

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЯДЕРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«МИФИ»

*На правах рукописи*



Карьгина Ирина Викторовна

**Изучение противоопухолевого потенциала и некоторых аспектов  
безопасности применения адресных систем доставки лекарственных  
средств в эксперименте**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

Самышина Елена Александровна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. НАНОТЕХНОЛОГИИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ .....	18
1.1 Нанотехнологии тканевого лекарственного таргетирования злокачественных новообразований .....	26
1.1.1 Пассивное воздействие наночастиц на опухоль с помощью EPR эффекта .....	28
1.1.2 Гетерогенность EPR эффекта .....	30
1.1.3 Пути повышения эффективности тканевого таргетирования злокачественных опухолей .....	31
1.1.4 Альтернативные стратегии повышения эффективности воздействия наночастиц на опухолевую ткань .....	35
1.2 Клеточно-направленные стратегии воздействия на опухоль при помощи наночастиц .....	37
1.2.1 Стволовые клетки – носители противоопухолевых наночастиц .....	40
1.2.2 Эритроциты как система доставки нанололекарственных форм противоопухолевых препаратов .....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	45
2.1 Общий план проведения работы .....	45
2.2 Следование биоэтическим требованиям при выполнении диссертационной работы .....	47
2.3 Физико-химическая характеристика наночастиц селена и способ введения. Лекарственная форма сравнения .....	49
2.3.1 Метод синтеза наночастиц селена .....	49
2.3.2 Общая характеристика наночастиц селена .....	50
2.3.3 Допирование наночастиц селена. Фармакологические особенности введения наночастиц селена .....	51
2.4 Методы исследования с участием лабораторных животных .....	51

2.4.1 Методы определения острой токсичности при внутрибрюшинном и внутривенном введении.....	54
2.4.2 Метод исследования противоопухолевого эффекта наночастиц селена в эксперименте на мышах .....	55
2.5 Метод исследования противоопухолевой активности в культуре клеток .....	57
2.6 Методы молекулярных исследований .....	58
2.6.1 Выделение РНК для постановки полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции.....	58
2.6.2 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени .....	58
2.6.3 Метод протеомного анализа .....	59
2.7 Метод определения концентрации наночастиц селена в крови, опухолевой ткани, печени методом атомной абсорбционной спектроскопии .....	59
2.8 Методы статистического анализа результатов .....	61
ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, В ТОМ ЧИСЛЕ ДОПИРОВАННОГО ЛХТ-17-19 .....	62
3.1 Физико-химические свойства исследуемых наночастиц селена.....	62
3.2 Острая токсичность наночастиц селена, допированных ЛХТ-17-19 при внутривенном и внутрибрюшинном введении лабораторным мышам.....	67
ГЛАВА 4. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, В ТОМ ЧИСЛЕ ДОПИРОВАННЫХ ЛХТ-17-19, НА МОДЕЛЯХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО IN VITRO И IN VIVO .....	69
4.1 Противоопухолевое действие наночастиц селена в культуре клеток аденокарциномы легкого А549.....	69
4.2 Противоопухолевое действие наночастиц селена на сингенной опухолевой модели аденокарциномы легкого Льюис у мышей .....	71

4.3 Анализ концентрации наночастиц селена в крови, опухолевом узле и печени мышей на фоне их курсового введения.....	74
4.4 Исследование антиметастатической активности наночастиц селена при курсовом введении мышам с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис.....	77
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА НА ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКУЮ ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ, СТРЕСС И КЛЕТОЧНУЮ ГИБЕЛЬ У МЫШЕЙ С СИНГЕННОЙ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЛЕГКОГО .....	80
ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
6.1 Итоги выполнения диссертационной работы .....	93
6.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования.....	95
ВЫВОДЫ.....	96
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время злокачественные новообразования (ЗНО) являются одной из основных причин смертности людей, представляя серьезную угрозу для жизни и здоровья человека. Рак легкого занимает третье место среди наиболее распространенных видов рака в Российской Федерации [1]. Некоторые из традиционных и новых методов лечения злокачественных опухолей, такие как хирургическая резекция, лучевая терапия, химиотерапия, таргетная терапия и иммунотерапия, имеют соответствующие побочные эффекты, которые отрицательно влияют на качество жизни пациентов [2,3]. Например, химиотерапевтические препараты обладают высокой цитотоксичностью и также поражают нормальные клетки во время лечения [4]. Таким образом, разработка новых препаратов с высокой селективностью и низкой цитотоксичностью важна для современной онкофармакологии. В последние годы металлические наночастицы стали шагом к более эффективным стратегиям лечения опухолевых процессов, которые способны одновременно инкапсулировать и вводить несколько противоопухолевых препаратов с различными терапевтическими механизмами, что делает их идеальными кандидатами для терапии в онкологии [5].

Селен (Se), необходимый микроэлемент для человека, жизненно важен для здоровья организма [6]. Селен является компонентом аминокислоты селеноцистеина, которая производит селенопротеины, включая антиоксидантный фермент глутатионпероксидазу (GPx) [7]. Кроме того, селен участвует в метаболизме, регуляции иммунной и репродуктивной систем, синтезе ДНК и апоптозе, устойчивости к окислительному повреждению, а также развитию и регенерации мышечной ткани [8, 9]. Как дефицит, так и избыток селена могут влиять на физиологические функции у людей [10]. Из-за узкого диапазона физиологических потребностей селена и

токсических доз рациональное и активное применение этого металла для контроля заболеваний и здоровья человека остается большой проблемой [11].

В последние годы, с развитием нанотехнологий, было показано, что наночастицы селена (НЧС, SeNP) обладают меньшей токсичностью и более высокой биодоступностью по сравнению с органическими или неорганическими формами соединений селена [12]. Наночастицы селена проявляют самостоятельную значительную противоопухолевую активность и используются для лечения различных заболеваний, таких как сахарный диабет, воспалительные заболевания, фиброз печени и лекарственная токсичность [13, 14, 209]. Однако наноразмерный селен очень нестабилен и склонен к спонтанной агрегации в кластеры и осаждению, что приводит к снижению биоактивности и биодоступности [15].

Все это обуславливает сохраняющийся высокий интерес исследователей во всем мире к разработке наночастиц селена с оптимальными функциональными и фармакологическими свойствами, определению наиболее востребованных терапевтических ниш для клинического применения НЧС в онкологии в качестве либо самостоятельного онкофармакологического агента, либо в качестве эффективного и безопасного фармакологического контейнера для селективной и направленной доставки других лекарственных препаратов в область опухолевого роста. Это обуславливает несомненную актуальность выполнения настоящего диссертационного исследования.

### **Степень разработанности темы исследования**

В последнее десятилетие большое внимание уделяется разработке новых подходов к лечению онкологических заболеваний с использованием нанотехнологий. Среди перспективных наночастиц для лечения онкологических заболеваний следует выделить наночастицы селена, обладающие наименее выраженной токсичностью по отношению к нормальным тканям и эффективным цитотоксическим действием в

отношении опухолевых клеток [16]. Биогенно полученный наноселен способен вызывать остановку клеточного цикла в моделях ЗНО эпителиального происхождения *in vitro* и *in vivo* [16]. Биогенные НЧС индуцировали не только апоптоз в клетках карциномы толстой кишки мышей (СТ26) или человека (HT29 и CaCo-2), но и повышенную иммуногенность [17]. На основе наноселена созданы сложные наноконплексы, среди которых следует отметить SeNVs@NE-IL32-EcN, представляющие собой внеклеточные везикулы, нагруженные наночастицами селена, интерлейкином-32 и пробиотиком *Escherichia coli* Nissle 1917. Использование этого наноконплекса показало высокую эффективность против различных злокачественных новообразований на гуманизированных мышинных моделях [17]. Также НЧС хорошо поддаются функциональным изменениям при допировании активными соединениями, когда наноселен является носителем активного вещества.

Наночастицы селена, функционализированные лентинаном, показали высокую противоопухолевую эффективность против клеток карциномы толстой кишки человека НСТ-116 за счет регуляции пути апоптоза, опосредованного митохондриями, и вызвали остановку клеточного цикла в фазе G0/G1. Интересно, что авторы использовали в исследовании 5 линий клеток — линии клеток рака толстой кишки человека (НСТ-116, HT-29, CaCo-2 и SW620) и линию клеток рака толстой кишки мыши (СТ26), а функционализированные НЧС показали наибольшую противоопухолевую эффективность против клеток НСТ-116 [17], что говорит о необходимости поиска молекулярных различий в разных типах рака с целью разработки наиболее эффективной наносистемы для лечения.

Интересные исследования в последние годы были выполнены российской академической группой под руководством д.б.н. Туровского Е.А. и д.б.н. Варламовой Е.А. Учеными были продемонстрированы как широкий противоопухолевый потенциал НЧС в отношении неоплазий неэпителиального происхождения, а также обоснованы основные положения

влияния наночастиц селена на молекулярные механизмы стресса эндоплазматического ретикула при экспериментальном канцерогенезе в опытах *in vitro* [16]. Кроме того, большой научно-практический потенциал представляют результаты исследования противоопухолевой активности нового класса соединений гетероциклической природы – производных дигидроакридона, выполненные в последние годы Кудрявцевым М.Ю. и Самышиной Е.А. [18, 19].

### **Цель и задачи исследования**

На основании комплексного исследования *in vitro* и *in vivo* определить противоопухолевый потенциал наночастиц селена, допированных производным дигидроакридона, а также установить механизмы их влияния на паранеопластическую воспалительную реакцию и клеточную гибель.

1. Определить острую токсичность наночастиц селена и их формы, допированной соединением ЛХТ-17-19, у мышей при внутрибрюшинном и внутривенном введении.

2. Изучить цитотоксичность наночастиц селена при их культивировании в культуре клеток аденокарциномы легкого человека А549 в сравнении с липосомальной формой доксорубицина и на фоне допирования известным ингибитором EGFR производным дигидроакридона ЛХТ-17-19.

3. Изучить противоопухолевый потенциал допированных ЛХТ-17-19 и недопированных наночастиц селена (динамика объема опухолевого узла, веса тела животных, количество отдаленных метастазов) при их курсовом внутрибрюшинном введении в дозах 5 и 10 мг/кг мышам С57В<sub>1</sub><sub>6</sub> с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис.

4. Определить концентрацию наночастиц селена в периферической крови, тканях печени и первичного опухолевого узла после окончания курсового внутрибрюшинного введения наночастиц селена мышам с С57В<sub>1</sub><sub>6</sub> с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис в зависимости от вводимой дозы.

5. С использованием ПЦР в режиме реального времени и протеомного анализа определить влияние курсового внутрибрюшинного введения наночастиц селена в дозах 5 и 10 мг/кг на метаболическую регуляцию паранеопластического воспалительного процесса.

6. Установить основные закономерности регуляции стресса эндоплазматического ретикулама и клеточной гибели аденокарциномы легкого Льюис у лабораторных мышей на фоне курсового внутрибрюшинного введения наночастиц селена, в том числе при их допировании ЛХТ-17-19.

### **Научная новизна**

Впервые проведено комплексное молекулярно-фармакологическое исследование противоопухолевого потенциала наночастиц селена, полученных методом лазерной абляции, в зависимости от их загрузки противоопухолевым агентом ЛХТ-17-19, на субклеточном, клеточном, тканевом и организменном уровне при экспериментальном канцерогенезе – в моделях аденокарциномы легкого человека и мыши с определением ведущих молекулярных паттернов паранеопластической воспалительной реакции, стресса эндоплазматического ретикулама опухолевых клеток, регуляции программируемой гибели клеток.

В культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549 было впервые показано, что наночастицы селена обладают собственной цитотоксической активностью в широком диапазоне концентраций с вычисленным показателем  $IC_{50}$  равным  $5,2 \times 10^{-6}$  М, при этом по силе подавления роста опухолевых клеток НЧС превосходят препарат сравнения доксорубин липосомальный. Допирование наночастиц селена ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) соединением дигидроакридона ЛХТ-17-19 дозозависимо повышало ингибиторный потенциал НЧС.

При изучении острой токсичности наночастиц селена показано, что при внутрибрюшинном введении наночастиц селена расчетные значения  $LD_{16}$  составили 378 [322 ÷ 434] мг/кг; значение  $LD_{50}$  было равно 502 [430 ÷ 575] мг/кг; показатель  $LD_{94}$  составил 654 [584 ÷ 724] мг/кг; показатель  $LD_{100}$  наночастиц селена при внутривенном введении мышам составил 415 [355 ÷ 480] мг/кг. Загрузка наночастиц селена противоопухолевым соединением ЛХТ-17-19 повышает их токсичность, но снижает токсикологический профиль антибластомного вещества. Токсикологический профиль НЧС для мышей при внутрибрюшинном и внутривенном введении соответствует 3 классу – умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.01.007 – 76 и 4 классу токсичности и опасности по классификации ОЕСД.

На модели сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис курсовое внутрибрюшинное в течение 20 суток введение допированных ЛХТ-17-19 наночастиц селена в дозе 5 мг/кг и недопированного наноселена в дозе 10 мг/кг сопровождается при сравнении с контролем торможением роста первичного опухолевого узла и метастазирования опухоли, причем эффект допированного производным дигироакридона ЛХТ-17-19 селенового контейнера превосходит по противоопухолевой эффективности незагруженный наноселен. Также установлена способность наночастиц селена сдерживать формирование паранеопластической кахексии лабораторных животных – носителей опухоли.

Использование метода позитронно-эмиссионной микроскопии для детекции наночастиц селена (по фракции селена) в периферической крови лабораторных животных, печени и опухолевом узле позволило установить, что вне зависимости от вводимой дозы наноселена в крови и ткани печени сохраняются сопоставимые концентрации селена при заборе материала через 1 сутки после последнего введения нанофармакологической лекарственной формы. Первичный опухолевый узел накапливает тем более, чем в большей дозе наночастицы селена вводились внутрибрюшинно мышам, что

подтверждает гипотезу о способности НЧС к адресному селективному накоплению в ткани опухоли.

Курсовое введение наночастиц селена дозозависимо приводило к 2-3-кратному снижению уровней экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17, ИЛ-6 и ИЛ-33, что также подтверждалось результатами протеомного анализа методом вестерн-блот. В обеих исследуемых дозах НЧС снижали почти в 3 раза экспрессию и клеточное содержание одного из ключевых регуляторов воспаления – Casp-1 на фоне умеренного влияния на продукцию противовоспалительного ИЛ-10 в опухолевой ткани, при этом увеличивая экспрессию и содержание белка провоспалительных факторов TNF $\alpha$  и TGF $\beta$ .

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Наночастицы селена, полученные методом лазерной абляции, имеющие сферическую форму, размеры по данным ПЭМ-изображений от 50 до 200 нанометров, имеющие мономодальное распределение по размерам с максимумом 150 нанометров и полушириной 150 нанометров с пиком распределения дзета-потенциала, расположенным при значениях около -25 мВ, с содержанием в 1 мл коллоида  $1,4 \times 10^{13}$  наночастиц, могут выступать в качестве самостоятельных нанолекарственных форм для проведения противоопухолевой терапии.

Загрузка НЧС веществом с противоопухолевым действием ЛХТ-17-19 снижает токсикологические свойства производного дигидроакридона и повышает его противобластомный эффект.

При планировании доклинических и клинических испытаний для исследования системной и тканевой фармакокинетики лекарственных препаратов на основе наночастиц селена в качестве аналитического метода может быть использована атомно-абсорбционная спектрометрия.

Наночастицы селена с указанными выше физико-химическими свойствами могут быть использованы в качестве фармакологических

контейнеров для адресной доставки действующих лекарственных веществ, обладающих антибластомной активностью, к очагу патологического процесса.

### **Методология и методы исследования**

Объектом в диссертационной работе являлись наночастицы селена, в связи с чем для получения доказательств их фармакологической активности при экспериментальном опухолевом процессе использовали методы биологической физики, биохимии, молекулярной и клеточной биологии.

Наночастицы селена были получены методом лазерной абляции. Для изучения их физико-химических свойств применяли комплекс физических методов: для определения размеров – позитронно-эмиссионную микроскопию, для анализа коллоидного раствора рентгеноконтрастный структурный анализ, определение дзета-потенциала.

Цитотоксические свойства наночастиц селена были изучены в сравнении с известной лекарственной наноразмерной формой противоопухолевого антибиотика – доксорубицина липосомального. Для определения цитотоксических свойств наноселена в качестве биологического контейнера использовали наночастицы, допированные известным анатагонистом рецептора эпидермального фактора роста – производного дигироакридона ЛХТ-17-19. Применяли клеточную культуру аденокарциномы легкого человека А549, выживаемость клеток определяли в тесте с трифенилтетразолием хоридом (МТТ-тест).

Токсикологические свойства допированного и недопированного наноселена определены в остром опыте на мышах при внутрибрюшинном и внутривенном введении. Для расчета показателя ЛД<sub>50</sub> использовали пробит-анализ по Миллеру и Тейнтеру.

Противоопухолевая активность НЧС изучена на животной модели канцерогенеза – у лабораторных мышей С57В<sub>1</sub><sub>6</sub> с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис: определяли динамику

роста опухоли, веса животного, интенсивность метастатического процесса на фоне курсового внутрибрюшинного введения допированных ЛХТ-17-19 и недопированных НЧС в дозах 5 и 10 мг/кг.

Для определения накопления в биологических жидкостях и тканях проводили определение концентрации селена в крови, печени и опухолевом узле на 21 сутки эксперимента методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Экспрессию генов – регуляторов стресса эндоплазматического ретикулума, гибели опухолевых клеток, паранеопластической воспалительной реакции определяли с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Протеомный анализ проводили методом вестрен-блот.

Статистический анализ полученных результатов выполняли методами вариационной и описательной статистики с использованием лицензионных программных пакетов SPSS и BioStat.

### **Личный вклад автора**

Диссертант совместно с научным руководителем выдвинул гипотезу работы, сформулировал научный вопрос, цель и задачи исследования; самостоятельно провел определение цитотоксичности на клеточной модели аденокарциномы легкого человека; лично выполнила постановку эксперимента по определению острой токсичности наноселена с расчетом токсикологических интегральных показателей; автор самостоятельно спланировала и провела все эксперименты по перевивке опухоли животным, введению НЧС и регистрации показателей эффективности; диссертант принимала включенное участие в выполнении молекулярного раздела работы и лично выполнила статистический анализ результатов, принимала самое деятельное участие в подготовке публикаций. Лично автор подготовила настоящую рукопись и автореферат диссертации.

### Положения, выносимые на защиту

1. Наночастицы селена имеющие сферическую форму, размеры по данным ПЭМ-изображений от 50 до 200 нанометров, с мономодальным распределением по размерам с максимумом 150 нанометров и полушириной 150 нанометров с пиком распределения дзета-потенциала, расположенным при значениях около -25 мВ, с содержанием в 1 мл коллоида  $1,4 \times 10^{13}$  наночастиц, обладают умеренной токсичностью при внутрибрюшинном и внутривенном путях введения у лабораторных мышей, при этом внутрибрюшинный путь может рассматриваться как биоэквивалент внутривенному. Допирование НЧС производным дигидроакридона ЛХТ-17-19 повышает острую токсичность наноселена, но снижает токсичность ЛХТ-17-19.

2. При инкубировании культуры аденокарциномы легкого человека А549 в присутствии наночастиц селена и при их внутрибрюшинном курсовом введении лабораторным мышам с экспериментальной сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис установлен самостоятельный противоопухолевый эффект наноселена, проявляющийся в подавлении роста клеток культуры, замедлении прогрессии роста опухолевого узла, предотвращении паранеопластической кахексии лабораторных животных и снижении метастазирования. Допирование наноселена соединением дигидроакридона ЛХТ-17-19 повышает противоопухолевую активность последнего при его курсовом введении при сравнении с аналогичным режимом введения чистой фармацевтической субстанции вещества.

3. В основе противоопухолевого эффекта наночастиц селена лежат дискоординация стресса эндоплазматического ретикулума, активация экспрессии и тканевого содержания факторов некроза опухолей альфа и бета, фактора CASP-1, снижение регуляции и тканевой концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-10, подавление экспрессии противоапоптотических сигнальных путей в клетках неоплазии и запуск

программы программируемой гибели, при этом, загрузка наноселена веществом с противоопухолевой активностью ЛХТ-17-19 приводит к росту экспрессии противовоспалительных цитокинов и одновременному снижению экспрессии антирадикальных ферментов.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, а именно п. 3. Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*; п. 5. Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток; п.7. Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности лекарственных средств. Изучение токсичности при однократном и многократном введении, включая оценку специфической токсичности и нежелательных побочных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие, иммунотоксичность и канцерогенность).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность положений и выводов диссертации основывается на выборе адекватных поставленным цели и задачам методов экспериментально-фармакологического исследования, использованием в работе валидированных клеточных и животных моделей немелкоклеточного рака легкого/альвеолярного рака человека и животного, признанных оценочных средств, достаточных для получения репрезентативных результатов объемов наблюдений и выполненных экспериментов, корректным методам фиксации

результатов, ведения базы данных диссертации и примененных методов медико-биологической статистики, сертифицированных животных, прошедших своевременную поверку приборов и аппаратов.

Диссертация выполнена при частичной финансовой и научно-методологической поддержке гранта Президента Российской Федерации для научной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3 «Разработка биологических *in vivo* платформ для изучения новых подходов к персонализированной терапии рака мочевого пузыря и немелкоклеточного рака легких» (2022-2023 гг.).

Основные научные и научно-практические результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, внедрены в учебную работу кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева», используются в работе научного семинара кафедр онкологии, кафедры фундаментальной медицины ИФИБ НИЯУ МИФИ, кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ИКМ им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Диссертационная работа заслушана и рекомендована к публичной защите на расширенном совместном межучрежденческом заседании кафедры кафедры фундаментальной медицины и лаборатории бионанопластики ИФИБ НИЯУ МИФИ, с участием докторов наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология – сотрудников, протокол №10 от 10.10.2025 г.

Результаты, нашедшие отражение в настоящей диссертации докладывались и обсуждались на 1st International Symposium Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine (Москва, 2017), XXXII Российский национальный конгресс "Человек и лекарство (Москва, 2025).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 9 научных работ, из них 2 – в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в издании, рецензируемом международной базой Scopus, 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций, 4 – в иных изданиях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация оформлена по традиционному плану, состоит из введения и шести глав: глава 1 – литературный обзор; глава 2 – материалы и методы исследования; главы 3-5 с собственными результатами исследования; глава 6 – заключение с описанием итогов работы и перспектив дальнейшего развития темы работы; выводов; практических рекомендаций; списка условных обозначений и сокращений; библиографического указателя.

Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 2 таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 210 работ, из которых 11 ссылок – на публикации отечественных и 199 – зарубежных авторов.

## **ГЛАВА 1. НАНОТЕХНОЛОГИИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

ЗНО остаются одними из наиболее фатальных заболеваний на планете. По данным Глобального отчета о ЗНО, подготовленного ВОЗ, в 2020 году в мире зафиксировано более 19,3 млн. новых случаев злокачественных опухолей и более 10 млн. смертей от них [20, 21]. Учитывая демографические процессы, изменения экологии, образа жизни населения ученые прогнозируют ускоряющийся рост заболеваемости онкологическими заболеваниями на горизонте будущих 20 лет [21]. Все это обуславливает острую необходимость в поиске новых эффективных способов борьбы с онкологическими заболеваниями. Конвенциональные методы лечения ЗНО, включающие лучевые методы, хирургическое лечение и классическую противоопухолевую химиотерапию безусловно сохраняют свою актуальность, будучи эффективными средствами первой линии у пациентов с первично-диагностированными опухолевыми процессами. Однако они теряют эффективность в случае возникновения рецидивов и появления рефрактерных форм заболевания [22].

Появление иммунобиологических лекарственных препаратов для лечения ЗНО явилось прорывным достижением мировой медицинской науки, однако клинические результаты применения препаратов антител оказались довольно скромными и частота положительного ответа опухоли – невелика [23]. Более важным оказалось то, что развитие терапевтического противоопухолевого эффекта при применении как классических противоопухолевых лекарственных средств, так и препаратов иммунобиологической терапии сопряжено с высоким риском клеточной и тканевой токсичности вследствие того, что эти виды фармакологических средств не являются таргетными – молекулярно-направленными видами воздействия. Напротив, поиск опухоль-специфических направленных систем

доставки противоопухолевых лекарственных средств, которые способны распознать клетку-мишень, специфически связаться с ней, накопиться в ткани в достаточной концентрации и произвести терапевтическое действие – предмет поиска множества научных групп во всем мире [23, 24,206-209].

За последние 3 десятилетия произошел чрезвычайный рост числа исследований в этой области (Рисунок 1) [25-42]. В мире были разработаны различные наночастицы, включая липидные наночастицы, полимерные наноносители, неорганические транспортные системы, которые позволяют доставлять внутрь клетки нуклеиновые кислоты, химиотерапевтические лекарственные средства, иммунобиологические агенты. За последние 2-3 года были одобрены для клинического применения не менее 15 новых лекарственных препаратов, разработанных на основе нанотехнологических методов. В настоящее время по данным международной базы данных ClinTrialsGov проводится более 200 клинических исследований новых нанотехнологических лекарственных препаратов. Однако, не смотря на это, до сегодняшнего дня ни один таргетных противоопухолевый лекарственный препарат не существует в форме нанотранспортной системы, и лишь 10 кандидатов в лекарственные препараты проходят клинические исследования (Таблица 1) [43-45]. Вместе с тем, последние результаты вселяют все больше надежд в то, что достижения нанотехнологий наряду с прогрессивным аккумулярованием сведений о природе злокачественных новообразований, могут привести к созданию эффективных и безопасных наноносителей, позволяющих избегать экстраопухолевой токсичности действующих веществ и эффективно бороться с опухолевым процессом путем тканевого, клеточного и органельного таргетирования [43-45,209].

Таргетирование опухолевой ткани достигается главным образом вследствие анатомо-физиологических особенностей кровеносных сосудов опухоли и локального внутритканевого иммунодефицита в структуре опухолевого микроокружения.

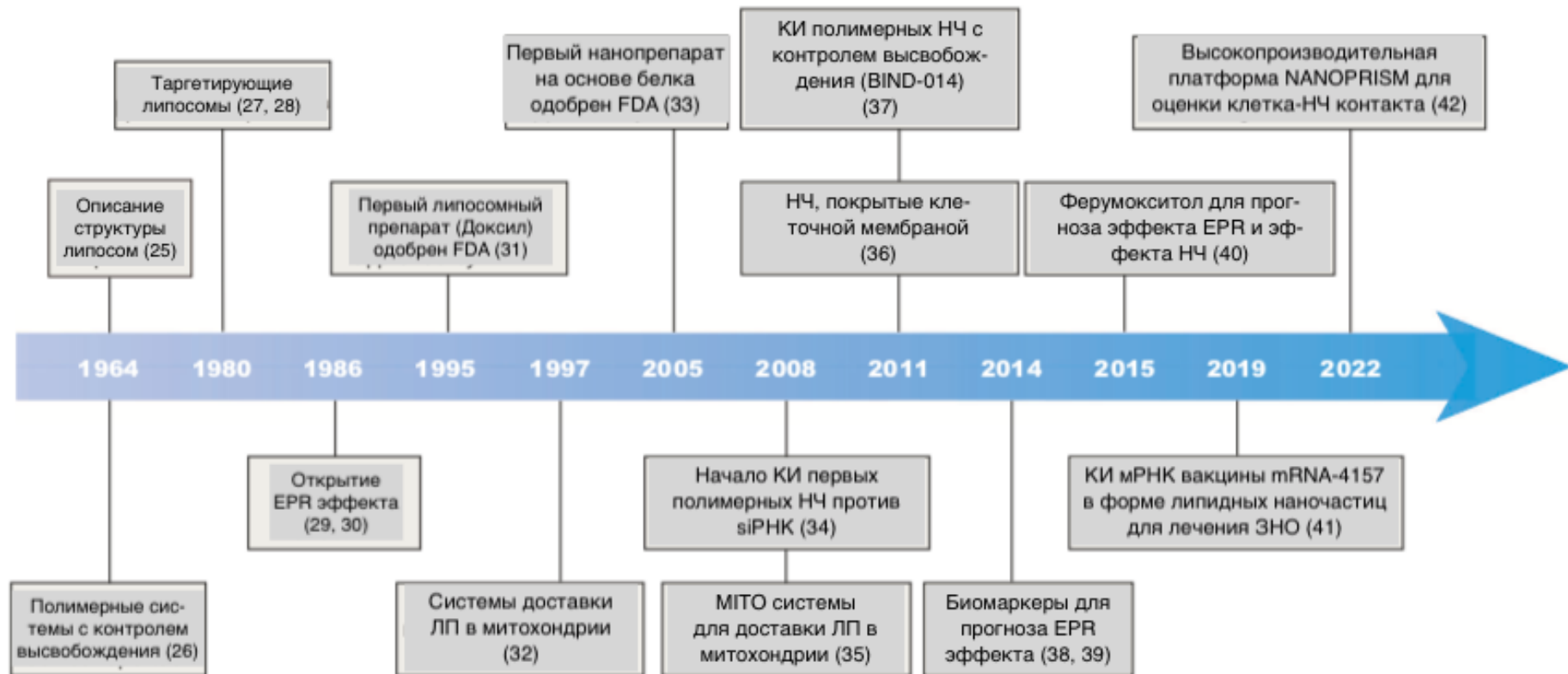


Рисунок 1 – История создания нанотехнологических подходов к терапии ЗНО, адаптировано по [20] в ред. автора

Таблица 1 – Клинические исследования наночастиц лекарственных препаратов молекулярно-направленного (таргетного) действия

Тип лиганда	Название	Лиганд	Мишень	Наноформа	Содержимое	Показание	Номер	Фаза
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Антитела	TagromiRs	Анти-EGFR биспецифическое антитело	EGFR	Minicell	Основанная на miR-16 микроРНК копия	Немелкоклеточный рак легкого, злокачественная мезотелиома	02369198	Первая
Фрагменты антитела	C225-ILs-DOX	Анти-EGFR Fab'	EGFR	Липосомы	Доксорубин	Солидные ЗНО	01702129	Первая
	MM-302	Анти-HER2 scFv	HER2	Липосомы	Доксорубин	РМЖ	01304797	Первая
	SGT-53	Анти-TfR scFv	TfR	Липосомы	Плазмида p53	Солидные ЗНО	00470613	Первая
						Рак поджел. железы	02340117	Вторая

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Фрагменты антитела	SGT-94	Анти-TfR scFv	TfR	Липосомы	Плазмида RB94	ЗНО урогенитальной локализации	01517464	Первая
	Липоваксим-ММ	Анти-DC-SIGN V <sub>H</sub>	DC-SIGN	Липосомы	Антигены меланомы и интерферон-гамма	Меланома	01052142	Первая
Протеины	MBP-426	Tf	TfR	Липосомы	Оксалиплатин	Солидные ЗНО	00355888	Первая
						Рак желудка метастатический Карцинома пищевода	00964080	Первая/ Вторая
	CALAA-01	Tf	TfR	Полимерные наночастицы	RRM2 siPHK	Солидные ЗНО	00689065	Первая

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Пептиды	2B3-101	GSH	GSH транспортер	Липосомы	Доксоруби- цин	РМЖ	01386580	Первая/ Вторая
	Rexin-G	Участок фактора фон Виллебран- да	коллаген	Ретровирус- ный вектор	dn-CCNG1	Остеосарко- ма	00572130	Первая
						Саркома	00505713	Первая
						Рак поджел. железы	00504998	Первая

Совокупность этих факторов обуславливает появления так называемого феномена повышенной проницаемости и удержания (Enhanced permeability and retention – EPR effect) [29, 46].

С момента открытия в 1986 году феномен повышенной проницаемости и удержания является краеугольным камнем для технологий нанотераностики [29, 43]. Начиная с первого допущенного к клиническому применению нанопрепарата доксил (пегилированная липосомальная форма доксорубицина) и заканчивая недавно получившим разрешение препаратом Arealea (мицеллярная форма паклитаксела) не менее 15 противоопухолевых нанолечебных форм рутинно применяющихся в клинической практике основаны на феномене повышенной проницаемости и удержания. Это подразумевает так называемое пассивное опухолевое таргетирование [47]. Вместе с тем феномен EPR чрезвычайно неоднороден. Его функциональные характеристики широко варьируют в зависимости от пациента, типа опухоли, первичной или метастатической природы неоплазии и даже стадии ЗНО у одного и того же пациента. Следовательно и степень аккумуляции и удержания наночастиц, обладающих противоопухолевым эффектом, также широко колеблется в зависимости от тех же самых обстоятельств [48]. В результате в мире было предложено несколько эффективных стратегий, позволяющих стандартизировать накопление и доставку наночастиц с противоопухолевым содержанием в тканях и клетках неоплазии с низким феноменом повышенной проницаемости и удержания. К таким стратегиям относятся описанные методы таргетирования сосудистой системы опухоли, клеточно-опосредованное опухолевое таргетирование, iRGD-опосредованная трансэндотелиальная экстравазация, опухолевая пенетрация и локорегиональная доставка [49-51].

И если первое поколение противоопухолевых нанолечебных форм создавалось для повышения накопления действующих веществ в ткани ЗНО и, тем самым, снижения экстранеопластической токсичности цитостатиков, то уже второе поколение антибластомных ЛП на основе нанотехнологий

преследовало своей целью добиваться селективной и эффективной клеточной интернализации с учетом целевой клеточной популяции: это направление можно обозначить: от тканевой к клеточно-специфической молекулярно-направленной терапии [52]. Клеточно-специфическое таргетирование достигается в настоящее время путем функционализации нанотранспортных систем при помощи антител или фрагментов антител, нуклеиновых кислот и их аптомеров, пептидов, углеводов, молекул низкой молекулярной массы. Указанные вещества селективно связываются со специфическими антигенами или рецепторами, экспрессирующимися на поверхности мембраны опухолевых клеток и опосредуют проникновение содержимого наночастиц внутрь целевой клетки [53]. Еще одной потенциальной возможностью повышения клеточной селективности является находящееся в центре внимания исследователей в последнее десятилетие биомиметическое таргетирование. Оно заключается в том, что наночастицы покрываются цитоплазматической мембраной опухолевых клеток, клеток крови или стволовых клеток. Это сообщает наночастицам возможность приобретать гомо- или гетеротипические адгезивные свойства и проникать внутрь опухолевых клеток [53, 54].

После успешной интернализации в опухолевую клетку необходимо последующее проникновение наночастиц с содержащимися в них действующими агентами как правило в органеллы клетки – митохондрии, ядро, лизосомы – для развития максимального терапевтического действия и избегания формирования лекарственной мультирезистентности опухолевых клеток [55-58]. Таргетирующие клеточные органеллы нанолекарственные формы относятся НЧ третьего поколения [59, 60].

Однако несмотря на значительный прогресс в области разработки наночастиц для адресной доставки противоопухолевых лекарственных средств, достигнутый в последние 3 десятилетия, очевидно, что структура с фиксированными размером, формой, физико-химическими свойствами, электрическим зарядом и т.д. будет способна одинаково эффективного

таргетировать опухоль на всех трех уровнях ее организации: тканевом, клеточном и органоидном [61-64]. Например, НЧ сравнительного большого размера (до 200 нм) как правило более эффективно способны к тканевому накоплению, тогда как наночастицы малого размера (до 20 нм) с положительным зарядом, как правило хорошо интернализируются и проникают в органоиды [64, 65]. В последние годы появляется все больше работ, описывающих результаты исследования модифицируемых наночастиц, способных под действием предложенных обстоятельств изменять размер, поверхностный заряд, что способствует многоэтапному опухолевому адаптивному таргетированию [65-67].

### **1.1 Нанотехнологии тканевого лекарственного таргетирования злокачественных новообразований**

За последние несколько десятилетий в мире были предприняты серьезные попытки улучшения целевой доставки наночастиц, несущих действующие противоопухолевые вещества, в ткань солидной неоплазии. В 1986 году японскими учеными Matsumura и Maeda впервые в мире показали, что некоторые макромолекулы в определенном диапазоне масс способны накапливаться в солидных злокачественных опухолях благодаря феномену повышенной проницаемости и удержания (Enhanced permeability and retention – EPR effect). Именно это открытие явилось началом эры нанотерапевтических подходов к лечению ЗНО [29]. По мере накопления новых знаний пришло понимание, что EPR эффект более сложен, чем предполагалось ранее. Его функциональные характеристики чрезвычайно широко варьируют в зависимости от пациента, морфологической и молекулярной гетерогенности опухоли, особенностей опухолевого микроокружения, а также физико-химических свойств самих наночастиц [48, 68].

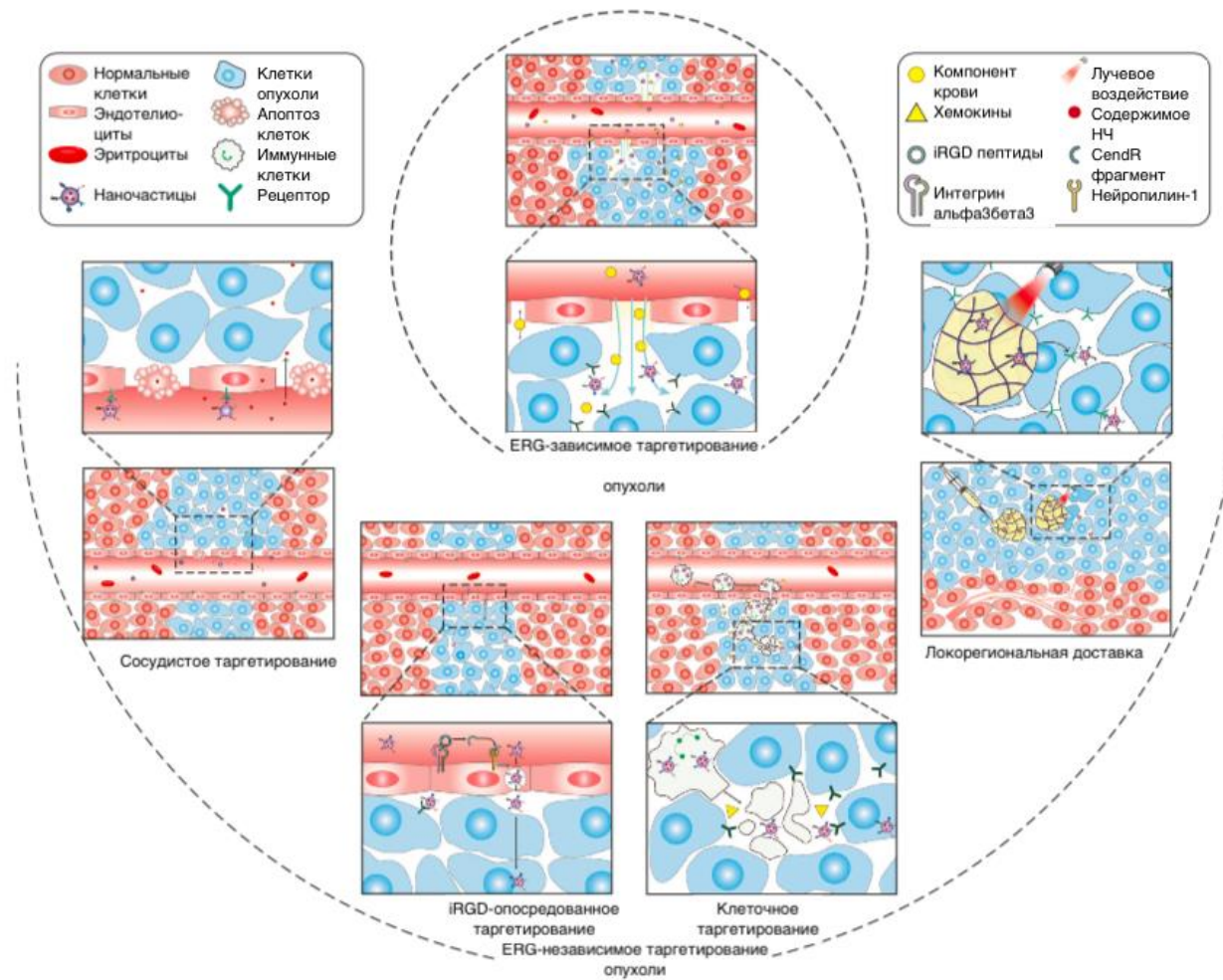


Рисунок 2 – Схематическое изображение механизмов EPR-зависимого и независимого опухолевого таргетирования, адаптировано по [20] в ред. автора

И хотя иногда с помощью применения некоторых вспомогательных технологий удастся использовать EPR эффект для адресной доставки наночастиц в область интереса у многих пациентов с ЗНО этот эффект не работает, что не позволяет осуществлять эффективное молекулярно направленное таргетирование (Рисунок 2) [69-71].

### **1.1.1 Пассивное воздействие наночастиц на опухоль с помощью EPR эффекта**

Одним из наиболее отличительных признаков злокачественности опухоли является быстрый и неконтролируемый рост неоплазии, для осуществления которого требуется огромное количество кислорода и нутриентов. При достижении опухолевого очага размера 1-2 мм существующие окружающие сосуды не способны обеспечивать нутритивную поддержку опухолевого роста, что создает предпосылки для формирования внутриопухолевого ангиогенеза [69, 70]. Формирующиеся опухолевые капилляры структурно представлены прерывистым слоем эндотелия, высокоперфорированной базальной мембраной: указанная анатомическая абнормальность предопределяет высокую проницаемость таких сосудистых элементов опухоли и облегчает экстравазацию молекул низкой молекулярной массы и высокомолекулярных соединений из просвета капилляров в толщу опухолевой ткани [71, 72]. Это один из элементов рассматриваемого эффекта – повышенная проницаемость.

В естественных условиях в нормальных тканях и неизмененных органах лимфатическая система осуществляет дренаж межклеточной тканевой жидкости, растворенных в ней солей, коллоидных веществ, в системную циркуляцию. В опухолевой ткани лимфатический дренаж неполноценен и зачастую перемещение тканевой жидкости и содержащихся в ней веществ нарушен или вовсе не осуществляется [71, 72]. И если вещества низкой молекулярной массы, водорастворимые молекулы и проч. Могут самостоятельно пассивно диффундировать в кровеносное русло, то

макромолекулярные вещества и наночастицы лишены такой способности в силу размера и физико-химических свойств, что обуславливает их накопление, задержку, в опухолевой ткани [73]. Это второй фундаментальный элемент EPR-эффекта, феномен накопления. Вместе с тем, функционирование и масштаб проявлений описанных феноменов может широко варьировать в результате особенностей взаимодействия опухолевых клеток и стромы опухоли, представленной клетками соединительной ткани, клетками иммунной системы и стромальными волокнами – коллагеном, эластином и др., а также нарушением регуляции продукции ангиогенных молекул (фактор роста эндотелия сосудов, гипоксия-зависимый фактор 1 альфа, брадикинин, оксид азота, пероксинитрит, простагландины, интерлейкины, интерфероны и др.) микроокружением опухоли [48, 74].

Таким образом, состояние, морфология опухоли и микроокружения, физико-химические свойства макромолекул и нанолекарственных форм обуславливают особенности реализации феномена проникновения и аккумуляции. Так, например, молекулы по размеру меньше 40 кДа (соответствуют наночастицам с гидродинамическим размером 5 нм) имеют невысокую продолжительность полужизни в системном кровотоке, так как быстро фильтруются почками. В это же время, наночастицы размером более 200 нм практически не способны к экстравазации даже через высокопроницаемые опухолевые капилляры. Следовательно, оптимальный размер для нанолекарственных форм, позволяющий им задерживаться в циркуляции для создания оптимальной концентрации в зоне опухолевого роста, может колебаться в диапазоне от 50 до 150 нм [75-77].

Помимо этого, как показали проведенные исследования наночастицы с высоким коэффициентом диспропорциональности и поверхностными искривлениями (палочковидные, дискоидальные, спиралевидные) способны в большей степени избегать фагоцитоза, сохраняться в периферическом кровотоке и аккумулироваться опухолевой ткани, чем нанолекарственные формы сферической геометрии [78, 79]. Большое значение для

внутриопухолевого накопления наночастиц и реализации феномена проникновения и задержки имеет их поверхностный электрический заряд. Наноформы с высоким положительным зарядом задерживаются в просвете капиллярного русла вследствие взаимодействия с высокой концентрацией отрицательно заряженных фосфолипидов. Отрицательно заряженные наночастицы быстро элиминируются из кровотока вследствие захвата селезенкой, печенью и почками. Следовательно, при конструировании наночастиц необходимо помнить, что они преимущественно должны быть положительно заряженными [80].

### 1.1.2 Гетерогенность EPR эффекта

Гетерогенность эффекта повышенной проницаемости и задержки обуславливает высокую неоднородность терапевтического эффекта нанолекарственных форм противоопухолевых лекарственных средств [68, 73]. Например, гепатоцеллюлярная карцинома и гипернефроидный рак обладают высокой плотностью опухолевых сосудов, в связи с чем EPR-эффект в этих опухолях реализуется в большей степени, чем в ткани карциномы поджелудочной железы и рака предстательной железы [81-84]. Большую роль играет также и то обстоятельство, что в тоще опухолевой ткани вследствие высокого давления и частого возникновения некроза ткани наблюдается полное нарушение васкулатуры, поэтому зачастую при назначении наноформ противоопухолевых лекарственных средств для терапии крупных опухолевых очагов можно рассчитывать лишь на EPR-эффект по периферии опухолевой ткани [81-85]. Также была доказана динамическая эволюция функциональной активности описываемого патофизиологического феномена. С применением лазерной конфокальной микроскопии удалось подтвердить периодическое открывание и замыкание сосудистых пор, через которые в определенные временные промежутки в

ткань опухоли поступали высокие объемы жидкой части содержимого кровеносных сосудов [85, 86].

### **1.1.3 Пути повышения эффективности тканевого таргетирования злокачественных опухолей**

Для преодоления функциональной неоднородности EPR-эффекта при назначении нанолекарственных форм противобластомных препаратов разработан целый ряд методов. К таковым можно отнести фармакологическое воздействие на внутриопухолевые сосуды путем введения вазоактивных и провоспалительных факторов – ангиотензина II, брадикинина, фактора некроза опухолей альфа. Физические методы воздействия включают радиотерапию, локальную гипертермию, сонопорацию (воздействие ультразвуком) [80].

Ангиотензин II является вазоконстриктором, который суживает просвет сосудов за счет прямого сократительного действия на гладкомышечные клетки в здоровых тканях [87]. Этот эффект не может быть реализован в опухолевой ткани в силу того, что опухолевые сосуды, как правило, лишены полноценной мышечной оболочки. Повышение пористости сосудов опухоли под действием этого агента носит вторичный характер и обусловлено повышением внутрисосудистого давления на фоне системной вазоконстрикции, а также перераспределения кровотока между капиллярами и кровоснабжающими опухоль сосудами. Все это приводит к активному перемещению жидкости в межклеточное опухолевое пространство [88]. Было показано, что ангиотензин II значительно повышает аккумуляцию наночастиц, содержащих противоопухолевые агенты в неопластических тканях вследствие системной вазоконстрикции не только в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных, но и при его введении пациентам с обширными опухолевыми поражениями [82, 89].

Брадикинин – вазоактивный пептид, вырабатываемый клетками калликреин-кининовой системы в ответ на развитие воспалительной реакции. Это биологически активное вещество расширяет капилляры, увеличивает эндотелиальные щели и повышает сосудистую проницаемость вследствие повышения образования оксида азота, простаглицлина и эндотелиального фактора гиперполяризации [90]. Было показано, что брадикинин присутствует в повышенных концентрациях в плазме крови, плевральном и перитонеальном выпоте онкологических пациентов. Также было установлено, что пептид играет ключевую роль в поддержании и оптимизации эффекта проникновения и удержания [91, 92].

В недавно проведенном исследовании Appiah и соавт. разработали кислотозависимый кополимер брадикинина P-ВК на основе N-(2-гидроксипропил) метакриламида (HPMA). Полученное вещество не только вдвое повышало период жизни брадикинина в плазме крови, но также приводило к кислотозависимым высвобождению и активации брадикинина в опухолевой ткани [93]. Введение P-ВК кополимера повышало в 1,4-1,7 раза внутриопухолевую перфузию, причем, эффект продолжался более 4 часов у лабораторных мышей с C26 опухолью. Предлечение P-ВК повышало селективную опухолевую аккумуляцию пегилированных липосомальных лекарственных форм доксорубина в 3 раза, что приводило к существенному росту противоопухолевой активности последних [93].

Фактор некроза опухолей альфа (ФНОальфа) представляет собой важный провоспалительный медиатор, преимущественно секретируемый активированными макрофагами и моноцитами [94]. Этот цитокин обладает быстрым вазодилатирующим эффектом, связанным не только с прямым сокращением актина элементов цитоскелета гладкомышечных клеток сосудов, приводя к ремоделированию в том числе и эндотелиальных клеток, но также вследствие повышения продукции реактивных форм кислорода (РФК) и модулирования экспрессии и таксиса молекул клеточной адгезии, таких как сосудистого эндотелиального катгерина, внутриклеточных молекул

адгезии (ICAM-1), сосудистых молекул адгезии (VCAM-1), тромбоцитарно-клеточных молекул адгезии (PECAM-1) и соединительных молекул адгезии (JAM) [94]. В недавно проведенном исследовании было показано, что введение ТНФальфа одновременно с мечеными радиоизотопной меткой наночастицами приводит к 10-кратному увеличению опухолеспецифической селективному накоплению последних в ткани ортотопической ксенографтной опухоли ЦНС у мышей по сравнению с введением только наночастиц [95].

Гипертермия также может повышать эффективность EPR-эффекта для нанолекарственных форм противоопухолевых лекарственных средств путем повышения сосудистой проницаемости. Эффект формируется вследствие повышения опухолевого кровотока и сосудистой проницаемости [96]. В частности на модели ксенографтного рака яичника у мыши со специально сформированным кожным лоскутом, позволяющим оценивать тканевой кровотоки, было показано, что при локальном в течение часа повышении температуры опухоли до 42<sup>0</sup>С непроницаемые для опухоли описываемой плотности липосомальные наночастицы размером 100 нм начинают беспрепятственно проникать в опухолевую ткань. Более того, размер липосом, способных к экстравазации в данных условиях увеличивался до 400 нм и даже более [97, 98]. Подобные же эффекты локальной гипертермии были подтверждены позднее на 4 мышинных опухолевых моделях с различным происхождением опухолевой ткани [99].

В последнее время все больше доказательств появляется в научной литературе о роли лучевой терапии в оптимизации эффекта проникновения и удержания вследствие изменения как морфологической структуры, так и функциональных особенностей кровеносных сосудов и окружающих тканей [100]. Так, было показано, что доза облучения 20 Гр за сутки до внутривенного введения значительно увеличивает накопление опухолевой тканью наночастицы кополимерной природы двух различных размеров – 31 и 65 кДа [101]. В другом исследовании было показано, что лучевое

воздействие дозой 15 Гр за сутки до введения приводило к снижению внутриопухолевого давления и повышению проницаемости сосудов в два раза, что способствовало значительному накоплению наночастиц оксида железа опухолевой тканью [102]. В недавно опубликованной работе было показано, что в основе лучевого эффекта по повышению накоплению наночастиц лежит участие активированных макрофагов, ассоциированных с опухолью [103]. Это, как было установлено при применении прижизненной микроскопии высокого разрешения, происходит вследствие миграции под действием радиации активированных макрофагов и их накопление в периваскулярном пространстве. Клетки повышают проницаемость сосудов, в том числе и для наночастиц [103].

Еще одним действенным механизмом временного повышения проницаемости клеточных мембран или сосудистой стенки является сонопорация – микродеструкция липидных оболочек вследствие образующегося под действием ультразвукового воздействия эффекта микрокавитации [104]. Было предложено применять этот метод для повышения проницаемости наночастиц в опухолевую ткань. Было, в частности, показано, что повышение порозности опухолевых сосудов под действием ультразвука приводит к повышению аккумуляции липосомального доксорубина тканями 9L глиобластомы, имплантированной в головной мозг кроликов, что сопровождалось замедлением роста опухоли и повышением выживаемости [105]. В недавно завершившемся исследовании Lee с соавторами показали, что использование ультразвука совместно с наночастицами человеческого альбумина, загруженными доксорубином, в комплексе с хлористыми микролипосомами (DOX-NPs/Сe6MB) не только улучшает экстравазацию нанолекарственных форм из сосуда, но и повышает проницаемость тканей опухоли для комплекса, что сопровождалось улучшением терапевтического эффекта липосомальных наночастиц [106].

### **1.1.4 Альтернативные стратегии повышения эффективности воздействия наночастиц на опухолевую ткань**

Одним из наиболее изученных путей повышения эффективности воздействия нанолекарственных форм на опухолевую ткань является сосудистая сеть опухолевого микроокружения. Поскольку, как хорошо известно, для обеспечения растущих потребностей опухоли в кислороде и нутриентах, неоплазия создает сеть новых кровеносных сосудов в результате активации неоангиогенеза, разрушения этих самых сосудов может рассматриваться в качестве надежной терапевтической опции. На поверхности эндотелия опухолевых сосудов наблюдается гиперэкспрессия ряда биологически активных молекул, среди которых рецепторы эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), интегрины и др. Для направленного воздействия на эти клетки необходимо использование загруженных действующими веществами наночастиц, которые в своей структуре несли бы активные фрагменты, сопряженные с гиперэкспрессируемыми молекулами на мембране сосудистых клеток [107].

Наиболее действенным регулятором опухолевого ангиогенеза является эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), его рецепторы (в частности, A) и циркулирующие в крови лиганды – активаторы рецептора – VEGF<sub>121</sub> и VEGF<sub>165</sub> [108]. Так, было установлено, что VEGF<sub>121</sub>-конъюгированные мезопоровые кремниевые наночастицы, загруженные ингибитором рецепторной тирозинкиназы сунитинибом, при их введении мышам – носителем ксенографтной глиобластомы – демонстрируют лучшие результаты по влиянию на размер опухоли и выживаемость животных по сравнению с подобными нанолекарственными формами без VEGF<sub>121</sub>-конъюгации [109]. В подобных исследованиях с VEGF<sub>121</sub>-конъюгированным функционализированным оксидом нанографена была продемонстрирована лучшая проницаемость наночастиц в сосудистое русло опухоли, позволившая осуществить ее более полноценную и глубокую визуализацию

[110]. В недавно проведенном исследовании было показано, что мезопоровые кремниевые наночастицы, загруженные  $^{131}\text{I}$  изотопом иода, селективно таргетировали сосудистое русло ксенографтной человеческой анапластической карциномы щитовидной железы у мыши и, тем самым, приводили к существенному увеличению выживаемости животных по сравнению с обычными подобными нанолекарственными формами [111].

Еще одним фактором, играющим значительную роль в опухолевом неоангиогенезе, является интегрин [112]. Этот пептид специфически распознает пептидную последовательность аргинин-глицин-аспарагиновая кислота, что может быть использовано при разработке селективных, направленно действующих наночастиц [113, 114]. Было показано, что применение циклических, содержащих описанный пептид функционализированных наночастиц, загруженных доксорубицином, позволяет в 15 раз повысить антиметастатическое действие доксорубицина на ортотопической модели почечноклеточного рака без развития явных нежелательных эффектов [115].

Эти научные находки вдохновили других ученых на применение аргинин-глицин-аспарагиновая кислота-конъюгированных наночастиц на основе полилактогликолевой кислоты, которые селективно связываются с экспрессируемой на поверхности эндотелия молекулой интегрина и приводят к повышению противоопухолевой активности паклитаксела у мышей с ксенографтной опухолью по сравнению с животными, получавшими в качестве терапии паклитаксел в нанолекарственной форме, не ассоциированной с рецепторным полипептидом [116]. Подобная наноформа была разработана для радиоимиджинга, в процессе которого наночастицы загружались  $^{64}\text{Cu}$  изотопом меди, а также для селективной доставки сунотинина в составе мезопоровых наночастиц [117].

Эндоглин, структурный компонент макромолекулы трансформирующего фактора роста бета, селективно подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток [118, 119], вследствие чего молекула

представляет собой многообещающий таргет для направленного противоопухолевого воздействия [120]. Используя химерное анти-CD105 моноклональное антитело в качестве взаимодействующего элемента, Cai с соавторами разработали серию эндоглин-направленных наночастиц для позитронно-эмиссионной томографии и в качестве контейнеров для загрузки действующих веществ лекарственных препаратов и получили целую серию превосходных экспериментальных результатов на мышинных моделях канцерогенеза [121-126].

## **1.2 Клеточно-направленные стратегии воздействия на опухоль при помощи наночастиц**

Клеточные стратегии при планировании реализации противоопухолевого эффекта нанолечебных форм препаратов подразумевают либо прикрепление наночастиц на поверхность цитоплазматической мембраны, либо проникновение внутрь живой клетки, взаимодействующей с опухолевыми клетками. Эта стратегия основывается, главным образом, на использовании клеток иммунной системы или периферической крови (лимфоциты, лейкоциты, стволовые клетки и эритроциты) [127] (Рисунок 3).

Моноциты и макрофаги представляют собой самую изученную клеточную популяцию как компонент клеточно-направленной и клеточно-опосредованной стратегии повышения эффективности лекарственных препаратов, использующих наноносители. Это связано с тем, что: а) упомянутые клетки мигрируют в результате хемоаттрактантного градиента в область острой или хронической воспалительной реакции, в том числе, в опухолевую ткань; б) способны перемещаться вглубь регионов опухолевой ткани, находящейся в состоянии гипоксии, что недоступно для лекарственных препаратов в силу отсутствия васкуляризации этих областей, и в) способны поглощать микроразмерные вещества, организмы с помощью явлений

фагоцитоза, что позволяет использовать его для загрузки клеток соответствующими наночастицами [128].

В литературе имеются многочисленные сообщения об успешной интернализации наночастиц в макрофаги / моноциты для лечения солидных злокачественных новообразований: в частности, полилактогликолактоновые наночастицы, загруженные доксорубицином, загруженные тем же препаратом наночастицы оксида графена, липосомальные наночастицы, хитозановые мицеллы показали обнадеживающие результаты на по энкапсулированию в мононуклеары крови и повышению аккумуляции в опухолевой ткани [129-132].

Другие лейкоциты, такие как нейтрофилы и Т-клетки, также довольно широко используются в качестве носителей наночастиц лекарственных препаратов. Нейтрофилы – самая многочисленная клеточная популяция лейкоцитов циркуляции широко представлена в составе опухолевого микроокружения [133]. Вследствие природной способности проникать через гемато-энцефалический барьер нейтрофилы являются многообещающим транспортным средством для лечения внутричерепных опухолей, в частности, опухолей центральной нервной системы [134, 135].

В одном из недавно проведенных исследований применение липосомальной формы паклитаксела для загрузки нейтрофилов сопровождалось многообещающими результатами по терапии глиобластомы у мышей [136]. Также нейтрофилы удобно использовать для доставки в опухолевую ткань короткоживущих контрастных веществ для магнитно-резонансной визуализации опухолевого процесса [137]. Следует обратить внимание, что эффективность такого способа доставки прямо коррелирует с презентацией нейтрофилов в опухолевой ткани [137].

Т-клетки, будучи критически важной субпопуляцией лейкоцитов, играют центральную роль в противоопухолевой защите организма.

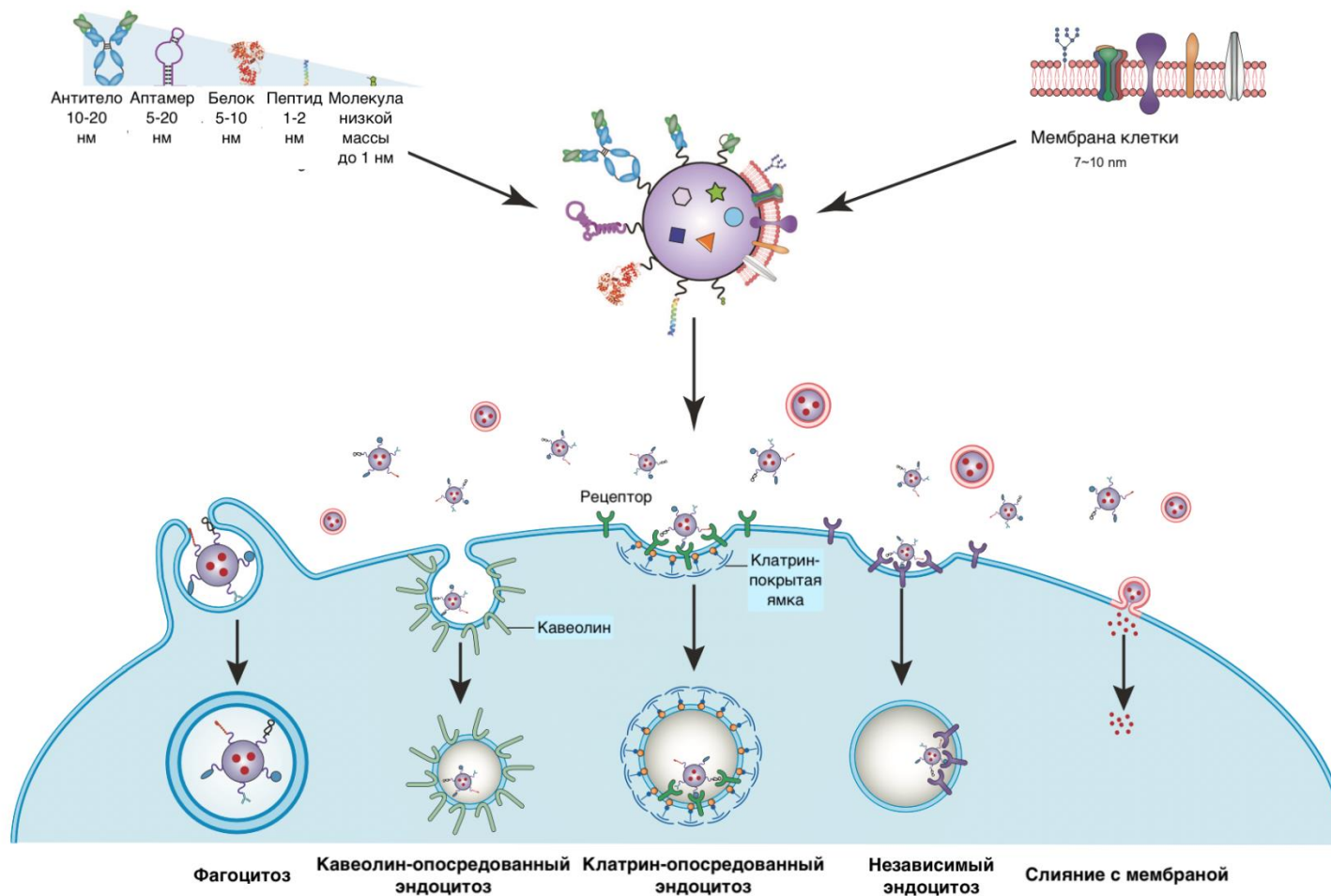


Рисунок 3 – Механизмы клеточно-ассоциированного противоопухолевого действия наночастиц, адаптировано по [20] в ред. автора

T-клетки способны не только самостоятельно непосредственно убивать клетки опухоли, но и делать это опосредованно через активацию других элементов иммунной системы посредством секреции цитокинов [138]. Средства иммунотерапии на основе T-клеток представляют собой одно из самых мощных направлений антибластной терапии в настоящее время [139].

Несмотря на это, ограничение в виде снижения активности трансплантированных T-лимфоцитов вследствие агрессивной реакции собственного опухолевого микроокружения и снижения интенсивности стимулирующих сигналов, требует продолжения исследований в этой области [140].

Эффективность противоопухолевой иммунотерапии может быть существенно повышена путем использования T-клеток в качестве лекарственных транспортеров. В одном из недавно проведенных исследований был использован наногель, содержащий суперантагонист-комплекс интерлейкина-15, который был конъюгирован с поверхностью T-клеток и мигрировал вместе с транспортирующими клетками в толщу солидной опухоли. В опухолевой ткани под действием активации рецепторов T-лимфоцитов комплекс высвобождался и приводил к 15-16-кратному повышению популяции T-лимфоцитов в опухолевой ткани по сравнению с внутривенным введением неконъюгированного комплекса [141]. Применение описанной технологии в производстве CAR-T клеток позволило повысить эффективность клеточной терапии солидных опухолей в эксперименте у мышей, что явилось существенным шагом вперед в прогрессе терапии ЗНО [141, 142].

### **1.2.1 Стволовые клетки – носители противоопухолевых наночастиц**

В последние годы стволовые клетки также пристально рассматриваются в качестве носителей нанолечекарственных форм

противоопухолевых препаратов, обеспечивающих адресную доставку лекарства к клеткам опухоли [143-145]. Wang с соавторами показали, что загрузка содержащих доцетаксел полилактогликолевых наночастиц мезенхимальных стволовых клеток способствует повышению накопления наночастиц в ткани карциномы легкого с развитием эффекта от 1/8 доза доцетаксела в таком виде по сравнению с терапевтической дозой препарата при традиционном способе доставки [144]. Конъюгация полистереновых наночастиц с мембраной нейрональных стволовых клеток с помощью биотин-стрептавидинового комплекса повышала накопление нанолекарственной формы в ткани глиомы [146]. Подобный технологический подход с использованием загруженных наночастиц доцетакселом повышал эффективность терапии тройного негативного ортотопического ксенографтного рака молочной железы у иммунодефицитных мышей [147].

### **1.2.2 Эритроциты как система доставки нанолекарственных форм противоопухолевых препаратов**

Поскольку эритроциты являются по своему функциональному назначению биологическими транспортерами (участие в обмене газами), эта клеточная популяция наиболее часто используется в качестве носителя для адресной доставки лекарственных препаратов в область патологического процесса [148]. Поскольку они экспрессируют на мембране CD47 рецепторы, они не подвергаются иммунному клиренсу, что позволяет им существовать до 120 суток в циркуляции [149, 150]. Было показано, что загрузка эритроцитов комплексом доксорубин – альбумин бычьей сыворотки сопровождается адресной доставкой препарата к опухолевым тканям и повышением эффективности лечения опухолевого процесса [151].

Помимо органических эритроциты могут быть загружены и неорганическими наночастицами, например магнитными частицами оксида железа. В частности, на основе эритроцитов как носителей был создан

сложный комплекс, содержащий наночастицы оксида железа, позволявший проводить прецизионное планирование хирургического вмешательства по поводу метастатического опухолевого поражения [152]. В недавнем исследовании Зелепукин и соавторы показали высокую эффективность нанофармакоцитов в терапии метастатического поражения легких при агрессивной меланоме [153].

За последнее десятилетие был достигнут определенный прогресс в разработке так называемых RGD-содержащих пептидов или интернализирующих пептидов (iRGD), которые облегчают накопление терапевтических веществ в опухолевой клетке при помощи механизма трансцитоза (Рисунок 4) [154]. Механизм описываемого процесса связан с тем, что первично интернализирующий пептидный комплекс связывается с опухолевой клеткой посредством альфа-бета интегрина, активизирует протеолитическое отщепление от полипептидного комплекса фрагмент CRGDK/R, который соединившись с нейропилином-1 активирует пенетрацию тканей. Вследствие этих уникальных способностей пептид часто применяется для опухолеспецифической доставки нанолекарственных средств в современной нанофармакологии. Liu с соавторами показали, что применение пептидного комплекса в составе бислойных кремниевых наночастиц (силикасомы) повышает эффективность экспериментальной терапии ксенографтного рака поджелудочной железы у лабораторных мышей [155, 156].

Кроме того, недавно в научной периодике появились сообщения о преимуществах указанного пептидного комплекса на поверхности эритроцитов по сравнению с квантовыми точками в экспериментальной терапии рака поджелудочной и молочной желез на ксенографтных мышинных моделях заболеваний [157] (Рисунок 4).

Также было показано, что применение пептидного комплекса облегчает проникновение в опухолевые ткани наночастиц, загруженных доксорубицином и индоцианином путем эндоцитоза [158, 159].

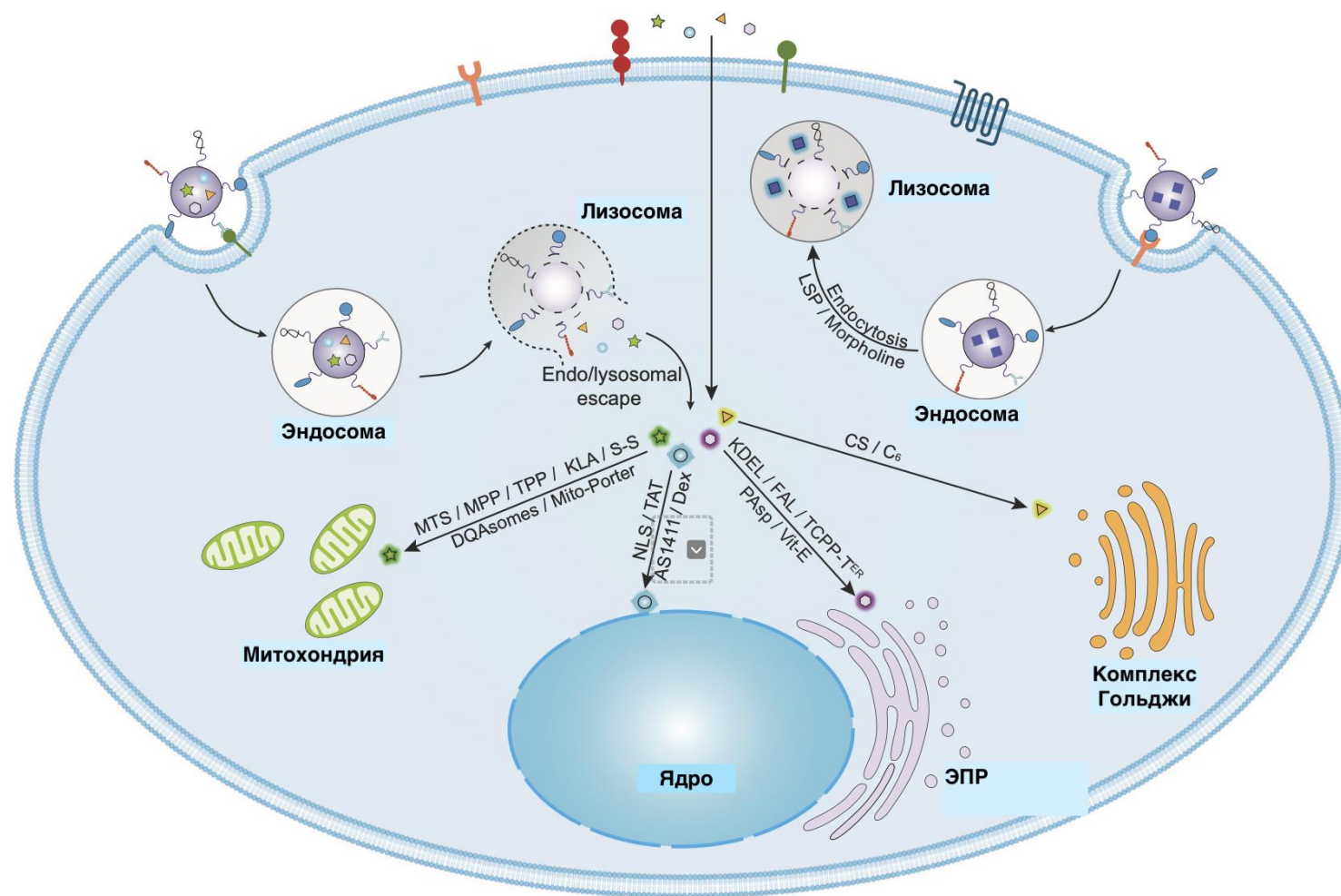


Рисунок 4 – Механизмы внутриклеточного распределения средств направленного транспорта противоопухолевых лекарственных средств, адаптировано по [20] в редакции автора

В недавнем исследовании на примере пролекарства тиропазамина была показана способность функционализированных конъюгированных с пептидным комплексом наночастиц и к внутриопухолевой дистрибуции [160].

Следовательно, разработка и изучение эффективных и безопасных подходов к направленной доставке противоопухолевых лекарственных средств является актуальной стратегией повышения результатов борьбы с онкологическими заболеваниями и отвечает современному технологическому развитию онкофармакологии, что и обуславливает своевременность и значимость настоящего диссертационного исследования.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поскольку основной целью настоящего исследования было определение противоопухолевого потенциала новой формы направленной фармакотерапии опухолевого процесса мы воспользовались комплексным междисциплинарным методологическим подходом при планировании диссертационной работы. В связи с этим помимо традиционных методов экспериментальной фармакологии привлекли для решения поставленных задач также методы молекулярной биологии и биофизики, что, с нашей точки зрения вполне оправдано.

### 2.1 Общий план проведения работы

На Рисунке 5 представлена схема выполнения диссертационной работы.

Для определения острой токсичности наночастиц селена в неизменном виде и на фоне допирования провели острый токсикологический эксперимент на белых лабораторных мышах обоего пола с определением показателя ЛД<sub>50</sub> при внутрибрюшинном и ЛД<sub>100</sub> при внутривенном введении.

Для анализа противоопухолевой активности использовали экспериментальную сингенную модель гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис, который перевивали мышам линии C<sub>57</sub>B16J. Наночастицы селена, в неизменном виде и допированные ЛХТ-17-19, вводили внутрибрюшинно в двух дозах с оценкой динамики опухолевого роста, динамики веса животных, метастазирования опухоли.

На различных этапах экспериментального воздействия на носителей опухоли в крови, печени и опухолевой ткани определяли концентрацию наночастиц методом атомной абсорбционной спектроскопии.



Рисунок 5 – Общий план выполнения диссертационного исследования диссертационной работы

Для оценки влияния инновационных нанолекарственных форм на паранеопластический воспалительный процесс оценивали уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в опухолевой ткани методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (рвПЦР). Этот же метод применяли для определения экспрессии мРНК проапоптотических генов и генов – ингибиторов программируемой гибели клеток.

Протеомное подтверждение молекулярно-генетических находок проводили методом вестерн-блоттинга.

Анализ результатов исследования выполняли методами вариационной статистики с использованием средней арифметической и стандартного отклонения в качестве интегральных величин для характеристики совокупностей после проверки нормальности распределения и уровня дисперсии. Сравнительный анализ осуществляли с помощью параметрических и непараметрических критериев. Непрерывные переменные сравнивали с помощью метода анализа вариантов (ANOVA), тогда как дискретные величины сравнивали с помощью точного критерия Фишера. Значимость различий принимали при значении вероятности ошибки менее 5%.

## **2.2 Следование биоэтическим требованиям при выполнении диссертационной работы**

Протокол исследования был рассмотрен и одобрен на заседании Локального этического комитета Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (12.12.2024, протокол № 02-2024).

Все манипуляции с лабораторными животными выполнялись в лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований ИФИБ ФГАОУ ВО НИЯУ МИФИ в полном соответствии с требованиями международных и национальных актов о гуманном обращении с лабораторными животными, в частности, Решения Совета Евразийской

экономической комиссии от 3 ноября 2026 года №78 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза», ГОСТа 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт Российской Федерации), ГОСТа Р 56701-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств» (Национальный стандарт Российской Федерации), ГОСТа 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits»), Директивы Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. 86/609/ ЕЕС о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

На всех этапах проводимого животного эксперимента контролировали возможность развития болевого синдрома, поэтому все болезненные манипуляции осуществляли под ингаляционной анестезией препаратом Изофлуран ветеринарный (Германия) на аппарате ИВЛ Ugo Basile (Италия) с наркозной приставкой RWD (Китай).

У лабораторных мышей-опухоленосителей использовали лицевую шкалу боли. При болевом синдроме умеренной и средней тяжести животным внутрижелудочно с помощью специального зонда для кормления вводили суспензию, содержащую 150 мг/кг кетопрофена (субстанция Merck SIGMA-Aldrich) [161, 162]. При отсутствии эффекта кетопрофена и формировании инкурабельного тяжелого болевого синдрома животные выводились из эксперимента под ингаляционной анестезией.

## **2.3 Физико-химическая характеристика наночастиц селена и способ введения. Лекарственная форма сравнения**

В работе изучены наночастицы селена (НЧС, SeNP), синтезированные в федеральном государственном бюджетном учреждении науки федеральном исследовательском центре «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук».

### **2.3.1 Метод синтеза наночастиц селена**

Синтез НЧС осуществлялся руководителем Центра биофотоники д.б.н. С.В. Гудковым методом лазерной абляции 99,99% поликристаллической селеновой мишени в деионизированной (18 МОм × см) воде. Для синтеза наночастиц использовалась классическая схема лазерной абляции твердой мишени в жидкой среде. Первоначально стеклянная кювета объемом 50 мл заполнялась деионизированной водой со слоем жидкости толщиной 2-3 мм, разделяющим воду от поверхности мишени. В качестве источника излучения использовался импульсный лазер Nd:YAG NL300 (Ekspla, Литва) с длительностью импульса 4 нс, частотой повторения 1 кГц, длиной волны 532 нм и энергией импульса 1,5 мДж. Дополнительно использовались гальванометрический сканер LScanH (Ateco-ТМ, Россия) и линза F-Theta с фокусным расстоянием 90 мм для перемещения сфокусированного пучка излучения по поверхности мишени с целью увеличения выхода наночастиц. Траектория луча состояла из нескольких параллельных линий, которые были вписаны в квадрат 1×1 см. Разрешение рисунка линии составляло 70 линий на миллиметр. Размер пятна в фокусе составлял 400 мкм, а скорость движения луча — 3000 мм/с. Процесс абляции длился примерно 15–20 минут.

### **2.3.2 Общая характеристика наночастиц селена**

Для получения изображений частиц и изучения их морфологии использовался просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) Libra200 FE HR (Carl Zeiss, Йена, Германия). Для подготовки наночастиц селена для анализа в позитронно-эмиссионном микроскопе (ПЭМ) использовались золотые микроскопические сетки. Анализ проводился, как описано ранее [163, 164]. Кристаллическая структура наночастиц селена изучалась с помощью рентгеновского дифрактометра Bruker AXS P4 (Bruker, США). Для изучения распределения размеров наночастиц, концентрации наночастиц и их электрокинетического потенциала применялся анализатор частиц Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Великобритания) с методом динамического рассеяния света (DLS). Измерения проводились в стандартной одноразовой кювете Malvern, электрокинетический потенциал определялся в многоразовой двухэлектродной кювете Malvern согласно [165]. Спектры поглощения коллоидных растворов SeNP исследовали с помощью волоконного спектрометра USB3000T (Ocean optics, США). Спектры поглощения измеряли в кварцевых кюветах объемом 3 мл, длина оптического пути составляла 1 см. В качестве реперных спектров использовали спектры поглощения деионизированной воды.

### **2.3.3 Допирование наночастиц селена. Фармакологические особенности введения наночастиц селена**

Допирование наночастиц селена производным дигидроакридона ЛХТ-17-19 проводилось в лаборатории инженерно-технического института биомедицины НИЯУ МИФИ методом магнитной диффузии. Субстанция с чистотой более 98% для загрузки наночастиц была любезно представлена разработчиками из отдела химии, технологии синтетических лекарственных

средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна Московской области).

Полученная водная форма недопированных наночастиц селена и НЧС, загруженных соединением ЛХТ-17-19, вводилась животным при изучении острой токсичности внутривенно и внутрибрюшинно, при исследовании противоопухолевого потенциала – внутрибрюшинно в объемах, не превышающих 1 мл в соответствии с видовыми предельными требованиями к объемам вводимых жидкостей в зависимости от пути введения у лабораторных животных [166].

В качестве препарата сравнения, исходя из общей концепции работы об изучении средств направленной доставки, использовали наноструктурированный цисплатин в виде липосомальной его формы. Использовали цисплатин липосомальный – препарат «Липоплатин» 3 мг/мл, во флаконах по 50 мл (компания «Регулон», Греция). Препарат вводили лабораторным животным внутрибрюшинно в объеме, не превышающем 1 мл, в дозе 12 мг/кг, что соответствует 1% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для мышей при описываемом пути введения, ранее [167]. Для сравнения использовали литературные данные об острой токсичности и терапевтической активности соединения дигидроакридона ЛХТ-17-19, полученные М.Ю. Кудрявцевым и Е.А. Самышиной [18, 19].

#### **2.4 Методы исследования с участием лабораторных животных**

В нашей работе лабораторные животные использовались в токсикологическом эксперименте, а также в опытах по воспроизведению сингенной опухолевой модели аденокарциномы легкого. Для токсикологического эксперимента использовали беспородных белых лабораторных мышей обоего пола весом 18-20 г, приобретенных в питомнике «Столбовая» – филиале ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России. Для онкофармакологического эксперимента

использовали линейных мышей-самцов C<sub>57</sub>B16J, приобретенных в питомнике SPF-животных – филиале ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова Российской академии наук в г. Пущино.

В таблице 2 представлено распределение и численность животных в зависимости от вида исследования и метода.

Таблица 2 – Распределение животных по видам экспериментальных исследований

Группа животных	Вид животных	Общее число животных	Интервенция	Перечень исследований
1	2	3	4	5
Определение острой токсичности	Беспородные белые мыши	140	Внутри-брюшинное введение НЧС	Общее состояние, гибель
	Беспородные белые мыши	6	Внутривенное введение НЧС введение допированных НЧС+ ЛХТ-17-19	Общее состояние, гибель
Исследование противоопухолевого действия	Мыши-самцы C <sub>57</sub> B16J	6	Внутри-брюшинное введение НЧС в дозе 5 мг/кг	Продолжительность жизни, динамика веса тела и массы опухоли,
		6	Внутри-брюшинное введение НЧС в дозе 10 мг/кг	молекулярно-генетическое

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	Мыши-самцы C <sub>57</sub> B16J	6	Внутри- брюшинное введение НЧС в дозе 5 мг/кг + ЛХТ-17-19	исследование, протеомный анализ
		6	Внутри- брюшинное введение доксорубицина липосомального в дозе 0,15 мг/кг	Продолжи- тельность жизни, динамика веса тела и массы опухоли

При изучении острой токсичности в состав каждой группы включали не менее 5-6 лабораторных грызунов. При определении противоопухолевого потенциала наночастиц селена группы формировали из 6 животных в каждой для получения репрезентативных данных.

Содержание лабораторных грызунов до момента начала экспериментального исследования осуществляли в виварии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» в соответствии с имеющимся соглашением о научно-практическом сотрудничестве. После включения животных в эксперимент мышей, на которых изучали острую токсичность для 14-суточного наблюдения возвращали в виварий, животных с перевитой опухолью помещали в индивидуальные вентилируемые клетки лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований ИФИБ ФГАОУ ВО НИЯУ МИФИ для лабораторного наблюдения за канцерогенезом.

Животные содержались в виварии в соответствии с ГОСТом 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits») при естественном освещении, влажности воздуха 50-55%, температуре 21-23<sup>0</sup>С. Для кормления животных применяли смесь гранулированного сухого корма специальной рецептуры производства ООО «Лабораторкорм» (Москва) и водопроводную воду. Доступ к корму и воде не ограничивали за исключением суток накануне включения животного в исследование.

Выведение лабораторных животных из эксперимента осуществляли под ингаляционной анестезией препаратом Изофлуран ветеринарный (Германия) на аппарате ИВЛ Ugo Basile (Италия) с наркозной приставкой RWD (Китай) методом вертебральной дислокации.

#### **2.4.1 Методы определения острой токсичности при внутрибрюшинном и внутривенном введении**

Острая токсичность изучена у белых беспородных лабораторных мышей весом 18-20 г в остром эксперименте. Для определения острой токсичности при внутрибрюшинном введении после исходного взвешивания и оценки общего состояния и поведения животному вводили внутрибрюшинно наночастицы селена, в том числе допированные ЛХТ-17-19 в фиксированной дозе и в объеме, не превышающем 1,0 мл.

Каждую концентрацию наночастиц в единице объема в порядке возрастания вводили группе мышей, включавших 2-3 самца и 2-3 самки (общее количество – 5 голов в группе), начиная с предельной концентрации, которая не вызывала гибели ни одного животного в группе до концентрации, которая приводила к гибели всех животных. Наблюдение за выжившими

мышами проводили в течение 14 суток, в течение которых регистрировали внешний вид грызунов, их общее состояние, особенности поведения. Расчет показателя  $LD_{50}$ , отражающего дозу, приводящую к гибели половины животных в группе, проводили методом Миллера и Тейнтера с помощью оригинальной разработанной программы.

Для определения острой токсичности при внутривенном пути введения была составлена 1 группа животных, включавшая 3 самца и 3 самки. Животным под ингаляционной анестезией осуществляли доступ к хвостовой вене, которую подключали к программируемому микроинъектору производства Kent Scientific Corp. (США). Животное помещали на подогреваемую площадку и перемещали в систему для неинвазивной регистрации ЭКГ.

При непрерывной регистрации ЭКГ с выводом ее на монитор начинали внутривенное введение наночастиц селена. Введение прекращали при наступлении асистолии продолжительностью более 20 с. Рассчитывали среднюю арифметическую введенной дозы на основании проведенных 6 экспериментов. Показатель соответствовал значению  $LD_{100}$  у мышей при данном пути введения.

#### **2.4.2 Метод исследования противоопухолевого эффекта наночастиц селена в эксперименте на мышах**

Мыши содержались отдельно, в стерильных условиях, в индивидуально вентилируемых полиуретановых клетках в виварии Сеченовского Университета и лаборатории молекулярно-клеточных технологий и экспериментальных исследований ИФИБ ФГАОУ ВО НИЯУ МИФИ. Клеточная линия сингенной гетеротопической аденокарциномы легкого C<sub>57</sub>Bl/6 (Льюис) была получена из Биобанка Института экспериментального канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Культированные в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) клетки инокулировали подкожно в левую заднюю лапу мыши в концентрации  $10^6$  клеток на мышь [168, 169]. На 5-й день мыши были случайным образом разделены на 4 группы ( $n = 6$  в каждой группе): мышам в 4 группах вмешательства внутрибрюшинно вводили SeNP в дозе 10 мг/кг и 5 мг/кг, НЧС + ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг, солюбилизованные в стерильном физиологическом растворе животные в контрольной группе получали тот же объем физиологического раствора. Размер выборки определялся с учетом необходимой статистической мощности, а также минимизации количества животных, используемых в экспериментальном исследовании. Инъекции НЧС выполнялись один раз в день в течение 14 дней (день 5 – день 19). В течение 14 суток после начала экспериментального воздействия животных ежедневно взвешивали и измеряли размер их опухолей с помощью электронного штангенциркуля (Рисунок 6).

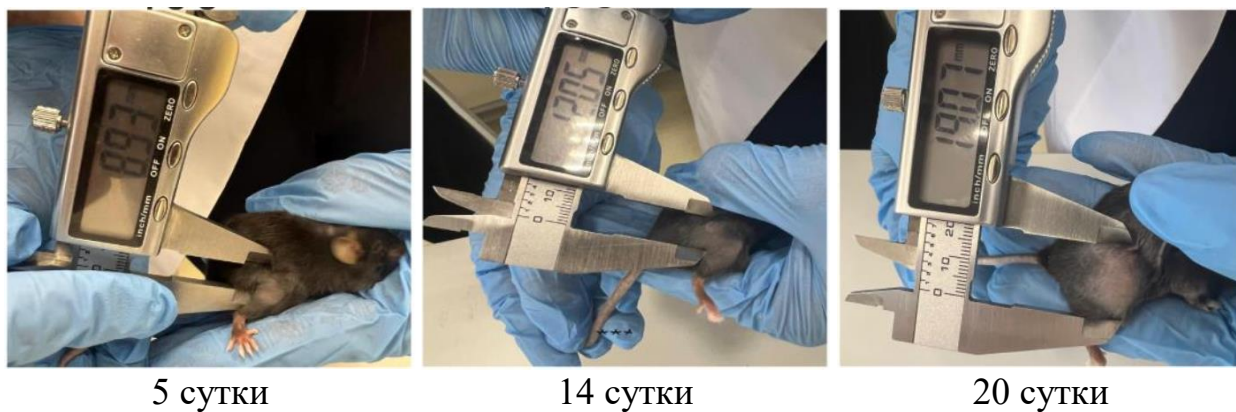


Рисунок 6 – Измерение размеров опухолевого узла с помощью штангенциркуля у животного контрольной группы – носителя сингенного ортотопического немелкоклеточного рака легкого

Размер опухоли определяли по известной формуле. На 20-й день подопытных животных анестезировали и выводили из эксперимента. Органы: легкие, печень и брюшина иссекали и фиксировали в растворе Карнуа (60% этанола, 30% хлороформа и 10% ледяной уксусной кислоты)

для подсчета поверхностных метастазов. На протяжении всего эксперимента проводили неукоснительную регистрацию болевого синдрома и его коррекцию. В процессе эксперимента ни у одного животного не развивался инкурабельный тяжелый болевой синдром.

## **2.5 Метод исследования противоопухолевой активности в культуре клеток**

Для исследования противоопухолевой активности наночастиц селена в опытах *in vitro* использована культура клеток аденокарциномы легкого человека А549. Культура была любезно предоставлена сотрудниками криобиблиотеки опухолевых культур Института экспериментального канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Клетки инкубировали в 96-луночных специальных планшетах производства «Thermo Fisher Sci» (США) в среде DMEM того же производителя с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки «Thermo Fisher Sci» (США) и 1% раствора, содержащего равные доли по массе бензилпеницилина натриевой соли и стептомицина того же производителя. Клеточную культуру аденокарциномы легкого инкубировали во влажной среде CO<sub>2</sub>-инкубатора в атмосфере 5% концентрации углекислого газа при температуре внутренней среды в инкубаторе 37<sup>0</sup>С.

Противоопухолевую активность наночастиц селена на описываемой культуре изучали при добавлении в среду культивирования недопированного наноселена и НЧС, загруженных ЛХТ-17-19, а также препарата сравнения цисплатина липосомального по подавлению роста опухолевых клеток в лабораторном тесте с трифенилтетразолия хлоридом (МТТ-тест, Merck Sigma-Aldrich, Германия). Рассчитывали показатель среднеподавляющей концентрации IC<sub>50</sub> в сравнении с цисплатином липосомальным.

## **2.6 Методы молекулярных исследований**

В своем исследовании мы применяли два метода молекулярного анализа: анализ экспрессии генов, кодирующих белки апоптоза, и маркеры, обладающие антиапоптотическим действием, а также протеомный анализ, выполненный методом вестерн-блота.

### **2.6.1 Выделение РНК для постановки полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции**

Для выделения тотальной РНК брали 100 мг опухолевой ткани, тщательно гомогенизировали и добавляли 1 мл монофазного водного раствора фенола и гуанидинизотиоцианата «ExtractRNA» (Евроген, Россия). Дальнейшие процедуры по работе с тотальной РНК проводили согласно протоколу, предложенному производителем. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию тотальной РНК определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 260 нм. Для получения комплементарной ДНК использовали набор реагентов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия), содержащий обратную транскриптазу вируса лейкоза мышей MMLV. Для проведения обратной транскрипции в каждый образец добавляли от 0,5 до 2 мкг тотальной РНК.

### **2.6.2 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени**

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали готовую реакционную смесь «5X qPCRmix-HS SYBR» (Евроген, Россия), содержащую HS Taq ДНК-полимеразу, краситель SYBR Green I и смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов. Реакцию амплификации проводили при следующих температурных условиях: 95°C – 1 мин; 95°C – 10 сек, 60°C – 10 сек, 72°C – 15 сек (40 циклов). Изменение уровня экспрессии мРНК исследуемых белков определяли по формуле  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , где  $\Delta\Delta Ct$  – разница

значений  $\Delta C_t$  для каждого гена до и после инъекций. В качестве референсного гена использовали ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ген *GAPDH*).

### **2.6.3 Метод протеомного анализа**

Образцы опухолей весом 100 мг гомогенизировали в жидком азоте, а затем растворяли в буфере (#IS007, «Белки-антитела», Россия). Лизаты центрифугировали и концентрировали в центрифужных фильтрах 10000 MW (#FTT510500, «BIOFIL»). Затем образцы наносили на 12,5% полиакриламидный гель в количестве 50 мкг/лунку. После переноса белков на мембрану PVDF ее блокировали в 5% бычьим сывороточным альбумине в течение 3-4 часов при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами при 4С, 16 ч: анти-GAPDH (#39-8600, «Thermo Fisher»), анти-IL-10 (#ARC 9102, «Thermo Fisher»), анти-IL1b (#MM42513, «Thermo Fisher»), анти-IL- 33 (#PA5-20398, «Thermo Fisher»), анти-pro-Casp-1 (#PA5-77886, «Thermo Fisher»), анти-IL-6 (#M620, «Thermo Fisher»), TGFb (#710276, «Thermo Fisher»). После этого мембраны промывали и инкубировали со вторичными антителами при 25С, 2 ч: Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (#31430, «Thermo Fisher») и Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (#31460, «Thermo Fisher»), меченными пероксидазой хрена. Затем мембраны промывали и визуализировали с помощью 0,1 % 3,3'-диаминобензидина (DAB).

### **2.7 Метод определения концентрации наночастиц селена в крови, опухолевой ткани, печени методом атомной абсорбционной спектроскопии**

Пробоподготовку проводили методом кислотной минерализации при повышенном давлении с использованием микроволнового нагрева в герметичных сосудах. Размороженные образцы печени и опухоли массой 200

мг (для образцов крови — 1 мл образца крови) переносили при комнатной температуре во фторопластовые сосуды для микроволновой минерализации, взвешивали, добавляли 3 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты, герметично закрывали и помещали в микроволновую систему пробоподготовки PreeKem M6 (Китай). Программа минерализации включала двухэтапное повышение температуры до 195°C и охлаждение до комнатной температуры. Через 60 мин минерализат количественно переносили в мерную пробирку и разбавляли деионизированной водой, фиксируя общий объем. Для перевода всех форм селена в форму, пригодную для гидрирования — Se (IV), в пробирку объемом 10 см<sup>3</sup> добавляли 5 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты и 5 см<sup>3</sup> раствора, полученного после микроволновой минерализации. Пробирки нагревали на водяной бане в течение 20 мин при температуре не более 90°C. После охлаждения пробирок до комнатной температуры объем доводили до 10 см<sup>3</sup> раствором 6М соляной кислоты. Затем с использованием стандартного раствора Se (IV) ГСО 7340-96 калибровали атомно-абсорбционный спектрометр Varian AA240FS (Австралия) с гидридной приставкой VGA-77 и проводили последующие измерения массовой концентрации селена в минерализатах на длине волны 196 нм. Массовую долю селена в пробе (мг/кг) рассчитывали по формуле:

$$X = C \times F \times V / 1000 \times m,$$

где  $C$  – массовая концентрация селена в анализируемом растворе, мкг/дм<sup>3</sup>;  $F$  – кратность разбавления пробы;  $V$  – объем раствора пробы после минерализации, см<sup>3</sup>; 1000 – коэффициент перевода мкг в мг;  $m$  – масса пробы, г. За результат измерения принимается среднее арифметическое двух измерений с расширенной неопределенностью, не превышающей 35%.

## 2.8 Методы статистического анализа результатов

Все первичные данные были проанализированы и представлены в виде среднего значения  $\pm$  SE. Внутригрупповую изменчивость проверяли графически, а для межгрупповых сравнений массы тела подопытных мышей, объема опухоли и количества метастазов в динамике использовали непараметрический тест Манна-Уитни. Статистическую значимость различий экспрессии мРНК оценивали с помощью парного t-теста на уровне 95%.

### ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, В ТОМ ЧИСЛЕ ДОПИРОВАННОГО ЛХТ-17-19

Как хорошо известно и описано в литературе, наночастицы, используемые в медико-биологических целях, должны обладать определенными физико-химическими и биомеханическими свойствами, позволяющими им реализовывать свой терапевтический потенциал. В настоящей главе будут рассмотрены вопросы, касающиеся описание физико-химических и токсикологических характеристик наночастиц селена, у которых мы изучаем противоопухолевые свойства.

#### 3.1 Физико-химические свойства исследуемых наночастиц селена

Наночастицы селена (НЧС, SeNP), полученные лазерной абляцией твердой селеновой мишени в деионизированной воде, были исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии, характерное ПЭМ-изображение наночастиц представлено на Рисунке 7.

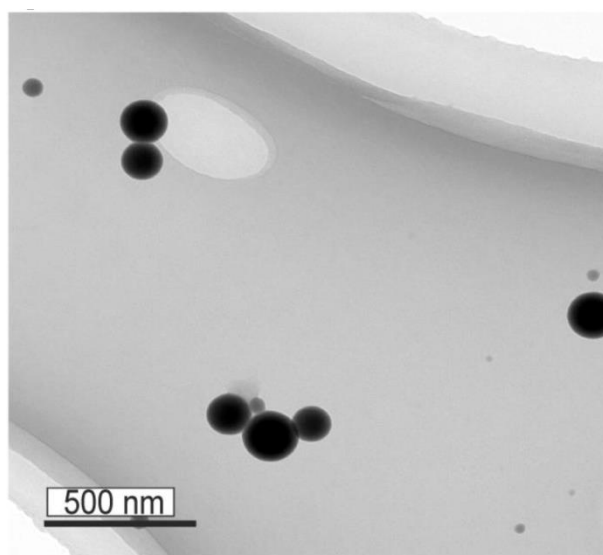


Рисунок 7 – Электронно-микроскопическое изображение наночастиц селена, масштаб линейки = 500 нм

Показано, что полученные НЧС имеют сферическую форму, размеры НЧС по данным ПЭМ-изображений составляют от 50 до 200 нанометров (Рисунок 7). Размеры также подтверждаются распределением частиц по размерам, полученным с помощью анализатора размеров частиц DLS (Рисунок 8). Мы установили, что наночастицы селена имеют мономодальное распределение по размерам с максимумом 150 нанометров и полушириной 150 нанометров (Рисунок 8).

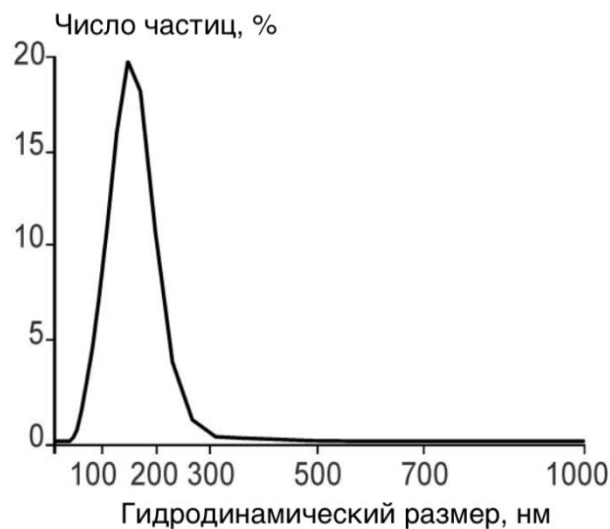


Рисунок 8 – Результаты анализа распределения наночастиц селена по размерам

Спектр поглощения коллоидных растворов наночастиц селена, полученных лазерной абляцией, представлен на Рисунке 9. Ключевой особенностью спектра поглощения водного коллоида, содержащего наночастицы селена, является наличие выраженного максимума поглощения при 590 нм, что характерно для сферических аморфных частиц селена.

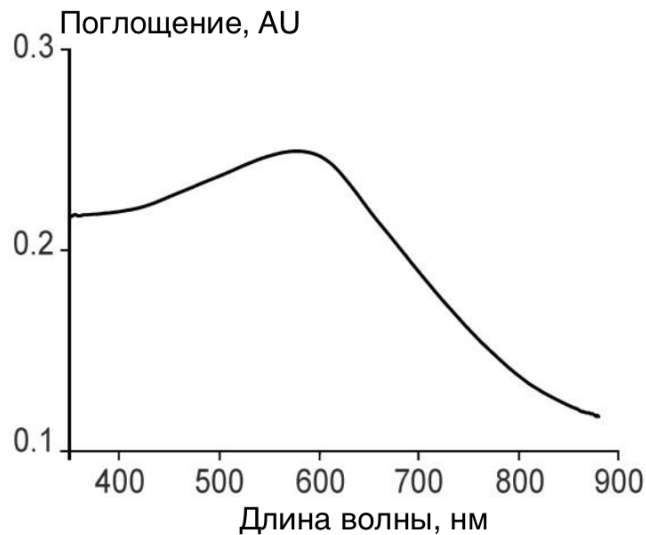


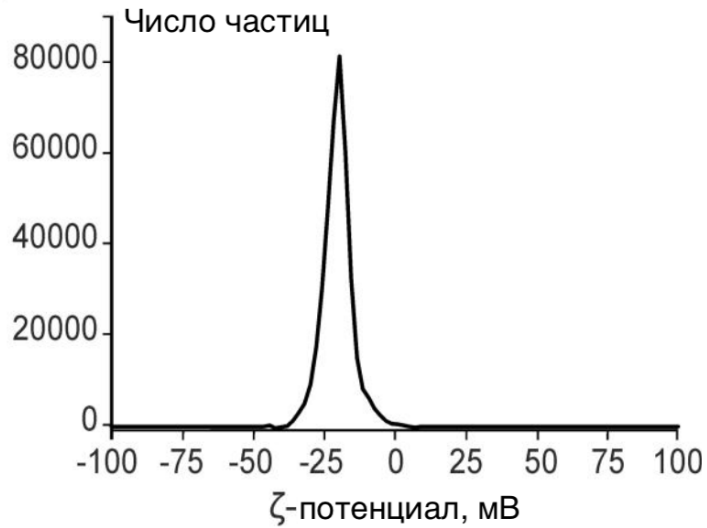
Рисунок 9 – Результаты анализа спектра поглощения наночастиц селена по размерам

Результаты измерения дзета-потенциала наночастиц селена представлены на Рисунке 10 (А). Нами установлено, что пик распределения дзета-потенциала расположен при значениях около  $-25$  мВ. На Рисунке 10 (Б) проиллюстрирована измеренная концентрация наночастиц в водном коллоиде. Выявлено, что 1 мл коллоида содержит  $1,4 \times 10^{13}$  наночастиц.

Также проведен рентгеноконтрастный структурный анализ наночастиц селена. На рисунке 11 показаны рентгенограммы наночастиц селена. Рентгенограмма частиц селена соответствует аморфной фазе наночастиц с незначительным содержанием кристаллических моноклинной и гексагональной фаз.

Таким образом, по своим физическим структурным показателям полученные наночастицы селена соответствуют описанным в литературе критериям для неорганических нанолекарственных форм с позиций их проникновения в опухолевую ткань и распределения в ней.

А



Б

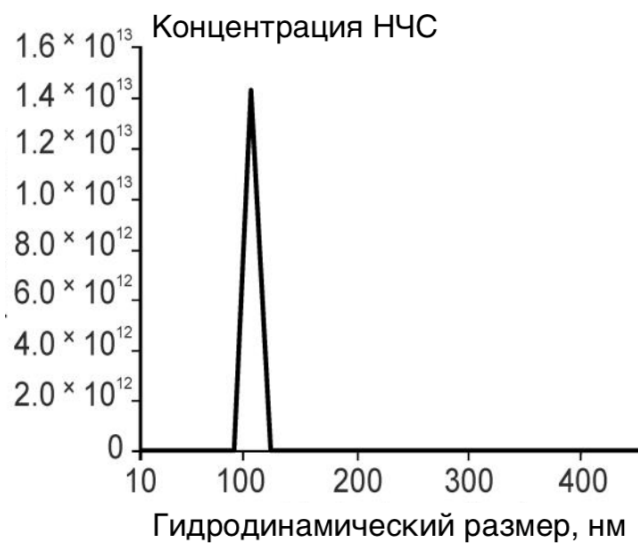


Рисунок 10 – Распределение дзета-потенциала (А) и гидродинамического размера (Б) наночастиц селена

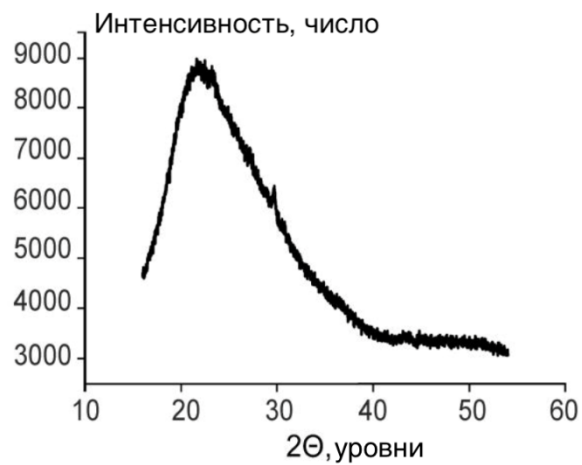


Рисунок 11 – Результаты анализа спектра поглощения наночастиц селена по размерам

### 3.2 Острая токсичность наночастиц селена, допированных ЛХТ-17-19 при внутривенном и внутрибрюшинном введении лабораторным мышам

Острая токсичность изучена у белых беспородных лабораторных мышей вестом 18-20 г в остром эксперименте. Для определения острой токсичности при внутрибрюшинном введении после исходного взвешивания и оценки общего состояния и поведения животному вводили внутрибрюшинно наночастицы селена в фиксированной дозе и в объеме, не превышающем 1,0 мл.

Для токсикологических экспериментов использовали данные, полученные в докторской диссертации Е.А. Варламовой, о цитотоксичности селеновых наночастиц в клеточных культурах, в том числе опухолевых, а также литературные данные [16], а также сведения Кудрявцева М.Ю. и Самышиной Е.А. о токсичности соединения дигидроакридона с лабораторным шифром ЛХТ-17-19.

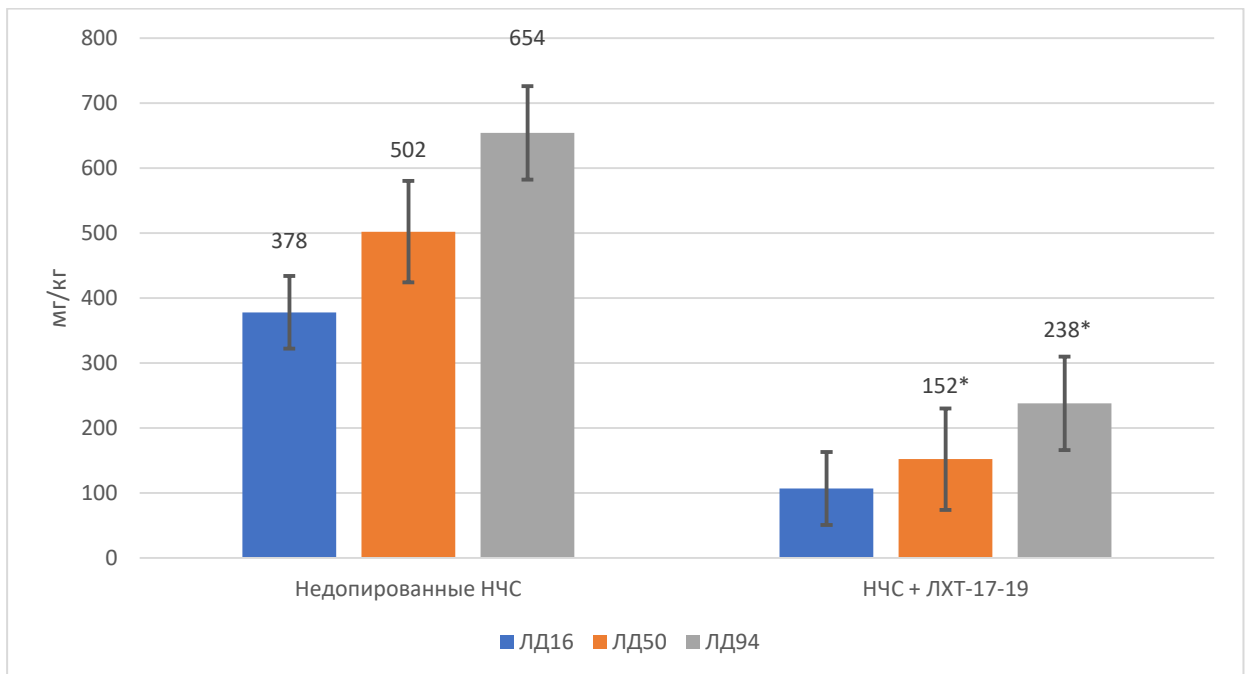


Рисунок 12 – Значение показателей ЛД<sub>16</sub>, ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>94</sub> с 95% доверительным интервалом при внутрибрюшинном введении наночастиц селена (пробит-анализ по Миллеру и Тейнтеру); \*  $p < 0,05$  при сравнении со значениями для недопированных НЧ

Каждую концентрацию наночастиц в единице объема в порядке возрастания вводили группе мышей, включавших 2-3 самца и 2-3 самки (общее количество – 5 голов в группе), начиная с предельной концентрации, которая не вызывала гибели ни одного животного в группе до концентрации, которая приводила к гибели всех животных. Наблюдение за выжившими мышами проводили в течение 14 суток, в течение которых регистрировали внешний вид грызунов, их общее состояние, особенности поведения. Расчет показателя ЛД<sub>50</sub>, отражающего дозу, приводящую к гибели половины животных в группе, проводили методом Миллера и Тейнтера с помощью оригинальной разработанной программы.

На Рисунке 12 представлены результаты исследования острой токсичности допированных и незагруженных наночастиц селена у мышей. Расчетные значения для недопированных НЧС ЛД<sub>16</sub> составили 378 [322 ÷ 434] мг/кг; значение ЛД<sub>50</sub> было равно 502 [430 ÷ 575] мг/кг; показатель ЛД<sub>94</sub> составил 654 [584 ÷ 724] мг/кг. Расчетные значения для наноселена, допированного противоопухолевым соединением из класса производных дигидроакридона ЛХТ-17-19, ЛД<sub>16</sub> составили 107 [73 ÷ 141] мг/кг; значение ЛД<sub>50</sub> было равно 152 [131 ÷ 183] мг/кг; показатель ЛД<sub>94</sub> составил 238 [197 ÷ 279] мг/кг ( $p < 0,05$  при сравнении со значениями для недопированных НЧС для всех значений).

Значение среднетоксической дозы для мышей при внутрибрюшинном введении недопированных и загруженных НЧС соответствует 3 классу – умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.01.007 – 76 и 4 классу токсичности и опасности по классификации ОЕСД [170]. При этом, следует обратить внимание на то, что показатель ЛД<sub>50</sub> соединения ЛХТ-17-19 равен при внутрибрюшинном введении мышам 74 [43 ÷ 105] мг/кг, что соответствует почти вдвое большей токсичности, чем при загрузки вещества в селеновый наноконтейнер.

Для определения острой токсичности при внутривенном пути введения была составлена 1 группа животных, включавшая 3 самца и 3 самки. Животным под ингаляционной анестезией осуществляли доступ к хвостовой вене, которую подключали к программируемому микроинъектору производства Kent Scientific Corp. (США). Животное помещали на подогреваемую площадку и перемещали в систему для неинвазивной регистрации ЭКГ.

При непрерывной регистрации ЭКГ с выводом ее на монитор начинали внутривенное введение наночастиц селена. Введение прекращали при наступлении асистолии продолжительностью более 20 с. Рассчитывали среднюю арифметическую введенной дозы на основании проведенных 6 экспериментов. Показатель соответствовал значению ЛД<sub>100</sub> у мышей при данном пути введения. С учетом вышесказанного, показатель ЛД<sub>100</sub> недопированных наночастиц селена составил 415 [355 ÷ 480] мг/кг. При загрузке НЧС веществом ЛХТ-17-19 острая токсичность также возрастала до 257 [218 ÷ 296] мг/кг, однако был более, чем в два раза ниже, чем у чистого вещества, по данным Куудрявцева М.Ю. и Самышиной Е.А. [18, 19]. Значение токсической дозы НЧС вне зависимости от загрузки для мышей при внутривенном введении соответствует 3 классу – умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.01.007 – 76 и 4 классу токсичности и опасности по классификации ОЕСД.

Полученное соотношение токсичности при внутривенном и внутрибрюшинном введении свидетельствует о биоэквивалентности этих путей друг другу и хорошей биодоступности НЧС при внутрибрюшинном введении.

## **ГЛАВА 4. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, В ТОМ ЧИСЛЕ ДОПИРОВАННЫХ ЛХТ-17-19, НА МОДЕЛЯХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО IN VITRO И IN VIVO**

В нашей работе провели исследование противоопухолевого потенциала недопированных наночастиц селена и наноселена, загруженного соединением дигидроакридон ЛХТ-17-19, на двух опухолевых моделях рака легкого – в культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549 и у животных с сингенной гетеротопической опухолью. Определены подавляющая концентрация, оценена способность наночастиц селена при курсовом введении сдерживать рост опухоли, влиять на продолжительность жизни мышей – опухоленосителей.

### **4.1 Противоопухолевое действие наночастиц селена в культуре клеток аденокарциномы легкого A549**

Опухолевые клетки инкубировали в питательной среде в атмосфере CO<sub>2</sub> инкубатора. Тестирование соединения и препарата сравнения – доксорубицина липосомального проводили в экспоненциальную фазу роста культуры в диапазоне концентраций от 10<sup>-8</sup> до 10<sup>-2</sup> М. Выживаемость клеток оценивали в тесте с триметилтетразолия хлоридом (МТТ-тест). На рисунке 13 представлены результаты проведенных опытов.

Как хорошо видно, цисплатин липосомальный эффективно подавлял рост опухолевых клеток в широком диапазоне концентраций. Расчет показателя IC<sub>50</sub> позволил установить среднеподавляющую концентрацию, равную 5,4 × 10<sup>-5</sup> М. Полученные данные подтверждаются сведениями из литературных источников о противоопухолевом эффекте липосомального цисплатина [171].

Исследование нанофармакологических частиц селена позволило получить следующие результаты: жидкая наноформа подавляла рост

опухолевых клеток также как и у препарата сравнения цисплатина липосомального в широком диапазоне концентраций. Расчет показателя  $IC_{50}$  позволил установить среднеподавляющую концентрацию, равную  $5,2 \times 10^{-6}$  М, что позволяет утверждать наличие противоопухолевой активности НЧС в культуре клеток аденокарциномы легкого.

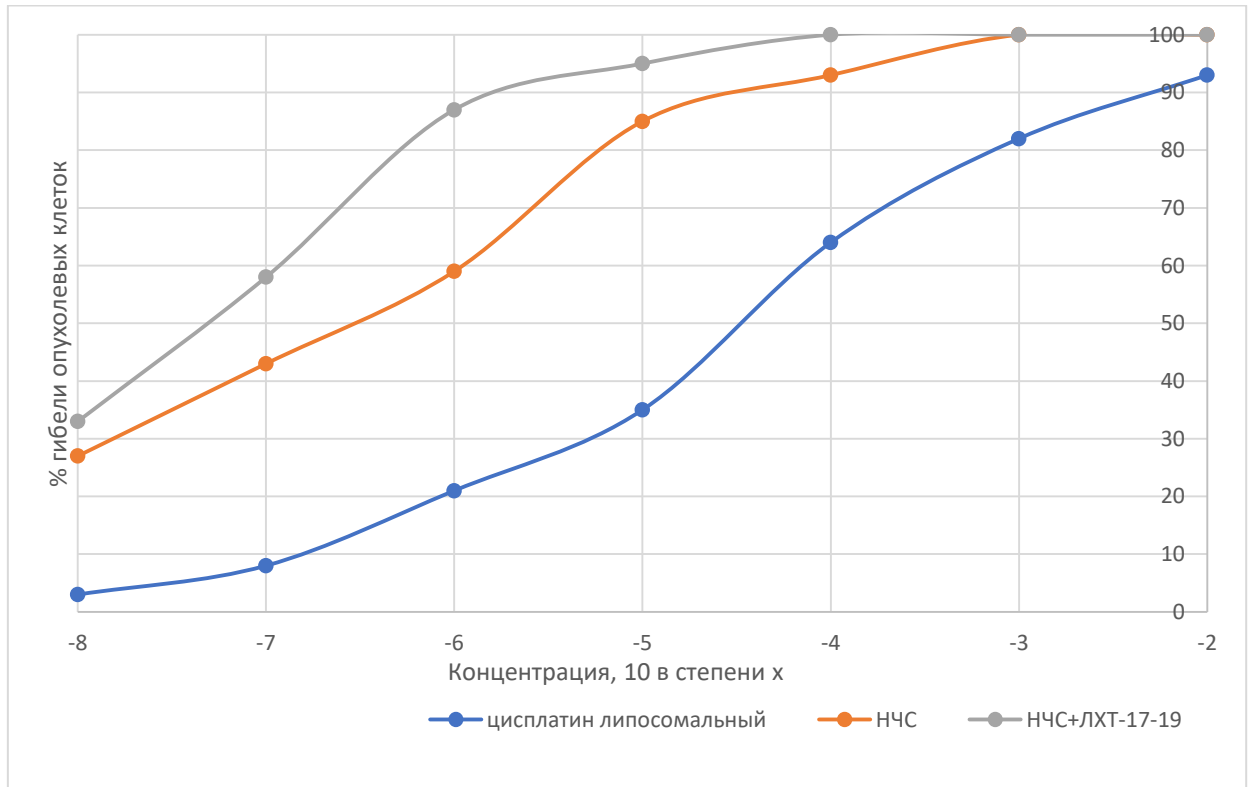


Рисунок 13 – Подавление клеточного роста клетками культуры аденокарциномы легкого A549 в присутствии наночастиц селена и цисплатина липосомального в диапазоне концентраций от  $10^{-8}$  до  $10^{-2}$  М (МТТ-тест)

Допирование (загрузка) НЧС известным ингибитором EGFR ЛХТ-17-19 в пропорциональных концентрациях сопровождалось ростом цитотоксического потенциала наночастиц селена. Расчет показателя  $IC_{50}$  позволил установить среднеподавляющую концентрацию, равную  $6,7 \times 10^{-7}$  М. При сравнении с данными о цитотоксической активности соединения в аналогичных условиях культивирования, полученных М.Ю. Кудрявцевым для чистой фармацевтической субстанции ЛХТ-17-19 показано, что

использование селенового наноконтейнера повышает противоопухолевый потенциал соединения дигидроакридона, а закономерность роста активности соответствует феномену суммации эффекта при фармакологическом однонаправленном взаимодействии лекарственных средств [18].

#### **4.2 Противоопухолевое действие наночастиц селена на сингенной опухолевой модели аденокарциномы легкого Льюис у мышей**

До и во время инъекций экспериментальным группам мышей 10 мг/кг НЧС, 5 мг/кг НЧС + 3,7 мг/кг ЛХТ-17-19 и контрольной группе физиологического раствора проводились измерения и сравнительный анализ следующих параметров: веса животных, объема опухоли и количества метастазов в легких, печени и брюшине (Рисунки 14, 15). Выбор доз наночастиц селена и соединения дигидроакридона основывался на определении показателей острой токсичности, а также предыдущих исследованиях на моделях *in vitro* и *in vivo*, где наблюдались мощные проапоптотические эффекты НЧС в концентрации 10 мкг/мл, которые были зарегистрированы как для линий опухолевых клеток, так и для «нормальных» неизмененных клеток [171, 172].

В то же время инъекции НЧС (0,1 мг/кг или 2,5 мг/кг) мышам в течение 28 дней вызывали одинаково положительные эффекты — снижение адгезивной способности нейтрофилов, подавление экспрессии белков, участвующих в генерации реактивных форм кислорода, тенденцию к подавлению экспрессии генов провоспалительных факторов при обеих концентрациях наночастиц [164]. Таким образом, было интересно наблюдать концентрационные эффекты недопированных НЧС и наночастиц, загруженных соединением дигидроакридона ЛХТ-17-19 также в терапевтической концентрации, в модели ксенотрансплантата. Экспериментальные группы мышей были сформированы из особей с примерно одинаковым весом (нулевой день, Рисунок 14) и вплоть до 5-го дня

наблюдений существенных изменений в контрольной и опытной группах не наблюдалось (Рисунок 14).

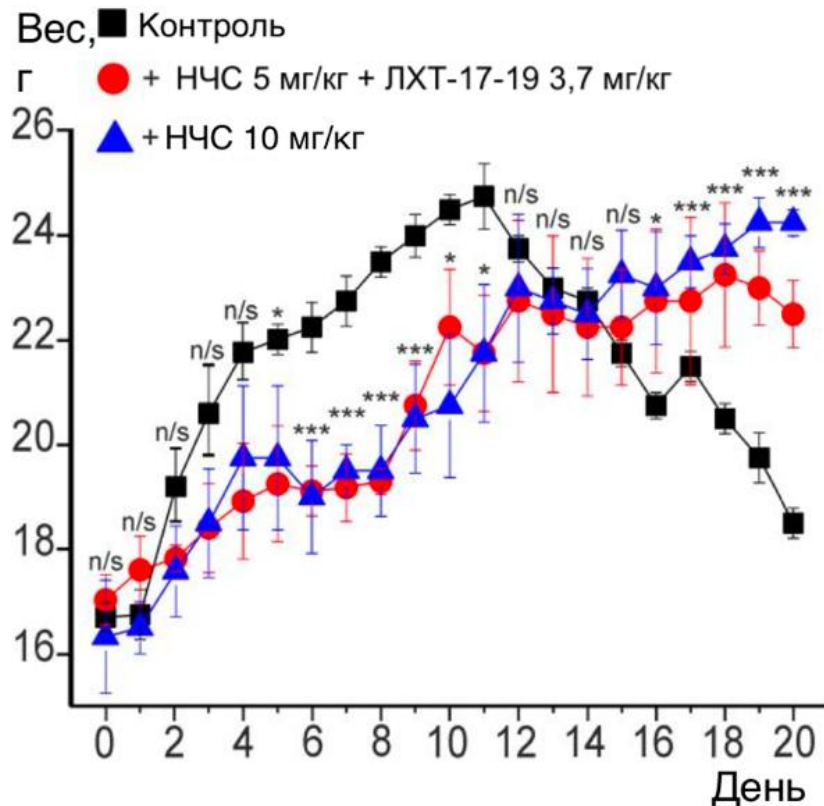


Рисунок 14 – Динамика массы тела мышей – носителей сингенной гетеротопической аденокарциномы легкого Льюис на фоне экспериментального воздействия наночастицами селена (НЧС, SeNP) в дозе 10 мг/кг и допированными наночастицами селена в дозе 5 мг/кг + ЛХТ-17-19 3,7 мг/кг; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$  при сравнении с контролем (ANOVA, с последующим применением критерия Даннета)

При этом мы обнаружили, что курсовое введение и не допированных и допированных ЛХТ-17-19 НЧС в обеих концентрациях приводили к существенному снижению массы тела мышей на 6-10-е сутки после трансплантации опухоли по сравнению с контролем. В течение 12-15 дней масса тела мышей опытной и контрольной групп выравнивалась и достоверно не различалась. Однако у мышей контрольной группы с 16 по 20 день наблюдалось резкое снижение массы тела, тогда как у мышей опытной группы этот показатель выходил на плато и не изменялся (Рисунок 14).

Анализ изменений опухолей у мышей показал, что в контрольной группе в течение 9-12 дней наблюдался экспоненциальный рост объема опухоли с дальнейшим достижением, вероятно, максимальных размеров и выходом на плато (Рисунок 15).

У мышей опытной группы до 9-го дня инъекций обоих видов и обеих доз наночастиц селена существенных отличий от контроля не наблюдалось, но начиная с 10-го дня инъекций наблюдалось уменьшение объемов опухолей по сравнению с контролем и уже на 12-й день наблюдалось заметное торможение роста опухоли. Причем показатель размера опухолевого узла был в 2-2,5 раза меньше, чем в контроле, и существенных отличий между двумя опытными группами, получавшими разные дозы наночастиц селена, допированных и незагруженных, не было до 19-20 дней наблюдения, когда в группе НЧС 5 мг/кг + ЛХТ-17-19 3,7 мг/кг продолжилось снижение размера опухолевого узла, достигшего статистической достоверности ( $p < 0,01$  при сравнении с контролем, при сравнении с НЧС 10 мг/кг).

Для наночастиц селена и наноконплексов на их основе продемонстрированы противоопухолевые эффекты, однако большая часть работ выполнена на клеточных моделях. Было показано, что наноконпозиты фукоидана/куркумина/SeNP, полученные путем биологического синтеза, оказывают мощное противоопухолевое действие в отношении колоректальной аденокарциномы (CaCo-2 и HT-29), и его эффективность превышает эффективность цисплатина [167]. В своей клеточной части работы мы также отметили, что эффективность наночастиц селена по силе противоопухолевого действия превосходит цисплатин липосомальный, а в опытах на лабораторных животных убедились, что допирование наночастиц селена противоопухолевым лекарственным веществом позволяет повысить антибластомный эффект комплекса при снижении концентрации НЧС и повышении безопасности нанотранспортной терапевтической системы.

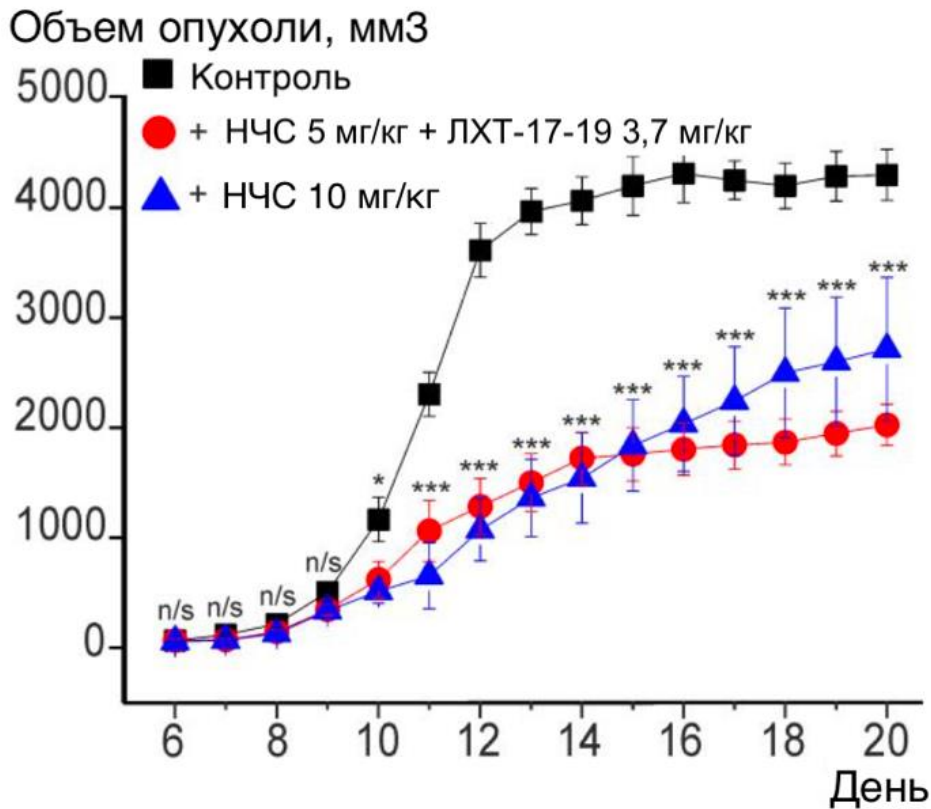


Рисунок 15 – Динамика объема сингенной гетеротопической аденокарциномы легкого Льюис у мышей на фоне экспериментального воздействия наночастицами селена (НЧС) в дозе 10 мг/кг и допированными наночастицами селена в дозе 5 мг/кг + ЛХТ-17-19 3,7 мг/кг. Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические сравнения результатов проводились с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия между экспериментальными группами отмечены звездочками. n/s, данные не значимы ( $P > 0,05$ ), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### 4.3 Анализ концентрации наночастиц селена в крови, опухолевом узле и печени мышей на фоне их курсового введения

Анализ гомогенатов ткани опухолевых узлов и образцов крови у мышей после 20 дней инъекций допированных и недопированных наночастиц селена с использованием атомно-абсорбционной спектрометрии показал, что концентрация селена в крови контрольных мышей (не получавших экспериментального воздействия, только физиологический раствор) составила  $0,372 \pm 0,004$  мг/кг, тогда как у мышей, получавших

инъекции 5 мг/кг или 10 мг/кг наночастиц селена, концентрация селена составила  $0,54 \pm 0,012$  мг/кг и  $0,575 \pm 0,008$  мг/кг соответственно (Рисунок 16), что говорит об отсутствии статистически достоверных различий между исследуемыми дозами при том, что в группе животных, получавших НЧС 5 мг/кг наноселен использовался в виде контейнера для соединения ЛХТ-17-19.

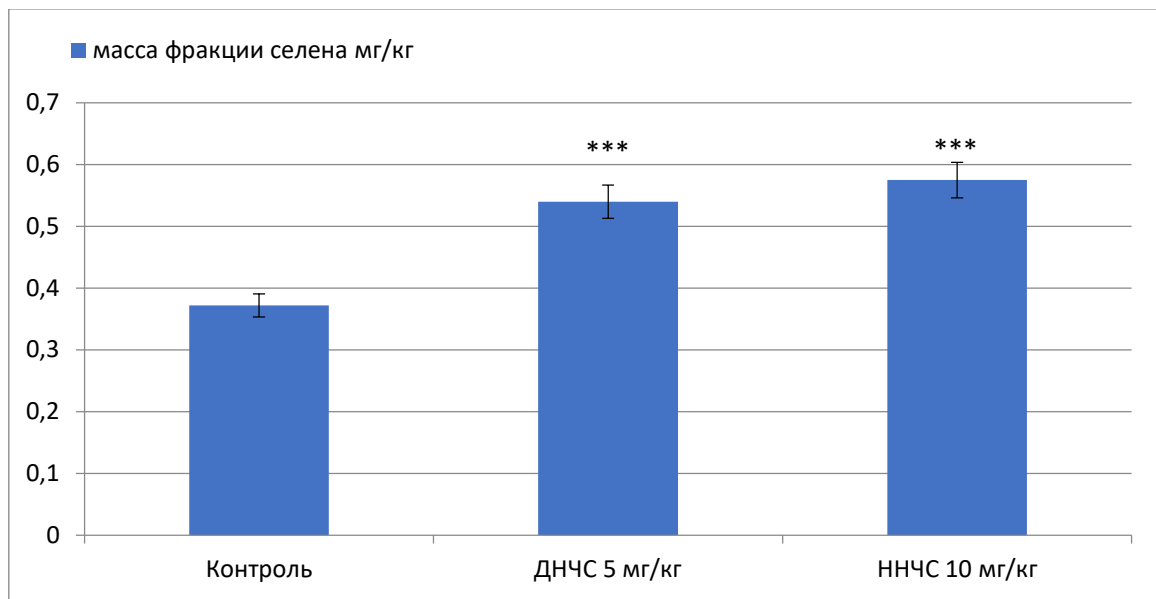


Рисунок 16 – Концентрация селеновой фракции в крови мышей с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис на фоне 20-суточного экспериментального воздействия недопированными (ННЧС) в дозах 5 и 10 мг/кг и допированными ЛХТ-17-19 (ДНЧС) наночастицами селена. Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические сравнения результатов проводились с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия между экспериментальными группами отмечены звездочками. n/s, данные не значимы ( $P > 0,05$ ), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

В образцах опухолей от контрольных мышей концентрация селена составила  $0,337 \pm 0,008$  мг/кг, тогда как в опухолях, извлеченных у мышей, которым вводили допированные наночастицы селена в дозе 5 мг/кг и недопированный наноселен в дозе 10 мг/кг, концентрация селена составила  $2,5 \pm 0,412$  мг/кг и  $4,317 \pm 0,056$  мг/кг соответственно (Рисунок 17).

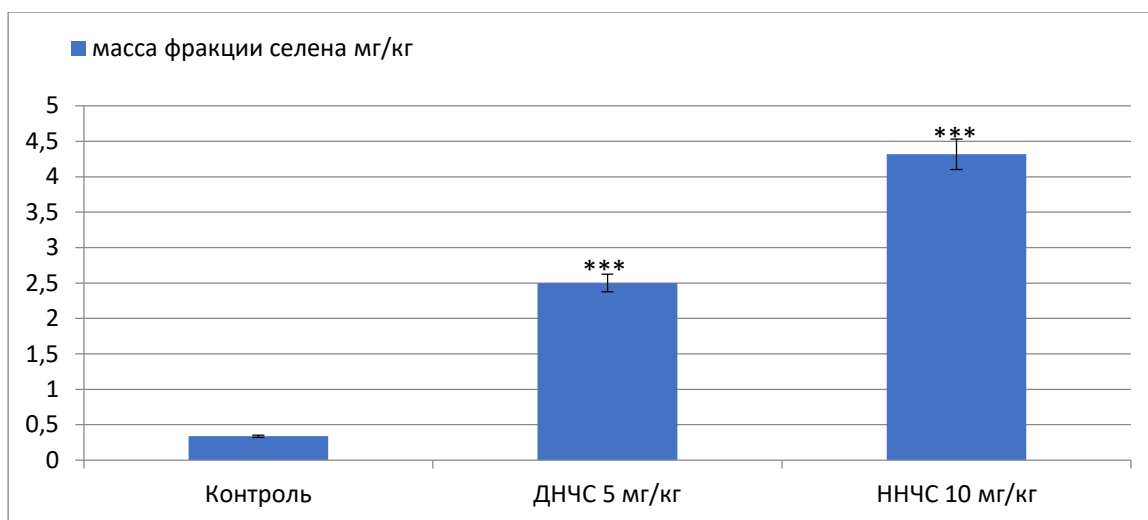


Рисунок 17 – Концентрация селеновой фракции в образцах аденокарциномы легкого мышей на фоне 20-суточного экспериментального воздействия недопированными (ННЧС) в дозах 5 и 10 мг/кг и допированными ЛХТ-17-19 (ДНЧС) наночастицами селена (НЧС). Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические сравнения результатов проводились с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия между экспериментальными группами отмечены звездочками. n/s, данные не значимы ( $P > 0,05$ ), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

Анализ образцов печени лабораторных мышей с экспериментальным канцерогенезом показал, что в контроле концентрация селена составляла  $1,13 \pm 0,04$  мг/кг, тогда как в печени мышей, которым вводили 5 мг/кг допированных ЛХТ-17-19, или 10 мг/кг незагруженных НЧС, концентрация селена составляла  $3,41 \pm 0,066$  мг/кг и  $3,266 \pm 0,233$  мг/кг соответственно (Рисунок 18), что также говорит об отсутствии статистически значимых различий между тканевой концентрацией НЧС в зависимости от вводимой дозы нанофармакологической лекарственной формы и особенностей применения их в виде наноконтейнера для противобластомного средства.

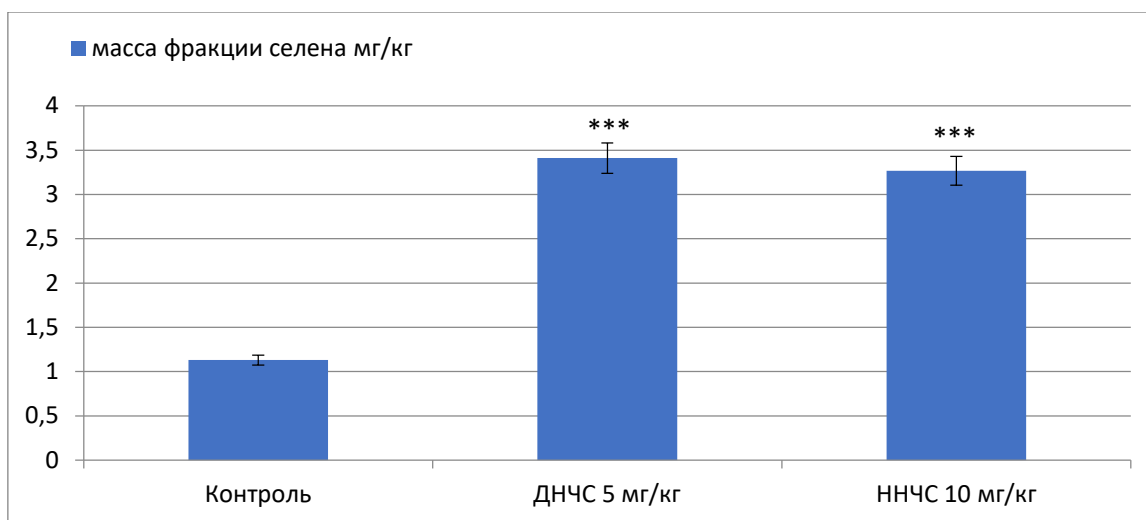


Рисунок 18 – Концентрация селеновой фракции в образцах печени мышей с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис на фоне 20-суточного экспериментального воздействия недопированными (ННЧС) в дозах 5 и 10 мг/кг и допированными ЛХТ-17-19 (ДНЧС) наночастицами селена. Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические сравнения результатов проводились с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия между экспериментальными группами отмечены звездочками. n/s, данные не значимы ( $P > 0,05$ ), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### **4.4 Исследование антиметастатической активности наночастиц селена при курсовом введении мышам с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис**

Через 20 дней после инъекций мышей под изофлурановым наркозом выводили из эксперимента и исследовали наличие метастазов в легких, печени и головном мозге. Оценка количества метастазов (MTS) представлена на Рисунке 19.

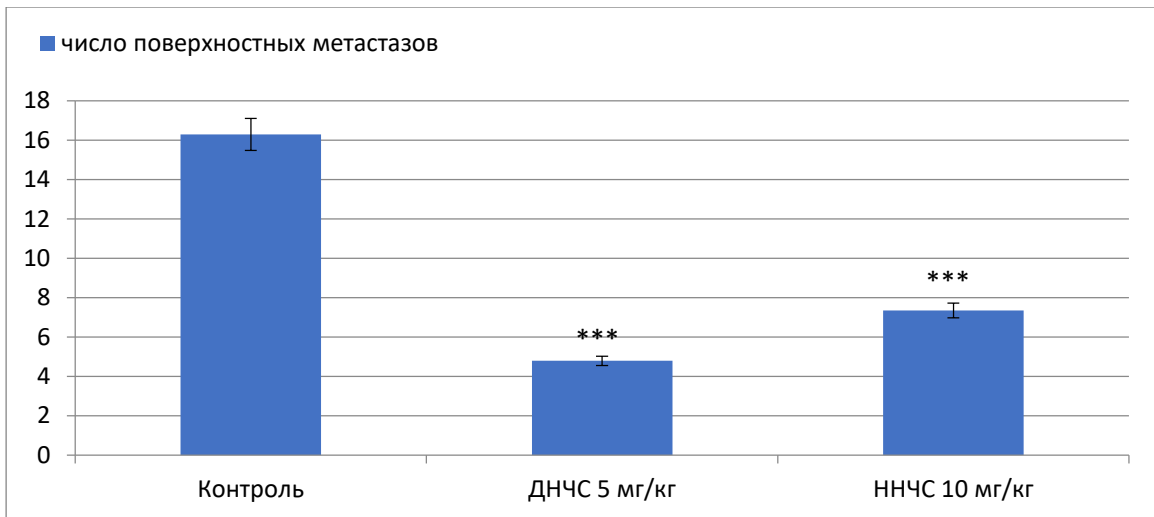


Рисунок 19 – Количество поверхностных метастазов в легких, печени и головном мозге мышей с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис на фоне 20-суточного экспериментального воздействия недопированными (ННЧС) в дозах 5 и 10 мг/кг и допированными ЛХТ-17-19 (ДНЧС). Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические сравнения результатов проводились с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия между экспериментальными группами отмечены звездочками. n/s, данные не значимы ( $P > 0,05$ ), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,05$  при сравнении с НЧС в дозе 10 мг/кг

Оказалось, что внутрибрюшинные курсовые инъекции водного раствора наночастиц селена в дозе 5 мг/кг, допированных соединением дигидроакридона ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг, снижали количество метастазов в 3 раза, а курсовое введение незагруженных антибластомным веществом наночастиц селена в дозе 10 мг/кг имело менее выраженный эффект, существенно не отличаясь от инъекций в дозе 5 мг/кг.

Таким образом, нами показано, что наночастицы селена при совместном культивировании клеток аденокарциномы легкого человека A549 подавляют рост опухолевых клеток, превосходя по активности препарат сравнения цисплатин липосомальный. Курсовое введение лекарственной формы НЧС лабораторным мышам с сингенной гетеротопической аденокарциномой легкого Льюис внутрибрюшинно в течение 20 дней подавляет рост опухоли, препятствует формированию перенеопластической

кахекии животных и метастазированию первичного опухолевого узла в печень, легкие и головной мозг. Наибольший антиметастатический эффект развивается при курсовом введении наночастиц в дозе 5 мг/кг, допированных соединением дигидроакридон ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг. При этом, установлено, что по антиметастатическому эффекту введение ЛХТ-17-19 в составе наноконтейнера превосходит введение фармацевтической субстанции ЛХТ-17-19 (Кудрявцев М.Ю., 2023).

Не получено статистических различий в концентрации НЧС в печени и крови мышей между группами с различными вводимыми дозами, в то время как опухолевый очаг накапливал НЧС в большей концентрации при введении наноформы в более высокой дозе.

## **ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА НА ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКУЮ ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ, СТРЕСС И КЛЕТОЧНУЮ ГИБЕЛЬ У МЫШЕЙ С СИНГЕННОЙ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЛЕГКОГО**

Известно, что рак легкого и воспалительные заболевания легкого являются тесно связанными заболеваниями, поэтому крайне важно изучить, как изменяются паттерны экспрессии про- и противовоспалительных генов как один из терапевтических эффектов, которые могут оказывать наночастицы селена в исследуемых дозах.

Анализируя полученные результаты с помощью ПЦР в реальном времени, мы получили противоречивые данные (Рисунок 20). С одной стороны, после курсового внутрибрюшинного введения допированных наночастиц селена в концентрации 10 мг/кг наблюдалось 2-3-кратное снижение уровней экспрессии провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17, ИЛ-6 и ИЛ-33, а курсовое введение 5 мг/кг НЧС, допированных производным дигидроакридона ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг, показало еще более выраженное снижение их экспрессии и снижение большего количества генов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-33 (Рисунок 20).

Данные протеомного анализа, представленные на Рисунке 21 подтверждают результаты ПЦР в реальном времени. Вестерн-блоттинг показывает, что содержание провоспалительных белков (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-33) снижается после курсового введения как наноселена 5 мг/кг, загруженного 3,7 мг/кг ЛХТ-17-19, так и 10 мг/кг чистых наночастиц селена (Рисунок 21).

Кроме того, в обоих случаях экспрессия Casp-1, который, как известно, является ключевым медиатором воспалительных процессов, снижалась примерно в 3 раза [173, 174]. Casp-1 является ферментом, участвующим в превращении про-ИЛ-1 $\beta$  в активный секретируемый ИЛ-1 $\beta$ , поэтому курсовое внутрибрюшинное введение НЧС в обеих дозах, и особенно при их

допировании ЛХТ-17-19 дозе 3,7 мг/кг, способствуют ингибированию воспалительных процессов в опухоли.

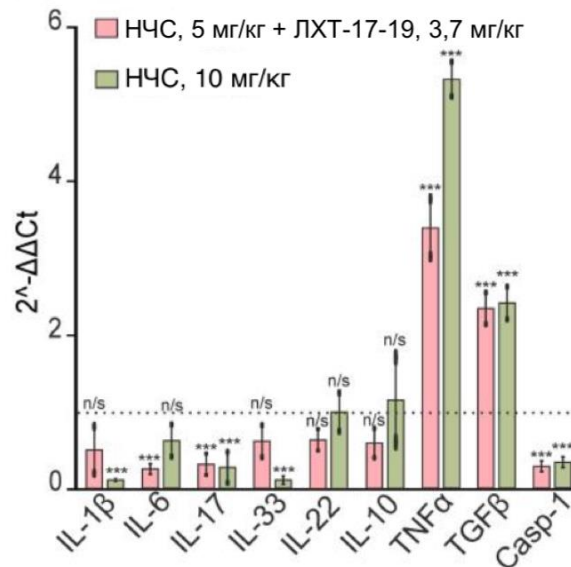


Рисунок 20 – Результаты ПЦР в реальном времени по изучению паттернов экспрессии мРНК про- и противовоспалительных маркеров и вестерн-блоттинга ключевых белков после курсового введения НЧС мышам в дозе 10 мг/кг и допированным ЛХТ-17-19 наноселеном в дозе 5 мг/кг. Относительные уровни экспрессии мРНК генов в опухоли после введения наночастиц селена относительно контрольных значений (опухоль без инъекций НЧС), принятых за 1 и отмеченных пунктирной линией. Уровень экспрессии мРНК в контроле (опухолевая ткань без инъекций НЧС) принят за 1. Статистическую значимость оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента. Сравнения между экспериментальными группами и контролями отмечены звездочками: n/s - данные незначимы ( $p > 0,05$ ) и \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 4$

С другой стороны, мы не обнаружили значительного увеличения экспрессии противовоспалительного интерлейкина ИЛ-10, а экспрессия (Рисунок 20), содержание белка (Рисунок 21) провоспалительных цитокинов TNFα и TGFβ значительно увеличились после курсового введения наночастиц селена в обеих концентрациях, но наиболее значительно при введении наивысшей дозы НЧС 10 мг/кг, не загруженным антибластомным средством ЛХТ-17-19.

Так, для TGF $\beta$  он увеличился более чем в два раза после экспериментально-терапевтических курсов, тогда как для TNF $\alpha$  он увеличился более чем в 3 и 6 раз соответственно.

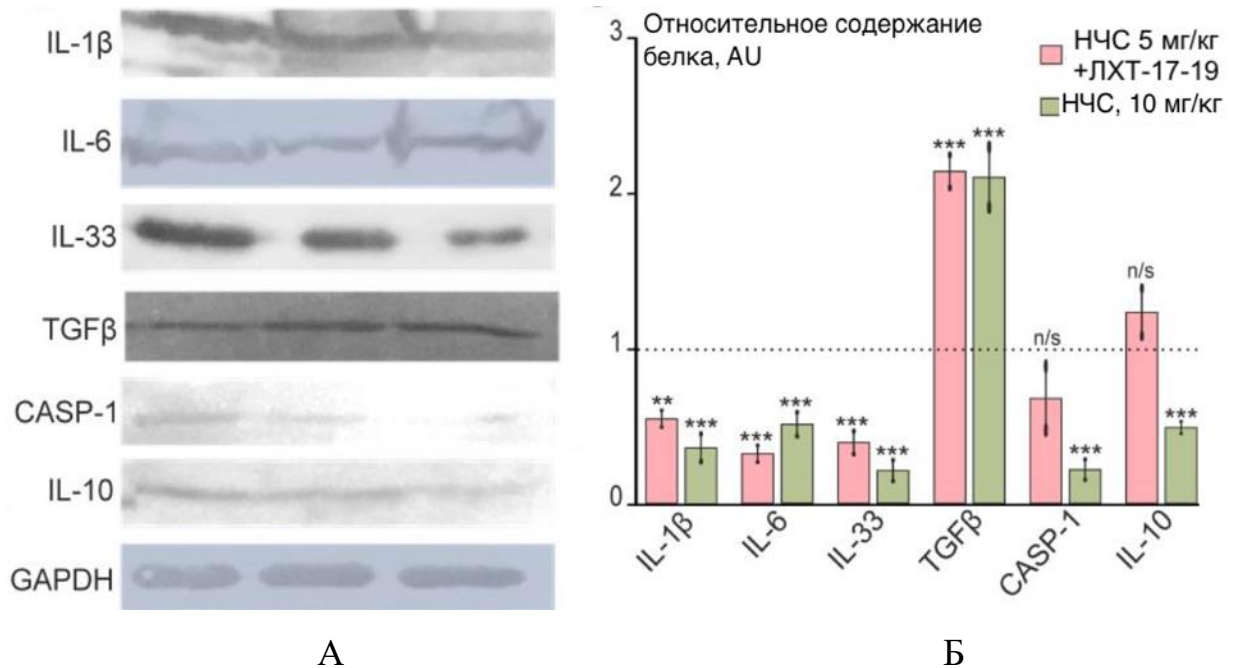


Рисунок 21 – Относительный уровень содержания белков воспалительного статуса в опухоли после курсового внутрибрюшинного введения 5 мг/кг (+ЛХТ-17-19 3,7 мг/кг) или 10 мг/кг наночастиц селена (А). Контроль – содержание белков в опухоли без инъекций НЧС; Б – Количественная оценка исследуемых белков в образцах, полученных с помощью программного обеспечения ImageJ, представленная как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка трех независимых экспериментов. В качестве контроля для нормализации использовали GAPDH; n/s – данные незначимы, \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ . Сокращения: IL-1 $\beta$  – интерлейкин-1 бета; IL-6, IL-17, IL-33, IL-22, IL-10 – интерлейкины 6, 17, 33, 22, 10; TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли; TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста бета; Casp-1 – каспаза 1

Таким образом, с помощью ПЦР и протеомного анализа удалось установить, что курсовое введение наночастиц селена приводит к повышению экспрессии генов, кодирующих противовоспалительные и антигипоксические белки, но снижает экспрессию антиоксидантных селенсодержащих белков на модели сингенной ортотопической колоректальной аденокарциномы. Обе концентрации НЧС приводили к

схожим эффектам, но стоит отметить, что допирование наноселена ЛХТ-17-19 сопровождалось менее контрастными проявлениями гиперэкспрессии провоспалительных и антигипоксических генов в ткани опухоли.

## ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск опухоль-специфических направленных систем доставки противоопухолевых лекарственных средств, которые способны распознать клетку-мишень, специфически связаться с ней, накопиться в ткани в достаточной концентрации и произвести терапевтическое действие – предмет поиска множества научных групп во всем мире. В наших исследованиях были изучены динамики процессов морфогенеза опухолевого роста в условиях экспериментальной гепатомы Зайдела у крыс на фоне применения нанодоксорубина. Было показано, что при введении нанодоксорубина снижаются реактивные патоморфологические процессы по типу паренхиматозной белковой и жировой дистрофии в миокарде, печени и почках. В ткани печени отчетливо сохраняется балочное строение, явления жировой дистрофии носили местный локальный характер по типу пылевидного и мелкокапельного ожирения [206-210].

В последнее десятилетие большое внимание уделяется разработке новых подходов к лечению онкологических заболеваний с использованием нанотехнологий. Среди перспективных наночастиц для лечения онкологических заболеваний следует выделить наночастицы селена (НЧС, SeNP), обладающие наименее выраженной токсичностью по отношению к нормальным тканям и эффективным цитотоксическим действием в отношении опухолевых клеток [16]. Биогенно полученный наноселен способен вызывать остановку клеточного цикла в моделях злокачественных новообразований *in vitro* и *in vivo* [16]. Биогенные НЧС индуцировали не только апоптоз в клетках карциномы толстой кишки и легких мышей или человека (A549, HT29 и CaCo-2), но и повышенную иммуногенность [17]. На основе наноселена созданы сложные наноконструкции, среди которых следует отметить SeNVs@NE-IL32-EcN, представляющие собой внеклеточные везикулы, нагруженные наночастицами селена, интерлейкином-32 и пробиотиком *Escherichia coli* Nissle 1917. Использование этого

наноконплекса показало высокую эффективность против немелкоклеточного рака легкого на гуманизированных мышинных моделях [18]. Также НЧС хорошо поддаются функциональным изменениям при допировании активными соединениями, когда наноселен является носителем активного вещества.

Аденокарцинома легкого является весьма распространенным онкологическим заболеванием человека и характеризуется высокой частотой рецидивов и ранним метастазированием. На протяжении нескольких десятилетий рак легкого занимает третье-четвертое место по заболеваемости, уступая только раку кожи и колоректальному раку [175, 176]. Современный уровень медицины не позволяет говорить об относительно благоприятном прогнозе при аденокарциноме легкого по сравнению с другими видами рака. Так, при выявлении аденокарциномы до появления метастазов пятилетняя выживаемость пациентов достигается в 90% случаев, но при обнаружении метастазов в лимфатических узлах этот показатель снижается до 70%. Однако у пациентов с отдаленными метастазами пятилетняя выживаемость составляет 10% [177]. Несмотря на относительно эффективную терапию этого вида ЗНО, высокая заболеваемость требует специальных исследований молекулярных механизмов развития аденокарциномы легкого и разработки новых эффективных методов его лечения. Экспрессия ключевых сигнальных путей, регулирующих апоптоз, является важным фактором прогноза лечения колоректального рака у пациентов и особенно эффективности химиотерапии. [178]. Кроме того, важным фактором развития/подавлением развития аденокарциномы легкого является аутофагия, которая, с одной стороны, подавляет развитие опухоли за счет утилизации дефектных органелл и белков, но с другой стороны, активация аутофагии может активировать защитные пути раковых клеток в условиях окислительного стресса, гипоксии и способствовать канцерогенезу [179, 180].

Наночастицы селена, функционализированные лентинаном, показали высокую противораковую эффективность против клеток карциномы легкого

человека за счет регуляции пути апоптоза, опосредованного митохондриями, и вызвали остановку клеточного цикла в фазе G0/G1. Интересно, что авторы использовали в исследовании 5 линий клеток, а функционализированные НЧС показали наибольшую противоопухолевую эффективность против одной линии клеток [19], что говорит о необходимости поиска молекулярных различий в разных типах рака легкого с целью разработки наиболее эффективной наносистемы для лечения.

Именно эти соображения подвигли нас к изучению противоопухолевого потенциала наночастиц селена и изучению некоторых аспектов механизма их действия в фармакологическом эксперименте.

Объектом нашего исследования были наночастицы селена (НЧС, SeNP), синтезированные в федеральном государственном бюджетном учреждении науки федеральном исследовательском центре «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук». Синтез SeNP осуществлялся руководителем Центра биофотоники д.б.н. С.В. Гудковым методом лазерной абляции 99,99% поликристаллической селеновой мишени в деионизированной (18 МОм × см) воде.

На первом этапе исследования была проведена физико-химическая характеристика НЧС, используемых в работе. Полученные методом лазерной абляции НЧС имеют сферическую форму, размеры наночастиц по данным ПЭМ-изображений составляют от 50 до 200 нанометров, имеют мономодальное распределение по размерам с максимумом 150 нанометров и полушириной 150 нанометров. Ключевой особенностью спектра поглощения водного коллоида, содержащего наночастицы селена, является наличие выраженного максимума поглощения при 590 нм, что характерно для сферических аморфных частиц селена. Пик распределения дзета-потенциала расположен при значениях около -25 мВ. Выявлено, что 1 мл коллоида содержит  $1,4 \times 10^{13}$  наночастиц. По своим физическим структурным показателям полученные наночастицы селена соответствуют описанным в

литературе критериям для неорганических нанолечекарственных форм с позиций их проникновения и распределения в опухолевой ткани.

Острая токсичность изучена у белых беспородных лабораторных мышей вестом 18-20 г в остром эксперименте. При внутрибрюшинном введении Расчетные значения  $LD_{16}$  составили 378 [322 ÷ 434] мг/кг; значение  $LD_{50}$  было равно 502 [430 ÷ 575] мг/кг; показатель  $LD_{94}$  составил 654 [584 ÷ 724] мг/кг. Расчетные значения для наноселена, допированного противоопухолевым соединением из класса производных дигидроакридонa ЛХТ-17-19,  $LD_{16}$  составили 107 [73 ÷ 141] мг/кг; значение  $LD_{50}$  было равно 152 [131 ÷ 183] мг/кг; показатель  $LD_{94}$  составил 238 [197 ÷ 279] мг/кг. Значение среднетоксической дозы для мышей при внутрибрюшинном введении соответствует 3 классу – умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.01.007 – 76 и 4 классу токсичности и опасности по классификации ОЕСД. При внутривенном введении показатель  $LD_{100}$  наночастиц селена составил 415 [355 ÷ 480] мг/кг. Значение токсической дозы для мышей при внутривенном введении соответствует 3 классу – умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.01.007 – 76 и 4 классу токсичности и опасности по классификации ОЕСД. Полученное соотношение токсичности при внутривенном и внутрибрюшинном введении свидетельствует о биоэквивалентности этих путей друг другу и хорошей биодоступности НЧС при внутрибрюшинном введении.

Прежде, чем перейти к животным экспериментам, нам было важно изучить противоопухолевый потенциал нанолечекарственных форм селена в культуре клеток аденокарциномы легкого человека А549. Мы провели исследование в сравнительном эксперименте, в котором в качестве препарата сравнения использовали липосомальную нанолечекарственную форму известного противоопухолевого антибиотика цисплатина – липоплатин. Жидкая наноформа подавляла рост опухолевых клеток также как и у препарата сравнения цисплатина липосомального в широком диапазоне концентраций. Расчет показателя  $IC_{50}$  позволил установить

среднеподавляющую концентрацию, равную  $5,2 \times 10^{-6}$  М, что позволяет утверждать наличие противоопухолевой активности НЧС в культуре клеток аденокарциномы легкого.

Трансплантации опухолей мышиноного происхождения являются хорошо описанной и широко используемой моделью для научных и доклинических исследований. Для изучения механизмов формирования рака легкого и разработки эффективной терапии наиболее подходящим методом является трансплантация линии сингенной аденокарциномы легкого Льюис. Эта линия клеток была впервые получена Льюисом [181]. Сингенные опухолевые клетки карциномы легкого имплантируются реципиентам подкожно, быстро приживаются, и результаты, полученные с помощью этого подхода, хорошо продуцируются. Наиболее очевидным преимуществом использования данного подхода является простота мониторинга роста опухоли [182]. Ограничением подкожной имплантации клеток опухоли является иное микроокружение подкожной опухоли по сравнению с бронхолегочной системой [183]. Существуют ортотопические модели с использованием клеток карциномы Льюиса, когда опухолевые клетки имплантируются в стенку бронха грызунов [184], однако такой подход связан со сложностью хирургической процедуры имплантации и различной степенью послеоперационного воспаления, что также формирует нефизиологическое микроокружение опухоли. Общеизвестно, что подкожная имплантация клеток сингенной аденокарциномы легкого Льюис имитирует признаки запущенного рака и предпочтительна для изучения механизмов противоопухолевого действия различных терапевтических агентов [185].

До и во время инъекций экспериментальным группам мышей 5 мг/кг или 10 мг/кг НЧС и контрольной группе физиологического раствора проводились измерения и сравнительный анализ следующих параметров: веса животных, объема опухоли и количества метастазов в легких, печени и головном мозге. Выбор доз наночастиц селена основывался на определении показателей острой токсичности, а также предыдущих исследованиях на

моделях *in vitro* и *in vivo*, где наблюдались мощные проапоптотические эффекты НЧС в концентрации 10 мкг/мл, которые были зарегистрированы как для линий опухолевых клеток, так и для «нормальных» клеточных популяций.

В то же время инъекции НЧС (0,1 мг/кг или 2,5 мг/кг) мышам в течение 28 дней вызывали одинаково положительные эффекты — снижение адгезивной способности нейтрофилов, подавление экспрессии белков, участвующих в генерации реактивных форм кислорода, тенденцию к подавлению экспрессии генов провоспалительных факторов при обеих концентрациях наночастиц [16]. Таким образом, было интересно наблюдать концентрационные эффекты НЧС в модели ксенотрансплантата.

У мышей опытной группы до 9-го дня инъекций обеих доз наночастиц селена существенных отличий от контроля не наблюдалось, но начиная с 10-го дня инъекций наблюдалось уменьшение объемов опухолей по сравнению с контролем и уже на 12-й день наблюдалось заметное торможение роста опухоли. Причем этот показатель был в 2-2,5 раза меньше, чем в контроле, и существенных отличий между двумя опытными группами, получавшими разные дозы наночастиц селена, не было. Для наночастиц селена и наноконплексов на их основе продемонстрированы противоопухолевые эффекты, однако большая часть работ выполнена на клеточных моделях. Было показано, что наноконпозиты фукоидана/куркумина/SeNP, полученные путем биологического синтеза, оказывают мощное противоопухолевое действие в отношении колоректальной аденокарциномы (CaCo-2 и HT-29), и его эффективность превышает эффективность цисплатина [167]. В своей клеточной части работы мы также отметили, что эффективность наночастиц селена по силе противоопухолевого действия превосходит цисплатин липосомальный.

При определении концентраций НЧС в крови, печени и опухолевом узле нами были получены довольно интересные результаты. Содержание наночастиц на фоне курсового внутривнутрибрюшинного введения в дозах 1 и 10

мг/кг в крови и печени не зависело от вводимой дозы, тогда как в опухоли зависимость была прямо пропорциональной. Связь между концентрацией селена и развитием/течением рака легкого прослежена в ряде современных исследований, однако молекулярные механизмы, даже на уровне изменения экспрессии генов, остаются неуловимыми. Обсуждение роли селена в канцерогенезе может показаться спекулятивным, поскольку есть доказательства того, что потребление селена играет роль в снижении рака желудка, толстой кишки, легких, молочной железы и мочевого пузыря [186]. С другой стороны, рандомизированные клинические испытания не подтверждают защитного эффекта потребления селена в профилактике колоректального рака, меланомы, рака простаты и мочевого пузыря [187]. Исследования на большой группе людей показали U-образную кривую потребления селена и риска развития ЗНО. Оказалось, что люди с самым низким потреблением селена (т. е. 27,8–77,2 мкг/день) были связаны с повышенным риском неоплазий, а люди с самым высоким потреблением (т. е. 169,1–331,7 мкг/день) также имели повышенный риск рака [188]. Однако нет сомнений, что различные источники селена кажутся многообещающими в лечении различных форм опухолевых заболеваний. Было показано, что источник селена, селенометионин, добавляемый с пищей, увеличивал концентрацию селена в крови до 2526,303 мкг/мл и в печени до 9,490 мкг/мл, а также способствовал антиоксидантной защите печени. У контрольных мышей BALB/c концентрация селена в крови составляла 210 мкг/мл, а в печени 0,615 мкг/мл, т.е. селенометионин увеличивал концентрацию селена в 12 и 15 раз соответственно. Наши эксперименты показали, что курсовое введение НЧС увеличивало концентрацию селена в крови и печени, т.е. наночастицы также могут служить источником селена для тканевого метаболизма, но особый интерес представляет наиболее выраженное увеличение концентрации селена в опухолях, что коррелировало с торможением роста опухоли.

Несмотря на достигнутые успехи в диагностике и лечении аденокарциномы легкого, у 20-50% пациентов диагностируются метастазы, при этом у 20-30% пациентов с диагнозом рака легкого локализацией метастазов является печень, головной мозг [2]. НЧС показали свою эффективность при лечении клеток гепатоцеллюлярной карциномы печени линии HepG2 в модели исследования *in vitro*, а также антифибротический эффект в модели *in vivo* фиброза печени, индуцированного ТАА (тиоацетамидом). Мы изучили антиметастатическую активность НЧС при курсовом внутрибрюшинном введении в двух дозах. Оказалось, что внутрибрюшинное введение 5 мг/кг НЧС, допированных соединением ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг, снижало количество метастазов в 3 раза, а инъекция НЧС в дозе 10 мг/кг имела менее выраженный эффект. Для различных форм селена, включая НЧС, показано подавление метастазирования при лечении гепатоцеллюлярной карциномы и колоректального рака.

То есть можно предположить, что на начальных этапах лечения аденокарциномы легкого у мышей организм находился в состоянии стресса и мыши теряли все, что может быть связано с временной потерей аппетита из-за слабой токсичности НЧС. Однако в процессе лечения мыши быстро адаптировались к ежедневным инъекциям и начали набирать массу тела. В то время как контрольные мыши, не получавшие лечения НЧС, начали терять вес по мере прогрессирования рака из-за нарушения функций организма. Интересно, что начало тенденции к снижению массы тела на 12-й день наблюдения за контрольными мышами коррелировало с окончанием экспоненциального роста объема опухоли и установлением его максимального значения. Введение НЧС приводило к повышению концентрации циркулирующего селена в крови как при 5 мг/кг, так и в более высокой дозе. Также наблюдалось значительное повышение концентрации селена в печени мышей, которым вводили НЧС, независимо от концентрации наночастиц, однако допированный ЛХТ-17-19 наноселен накапливался в печени в меньшей степени. Однако была обнаружена четкая дозозависимая

корреляция накопления селена в опухолях, причем самые высокие концентрации селена достигались при инъекциях 10 мг/кг НЧС. В то же время у мышей, которым вводили наноселен, также наблюдалась нормализация массы тела на 12-й день, которая не менялась до 20-го дня, одновременно с ингибированием объема опухоли. Кроме того, инъекции наночастиц селена снижали количество метастазов в 2–2,5 раза по сравнению с контролем.

И в целом данные об изменении экспрессии генома при немелкоклеточном раке легкого, его метастазировании и терапии остаются крайне противоречивыми, что затрудняет разработку неинвазивных подходов к его лечению. Для понимания роли экспрессии различных сигнальных путей при раке легкого и влияния на этот процесс различных наночастиц селена был предпринят ряд исследований.

Согласно полученным в них результатам, выявлена незначительная тенденция к снижению экспрессии сплайсированной формы мРНК фактора транскрипции XBP1s. Показано, что ингибирование IRE1 $\alpha$ -XBP1s может усиливать апоптоз опухолевых клеток за счет генерации активных форм кислорода [189-192]. При этом не было выявлено значимых отличий от контроля в уровнях экспрессии факторов транскрипции ATF-4 и ATF-6. Кроме того, НЧС снижали экспрессию мРНК ряда маркеров, участвующих в активации ЭР-стресса, таких как CHOP, PUMA, GADD34 (регуляторная субъединица 15A протеинфосфатазы 1), BIM (Bcl-2-подобный белок 11), в 2-3 раза. Небольшое снижение экспрессии мРНК CHOP (гомологичный белок C/EBP; известный как GADD153; название гена Ddit3) также повлекло за собой снижение экспрессии его транскрипционной мишени GADD34 [193, 194]. Известно, что CHOP снижает экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и BCL-xL, и одновременно увеличивает экспрессию проапоптотических генов Bax, Bax, Puma, Vim и Noxa [195, 196].

Также было установлено, что не было никаких изменений в экспрессии киназы ASK1, которая регулирует сигнал для апоптоза и относится к

семейству митоген-активируемых киназ MAP3K, после инъекций наночастиц селена. Также не было обнаружено никакого влияния наночастиц на экспрессию ее нижестоящих целевых N-терминальных киназ c-Jun (MAPK8) [197]. Эти данные дополнительно подтверждают отсутствие сигнального пути IRE1 $\alpha$  активации UPR. Дополнительным доказательством этого является резкое снижение экспрессии мРНК Casp-12, а также неизменная экспрессия мРНК Casp-3 после инъекций SeNP. Дело в том, что в дополнение к путям IRE1 $\alpha$ /XBP1s и IRE1 $\alpha$ /TRAF2/ASK1/JNK активации UPR, существует также путь IRE1 $\alpha$ /TRAF2/Casp-12. В этом случае Casp-12, активированный IRE1 $\alpha$ /TRAF2, транслоцируется из ЭР в цитозоль, где инициирует расщепление proCasp-9, активируя эффектор Casp-3 [198-204]. Все эти результаты свидетельствуют об отсутствии апоптотической гибели раковых клеток, в том числе в результате длительного ЭР-стресса.

### **6.1 Итоги выполнения диссертационной работы**

Разработка и изучение эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов на основе наночастиц является актуальной задачей современной биомедицины. Особый интерес представляют попытки перевести исследования с уровня *in vitro* на уровень доклинических исследований *in vivo*. В представленном диссертационном исследовании при изучении острой токсичности при внутрибрюшинном и внутривенном введении мы установили, что наночастицы селена относятся к умеренно токсичным веществам, их допирование соединением дигидроакридона ЛХТ-17-19 сопровождается ростом токсичности наноселена с одновременным уменьшением токсических свойств антибластомной субстанции. В культуре опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого – аденокарциномы легкого человека была показана цитостатическая активность НЧС, превышающая таковую препарата сравнения – цисплатина липосомального.

Применение наноселена в виде контейнера для соединения ЛХТ-17-19 приводит к увеличению противоопухолевой цитотоксичности [203-205].

На этапе исследований *in vivo* мышам подкожно имплантировали синегную опухоль легкого – клеточную линию карциномы легкого Льюис, выращивали опухоль и вводили внутривнутрибрюшинно наночастицы селена диаметром 100 нм, полученные методом лазерной абляции, а также те же наночастицы, загруженные соединением дигидроакридон ЛХТ-17-19. С помощью морфометрических измерений установлено, что курсовое введение 5 мг/кг допированных или 10 мг/кг недопированных НЧС тормозило потерю веса у мышей при развитии опухоли, уменьшало размер опухоли в 2-2,5 раза и подавляло метастазирование в 1,5-3 раза, причем наибольший антиметастатический эффект, превышающий эффект НЧС и ЛХТ-17-19 в виде монотерапии. Анализ уровня селена в крови, печени и опухолевых образцах мышей методом атомно-абсорбционной спектрометрии после окончания экспериментального воздействия показал, что наночастицы повышали уровень селена в крови и печени мышей без существенной дозозависимости, тогда как в опухолях было выявлено дозозависимое увеличение концентрации селена от концентрации наночастиц, причем 10 мг/кг НЧС вызывало более выраженное увеличение концентрации селена [203-205].

С помощью ПЦР и вестерн-блоттинга удалось установить, что введение НЧС приводило к повышению экспрессии генов, кодирующих противовоспалительные и антигипоксические белки, но снижало экспрессию антиоксидантных селенсодержащих белков и белков, ответственных за пролиферацию опухолевых клеток. Обе дозы и допирование НЧС веществом ЛХТ-17-19 приводили к схожим эффектам, но повышение вводимой дозы наноселена до 10 мг/кг влияло на экспрессию большего числа генов, а эффекты на экспрессию были более «яркими». Таким образом, комплекс представленных экспериментов показал, что курсовое внутривнутрибрюшинное введение наночастиц селена в дозах 5 мг/кг, допированных ЛХТ-17-19 в дозе

3,7 мг/кг, или 10 мг/кг недопированных НЧС сопровождается транспортировкой наночастиц кровотоком и накоплением в наибольшей концентрации в аденокарциноме легкого, по сравнению с печенью, что свидетельствует о направленности НЧС в отношении опухолей даже без функционализации специфическими молекулами. В результате наблюдалось изменение паттернов экспрессии генов и ряда белков, и как следствие, наблюдалось уменьшение объема опухоли, нормализация веса мышечной и сохранение положительной динамики на протяжении всего периода наблюдения [203-205].

## **6.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования**

При выполнении диссертационной работы нами были получены результаты, закладывающие фундамент для проведения последующих научных изысканий. Большой научно-практический интерес представляет вопрос широты противоопухолевого действия наночастиц селена, для ответа на который необходимо расширить спектр моделей экспериментального канцерогенеза. Отсутствие дозозависимого накопления НЧС в крови и печени требует проведения фармакокинетических исследований для определения основных закономерностей биологического распределения НЧС. Также отдельного исследования заслуживает возможность применения наноселена в качестве транспортной формы для направленного воздействия других противоопухолевых соединений и веществ с антибластной активностью.

## ВЫВОДЫ

1. При внутрибрюшинном введении наночастиц селена расчетные значения  $LD_{16}$  составили 378 [322 ÷ 434] мг/кг; значение  $LD_{50}$  было равно 502 [430 ÷ 575] мг/кг; показатель  $LD_{94}$  составил 654 [584 ÷ 724] мг/кг; показатель  $LD_{100}$  наночастиц селена при внутривенном введении мышам составил 415 [355 ÷ 480] мг/кг. Допирование НЧС соединением ЛХТ-17-19 повышает острую токсичность наноселена, но более, чем в два раза снижает острую токсичность ЛХТ-17-19. Токсикологический профиль НЧС для мышей при внутрибрюшинном и внутривенном введении соответствует 3 классу – умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.01.007 – 76 и 4 классу токсичности и опасности по классификации ОЕСД.

2. Жидкая лекарственная форма наноселена подавляет рост опухолевых клеток аденокарциномы легкого A549 в широком диапазоне концентраций и превосходит по силе эффекта препарат сравнения цисплатин липосомальный. Среднеподавляющая концентрация НЧС равна  $5,2 \times 10^{-6}$  М, что позволяет утверждать наличие противоопухолевой активности лекарственной формы в исследуемой культуре. Допирование НЧС ингибитором EGFR соединением ЛХТ-17-19 приводит к повышению цитотоксического потенциала как ингибитора, так и наноселена.

3. На сингенной модели гетеротопической аденокарциномы легкого Льюис курсовое внутрибрюшинное введение 5 мг/кг допированных ЛХТ-17-19, или 10 мг/кг недопированных наночастиц селена тормозило потерю веса у мышей при развитии опухоли, уменьшало размер опухоли в 2-2,5 раза и подавляло метастазирование в 1,5-3 раза, повышало выживаемость животных.

4. Анализ уровня селена в крови, печени и опухолевых образцах мышей методом атомно-абсорбционной спектрометрии после окончания экспериментального воздействия показал, что наночастицы повышали уровень селена в крови и печени мышей без существенной дозозависимости,

тогда как в опухолях было выявлено дозозависимое увеличение концентрации селена от концентрации наночастиц, причем 10 мг/кг НЧС вызывало более выраженное увеличение концентрации селена, что можно рассматривать как доказательство селективности накопления НЧС опухолью и направленности действия.

5. Введение НЧС приводило к повышению экспрессии генов, кодирующих противовоспалительные и антигипоксические белки. Обе дозы НЧС приводили к схожим эффектам, при этом допирование НЧС противоопухолевым соединением ЛХТ-17-19 влияло на экспрессию большего числа генов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для разработки лекарственных форм противоопухолевых препаратов могут быть использованы полученные методом лазерной абляции наночастицы селена, имеющие сферическую форму, размеры по данным ПЭМ-изображений от 50 до 200 нанометров, имеющие мономодальное распределение по размерам с максимумом 150 нанометров и полушириной 150 нанометров с пиком распределения дзета-потенциала, расположенным при значениях около -25 мВ, с содержанием в 1 мл коллоида  $1,4 \times 10^{13}$  наночастиц.

2. Для исследования системной и тканевой фармакокинетики лекарственных препаратов на основе наночастиц селена может быть использована аналитическая методика на основе атомно-абсорбционной спектроскопии.

3. Наночастицы селена могут быть использованы в качестве фармакологических контейнеров для адресной доставки действующих лекарственных веществ, обладающих антибластомной активностью, к очагу патологического процесса.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ЗНО – злокачественные новообразования

ИЛ – интерлейкины

ЛД – летальная доза

МТТ – тест с триметилтетразолием хлоридом

НЧС – наночастицы селена

ПЭМ – позитронно-эмиссионная микроскопия

ЭР – эндоплазматический ретикулум

Angpt1 – ангиопоэтин 1

ATF-4 – активирующий фактор транскрипции 4

ATF-6 – активирующий фактор транскрипции 6

BCL-2 – регулятор апоптоза Bcl-2

BCL-xL – В-клеточная лимфома-экстра большая

CASP-1, 3, 12 – каспаза 1, 3, 12

CHOP – гомологичный белок C/EBP

cKIT – тирозин-протеинкиназа KIT (протоонкоген)

DKK1 – белок 1, связанный с Диккопфом

EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

Hif-1 $\alpha$  – фактор 1-альфа, индуцируемый гипоксией

IC<sub>50</sub> – среднеподавляющая концентрация

MAPK1 – митоген-активируемая протеинкиназа 1

MAPK8 – митоген-активируемая протеинкиназа 8

MAPK3 – митоген-активируемая протеинкиназа 3

mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих

NOX1 – НАДФН-оксидаза 1

NOX4 – НАДФН-оксидаза 4

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PI3K – фосфатидилинозитол 3-киназы

PUMA – модулятор апоптоза, активируемый p53

SeNP – наночастицы селена

STAT3 – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 3

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли

TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста бета

UPR, unfolded protein response обширный белковый ответ

VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов A

XBP $s$  – сплайсированная форма X-box связывающего белка 1

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Злокачественные новообразования в России в 2024 году (заболеваемость) / под ред. А.Д. Каприна [и др.] – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – илл. – 178 с.
2. Zhang, B. Li // *Int. J. Surg.* – 2024. – Vol. 110. – № 4. – P. 2288-2299.
3. Cancer statistics for the year 2020: an overview // J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2021. – Vol. 149. – №. 4. – P. 778-789.
4. Marwah, H. Advancements in solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for breast cancer therapy / H. Marwah, H.K. Dewangan // *Curr. Pharm. Des.* – 2024. – Vol. 30. – № 37. – P. 2922-2936.
5. Combinational chemotherapy and photothermal therapy using a gold nanorod platform for cancer treatment / N. Shukla, B. Singh, H.J. Kim [et al.] // *Part. Part. Syst. Charact.* – 2020. – Vol. 37. – № 8. – ID: 2000099.
6. Metal-based nanoparticle in cancer treatment: lessons learned and challenges / A. Hheidari, J. Mohammadi, M. Ghodousi [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2024. – Vol. 12. – ID: 1436297.
7. Review on the health-promoting effect of adequate selenium status / Y. Sun, Z. Wang, P. Gong [et al.] // *Front. Nutr.* – 2023. – Vol. 10. – ID: 1136458.
8. Metabolism of selenium, selenocysteine, and selenoproteins in ferroptosis in solid tumor cancers / B.K. Shimada, S. Swanson, P. Toh, L.A. Seale // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12. – № 11. – ID: 1581.
9. Biological activity of selenium and its impact on human health / G. Genchi, G. Lauria, A. Catalano [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 3. –ID: 2633.

10. Physiological benefits of novel selenium delivery via nanoparticles / A. Au, A. Mojadadi, J.Y. Shao [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 7. –ID: 6068.
11. Rayman, M.P. Selenium intake, status, and health: a complex relationship / M.P. Rayman // *Hormones (Athens)*. – 2020. – Vol. 19. – № 1. – P. 9-14.
12. Immunomodulatory roles of selenium nanoparticles: novel arts for potential immunotherapy strategy development / G. Chen, F. Yang, S. Fan [et al.] // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – ID: 956181.
13. Age-dependent assessment of selenium nanoparticles: biodistribution and toxicity study in young and adult rats / H. Singh, J. Kaur, A.K. Datusalia, S. Naqvi // *Nanomedicine (Lond)*. – 2023. – Vol. 18. – № 27. – P. 2021-2038.
14. Biomedical potential of plant-based selenium nanoparticles: a comprehensive review on therapeutic and mechanistic aspects / M. Ikram, B. Javed, N.I. Raja, Z.U. Mashwani // *Int. J. Nanomed.* – 2021. – Vol. 16. – P. 249-268.
15. Selenium nanoparticles: enhanced nutrition and beyond / N. Chen, P. Yao, W. Zhang [et al.] // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2023. – Vol. 63. – № 33. – P. 12360-12371.
16. Modulation of gut microbiota by *Ilex kudingcha* improves dextran sulfate sodium-induced colitis / P. Wan, Y. Peng, G. Chen [et al.] // *Food Res. Int.* – 2019. – Vol. 126. – ID: 108595.
17. Comparative study of the anticancer effects of selenium nanoparticles and selenium nanorods. Regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling, ER stress and apoptosis / E.G. Varlamova, I.V. Baimler, S.V. Gudkov, E.A. Turovsky // *Appl. Sci.* – 2023. – Vol. 13. – № 19. – ID: 10763.
18. Biogenic selenium nanoparticles produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo / K. Spyridopoulou, E. Tryfonopoulou, G. Aindelis [et al.] // *Nanoscale Adv.* – 2021. – Vol. 3. – № 9. – P. 2516-2528.

19. Кудрявцев, М.Ю. Противоопухолевая активность некоторых производных пиридинкарбоновых кислот (in vitro и in vivo исследование). – Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 3.3.6. / Кудрявцев Михаил Юрьевич. – Москва, 2022. – 24 с.

20. 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена подавляет рост и метастазирование ксенографтной аденокарциномы легкого / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Р. Сулова, О.Н. Дерябина, Д.С. Блинов, П.Н. Жданов, В.И. Шаробаро // Сеченовский Вестник.– 2019. – Т. 2(2). – С. 15-20.

21. Nanomedicine in cancer therapy / D. Fan, Y. Cao, M. Cao [et al.] // Signal Transduct. Target. Ther. – 2023. – Vol. 8. – № 1. – ID: 293.

22. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2021. – Vol. 71. – № 3. – P. 209-249.

23. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy / P. Gotwals, S. Cameron, D. Cipolletta [et al.] // Nat. Rev. Cancer. – 2017. – Vol. 17. – № 5. – P. 286-301.

24. Cancer nanomedicine for combination cancer immunotherapy / J. Nam, S. Son, K.S. Park [et al.]. // Nat. Rev. Mater. – 2019. – Vol. 4. – P. 398-414.

25. Delivery technologies for cancer immunotherapy / R.S. Riley, C.H. June, R. Langer, M.J. Mitchell // Nat. Rev. Drug Discov. – 2019. – Vol. 18. – № 3. – P. 175-196.

26. Bangham, A.D. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope / A.D. Bangham, R.W. Horne/ J. Mol. Biol. – 1964. – Vol. 8. – № 5. – P. 660-668. – IN2-IN10.

27. Folkman, J. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy / J. Folkman, D.M. Long // J. Surg. Res. – 1964. – Vol. 4. – № 3. – P. 139-142.

28. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A / L.D. Leserman, J. Barbet, F. Kourilsky, J.N. Weinstein // *Nature*. – 1980. – Vol. 288. – № 5791. – P.602-604.

29. Heath, T.D. Antibody targeting of liposomes: cell specificity obtained by conjugation of F(ab')<sub>2</sub> to vesicle surface / T.D. Heath, R.T. Fraley, D. Papahadjopoulos // *Science*. – 1980. – Vol. 210. – № 4469. – P. 539-541.

30. Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer Res*. – 1986. – Vol. 46. – № 12 Pt 1. – P. 6387-6392.

31. Gerlowski, L.E. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues / L.E. Gerlowski, R.K. Jain // *Microvasc. Res*. – 1986. – Vol. 31. – № 3. – P. 288-305.

32. Nicolau, C. Demetrios papahadjopoulos and liposomes: from art to science / C. Nicolau, C.R. Alving // *J. Liposome Res*. – 1995. – № 5. – P. 627-634.

33. DQAsomes: a novel potential drug and gene delivery system made from dequalinium / V. Weissig, J. Lasch, G. Erdos [et al.] // *Pharm Res*. – 1998. – Vol. 15. – № 2. – P. 334-337.

34. Amato, I. Nanotechnologists seek biological niches / I. Amato // *Cell*. – 2005. – Vol. 123. – № 6. – P. 967-970.

35. National Library of Medicine. Safety study of CALAA-01 to treat solid tumor cancers, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00689065> (2013).

36. MITO-Porter: a liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion / Y. Yamada, H. Akita, H. Kamiya [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – Vol. 1778. – № 2. – P. 423-432.

37. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform / C.M.J. Hu, L. Zhang, S. Aryal [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108. – № 27. – P. 10980-10985.

38. U.S. National Library of Medicine. A study of BIND-014 given to patients with advanced or metastatic cancer, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01300533> (2016).

39. Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments / K. Yokoi, T. Tanei, B. Godin [et al.] // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 345. – № 1. – P. 48-55.

40. Capillary-wall collagen as a biophysical marker of nanotherapeutic permeability into the tumor microenvironment / K. Yokoi, M. Kojic, M. Milosevic [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. – № 16. – P. 4239-4246.

41. Predicting therapeutic nanomedicine efficacy using a companion magnetic resonance imaging nanoparticle / M.A. Miller, S. Gadde, C. Pfirschke, [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7. – № 314. – ID: 314ra183.

42. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors / H.A. Burris, M.R. Patel, D.C. Cho [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – Vol. 37. – № 15\_suppl. – P. 2523-2523.

43. Massively parallel pooled screening reveals genomic determinants of nanoparticle delivery / N. Boehnke, J.P. Straehla, H.C. Safford, et al. // *Science.* – 2022. – Vol. 377. – № 6604. – ID: eabm5551.

44. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities / J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad // *Nat. Rev. Cancer.* – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 20-37.

45. Targeted drug delivery strategies for precision medicines / M.T. Manzari, Y. Shamay, H. Kiguchi, [et al.] // *Nat. Rev. Mater.* – 2021. – Vol. 6. – № 4. – P. 351-370.

46. Engineering precision nanoparticles for drug delivery / M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2021. – Vol. 20. – № 2. – P. 101-124.

47. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy / D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, [et al.]. // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – Vol. 2. – № 12. – P. 751-760.
48. Survey of clinical translation of cancer nanomedicines-lessons learned from successes and failures / H. He, L. Liu, E.E. Morin, [et al.] // *Acc. Chem. Res.* – 2019. – Vol. 52. – № 9. – P. 2445-2461.
49. Tumor targeting via EPR: strategies to enhance patient responses / S.K. Golombek, J.N. May, B. Theek, [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – Vol. 130. – P. 17-38.
50. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics / D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9. – № 1. – ID: 1410.
51. Ruoslahti, E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery / E. Ruoslahti // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol. 110-111. – P. 3-12.
52. Targeting strategies for tissue-specific drug delivery / Z. Zhao, A. Ukidve, J. Kim, S. Mitragotri // *Cell.* – 2020. – Vol. 181. – № 1. – P. 151-167.
53. Youn, Y.S. Perspectives on the past, present, and future of cancer nanomedicine / Y.S. Youn, Y.H. Bae // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – Vol. 130. – P. 3-11.
54. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology / N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – Vol. 66. – P. 2-25.
55. Cell membrane coating nanotechnology / R.H. Fang, A.V. Kroll, W. Gao, L. Zhang // *Adv Mater.* – 2018. – Vol. 30. – №. 23. – ID: 1706759.
56. Recent progress in targeted delivery vectors based on biomimetic nanoparticles / L. Chen, W. Hong, W. Ren, [et al.] // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2021. – Vol. 6. – № 1. – ID: 225.
57. Rajendran, L. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery / L. Rajendran, H.J. Knölker, K. Simons // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9. – № 1. – P. 29-42.

58. Pan, L. Cancer cell nucleus-targeting nanocomposites for advanced tumor therapeutics / L. Pan, J. Liu, J. Shi // *Chem. Soc. Rev.* – 2018. – Vol. 47. – № 18. – P. 6930-6946.
59. A framework for designing delivery systems / W. Poon, B.R. Kingston, B. Ouyang, [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2020. – Vol. 15. – № 10. – P. 819-829.
60. Sakhrani, N.M. Organelle targeting: third level of drug targeting / N.M. Sakhrani, H. Padh // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2013. – Vol. 7. – P. 585-599.
61. Future of nanotherapeutics: targeting the cellular sub-organelles / X. Ma, N. Gong, L. Zhong, [et al.] // *Biomaterials.* – 2016. – Vol. 97. – P. 10-21.
62. Multistage nanovehicle delivery system based on stepwise size reduction and charge reversal for programmed nuclear targeting of systemically administered anticancer drugs / L. Li, W. Sun, J. Zhong, [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2015. – Vol. 25. – № 26. – P. 4101-4113
63. Surface charge switchable nanoparticles based on zwitterionic polymer for enhanced drug delivery to tumor / Y.Y. Yuan, C.Q. Mao, X.J. Du // *Adv. Mater.* – 2012. – Vol. 24. – № 40. – P. 5476-5480.
64. Acidity-triggered ligand-presenting nanoparticles to overcome sequential drug delivery barriers to tumors / T. Wang, D. Wang, J. Liu, [et al.] // *Nano Lett.* – 2017. – Vol. 17. – № 9. – P. 5429-5436.
65. Rational design of cancer nanomedicine: nanoproperty integration and synchronization / Q. Sun, Z. Zhou, N. Qiu, Y. Shen // *Adv. Mater.* – 2017. – Vol. 29. – № 14. – ID: 1606628.
66. Design of smart size-, surface-, and shape-switching nanoparticles to improve therapeutic efficacy / X. Li, E.C. Montague, A. Pollinzi, [et al.] // *Small.* – 2022. – Vol. 18. – № 6. – ID: 2104632.
67. Stimuli-responsive size-changeable strategy for cancer theranostics / G. Cheng, D. Wu, S. Wang, [et al.] // *Nano Today.* – 2021. – Vol. 38. – ID: 101208.

68. Stimuli-responsive clustered nanoparticles for improved tumor penetration and therapeutic efficacy / H.J. Li, J.Z. Du, X.J. Du, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2016. – Vol. 113. – № 15. – P. 4164-4169.
69. Maeda, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity / H. Maeda // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 91. – P. 3-6.
70. Kerbel, R.S. Tumor angiogenesis / R.S. Kerbel // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 358. – № 19. – P. 2039-2049.
71. Jain, R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy / R.K. Jain // *Science.* – 2005. – Vol. 307. – № 5706. – P. 58-62.
72. Seki, T., Fang, J. & Maeda, H. In: *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics.* (eds. Y. Lu & R. I. Mahato) 93–120 (Springer, USA, 2009).
73. Jain, R.K. Delivering nanomedicine to solid tumors / R.K. Jain, T. Stylianopoulos // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 7. – № 11. – P. 653-64.
74. Maeda, H. The 35th anniversary of the discovery of EPR effect: a new wave of nanomedicines for tumor-targeted drug delivery—personal remarks and future prospects / H. Maeda // *J. Pers. Med.* – 2021. – Vol. 11. – № 3. – ID: 229.
75. Matsumura, Y. Cancer stromal targeting therapy to overcome the pitfall of EPR effect / Y. Matsumura // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – Vol. 154-155. – P. 142-150.
76. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues / Y. Noguchi, J. Wu, R. Duncan, et al. // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1998. – Vol. 89. – № 3. – P. 307-314.
77. Renal clearance of quantum dots / H.S. Choi, W. Liu, P. Misra, [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25. – № 10. – P. 1165-1170.
78. Davis, M.E. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer / M.E. Davis, Z.G. Chen, D.M. Shin // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7. – № 9. – P. 771-782.

79. Blanco, E. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery / E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari // *Nat. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33. – № 9. – P. 941-951.

80. Form follows function: nanoparticle shape and its implications for nanomedicine / C. Kinnear, T.L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo, [et al.] // *Chem. Rev.* – 2017. – Vol. 117. – № 17. – P. 11476-11521.

81. Fang, J. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers / J. Fang, W. Islam, H. Maeda // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – Vol. 157. – P. 142-160.

82. Iwai, K. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: enhanced therapeutic effect and X-ray image / K. Iwai, H. Maeda, T. Konno // *Cancer Res.* – 1984. – Vol. 44. – № 5. – P. 2115-2121.

83. Nagamitsu, A. Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor-targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: cases of advanced solid tumors / A. Nagamitsu, K. Greish, H. Maeda // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 39. – № 11. – P. 756-766.

84. Maeda, H. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs / H. Maeda, M. Khatami // *Clin. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 7. – № 1. – ID: 11.

85. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer / D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2019. – Vol. 98. – P. 1252-1276.

86. Nanoparticles' interactions with vasculature in diseases / J.K. Tee, L.X. Yip, E.S. Tan, [et al.]. // *Chem. Soc. Rev.* – 2019. – Vol. 48. – № 21. – P. 5381-5407.

87. Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery / Y. Matsumoto, J.W. Nichols, K. Toh, [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2016. – Vol. 11. – № 6. – P. 533-538.

88. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle / K.K. Griendling, M. Ushio-Fukai, B. Lassègue, R.W. Alexander // *Hypertension.* – 1997. – Vol. 29. – № 1 Pt 2. – P. 366-373.

89. A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II<sub>23</sub> / M. Suzuki, K. Hori, I. Abe, [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1981. – Vol. 67. – № 3. – P. 663-669.

90. Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure / C.J. Li, Y. Miyamoto, Y. Kojima, H. Maeda // *Br. J. Cancer.* – 1993. – Vol. 67. – № 5. – P. 975-980.

91. Bradykinin: inflammatory product of the coagulation system / Z. Hofman, S. de Maat, C.E. Hack, C. Maas // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2016. – Vol. 51. – № 2. – P. 152-161.

92. Maeda, H. Purification and identification of [hydroxypropyl<sup>3</sup>]bradykinin in ascitic fluid from a patient with gastric cancer / H. Maeda, Y. Matsumura, H. Kato // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – № 31. – P. 16051-16054.

93. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications / H. Maeda, J. Fang, T. Inutsuka, Y. Kitamoto // *Int. Immunopharmacol.* – 2003. – Vol. 3. – № 3. – P. 319-328.

94. Acid-responsive HPMA copolymer-bradykinin conjugate enhances tumor-targeted delivery of nanomedicine / E. Appiah, H. Nakamura, R. Pola, et al. // *J. Control Release.* – 2021. – Vol. 337. – P. 546-556.

95. Marcos-Ramiro, B. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho / B. Marcos-Ramiro, D. García-Weber, J. Millán // *Thromb. Haemost.* – 2014. – Vol. 112. – № 6. – P. 1088-1102.

96. A robust approach to enhance tumor-selective accumulation of nanoparticles / Y. Qiao, X. Huang, S. Nimmagadda, [et al.] // *Oncotarget*. – 2011. – Vol. 2. – № 1-2. – P. 59-68.
97. Hyperthermia and smart drug delivery systems for solid tumor therapy / A.L. B. Seynhaeve, M. Amin, D. Haemmerich, [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – Vol. 163-164. – P.125-144.
98. Kong, G. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size / G. Kong, R.D. Braun, M.W. Dewhirst // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – № 16. – P. 4440-4445.
99. Kong, G. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature / G. Kong, R.D. Braun, M.W. Dewhirst // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – № 7. – P. 3027-3032.
100. Improved intratumoral nanoparticle extravasation and penetration by mild hyperthermia / L. Li, T.L. ten Hagen, M. Bolkestein, [et al.] // *J. Control Release*. – 2013. – Vol. 167. – № 2. – P. 130-137.
101. Stapleton, S. Radiation effects on the tumor microenvironment: implications for nanomedicine delivery / S. Stapleton, D. Jaffray, M. Milosevic // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol. 109. – P. 119-130.
102. Effect of radiotherapy and hyperthermia on the tumor accumulation of HPMA copolymer-based drug delivery systems / T. Lammers, P. Peschke, R. Kühnlein, [et al.] // *J. Control Release*. – 2007. – Vol. 117. – № 3. – P. 333-341.
103. Giustini, A.J. Ionizing radiation increases systemic nanoparticle tumor accumulation / A.J. Giustini, A.A. Petryk, P.J. Hoopes // *Nanomedicine*. –2012. – Vol. 8. – № 6. – P. 818-821.
104. Radiation therapy primes tumors for nanotherapeutic delivery via macrophage-mediated vascular bursts / M.A. Miller, R. Chandra, M.F. Cuccarese, et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 9. – № 392. – ID: eaal0225.
105. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms / I. Lentacker, I. De Cock, R. Deckers, [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – Vol. 72. – P. 49-64.

106. Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma / L. H. Treat, N. McDannold, Y. Zhang, [et al.]. // *Ultrasound Med. Biol.* – 2012. – Vol. 38. – № 10. – P. 1716-1725.

107. Combination of chemotherapy and photodynamic therapy for cancer treatment with sonoporation effects / H. Lee, J. Han, H. Shin, [et al.] // *J. Control Release.* – 2018. – Vol. 283. – P. 190-199.

108. Chen, F. Tumor vasculature targeting: a generally applicable approach for functionalized nanomaterials / F. Chen, W. Cai // *Small.* – 2014. – Vol. 10. – № 10. – P. 1887-1893.

109. Ellis, L.M. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity / L.M. Ellis, D.J. Hicklin // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – № 8. – P. 579-591.

110. VEGF121-conjugated mesoporous silica nanoparticle: a tumor targeted drug delivery system / S. Goel, F. Chen, H. Hong, [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2014. – Vol. 6. – № 23. – P. 21677-21685.

111. VEGFR targeting leads to significantly enhanced tumor uptake of nanographene oxide in vivo / S. Shi, K. Yang, H. Hong, [et al.] // *Biomaterials.* – 2015. – Vol. 39. – P. 39-46.

112. Antitumor effect of <sup>131</sup>I-labeled anti-VEGFR2 targeted mesoporous silica nanoparticles in anaplastic thyroid cancer / R. Zhang, Y. Zhang, J. Tan, [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2019. – Vol. 14. – № 1. – ID: 96.

113. Desgrosellier, J.S. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities / J.S. Desgrosellier, D.A. Cheresh // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 9-22.

114. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice / Z. Liu, W. Cai, L. He, [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – Vol. 2. – № 1. – P. 47-52.

115. Li, Z.J. Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery / Z.J. Li, C.H. Cho // *J. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 10 Suppl 1. – № Suppl 1. – ID: S1.

116. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis / E.A. Murphy, B.K. Majeti, L.A. Barnes, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – Vol. 105. – № 27. – P. 9343-9348.

117. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel / F. Danhier, B. Vroman, N. Lecouturier, [et al.]. // *J. Control. Release.* – 2009. – Vol. 140. – № 2. – P. 166-173.

118. Hollow mesoporous silica nanoparticles for tumor vasculature targeting and PET image-guided drug delivery / R. Chakravarty, S. Goel, H. Hong, et al. // *Nanomedicine (Lond).* – 2015. – Vol. 10. – № 8. – P. 1233-1246.

119. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy / N.A. Dallas, S. Samuel, L. Xia, [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – № 7. – P. 1931-1937.

120. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours / E. Fonsatti, H.J. Nicolay, M. Altomonte, [et al.]. // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 86. – № 1. – P. 12-19.

121. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy / F. Nassiri, M.D. Cusimano, B.W. Scheithauer, et al. // *Anticancer Res.* – 2011. – Vol. 31. – № 6. – P. 2283-2290.

122. In vivo tumor targeting and image-guided drug delivery with antibody-conjugated, radiolabeled mesoporous silica nanoparticles / F. Chen, H. Hong, Y. Zhang, [et al.] // *ACS Nano.* – 2013. – Vol. 7. – № 10. – P. 9027-9039.

123. In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene / H. Hong, K. Yang, Y. Zhang, [et al.] // *ACS Nano.* – 2012. – Vol. 6. – № 3. – P. 2361-2370.

124. Engineering of hollow mesoporous silica nanoparticles for remarkably enhanced tumor active targeting efficacy / F. Chen, H. Hong, S. Shi, [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – ID: 5080.

125. In vivo tumor vasculature targeting of CuS@MSN based theranostic nanomedicine / F. Chen, H. Hong, S. Goel, et al. // *ACS Nano.* – 2015. – Vol. 9. – № 4. – P. 3926-3934.

126. General synthesis of silica-based yolk/shell hybrid nanomaterials and in vivo tumor vasculature targeting / F. Chen, S. Goel, S. Shi, [et al.] // *Nano Res.* – 2018. – Vol. 11. – № 9. – P. 4890-4904.

127. A new theranostic system based on endoglin aptamer conjugated fluorescent silica nanoparticles / J. Tan, N. Yang, L. Zhong, [et al.] // *Theranostics.* – 2017. – Vol. 7. – № 19. – P. 4862-4876.

128. Cell-mediated targeting drugs delivery systems / H. Yu, Z. Yang, F. Li, [et al.] // *Drug Deliv.* – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 1425-1437.

129. Mitchell, M.J. Leukocytes as carriers for targeted cancer drug delivery / M.J. Mitchell, M.R. King // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2015. – Vol. 12. – №3. – P. 375-392.

130. PLGA based nanoparticles for the monocyte-mediated anti-tumor drug delivery system / P. Allavena, A. Palmioli, R. Avigni, [et al.] // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2020. – Vol. 16. – № 2. – P. 212-223.

131. A novel macrophage-mediated biomimetic delivery system with NIR-triggered release for prostate cancer therapy / L. Qiang, Z. Cai, W. Jiang, [et al.] // *J. Nanobiotechnology.* – 2019. – Vol. 17. – №1. – ID: 83.

132. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors / J. Choi, H.Y. Kim, E.J. Ju, [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – № 16. – P. 4195-4203.

133. Selective uptake of chitosan polymeric micelles by circulating monocytes for enhanced tumor targeting / X. Yang, K. Lian, Y. Tan, [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 229. – ID: 115435.

134. Coffelt, S.B. Neutrophils in cancer: neutral no more / S.B. Coffelt, M.D. Wellenstein, K.E. de Visser // *Nat. Rev. Cancer.* – 2016. – Vol. 16. – № 7. – P. 431-446.

135. Modulation of blood–brain barrier permeability by neutrophils: in vitro and in vivo studies / S.L. Joice, F. Mydeen, P.O. Couraud, [et al.] // *Brain Res.* – 2009. – Vol. 1298. – P. 13-23.

136. Neutrophil infiltration into human gliomas / G. Fossati, G. Ricevuti, S.W. Edwards, [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 1999. – Vol. 98. – № 4. – P. 349-354.

137. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence / J. Xue, Z. Zhao, L. Zhang, [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2017. – Vol. 12. – № 7. – P. 692-700.

138. Neutrophil-mediated transport is crucial for delivery of short-circulating magnetic nanoparticles to tumors / V. Naumenko, A. Nikitin, A. Garanina, [et al.] // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 104. – P. 176-187.

139. Restifo, N.P. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response / N.P. Restifo, M.E. Dudley, S.A. Rosenberg // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – № 4. – P. 269-281.

140. Waldman, A.D. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice / A.D. Waldman, J.M. Fritz, M.J. Lenardo // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 20. – № 11. – P. 651-668.

141. Nanomaterials for T-cell cancer immunotherapy / N. Gong, N.C. Sheppard, M.M. Billingsley, [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 25-36.

142. Enhancing T cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery / L. Tang, Y. Zheng, M.B. Melo, [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36. – № 8. – P. 707-716.

143. Irvine, D.J. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine / D.J. Irvine, E.L. Dane // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 20. – № 5. – P. 321-334.

144. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy / Y. Zhao, S. Tang, J. Guo, [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – ID: 44758.

145. Efficient lung cancer-targeted drug delivery via a nanoparticle/ MSC system / X. Wang, H. Chen, X. Zeng, [et al.] // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 167-176.

146. Stem cell-mediated delivery of SPIO-loaded gold nanoparticles for the theranosis of liver injury and hepatocellular carcinoma / J. Zhao, J. Vykoukal, M. Abdelsalam, [et al.] // *Nanotechnology.* – 2014. – Vol. 25. – № 40. – ID: 405101.

147. Neural stem cells improve intracranial nanoparticle retention and tumor-selective distribution / R. Mooney, Y. Weng, R. Tirughana-Sambandan, [et al.] // *Future Oncol.* – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. 401-415.

148. Conjugation of pH-responsive nanoparticles to neural stem cells improves intratumoral therapy / R. Mooney, Y. Weng, E. Garcia, [et al.] // *J. Control. Release.* – 2014. – Vol. 191. – P. 82-89.

149. Erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt): nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis / Z. Zhao, A. Ukidve, Y. Gao et al. // *Sci. Adv.* – 2019. – Vol. 5. – № 11. – ID: eaax9250.

150. 'Marker-of-self' functionalization of nanoscale particles through a top-down cellular membrane coating approach / C.M. Hu, R.H. Fang, B.T. Luk, [et al.] // *Nanoscale.* – 2013. – Vol. 5. – № 7. – P. 2664-2668.

151. Minimal "Self" peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles / P.L. Rodriguez, T. Harada, D.A. Christian, [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 339. – № 6122. – P. 971-975.

152. Remotely controlled red blood cell carriers for cancer targeting and near-infrared light-triggered drug release in combined photothermal-chemotherapy / X. Sun, C. Wang, M. Gao, [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2015. – Vol. 25. – № 16. – P. 2386-2394.

153. Fabrication of red blood cell-based multimodal theranostic probes for second near-infrared window fluorescence imaging-guided tumor surgery and

photodynamic therapy / P. Wang, X. Wang, Q. Luo, [et al.] // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9. – № 2. – P. 369-380.

154. Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth / I.V. Zelepukin, A.V. Yaremenko, V.O. Shipunova, [et al.] // *Nanoscale*. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 1636-1646.

155. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs / K.N. Sugahara, T. Teesalu, P.P. Karmali, [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – № 5981. – P.1031-1035.

156. Tumor-penetrating peptide enhances transcytosis of silicasome-based chemotherapy for pancreatic cancer / X. Liu, P. Lin, I. Perrett, [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2017. – Vol. 127. – № 5. – P. 2007-2018.

157. Ruoslahti, E. Access granted: iRGD helps silicasome-encased drugs breach the tumor barrier / E. Ruoslahti // *J. Clin. Invest.* – 2017. – Vol. 127. – № 5. – P. 1622-1624.

158. In vivo cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging / X. Liu, G.B. Braun, M. Qin, et al. // *Nat Commun.* – 2017. – Vol. 8. – № 1. – ID: 343.

159. Coadministration of iRGD with multistage responsive nanoparticles enhanced tumor targeting and penetration abilities for breast cancer therapy / C. Hu, X. Yang, R. Liu, [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2018. – Vol. 10. – №. 26. – P. 22571-22579.

160. Tumor-penetrating nanoparticles for enhanced anticancer activity of combined photodynamic and hypoxia-activated therapy / Y. Wang, Y. Xie, J. Li, [et al.] // *ACS Nano*. – 2017. – Vol. 11. – № 2. – P. 2227-2238.

161. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse / D.J. Langford, A.L. Bailey, M.L. Chanda [et al.] // *Nat. Methods*. – 2010. – Vol. 7. – № 6. –P. 447-449.

162. Nefopam and ketoprofen synergy in rodent models of antinociception / P. Girard, D. Verniers, M.C. Coppé, [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 584. – № 2-3. – P. 263-271.

163. Bacteriostatic and cytotoxic properties of composite material based on ZnO nanoparticles in PLGA obtained by low temperature method / D.E. Burmistrov, A.V. Simakin, V.V. Smirnova, [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – ID: 49.

164. Mal'tseva, V.N. Modulation of the functional state of mouse neutrophils by selenium nanoparticles in vivo // V.N. Mal'tseva, S.V. Gudkov, E.A. Turovsky // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 21. – ID: 13651.

165. Cytoprotective properties of a new nanocomplex of selenium with taxifolin in the cells of the cerebral cortex exposed to ischemia/reoxygenation / E.G. Varlamova, V.V. Khabatova, S.V. Gudkov, [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – ID: 2477.

166. The mechanisms underlying the protective action of selenium nanoparticles against ischemia/reoxygenation are mediated by the activation of the Ca<sup>2+</sup> signaling system of astrocytes and reactive astrogliosis / E.G. Varlamova, E.A. Turovsky, V.A. Babenko, E.Y. Plotnikov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 23. – ID: 12825.

167. 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 / E.G. Varlamova, M.V. Goltyaev, A.V. Simakin, [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 12. – ID: 6641.

168. Liu, J. Experimental Animal Models for Studying Lung Cancer / J. Liu, M.R. Johnston. In: Keshamouni, V., Arenberg, D., Kalemkerian, G. (eds.) *Lung Cancer Metastasis*. Springer, New York, NY, 2009.

169. The Pivotal Role of Preclinical Animal Models in Anti-Cancer Drug Discovery and Personalized Cancer Therapy Strategies / H. Guo, X. Xu, J. Zhang [et al.] // *Pharmaceutics (Basel)*. – 2024. – Vol. 17. – № 8. – ID 1048.

170. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // *Хим.-фарм. журнал*. – 2003. – Т. 37. – № 3. – С. 32-34.

171. In vivo comparative study of the cytotoxicity of a liposomal formulation of cisplatin (lipoplatin™) / A. Canta, A. Chiorazzi, V. Carozzi, [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 68. – P. 1001-1008.

172. Features of the cytoprotective effect of selenium nanoparticles on primary cortical neurons and astrocytes during oxygen-glucose deprivation and reoxygenation / E.A. Turovsky, V.N. Mal'tseva, R.M. Sarimov, [et al.] // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12. – № 1. – ID: 1710.

173. Denes, A. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? / A. Denes, G. Lopez-Castejon, D. Brough // *Cell Death Dis.* – 2012. – Vol. 3. – № 7. – ID: 338.

174. Kim, C. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: a review / C. Kim, B. Kim // *Nutrients.* – 2018. – Vol. 10. – № 8. – ID: 1021.

175. Turovsky, E.A. Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent pro-apoptotic action of selenium nanoparticles, mediated by activation of Cx43 hemichannels / E.A. Turovsky, E.G. Varlamova // *Biology (Basel).* – 2021. – Vol. 10. – № 8. – ID: 743.

176. Survival endpoints in colorectal cancer and the effect of second primary other cancer on disease free survival / H. Birgisson, U. Wallin, L. Holmberg, B. Glimelius // *BMC Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – ID: 438.

177. BCL-2 system analysis identifies high-risk colorectal cancer patients / A.U. Lindner, M. Salvucci, C. Morgan, [et al.] // *Gut.* – 2017. – Vol. 66. – № 12. – P. 2141-2148.

178. Gil, J. May autophagy be a novel biomarker and antitumor target in colorectal cancer? / J. Gil, K.A. Pesz, M.M. Sasiadek // *Biomark. Med.* – 2016. – Vol. 10. – № 10. – P. 1081-1094.

179. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status / K.J. Schmitz, C. Ademi, S. Bertram, [et al.] // *World J. Surg. Oncol.* – 2016. – Vol. 14. – № 1. – ID: 189.

180. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure / T.H. Corbett, D.P. Griswold Jr, B.J. Roberts, [et al.] // *Cancer Res.* – 1975. – Vol. 35. – № 9. – P. 2434-2439.

181. Mouse models for cancer immunotherapy research / B. Olson, Y. Li, Y. Lin, et al. // *Cancer Discov.* – 2018. – Vol. 8. – № 11. – P. 1358-1365.

182. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer / X. Zhao, L. Li, T.K. Starr, S. Subramanian / *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 33. – P. 54775-54787.

183. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer / E. Zigmond, Z. Halpern, E. Elinav, [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – № 12. – ID: 28858.

184. Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution / M. Efremova, D. Rieder, V. Klepsch, [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9. – № 1. – ID: 32.

185. Pfister, C. Selenium in cancer rehabilitation-a retrospective study from a specialized clinic / C. Pfister, J. Schoenemann // *Nutrients.* – 2023. – Vol. 15. – № 17. – ID: 3827.

186. Selenium for preventing cancer / M. Vinceti, T. Filippini, C. Del Giovane, [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2018. – Vol. 1. – № 1. – ID: CD005195.

187. A U-shaped association between selenium intake and cancer risk / N.T. Le, Y.T. Pham, C.T. Le, [et al.] // *Sci. Rep.* – 2024. – Vol. 14. – № 1. – ID: 21378.

188. Targeting x box-binding protein-1 (XBP1) enhances sensitivity of glioma cells to oxidative stress / Y. Liu, X. Zhang, Y. Liang, [et al.] // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 37. – № 4. – P. 395-405.

189. Identification of an ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma / I. Papandreou, N.C. Denko, M. Olson, [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – № 4. – P. 1311-1314.

190. Fulda, S. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy / S. Fulda, K.-M. Debatin // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – № 34. – P. 4798-4811.

191. Debatin, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy / K.M. Debatin // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2004. – Vol. 53. – № 3. – P. 153-159.

192. Oyadomari, S. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress / S. Oyadomari, M. Mori // *Cell Death Differ.* – 2004. – Vol. 11. – № 4. – P. 381-389.

193. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha / I. Novoa, H. Zeng, H.P. Harding, D. Ron // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 153. – № 5. – P. 1011-1022.

194. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim / H. Puthalakath, L.A. O'Reilly, P. Gunn, [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 129. – № 7. – P. 1337-1349.

195. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: Induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway / C. Reimertz, D. Kögel, A. Rami, [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 162. – № 4. – P. 587-597.

196. Dhanasekaran, D.N. JNK signaling in apoptosis / D.N. Dhanasekaran, E.P. Reddy // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27. – № 48. – P. 6245-6251.

197. 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.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – № 17. – P. 13935-13940.

198. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats / H. Nishitoh, A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, [et al.] // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16. – № 11. – P. 1345-1355.

199. Leeman, R.J. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer / R.J. Leeman, V.W. Lui, J.R. Grandis // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2006. – Vol. 6. – № 3. – P. 231-241.

200. Quesnelle, K.M. STAT-mediated EGFR signaling in cancer / K.M. Quesnelle, A.L. Boehm, J.R. Grandis // *J. Cell. Biochem.* – 2007. – Vol. 102. – № 2. – P. 311-319.

201. Frank, D.A. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation / D.A. Frank // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 251. – № 2. – P. 199-210.

202. Germain, D. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy / D. Germain, D.A. Frank // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13. – № 19. – P. 5665-5669.

203. Изучение эффективности и безопасности адресных систем доставки на основе наночастиц селена при экспериментальном канцерогенезе / Карьгина И.В., Пакина В.А., Шимановский Д.Н., Куторкина Е.А. [и др.] // *Вестник «Биомедицина и Социология»*. – 2025. Т.10. №2. – С.72-78.

204. Противоопухолевая активность и безопасность нового производного бензоксазинона / Иксанова Е.З., Дерябина О.Н., Тумутолова О.М. [и др.] // *Вестник «Биомедицина и Социология»*. – 2025. Т.10. №3. – С.64-72

205. An effective way for targeting EGFR-mediated carcinogenesis: an in vitro study / Pakina V.A., Iksanova E.Z., Shikh E.V. [et al.] // *Research Results in Pharmacology*. 2024. – Т. 10. № 2. – С. 17-26

206. Динамика патоморфологических изменений в тканях паренхиматозных органов у крыс в условиях экспериментальной гепатомы Зайдела на фоне применения доксорубицина и нанодоксорубицина / Карьгина И.В. [и др.] // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. – 2018. – № 1 (45). – С. 5-17

207. Сравнительная оценка биохимических показателей крови и изменений со стороны внутренних органов под влиянием доксорубицина и

наноструктурированного доксорубина в условиях перевиваемого канцерогенеза (экспериментальная асцитная гепатома зайдеда) / Чаиркин И.Н., Дерябина О.Н., Чаиркина Н.В., Карьгина // Сеченовский вестник. – 2018. – № 2. – С. 33-37.

208. Исследование продолжительности жизни крыс под влиянием доксорубина и нанодоксорубина в условиях экспериментальной гепатомы зайдеда / Медвежонков В.Ю., Карьгина И.В., Плотникова Н.А., Пятаев Н.А. // Российский биотерапевтический журнал. –2017. – Т. 16. № 5. С. 51-52.

209. Влияние доксорубина и нанодоксорубина на продолжительность жизни крыс в условиях экспериментальной гепатомы зайдеда // Карьгина И.В., Медвежонков В.Ю., Плотникова Н.А., Пятаев Н.А.// Огарёв-Online. – 2017. – № 7 (96). – С. 6.

210. Synthesis and investigation of the specific activity of the dna-doxorubicin conjugates / Kokorev A.V., Kotlyarov A.A., Zaborovskiy A.V., Gurevich K.G., Balykova L.A., Malkina M.A., Kargina I.V. // 1st International Symposium Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine. electronic collection. «Journal of Physics: Conference Series» – 2017. – С. 012026.