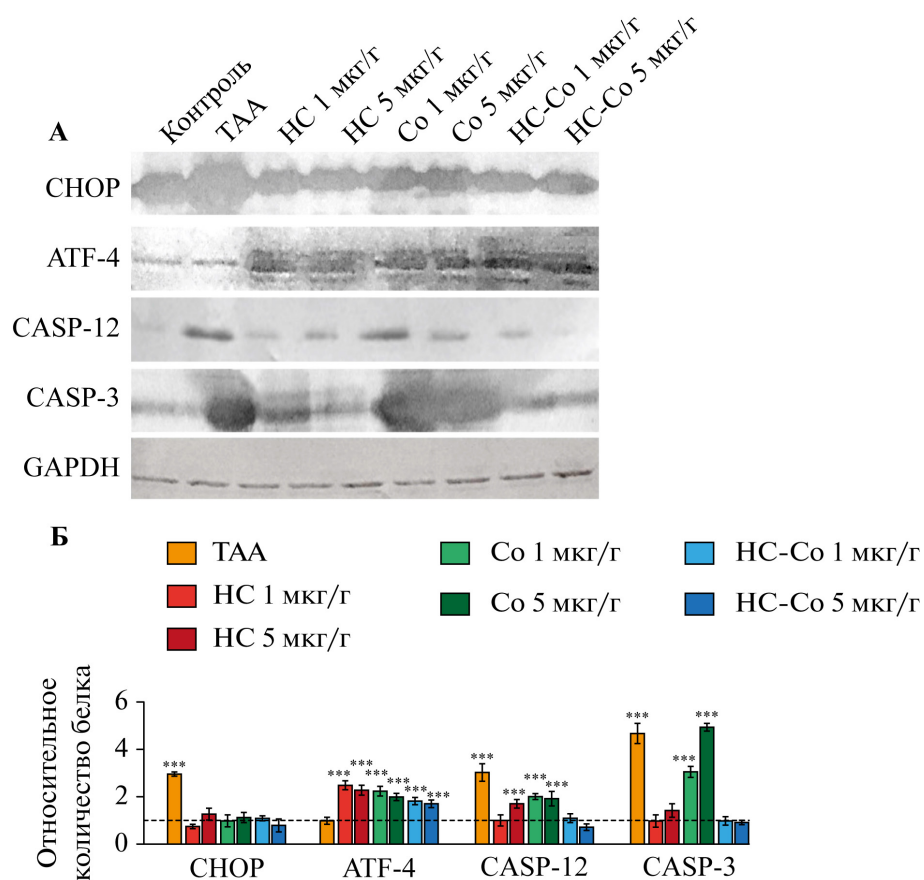


Рисунок 27. Относительные уровни исследуемых белков в печени. **А.** Результаты иммуноблоттинга; **Б.** Количественная оценка изучаемых белков в образцах, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ, представленная как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов. 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].

Последующие инъекции НС в концентрации 1 мкг/г существенно снизили уровни экспрессии генов *XBPIs*, *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 *XBPIs* 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 *XBPIs*, *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 *XBPIs* и *BCL-2*, нормализации уровней экспрессии генов *ATF-6*, *GADD34*, *PUMA*, *CHOP*, *BAX*, *BAK* и росту уровней *ATF-4*, *CASP-12*, *BIM*, *CASP-3*.

Наноконплекс в дозировке 1 мкг/г снижал паттерны экспрессии *XBPIs*, *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 *XBPIs*, *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*.

Суммируя полученные данные по экспрессии вышеперечисленных генов, можно заключить, что восстановление контрольных показателей этих значений несколько отличалось в зависимости от природы и дозировки агента. В совокупности НС смогли нормализовать уровни экспрессии для девяти генов, Со-семи генов, НС-Со-восьми генов. Стоит отметить, что каждый из трех агентов вызвал резкое снижение уровней экспрессии сплайсированной формы транскрипционного фактора *XBPIs* и фактора транскрипции *ATF-6*, ключевых маркеров сигнальных путей «ответа на мисфолдинг» *IRE1α* и *ATF-6*, а также значительному увеличению экспрессии транскрипционного фактора *ATF-4* – ключевого маркера сигнального пути PERK (Рисунок 24Б-Г). Кроме того, НС и НС-Со, в отличие от Со, в разной степени смогли снизить или нормализовать паттерны экспрессии генов *CASP-3* и *CASP-12*, что на фоне подавления активности проапоптотических маркеров *BAX*, *BAK* может указывать на снижение стресса ЭПР через кальциевый сигнальный путь, описанный выше. Учитывая результаты, полученные на клетках НерG2, где нами было установлено, что НС и НС-Со

способны дозозависимо модулировать кальциевые ответы различных форм, описанный сценарий нивелирования стресса ЭПР и апоптоза представляется вполне вероятным.

Результаты ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга до и после воздействия НС, Со и НС-Со представлены в Таблице 5.

Паттерны экспрессии про и антиапоптотических генов и маркеров стресса ЭПР		
ТАА (150 мкг/г)	<i>CASP-12*</i> , <i>BIM</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>CASP-3*</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> <i>GADD34</i>	
Агент	1 мкг/г	5 мкг/г
НС	<i>ATF-4*</i> , <i>BAK</i> <i>CASP-12*</i> , <i>BIM</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>CASP-3*</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> <i>XBPIs</i> , <i>ATF-6</i> , <i>GADD34</i>	<i>ATF-4*</i> <i>CASP-12*</i> , <i>GADD34</i> , <i>BIM</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>CASP-3*</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> , <i>BCL-2</i> <i>XBPIs</i> , <i>ATF-6</i>
Со	<i>ATF-4*</i> , <i>CASP-12*</i> , <i>CASP-3*</i> <i>BIM</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> <i>XBPIs</i> , <i>ATF-6</i> , <i>GADD34</i> , <i>BCL-2</i>	<i>ATF-4*</i> , <i>CASP-12*</i> , <i>BIM</i> , <i>CASP-3*</i> <i>ATF-6</i> , <i>GADD34</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> <i>XBPIs</i> , <i>BCL-2</i>
НС-Со	<i>ATF-4*</i> , <i>CASP-12*</i> <i>BIM</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> , <i>CASP-3*</i> <i>XBPIs</i> , <i>ATF-6</i> , <i>GADD34</i> , <i>BCL-2</i>	<i>ATF-4*</i> , <i>CASP-3*</i> <i>CASP-12*</i> , <i>BIM</i> , <i>PUMA</i> , <i>CHOP*</i> , <i>BAX</i> , <i>BAK</i> , <i>GADD34</i> <i>XBPIs</i> , <i>ATF-6</i> , <i>BCL-2</i>

Таблица 5. Изменение уровней экспрессии маркеров апоптоза и стресса ЭПР в печени всех групп животных относительно здоровых животных. Показатели, которые выросли, выделены красным, показатели, которые снизились, выделены синим, показатели, которые остались в норме, выделены зеленым. * – данные подтверждены результатами вестерн-блоттинга.

Подводя итог второй серии экспериментов, выполненных на модели *in vivo*, можно выделить следующие основные результаты. НС уже в минимальной концентрации (1 мкг/г) способны нормализовать средние показатели веса животных, тогда как Со и НС-Со оказывают тот же эффект лишь в дозировке 5 мкг/г. С помощью различных методов установлено, что последствия вызванного инъекциями ТАА тяжелого токсического фиброза печени у мышей существенно снижались на фоне применения препаратов НС, Со и НС-Со. Однако, Со по ряду параметров оказался менее эффективным, чем НС и НС-Со. Так, он в меньшей степени подавлял активность ферментов АЛТ и АСТ в крови животных, менее

эффективно нормализовал уровни экспрессии маркеров воспаления, фиброза и апоптоза, общее число которых составило двенадцать, тогда как НС-нормализовали уровни экспрессии для семнадцати генов, НС-Со-четырнадцати. При этом стоит отметить, что после инъекций Со высокие показатели экспрессии сохранялись для большего процента исследуемых маркеров, чем после инъекций НС и НС-Со. Эффекты НС, Со и НС-Со, установленные на модели *in vivo*, охватывают широкий перечень сигнальных каскадов, способствующих в разной степени снижению апоптоза, возможно пироптоза, ЭР-стресса, фиброгенеза, воспалительного статуса в гепатоцитах, что указывает на сложный характер регуляции этих процессов под контролем каждого из агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы молекулярно-клеточные механизмы действия 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 HepG2 *in vitro*, вторая – мыши с индуцированным тиаоацетамидом фиброзом печени *in vivo*. В первом случае показано цитотоксическое действие НС и НС-Со, во втором – их защитное действие.

Выявлено, что наночастицы селена и комплекс селен-сорафениб вызывают апоптотическую гибель клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 *in vitro*, при этом нагрузка наночастиц селена сорафенибом не усиливает их цитотоксическое действие. Цитотоксическое действие НС на раковые клетки *in vitro* согласуется с данными литературы, цитотоксическая активность комплекса НС-Со показана впервые. Установлены молекулярные пути регуляции цитотоксического действия НС и НС-Со на клетки HepG2: 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 HepG2.

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.

Обобщающая схема действия НС, Со и НС-Со на моделях ГЦК *in vitro* и фиброза печени *in vivo* представлена на Рисунке 28.

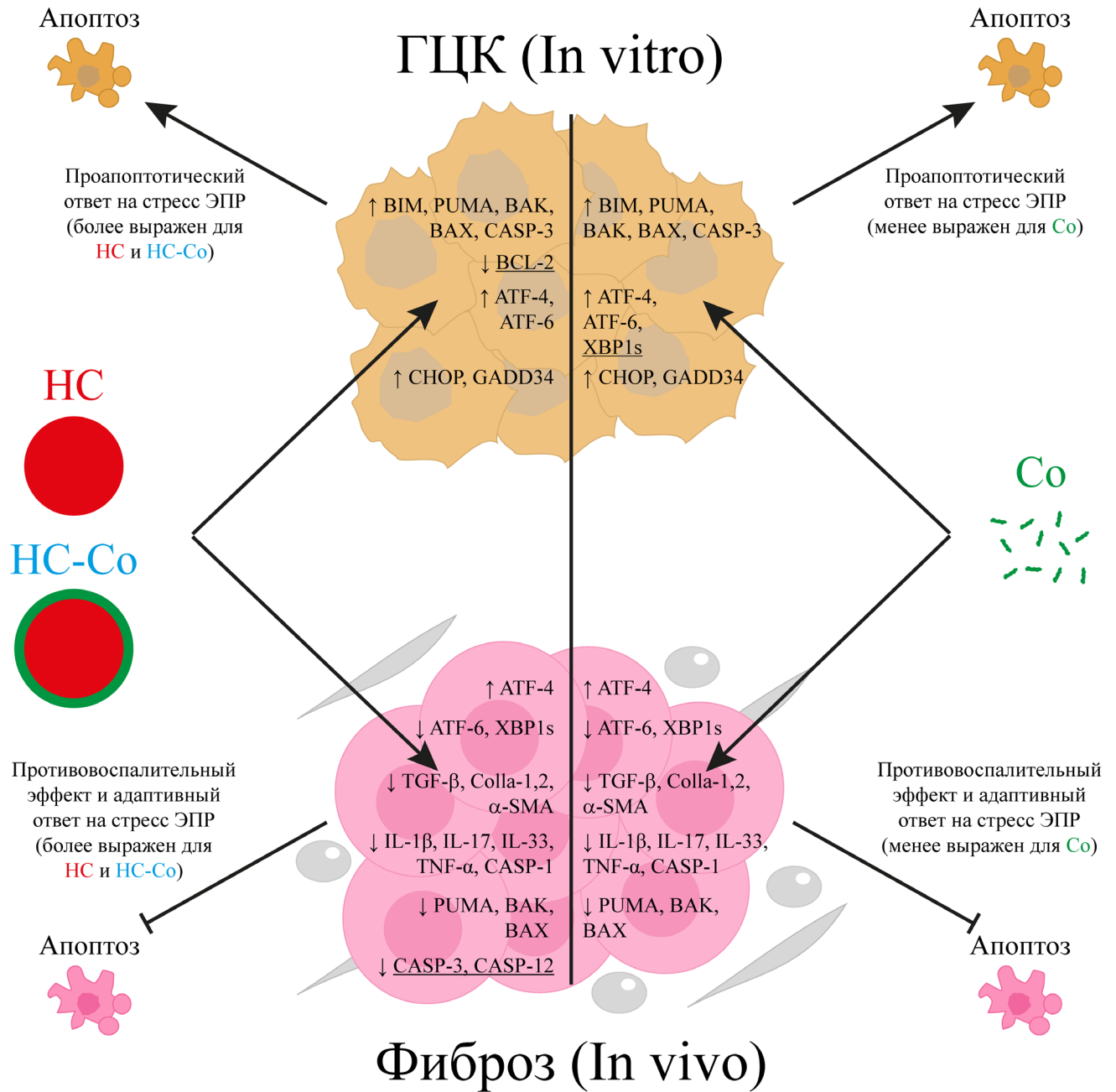


Рисунок 28. Схема действия НС, Со и НС-Со на моделях ГЦК *in vitro* и фиброза печени *in vivo*.

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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза;

АСТ – аспаратаминотрансфераза;

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома;

НС – наночастицы селена;

НС-Co – наноконплекс селен-сорафениб;

Со – сорафениб;

ТАА – тиаоааамид;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

ATF (activating transcription factor) – активирующий фактор транскрипции;

БАК (Bcl-2 homologous antagonist/killer) – гомологический антагонист/киллер Bcl-2;

ВАХ (Bcl-2-like protein 4) –bcl-2-подобный белок 4;

BCL-2 (b-cell lymphoma 2) – регулятор апоптоза;

BIM (Bcl-2-like protein 11) – BCL-2-подобный белок 11;

CASP – каспаза;

CHOP (C/EBP homologous protein) – гомологичный белок C/EBP, проапоптотический транскрипционный фактор;

Colla1 и Colla2 (collagen type I) – коллаген I типа α -цепь 1 и 2;

GADD34 (growth arrest and DNA damage gene) – белок, индуцирующй остановку роста и повреждение ДНК;

IL – интерлейкин;

IRE1 α (inositol–requiring enzyme 1 α) – инозитол-требующй фермент 1 α ;

PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) – протеинкиназа R-подобная киназа эндоплазматического ретикулума;

PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) – модулятор апоптоза;

SMA – (actin alpha 2, smooth muscle) – гладкомышечный актин;

TGF- β (transforming growth factor, beta receptor I) – трансформирующий ростовой фактор, бета-1;

TNF- α (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли;

UPR (unfolded protein response) – клеточный ответ на стресс ЭПР, вызванный неправильно свернутыми белками;

XBP1s – (X-box binding protein 1) – X-box-связывающий белок 1, сплайсированная изоформа;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Asrani, S. K. Burden of liver diseases in the world / S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, P. S. Kamath // *Journal of Hepatology*. – 2019. – 70. N 1. – C.151-171.
2. Ma, P. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review / P. Ma, R. J. Mumper // *Journal of nanomedicine & nanotechnology*. – 2013. – 4. N 2. – C.1000164.
3. Nano delivery system for paclitaxel: Recent advances in cancer theranostics / N. Ying, S. Liu, M. Zhang, et al. // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. – 2023. – 228. – C.113419.
4. Li, C. Functional Nanoparticles for Enhanced Cancer Therapy / C. Li, Y. Li, G. Li, S. Wu // *Pharmaceutics*. – 2022. – 14. N 8.
5. Doxorubicin-loaded iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy: a combinational approach for enhanced delivery of nanoparticles / M. Norouzi, V. Yathindranath, J. A. Thliveris, et al. // *Scientific Reports*. – 2020. – 10. N 1. – C.11292.
6. Doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles containing ketoester-based block and cholesterol moiety as specific vehicles to fight estrogen-dependent breast cancer / P. Misiak, K. Niemirowicz-Laskowska, K. H. Markiewicz, et al. // *Cancer Nanotechnology*. – 2023. – 14. N 1. – C.1173.
7. Doxorubicin nanoformulations on therapy against cancer: An overview from the last 10 years / N. A. D'Angelo, M. A. Noronha, M. C. C. Câmara, et al. // *Biomaterials advances*. – 2022. – 133. – C.112623.
8. Docetaxel-Loaded PLGA Nanoparticles Improve Efficacy in Taxane-Resistant Triple-Negative Breast Cancer / C. J. Bowerman, J. D. Byrne, K. S. Chu, et al. // *Nano letters*. – 2017. – 17. N 1. – C.242-248.
9. Boosting antitumor efficacy using docetaxel-loaded nanoplatforms: from cancer therapy to regenerative medicine approaches / N. Beheshtizadeh, Z. Amiri, S. Z. Tabatabaei, et al. // *Journal of translational medicine*. – 2024. – 22. N 1. – C.520.
10. Fabrication of camptothecin loaded casein nanoparticles for the treatment of colorectal cancer through targeted drug delivery / S. Hameed, S. Dayyan, R. Maqsood, et al. // *Journal of drug delivery science and technology*. – 2025. – 113. N 5. – C.107314.

11. Camptothecin-based nanodrug delivery systems / Y. Wen, Y. Wang, X. Liu, et al. // *Cancer biology & medicine*. – 2017. – 14. N 4. – C.363-370.
12. Gokduman, K. Camptothecin Anticancer Drug Loaded Iron Oxide Micro and Nanoparticles: Tuning Targeted and Sustained Release of the Drug in Bioactive Form# / K. Gokduman, A. S. Demir // *Current Nanoscience*. – 2015. – 9. N 6. – C.704-710.
13. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration / Y. Zhang, X. Li, Z. Huang, et al. // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. – 2013. – 9. N 1. – C.74-84.
14. Vekariya, K. K. ER α signaling imparts chemotherapeutic selectivity to selenium nanoparticles in breast cancer / K. K. Vekariya, J. Kaur, K. Tikoo // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. – 2012. – 8. N 7. – C.1125-1132.
15. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells / T. Liu, L. Zeng, W. Jiang, et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2015. – 11. N 4. – C.947-958.
16. The effects of luminescent ruthenium(II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling / D. Sun, Y. Liu, Q. Yu, et al. // *Biomaterials*. – 2013. – 34. N 1. – C.171-180.
17. RGD-conjugated gold nanorods induce radiosensitization in melanoma cancer cells by downregulating $\alpha(v)\beta_3$ expression / W. Xu, T. Luo, P. Li, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – 7. – C.915-924.
18. Yanhua, W. Selenium-substituted hydroxyapatite nanoparticles and their in vivo antitumor effect on hepatocellular carcinoma / W. Yanhua, H. Hao, Y. Li, S. Zhang // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – 140. – C.297-306.
19. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF- α ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia / M. Molanouri Shamsi, S. Chekachak, S. Soudi, et al. // *Cytokine*. – 2017. – 90. – C.100-108.
20. Redox-responsive mesoporous selenium delivery of doxorubicin targets MCF-7 cells and synergistically enhances its anti-tumor activity / S. Zhao, Q. Yu, J. Pan, et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – 54. – C.294-306.

21. Selenium–functionalized liposomes for systemic delivery of doxorubicin with enhanced pharmacokinetics and anticancer effect / Q. Xie, W. Deng, X. Yuan, et al. // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* – 2018. – 122. – C.87-95.
22. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer–targeted selenium nanoparticles / Y. Huang, L. He, W. Liu, et al. // *Biomaterials.* – 2013. – 34. N 29. – C.7106-7116.
23. Inverse relationship between elemental selenium nanoparticle size and inhibition of cancer cell growth in vitro and in vivo / Y. Wang, P. Chen, G. Zhao, et al. // *Food and Chemical Toxicology.* – 2015. – 85. – C.71-77.
24. Kumar, S. Carboxylic group–induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its anti–tumor potential on Dalton's lymphoma cells / S. Kumar, M. S. Tomar, A. Acharya // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces.* – 2015. – 126. – C.546-552.
25. X-ray-responsive selenium nanoparticles for enhanced cancer chemo–radiotherapy / B. Yu, T. Liu, Y. Du, et al. // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces.* – 2016. – 139. – C.180-189.
26. Recent research progress on the synthesis and biological effects of selenium nanoparticles / T. Zhang, M. Qi, Q. Wu, et al. // *Frontiers in nutrition.* – 2023. – 10. – C.1183487.
27. Bioconversion of inorganic selenium to less toxic selenium forms by microbes: A review / X. Nie, X. Yang, J. He, et al. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* – 2023. – 11. – C.1167123.
28. Inhibiting Metastasis and Improving Chemosensitivity via Chitosan–Coated Selenium Nanoparticles for Brain Cancer Therapy / P. Dana, N. Pimpha, A. Chaipuang, et al. // *Nanomaterials (Basel, Switzerland).* – 2022. – 12. N 15.
29. Chitosan-functionalized selenium nanoparticles for targeted cancer therapy: Advances in synthesis, stability, and tumor–specific delivery / T. Akmal, Y. Herdiana, A. F. A. Mohammed, et al. // *OpenNano.* – 2025. – 26. – C.100263.

30. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) / M. Vert, Y. Doi, K.–H. Hellwich, et al. // *Pure and Applied Chemistry*. – 2012. – 84. N 2. – C.377-410.
31. Sajanalal, P. R. Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions / P. R. Sajanalal, T. S. Sreeprasad, A. K. Samal, T. Pradeep // *Nano reviews*. – 2011. – 2.
32. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine / S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, et al. // *Molecules*. – 2019. – 25. N 1.
33. Salata, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine / O. V. Salata // *Journal of nanobiotechnology*. – 2004. – 2. N 1. – C.3.
34. Rayman, M. P. Selenium and human health / M. P. Rayman // *Lancet* (London, England). – 2012. – 379. N 9822. – C.1256-1268.
35. Selenium Anticancer Properties and Impact on Cellular Redox Status / L. Kuršvietienė, A. Mongirdienė, J. Bernatoniienė, et al. // *Antioxidants* (Basel, Switzerland). – 2020. – 9. N 1.
36. Huang, B. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro / B. Huang, J. Zhang, J. Hou, C. Chen // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2003. – 35. N 7. – C.805-813.
37. Synthesis of Selenium Nanoparticle and Its Photocatalytic Application for Decolorization of Methylene Blue under UV Irradiation / S. Nath, S. K. Ghosh, S. Panigahi, et al. // *Langmuir*. – 2004. – 20. N 18. – C.7880-7883.
38. Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats / M. A. El–Ghazaly, N. Fadel, E. Rashed, et al. // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2017. – 95. N 2. – C.101-110.
39. Zhang, Y. Creation of Highly Stable Selenium Nanoparticles Capped with Hyperbranched Polysaccharide in Water / Y. Zhang, J. Wang, L. Zhang // *Langmuir*. – 2010. – 26. N 22. – C.17617-17623.
40. Gao, X. Hollow Sphere Selenium Nanoparticles / X. Gao, J. Zhang, L. Zhang // *Advanced Materials*. – 2002. – 14. N 4. – C.290-293.

41. Vahdati, M. Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles-Lysozyme Nanohybrid System with Synergistic Antibacterial Properties / M. Vahdati, T. Tohidi Moghadam // *Scientific Reports*. – 2020. – 10. N 1. – C.710.
42. The inhibitory effect of selenium nanoparticles on protein glycation in vitro / S. Yu, W. Zhang, W. Liu, et al. // *Nanotechnology*. – 2015. – 26. N 14. – C.145703.
43. Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli* / P. A. Tran, N. O'Brien-Simpson, E. C. Reynolds, et al. // *Nanotechnology*. – 2016. – 27. N 4. – C.45101.
44. El-Borady, O. M. Hypoglycemic potential of selenium nanoparticles capped with polyvinyl-pyrrolidone in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats / O. M. El-Borady, M. S. Othman, H. H. Atallah, A. E. Abdel Moneim // *Heliyon*. – 2020. – 6. N 5. – C.e04045.
45. Boroumand, S. Selenium nanoparticles / S. Boroumand, M. Safari, E. Shaabani, M. Shirzad, R. Faridi-Majidi // *Materials Research Express*. – 2019. – 6. N 8. – C.850.
46. A novel selenium nanoparticles-enhanced chemiluminescence system for determination of dinitrobutylphenol / M. Iranifam, M. Fathinia, T. Sadeghi Rad, et al. // *Talanta*. – 2013. – 107. – C.263-269.
47. Extracellular synthesis of nanoselenium from fresh water bacteria *Bacillus* sp., and its validation of antibacterial and cytotoxic potential / S. Bharathi, S. Kumaran, G. Suresh, et al. // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – 27. N 2. – C.101655.
48. Insights into selenite reduction and biogenesis of elemental selenium nanoparticles by two environmental isolates of *Burkholderia fungorum* / N. S. Khoei, S. Lampis, E. Zonaro, et al. // *New Biotechnology*. – 2017. – 34. – C.1-11.
49. Fardsadegh, B. Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their In vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains / B. Fardsadegh, H. Jafarizadeh-Malmiri // *Green Processing and Synthesis*. – 2019. – 8. N 1. – C.399-407.

50. Kokila, K. Diospyros montana leaf extract-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their biological applications / K. Kokila, N. Elavarasan, V. Sujatha // New Journal of Chemistry. – 2017. – 41. N 15. – C.7481-7490.

51. El-Sayyad, G. S. Gentamicin–Assisted Mycogenic Selenium Nanoparticles Synthesized Under Gamma Irradiation for Robust Reluctance of Resistant Urinary Tract Infection-Causing Pathogens / G. S. El-Sayyad, H. S. El-Bastawisy, M. Gobara, A. I. El–Batal // Biological Trace Element Research. – 2020. – 195. N 1. – C.323-342.

52. Hashem, A. H. Biomedical Applications of Mycosynthesized Selenium Nanoparticles Using Penicillium expansum ATTC 36200 / A. H. Hashem, A. M. A. Khalil, A. M. Reyad, S. S. Salem // Biological Trace Element Research. – 2021. – 199. N 10. – C.3998-4008.

53. Panahi-Kalamuei, M. Facile microwave synthesis, characterization, and solar cell application of selenium nanoparticles / M. Panahi-Kalamuei, M. Salavati-Niasari, S. M. Hosseinpour-Mashkani // Journal of Alloys and Compounds. – 2014. – 617. – C.627-632.

54. Production and Use of Selenium Nanoparticles as Fertilizers / S. V. Gudkov, G. A. Shafeev, A. P. Glinushkin, et al. // ACS Omega. – 2020. – 5. N 28. – C.17767-17774.

55. Quintana, M. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation / M. Quintana, E. Haro–Poniatowski, J. Morales, N. Batina // Applied Surface Science. – 2002. – 195. N 1–4. – C.175-186.

56. Selenium nanoparticles: A potent chemotherapeutic agent and an elucidation of its mechanism / S. Menon, D. Shrudhi, R. Santhiya, et al. // Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. – 2018. – 170. – C.280–292.

57. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine / C. Kinnear, T. L. Moore, L. Rodriguez–Lorenzo, et al. // Chemical reviews. – 2017. – 117. N 17. – C.11476-11521.

58. Shape and Size Diversity of Gold, Silver, Selenium, and Silica Nanoparticles Prepared by Green Synthesis Using Fungi and Bacteria / E. Vetchinkina, E. Loshchinina,

M. Kupryashina, et al. // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2019. – 58. N 37. – C.17207-17218.

59. Gad, S. S. Nanotechnology applications for treatment of hepatic infections via modulating Hepatic histopathological and DNA alterations / S. S. Gad, D. S. Abdelrahim, S. H. Ismail, S. M. Ibrahim // *Bioorganic Chemistry*. – 2022. – 127. N 2. – C.105927.

60. Gad, S. S. Selenium and silver nanoparticles / S. S. Gad, D. S. Abdelrahim, S. H. Ismail, S. M. Ibrahim // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2022. – 36. N 3. – C.24.

61. Clogston, J. D. Zeta potential measurement / J. D. Clogston, A. K. Patri // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2011. – 697. – C.63-70.

62. Antioxidant and Hepatoprotective Efficiency of Selenium Nanoparticles Against Acetaminophen–Induced Hepatic Damage / K. A. Amin, K. S. Hashem, F. S. Alshehri, et al. // *Biological Trace Element Research*. – 2017. – 175. N 1. – C.136-145.

63. 2006 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS) / A. C. Bronstein, D. A. Spyker, L. R. Cantilena, et al. // *Clinical Toxicology*. – 2008. – 45. N 8. – C.815-917.

64. Perkins, J. D. Acetaminophen sets records in the United States / J. D. Perkins // *Liver Transplantation*. – 2006. – 12. N 4. – C.682-686.

65. Luo, G. The molecular mechanisms of acetaminophen–induced hepatotoxicity and its potential therapeutic targets / G. Luo, L. Huang, Z. Zhang // *Experimental Biology and Medicine*. – 2023. – 119. – C. 412-424.

66. Hepatic and immune modulatory effectiveness of lactoferrin loaded Selenium nanoparticles on bleomycin induced hepatic injury / K. G. Abdel–Wahhab, M. Ashry, L. K. Hassan, et al. // *Scientific Reports*. – 2024. – 14. N 1. – C.21066.

67. Biogenic selenium and its hepatoprotective activity / B. Li, D. Li, W. Jing, et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – 7. N 1. – C.1256.

68. Nady Ouais, G. A comparative study on the hepatoprotective effect of selenium–nanoparticles and dates flesh extract on carbon tetrachloride induced liver damage in albino rats / G. Nady Ouais, D. M. Hassan // *Anatomy & cell biology*. – 2023. – 56. N 4. – C.538-551.

69. Xu, Y. Angelica sinensis polysaccharides modified selenium nanoparticles for effective prevention of acute liver injury / Y. Xu, X.-C. Wang, W. Jiang, J.-N. Hu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – 263. N Pt 1. – C.130321.
70. Mrwad, A. A. Chitosan-encapsulated selenium nanoparticles alleviate CCl₄ induced hepatotoxicity through synergistically modulating NF- κ B and Nrf2 signaling pathways and regulating Bcl-2 and Caspase-3 expression: A comprehensive study with multiple regression analysis / A. A. Mrwad, S. E. El-Shafey, N. M. Said // Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS). – 2024. – 86. – C.127563.
71. Hepatoprotective effects of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid from Antrodia camphorata in a mouse model of acute hepatic injury / G.-J. Huang, J.-S. Deng, S.-S. Huang, et al. // Food Chemistry. – 2013. – 141. N 3. – C.3020-3027.
72. Bai, K. Antioxidant Capacity and Hepatoprotective Role of Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles in Concanavalin A-Induced Liver Injury in Mice / K. Bai, B. Hong, J. He, W. Huang // Nutrients. – 2020. – 12. N 3. – C.857.
73. Concanavalin A hepatotoxicity in mice / G. Künstle, H. Hentze, P.-G. Germann, et al. // Hepatology. – 1999. – 30. N 5. – C.1241-1251.
74. Rinaudo, M. Chitin and chitosan / M. Rinaudo // Progress in Polymer Science. – 2006. – 31. N 7. – C.603-632.
75. Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles Alleviate High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) by Modulating the Gut Barrier Function and Microbiota / Y. Luo, S. Peng, J. Cheng, et al. // Journal of Functional Biomaterials. – 2024. – 15. N 8.
76. Effects of Selenium Nanoparticles on Preventing Patulin-Induced Liver, Kidney and Gastrointestinal Damage / Y. Qiu, X. Chen, Z. Chen, et al. // Foods. – 2022. – 11. N 5. – C.749.
77. The mycotoxin patulin / A. Vidal, S. Ouhibi, R. Ghali, et al. // Food and Chemical Toxicology. – 2019. – 129. – C.249-256.
78. Patulin and Trichothecene / H. Sohrabi, O. Arbabzadeh, P. Khaaki, et al. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2022. – 62. N 20. – C.5540-5568.

79. Nano Selenium-Enriched Probiotics as Functional Food Products against Cadmium Liver Toxicity / S. I. Vicas, V. Laslo, A. V. Timar, et al. // *Materials*. – 2021. – 14. N 9. – C.2257.
80. Unsal, V. The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity / V. Unsal, T. Dalkiran, M. Çiçek, E. Kölükçü // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2020. – 10. N 2. – C.184-202.
81. Flora, S. J. S. Chelation in Metal Intoxication / S. J. S. Flora, V. Pachauri // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2010. – 7. N 7. – C.2745-2788.
82. Potential Protective Effect of Selenium-Enriched *Lactobacillus plantarum* on Cadmium-Induced Liver Injury in Mice / Y. Song, J. Zhang, Y. Li, et al. // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2024. – 34. N 6. – C.1328-1339.
83. Selenium nanoparticles alleviates cadmium induced hepatotoxicity by inhibiting ferroptosis and oxidative stress in vivo and in vitro / C. Shao, T. Luo, S. Wang, et al. // *Chemosphere*. – 2024. – 364. – C.143004.
84. Protective Effects of Salidroside on Lead Acetate-induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Sprague–Dawley Rats / C. Chen, B. Lin, S. Qi, et al. // *Biological Trace Element Research*. – 2019. – 191. N 2. – C.426-434.
85. Petteruti, S. Reduction of Lead Levels in Patients Following a Long–Term, Intermittent Calcium Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)–Based Intravenous Chelation Infusions / S. Petteruti // *Cureus*. – 2020. – 114.
86. 2, 3-Dimethylsuccinic acid and fulvic acid attenuate lead–induced oxidative misbalance in brain tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* / W. A. Neamatallah, K. M. Sadek, Y. S. El–Sayed, et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2022. – 29. N 15. – C.21998-22011.
87. Potentials of orally supplemented selenium–enriched *Lactobacillus rhamnosus* to mitigate the lead induced liver and intestinal tract injury / H. Jin, M. S. Riaz Rajoka, X. Xu, et al. // *Environmental Pollution*. – 2022. – 302. N Suppl. 1. – C.119062.

88. Protective role of selenium and selenium-nanoparticles against multiple stresses in *Pangasianodon hypophthalmus* / N. Kumar, S. T. Thorat, P. B. Patole, et al. // *Fish physiology and biochemistry*. – 2024. – 50. N 1. – C.239–258.
89. Hepatoprotective effect of Quercetin supplementation against Acrylamide–induced DNA damage in wistar rats / S. Ansar, N. J. Siddiqi, S. Zargar, et al. // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – 16. N 1. – C.7212.
90. Hamza, R. Z. Protective and Antioxidant Role of Selenium Nanoparticles and Vitamin C Against Acrylamide Induced Hepatotoxicity in Male Mice / R. Z. Hamza, S. E. Al–Motaan, N. Malik // *International Journal of Pharmacology*. – 2019. – 15. N 6. – C.664-674.
91. Shen, Q. Nano–Selenium Modulates NF- κ B/NLRP3 Pathway and Mitochondrial Dynamics to Attenuate Microplastic-Induced Liver Injury / Q. Shen, Y. Liu, J. Li, D. Zhou // *Nutrients*. – 2024. – 16. N 22.
92. Microplastic-induced NAFLD: Hepatoprotective effects of nanosized selenium / Q. Shen, Y. J. Liu, T. T. Qiu, et al. // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2024. – 272. – C.115850.
93. Recent advances in the therapeutic applications of selenium nanoparticles / J. A. Ansari, J. A. Malik, S. Ahmed, et al. // *Molecular biology reports*. – 2024. – 51. N 1. – C.688.
94. Characterization and Synthesis of Selenium-TPGS Nanoparticles for Target Delivery Clove to Minimize Cytogenic and Liver Damage Induced in Adult Male Rats / A. M. Jasim, E. D. Alhtheal, S. S. Raheem, et al. // *Nano Biomedicine and Engineering*. – 2021. – 13. N 2.
95. Müller, A. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats usefulness and reliability of this animal model / A. Müller, F. Machnik, T. Zimmermann, H. Schubert // *Experimental Pathology*. – 1988. – 34. N 4. – C.229-236.
96. Ezhilarasan, D. Molecular mechanisms in thioacetamide-induced acute and chronic liver injury models / D. Ezhilarasan // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2023. – 99. N 12. – C.104093.

97. Elleithi, Y. A. Simvastatin Induces Apoptosis And Suppresses Hepatocellular Carcinoma Induced In Rats / Y. A. Elleithi, A. M. El-Gayar, M. N. Amin // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2023. – 195. N 3. – C.1656-1674.
98. El Sadda, R. R. Biochemical and pathophysiological improvements in rats with thioacetamide induced-hepatocellular carcinoma using aspirin plus vitamin C / R. R. El Sadda, Z. R. Elshahawy, E. A. Saad // *BMC Cancer*. – 2023. – 23. N 1. – C.165.
99. Protective effect of Selenium nanoparticle against cyclophosphamide induced hepatotoxicity and genotoxicity in Swiss albino mice / A. Bhattacharjee, A. Basu, P. Ghosh, et al. // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2014. – 29. N 2. – C.303-317.
100. Conklin, K. A. Chemotherapy–Associated Oxidative Stress / K. A. Conklin // *Integrative Cancer Therapies*. – 2004. – 3. N 4. – C.294-300.
101. Exploration the Mechanism of Doxorubicin-Induced Heart Failure in Rats by Integration of Proteomics and Metabolomics Data / Y. Yuan, S. Fan, L. Shu, et al. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – 11. – C.231506.
102. Tacar, O. Doxorubicin / O. Tacar, P. Sriamornsak, C. R. Dass // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2013. – 65. N 2. – C.157-170.
103. Pugazhendhi, A. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems / A. Pugazhendhi, Edison, Thomas Nesakumar Jebakumar Immanuel, B. K. Velmurugan, J. A. Jacob, I. Karuppusamy // *Life Sciences*. – 2018. – 200. – C.26–30.
104. Protective effect of green synthesized Selenium Nanoparticles against Doxorubicin induced multiple adverse effects in Swiss albino mice / M. A. Khan, D. Singh, A. Arif, et al. // *Life Sciences*. – 2022. – 305. N 6. – C.120792.
105. Turmeric Extract-loaded Selenium Nanoparticles Counter Doxorubicin–induced Hepatotoxicity in Mice via Repressing Oxidative Stress, Inflammatory Cytokines, and Cell Apoptosis / B. M. ALRashdi, M. M. Hussein, R. M. Mohammed, et al. // *Anti–Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2024. – 24. N 6. – C.443-453.
106. Polypyridyl Ruthenium(II) complex-induced mitochondrial membrane potential dissipation activates DNA damage-mediated apoptosis to inhibit liver cancer / Y. Li, Q. Wu, G. Yu, et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – 164. – C.282-291.

107. Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5-Fluorouracil to Achieve Anticancer Synergism / W. Liu, X. Li, Y.-S. Wong, et al. // ACS Nano. – 2012. – 6. N 8. – C.6578-6591.
108. siRNA-loaded selenium nanoparticle modified with hyaluronic acid for enhanced hepatocellular carcinoma therapy / Y. Xia, M. Guo, T. Xu, et al. // International Journal of Nanomedicine. – 2018. – Volume 13. – C.1539-1552.
109. Li, J. Nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics / J. Li, S. Xue, Z.-W. Mao // Journal of Materials Chemistry B. – 2016. – 4. N 41. – C.6620–6639.
110. Morris, K. V. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy / K. V. Morris, J. J. Rossi // Gene Therapy. – 2006. – 13. N 6. – C.553-558.
111. Polymer functionalized gold nanoparticles as nonviral gene delivery reagents / M. M. Encabo-Berzosa, M. Sancho-Albero, V. Sebastian, et al. // The Journal of Gene Medicine. – 2017. – 19. N 6–7. – C.e2964.
112. HES5 Activates Long Noncoding RNA UCA1 to Induce Colorectal Cancer Progression by Modulating miR-185/NOTCH3 Signaling / M. Wang, Q. Zheng, Z. Zhao, et al. // Gastroenterology Research and Practice. – 2021. – 2021. N 1. – C.1-12.
113. Construction and antitumor activity of selenium nanoparticles decorated with the polysaccharide extracted from Citrus limon (L.) Burm. f. (Rutaceae) / L. Zhou, Z. Song, S. Zhang, et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – 188. – C.904-913.
114. Zhang, X. The cellular uptake of Cordyceps sinensis exopolysaccharide-selenium nanoparticles and their induced apoptosis of HepG2 cells via mitochondria- and death receptor-mediated pathways / X. Zhang, Y. Xiao, Q. Huang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – 247. – C.125747.
115. Acharya, S. Selenium Nanoparticles Show Anticancer Activity Through Regulation of HIF-1 α and HIF-2 α Under Hypoxic Condition in Liver Cancer Cells / S. Acharya, S. Nithyananthan, C. Thirunavukkarasu // DNA and cell biology. – 2023. – 42. N 7. – C.433-444.

116. Delivery of Sesamol Using Polyethylene–Glycol–Functionalized Selenium Nanoparticles in Human Liver Cells in Culture / F. Liu, H. Liu, R. Liu, et al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2019. – 67. N 10. – C.2991-2998.
117. Chu, P.-Y. Protective effect of sesamol on the pulmonary inflammatory response and lung injury in endotoxemic rats / P.-Y. Chu, S.-P. Chien, D.-Z. Hsu, M.-Y. Liu // *Food and Chemical Toxicology*. – 2010. – 48. N 7. – C.1821-1826.
118. The interaction of sesamol with DNA and cytotoxicity, apoptosis, and localization in HepG2 cells / Z. Liu, Q. Xiang, L. Du, et al. // *Food Chemistry*. – 2013. – 141. N 1. – C.289-296.
119. Wang, Z. Poly Ethylene Glycol (PEG)-based Hydrogels for Drug Delivery in Cancer Therapy / Z. Wang, Q. Ye, S. Yu, B. Akhavan // *Advanced Healthcare Materials*. – 2023.
120. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction / T. Chen, S. Zheng, X. Li, et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – C.3939.
121. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis / D. Cui, T. Liang, L. Sun, et al. // *Pharmaceutical Biology*. – 2018. – 56. N 1. – C.528-534.
122. Preliminary Structural Characterization of Selenium Nanoparticle Composites Modified by Astragalus Polysaccharide and the Cytotoxicity Mechanism on Liver Cancer Cells / H. Ji, X. Lou, J. Jiao, et al. // *Molecules*. – 2023. – 28. N 4. – C.1561.
123. Yu, J. Alcohol-soluble polysaccharide from *Astragalus membranaceus* / J. Yu, H.-y. Ji, A.-j. Liu // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – 118. N 1. – C.2057-2064.
124. Synthesis, characterization, and cytotoxicity analysis of selenium nanoparticles stabilized by *Morchella sextelata* polysaccharide / M. Shi, J. Deng, J. Min, et al. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – 242. N Pt 3. – C.125143.

125. Green–Synthesized Silver and Selenium Nanoparticles Using Berberine: A Comparative Assessment of In Vitro Anticancer Potential on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line (HepG2) / A. M. Khaled, M. S. Othman, S. T. Obeidat, et al. // *Cells*. – 2024. – 13. N 3.
126. Selenium Nanoparticles Stabilized by β -Glucan Nanotubes from Black Fungus and Their Effects on the Proliferation, Apoptosis, and Cell Cycle of HepG2 Cells / Z. He, H. Song, J. Cheng, et al. // *ACS Omega*. – 2023. – 8. N 48. – C.45358-45368.
127. Antitumoural hydroxyapatite nanoparticles–mediated hepatoma–targeted trans–arterial embolization gene therapy / G. Li, L. Ye, J. Pan, et al. // *Liver International*. – 2012. – 32. N 6. – C.998-1007.
128. Ahmed, H. H. Molecular mechanisms of Nano-selenium in mitigating hepatocellular carcinoma induced by N-nitrosodiethylamine (NDEA) in rats / H. H. Ahmed, W. K. B. Khalil, A. H. Hamza // *Toxicology Mechanisms and Methods*. – 2014. – 24. N 8. – C.593-602.
129. Verna, L. N–Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment / L. Verna // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1996. – 71. N 1–2. – C.57-81.
130. Mohamed, A. A. Selenium nanoparticles and quercetin suppress thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma in rats / A. A. Mohamed, R. A. Zaghloul, A. M. Abdelghany, A. M. El Gayar // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2022. – 36. N 4. – C.9.
131. Chiang, M.-C. The Potential Benefits of Quercetin for Brain Health / M.-C. Chiang, T.-Y. Tsai, C.-J. Wang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – 24. N 7. – C.6328.
132. Cogent role of flavonoids as key orchestrators of chemoprevention of hepatocellular carcinoma / J. Baby, A. R. Devan, A. R. Kumar, et al. // *Journal of Food Biochemistry*. – 2021. – 45. N 7. – C.933.
133. Selenium nanoparticles overcomes sorafenib resistance in thioacetamide induced hepatocellular carcinoma in rats by modulation of mTOR, NF- κ B pathways and LncRNA-AF085935/GPC3 axis / T. M. AL-Noshokaty, N. M. Mesbah, D. M. Abo-Elmatty, et al. // *Life Sciences*. – 2022. – 303. N Pt 2. – C.120675.

134. Nayak, V. Potentialities of selenium nanoparticles in biomedical science / V. Nayak, K. R. B. Singh, A. K. Singh, R. P. Singh // *New Journal of Chemistry*. – 2021. – 45. N 6. – C.2849-2878.
135. Chen, Y.-C. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? / Y.-C. Chen, K. S. Prabhu, A. M. Mastro // *Nutrients*. – 2013. – 5. N 4. – C.1149-1168.
136. Redox-active selenium compounds-from toxicity and cell death to cancer treatment / S. Misra, M. Boylan, A. Selvam, et al. // *Nutrients*. – 2015. – 7. N 5. – C.3536-3556.
137. Varlamova, E. G. THE MAIN CYTOTOXIC EFFECTS OF METHYLSELENINIC ACID ON VARIOUS CANCER CELLS / E. G. Varlamova, E. A. Turovsky // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – 22. N 12.
138. Wu, J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application / J. Wu // *Journal of personalized medicine*. – 2021. – 11. N 8.
139. Biogenic Selenium Nanoparticles and Their Anticancer Effects Pertaining to Probiotic Bacteria-A Review / A. Ullah, J. Mu, F. Wang, et al. // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2022. – 11. N 10.
140. Roehlen, N. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives / N. Roehlen, E. Crouchet, T. F. Baumert // *Cells*. – 2020. – 9. N 4.
141. Extracellular vesicle activities regulating macrophage– and tissue–mediated injury and repair responses / Q. Hu, C. J. Lyon, J. K. Fletcher, et al. // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – 11. N 6. – C.1493-1512.
142. Critical Roles of Kupffer Cells in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease / T. Zeng, C.-L. Zhang, M. Xiao, et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – 7. N 10. – C.18685.
143. Geerts, A. History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells / A. Geerts // *Seminars in Liver Disease*. – 2001. – 21. N 03. – C.311–336.

144. Eng, F. J. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation / F. J. Eng, S. L. Friedman // *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2000. – 279. N 1. – C.G7-G11.
145. Batts, K. P. An Update on Terminology and Reporting / K. P. Batts, J. Ludwig // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 1995. – 19. N 12. – C.1409-1417.
146. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver / P. Ferenci, B. Dragosics, H. Dittrich, et al. // *Journal of Hepatology*. – 1989. – 9. N 1. – C.105-113.
147. Cederbaum, A. I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury / A. I. Cederbaum // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – 16. N 11. – C.1366-1376.
148. Propylthiouracil for alcoholic liver disease / G. Fede, G. Germani, C. Gluud, et al. // *The Cochrane database of systematic reviews*. – 2011. – 2011. N 6. – C.CD002800.
149. Whitfield, K. Pentoxifylline for alcoholic hepatitis / K. Whitfield, A. Rambaldi, J. Wetterslev, C. Gluud // *The Cochrane database of systematic reviews*. – 2009. – 2009. N 4. – C.CD007339.
150. Suk, K. T. Alcoholic liver disease: treatment / K. T. Suk, M. Y. Kim, S. K. Baik // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – 20. N 36. – C.12934-12944.
151. Tilg, H. Management strategies in alcoholic liver disease / H. Tilg, C. P. Day // *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*. – 2007. – 4. N 1. – C.24-34.
152. A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH / S. M. Francque, P. Bedossa, V. Ratziu, et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – 385. N 17. – C.1547-1558.
153. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis / P. N. Newsome, K. Buchholtz, K. Cusi, et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – 384. N 12. – C.1113-1124.
154. Clinical Trial Landscape in NASH / S. A. Harrison, R. Loomba, J. Dubourg, et al. // *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. – 2023. – 21. N 8. – C.2001-2014.

155. Carvedilol is associated with improved survival in patients with cirrhosis: a long-term follow-up study / H. R. McDowell, C. S. Chuah, D. Tripathi, et al. // *Alimentary pharmacology & therapeutics*. – 2021. – 53. N 4. – C.531-539.
156. Combination Therapies Including Cilofexor and Firsocostat for Bridging Fibrosis and Cirrhosis Attributable to NASH / R. Loomba, M. Noureddin, K. V. Kowdley, et al. // *Hepatology*. – 2021. – 73. N 2. – C.625-643.
157. Roberts, E. A. A practice guideline on Wilson disease / E. A. Roberts, M. L. Schilsky // *Hepatology*. – 2003. – 37. N 6. – C.1475-1492.
158. Walshe, J. M. Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride / J. M. Walshe // *The Lancet*. – 1982. – 1. N 8273. – C.643-647.
159. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate. I. Initial therapy in 17 neurologically affected patients / G. J. Brewer, R. D. Dick, V. Johnson, et al. // *Archives of neurology*. – 1994. – 51. N 6. – C.545-554.
160. Affo, S. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer / S. Affo, L.-X. Yu, R. F. Schwabe // *Annual review of pathology*. – 2017. – 12. – C.153-186.
161. Forner, A. Hepatocellular carcinoma / A. Forner, J. M. Llovet, J. Bruix // *Lancet (London, England)*. – 2012. – 379. N 9822. – C.1245-1255.
162. From liver fibrosis to hepatocarcinogenesis: Role of excessive liver H₂O₂ and targeting nanotherapeutics / M. Shao, Y. Wang, H. Dong, et al. // *Bioactive materials*. – 2023. – 23. – C.187-205.
163. Hamid, A. S. Aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention / A. S. Hamid, I. G. Tesfamariam, Y. Zhang, Z. G. Zhang // *Oncology letters*. – 2013. – 5. N 4. – C.1087-1092.
164. Dhar, D. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer / D. Dhar, J. Baglieri, T. Kisseleva, D. A. Brenner // *Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – 245. N 2. – C.96-108.

165. From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence / G. Ramakrishna, A. Rastogi, N. Trehanpati, et al. // *Liver cancer*. – 2013. – 2. N 3–4. – C.367-383.

166. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation / T. Lawrence // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2009. – 1. N 6. – C.a001651.

167. Martinon, F. The inflammasomes: guardians of the body / F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp // *Annual Review of Immunology*. – 2009. – 27. – C.229-265.

168. Schroder, K. The inflammasomes / K. Schroder, J. Tschopp // *Cell*. – 2010. – 140. N 6. – C.821-832.

169. Long-term results of liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an update of the University of Padova experience / A. Vitale, E. Gringeri, M. Valmasoni, et al. // *Transplantation Proceedings*. – 2007. – 39. N 6. – C.1892-1894.

170. Ma, K. W. Surgical resection of localized hepatocellular carcinoma: patient selection and special consideration / K. W. Ma, T. T. Cheung // *Journal of hepatocellular carcinoma*. – 2017. – 4. – C.1-9.

171. Oncological benefits of portal vein embolization for patients with hepatocellular carcinoma / T. Beppu, K. Yamamura, H. Okabe, et al. // *Annals of gastroenterological surgery*. – 2021. – 5. N 3. – C.287-295.

172. Bosi, C. Understanding the causes of recurrent HCC after liver resection and radiofrequency ablation / C. Bosi, M. Rimini, A. Casadei–Gardini, E. Giorgio // *Expert review of anticancer therapy*. – 2023. – 23. N 5. – C.503-515.

173. High-intensity focused ultrasound ablation of liver tumors in difficult locations / S. H. Tsang, K. W. Ma, W. H. She, et al. // *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. – 2021. – 38. N 2. – C.56-64.

174. Schoppmeyer, K. Percutaneous ethanol injection or percutaneous acetic acid injection for early hepatocellular carcinoma / K. Schoppmeyer, S. Weis, J. Mössner, W. E. Fleig // *The Cochrane database of systematic reviews*. – 2009. N 3. – C.CD006745.

175. Efficacy of transcatheter embolization/chemoembolization (TAE/TACE) for the treatment of single hepatocellular carcinoma / R. Miraglia, G. Pietrosi, L. Maruzzelli, et al. // World Journal of Gastroenterology. – 2007. – 13. N 21. – C.2952-2955.

176. Conversion to resection post radioembolization in patients with HCC: recommendations from a multidisciplinary working group / T. Baker, P. Tabrizian, I. Zendejas, et al. // HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association. – 2022. – 24. N 7. – C.1007-1018.

177. Klein, J. Hepatocellular carcinoma radiation therapy: review of evidence and future opportunities / J. Klein, L. A. Dawson // International journal of radiation oncology, biology, physics. – 2013. – 87. N 1. – C.22-32.

178. Proton therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma / F. Dionisi, D. Scartoni, F. Fracchiolla, et al. // Frontiers in oncology. – 2022. – 12. – C.959552.

179. Keating, G. M. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma / G. M. Keating, A. Santoro // Drugs. – 2009. – 69. N 2. – C.223-240.

180. Daher, S. Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review / S. Daher, M. Massarwa, A. A. Benson, T. Khoury // Journal of clinical and translational hepatology. – 2018. – 6. N 1. – C.69-78.

181. Sorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Is Reversed by SIRT1 / A. Garten, T. Grohmann, K. Kluckova, et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – 20. N 16.

182. Sorafenib fails to trigger ferroptosis across a wide range of cancer cell lines / J. Zheng, M. Sato, E. Mishima, et al. // Cell death & disease. – 2021. – 12. N 7. – C.698.

183. Chen, X. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer / X. Chen, R. Kang, G. Kroemer, D. Tang // Nature reviews. Clinical oncology. – 2021. – 18. N 5. – C.280-296.

184. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma / J. M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, et al. // New England Journal of Medicine. – 2008. – 359. N 4. – C.378-390.

185. In vivo biodistribution, biocompatibility, and efficacy of sorafenib-loaded lipid-based nanosuspensions evaluated experimentally in cancer / N. Zhang, B. Zhang, X. Gong, et al. // International Journal of Nanomedicine. – 2016. – C.2329.

186. A dual-targeting reconstituted high density lipoprotein leveraging the synergy of sorafenib and antimiRNA21 for enhanced hepatocellular carcinoma therapy / M. Li, Y. Su, F. Zhang, et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – 75. – C.413-426.
187. Mancuso, A. Fatal gastric bleeding during sorafenib treatment for hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation / A. Mancuso, A. Airolidi, R. Vigano, G. Pinzello // *Digestive and Liver Disease*. – 2011. – 43. N 9. – C.754.
188. Li, Y. The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers / Y. Li, Z.-H. Gao, X.-J. Qu // *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. – 2015. – 116. N 3. – C.216-221.
189. Sorafenib metabolism is significantly altered in the liver tumor tissue of hepatocellular carcinoma patient / L. Ye, X. Yang, E. Guo, et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – 9. N 5. – C.e96664.
190. Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model / S. L. Beedie, C. Mahony, H. M. Walker, et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – 6. – C.30038.
191. The effects of sorafenib in healthy and cisplatin-treated rats / L. Demirtas, M. Gürbüzel, H. Tahirler, et al. // *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*. – 2023. – 32. N 4. – C.449-456.
192. Cui, T.-M. Adverse Effects of Immune-Checkpoint Inhibitors in Hepatocellular Carcinoma / T.-M. Cui, Y. Liu, J.-B. Wang, L.-X. Liu // *OncoTargets and therapy*. – 2020. – 13. – C.11725-11740.
193. Programmed Cell Death in Sepsis Associated Acute Kidney Injury / Z. Wu, J. Deng, H. Zhou, et al. // *Frontiers in medicine*. – 2022. – 9. – C.883028.
194. Proskuryakov, S. Y. Necrosis: a specific form of programmed cell death? / S. Y. Proskuryakov, A. G. Konoplyannikov, V. L. Gabai // *Experimental cell research*. – 2003. – 283. N 1. – C.1-16.
195. Rock, K. L. The inflammatory response to cell death / K. L. Rock, H. Kono // *Annual review of pathology*. – 2008. – 3. – C.99-126.
196. Ferris, J. A. Definitions of ischaemia, infarction and necrosis / J. A. Ferris, J. M. Friesen // *Forensic science international*. – 1979. – 13. N 3. – C.253-259.

197. Raffray, M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? / M. Raffray, G. M. Cohen // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1997. – 75. N 3. – C.153-177.
198. Wu, W. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death / W. Wu, P. Liu, J. Li // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2012. – 82. N 3. – C.249-258.
199. Linkermann, A. Necroptosis / A. Linkermann, D. R. Green // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – 370. N 5. – C.455-465.
200. Zhou, W. Necroptosis in health and diseases / W. Zhou, J. Yuan // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2014. – 35. – C.14-23.
201. Razaghi, A. Negative regulators of cell death pathways in cancer: perspective on biomarkers and targeted therapies / A. Razaghi, K. Heimann, P. M. Schaeffer, S. B. Gibson // *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. – 2018. – 23. N 2. – C.93-112.
202. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker / N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, et al. // *Molecular biology of the cell*. – 2004. – 15. N 3. – C.1101-1111.
203. -The role of autophagy during the early neonatal starvation period / A. Kuma, M. Hatano, M. Matsui, et al. // *Nature*. – 2004. – 432. N 7020. – C.1032-1036.
204. New use for old drugs? Prospective targets of chloroquines in cancer therapy / S. Vlahopoulos, E. Critselis, I. F. Voutsas, et al. // *Current drug targets*. – 2014. – 15. N 9. – C.843-851.
205. Roles of Autophagy in Oxidative Stress / H. R. Yun, Y. H. Jo, J. Kim, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – 21. N 9.
206. Lei, G. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer / G. Lei, L. Zhuang, B. Gan // *Nature reviews. Cancer*. – 2022. – 22. N 7. – C.381-396.
207. Gong, W. Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases / W. Gong, Y. Shi, J. Ren // *Immunobiology*. – 2020. – 225. N 2. – C.151884.

208. Koenig, U. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene / U. Koenig, L. Eckhart, E. Tschachler // Biochemical and biophysical research communications. – 2001. – 285. N 5. – C.1150-1154.
209. Davis, B. K. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases / B. K. Davis, H. Wen, J. P.–Y. Ting // Annual Review of Immunology. – 2011. – 29. – C.707-735.
210. Broz, P. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling / P. Broz, V. M. Dixit // Nature reviews. Immunology. – 2016. – 16. N 7. – C.407-420.
211. Platnich, J. M. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways / J. M. Platnich, D. A. Muruve // Archives of biochemistry and biophysics. – 2019. – 670. – C.4-14.
212. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation / C. Rogers, D. A. Erkes, A. Nardone, et al. // Nature communications. – 2019. – 10. N 1. – C.1689.
213. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix / S. Sperandio, K. Poksay, I. de Belle, et al. // Cell death and differentiation. – 2004. – 11. N 10. – C.1066-1075.
214. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 / L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, et al. // Cell death and differentiation. – 2012. – 19. N 1. – C.107-120.
215. David, K. K. Parthanatos, a messenger of death / K. K. David, S. A. Andrabi, T. M. Dawson, V. L. Dawson // Frontiers in bioscience (Landmark edition). – 2009. – 14. N 3. – C.1116-1128.
216. Repsold, L. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death / L. Repsold, A. M. Joubert // BioMed research international. – 2018. – 2018. – C.9405617.
217. Cell-cell contact activation of fibroblasts increases the expression of matrix metalloproteinases / V. Sirén, P. Salmenperä, E. Kankuri, et al. // Annals of medicine. – 2006. – 38. N 3. – C.212-220.
218. Entosis: From Cell Biology to Clinical Cancer Pathology / I. Mlynarczuk-Bialy, I. Dziuba, A. Sarnecka, et al. // Cancers. – 2020. – 12. N 9.

219. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, et al. // *Science* (New York, N.Y.). – 2004. – 303. N 5663. – C.1532-1535.
220. Pandeya, A. Therapeutic potential of PANoptosis: innate sensors, inflammasomes, and RIPKs in PANoptosomes / A. Pandeya, T.-D. Kanneganti // *Trends in molecular medicine*. – 2024. – 30. N 1. – C.74-88.
221. Taddei, M. L. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases / M. L. Taddei, E. Giannoni, T. Fiaschi, P. Chiarugi // *The Journal of pathology*. – 2012. – 226. N 2. – C.380-393.
222. Nirmala, J. G. Cell death mechanisms in eukaryotes / J. G. Nirmala, M. Lopus // *Cell biology and toxicology*. – 2020. – 36. N 2. – C.145-164.
223. Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials / A. K. Wani, N. Akhtar, T. U. G. Mir, et al. // *Biomolecules*. – 2023. – 13. N 2.
224. Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm / H. Wajant // *Science* (New York, N.Y.). – 2002. – 296. N 5573. – C.1635-1636.
225. Uren, R. T. Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? / R. T. Uren, S. Iyer, R. M. Kluck // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. – 2017. – 372. N 1726.
226. Westphal, D. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis / D. Westphal, R. M. Kluck, G. Dewson // *Cell death and differentiation*. – 2014. – 21. N 2. – C.196-205.
227. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade / P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, et al. // *Cell*. – 1997. – 91. N 4. – C.479-489.
228. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP) / D. Vucic, K. Deshayes, H. Ackerly, et al. // *The Journal of biological chemistry*. – 2002. – 277. N 14. – C.12275-12279.
229. tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation / A. Shamas-Din, S. Bindner, W. Zhu, et al. // *The Journal of biological chemistry*. – 2013. – 288. N 30. – C.22111-22127.

230. Life with or without AIF / E. Hangen, K. Blomgren, P. Bénit, et al. // Trends in biochemical sciences. – 2010. – 35. N 5. – C.278-287.

231. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 / N. Morishima, K. Nakanishi, H. Takenouchi, et al. // The Journal of biological chemistry. – 2002. – 277. N 37. – C.34287-34294.

232. Cho, S.-G. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases / S.-G. Cho, E.-J. Choi // Journal of biochemistry and molecular biology. – 2002. – 35. N 1. – C.24-27.

233. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells / M. O. Li, M. R. Sarkisian, W. Z. Mehal, et al. // Science (New York, N.Y.). – 2003. – 302. N 5650. – C.1560-1563.

234. Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis / R. Tixeira, S. Caruso, S. Paone, et al. // Apoptosis: an international journal on programmed cell death. – 2017. – 22. N 3. – C.475-477.

235. Emerging Role of the Unfolded Protein Response in Tumor Immunosurveillance / H. Vanacker, J. Veters, L. Moudombi, et al. // Trends in cancer. – 2017. – 3. N 7. – C.491-505.

236. Chapman, R. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus / R. Chapman, C. Sidrauski, P. Walter // Annual review of cell and developmental biology. – 1998. – 14. – C.459-485.

237. Bernales, S. Intracellular signaling by the unfolded protein response / S. Bernales, F. R. Papa, P. Walter // Annual review of cell and developmental biology. – 2006. – 22. – C.487-508.

238. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 / F. Urano, X. Wang, A. Bertolotti, et al. // Science (New York, N.Y.). – 2000. – 287. N 5453. – C.664-666.

239. Park, S.-M. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes / S.-M. Park, T.-I. Kang, J.-S. So // Biomedicines. – 2021. – 9. N 7.

240. Harding, H. P. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic–reticulum–resident kinase / H. P. Harding, Y. Zhang, D. Ron // *Nature*. – 1999. – 397. N 6716. – C.271-274.

241. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response / H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, et al. // *Molecular and cellular biology*. – 2000. – 20. N 18. – C.6755-6767.

242. Ron, D. How IRE1 reacts to ER stress / D. Ron, S. R. Hubbard // *Cell*. – 2008. – 132. N 1. – C.24-26.

243. Iurlaro, R. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress / R. Iurlaro, C. Muñoz-Pinedo // *The FEBS journal*. – 2016. – 283. N 14. – C.2640-2652.

244. Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress–induced apoptosis / G. Li, M. Mongillo, K.-T. Chin, et al. // *The Journal of cell biology*. – 2009. – 186. N 6. – C.783-792.

245. DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells / T. Li, L. Su, Y. Lei, et al. // *The Journal of biological chemistry*. – 2015. – 290. N 17. – C.11108-11118.

246. Neddylation Inhibition Activates the Extrinsic Apoptosis Pathway through ATF4-CHOP-DR5 Axis in Human Esophageal Cancer Cells / P. Chen, T. Hu, Y. Liang, et al. // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2016. – 22. N 16. – C.4145-4157.

247. Features of optical breakdown of aqueous colloidal solutions of ferric oxide (Fe_2O_3) nanoparticles occurring on individual or on two closely located nanoparticles / I. V. Baimler, A. V. Simakin, V. K. Chevokin, et al. // *Chemical Physics Letters*. – 2021. – 776. N 1. – C.138697.

248. Baimler, I. V. Investigation of the laser–induced breakdown plasma, acoustic vibrations and dissociation processes of water molecules caused by laser breakdown of colloidal solutions containing Ni nanoparticles / I. V. Baimler, A. V. Simakin, S. V. Gudkov // *Plasma Sources Science and Technology*. – 2021. – 30. N 12. – C.125015.

249. Laser-Induced Optical Breakdown of an Aqueous Colloidal Solution Containing Terbium Nanoparticles: The Effect of Oxidation of Nanoparticles / S. V. Gudkov, M. E. Astashev, I. V. Baimler, et al. // The journal of physical chemistry. B. – 2022. – 126. N 30. – C.5678-5688.

250. Drexler, H. G. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention / H. G. Drexler, C. C. Uphoff // Cytotechnology. – 2002. – 39. N 2. – C.75-90.

251. Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb / K. Aoki, S. Satoi, S. Harada, et al. // Molecular biology of the cell. – 2020. – 31. N 8. – C.833-844.

252. Silva, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program / M. T. Silva // FEBS letters. – 2010. – 584. N 22. – C.4491-4499.

253. Mechanisms of the Cytotoxic Effect of Selenium Nanoparticles in Different Human Cancer Cell Lines / E. G. Varlamova, M. V. Goltyaev, V. N. Mal'tseva, et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – 22. N 15.

254. Ben Mousa, A. Sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma / A. Ben Mousa // Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association. – 2008. – 14. N 1. – C.40-42.

255. Hepatocellular Carcinoma Treatment With Sorafenib: Real-Life Evaluation of Prognostic Factors and a Practical Clue for Patient Management / H. Cardoso, A. M. Alves, M. Marques, et al. // GE Portuguese journal of gastroenterology. – 2016. – 23. N 5. – C.243-248.

256. Goltyaev, M. V. Expression of ER-resident selenoproteins and activation of cancer cells apoptosis mechanisms under ER-stress conditions caused by methylseleninic acid / M. V. Goltyaev, V. N. Mal'tseva, E. G. Varlamova // Gene. – 2020. – 755. – C.144884.

257. King, A. P. Endoplasmic reticulum stress: an arising target for metal-based anticancer agents / A. P. King, J. J. Wilson // Chemical Society reviews. – 2020. – 49. N 22. – C.8113-8136.

258. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics / R. Bravo, T. Gutierrez, F. Paredes, et al. // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2012. – 44. N 1. – C.16-20.

259. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer / S. Patergnani, A. Danese, E. Bouhamida, et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – 21. N 21.

260. Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon / C. M. López De Padilla, M. J. Coenen, A. Tovar, et al. // The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society. – 2021. – 69. N 10. – C.633-643.

261. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats / K. Kinoshita, Y. Iimuro, K. Otagawa, et al. // Gut. – 2007. – 56. N 5. – C.706-714.

262. Shin, G.-M. Anti-hepatofibrosis effect of *Allium senescens* in activated hepatic stellate cells and thioacetamide-induced fibrosis rat model / G.-M. Shin, S. Koppula, Y.-J. Chae, et al. // Pharmaceutical Biology. – 2018. – 56. N 1. – C.632-642.

263. Chan, J. K. C. The wonderful colors of the hematoxylin–eosin stain in diagnostic surgical pathology / J. K. C. Chan // International journal of surgical pathology. – 2014. – 22. N 1. – C.12-32.

264. Dapson, R. W. Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80) / R. W. Dapson, C. Fagan, J. A. Kiernan, T. W. Wickersham // Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission. – 2011. – 86. N 3. – C.133-139.

265. Digital Image Analysis of Picrosirius Red Staining: A Robust Method for Multi-Organ Fibrosis Quantification and Characterization / G. E. Courtoy, I. Leclercq, A. Froidure, et al. // Biomolecules. – 2020. – 10. N 11.

266. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats / M. C. Wallace, K. Hamesch, M. Lunova, et al. // Laboratory animals. – 2015. – 49. N 1 Suppl. – C.21-29.

267. Thioacetamide–induced hepatic fibrosis in the common marmoset / T. Inoue, Y. Ishizaka, E. Sasaki, et al. // *Experimental animals*. – 2018. – 67. N 3. – C.321-327.

268. Novel liver fibrosis model in *Macaca fascicularis* induced by thioacetamide / M. Matsuo, S. Murata, S. Hasegawa, et al. // *Scientific Reports*. – 2020. – 10. N 1. – C.2450.

269. Hong, F. Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy in vivo / F. Hong, H. Chou, M. I. Fiel, S. L. Friedman // *Digestive diseases and sciences*. – 2013. – 58. N 1. – C.257-264.

270. Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition / T.-H. Su, C.-W. Shiau, P. Jao, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – 112. N 23. – C.7243-7248.

271. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis / Y. Wang, J. Gao, Di Zhang, et al. // *Journal of Hepatology*. – 2010. – 53. N 1. – C.132-144.

272. Shahabi, R. Protective and anti–inflammatory effect of selenium nanoparticles against bleomycin–induced pulmonary injury in male rats / R. Shahabi, A. Anissian, S. A. Javadmoosavi, F. Nasirinezhad // *Drug and chemical toxicology*. – 2021. – 44. N 1. – C.92-100.

273. Antimicrobial and anti–viral effects of selenium nanoparticles and selenoprotein based strategies: COVID-19 and beyond / A. Khurana, P. Allawadhi, V. Singh, et al. // *Journal of drug delivery science and technology*. – 2023. – 86. – C.104663.

274. *Nardostachys jatamansi* protects against liver damage induced by thioacetamide in rats / S. Ali, K. A. Ansari, M. A. Jafry, et al. // *Journal of ethnopharmacology*. – 2000. – 71. N 3. – C.359-363.

275. Schnell, M. A. Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters / M. A. Schnell, C. Hardy, M. Hawley, K. J. Propert, J. M. Wilson // *Human gene therapy*. – 2002. – 13. N 1. – C.155-161.

276. Human collagen alpha-2 type I stimulates collagen synthesis, wound healing, and elastin production in normal human dermal fibroblasts (HDFs) / S. J. Hwang, G.-H. Ha, W.-Y. Seo, et al. // *BMB reports*. – 2020. – 53. N 10. – C.539-544.
277. Karsenty, G. Regulation of type I collagen genes expression / G. Karsenty, R. W. Park // *International reviews of immunology*. – 1995. – 12. N 2–4. – C.177-185.
278. Myllyharju, J. Collagens and collagen-related diseases / J. Myllyharju, K. I. Kivirikko // *Annals of medicine*. – 2001. – 33. N 1. – C.7-21.
279. Trojanowska, M. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin / M. Trojanowska, E. C. LeRoy, B. Eckes, T. Krieg // *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. – 1998. – 76. N 3–4. – C.266-274.
280. Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of α -SMA and collagen III / D.-J. Zhou, D. Mu, M.-D. Jiang, et al. // *Molecular medicine reports*. – 2015. – 12. N 3. – C.4095-4102.
281. Hammerich, L. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases / L. Hammerich, F. Heymann, F. Tacke // *Clinical & developmental immunology*. – 2011. – 2011. – C.345803.
282. Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β -dependent liver fibrosis / T. Fabre, M. F. Molina, G. Soucy, et al. // *Science immunology*. – 2018. – 3. N 28.
283. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice / X. Kong, D. Feng, H. Wang, et al. // *Hepatology*. – 2012. – 56. N 3. – C.1150-1159.
284. Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment / J. Zhao, Z. Zhang, Y. Luan, et al. // *Hepatology*. – 2014. – 59. N 4. – C.1331-1342.
285. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation / S. Radaeva, R. Sun, H.-N. Pan, et al. // *Hepatology*. – 2004. – 39. N 5. – C.1332-1342.
286. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis / T. McHedlidze, M. Waldner, S. Zopf, et al. // *Immunity*. – 2013. – 39. N 2. – C.357-371.

287. Rathinam, V. A. K. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions / V. A. K. Rathinam, K. A. Fitzgerald // *Cell*. – 2016. – 165. N 4. – C.792-800.
288. Tsuchida, T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation / T. Tsuchida, S. L. Friedman // *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. – 2017. – 14. N 7. – C.397-411.
289. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death / J. Shi, Y. Zhao, K. Wang, et al. // *Nature*. – 2015. – 526. N 7575. – C.660-665.
290. Gan, C. Inflammasomes and Pyroptosis of Liver Cells in Liver Fibrosis / C. Gan, Q. Cai, C. Tang, J. Gao // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – 13. – C.896473.
291. Pinzani, M. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells / M. Pinzani, F. Marra // *Seminars in Liver Disease*. – 2001. – 21. N 3. – C.397-416.
292. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats / Y.-H. Huang, M.-N. Shi, W.-D. Zheng, et al. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – 12. N 9. – C.1386-1391.
293. Hydrodynamics-based transfection of rat interleukin-10 gene attenuates porcine serum-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the activation of hepatic stellate cells / Y.-H. Huang, Y.-X. Chen, L.-J. Zhang, et al. // *International journal of molecular medicine*. – 2014. – 34. N 3. – C.677-686.
294. Varlamova, E. G. Ca²⁺-Dependent Effects of the Selenium-Sorafenib Nanocomplex on Glioblastoma Cells and Astrocytes of the Cerebral Cortex: Anticancer Agent and Cytoprotector / E. G. Varlamova, V. V. Khabatova, S. V. Gudkov, E. A. Turovsky // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – 24. N 3.
295. Maiyo, F. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery / F. Maiyo, M. Singh // *Nanomedicine (London, England)*. – 2017. – 12. N 9. – C.1075-1089.
296. Goltyaev, M. V. Activation of Signal Pathways of Apoptosis under Conditions of Prolonged ER-Stress Caused by Exposure of Mouse Testicular Teratoma Cells to Selenium-Containing Compounds / M. V. Goltyaev, E. G. Varlamova, S. V. Novoselov, E. E. Fesenko // *Doklady. Biochemistry and biophysics*. – 2020. – 490. N 1. – C.9-11.

297. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress / T. Yoneda, K. Imaizumi, K. Oono, et al. // The Journal of biological chemistry. – 2001. – 276. N 17. – C.13935-13940.

298. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta / T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, et al. // Nature. – 2000. – 403. N 6765. – C.98–103.

299. Wang, X. Z. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase / X. Z. Wang, D. Ron // Science (New York, N.Y.). – 1996. – 272. N 5266. – C.1347-1349.

300. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways / C. E. Senkal, S. Ponnusamy, J. Bielawski, et al. // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2010. – 24. N 1. – C.296-308.

301. Kim, I. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities / I. Kim, W. Xu, J. C. Reed // Nature reviews. Drug discovery. – 2008. – 7. N 12. – C.1013-1030.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Varlamova EG, **Goltyaev MV**, Simak 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю – д.б.н. Варламовой Е.Г. за помощь на всех этапах проведенной работы. За помощь в проведении экспериментов автор выражает благодарность д.б.н. Туровскому Е.А. и Рогачеву В.В. Автор благодарит за помощь Сектор Оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН и лично д.ф.-м.н. Пенькова Н.В. и Яшина В.А. Автор выражает благодарность д.б.н., проф. С.В. Гудкову (Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН) за предоставленные для работы сорафениб, наночастицы селена и наноконкомплекс селен-сорафениб.