

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**КОПАНИЦА МАРИЯ АНДРЕЕВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ  
ГЛИКОНАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК  
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
доцент  
Черных Иван Владимирович

РЯЗАНЬ – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	16
1. Современное состояние онкологической помощи в Российской Федерации 16	
2. Общая характеристика наночастиц как потенциальных противоопухолевых агентов .....	18
2.1. Способы получения наночастиц золота .....	19
2.2. Пути стабилизации растворов наночастиц золота .....	22
2.3. Модификация поверхности наночастиц золота .....	23
3. Наночастицы золота как потенциальные противоопухолевые агенты .....	26
3.1. Фармакокинетика наночастиц золота .....	26
3.2. Специфические физико-химические свойства наночастиц золота, используемые в химиотерапии.....	29
3.3. Собственная противоопухолевая активность наночастиц золота и их использование в качестве средств доставки химиопрепаратов.....	31
3.4. Способы оценки противоопухолевой активности веществ <i>in vitro</i> .....	34
4. Возможные механизмы реализации противоопухолевой активности наночастиц золота .....	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	44
2.1. Объект исследования .....	44
2.2. Клеточные линии и условия их культивирования.....	46
2.3. Оценка цитотоксичности гликонаночастиц золота.....	47
2.4. Оценка механизмов противоопухолевой активности гликонаночастиц золота .....	49
2.4.1. Приготовление клеточных лизатов для оценки механизмов противоопухолевой активности гликонаночастиц золота .....	51
2.4.2. Оценка влияния гликонаночастиц золота на интенсивность окислительного стресса .....	53
2.4.3. Оценка влияния гликонаночастиц золота на величину трансмембранного потенциала митохондрий .....	53
2.4.4. Оценка способности гликонаночастиц золота инициировать апоптотический процесс .....	54

2.4.5. Оценка влияния гликонаночастиц золота на функционирование ABCB1-белка .....	55
2.4.5.1. Оценка влияния гликонаночастиц золота на относительное количество ABCB1-белка .....	55
2.4.5.2. Оценка влияния гликонаночастиц золота на функциональную активность ABCB1-белка .....	56
2.4.5.2.1. Разработка и валидация методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС .....	56
2.4.5.2.2. Оценка функциональной активности ABCB1-белка .....	60
2.5. Статистическая обработка полученных результатов .....	61
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>62</b>
3.1. Определение цитотоксичности гликонаночастиц золота .....	62
3.2. Механизмы противоопухолевой активности гликонаночастиц золота .....	66
3.2.1. Влияние гликонаночастиц золота на интенсивность окислительного стресса .....	67
3.2.2. Оценка способности гликонаночастиц золота инициировать апоптотический процесс .....	69
3.2.3. Влияние гликонаночастиц золота на функционирование ABCB1-белка .....	72
3.2.3.1. Влияние гликонаночастиц золота на относительное количество ABCB1-белка .....	72
3.2.3.2. Разработка и валидация методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС .....	73
3.2.3.3. Оценка функциональной активности ABCB1-белка .....	83
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>86</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>101</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>102</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>104</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>105</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>110</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Колоректальный рак на сегодняшний день занимает третье место в структуре заболеваемости (6,0%) среди злокачественных новообразований в России [23]. Его лечение предусматривает преимущественно хирургическое вмешательство и адъювантную химиотерапию (фторурацил, капецитабин, лейковорин, оксалиплатин и т. д.). Последняя, однако, сопряжена со значительной токсичностью препаратов и их низкой эффективностью [10, 27, 110]. Таким образом, рационален поиск новых, эффективных и безопасных химиотерапевтических лекарственных средств и современных систем направленной их доставки в опухоль, что согласуется с Национальной стратегией по борьбе с онкологическими заболеваниями [2].

Одним из перспективных направлений противоопухолевой фармакотерапии, а также адресной доставки лекарственных средств в опухолевую ткань и специфического физического воздействия на нее (фототермическая, фотодинамическая терапия и пр.) является использование наночастиц благородных металлов, благодаря наличию у них собственной цитотоксичности [271], а также комплекса специфических физико-химических свойств (поверхностный плазмонный резонанс [123], способность поглощать свет в ближней ИК-области [95], высокий коэффициент абсорбции рентгеновского излучения [305]), а также развитой поверхности с возможностью ее модификации [11] с целью повышения стабильности [44], улучшения фармакокинетики [236] или превращения в носители химиопрепаратов молекулярных размеров [96].

Согласно сведениям научной литературы противоопухолевый потенциал наночастиц золота может реализоваться посредством активации окислительного стресса [143], инициации апоптоза [271] или других путей клеточной гибели [255]. Известно о способности золотых наноразмерных частиц ингибировать мембранный эффлюксный ABCB1-белок [258], что расширяет перспективы их использования в связи с возможным преодолением феномена множественной

лекарственной устойчивости, при котором опухолевые клетки становятся невосприимчивы к ряду химиотерапевтических препаратов с различным механизмом действия [25, 156, 203]. Продемонстрировано также, что ABCB1-белок защищает клетки от апоптоза [129], таким образом, снижение его активности может являться дополнительным механизмом противоопухолевого действия наночастиц.

Следует отметить высокую системную токсичность наноразмерных материалов [247, 270], что диктует необходимость повышения селективности их действия непосредственно на опухолевую ткань. Данная цель может быть достигнута путем модификации их поверхности, например, остатками углеводов, имеющих тропность к поверхностным опухолевым лектинам. Лектины – это углеводсвязывающие белки, способные распознавать свободные сахара, а также специфические углеводные структуры других клеток и связываться с ними [245, 268]. Подобный подход, вероятно, повысит избирательность цитотоксического действия наночастиц золота и интенсифицирует их внутриклеточное накопление путем рецептор-опосредованного эндоцитоза [316] – клатрин- или кавеолин-зависимого [142].

Таким образом, актуальным является синтез наночастиц золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы (Au-MNH-Fuc), лактозы (Au-MPH-Lac) и галактозы (Au-MPH-Gal) (гликонаночастиц), и подбор их оптимальных концентраций и длительности экспозиции, при которых их действие будет являться избирательным по отношению именно к опухолевым клеткам. Дальнейшее выяснение механизмов цитотоксичности модифицированных наночастиц золота позволит проводить целенаправленное изменение поверхности наночастиц иной природы, формы и размеров для расширения спектра их возможного использования, а также комбинирования с веществами с другими механизмами противоопухолевого действия для потенцирования их эффектов.

## Степень разработанности проблемы

По данным научной литературы известно о проявлении наночастицами золота цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам как *in vitro* [270], так и *in vivo* [167]. Выявлены некоторые механизмы подобного эффекта: инициация окислительного стресса путем воздействия на митохондрии или непосредственно за счет образования активных форм кислорода; повреждающее действие на ДНК, приводящее к активации одного из путей запрограммированной клеточной гибели [290]; ингибирование транспортера ABCB1-белка, гиперэкспрессирующегося на мембранах опухолевых клеток и играющего протекторную роль по отношению к ним [258].

Предпринимались попытки специфически модифицировать поверхность наночастиц золота для придания большей избирательности их противоопухолевого потенциала: покрытие поверхности полиэтиленгликолем с целью увеличения времени циркуляции наночастиц в крови [236]; цитратом – с целью преодоления наночастицами гематоэнцефалического барьера [55]. Однако высокая токсичность наночастиц золота, тем не менее, является до сих пор серьезным препятствием для их дальнейшего изучения *in vivo* [82, 263, 311] и применения в клинике [147]. Несмотря на большой объем сведений научной литературы о перспективности биомедицинского применения наночастиц золота для терапии, визуализации или доставки лекарств, лишь немногие из наносистем проходят клинические испытания [147].

Кроме того, существуют проблемы с фармакокинетикой наноразмерных частиц: их внутривенное введение может вызвать эмболию [138], а при пероральном пути введения наблюдается их низкая биодоступность и высокая токсичность [263].

Таким образом, наночастицы золота остаются перспективными химиотерапевтическими агентами, однако необходима комплексная оценка их противоопухолевого действия с выявлением основных механизмов, широты терапевтического действия и сроков экспозиции.

## Цель исследования

Изучить цитотоксичность наночастиц золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, по отношению к клеткам аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 и оценить ее возможные механизмы.

## Задачи исследования

1. Оценить цитотоксичность наночастиц золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, а также препарата сравнения – фторурацила по отношению к культуре клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2, определить концентрации и длительность экспозиции, при которых их действие реализуется по отношению к опухолевым клеткам, но не проявляется по отношению к клеткам, дифференцированным в кишечный эпителий («нормальным»).

2. Проанализировать возможные механизмы противоопухолевой активности гликонаночастиц золота: оценить влияние на степень развития окислительного стресса и способность стимулировать апоптоз опухолевых клеток Caco-2 в концентрациях  $IC_{50}$  при экспозиции 2 и 8 часов.

3. Оценить влияние гликонаночастиц золота на относительное количество ABCB1-белка в опухолевых клетках Caco-2 в максимальных концентрациях, не снижающих интенсивность клеточного метаболизма при экспозиции 2 и 8 часов.

4. Разработать и валидировать методику количественного определения маркерного субстрата ABCB1-белка – фексофенадина в лизате клеток Caco-2 и с помощью нее изучить влияние гликонаночастиц золота на функциональную активность белка-транспортера в опухолевых клетках в максимальных концентрациях, не снижающих интенсивность клеточного метаболизма при экспозиции 2 и 8 часов.

## Научная новизна

Впервые показано, что наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки Сасо-2, при этом проявляя более высокую активность по сравнению с препаратом сравнения фторурацилом. 2- и 8- часовая инкубация клеток с гликонаночастицами золота является оптимальной, так как при этих сроках их токсичность по отношению к «нормальным» (дифференцированным в эпителиоциты) клеткам менее выражена, чем по отношению к опухолевым.

Доказано, что протестированные гликонаночастицы золота, модифицированные остатками фукозы, проявляют противоопухолевое действие за счет прооксидантного эффекта, что подтверждается значительным снижением уровня общих сульфгидрильных групп и ростом концентрации малонового диальдегида уже через 2 часа инкубации.

Дополнительным механизмом действия всех протестированных гликонаночастиц золота является инициация одного из путей запрограммированной клеточной гибели, что сопровождается увеличением количества транскрипционного фактора p53, а также снижением трансмембранного потенциала митохондрий.

Разработана и валидирована оригинальная чувствительная и селективная методика количественного определения маркерного субстрата ABCB1-белка – фексофенадина методом ВЭЖХ-МС/МС в лизате опухолевых клеток Сасо-2, позволяющая косвенно анализировать функциональную активность транспортера по степени внутриклеточного накопления данного вещества.

Впервые продемонстрирован ингибирующий потенциал гликонаночастиц золота по отношению к ABCB1-белку, что может служить дополнительным механизмом их цитотоксичности в связи с протекторной ролью транспортера и его гиперэкспрессией в опухолевых клетках.



## Теоретическая и практическая значимость

В ходе исследования *in vitro* выявлено цитотоксическое действие наночастиц золота, поверхность которых модифицирована остатками фукозы, лактозы и галактозы, по отношению к клеткам аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2). При этом цитотоксическое действие исследуемых соединений превышало по активности препарат сравнения – фторурацил, не уступая ему по эффективности (количество мертвых клеток в сериях не отличалось). Следует отметить, что использованная нами модификация поверхности наночастиц привела к тому, что их IC<sub>50</sub> по отношению к опухолевым клеткам Caco-2 была достоверно ниже, чем к клеткам, дифференцированным в энтероциты тонкого кишечника, что, вероятно, связано с активацией рецептор-опосредованного механизма их проникновения внутрь именно опухолевой разновидности клеток. Полученные результаты создают предпосылки для аналогичной модификации поверхности наночастиц других металлов, использования наночастиц других форм и размеров с оценкой их противоопухолевого потенциала, выявления наиболее перспективных и изучения их *in vivo*.

Выявлены механизмы противоопухолевой активности гликонаночастиц золота: их прооксидантное действие, а также инициация процесса запрограммированной клеточной гибели опухолевых клеток, опосредованная транскрипционным фактором p53. Показано, что цитотоксическое действие модифицированных наночастиц золота может реализовываться также посредством снижения функциональной активности протекторного для опухолевых клеток ABCB1-белка. Подобные механизмы реализации цитотоксического действия наночастиц золота актуализируют оценку эффективности их комбинаций с химиотерапевтическими средствами с иными фармакодинамическими свойствами для достижения потенцированного эффекта и диктуют необходимость анализа их противоопухолевой активности *in vivo* на моделях опухолей животных. Выявленный ингибирующий потенциал гликонаночастиц золота по отношению к ABCB1-белку позволяет использовать их в качестве положительного контроля

сниженной активности транспортера при поиске веществ-ингибиторов. Полученные результаты необходимо учитывать для прогнозирования возможных фармакокинетических взаимодействий между гликонаночастицами золота и средствами, являющимися субстратами данного белка-транспортера (дигоксин, дабигатрана этексилат и др.) при их совместном применении в терапевтической практике.

Разработанную и валидированную методику количественного определения фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 можно рекомендовать к использованию для исследования лекарственных веществ на предмет принадлежности к модуляторам активности ABCB1-белка по степени внутриклеточного накопления данного вещества.

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена *in vitro* с использованием клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Сасо-2), культивируемой в стандартных условиях лаборатории клеточного культивирования [119] ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Линия клеток Сасо-2 способна спонтанно дифференцироваться в клетки, подобные эпителию тонкого кишечника через 21 день после образования монослоя, что позволяет использовать культуру в качестве модели *in vitro* для изучения всасывания и метаболизма лекарственных препаратов [296], а также в качестве модели опухолевых и условно «нормальных» клеток для поиска потенциальных противоопухолевых средств с низкой токсичностью.

Цитотоксическое действие гликонаночастиц золота (Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Lac, Au-MPH-Gal) анализировали по результатам МТТ-теста, рекомендованного в качестве методики оценки общетоксического действия лекарственных препаратов на основе наночастиц [13, 120]. Оценка их влияния на интенсивность окислительного стресса проводилась традиционными методами: количество общих SH-групп – методом Элмана [32]; концентрация малонового диальдегида и уровень антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы IV типа –

гетерогенным иммуноферментным анализом. Способность гликонаночастиц золота инициировать апоптоз оценивалась по величине трансмембранного потенциала митохондрий (интенсивность флуоресценции после окраски красителем MitoTracker™ Red CMXRos), а также по уровню основной эффекторной каспазы, участвующей в процессе апоптоза и приводящей к характерным морфологическим изменениям в клетках – каспазы-3 [109] и проапоптотического транскрипционного фактора p53 (гетерогенным иммуноферментным анализом). Оценку влияния гликонаночастиц золота на относительное количество ABCB1-белка проводили с применением метода вестерн-блот. Функциональная активность транспортера оценивалась на двух культурах: Caco-2 (экспрессирует белок [280]) и, для исключения неспецифического повышения проницаемости клеточных мембран, дополнительно, на HEK-293 (не экспрессирует белок [154]) – по степени внутриклеточного накопления его маркерного субстрата – фексофенадина. Количественный анализ фексофенадина в клеточном лизате проводили с применением разработанной и валидированной оригинальной методики ВЭЖХ-МС/МС. Полученные результаты обрабатывали с помощью программ «Stat Soft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prizm 8.4.3.

### **Положения, выносимые на защиту**

Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, являются перспективными противоопухолевыми агентами, оказывающими цитотоксическое действие на клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2), превышая по активности (значения  $IC_{50}$ ) препарат сравнения – фторурацил, а по эффективности (процент мертвых клеток) – не отличаясь от него.

Противоопухолевая активность гликонаночастиц золота реализуется посредством нескольких механизмов. Наночастицы золота с поверхностью,

модифицированной остатками фукозы, оказывают прооксидантный эффект по отношению к опухолевым клеткам Сасо-2, проявляемый снижением уровня общих сульфгидрильных групп и ростом концентрации малонового диальдегида. Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, инициируют один из механизмов запрограммированной клеточной гибели, реализуемый за счет активации транскрипционного фактора p53 и проявляемый снижением трансмембранного потенциала митохондрий.

Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной лактозой, увеличивают относительное количество ABCB1-белка в опухолевых клетках, что может являться их отрицательной характеристикой.

Разработана и валидирована методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка – фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС, позволяющая характеризовать эффлюксную активность транспортера путем оценки внутриклеточного накопления данного вещества. С помощью данной методики выявлено, что наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, снижают функциональную активность ABCB1-белка, что можно рассматривать в качестве дополнительного механизма их противоопухолевого действия, но следует учитывать как вероятную причину их межлекарственных фармакокинетических взаимодействий с субстратами данного транспортера.

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

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования, выполненных на сертифицированном оборудовании с последующим анализом, систематизацией и статистической обработкой в соответствии с международными и отечественными рекомендациями. Основные положения диссертации представлены, доложены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций: Международной научно-

практической конференции, посвященной «Годам развития села, туризма и народных ремесел». Фундаментальные основы инновационного развития науки и образования (Душанбе, 2020); Ежегодной научной конференции РязГМУ им. акад. И.П. Павлова к 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле (Рязань, 2020); XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2021); II Международной онлайн научно-практической конференции «Актуальные вопросы фармакологии: от разработки лекарств до их рационального применения» (Бухара, 2021); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); IX Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2022» (Санкт-Петербург, 2022); Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвященной 10-летию науки и технологий (Рязань, 2022); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые науке и практике XXI века» (Оренбург, 2023); XI Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы науки XXI века» (Смоленск, 2023); IX Международной научно-методической конференции «Фармобразование - 2023» (Воронеж, 2023); II Научно-практической конференции с Международным участием «Современные проблемы фармации» (Самара, 2023).

Апробация работы состоялась 26 июня 2024 года на заседании кафедр фармакологии, биологической химии, фармацевтической химии и фармакогнозии, управления и экономики фармации, общей химии, математики, физики и медицинской информатики, фтизиатрии, онкологии с курсом анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2022) (приказ Минобрнауки России от 20.01.2022 №38).

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и ординаторов на кафедрах фармакологии и фармацевтической химии и фармакогнозии, а также внедрены в деятельность центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, тестирующей новые оригинальные отечественные лекарственные средства на принадлежность к модуляторам активности ABCB1-белка.

## **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно подготовил обзор литературы по теме диссертационной работы; провел эксперименты *in vitro*; выполнил биохимические исследования; разработал и валидировал методику количественного анализа фексофенадина в клеточном лизате; обработал и интерпретировал полученные результаты; подготовил печатные работы по изучаемой проблематике. В целом личный вклад автора в исследование превышает 80%.

## **Сведения о публикациях по теме диссертации**

По результатам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и 7 статей, входящих в международные цитатно-аналитические базы Web of Science и Scopus; 11 тезисов докладов – в материалах всероссийских и международных конференций. Получен 1 патент на изобретение.

## Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 146 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками и 17 таблицами. Список литературы представлен 330 источниками, из них 26 отечественных и 304 зарубежных автора.

## Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д.х.н., ведущему научному сотруднику лаборатории №14 (Полимерных наноматериалов и композиций для оптических сред) Института высокомолекулярных соединений РАН Ершову А.Ю., заведующей кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России Якушевой Е.Н., д.м.н., профессору кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России Шулькину А.В., к.х.н., старшему научному сотруднику НИИ «Государственный Научно-исследовательский Испытательный институт Военной Медицины» Министерства обороны РФ Лагоде И.В., к.х.н., старшему научному сотруднику лаборатории №14 (Полимерных наноматериалов и композиций для оптических сред) Института высокомолекулярных соединений РАН Мартыненко А.А., к.б.н., ассистенту кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России Мыльникову П.Ю. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. Современное состояние онкологической помощи в Российской Федерации

Онкологические заболевания являются второй по частоте причиной смертности в мире после сердечно-сосудистых патологий и составляют более 15% в общей структуре смертности [4].

В 2022 году в Российской Федерации выявлено более 620 тысяч случаев злокачественных новообразований, большая доля которых приходится на пациентов женского пола. По сравнению с 2021 годом количество случаев выявления опухолевых заболеваний увеличилось на 7,6% [23].

Основной объем онкологических больных формируется из пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы (19,1%), кожи (кроме меланомы) (10,8%), предстательной железы (7,2%), тела матки (7,1%), ободочной кишки (6,0%), лимфатической и кроветворной ткани (5,7%), почки (4,9%), щитовидной железы (4,8%), шейки матки (4,6%), прямой кишки (4,5%), трахеи, бронхов, легкого (3,5%) и желудка (3,3%), что суммарно составляет около 81,5% всех онкопатологий.

В период до 2030 года реализуется Национальная стратегия по борьбе с онкологическими заболеваниями, приоритетными направлениями которой являются доступ к безопасным, эффективным, качественным и недорогим основным лекарственным средствам и вакцинам для всех, а также внедрение современных средств и систем с направленной доставкой лекарственных веществ [2].

Существующая в настоящее время противоопухолевая фармакотерапия зачастую связана с использованием высокотоксичных и неизбирательных лекарственных средств [91]. Кроме того, эффективность препаратов также ограничена из-за феномена множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – невосприимчивости опухолевых клеток к целому ряду химиотерапевтических препаратов с различным механизмом действия [25, 156, 203]. Устойчивость может



быть связана со снижением внутриклеточной концентрации противоопухолевого препарата вследствие гиперэкспрессии эффлюксных мембранных транспортеров, таких как ABCB1-белок (гликопротеин-P), белок устойчивости рака молочной железы (BCRP), белки множественной лекарственной устойчивости (MRP1/ABCC1), а также с нарушением апоптотических механизмов в опухолевых клетках (мутация или дефицит гена p53) или с активацией детоксифицирующих систем (глутатион-S трансферазы и др. [198, 262]).

Одной из распространенных форм (четвертая по частоте причина смертности среди всех онкозаболеваний [85]) злокачественных новообразований не только в Российской Федерации, но и во всем мире являются колоректальные опухоли [23, 30] – патология с неблагоприятным прогнозом, высоким процентом химиорезистентности [27], выявлением часто на поздних стадиях [294].

В качестве ведущего метода лечения рака ободочной кишки применяется хирургическое вмешательство и использование адъювантной химиотерапии. Основными фармакотерапевтическими средствами являются фторпиримидины (фторурацил, капецитабин), лейковорин, оксалиплатин [10, 110], для которых, однако, характерна значительная токсичность (полинейропатия на фоне оксалиплатина и т.д.) и низкая эффективность, связанная с развитием химиорезистентности и приводящая к раннему рецидиву опухоли [27].

Основной моделью, применяемой для изучения аденокарциномы ободочной кишки *in vitro* является клеточная линия Caco-2 (colorectal adenocarcinoma cells – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека), которая была выделена из человеческой колоректальной аденокарциномы [119]. Показано, что клетки линии Caco-2 через 21 день после образования монослоя способны спонтанно дифференцироваться в клетки, подобные эпителию тонкого кишечника, благодаря чему данная культура находит широкое применение в качестве модели *in vitro* для изучения всасывания и метаболизма лекарственных препаратов [296].

В монослое клеток Caco-2 экспрессируются такие ферменты и транспортеры как ABCB1-белок, BCRP, транспортер H<sup>+</sup>/ди-трипептида (PEPT1), полипептид, транспортирующий органические анионы 2B1 (OATP-B), глутатион S-трансфераза

(Glutathione S-transferase – GST), уридиндифосфоглюкуронозилтрансфераза (UDP-glucuronosyltransferase – UGT) и ряд других [280]. Также клеточная линия, согласно рекомендациям FDA (Food and Drug Administration) и EMA (European medicines agency), может применяться в качестве тест-системы, позволяющей определить принадлежность лекарственных веществ к субстратам эффлюксных АТФ-зависимых белков-транспортеров ABCB1 и BCRP [81].

На сегодняшний день предложен ряд перспективных инновационных препаратов для фармакотерапии колоректальных опухолей: моноклональные антитела против фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor – VEGF) и рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor – EGFR) [227, 320], противораковые вакцины [29, 297], растительные экстракты, индуцирующие апоптоз или аутофагию [51], а также наночастицы металлов, в том числе золота, обеспечивающие направленное действие на колоректальные опухоли [39, 105, 212].

Таким образом, ввиду широкой распространенности и агрессивности колоректального рака, перспективен поиск новых подходов к терапии данной патологии, включающих использование наноматериалов, фитокомпозиций и средств для преодоления феномена МЛУ.

## **2. Общая характеристика наночастиц как потенциальных противоопухолевых агентов**

В последнее время значительно возрос интерес к нанотехнологиям, способным преодолевать препятствия классической онкотерапии, такие как низкая избирательность действия, токсичность [205], феномен МЛУ [298].

Наночастицы представляют собой класс веществ, объединенных общим критерием – размером от 1 до 100 нм во всех трех измерениях [237]. Подобные размеры сопоставимы с основным большинством биомакромолекул (например, диаметр двойной спирали ДНК составляет 2 нм, размер мельчайшей живой структуры – *Mycoplasma bacterium* – 200 нм) [1, 237].

Современные технологии позволяют получить наночастицы с желаемой геометрией, составом и морфологией – кубические, сферические и цилиндрические, а также наночастицы в форме стержней, звезд и цветков [16, 286], что может изменять их биосовместимость, способность проникать через биологические мембраны и взаимодействовать с различными ферментами и рецепторами [112, 181]

## 2.1. Способы получения наночастиц золота

Существующие варианты синтеза наночастиц предполагают применение нисходящего или восходящего подхода. Нисходящий подход предусматривает уменьшение размера исходных частиц путем диспергирования – измельчения, размола с помощью мельниц, травления и т. п. [163]. Основным недостатком такого подхода к синтезу является образование дефектов, нарушающих структуру поверхности наночастиц, что может значительно повлиять на химический состав их поверхности и их физико-химические свойства, так как отношение поверхности к объему у наноматериалов существенно [8].

Восходящий подход предполагает синтез наночастиц из отдельных атомов и молекул преимущественно с помощью химических реакций [8]. Такой вариант синтеза позволяет получать наночастицы путем их осаждения из газовой фазы или путем образования в коллоидном растворе.

Одним из стандартных методов синтеза коллоидных растворов наночастиц золота, описанным еще в 1951 году, является цитратный метод Туркевича [315]. Метод основан на восстановлении ионов золота  $Au^{3+}$  до атомов с помощью различных восстановителей (УФ-свет, цитрат и др.). Синтез предполагает восстановление натриевой соли золотохлористоводородной кислоты ( $NaAuCl_4$ ) в присутствии стабилизатора 12-аминододецилтиола  $H_2N(CH_2)_{12}SH$ . В ходе реакции происходит декарбоксилирование соли лимонной кислоты, а ее вторичная спиртовая группа окисляется в кетонную [315].

Далее полученное атомарное золото связывается с тиольными группами молекул аминокантиола (аминотиольные лиганды), которые покрывают поверхность образующихся наночастиц и препятствуют взаимодействию их друг с другом и укрупнению до макроразмеров.

В результате синтеза образуется коллоидный раствор наночастиц. Наличие аминогрупп на их поверхности делает их водорастворимыми, а прочная ковалентная связь Au–S придает им коагуляционную стабильность. Размер частиц регулируется количеством стабилизатора – 12-аминододецилтиола: его низкая концентрация позволяет получить наночастицы с меньшим размером [267]. Установлено, что изменение соотношения стабилизирующих и восстанавливающих веществ позволяет получить наночастицы золота различного размера в диапазоне от 16 до 100 нм [315].

Еще одним методом химического синтеза наночастиц золота в органическом растворителе является метод Бруста-Шифрина, который позволяет получить частицы размером от 2 до 6 нм [288]. Метод предполагает смешивание водного раствора золотохлористоводородной кислоты  $\text{HAuCl}_4$  с избытком толуольного раствора бромид тетраоктиламмония  $[\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4]^+\text{Br}^-$ , который способен образовывать мицеллу в органическом растворителе. Мицелла представляет собой коллоидную частицу с гидрофильной внутренней частью и гидрофобной наружной, при этом гидрофильная золотохлористоводородная кислота растворяется во внутреннем объеме коллоидных частиц и переходит из водной фазы в органическую. Далее внутри обращенной мицеллы под действием борогидрида натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) протекает процесс восстановления  $\text{HAuCl}_4$  до атомарного золота. Атомы металла слипаются в наночастицы, покрытые слоем бромид тетраоктиламмония. Для придания устойчивости к полученным наночастицам добавляют додецилтиол  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$ .

В связи с тем, что ряд реагентов, используемых для химического синтеза наночастиц золота, может негативно воздействовать на окружающую среду, в последние годы стал популярным так называемый «зеленый» синтез, где в качестве

редуцирующего агента используются микроорганизмы, водоросли, растения и пр. [191].

Применение микроорганизмов и грибов в качестве биологического источника синтеза наночастиц основано на их способности синтезировать как внутриклеточные, так и внеклеточные наночастицы золота. Отрицательно заряженная клеточная стенка бактерий способна электростатически взаимодействовать с ионами золота, заряженными положительно. Внутриклеточный синтез предполагает транспорт ионов золота внутрь клетки с последующим образованием наночастиц с помощью биомолекул и ферментов-редуктаз, способных восстанавливать соли металлов до наночастиц металлов с узким распределением размеров и монодисперсностью [61].

В синтезе наночастиц золота описано использование таких биоконпонентов как флавоноиды, фитостеролы, хиноидные структуры и т.д., благодаря функциональным группам, которые ускоряют восстановление катионов металла и стабилизацию наночастиц [248].

Существует также электрохимический вариант синтеза наночастиц золота. Данный способ заключается в использовании двухэлектродной электрохимической ячейки, где в качестве катода применяется платиновый электрод, а в качестве анода – золотая пластинка. В процессе синтеза электроды погружают в раствор с гидрофобным бромидом тетрадециламмония и поверхностно-активным веществом – бромидом цетилтриметиламмония, который выступает в роли стабилизатора и предотвращает агрегацию наночастиц. Далее электролитическую ячейку помещают в ультразвуковую баню, в которой вследствие растворения золотого анода в результате электролиза образуются ионы  $\text{AuBr}^{4-}$ . Ионы двигаются к катоду, где происходит электровосстановление. К недостаткам данного метода относят длительность процесса синтеза [145].

Перечисленные направления синтеза позволяют получать наночастицы золота, имеющие различную форму (наносферы, наностержни, нанотрубки, нанозвезды, нанопроволоки, наночастицы кубической и многогранной формы). Для получения наночастиц различной морфологии может применяться изменение

концентрации поверхностно-активного вещества в процессе синтеза [224], а также изменение условий проведения реакций синтеза (температура, pH, время инкубации). Например, pH=2 позволяет получить более крупные, стержнеобразные наночастицы, pH=3–4 – меньшие, стержнеобразные, pH=8 – сферические, овальные, многогранные, pH=9 – сферические, pH=10 – стержнеобразные, pH=11 – нанопроволоки [151]. Изменение концентрации поверхностно-активного вещества в процессе синтеза приводит к тому, что его молекулы начинают собираться в агрегаты. Посредством гидрофильных и гидрофобных групп агрегаты в реакционном растворе принимают различную форму, известную как мицеллы, что приводит к анизотропному росту атомов металла в нанокристаллы определенной формы [31].

Наночастицы золота могут иметь различную форму в зависимости от температуры: синтезированные при температуре 0–5°C они являются сферическими и изотропными; частицы, синтезированные при 15–25°C, имеют звездчатую форму [114]. Реакция при 100°C позволяет получить наноструктуры шестиугольной, пятиугольной и квадратной формы [148].

## **2.2. Пути стабилизации растворов наночастиц золота**

К общим проблемам физической стабильности наночастиц относят седиментацию и агломерацию. Большая площадь поверхности наночастиц создает высокую общую поверхностную энергию, что термодинамически невыгодно, и частицы стремятся минимизировать ее путем агломерации. Агломерация приводит к снижению стабильности наночастиц ввиду их быстрого осаждения и расслоения в суспензиях. Предотвратить дестабилизацию можно путем уменьшения размера наночастиц при их синтезе [215], а также такими путями, как добавление поверхностно-активных веществ (полисорбаты, поливиниловый спирт, полуксамеры) [216] или полимеров (полиэтиленгликоль, полиэфиримид), полиглицерины, гидрофильные полиакрилаты, хитозан и декстран [44, 228].

Такая физическая характеристика, как дзета-потенциал может косвенно отражать и стабильность и поверхностный заряд наноматериала [327]. Дзета-потенциал представляет собой электростатический потенциал на границе плоскости скольжения двух электрических слоев, окружающих наночастицу, находящуюся в ионном растворе. Наночастицы, покрытые цитратом, имеют отрицательный заряд, притягивающий положительно заряженные ионы электролита, которые образуют электрический слой на поверхности частицы (слой Штерна). Также образуется вторичный (диффузный) слой, состоящий как из положительных, так и из отрицательных ионов с высоким противоионным зарядом [123].

Величина потенциала прямопропорциональна толщине диффузного слоя. Устойчивый раствор характеризуется высоким значением дзета-потенциала, при котором частицы одноименного заряда отталкиваются друг от друга, что препятствует их коагуляции и седиментации и стабилизирует раствор [53].

Наночастицы, имеющие дзета-потенциал от -10 до +10 мВ считаются относительно нейтральными, в то время как частицы с его значением более +30 мВ или менее -30 мВ считаются сильно катионными и сильно анионными соответственно. Дзета-потенциал может влиять на процесс проникновения наночастиц через клеточные мембраны, большинство из которых заряжены отрицательно, при этом катионные частицы обычно проявляют большую токсичность, связанную с повреждением мембраны клетки [82].

### **2.3. Модификация поверхности наночастиц золота**

Поверхность наночастиц золота позволяет осуществлять ее модификацию различными лигандами с целью стабилизации их растворов, повышения специфичности действия, улучшения фармакокинетики (проникновение через тканевые и гистогематические барьеры, распределение в органах и тканях), предотвращения их поглощения ретикулоэндотелиальной системой (что может продлить их эффекты), а также с целью снижения токсичности. Используются два

основных пути модификации поверхности наночастиц: электростатическая адсорбция лигандов, основанная на отрицательном заряде (ионы цитрата) поверхности золотых наночастиц (цистеин,  $\beta$ -амилоид при кислых pH), или химический синтез (хемосорбция) обычно с участием тиольного линкера – бифункциональных тиолов, дополнительная функциональная группа которых используется для конъюгации с биомолекулами, а SH-группа конъюгирует с поверхностью металла путем образования ковалентной связи серы с металлом [11, 239, 259].

Покрытие поверхности наночастиц золота остатками полиэтиленгликоля значительно увеличивает время циркуляции частиц в крови, повышает их гидрофильность и препятствует захвату тканями [236]. Также показано, что введение катионных звеньев, например, триметиламмонийметантиола в состав поверхности частиц приводит к увеличению их токсичности по отношению к мембранам клеток по сравнению с анионными поверхностными группами (2-меркаптоэтансульфонат) или нейтральными лигандами (2-(2-меркаптоэтокси)этанол) [158, 282]. Известно, что наночастицы золота, покрытые цитратом, преодолевают гематоэнцефалический барьер и накапливаются в нейронах головного мозга, а также в печени, селезенке и почках, при этом их токсичность не обнаружена [55].

Одной из особенностей опухолевых клеток является изменение их обменных процессов, приводящее к биосинтезу специфических углеводов в составе гликопротеидов. В частности, злокачественная трансформация связана с сиалированием, фукозилированием, маннозилированием мембранных гликопротеидов [34, 221]. Углеводы, конъюгированные на поверхности наночастиц золота, могут вступать в комплементарное взаимодействие с поверхностными углеводами мембран опухолевых клеток. Показано, что культура клеток меланомы B16F10 интенсивно взаимодействует с галактозомодифицированными магнитными наночастицами [155], на мембранах клеток рака поджелудочной железы обнаружены специфические рецепторы, связывающиеся с фукозой [293]. Также выявлено, что клетки колоректального рака проявляют



повышенную потребность в моносахариде L-фукозе [150, 254], что говорит о возможности создания и использования наночастиц с подобной модификацией поверхности для адресной доставки противоопухолевых препаратов.

Одним из перспективных направлений, обеспечивающих избирательное действие наночастиц золота, является модификация их поверхности углеводными фрагментами, имеющими тропность к лектинам опухолевых клеток [150].

Лектины представляют собой класс углеводовсвязывающих белков, которые способны избирательно распознавать углеводы и гликоконъюгаты на поверхности клеток и обратимо связываться с ними. Лектины могут находиться в цитозоле или являться фрагментами мембран как нормальных (например, печени [329]), так и опухолевых клеток (клетки меланомы B16F10 [155], клетки колоректального рака Сасо-2 [256]). Показано увеличение их количества на опухолевых клетках [124]. Взаимодействие лектинов с отдельными углеводами может быть столь же специфичным, как и взаимодействие между антигеном и антителом или субстратом и ферментом. Лектины способны связываться не только с олигосахаридами на поверхности клеток, но и со свободно расположенными гликанами, включая моносахариды [219]. К естественным мишеням лектинов относят углеводные фрагменты клеточных гликопротеинов, гликолипидов и протеогликанов: то есть они выполняют функцию межклеточных контактов, а также способствуют захвату углеводов, необходимых для питания опухолевых клеток. Взаимодействие лектинов со специфическими сахарами опухолевых клеток (фукоза, сиаловая кислота, галактоза) может приводить к агглютинации и запуску таких механизмов гибели злокачественных клеток, как апоптоз, аутофагия или некроз, так как известно о собственной противоопухолевой активности лектинов [174, 278].

Таким образом, существующие подходы к синтезу наночастиц золота позволяют получать их экономически доступными и экологически безопасными способами, а их развитая поверхность создает предпосылки к ее модификации, что обеспечивает их таргетное действие.

### 3. Наночастицы золота как потенциальные противоопухолевые агенты

#### 3.1. Фармакокинетика наночастиц золота

Наноразмеры определяют особую фармакокинетику наночастиц: в научной литературе описаны различные механизмы их всасывания и распределения, однако зачастую данные противоречивы [35, 99], что может объясняться способом их введения, а также использованием частиц различной формы, размера, поверхностного заряда, и модификации поверхности.

Из описанных путей введения наночастиц золота известны пероральный, трансдермальный, ингаляционный и парентеральный, при этом абсорбция наночастиц, как правило, низкая и составляет при вдыхании от 0,06% до 5,5% в зависимости от размера, всасывание при приеме внутрь составляет около 0,01–5% для наночастиц золота, 1–4,2% для наночастиц серебра и 0,01–0,05% для наночастиц диоксида титана в зависимости от размера и покрытия [178]. При приеме внутрь при проведении *in vivo* исследований на крысах наблюдается низкое всасывание для наночастиц золота и составляет от 0,37% для малых размеров (1,4–2,8 нм) до 0,01% для больших размеров (100 нм). При трансдермальном пути введения проникновение в кожу невелико, но для наночастиц золота проникновение выше, нежели для других металлических частиц. Парентеральное введение наночастиц золота, исследованное на кроликах, показало, что концентрация частиц размером 15 нм достигала максимума через 15–30 минут после внутривенной инъекции, для наночастиц размером 5 нм – через 10 минут, для наночастиц с размером 25 нм – через 30 минут [167]. Размер частиц при внутривенном введении является важным фактором, так как накопление крупных наночастиц может вызвать эмболию [138].

Исследования показывают, что предпочтительным способом введения наночастиц золота является внутривенная инъекция, ввиду относительно низкой токсичности [193]. При внутривенном введении самцам крыс наночастиц золота размером 50 нм не наблюдалось органотоксического воздействия, а также изменения массы тела животных [138]. Однако после внутривенного введения

наблюдается низкая экскреция наночастиц золота с калом или мочой, поскольку наночастицы фагоцитозуются клетками Купфера ретикулоэндотелиальной системы, где они задерживаются в течение длительного времени [302]. При пероральном способе введения наночастиц золота, напротив, наблюдали значительное снижение массы тела крыс, уменьшение размеров селезенки и эритроцитов [311]. В сравнении с внутривенным введением обнаружена более высокая токсичность наночастиц золота размером 13,5 нм при их внутрибрюшинном и пероральном введении мышам [263, 311]. Пероральное введение приводит к повреждению желудочно-кишечной системы и дополнительно влияет на иммунную систему через метаболизм в селезенке. При внутрибрюшинной инъекции отмечено снижение количества эритроцитов, что указывает на повреждение системы кроветворения под действием наночастиц золота [57].

Ключевым способом проникновения наночастиц через биологические мембраны является эндоцитоз, который можно разделить на 3 основных типа: фагоцитоз (захват клеткой крупных объектов, таких как нанотрубки, имеющих размер 100 нм [38]), пиноцитоз (из внешнего пространства в клетку проникает жидкая фаза и мелкие – от 10 до 100 нм частицы [316]) и рецептор-опосредованный эндоцитоз (основан на модели захвата по типу «ключ-замок») [283, 316]. При этом скорость и интенсивность абсорбции наночастиц обратно пропорциональны их диаметру. Также описано, что наночастицы серебра и золота с диаметром 15–30 нм способны проникать в опухолевые ткани пассивным путем – с помощью так называемого эффекта повышенной проницаемости и удерживания (*enhanced permeability and retention effect (EPR)*), который связан с дефективной опухолевой васкуляризацией и нерегулярным эпителием, а также сниженным количеством лимфатических сосудов и незначительным поглощением интерстициальной жидкости [71, 72, 325]. При этом нейтральные и отрицательно заряженные наночастицы золота в меньшей степени поглощаются клетками, в отличие от положительно заряженных наночастиц [121].

На культуре клеток Caco-2 показана способность наночастиц золота с диаметром 50 нм проникать в клетки, однако при этом транспорт частиц через монослой происходит слабо и достигает 0,3% после 5-часовой инкубации с немодифицированными наночастицами [111]. Способность немодифицированных наночастиц золота проникать через гистогематические барьеры также зависит от их размера. Известно, что наночастицы золота диаметром 10 нм и более не проникают через гематоэнцефалический барьер, однако в ряде исследований показано, что наночастицы золота диаметром 15–20 нм способны проникать в мозг [300, 301], что, вероятно, реализуется путем рецептор-опосредованного механизма [146] или посредством эндоцитоза наночастиц эндотелиальными клетками капилляров головного мозга [125].

Проникновение через гематоплацентарный барьер показано для наночастиц золота с диаметром до 50 нм [14].

Распределение наночастиц может происходить по всему организму (печень, селезенка, легкие, почки, кишечник, головной мозг); в основном их накопление наблюдается в печени, селезенке, лимфатических узлах (неспецифическое поглощение ретикулоэндотелиальными клетками) и коррелирует с вводимой дозой [138]. Более крупные наночастицы ( $\geq 80$  нм) в основном распределяются в селезенке, тогда как более мелкие ( $\leq 60$  нм) – преимущественно накапливаются в печени, так как капилляры печени отличаются наличием специфических открытых пор, или фенестр размером около 100 нм, и отсутствием базальной мембраны под эндотелием, что способствует лучшему поглощению частиц [178].

С целью повышения биосовместимости металлические наночастицы обычно модифицируют природными или синтетическими полимерами, такими как полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, пептиды или природные полисахариды (геллан, велан, пектин и к-каррагинан) [260, 287], что способствует увеличению времени циркуляции и интенсифицирует всасывание наночастиц в желудочно-кишечном тракте, а также приводит к активному захвату гепатоцитами [178].

Элиминация наночастиц осуществляется в основном через мочевыводящие и желчевыводящие пути, причем более мелкие наночастицы выводятся преимущественно почками [56, 178].

Экскреция почками и желчевыводящими путями, как правило, низкая и связана с размером и химическим составом поверхности наночастиц. Например, после внутривенной инъекции наночастиц золота крысам почти около 50% наночастиц размером 1,4 нм кумулировало в печени и только 9% выводилось с мочой через 24 часа после инъекции крысам.

### **3.2. Специфические физико-химические свойства наночастиц золота, используемые в химиотерапии**

Значительное отношение площади поверхности наночастиц к объему обеспечивает им оригинальные физические и химические свойства, а, следовательно, и специфическую биологическую активность.

Наночастицы металлов обладают свойством поверхностного плазмонного резонанса (ППР) – явление взаимодействия света с частицами, приводящее к коллективным колебаниям свободных электронов проводимости металла. Если входящая электромагнитная волна имеет тот же волновой вектор, что и колеблющиеся электроны проводимости, то возникает резонанс, и входящая энергия поглощается плазмонной волной [123].

Явление ППР определяет способность наночастиц поглощать и рассеивать видимый свет [234], а также способствует увеличению интенсивности люминесценции наночастиц [22]. Предпочтительными плазмонными металлами для оптического применения являются наночастицы золота, серебра и меди, условие резонанса которых выполняется на видимых частотах. ППР способствует локальному усилению электрического поля на поверхности наночастицы, а также поглощению и рассеянию света наночастицей на частоте ППР [306]. Частота ППР зависит не только от металла, но и от размера и формы наночастиц [16, 70]. Усиленное поглощение света наночастицами золота, опосредованное ППР

позволяет визуализировать исследуемую область за счет накопления наночастиц золота в интересующем участке (опухолевой ткани) с помощью фазово-контрастной оптической микроскопии, микроскопии в темном поле, фототермической или фотоакустической визуализации [58, 284].

Известно о способности наночастиц золота поглощать свет в ближней ИК-области [95]. Ввиду того, что для ближней ИК-области ткани организма относительно прозрачны, возможно использовать наночастицы, обладающие высоким фотоакустическим контрастом (за счет явления ППР наночастицы золота обладают высоким оптическим откликом) с целью диагностики опухолей (фотоакустическое наблюдение) [220, 232].

Одним из современных направлений использования наночастиц золота является их фототермическая и фотодинамическая терапия [52, 180, 246, 309].

Фототермическая терапия с применением наночастиц золота характеризуется минимальной инвазивностью и заключается в выделении тепла наночастицами после поглощения ими излучения в видимой или близкой к ИК-области. Воздействие наночастиц золота на клетки MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы) в течение 45 мин при температуре 43°C приводит к гибели злокачественной ткани [285]. Продемонстрирован хороший потенциал фототермической терапии рака молочной железы с применением наночастиц золота со 100% эффективностью в ремиссии опухоли *in vitro* [134]

Фотодинамическую терапию проводят, воздействуя на организм лазером после введения наночастиц, что приводит к образованию активных форм кислорода и свободных радикалов в зоне их накопления [45, 101, 303].

Комбинация плазмонной фототермической терапии с химиотерапией (фототермическая химиотерапия), предусматривающая одновременное фототермическое уничтожение клеток и высвобождение лекарственного средства, конъюгированного с наночастицами золота, демонстрирует высокую противоопухолевую активность. Известно об использовании конъюгатов наночастиц золота с доксорубицином в комбинации с инфракрасным лазером,

которое показало противоопухолевый эффект по отношению к клеткам СТ26 (мышинная модель колоректального рака) [79].

Наночастицы золота также находят применение в рентгенодиагностике, что обусловлено высоким коэффициентом абсорбции наночастицами рентгеновского излучения, позволяющим использовать их в качестве рентгеноконтрастных веществ [305]. Также в рамках диагностики при проведении компьютерной томографии и магнитно-резонансной визуализации используется двойной контраст – наноструктуры на основе золота, покрытого оксидом железа [21].

### **3.3. Собственная противоопухолевая активность наночастиц золота и их использование в качестве средств доставки химиопрепаратов**

Показана собственная противоопухолевая активность наночастиц золота с диаметром 46 нм по отношению к культуре клеток остеосаркомы MG63. Такие наночастицы способны снижать трансмембранный потенциал митохондрий (ТМПМ) и инициировать процесс апоптоза, индуцируемый активными формами кислорода [270].

Известно о стимуляции иммунного ответа под действием наночастиц золота, которая объясняется их тропностью к дендритным клеткам. Связывание с дендритными клетками приводит к активизации выработки иммуностимулирующих (интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-12, и фактора некроза опухолей альфа – TNF- $\alpha$ ) и торможению выработки иммунодепрессивных цитокинов (трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1 и интерлейкин-10) [96].

Противоопухолевая активность наночастиц золота может быть связана с их способностью вызывать эффект повышения проницаемости сосудов – *nanomaterial-induced endothelial leakiness* (NanoEL). Наноматериалы проникают в интерстициальное пространство эндотелиальных клеток и нарушают межклеточные взаимодействия эндотелия за счет взаимодействия с кадгерином эндотелия сосудов (VE-cad). Это приводит как к интенсивному проникновению

самих наночастиц, так и к повышению возможности доставки к опухолям терапевтических агентов молекулярных размеров [273].

Гибель опухолевых клеток под действием наночастиц золота может объясняться способностью наночастиц к ионизации, что приводит к лизису или потере функций клеток [93].

Наночастицы золота при определенных пороговых значениях pH могут подвергаться частичной ионизации, что приводит к повышению осмотического давления. Диссоциация может происходить как внутри, так и снаружи относительно клеточной мембраны. Внутриклеточная ионизация при этом способна привести к лизису, связанному со входом воды в клетку, а внеклеточная ионизация, напротив, способна привести к выходу воды из клетки, что повлечет за собой потерю ее функций [93].

Перспективы диагностического или фармакотерапевтического применения наночастиц золота без специфической модификации их поверхности для повышения селективности по отношению к опухолевым клеткам могут ограничиваться их токсичностью. На сегодняшний день ввиду токсичности наночастиц золота FDA (Food and Drug Administration) одобрены только некоторые клинические исследования липосомальных и полимерных наночастиц [147, 210].

Основным параметром, определяющим токсичность наночастиц является их размер, в виду способности наночастиц размером около 10 нм к кумуляции [242, 247] и последующей агрегации [139]. Наночастицы золота оказывают гепатотоксическое действие, ассоциированное с ростом уровня купферовских клеток, развитием воспаления и активацией апоптоза [48]. Для различных культур опухолевых клеток на фоне введения наночастиц золота описаны задержка клеточного цикла, активация апоптоза, интенсификация липопероксидации, а также связывание частиц с ДНК [290]. Наночастицы размером 2 нм и менее являются токсичными ввиду своей способности проникать в ядро через поры в ядерной мембране и вызывать уплотнение и сегрегацию хроматина, а также фрагментацию ядра [226, 272], увеличение размера до 10 нм приводит к снижению токсичности [244].



Наиболее перспективным является применение наночастиц золота менее 8 нм в диаметре, что связано с их лучшей почечной экскрецией [62].

Одним из параметров, с которым связывают токсичность наночастиц является также их форма. Показано, что наночастицы в форме звезд, призм и цветов являются менее токсичными, в отличие от наносфер и наностержней, из-за способности последних группироваться внутри клетки, образовывать агрегаты и нарушать тем самым структуру клеточных мембран [270].

Наночастицы золота при лечении онкологических заболеваний можно применять не только в качестве самостоятельных цитотоксических агентов, но и в виде наноплатформ для таргетной доставки противоопухолевых препаратов [96, 100]. Известно, что наноразмерный оксид железа, а также наночастицы золота применяются для адресной доставки паклитаксела в клетки фибросаркомы и доцетаксела в клетки рака молочной железы [107, 235, 292]. Подобные направления их использования требуют модификации поверхности способами, описанными выше, что позволит повысить избирательность действия на трансформированную ткань.

Наибольшую эффективность против злокачественных новообразований оказывают конъюгаты наночастиц с химиопрепаратами, в которых наночастицы используются в качестве систем доставки благодаря своей низкой токсичности [169] и относительной биосовместимости [41]. Так, наночастицы золота, модифицированные цитратом и конъюгированные с метотрексатом (ионизированный метотрексат обменивается отрицательно заряженными цитрат-ионами наночастиц золота и хемосорбируется на их поверхности), показали индукцию цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам карциномы легкого Льюиса (LL2) *in vitro* и *in vivo* по сравнению со свободным метотрексатом [136, 190]. Также рядом исследователей при помощи алкантиоловых линкеров была осуществлена конъюгация наночастиц золота с такими противоопухолевыми веществами как паклитаксел [84], 5-фторурацил [233], доксорубин [94], цетуксимаб [59], митоксантрон [208]. При этом накопление золота, конъюгированного с химиопрепаратами, в опухолевых клетках происходило

быстрее и в более высоких концентрациях по сравнению со свободным противоопухолевым средством [189], что демонстрирует значительный потенциал наночастиц золота как носителей лекарств, нацеленных на опухолевые клетки.

Наночастицы золота могут применяться в качестве носителей для пептидов и плазмидных ДНК [141], при этом одним из преимуществ является то, что молекулы, ассоциированные с наночастицами защищены от ферментативной деградации в крови [135].

Также в недавних исследованиях продемонстрирована способность наночастиц золота выступать в качестве систем для доставки транскрипционного фактора p53 к опухолевым клеткам [289]. Существует метод нацеливания на EGFR (рецептор эпидермального фактора роста, гиперэкспрессирующийся на поверхности многих злокачественных новообразований) на основе наночастиц золота, который обеспечивает доставку p53 к клеткам рака яичников, что способствует запуску запрограммированной клеточной гибели под действием транскрипционного фактора [255].

Описано применение наночастиц золота в качестве систем доставки TNF- $\alpha$  к клеткам опухоли толстой кишки, приводящее к проявлению цитотоксического эффекта и развитию апоптоза злокачественных клеток без проявления системной токсичности по отношению к нормальным клеткам [84].

Таким образом, наночастицы золота являются перспективными химиотерапевтическими агентами с собственной цитотоксичностью, которые также могут использоваться для диагностики и физического воздействия на опухолевую ткань, а также в качестве средства таргетной доставки химиопрепаратов.

### **3.4. Способы оценки противоопухолевой активности веществ *in vitro***

В настоящее время для проведения исследований по оценке противоопухолевой активности исследуемых соединений в качестве моделей используют клеточные линии или ксенографты (гетеротрансплантаты) опухолей

человека, растущие у иммунодефицитных мышей и обладающие различными биологическими и биохимическими свойствами, в том числе лекарственной устойчивостью. Ксеногенные модели злокачественных опухолей позволяют дополнить исследования *in vitro*, а также применяются при изучении онкогенеза *in vivo* [78].

Известные методики оценки противоопухолевой активности *in vitro* предполагают изучение степени подавления пролиферации или снижения интенсивности метаболизма клеток под действием исследуемого соединения.

Могут быть использованы следующие методы оценки:

- метод подсчета клеток (применим преимущественно для лейкоза MOLT-4),
- МТТ/MTS-тест,
- <sup>3</sup>H-тимидиновый тест.

Приведенные методы предусматривают оценку выживаемости (метаболической активности) клеток, культивируемых в определенных условиях. Исследуемое соединение тестируют в 3 повторениях для 4 концентраций:  $10^{-7}$  М,  $10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М и  $10^{-4}$  М. Далее по кривой зависимости роста культуры клеток от концентрации соединения определяют  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$ , то есть концентрации препарата, вызывающие торможение роста клеток на 50% и 90% соответственно. После определения данных параметров проводится дополнительное тестирование при 4–5 концентрациях, близких к  $IC_{50}$  [13].

Метод подсчета клеток применим преимущественно для оценки метаболической активности клеток Т-лимфобластной лейкемии (MOLT-4). Исследуемый противоопухолевый агент в двукратной концентрации по отношению к конечной полностью растворяют в питательной среде (RPMI-1640) без добавления сыворотки и стерилизуют мембранной фильтрацией. В качестве контроля используют питательную среду с добавлением 20 мМ буфера HEPES. Далее суспензию разбавляют питательной средой с добавлением 20%-й эмбриональной сыворотки телят и 20 мМ буфера HEPES до необходимых концентраций и распределяют в пробирки с количеством клеток  $1 \times 10^4$  клеток/мл. Пробирки инкубируют 48 ч при 37°C, далее определяют количество клеток с

помощью автоматического счетчика клеток и для каждой из концентраций исследуемого противоопухолевого соединения вычисляют среднее значение из трех параллельных измерений и рассчитывают отношение к контрольному росту в процентах [13].

При проведении исследований на опухолевых клетках человека применяют МТТ- или МТС-тест. Методы основаны на ферментативном восстановлении живыми метаболически активными клетками неокрашенных солей тетраметилтетразолия – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ) или 5-(3-(карбоксиметокси)фенил)-3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2-(4-сульфофенил)-гидроксида (МТС) до формазана (голубые кристаллы). Интенсивность клеточного метаболизма (дыхательную активность клеток, в которых активны митохондриальные редуктазы, способные восстанавливать реагент до формазана) оценивают колориметрически на оптическом счетчике по величине оптической плотности при  $\lambda=570$  нм, далее вычисляют величины  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$  [13].

$^3H$ -тимидиновый тест предполагает определение метаболической активности клеток при помощи дисков из фильтровальной бумаги, на которые собирают клетки после предварительной инкубации их в планшете с анализируемым раствором и определяют содержание  $^3H$ -тимидина, включившегося в клетки. Высушенные диски при этом помещают в сцинтилляционные флаконы и с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика подсчитывают радиоактивность (в распадах в минуту на пробу) и выражают в % от контроля, определяя при этом  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$ . Другим вариантом проведения  $^3H$ -тимидинового теста является инкубация опухолевых клеток с исследуемым соединением и введением в лунки  $^3H$ -тимидина, после чего образцы промывают и гидролизуют. Пробы гидролизатов далее помещают в сцинтилляционную жидкость и измеряют уровень радиоактивности проб (распад/минуту) на жидкостном сцинтилляционном счетчике, выражают в % к контролю и вычисляют значения  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$  [13].

Одним из часто применяемых методов оценки количества жизнеспособных клеток является проточная цитофлуориметрия. Анализ жизнеспособности клеток

предполагает оценку их способности поддерживать эффективный барьер с внешней средой, ввиду чего клетки с поврежденной мембраной обычно классифицируются как мертвые клетки. Проточная цитофлуориметрия основана на пневматической подаче суспензии клеток в виде ламинарного потока, что позволяет клеткам проходить одна за другой через сфокусированный свет. Сигналы, полученные от детектора, позволяют определить характеристические особенности клеток. Преимуществом метода является то, что он способен предоставить данные по каждой обнаруженной клетке [185].

При проведении оценки жизнеспособности клеток также проводят анализ на исключение красителя трипанового синего. Метод основан на том, что жизнеспособные клетки (с неповрежденной клеточной мембраной) не окрашиваются красителем, в то время как мертвые клетки с нарушенной мембраной накапливают краситель и окрашиваются в синий цвет. Для проведения анализа клетки должны находиться в клеточной суспензии, которую окрашивают красителем и подсчитывают количество жизнеспособных клеток под микроскопом или с помощью автоматических счетных устройств [275].

Оценка общетоксического действия нанопрепаратов несопоставима с оценкой общетоксического действия низкомолекулярных лекарственных веществ, в связи с различием в характере распределения и выведения, времени нахождения нанопрепаратов в организме (в клетке), а также в сроках проявления возможных токсических эффектов. В настоящее время исследования в нанотоксикологии не имеют однозначной методики оценки общетоксического действия лекарственных препаратов на основе наночастиц [13, 120], однако по мнению ряда авторов наиболее приемлемой методикой является МТТ-тест [202].

Таким образом, способы скрининга противоопухолевой активности *in vitro* предполагают использование различных методик, наиболее применимой из которых не только для низкомолекулярных, но и для нанопрепаратов, является МТТ-тест.

#### **4. Возможные механизмы реализации противоопухолевой активности наночастиц золота**

Одним из вероятных механизмов клеточной гибели под действием наночастиц золота является инициация апоптоза, опосредованная проникновением наночастиц в клетку и накоплением в цитозоле, а также их способностью проникать в ядро. Известно, что наночастицы золота способны запускать процесс запрограммированной клеточной гибели за счет повышения уровня фактора некроза опухолей альфа – TNF- $\alpha$  (воспалительный цитокин, который накапливается в очаге опухоли во время прогрессирования рака) [140]. Повышение уровня TNF- $\alpha$  приводит к его связыванию со специфическим рецептором (TNF-рецептор) и способствует развитию апоптоза по рецептор-зависимому пути [67, 313].

Одним из возможных механизмов реализации клеточной гибели под влиянием наночастиц золота может быть нарушение функций митохондрий ввиду повышения внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК), что сопровождается снижением трансмембранного потенциала органелл [144, 225]. Наночастицы с катионным поверхностным зарядом обладают специфическим сродством к митохондриям и могут нарушать работу дыхательной цепи, что приводит к образованию АФК и последующей гибели опухолевых клеток посредством апоптоза и аутофагии [270, 279].

Апоптоз под действием наночастиц золота может быть также активирован по рецептор-опосредованному (внутреннему) пути за счет их влияния на активность иницирующих каспаз. Так, для сферических наночастиц золота с диаметром 13 нм показано нарушение ТМПМ, а также увеличение активности каспазы-8 и каспазы-9 в клетках НК-2 (линия иммортализованных клеток проксимальных канальцев почки человека) после 24-часовой инкубации. Однако активация каспаз наблюдалась уже при 20 мкМ концентрации тестируемых наночастиц золота, в то время как при 40 мкМ активации каспаз не происходило, что может объясняться

инициацией других процессов клеточной гибели, помимо апоптоза, например, аутофагии [142].

Гибель клеток под действием наночастиц золота может объясняться влиянием на транскрипционный фактор p53 посредством нарушения структуры ДНК после проникновения в ядро [324]. p53, в свою очередь, активирует проапоптотические белки семейства bcl-2, что в перспективе приводит к деполяризации внешней митохондриальной мембраны и выходу в цитозоль белков, индуцирующих активацию каспаз [265, 326].

К одним из возможных механизмов противоопухолевой активности наночастиц золота можно отнести их способность индуцировать окислительный стресс. Известно о повышении продукции АФК за счет взаимодействия электронно-активной поверхности наночастиц золота с кислородом, что сопровождается переходом свободных электронов с поверхности наночастиц (явление ППР) на молекулы кислорода и приводит к формированию супероксид-аниона. Образующийся супероксид-анион путем дисмутации образует АФК и вызывает окислительный стресс, что показано на клетках карциномы шейки матки (HeLa) под действием наночастиц золота с размером 1,4 нм. Окислительный стресс в свою очередь приводит к нарушению функций митохондрий и гибели опухолевых клеток путем апоптоза, опосредованного выходом из поврежденных митохондрий в цитозоль проапоптотических факторов [143].

Влияние наночастиц золота на митохондрии может также приводить к такому типу запрограммированной клеточной гибели, как ферроптоз. Наночастицы золота способны нарушать метаболизм железа в митохондриях, что приводит к накоплению лабильного железа ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ), способствующего образованию продуктов ПОЛ (перекисного окисления липидов), снижению ТМПМ и последующей активации ферроптоза. При этом наблюдаются изменения структуры митохондрий – уменьшение объема, увеличение плотности двухслойных мембран, разрушение их внешней мембраны митохондрий и исчезновение митохондриальных крист. Активация ферроптоза под действием наночастиц также может быть связана с нарушением работы лизосом, являющихся хранилищем

большого количества редокс-активного железа. Проникновение наночастиц золота в лизосомы вызывает окислительно-восстановительные реакции, приводящие к денатурации лизосомальных биомолекул и выходу лабильного железа  $Fe^{2+}$  в цитозоль. Далее в результате реакции Фентона инициируется ПОЛ, что приводит к развитию ферроптоза [211].

В качестве одного из возможных механизмов реализации противоопухолевой активности наночастиц золота можно рассматривать их влияние на ABCB1-белок. ABCB1-белок (гликопротеин-P, Pgp) является мембранным эффлюксным АТФ-зависимым белком-транспортером, который контролирует абсорбцию, а также распределение и экскрецию широкого спектра эндогенных веществ и ксенобиотиков, имеющих преимущественно липофильную природу [26].

Известно о широкой локализации ABCB1-белка в различных системах и органах (гепатоциты, эндотелий гистогематических барьеров, энтероциты и эпителиоциты проксимальных почечных канальцев и т.д.) в физиологических условиях, а также о его гиперэкспрессии на мембранах опухолевых клеток [126, 251].

Возрастание количества и функциональной активности белка-транспортера в опухолевых клетках происходит под действием таких факторов, как окислительный стресс, гипоксия, дефицит питательных веществ и т.д. и является ведущей причиной феномена МЛУ [314], так как к числу его субстратов относится порядка 50% современных лекарственных веществ, в том числе химиопрепараты (доцетаксел, доксорубицин, иринотекан, митоксантрон, паклитаксел, винкристин, винбластин) [160, 330]

ABCB1-белок способен препятствовать развитию апоптоза в опухолевых клетках за счет модуляции активности ключевых ферментов окислительного стресса (глутатион-S-трансфераза, супероксиддисмутаза, каталаза) [241, 250], а также путем транспортировки цитокинов (интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-2, интерлейкин-4) при апоптозе [33]. На клеточной линии K562 (миелолейкоз человека) отмечена индукция апоптоза и остановка клеточного цикла после их инкубации с ингибиторами (силибинин) ABCB1-белка [98].



Наночастицы золота возможно конъюгировать с химиопрепаратами-субстратами ABCB1-белка с целью преодоления МЛУ, подобная конъюгация позволит доставить противоопухолевый препарат в трансформированную ткань за счет способности наночастиц проникать в клетки с помощью EPR-эффекта [214].

Таким образом, фармакологическое ингибирование ABCB1-белка избирательно в опухолевых клетках является перспективной целью как для повышения эффективности химиопрепаратов, являющихся его субстратами, так и для снижения резистентности трансформированных клеток к другим видам воздействий (ионизирующее излучение, гипоксия и пр.)

Ингибирование ABCB1-белка может происходить в результате прямого взаимодействия ряда соединений (флавоноиды [277], ксантоны [323] и синтетические таксоиды) с молекулой транспортера, что приводит к его конформационным изменениям. К прямым ингибиторам относят верапамил, омепразол, зосуквидар, и другие вещества, которые способны формировать водородные связи с остатками тирозина в трансмембранном домене ABCB1-белка [80]. Существует также механизм непрямого ингибирования ABCB1-белка, реализующийся за счет изменения относительного количества транспортера на мембранах клеток, что приводит к снижению его функциональной активности (фабомотизол) [5])

Анализ принадлежности веществ к числу ингибиторов ABCB1-белка проводят на моделях *in vitro* – используют культуры клеток, гиперэкспрессирующие ген *MDR1*, кодирующий ABCB1-белок: например, Сасо-2 [230], IGROV-1 (карцинома яичников человека [222]), К562 (миелолейкоз человека [186]). При этом свидетельством ингибирующей активности исследуемых соединений будет являться замедление транспорта маркерного субстрата транспортера (фексофенадин, дигоксин и др.) внутрь клеток под их воздействием [157]. В случае положительных результатов *in vitro* в дальнейшем проводят опыты *in vivo* на животных, вводя им потенциальный ингибитор ABCB1-белка совместно с маркерным субстратом ABCB1-белка с дальнейшим анализом их фармакокинетики.

Дополнительно оценить интенсивность функциональной активности ABCB1-белка *in vitro* и *in vivo* можно путем изучения его относительного (иммуногистохимия) или абсолютного (вестерн-блот, ИФА) количества. Однако, увеличение количества ABCB1-белка не всегда коррелирует с модуляцией его эффлюксной активности, в связи с чем необходимо оценивать функционирование транспортера комплексно [251].

Наноразмерные материалы способны оказывать влияние на ABCB1-белок. Для наночастиц серебра при их воздействии на клетки A549 (аденокарцинома альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) показано увеличение экспрессии ABCB1-белка через 6 часов инкубации и снижение его экспрессии через 12 часов инкубации [172].

На клетках линии Colo320 (колоректальный рак) показано снижение экспрессии и активности ABCB1-белка под действием наночастиц серебра с диаметром 28 нм, а также под действием наночастиц серебра диаметром 20 нм на клетки немелкоклеточного рака легкого (A5490) и клетки гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) [106, 172]. Для наночастиц золота размером 4,1 нм и 5,4 нм продемонстрировано различное влияние на ABCB1-белок в клетках MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы человека) в зависимости от эффективности их связывания с активным центром транспортера. Для наночастиц большего размера (5,4 нм) ввиду несоответствия размера наночастиц и активного центра ABCB1-белка не наблюдается эффективного связывания с транспортером [298]. Определено, что критический размер наночастиц золота для преодоления МЛУ составляет от 4,1 до 5,4 нм [298]. К возможным механизмам ингибирования ABCB1-белка можно отнести влияние наночастиц золота на АТФ-азную активность транспортера [257].

Таким образом, наночастицы золота способны реализовывать свой противоопухолевый потенциал с помощью различных механизмов, включающих индукцию окислительного стресса, непосредственного повреждения митохондриальной мембраны или ДНК, ингибирования ABCB1-белка,

приводящих в конечном итоге к гибели опухолевых клеток путем апоптоза, аутофагии или ферроптоза.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

Исследовали водные коллоидные растворы модифицированных гликонаночастиц золота с диаметром 18–21 нм [19], синтезированные в лаборатории полимерных наноматериалов и композиций для оптических сред Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН) (г. Санкт-Петербург):

- 1) Золото-Меркаптогексаноилгидразид-Фукоза (Au-MNH-Fuc)  
(концентрация исходного раствора – 1 мг/мл);
- 2) Золото-Меркаптопропаноилгидразид-Лактоза (Au-MPH-Lac)  
(концентрация исходного раствора – 2 мг/мл);
- 3) Золото-Меркаптопропаноилгидразид-Галактоза (Au-MPH-Gal)  
(концентрация исходного раствора – 1 мг/мл).

Синтез гликонаночастиц золота состоял из трех стадий. Первая стадия представляла собой получение лигандов (II) путем взаимодействия природных моносахаридов (фукозы, галактозы) или дисахарида (лактозы) (I) с гидразидами 3-меркаптопропионовой или 6-меркаптогексановой кислот при кипячении эквимольных количеств тиолированных гидразонов и соответствующего углевода в метаноле (лактоза, галактоза) или водно-метанольном растворе (фукоза) в течение 8 и 5 часов соответственно с последующим удалением растворителя под вакуумом (рисунок 1).

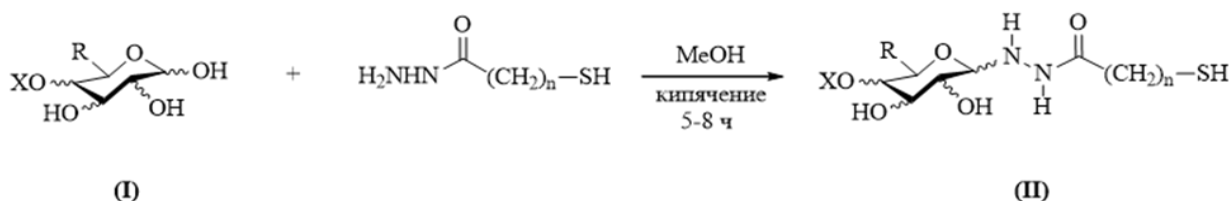


Рисунок 1 – Схема получения гликолигандов

Примечание – X – атом водорода или фрагмент D-галактозы, R – метильная (фукоза) или гидроксиметильная (лактоза, галактоза) группа, n – этаноильная группа или пентаноильная группа.

Вторая стадия подразумевала получение наночастиц золота цитратным способом по методу Туркевича (рисунок 2) [315] с дальнейшей оценкой их диаметра и индекса полидисперсности методом динамического светорассеяния на анализаторе Malvern Zetasizer Nano-ZS («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) с длиной волны лазерного излучения 633 нм.

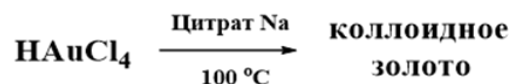


Рисунок 2 – Схема получения коллоидного золота по методу Туркевича

Третья стадия заключалась в модификации наночастиц продуктами конденсации (II), полученными на первой стадии синтеза, путем введения в раствор коллоидного золота избытка соответствующего гликолиганда и выдерживания при комнатной температуре в течение 48 часов (рисунок 3) [20].

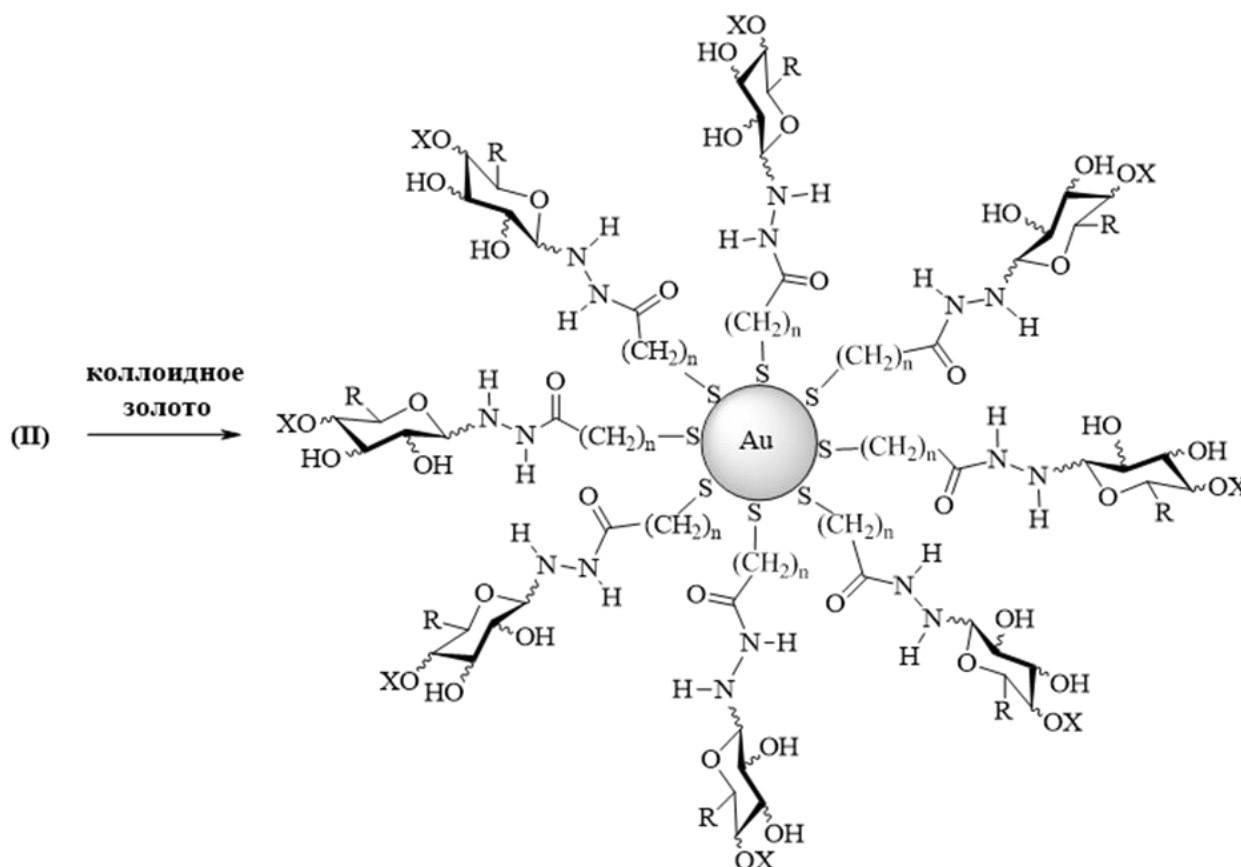


Рисунок 3 – Модификация коллоидного золота гликолигандами

Электронные спектры поглощения гликонаночастиц золота регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия) в диапазоне длин волн 300–750 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см: максимум оптической плотности

наблюдался при 530 нм (Au-MNH-Fuc), при 533 нм (Au-MPH-Lac), и при 529 нм (Au-MPH-Gal). Для определения морфологии (подтверждение шаровидной формы) гликонаночастиц золота использовался метод просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе Jeol JEM 100 S («Jeol», Япония).

Элементный анализ на этапе получения гликолигандов проводили на анализаторе Hewlett-Packard 185B («Hewlett Packard», США). Спектры ядерного магнитного резонанса  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  гликолигандов снимались на спектрометре Bruker AV-400 при рабочих частотах 400 и 100 МГц соответственно и подтверждали структуру веществ.

Контроль за протеканием реакций получения гликолигандов (до исчезновения исходных веществ) осуществлялся методом тонкослойной хроматографии на пластинках марки Silufol UV-254 в системе бутанол–вода–диметилкарбонат в соотношении 8:1:1 [19]. Концентрацию гликонаночастиц золота в исходных растворах оценивали исходя из начальной концентрации золотохлористоводородной кислоты ( $\text{HAuCl}_4$ ), которую брали в недостатке относительно восстановителя (цитрата натрия).

В качестве препарата сравнения при оценке противоопухолевой активности и изучении ее механизмов был использован стандартный фармакопейный образец фторурацила (Nantong Jinghua Pharmaceutical Co., Ltd., Китай), который рекомендован для адъювантной терапии колоректальных опухолей [27]. В качестве ингибитора эффлюксной активности мембранного транспортера ABCB1-белка был использован хинидин (Sigma-Aldrich, США).

## 2.2. Клеточные линии и условия их культивирования

Оценку противоопухолевой активности гликонаночастиц золота и изучение ее механизмов проводили на клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2); оценку функциональной активности ABCB1-белка – также на линии эмбриональных клеток почки человека (HEK-293). Обе культуры закуплены в центре коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных»

(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук», г. Санкт-Петербург, Россия), полученных ими из Американской коллекции типовых клеточных культур (American Type Culture Collection, США).

Линия клеток Caco-2 имеет свойство через 21 день культивирования на плоской подложке спонтанно дифференцироваться в клетки, морфологически и функционально подобные кишечному эпителию человека [152], что позволяет использовать данную клеточную линию в качестве модели опухолевых и условно «нормальных» клеток. Клетки обеих культур культивировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе (WS-180SC, Корея) в условиях 5%-го содержания углекислого газа при температуре 37°C в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM, «ПанЭко», Россия) с содержанием глюкозы 4500 мг/л и добавлением L-глутамина (4 ммоль/л) («Sigma Aldrich», Германия), 15% (для НЕК-293 – 10%) фетальной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия) и 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) соответственно. Длительность культивирования клеток Caco-2 составляла 48 часов (опухолевые клетки) или 21 день после достижения монослоя (дифференцированные, «нормальные» клетки). Клетки НЕК-293 культивировали в аналогичных условиях в течение 48 часов после достижения монослоя. Смену питательной среды производили ежедневно.

### **2.3. Оценка цитотоксичности гликонаночастиц золота**

Цитотоксичность гликонаночастиц золота (влияние на интенсивность клеточного метаболизма) анализировали с помощью МТТ-теста [13].

Клетки линии Caco-2 высевали на 96-луночные планшеты («Corning», США) в количестве 10<sup>4</sup> клеток на лунку и культивировали в течение 48 часов после достижения монослоя опухолевых клеток, а также в течение 21 суток после образования монослоя («нормальные» клетки).

Для проведения эксперимента готовили рабочие растворы гликонаночастиц золота и препарата сравнения – фторурацила путем разведения исходных

растворов питательной средой. Для Au-MNH-Fuc использовали концентрации в диапазоне 10–600 мкг/мл (10, 25, 50, 100, 200, 400, 450, 475, 500, 550, 600), для Au-MPH-Lac – в диапазоне 10–900 мкг/мл (10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 650, 700, 750, 850, 900), для Au-MPH-Gal – в диапазоне 10–550 мкг/мл (10, 25, 50, 100, 200, 400, 450, 475, 500, 550), для фторурацила – в диапазоне 50–2000 мкг/мл (50, 200, 600, 800, 1000, 1500, 2000). В качестве контроля использовали лунки с питательной средой без добавления гликонаночастиц или препарата сравнения.

Гликонаночастицы золота и препарат сравнения фторурацил инкубировали с клетками в течение 2 и 8 часов.

По истечении указанных сроков инкубации клеток с анализируемыми веществами в каждую лунку планшета добавляли по 20 мкл 0,5%-го изотонического раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, Диаэм, Россия) и инкубировали в течение 2 часов, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). После 10 минут инкубации с диметилсульфоксидом производили измерение оптической плотности растворов на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («Awareness Technology», США) при 530 нм, используя дифференциальный светофильтр на 620 нм.

Влияние исследуемых растворов на интенсивность клеточного метаболизма (цитотоксичность) рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП blank}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП blank}} * 100\%, \quad (1)$$

где ОП – оптическая плотность, blank – лунка без клеток после инкубации с растворами тестируемых веществ, контрольные лунки – лунки с клетками после инкубации с чистой питательной средой.

Далее рассчитывали значения концентраций полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) с помощью программы GraphPad Prizm 8.4.3. Для каждой концентрации и срока инкубации выполняли по 4 повторения эксперимента.

В связи с тем, что результаты МТТ-теста характеризуют в первую очередь интенсивность клеточного метаболизма [295], дополнительно была оценена выживаемость клеток после инкубации с гликонаночастицами золота и



фторурацилом. Для этого после 2- и 8-часовой инкубации опухолевых клеток с тестируемыми веществами в концентрациях, соответствующих ( $IC_{50}$ ) (таблица 1) удаляли питательную среду, затем клетки снимали со дна 96-луночного планшета струей свежей питательной среды (100 мкл), ресуспендировали, смешивали 10 мкл клеточной суспензии с 10 мкл красителя трипанового синего (Thermo Fisher Scientific, США) и наносили смесь на картридж автоматического счетчика клеток Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контроля использовали клетки, инкубируемые с питательной средой без добавления исследуемых соединений. Для каждого вещества и срока инкубации выполняли по 3 повторения.

Таблица 1 –  $IC_{50}$  растворов гликонаночастиц золота и фторурацила по отношению к опухолевым клеткам при 2- и 8-часовой инкубации

Срок инкубации	$IC_{50}$ Au-MNH-Fuc, мкг/мл	$IC_{50}$ Au-MPH-Lac, мкг/мл	$IC_{50}$ Au-MPH-Gal, мкг/мл	$IC_{50}$ Фторурацила, мкг/мл
2 часа	480	770	470	2110
8 часов	340	520	300	1760

Примечание – значения, рассчитанные с помощью программы GraphPad Prizm 8.4.3., округлены до 10 мкг/мл.

#### **2.4. Оценка механизмов противоопухолевой активности гликонаночастиц золота**

При исследовании возможных механизмов противоопухолевой активности гликонаночастиц золота оценивали их влияние на интенсивность окислительного стресса, величину трансмембранного потенциала митохондрий (ТМПМ). Кроме того, изучалась способность тестируемых веществ инициировать апоптотический процесс: оценивался уровень каспазы-3 и проапоптотического транскрипционного фактора p53; а также ингибирующий потенциал по отношению к ABCB1-белку, одна из функций которого заключается в препятствовании апоптозу за счет

обеспечения оттока продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (малонового диальдегида – МДА, окисленного глутатиона), а также химиопрепаратов во внеклеточное пространство [47, 251].

Исследование выполнено на культурах клеток Сасо-2 (оценка всех предполагаемых механизмов) и НЕК-293 (анализ функциональной активности АВСВ1-белка), которые культивировали на культуральных флаконах до образования монослоя, затем высевали на 6-луночные (анализ интенсивности окислительного стресса, величины ТМППМ, уровня каспазы-3 и белка р53, количества АВСВ1-белка) или 24-луночные (анализ активности АВСВ1-белка) планшеты («Corning», США) в количестве  $10^6$  и  $10^5$  клеток на лунку соответственно. Далее клетки культивировали в течение 48 часов после достижения монослоя. Таким образом, в данном исследовании использовалась недифференцированная культура Сасо-2, то есть опухолевые клетки.

Сроки инкубации опухолевых клеток с исследуемыми растворами и фторурацилом при определении механизмов цитотоксичности составили 2 и 8 часов. Клетки инкубировали с растворами исследуемых соединений в концентрациях  $IC_{50}$ , соответствующих каждому сроку (таблица 1) (анализ интенсивности окислительного стресса, величины ТМППМ, уровня каспазы-3 и белка р53) или в концентрациях, соответствующих минимальным значениям, при которых исследуемые растворы не оказывали повреждающего действия на опухолевые клетки (интенсивность клеточного метаболизма достоверно не отличалась от 100%) (анализ относительного количества и активности АВСВ1-белка) (таблица 2). Концентрация хинидина (вещества с известной ингибирующей активностью по отношению к АВСВ1-белку) выбрана на основании данных научной литературы [12, 24] и составила 200 мкМ для обоих сроков инкубации.

Таблица 2 – Максимальные концентрации растворов гликонаночастиц золота и фторурацила, при которых интенсивность метаболизма опухолевых клеток достоверно не ниже 100%

Срок инкубации	Au-MNH-Fuc, мкг/мл	Au-MPH-Lac, мкг/мл	Au-MPH-Gal, мкг/мл	Фторурацил, мкг/мл
2 часа	450	700	400	1750
8 часов	300	490	250	1000

#### **2.4.1. Приготовление клеточных лизатов для оценки механизмов противоопухолевой активности гликонаночастиц золота**

После инкубации с тестируемыми веществами клетки снимали со дна лунок с помощью раствора трипсин-этилендиамин-тетрауксусной кислоты (трипсин-ЭДТА) (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия), трехкратно промывали фосфатным буфером с pH=7,4 («ПанЭко», Россия) и лизировали согласно описанным протоколам.

В качестве контроля при всех видах анализа использовали клетки, которые инкубировали с питательной средой, разведенной водой для инъекций, аналогично рабочему раствору гликонаночастиц золота соответствующего срока. Каждый анализ выполняли 4-кратно (3-кратно при анализе влияния веществ на относительное количество ABCB1-белка).

##### *Приготовление клеточных лизатов для метода гИФА и метода Элмана*

Клетки после снятия со дна планшета лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки при  $-80^{\circ}\text{C}$  в 300 мкл фосфатного буфера. Анализ показателей (уровень SH-групп, уровень МДА, количество G-per, уровень каспазы-3 и белка p53) проводили в лизатах клеток после центрифугирования при 3000 g в течение 15 минут на центрифуге (LaboGene, Дания) в пересчете на белок,

содержание которого оценивали по методу Брэдфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США) [65].

#### *Приготовление клеточных лизатов для определения уровня ТМПМ*

После инкубации с тестируемыми веществами и красителем раствор удаляли, клетки выдерживали в течение 10 минут с раствором фосфатного буфера (рН 7,2), содержащего 0,2% раствор Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), снимали с лунок и лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки при  $-80^{\circ}\text{C}$  в 300 мкл фосфатного буфера. Анализ уровня ТМПМ проводили в лизатах клеток после центрифугирования при 3000 g в течение 15 минут.

#### *Приготовление клеточных лизатов для метода вестерн-блот*

После снятия клеток с планшета к суспензии клеток на 30 минут при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  при постоянном перемешивании прибавляли лизирующий буфер NP<sub>40</sub> Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил)фторида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1 мМ, транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ (Sigma-Aldrich, Германия)) из расчета 100 мкл буфера на  $10^7$  клеток. После проведения лизиса пробы центрифугировали в течение 10 минут при 10000 g на центрифуге Avanti JXN-3 (Beckman Coulter, США) для отделения неразрушенных клеток и ядер.

#### *Приготовление клеточных лизатов для метода ВЭЖХ-МС/МС*

Клетки лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки при  $-80^{\circ}\text{C}$  в 350 мкл фосфатного буфера. Анализ функциональной активности ABCB1-белка) проводили в лизатах клеток после центрифугирования при 3000 g в течение 15 минут на центрифуге (LaboGene, Дания) в пересчете на белок, содержание которого оценивали по методу Брэдфорда [65].

#### **2.4.2. Оценка влияния гликонаночастиц золота на интенсивность окислительного стресса**

При проведении оценки влияния исследуемых растворов на интенсивность окислительного стресса в опухолевых клетках определяли количество общих сульфгидрильных (SH) групп, концентрацию МДА, а также уровень антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы IV типа (G-per).

Количество общих SH-групп в лизате опухолевых клеток анализировали по методу Элмана с 5,5'-дитиобис-2-нитробензоатом в неденатурирующих условиях [32]. К 200 мкл клеточного лизата добавляли 100 мкл 2 мМ раствора 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) («Serva», Германия) в 1 М Tris-HCl буфера (pH 8,0) и 1000 мкл воды деионизированной, после 30 минут экспозиции при комнатной температуре количественно оценивали содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на спектрофотометре («Bio-rad», США) при длине оптического пути 1 см. Концентрацию SH-групп рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции  $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [103], полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Количество МДА и G-per в лизате клеток определяли с помощью гетерогенного иммуноферментного анализа (ГИФА) (Blue Gene, Китай), полученные результаты выражали в нг/мг белка.

#### **2.4.3. Оценка влияния гликонаночастиц золота на величину трансмембранного потенциала митохондрий**

При исследовании влияния гликонаночастиц золота на величину ТМПМ опухолевых клеток Сасо-2 после инкубации с анализируемыми растворами питательную среду удаляли и окрашивали клетки красителем MitoTracker<sup>TM</sup> Red CMXRos (Invitrogen, США) с рабочей концентрацией 200 нМ путем инкубации в течение 30 минут. Далее раствор удаляли, клетки выдерживали в течение 10 минут с раствором фосфатного буфера (pH 7,2), содержащего 0,2% раствор Triton X-100

(Sigma-Aldrich, США), снимали с лунок и лизировали, как указано в разделе 2.4.1. Величину ТМПМ оценивали по интенсивности флуоресценции с использованием спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000, Япония) при длине волны возбуждения 579 нм, длине волны эмиссии 599 нм [266], полученные результаты выражали в % от контроля.

#### **2.4.4. Оценка способности гликонаночастиц золота инициировать апоптотический процесс**

При исследовании способности гликонаночастиц золота стимулировать апоптоз оценивали уровень каспазы-3 и проапоптотического белка p53 в клеточном лизате. Каспаза-3 является основной эффекторной каспазой, накопление которой свидетельствует об активации апоптоза по одному из основных путей (внешний, митохондриальный) [104, 270]. Накопление проапоптотического транскрипционного фактора p53 также может свидетельствовать об инициации клеточной гибели посредством апоптоза (митохондриальный путь) [54] или аутофагии (транскрипционно-зависимым способом) [92].

Уровень транскрипционного фактора p53 и каспазы-3 определяли в лизате клеток после их инкубации с исследуемыми растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в концентрациях  $IC_{50}$  в течение 2 и 8 часов методом ГИФА с применением коммерческих наборов Blue Gene (Китай) методом абсолютной калибровки с использованием стандартов, входивших в состав наборов, по методике, описанной в инструкции. Полученные результаты при оценке уровня каспазы-3 выражали в нг/мг белка, при оценке уровня транскрипционного фактора p53 – в пг/мг белка.

## **2.4.5. Оценка влияния гликонаночастиц золота на функционирование АВСВ1-белка**

### **2.4.5.1. Оценка влияния гликонаночастиц золота на относительное количество АВСВ1-белка**

Относительное количество АВСВ1-белка на мембранах опухолевых клеток Сасо-2 определяли с применением метода вестерн-блот. Клетки культивировали в течение 48 часов после достижения монослоя, затем питательную среду заменяли исследуемыми растворами гликонаночастиц золота или фторурацила в питательной среде в концентрациях, соответствующих их  $IC_{50}$ , и инкубировали в течение 2 и 8 часов. После инкубации клетки снимали с планшета и лизировали, как указано в разделе 2.4.1. Затем клеточные лизаты обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad: смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащим 2,5% 2-меркаптоэтанола («Helicon», Россия), в соотношении 1:3, инкубировали в течение 5 минут при температуре 70°C (термостат Гном (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)). Подготовленные пробы в объеме 20 мкл (содержание белка 30 мкг) вносили в лунки электрофоретической системы и подвергали вертикальному электрофорезу с использованием 7,5%-го TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) при 100 В в течение 90 минут. Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, «Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А и блокировали 1%-м раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween-20 («Sigma», Германия), при инкубации в течение 1 часа и комнатной температуре.

Для определения относительного количества АВСВ1-белка использовали первичные мышинные моноклональные антитела P-Glycoprotein Antibody MA5-13854 («Invitrogen», США) в разведении 1:200 в растворе Casein blocker (раствор казеина с добавлением 0,1%-го раствора Твина 20) («Bio-Rad», США). Визуализацию первичных антител осуществляли с применением вторичных

кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 в растворе Casein blocker.

Количество ABCB1-белка было оценено относительно содержания белка домашнего хозяйства – GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). В качестве первичных антител к GAPDH использовали Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R) DyLight 68 («Invitrogen», США), в разведении 1:1000 в растворе Casein blocker, в качестве вторичных антител – кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), в разведении 1:4000 в растворе Casein blocker.

Применялась хемилюминесцентная визуализация белков на приборе Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad», США). Денситометрически определяли интенсивность полученных полос (бэндов) с использованием программного обеспечения Image Lab («Bio-Rad», США). Молекулярную массу ABCB1-белка подтверждали путем сравнения с предварительно установленными маркерами молекулярной массы (Precision Plus Protein Standards Dual Color, «Bio-Rad», США).

#### **2.4.5.2. Оценка влияния гликонаночастиц золота на функциональную активность ABCB1-белка**

##### **2.4.5.2.1. Разработка и валидация методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС**

Эффлюксная активность ABCB1-белка оценивалась косвенно – по степени внутриклеточного накопления маркерного субстрата транспортера – фексофенадина (United States Pharmacopeia Reference Standard, США). Возрастание проникновения данного вещества в клетки, гиперэкспрессирующие ABCB1-белок, может свидетельствовать о снижении его функциональной активности, и наоборот [81]. Исходя из незначительной интенсивности трансмембранного переноса фексофенадина [6] необходима разработка высокочувствительной методики его количественного анализа в клеточном лизате.



Исследование выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащенном автосемплером, дегазатором, градиентным насосом и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Использовали обращенно-фазную хроматографическую колонку UCT Selectra C18 4,6 мм\*100 мм 5 мкм, 100 Å и предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM. В качестве стандарта использовали субстанцию фексофенадина гидрохлорида.

Для разработки и валидации методики количественного определения фексофенадина в качестве матрицы использовали лизат клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2. Клетки культивировали на 24-луночных планшетах в течение 48 часов после образования монослоя, снимали со дна и лизировали по методике, описанной в разделе 2.4.1.

Маточный раствор фексофенадина готовили с концентрацией 1 мг/мл в метаноле и хранили при температуре -20°C. Концентрации рабочих растворов фексофенадина, которые получали из маточного путем его разбавления метанолом, составили: 5, 10, 15, 50, 100, 250, 400, 500 нг/мл.

Предварительно готовили градуировочные стандарты и образцы для контроля качества путем разбавления рабочих растворов матрицей. Концентрации градуировочных стандартов составили 0,5, 1, 1,5, 5, 10, 25, 40 и 50 нг/мл, концентрации образцов для контроля качества – 0,5, 1,5, 25 и 40 нг/мл [18]. Аналитический диапазон методики выбирали на основе концентраций, ожидаемых в исследовании на клеточной линии Caco-2 с учетом концентрации фексофенадина в питательной среде при культивировании клеток и процента внутриклеточного проникновения вещества.

Внутренний стандарт, используемый при валидации методики, амантадин (амантадина гидрохлорид, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США), выбирался из следующих веществ: анастразол, валсартан, амантадин, амлодипин, метопролол в концентрациях от 1 до 10 нг/мл (Sigma-Aldrich, США). Подбор внутреннего стандарта осуществлялся путем вкола тестируемых веществ согласно методике анализа, подобранной для фексофенадина, с последующим

отбором по параметрам пригодности хроматографической системы и близости времени удерживания внутреннего стандарта к времени удерживания фексофенадина. Раствор внутреннего стандарта готовили путем добавления к 1 мкл раствора каждого из веществ в соответствующем растворителе с концентрацией 1 мг/мл 99 мкл ацетонитрила до получения раствора с концентрацией 10 мкг/мл. Далее к 50 мкл полученного раствора добавляли 49950 мкл ацетонитрила (10 нг/мл).

Управление системой и математическую обработку данных проводили с помощью программы «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Для приготовления подвижной фазы использовали следующие реактивы: вода ВЭЖХ-МС («VWR», №21F104014; Франция), метанол (массовая доля (%)  $\geq$  99,99, Химмед, Россия), кислота муравьиная 98%-я для аналитики («Panreac AppliChem», №0001900259; Испания), ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ («Химмед», Россия).

При подборе профиля элюирования на начальном этапе вводили пробу анализируемого соединения (фексофенадина) в изократическом режиме (анализировался каждый элюент): муравьиная кислота, ацетонитрил, метанол. Далее апробировали градиентный режим элюирования, предусматривающий подбор соотношения компонентов подвижной фазы (смесь 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила или смесь 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты и метанола), а также определение влияния концентрации органического растворителя на элюирующую силу подвижной фазы по отношению к аналиту. При этом последовательно производили вкол водно-метанольного или водно-ацетонитрильного растворов фексофенадина (200 нг/мл) в объеме 10 мкл, имеющих концентрацию органического компонента в подвижной фазе 20%, 50% и 80%. Каждая смена концентрации органического компонента подвижной фазы при этом сопровождалась уравниванием колонки в течение 1 часа путем введения растворителя с меньшей элюирующей силой (вода) с последующей сменой на растворитель с большей элюирующей силой (ацетонитрил или метанол). На основании полученных данных составляли профиль градиентного режима

элюирования путем выбора начальной концентрации растворителя и ее изменения в ходе анализа по принципу увеличения элюирующей силы подвижной фазы до выхода целевого соединения. После выхода пика фексофенадина проводили смену соотношения органического растворителя и воды на режим для уравнивания колонки.

Скорость потока подвижной фазы, режим термостатирования и объем вводимой пробы подбирались с целью получения оптимальных хроматографических параметров, таких как эффективность (число теоретических тарелок) и симметрия пиков.

Режим ионизации целевого вещества, скорости потока оболочечного, вспомогательного и продувочного газов, а также температура трубки для переноса ионов и испарителя подбирались автоматически. Параметры источника ионов (объемные скорости вспомогательного газа – азота, напряжение электрораспыления, потенциал декластеризации, температуры испарителя и ион-транспортующего капилляра) подбирались с учетом скорости потока подвижной фазы согласно значениям по умолчанию, определенным для используемого масс-спектрометра и источника ионов к каждому диапазону скоростей потока. Параметры фрагментации фексофенадина и внутреннего стандарта подбирались в полуавтоматическом режиме методом прямого шприцевого ввода водно-метанольного раствора веществ с 80%-м содержанием метанола и 20%-м – водной 0,1%-й муравьиной кислоты и концентрацией целевого соединения 1 мкг/мл со скоростью потока 15 мкл в минуту. Фрагментация осуществлялась аргоном, для которого проверяли давление подачи 1,5, 2,0, 2,5 и 3,0 мТорр. Из полученных результатов выбирали условия, при которых наблюдалась максимальная интенсивность ионов фрагментов фексофенадина и внутреннего стандарта, один осколочный ион (с максимальной интенсивностью) отбирался для количественного анализа, а следующий по интенсивности – дополнительно для качественного анализа как подтверждающий.

При проведении пробоподготовки 300 мкл интактного лизата клеток (для анализа селективности) или градуировочных растворов (для контроля качества)

смешивали с 300 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом для осаждения белка и других высокомолекулярных соединений. Далее пробы перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия) и центрифугировали при 25000 g в течение 10 минут при температуре 4°C.

Разработанную биоаналитическую методику валидировали по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), матричный эффект, перенос пробы и стабильность образцов в соответствии с современными отечественными и зарубежными руководствами [18, 149].

#### **2.4.5.2.2. Оценка функциональной активности ABCB1-белка**

Функциональную активность ABCB1-белка анализировали путем оценки накопления внутри клеток Caco-2 (опухолевой их разновидности) и HEK-293 маркерного субстрата транспортера – фексофенадина. Фексофенадин не подвергается метаболической трансформации, а его проникновение через клеточные мембраны контролируется данным белком-переносчиком, который осуществляет его активный эффлюкс. Таким образом, рост внутриклеточного содержания вещества после инкубирования с гликонаночастицами золота может косвенно свидетельствовать о снижении активности ABCB1-белка. Количественный анализ фексофенадина в лизате клеток выполняли с применением разработанной и валидированной методики ВЭЖХ-МС/МС.

Исследование проводили на 2 клеточных линиях. Клетки Caco-2, содержащие ABCB1-белок на мембранах, использовали в качестве положительного контроля. Клетки HEK-293 (линия эмбриональных клеток почек человека) использовали в качестве негативного контроля, в связи с отсутствием экспрессии транспортера [154]. Через 48 часов после образования монослоя клеточные культуры преинкубировали в течение 2 и 8 часов с растворами

гликонаночастиц золота или с препаратами сравнения (фторурацил и хинидин) в питательной среде в соответствующих концентрациях.

После преинкубации растворы удаляли из лунок и к клеткам добавляли растворы гликонаночастиц золота или препаратов сравнения с добавкой фексофенадина (150 мкМ) в растворе Хэнкса («Панэко», Россия) и инкубировали 2 часа. После инкубации удаляли исследуемые растворы из лунок, клетки промывали, снимали со дна планшетов и лизировали. В дальнейшем лизаты подвергали пробоподготовке, как описано в разделе 2.4.1, и анализировали количественное содержание фексофенадина, полученные результаты выражали в нг/мг белка.

## 2.5. Статистическая обработка полученных результатов

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Statistica 13.0 (США, № лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W). Распределение данных анализировали, используя критерий Шапиро-Уилка. Различия контрольных значений  $IC_{50}$  исследуемых веществ по отношению к опухолевой и «нормальной» разновидностям клеток Сасо-2, а также показателей липопероксидации, величины ТМППМ, количества белка р53, каспазы-3 и их значений после инкубации растворами гликонаночастиц золота и препарата сравнения оценивали с помощью критерия Ньюмена-Кейлса при нормальном распределении данных (после теста ANOVA) или критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (после использования критерия Крускала-Уоллиса) при отличном от нормального распределении. Различия относительного количества ABCB1-белка, а также концентраций фексофенадина в клеточном лизате оценивали с помощью критерия Даннета. Приемлемой вероятностью ошибки первого рода считали 0,05.

Данные в таблицах и тексте представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартное отклонение (нормальное распределение) или в виде медианы, с указанием нижнего и верхнего квартилей (распределение, отличное от нормального).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Определение цитотоксичности (влияния на интенсивность клеточного метаболизма) гликонаночастиц золота

В ходе проведения МТТ-теста после инкубации клеточной культуры Сасо-2 (опухолевой и «нормальной» их разновидностей) с растворами гликонаночастиц золота (Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Lac, Au-MPH-Gal) и препарата сравнения фторурацила в течение 2 и 8 часов получены следующие данные по метаболической активности клеток (Рисунки 4,5):

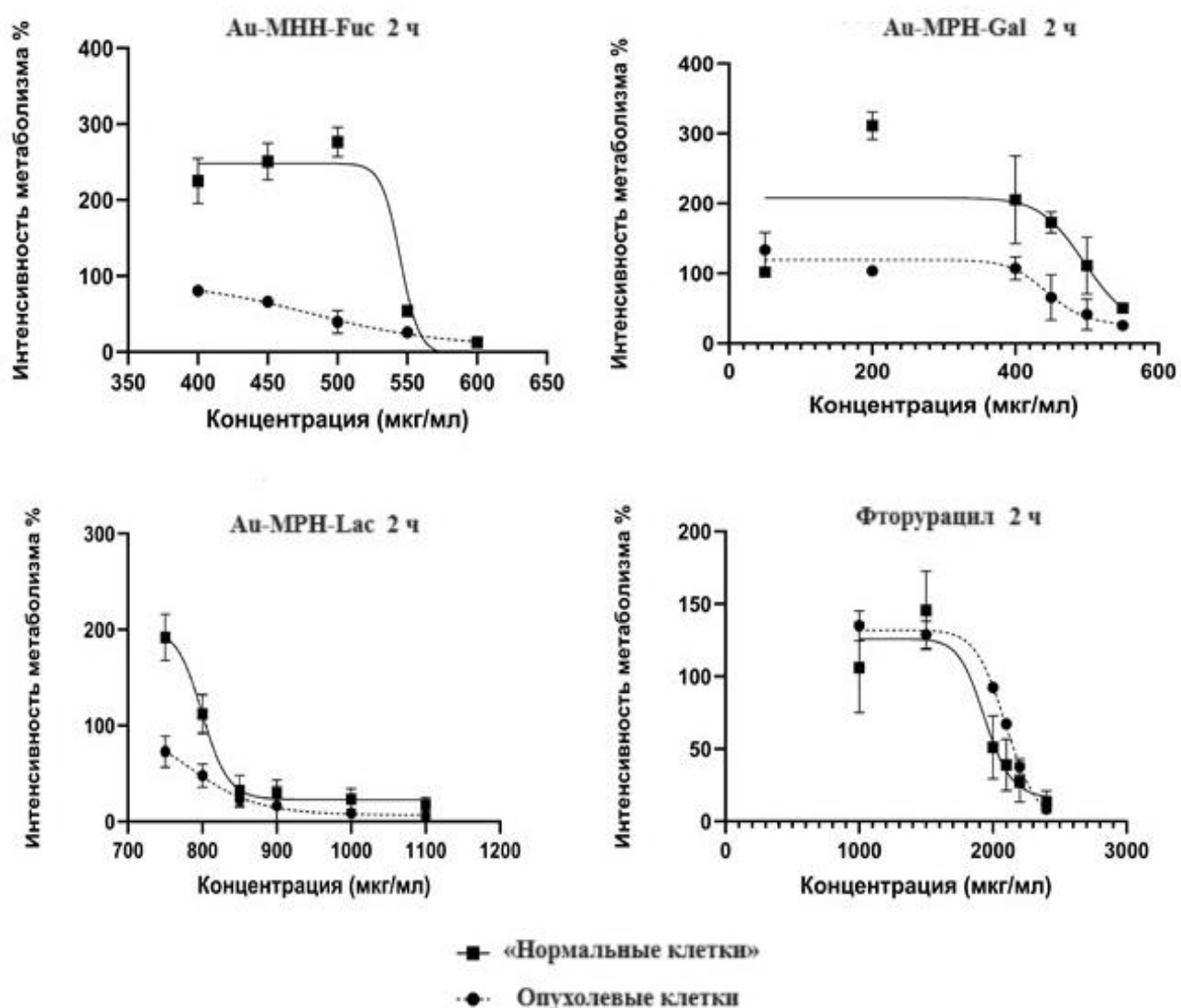


Рисунок 4 – Графики метаболической активности клеток Сасо-2 при их инкубации с гликонаночастицами золота и препаратом сравнения (фторурацил) в течение 2 часов

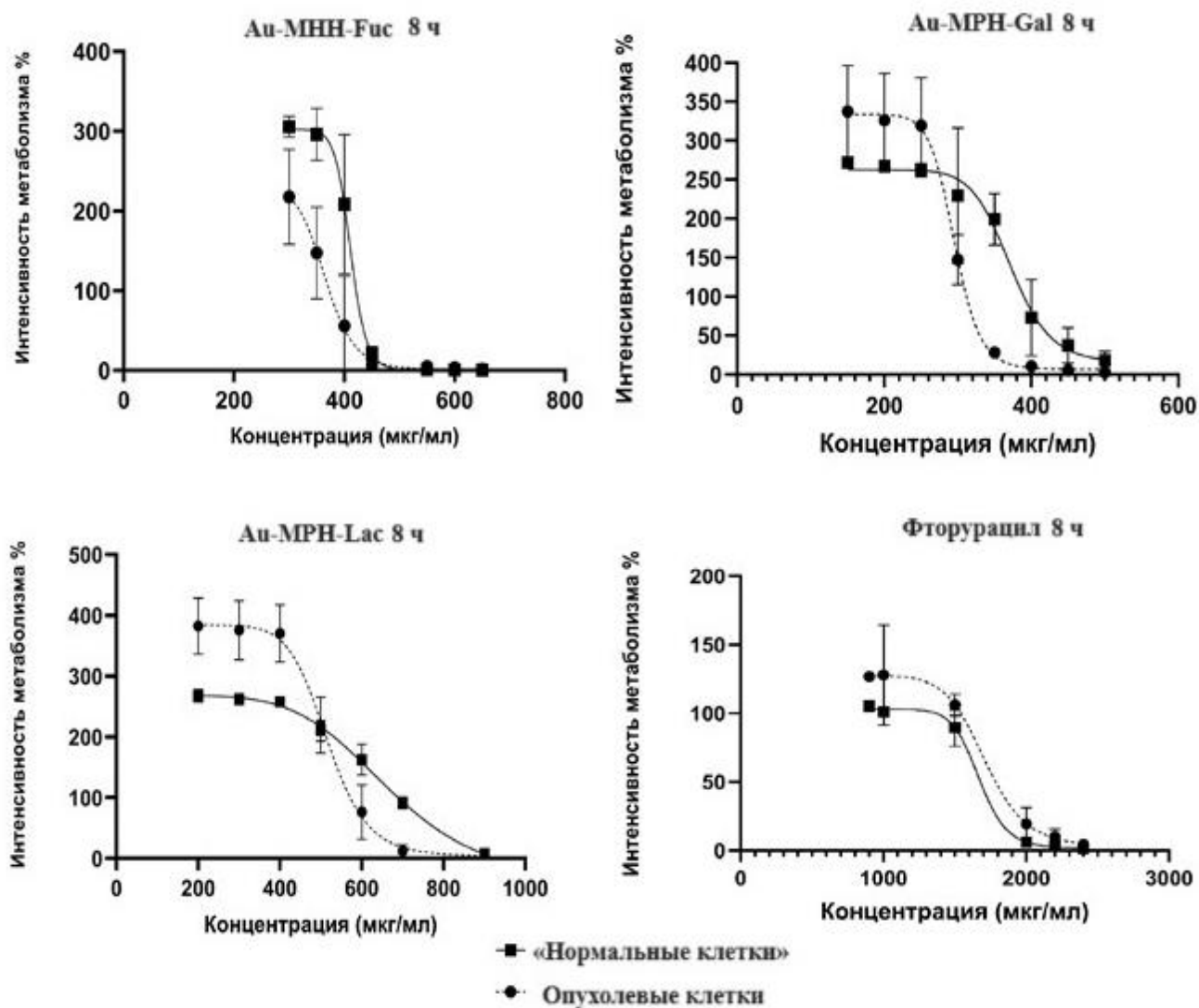


Рисунок 5 – Графики метаболической активности клеток Caco-2 при их инкубации с гликонаночастицами золота и препаратом сравнения (фторурацил) в течение 8 часов

Далее с помощью программы GraphPad Prizm 8.4.3 была рассчитана концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) в мкг/мл для каждого исследуемого раствора и препарата сравнения и каждого срока инкубации (Таблица 3).

Таблица 3 – Значения  $IC_{50}$  растворов гликонаночастиц золота и фторурацила по отношению к опухолевым и «нормальным» клеткам

Срок инкубации, ч	Au-MNH-Fuc		Au-MPH-Lac		Au-MPH-Gal		Фторурацил	
	опухолевые клетки, n=4	нормальные клетки, n=4	опухолевые клетки, n=4	нормальные клетки, n=4	опухолевые клетки, n=4	нормальные клетки, n=4	опухолевые клетки, n=4	нормальные клетки, n=4
2	481,5 ±28,9	530,1 ±2,7*	768,9 ±50,3	830,9 ±6,5*	466,9 ±29,2	510,7 ±20,9*	2107,5 ±19,1	1995,0 ±19,7
8	335,5 ±35,5#	410,0 ±14,7*#	514,5 ±44,8#	638,9 ±13,7*#	298,6 ±27,8#	376,1 ±35,8*#	1764,0 ±192,8	1694,4 ±101,5

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с опухолевой разновидностью клеток; при той же продолжительности инкубации; # – достоверные различия по сравнению с 2-часовой инкубацией с аналогичной разновидностью клеточной культуры.

Для фукоза-модифицированных наночастиц золота  $IC_{50}$  по отношению к опухолевым клеткам при 2- и 8-часовом сроках инкубации составила  $481,5 \pm 28,9$  и  $335,5 \pm 35,5$  мкг/мл, для лактоза-модифицированных наночастиц –  $768,9 \pm 50,3$  и  $514,5 \pm 44,8$  мкг/мл, для галактоза-модифицированных наночастиц –  $466,9 \pm 29,2$  и  $298,6 \pm 27,8$  мкг/мл соответственно. При увеличении длительности инкубации с 2 до 8 часов наблюдалось достоверное снижение  $IC_{50}$  исследуемых растворов Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Lac и Au-MPH-Gal в 1,4 ( $p=0,00070$ ), в 1,5 ( $p=0,00030$ ) и в 1,6 раза ( $p=0,00030$ ) соответственно по сравнению с 2-часовой инкубацией.

Для фукоза-модифицированных наночастиц  $IC_{50}$  по отношению к дифференцированным в тонкий эпителий («нормальным») клеткам при 2- и 8-часовом сроках инкубации была достоверно выше, чем для опухолевой их разновидности на 9,9% ( $p=0,037$ ) и 22,0% ( $p=0,0020$ ), для лактоза-модифицированных наночастиц – на 8,1% ( $p=0,019$ ) и 24,1% ( $p=0,015$ ), для галактоза-модифицированных – на 9,4% ( $p=0,018$ ) и 25,8% ( $p=0,0070$ ). Увеличение продолжительности инкубации с 2 до 8 часов приводило к достоверному снижению



IC<sub>50</sub> по отношению к «нормальным» клеткам в 1,3 раза для наночастиц с фукозой и лактозой ( $p < 0,00001$ ) и в 1,4 раза для наночастиц с галактозой ( $p = 0,00060$ ).

Таким образом, IC<sub>50</sub> всех типов гликонаночастиц золота по отношению к дифференцированным в тонкий эпителий клеткам достоверно превышала данный показатель по отношению к опухолевым клеткам при обоих сроках инкубации.

Препарат сравнения фторурацил при 2- и 8-часовой инкубации проявил цитотоксичность с IC<sub>50</sub> 2107,5±19,1 мкг/мл и 1764,0±192,8 мкг/мл соответственно по отношению к опухолевым клеткам. IC<sub>50</sub> по отношению к «нормальным» клеткам при 2- и 8-часовой инкубации составила 1995,0±19,7 мкг/мл и 1694,4±101,5 мкг/мл соответственно. При этом значимой разницы между IC<sub>50</sub> вещества по отношению к опухолевым и «нормальным» клеткам при равной продолжительности инкубации не было отмечено ( $p > 0,1$ ).

Увеличение продолжительности инкубации клеток с фторурацилом с 2 до 8 часов привело к снижению IC<sub>50</sub> препарата сравнения в 1,2 раза ( $p = 0,012$ ) по отношению к опухолевым клеткам и в 1,2 раза ( $p = 0,0024$ ) по отношению к нормальным клеткам. Следует отметить, что IC<sub>50</sub> фторурацила при аналогичных сроках инкубации достоверно превышала данный параметр для гликонаночастиц.

Таким образом, препарат сравнения фторурацил проявляет меньшую цитотоксическую активность по сравнению с тестируемыми гликонаночастицами золота по отношению к опухолевым клеткам при 2- и 8-часовой инкубации.

При инкубации клеток с исследуемыми гликонаночастицами в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub> (с округлением до 10 мкг/мл), в течение 2 часов процент живых клеток достоверно не отличался от значений, полученных при инкубации с чистой питательной средой (контроль) ( $p > 0,1$ ). Увеличение продолжительности инкубации до 8 часов привело к достоверному снижению количества живых клеток в 4,1 раза ( $p = 0,041$ ) для Au-MNH-Fuc, в 3,3 раза для Au-MPH-Lac ( $p = 0,046$ ) и в 3,1 раза для Au-MPH-Gal ( $p = 0,030$ ) по сравнению с контролем (Таблица 4).

Таблица 4 – Процент живых опухолевых клеток Сасо-2 после инкубирования с гликонаночастицами золота и фторурацилом (выживаемость в контроле принята за 100%; окраска трипановым синим)

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Au-МНН-Fuc, n=3	36,6±11,8%	24,2±0,4%*
Au-МРН-Lac, n=3	60,6±15,0%	30,6±8,6%*
Au-МРН-Gal, n=3	41,8±7,3%	32,8±3,1%*
Фторурацил, n=3	28,8±1,3%	45,4±18,9%*

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Количество жизнеспособных опухолевых клеток после их инкубации с фторурацилом в концентрации, соответствующей  $IC_{50}$ , было достоверно ниже контроля также только при 8-часовой инкубации и составило менее 50% ( $p = 0,035$ ).

Достоверной разницы между процентом мертвых опухолевых клеток после 8-часовой инкубации клеток с гликонаночастицами и фторурацилом выявлено не было ( $p > 0,1$ ), т.е. вещества не различались с точки зрения эффективности их цитотоксического действия.

Таким образом, было рационально оценить механизм противоопухолевой активности гликонаночастиц золота именно при 2- и 8-часовом сроках инкубации, что связано с их более высокой активностью по отношению к опухолевым по сравнению с дифференцированными в кишечный эпителий клеткам.

### 3.2. Механизмы противоопухолевой активности гликонаночастиц золота

Было предположено, что противоопухолевая активность гликонаночастиц золота реализуется посредством одного из следующих механизмов: развитие окислительного стресса, активация апоптоза или угнетение функциональной активности ABCB1-белка. Для выяснения конкретного механизма опухолевые

клетки инкубировали с растворами гликонаночастиц золота в концентрациях, соответствующих  $IC_{50}$  (с округлением до 10 мкг/мл), в течение 2 и 8 часов.

### 3.2.1. Влияние гликонаночастиц золота на интенсивность окислительного стресса

Оценку влияния веществ на интенсивность окислительного стресса проводили путем анализа количества общих сульфгидрильных (SH) групп, концентрации малонового диальдегида (МДА), а также уровня антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы IV типа (G-per), относящихся к ключевым параметрам оценки интенсивности окислительного стресса согласно сведениям научной литературы [183, 223].

Было показано, что при 2-часовой инкубации клеток с гликонаночастицами золота происходило резкое снижение уровня общих SH-групп в лизате клеток по сравнению с контролем: при инкубации с Au-MNH-Fuc – в 35,7 раза ( $p=0,0085$ ), с Au-MPH-Lac – в 11,9 раза ( $p=0,0055$ ) и с Au-MPH-Gal – в 20,7 раза ( $p=0,0059$ ). Инкубация с растворами в течение 8 часов привела к снижению уровня общих SH-групп для Au-Fuc-MNH, Au-Lac-MPH и Au-Gal-MPH в 6,1 ( $p=0,0067$ ), в 5,6 ( $p=0,0040$ ) и в 20,7 ( $p=0,0078$ ) раз соответственно.

Инкубация клеток с препаратом сравнения фторурацилом в течение 2 часов не приводила к изменению уровня общих SH-групп; в течение 8-часов – вызывала увеличение их количества в 1,9 раза ( $p=0,045$ ) (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество общих SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток Сасо-2 после инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в течение 2 и 8 часов

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Контроль, n=4	3,9±0,8	

<i>Продолжение таблицы 5</i>		
Au-MNH-Fuc, n=4	0,1±0,08*	0,6±0,3*
Au-MPH-Lac, n=4	0,3±0,2*	0,7±0,6*
Au-MPH-Gal, n=4	0,2±0,1*	0,2±0,1*
Фторурацил, n=4	4,6±3,4	7,5±2,02*

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

В ходе анализа уровня МДА наблюдалось достоверное его возрастание только после 8-часовой инкубации клеток с фукоза-модифицированными наночастицами золота. Инкубация с лактоза- и галактоза-модифицированными частицами, а также с фторурацилом не приводила к достоверному изменению данного показателя в лизате опухолевых клеток (Таблица 6).

Таблица 6 – Уровень МДА (нг/мг белка) в лизате клеток Сасо-2 после инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в течение 2 и 8 часов

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Контроль, n=4	44,7±19,9	
Au-MNH-Fuc, n=4	63,3±19,3**	70,5±11,6*
Au-MPH-Lac, n=4	23,3±5,2	32,0±4,8
Au-MPH-Gal, n=4	33,8±9,4	26,4±5,1
Фторурацил, n=4	28,8±16,04	37,02±16,3

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия по сравнению с контролем на уровне тенденции ( $0,05 < p < 0,10$ ).

Оценка количества фермента G-per не показала достоверного изменения его уровня в клеточном лизате после 2- и 8-часовой инкубации опухолевых клеток со всеми тестируемыми веществами (Таблица 7).

Таблица 7 – Количество G-per (нг/мг белка) в лизате клеток Caco-2 после инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в течение 2 и 8 часов

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Контроль, n=4	63,7±34,2	
Au-MNH-Fuc, n=4	84,9±38,7	68,74±67,1
Au-MPH-Lac, n=4	50,3±22,6	55,01±22,3
Au-MPH-Gal, n=4	74,9±39,1	39,7±27,8
Фторурацил, n=4	49,5±30,8	72,9±37,07

Таким образом, утверждать о том, что активация окислительного стресса является значимым звеном механизма противоопухолевого действия гликонаночастиц золота, можно только для Au-MNH-Fuc, в связи с выявленным ростом количества основного индикатора перекисного окисления липидов (ПОЛ) – МДА [179].

### **3.2.2. Оценка способности гликонаночастиц золота инициировать апоптотический процесс**

При оценке влияния гликонаночастиц золота на процесс апоптоза определяли уровень каспазы-3 – ключевого фермента, принимающего участие во внутреннем и внешнем путях данного процесса [104, 269]. Также оценивали уровень проапоптотического белка p53, стимуляция которого приводит к гибели клеток посредством апоптоза по митохондриальному пути [168]. Дополнительно проводили определение величины ТМПМ, снижение которого может свидетельствовать о запуске необратимого каскада апоптотического процесса [66], а рост сопровождается повышением продукции активных форм кислорода (АФК), способных индуцировать аутофагию [63, 253].

Анализ уровня фермента, являющегося ведущим звеном апоптотического процесса (каспаза-3), не показал изменений после инкубации клеток с растворами гликонаночастиц золота и препаратом сравнения фторурацилом ( $p>0,1$ ) (Таблица 8).

Таблица 8 – Уровень каспазы-3 (нг/мг белка) в лизате клеток Сасо-2 после инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в течение 2 и 8 часов

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Контроль, n=4	9,04 (7,02; 9,7)	
Au-MNH-Fuc, n=4	9,79 (8,9; 22,1)	14,6 (11,2; 20,3)
Au-MPH-Lac, n=4	10,2 (8,7; 16,8)	10,03 (8,05; 20,8)
Au-MPH-Gal, n=4	12,6 (7,7; 26,9)	9,02 (6,5; 10,9)
Фторурацил, n=4	9,7 (8,5; 10,6)	8,1 (7,5; 9,5)

При анализе уровня проапоптотического транскрипционного фактора p53 выявлено его увеличение в лизате клеток при 8-часовом сроке инкубации с каждым из протестированных растворов наночастиц золота: с Au-MNH-Fuc – в 2,6 раза ( $p=0,021$ ), с Au-MPH-Lac – в 2,3 раза (уровень тенденции:  $p=0,057$ ) и с Au-MPH-Gal – в 2,2 раза (уровень тенденции:  $p=0,078$ ). Для препарата сравнения фторурацила наблюдалось возрастание уровня p53 в 2,2 раза при 2-часовом (уровень тенденции –  $p=0,079$ ), и в 2,4 раза при 8-часовом сроке инкубации ( $p=0,039$ ) (Таблица 9).

Таблица 9 – Количество белка p53 (пг/мг белка) в лизате клеток Сасо-2 после инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в течение 2 и 8 часов

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Контроль, n=4	502,7±241,9	

<i>Продолжение таблицы 9</i>		
Au-MNH-Fuc, n=4	479,2±455,08	1287,8±685,8*
Au-MPH-Lac, n=4	665,9±648,8	1138,3±378,2**
Au-MPH-Gal, n=4	580,9±351,4	1088,4±308,3**
Фторурацил, n=4	1086,7±114,7**	1196,7±555,2*

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия по сравнению с контролем на уровне тенденции ( $0,05 < p < 0,10$ ).

Оценка ТМПМ показала снижение его уровня при 8-часовой инкубации клеток с гликонаночастицами золота в сравнении с контролем: для Au-MNH-Fuc – на 56% ( $p = 0,037$ ), Au-MPH-Lac – на 27% ( $p = 0,015$ ) и для Au-MPH-Gal – на 62% (уровень тенденции:  $p = 0,065$ ). Стоит отметить, что 2-часовая инкубация опухолевых клеток с наночастицами золота, модифицированными остатками фукозы, приводила к увеличению оцениваемого показателя в 2,2 раза (уровень тенденции:  $p = 0,095$ ). Инкубация клеток с препаратом сравнения фторурацилом не приводила к изменению уровня ТМПМ ( $p > 0,1$ ) (Таблица 10).

Таблица 10 – Уровень ТМПМ клеток Сасо-2 после инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила в течение 2 и 8 часов.

Вещество в среде инкубации	Срок инкубации, ч	
	2	8
Контроль, n=4	100%	
Au-MNH-Fuc, n=4	218,4±32,7%**	44,0±6,8%*
Au-MPH-Lac, n=4	164,4±21,0%	72,6±9,0%*
Au-MPH-Gal, n=4	102,9±10,6%	38,1±3,9%*
Фторурацил, n=4	76,2±41,6%	83,2±25,8%

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия по сравнению с контролем на уровне тенденции ( $0,05 < p < 0,10$ ).

Таким образом, увеличение количества транскрипционного фактора p53, а также снижение через 8 часов инкубации ТМПМ под действием гликонаночастиц золота может свидетельствовать о реализации механизма противоопухолевого

действия посредством активации одного из путей запрограммированной клеточной гибели, в развитии которого участвует белок p53, а отсутствие изменения уровня каспазы-3 может объясняться недостаточной продолжительностью инкубации.

### 3.2.3. Влияние гликонаночастиц золота на функционирование ABCB1-белка

#### 3.2.3.1. Влияние гликонаночастиц золота на относительное количество ABCB1-белка

Определение относительного количества ABCB1-белка в лизатах опухолевых клеток Сасо-2 методом вестерн-блот после инкубации их в течение 2 и 8 часов с растворами гликонаночастиц золота, а также препарата сравнения, показало, что наночастицы, модифицированные остатками фукозы и галактозы (Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Gal), а также препарат сравнения фторурацил, достоверно не изменяли уровень транспортера ( $p > 0,1$ ). Однако инкубация с наночастицами, поверхность которых модифицирована остатками лактозы (Au-MPH-Lac), приводила к увеличению количества ABCB1-белка в сравнении с контролем и после 2-часовой, и после 8-часовой инкубации в 1,9 ( $p = 0,013$ ) и в 1,8 ( $p = 0,021$ ) раза соответственно (Рисунки 7,8).

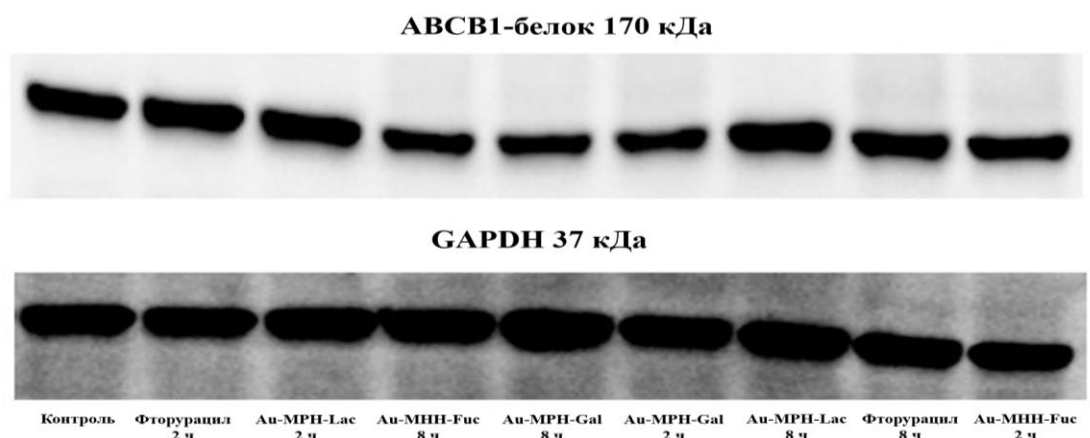


Рисунок 6 – Результаты анализа относительного количества ABCB1-белка на мембранах опухолевых клеток Сасо-2 (вестерн-блот) после 2- и 8-часовой инкубации с растворами гликонаночастиц золота и фторурацила ( $n=3$  для каждой серии эксперимента)



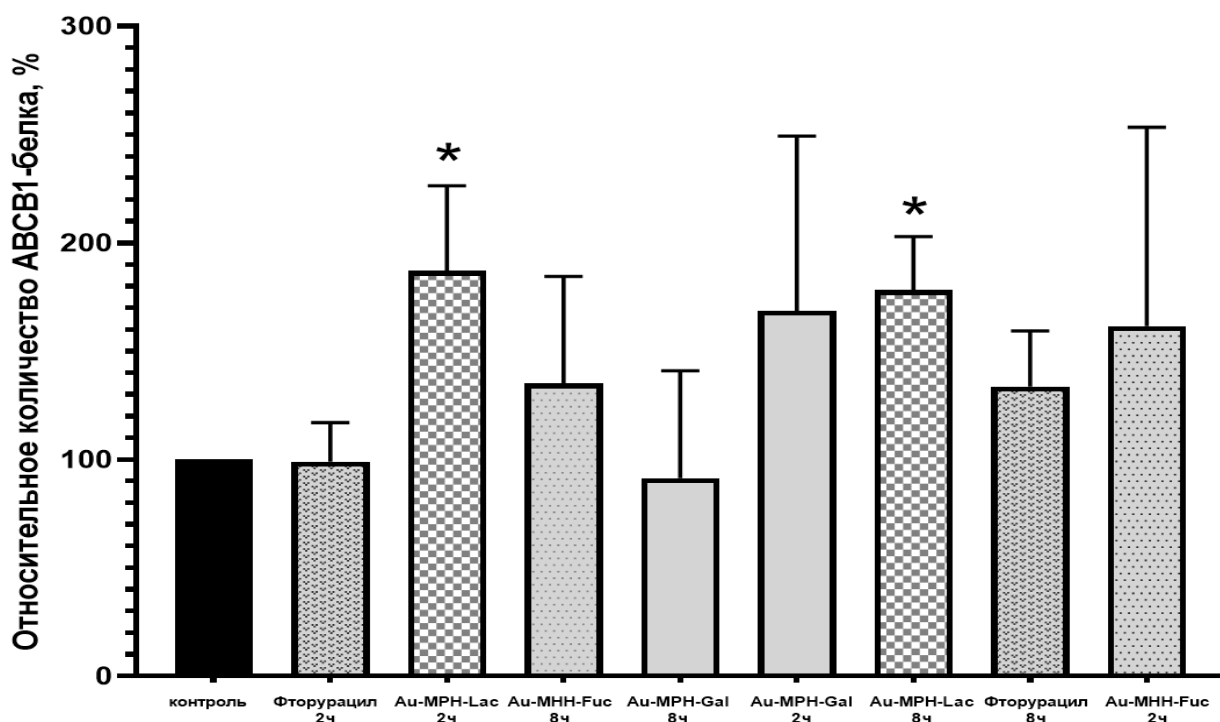


Рисунок 7 – Относительное количество ABCB1-белка в опухолевых клетках Caco-2 после 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота и фторурацилом ( $M \pm SD$ ,  $n=3$  для каждой серии эксперимента)

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, ингибирующего действия гликонаночастиц золота на синтез ABCB1-белка не выявлено, напротив, наночастицы с поверхностью, модифицированной лактозой, увеличивали относительное количество транспортера в опухолевых клетках, что может служить их негативной характеристикой.

### 3.2.3.2. Разработка и валидация методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС

Разработка методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС заключалась в подборе режима элюирования, который позволял добиться пиков с воспроизводимыми параметрами (время удерживания, эффективность и пр.). По результатам выбора режима элюирования наибольшая элюирующая активность, а также оптимальные

параметры пиков показала подвижная фаза состава: водный раствор муравьиной кислоты 0,1% в смеси с ацетонитрилом, соотношение компонентов которой приведено в Таблице 11. Подобранная подвижная фаза для количественного определения фексофенадина содержала преобладающее количество водного компонента (водный раствор муравьиной кислоты 0,1%:ацетонитрил 75:25), а затем преобладающее количество органического компонента (водный раствор муравьиной кислоты 0,1%:ацетонитрил 25:75). Скорость потока подвижной фазы составила 0,3 мл/мин при температуре 35°C, объем вводимой пробы – 20 мкл.

Таблица 11 – Соотношение компонентов подвижной фазы по объему в зависимости от времени хроматографического анализа

Время, мин	Водный 0,1%-й раствор муравьиной кислоты	Ацетонитрил
0	75%	25%
0,2	30%	70%
6	1%	99%
8	75%	25%

Время анализа составляло 10 минут, время удерживания фексофенадина соответствовало  $5,7 \pm 0,091$  минутам.

В рамках разработки методики наиболее высокую воспроизводимость результатов хроматографического анализа, максимальную эффективность разделения и симметричность хроматографических пиков – показал амантадин в концентрации 10 нг/мл, который был выбран в качестве внутреннего стандарта.

Был подобран режим ионизации молекул фексофенадина, проводимый в положительном режиме на электроспрее при напряжении 3500 В; скорость потока оболочечного газа (sheath gas) составляла 50 Arb, вспомогательного газа (aux gas) – 10 Arb, продувочного газа (sweep gas) – 1 Arb, температура трубки для переноса ионов – 300°C, температура испарителя – 350°C.

Для детектирования фексофенадина использовали следующие переходы масс (Рисунок 9):  $502,3 \text{ m/z} \rightarrow 171,0 \text{ m/z}$  при энергии столкновения 37 В,  $502,3 \text{ m/z} \rightarrow 466,2 \text{ m/z}$  при энергии столкновения 27 В и  $502,3 \text{ m/z} \rightarrow 484,2 \text{ m/z}$  при энергии

столкновения 22 В, фрагментация источника 5, CID gas 1,5 мТорр. Переходы масс для внутреннего стандарта (амантадина) (Рисунок 10): 152,1  $m/z$   $\rightarrow$  79,08  $m/z$  при энергии столкновения 33 В и 152,1  $m/z$   $\rightarrow$  135,08  $m/z$  при энергии столкновения 17 В.

Количественный анализ фексофенадина проводили по дочернему иону с наибольшей интенсивностью сигнала с  $m/z$  466,2, образуемому в результате фрагментации родительского молекулярного иона фексофенадина с  $m/z$  502,3 при энергии столкновения 27 В; анализ амантадина – по дочернему иону с  $m/z$  135,08, образуемому в результате фрагментации родительского молекулярного иона амантадина с  $m/z$  152,1 при энергии столкновения 17 В.

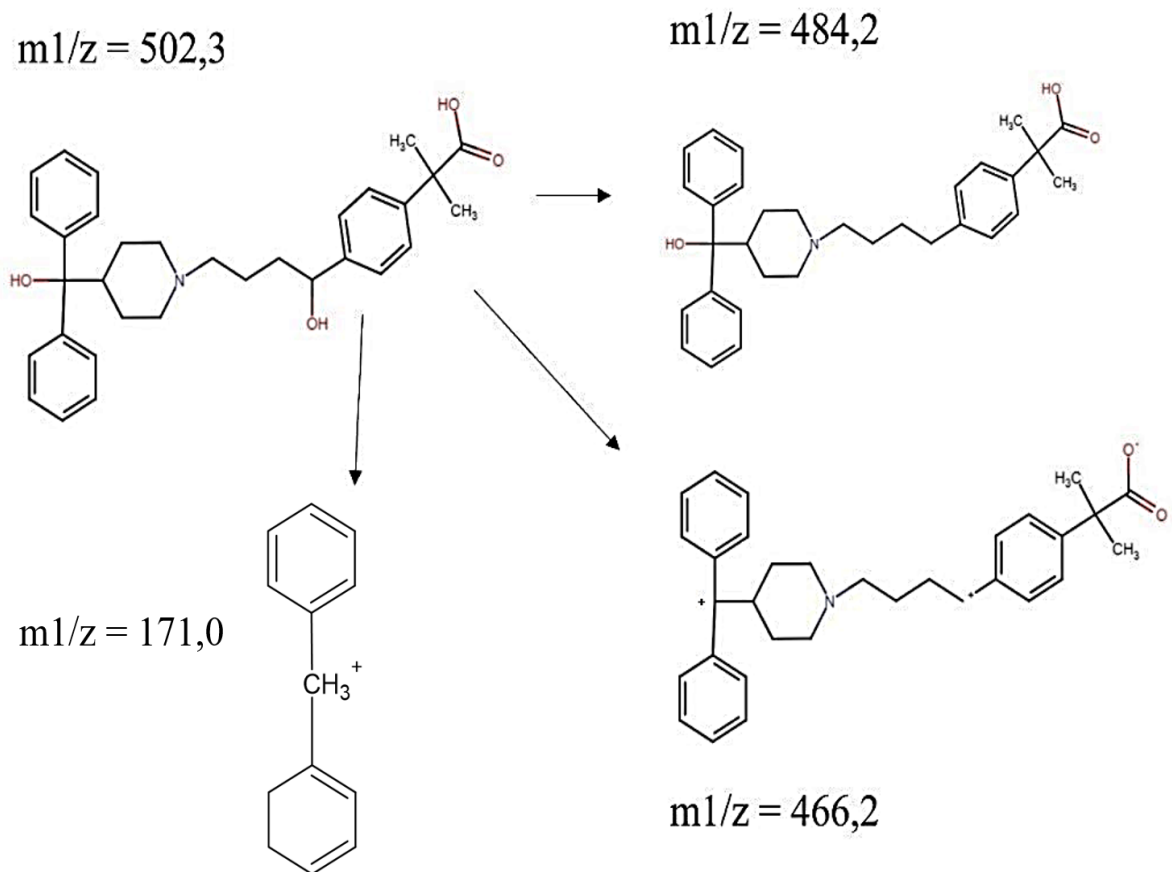


Рисунок 8 – Предполагаемая фрагментация молекулы фексофенадина

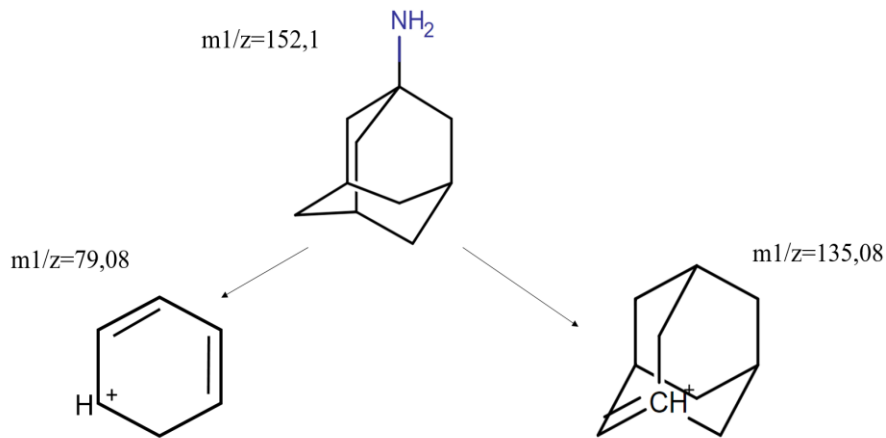


Рисунок 9 – Предполагаемая фрагментация молекулы амантадина

Валидация биоаналитической методики проведена по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения (НПКО), правильность, прецизионность, перенос пробы и стабильность образцов [18].

Для оценки селективности проведен анализ холостых проб лизата клеток Сасо-2 без добавления фексофенадина и внутреннего стандарта – амантадина, а также с добавлением фексофенадина до концентрации 0,5 нг/мл и амантадина до концентрации 10 нг/мл и описанной выше пробоподготовки. На хроматограммах холостых проб лизатов клеток Сасо-2 не наблюдали пиков, соответствующих по времени удерживания фексофенадину или амантадину (Рисунки 11-13).

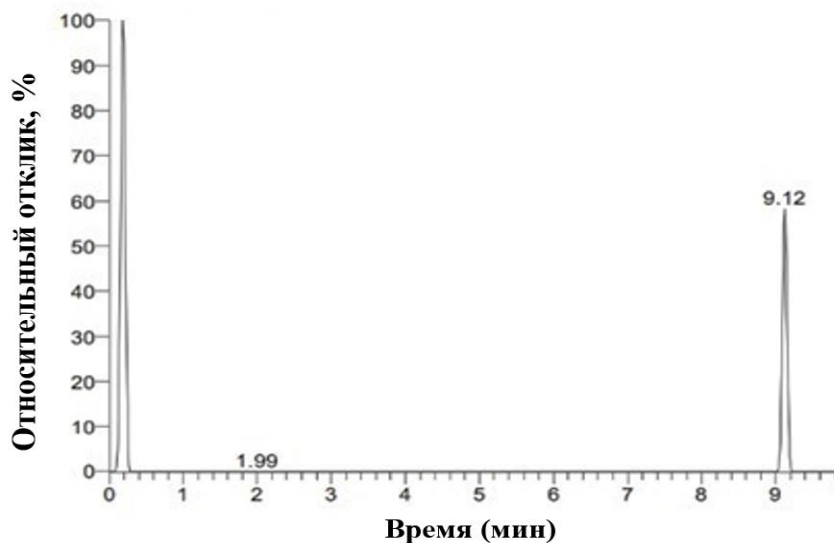


Рисунок 10 – Хроматограмма холостой пробы лизата клеток Сасо-2 без добавления фексофенадина и внутреннего стандарта амантадина

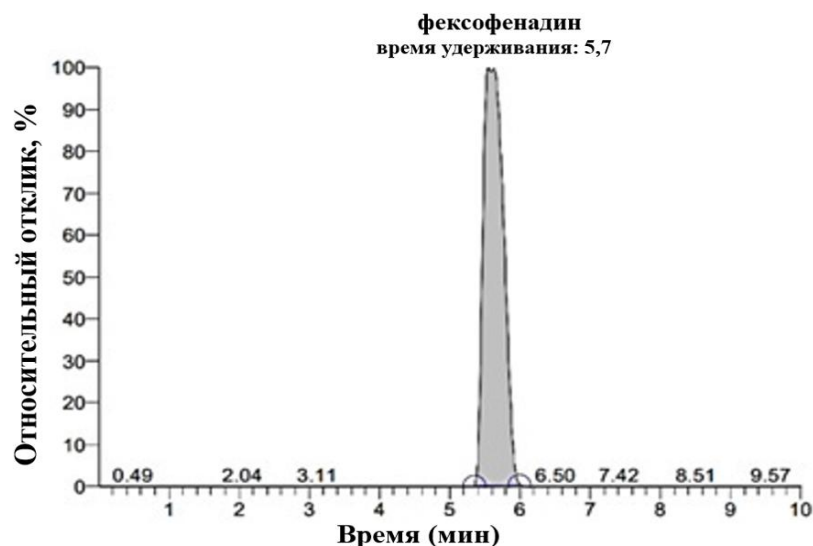


Рисунок 11 – Хроматограмма холостой пробы лизата клеток Сасо-2 с добавлением фексофенадина с концентрацией 0,5 нг/мл после пробоподготовки без добавления внутреннего стандарта

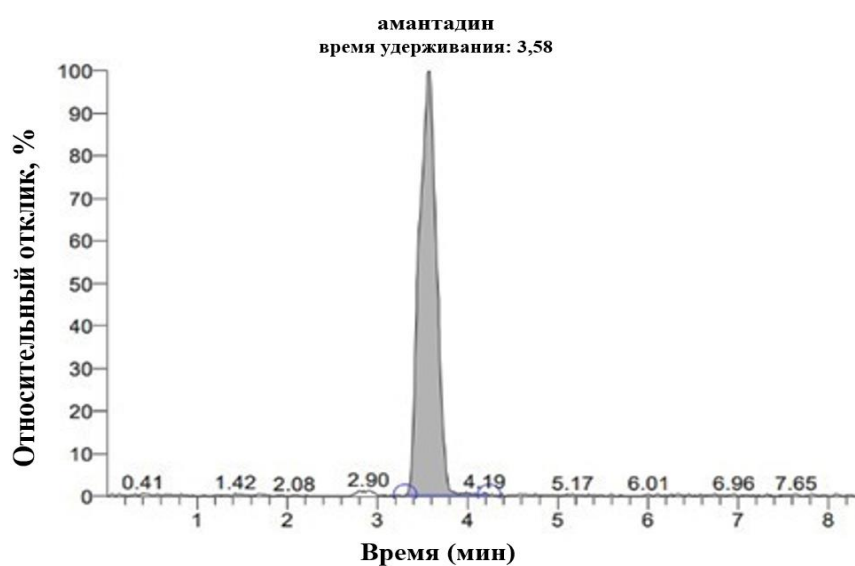


Рисунок 12 – Хроматограмма холостой пробы лизата клеток Сасо-2 со стандартной пробоподготовкой

С целью оценки рабочего диапазона и линейности проведен анализ 8 проб (градуировочных стандартов) лизатов клеток Сасо-2 с добавлением рабочих растворов фексофенадина до получения концентраций 0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах площадь пика – концентрация фексофенадина. Образец калибровочного графика представлен на Рисунке 14.

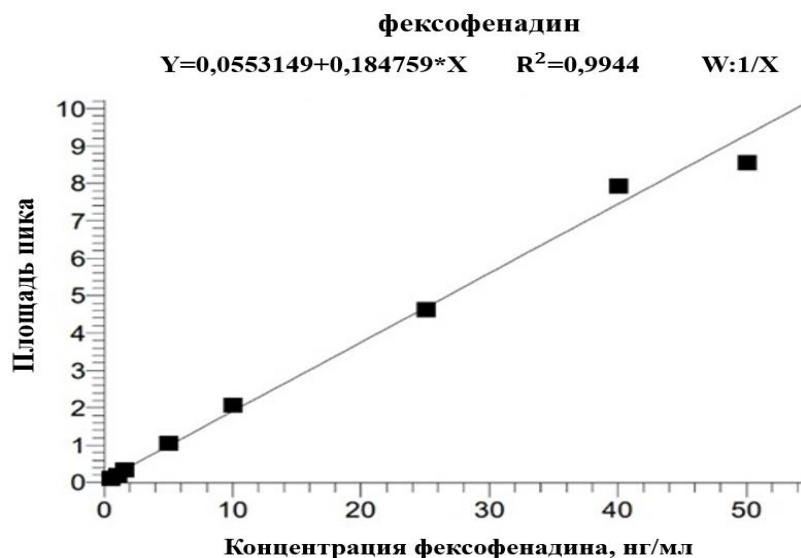


Рисунок 13 – Калибровочный график зависимости «площадь пика – концентрация фексофенадина» в лизате клеток Сасо-2.

Примечание – Y – площадь пика, X – концентрация фексофенадина,  $W=1/x$  – весовой коэффициент (анг. weighting factor).

Получены следующие уравнения линейной регрессии (строились 3 калибровочных графика в рамках трех аналитических циклов):

$$Y = 0,0553149+0,184759*X; R^2 = 0,9944; W:1/X,$$

$$Y = 0,000945174+0,138063*X; R^2 = 0,9991; W: 1/X,$$

$$Y = 0,0197284+0,131622*X; R^2 = 0,9938; W: 1/X.$$

Полученные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99) [18].

Отклонения концентраций градуировочных стандартов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в Таблице 12 и демонстрируют близость каждой из точек к калибровочной кривой, что, наряду с коэффициентом корреляции, является характеристикой линейности.

Таблица 12 – Отклонения концентраций градуировочных стандартов фексофенадина от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нг/мл	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
0,5	0,5	4,5	0,6	16,8	0,4	14,3
1,0	1,0	5,2	0,9	8,3	0,9	10,7
1,5	1,5	1,4	1,6	7,9	1,6	8,2
5,0	5,5	10,8	4,9	2,6	5,4	8,3
10,0	9,8	2,3	9,0	10,2	11,0	10,3
25,0	25,9	3,5	22,0	12,0	24,9	0,7
40,0	38,6	3,5	40,8	1,9	42,7	6,8
50,0	50,7	1,5	53,3	6,6	46,1	7,9

Указанные отклонения градуировочных стандартов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, не превышали допустимых значений [18]: 20% – для НПКО; 15% – для остальных точек. Для определения эффекта переноса проводили анализ холостой пробы лизата клеток Сасо-2, подвергнутой пробоподготовке без добавления внутреннего стандарта, непосредственно после инъекции пробы с фексофенадином с концентрацией 50 нг/мл также после пробоподготовки с амантадином. Согласно полученным данным, перенос фексофенадина не превышал 20% величины НПКО и 5% – для внутреннего стандарта амантадина [18]. НПКО (наименьшая концентрация анализируемого вещества, которая поддается надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью) фексофенадина составила 0,5 нг/мл. При этом отношение сигнала фексофенадина к шуму было не ниже 10, а правильность и прецизионность определения не превышали 20%.

Для оценки точности и прецизионности выполняли анализ образцов контролей качества фексофенадина, имеющих концентрации 0,5; 1,5; 25 и 40 нг/мл. Анализ выполняли в рамках трех циклов, при этом оценивали параметры внутри и

между циклами. Полученные значения правильности и прецизионности соответствовали принятым нормам – не превышали 20% для НПКО и 15% – для проб с более высокими концентрациями (Таблицы 13,14) [18].

Таблица 13 – Значения правильности и прецизионности методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Правильность, %	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность средняя, %	Стандартное отклонение (SD)	Прецизионность, %
0,5	0,5	9,2	0,5	7,7	0,1	8,4
	0,5	3,4				
	0,5	5,6				
	0,5	10,2				
	0,5	10,2				
1,5	1,7	14,9	1,6	8,1	0,2	10,0
	1,7	14,3				
	1,4	7,7				
	1,5	1,3				
	1,5	2,4				
25,0	25,6	3,0	25,0	1,7	0,6	2,5
	24,8	0,8				
	24,0	3,9				
	25,0	0,1				
	25,3	1,1				
40,0	37,7	5,9	39,4	2,3	1,2	3,0
	39,5	1,3				
	40,1	0,3				
	39,1	2,3				
	40,8	1,9				



Таблица 14 – Значения правильности и прецизионности методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 между циклами

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация, рассчитанная по трем различным уравнениям регрессии, нг/мл	Правильность, %	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность средняя, %	Стандартное отклонение (SD)	Прецизионность %
0,5	0,5	7,7	0,5	10,8	0,1	6,1
	0,5	11,2				
	0,5	13,3				
1,5	1,6	8,1	1,5	5,7	0,1	5,3
	1,5	2,4				
	1,4	6,7				
25,0	25,0	1,8	24,3	5,7	2,0	8,2
	25,9	3,6				
	22,1	11,6				
40,0	39,4	2,3	38,6	5,3	0,9	2,3
	37,7	6,5				
	38,7	7,2				

Матричный эффект оценивали путем вычисления отношения максимальной площади пика в присутствии матрицы (определяется путем анализа не менее 6 проб подготовленного холостого образца из разных лунок планшета с добавленной известной концентрацией анализируемого вещества) к максимальной площади пика в отсутствие матрицы (раствор анализируемого вещества в той же концентрации без матрицы, в воде). Оценивали площади пиков фексофенадина в

лизате клеток Сасо-2 и в воде в нижнем и верхнем уровнях концентрации образцов для контроля качества: 1,5 и 40 нг/мл [18].

Для образцов контроля качества, имеющих концентрации 1,5 и 40 нг/мл, средняя точность составила 6,7% и 3,0% соответственно.

В рамках оценки матричного эффекта также определяли нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (амантадину), который представляет собой величину отношения эффекта матрицы фексофенадина к эффекту матрицы амантадина. Относительное стандартное отклонение нормализованного эффекта матрицы по амантадину из 6 отдельных лунок планшета не превышало 15%

Стабильность оценивали для растворов фексофенадина в лизате клеток в нижнем и верхнем уровнях концентраций образцов для контроля качества: 1,5 и 40 нг/мл [18] путем их краткосрочного хранения в условиях комнатной температуры, трехкратной заморозки-разморозки при  $-80^{\circ}\text{C}$ , хранении при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 60 суток, а также после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 часов. Для каждого вида стабильности выполняли по 3 повтора. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) при всех режимах хранения находилась в пределах 15% от номинальных значений (Таблица 15).

Таблица 15 – Правильность при определении стабильности растворов фексофенадина с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл

Условия	Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность, %
Хранение при комнатной температуре	1,5	1,4	4,9
	40,0	38,9	3,9
Трехкратная заморозка-разморозка при $-80^{\circ}\text{C}$	1,5	1,6	12,3
	40,0	37,3	4,2
Хранение при $-80^{\circ}\text{C}$ в течение 60 суток	1,5	1,4	3,8
	40,0	37,5	6,4

<i>Продолжение таблицы 15</i>			
После пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч	1,5	1,4	6,9
	40,0	36,3	9,3

Таким образом, разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения маркерного субстрата ABCB1-белка – фексофенадина в лизате клеток Сасо-2, которая позволит анализировать функциональную активность ABCB1-белка по степени внутриклеточного накопления данного вещества.

### 3.2.3.3. Оценка функциональной активности ABCB1-белка

Определение функциональной активности ABCB1-белка осуществлялось косвенно, по степени внутриклеточного накопления маркерного субстрата транспортера – фексофенадина. Количественный анализ вещества в клеточном лизате проводился с применением метода ВЭЖХ-МС/МС по разработанной и валидированной ранее методике. Анализ выполнен на двух клеточных линиях: Сасо-2 (клетки, экспрессирующие данный белок-транспортер) и НЕК-293 (не экспрессируют ABCB1-белок). В качестве известного ингибитора ABCB1-белка использован хинидин; в качестве препарата, не оказывающего влияния на функциональную активность транспортера, по данным научной литературы был выбран фторурацил.

В ходе анализа внутриклеточного накопления фексофенадина показано увеличение его содержания в клетках линии Сасо-2 после инкубации в течение 8 часов с Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Lac и Au-MPH-Gal в 2,6 (уровень тенденции:  $p=0,097$ ), в 3,5 ( $p=0,0025$ ) и в 5,3 ( $p<0,00001$ ) раза соответственно по сравнению с контролем. Наночастицы золота, модифицированные остатками лактозы, увеличивали внутриклеточное накопление фексофенадина также через 2 часа инкубации в 4,1 раза ( $p=0,00010$ ).

Результаты 8-часовой инкубации клеток с ингибитором ABCB1-белка хинидином показывали увеличение количества маркерного субстрата внутри клеток в 3,0 раза ( $p=0,024$ ). Фторурацил не влиял на количество фексофенадина в клетках линии Сасо-2 ( $p>0,1$ ) (Таблица 16).

Таблица 16 – Количество фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 на фоне их 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота, хинидином и фторурацилом, нг/мг белка

Срок инкубации	2 часа	8 часов
Контроль, n=3	132,7±36,5	
Хинидин, n=3	141,8±16,4	393,4±188,3*
Au-MNH-Fuc, n=3	270,4±106,6	346,4±108,7**
Au-MPH-Lac, n=3	543,7±106,4*	459,9±188,2*
Au-MPH-Gal, n=3	343,6±223,2	706,8±245,6*
Фторурацил, n=3	198,8±65,6	311,4±90,6

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ); \*\* – различия по сравнению с контролем на уровне тенденции ( $0,05<p<0,10$ ); в качестве контроля использовались клетки после инкубации с фексофенадином в течение 2 часов без преинкубации с тетируемыми наночастицами.

В ходе анализа накопления фексофенадина внутри клеток линии НЕК-293 выявлено снижение количества маркерного субстрата после 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота: с Au-MNH-Fuc в 3,9 ( $p\leq 0,0001$ ) и 3,4 ( $p=0,00015$ ) раза, с Au-MPH-Lac в 8,1 ( $p<0,0001$ ) и 9,1 ( $p<0,0001$ ) раза и с Au-MPH-Gal в 2,8 ( $p=0,00045$ ) и 2,1 ( $p=0,0030$ ) раза соответственно (Таблица 17), что подтверждает отсутствие неспецифического повышения проницаемости клеточных мембран под действием гликонаночастиц золота.

Таблица 17 – Количество фексофенадина в лизате клеток НЕК-293 на фоне их 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота, нг/мг белка

Срок инкубации	2 часа	8 часов
Контроль, n=3	453,6±152,3	
Au-MNH-Fuc, n=3	116,1±16,2*	132,9±30,2*
Au-MPH-Lac, n=3	55,7±5,6*	50,0±9,5*
Au-MPH-Gal, n=3	163,6±28,5*	212,5±24,8*

Примечание – \* – достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об угнетении эффлюксной активности ABCB1-белка в ходе 8-часовой инкубации клеток линии Сасо-2 с растворами гликонаночастиц золота.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аденокарцинома ободочной кишки является одним из самых распространенных злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта человека. В мире ежегодно регистрируется около 1,2 млн. случаев заболеваемости колоректальным раком [131]. В настоящее время данная патология регистрируется более чем в 20% случаев только на IV стадии заболевания [9], а летальность в течение первого года после постановки диагноза превышает 21% [23].

Основная тактика лечения колоректального рака – хирургическое вмешательство [110]. Лучевая терапия при аденокарциноме ободочной кишки не рекомендуется [317], а адъювантная химиотерапия имеет второстепенное значение, так как ее эффективность в настоящее время остается спорной [37]. Также применяемые химиопрепараты (оксалиплатин, капецитабин, цетуксимаб, иринотекан) характеризуются выраженной органотоксичностью (нейротоксичность оксалиплатина, подавление иммунной системы под действием иринотекана и пр. [128, 164, 229, 238]).

Для повышения терапевтической селективности и снижения побочных эффектов химиотерапии перспективным является применение новых противоопухолевых агентов, что согласуется с национальной стратегией по борьбе с онкологическими заболеваниями на долгосрочный период до 2030 года [15].

Среди потенциальных химиопрепаратов можно выделить наночастицы благородных металлов, развитая поверхность которых позволяет целенаправленно модифицировать ее различными лигандами с целью обеспечения их направленного действия на опухолевые клетки [213].

Совместно с Институтом высокомолекулярных соединений РАН (г. Санкт-Петербург) были синтезированы и охарактеризованы (морфология, размеры, физические свойства) наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы (Au-MNH-Fuc), лактозы (Au-MPH-Lac) и галактозы (Au-MPH-Gal) – углеводными остатками, имеющими тропность к лектинам опухолевых

клеток [46, 73]. Лектины представляют собой гликопротеины, способные распознавать специфические углеводные структуры как других клеток (обеспечивая межклеточные контакты), так и свободные сахара [245, 268]. Опухолевая трансформация клеток сопровождается увеличением количества лектинов, что связано с высокой потребностью опухолевых клеток в углеводах [50].

Для практического подтверждения теоретических перспектив применения данных наночастиц в химиотерапии колоректальных опухолей на первом этапе работы проведена оценка их цитотоксичности *in vitro* на клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2). Выбранная культура обладает способностью спонтанно дифференцироваться в энтероциты кишечного эпителия через 3 недели после достижения монослоя [296]. Таким образом, в ходе работы использовались клетки разной морфологии из одного предшественника: опухолевые (48 часов после образования монослоя) и условно «нормальные» (21-е сутки после образования монослоя), что позволило выявить продолжительность экспозиции тестируемых веществ и их концентрации, оказывающие селективное цитотоксическое действие.

В ходе исследования с помощью МТТ-теста доказано, что гликонаночастицы золота уже при 2-часовом сроке инкубации с опухолевыми клетками проявляют цитотоксичность в концентрациях полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) от 450 до 770 мкг/мл. Причем значение  $IC_{50}$  наночастиц для дифференцированных в эпителиоциты тонкого кишечника клеток были достоверно выше, чем данный показатель для опухолевых клеток. Аналогичные результаты получены и при 8-часовой инкубации, при этом  $IC_{50}$  всех наночастиц были ниже, чем при более кратковременном воздействии.

Полученные результаты косвенно подтверждают актуальность примененной модификации поверхности наночастиц и могут свидетельствовать о том, что гликонаночастицы золота в большей степени накапливаются в опухолевых, чем в дифференцированных клетках. Известно, что в опухолевую ткань наночастицы попадают преимущественно с помощью так называемого эффекта повышенной

проницаемости и удерживания – EPR-эффекта, то есть пассивным путем. EPR-эффект связан с быстрым ростом опухолевых тканей и возникновением значительных полостей в клеточных мембранах *in vitro*, а также дефективной опухолевой васкуляризацией и нерегулярным эпителием, сниженным количеством лимфатических сосудов и незначительным поглощением интерстициальной жидкости *in vivo* [11]. Однако благодаря наличию на поверхности наночастиц остатков углеводов, которые обладают сродством к поверхностным лектинам опухолевых клеток [42], они, вероятно, интенсивно проникают через клеточную мембрану именно опухолевой разновидности клеток Caco-2 дополнительно путем эндоцитоза [108, 150].

Следует отметить, что после 2 и 8 часов инкубирования с низкими концентрациями гликонаночастиц золота происходило возрастание метаболической активности как дифференцированных (преимущественно), так и опухолевых клеток. Такая динамика может объясняться повышенной митохондриальной активностью, которая связана с G2/M блокадой клеточного цикла, предшествующей клеточной смерти [127]. Другая возможная причина возрастания метаболической активности – ингибирование гликонаночастицами эффлюксного мембранного белка-транспортера – ABCB1-белка (гликопротеина-P), что могло привести к более интенсивному внутриклеточному накоплению МТТ (субстрат транспортера) и его восстановлению до формазана, поглощающего свет в рабочем УФ-диапазоне [321].

Предварительное совместное инкубирование гликонаночастиц золота и МТТ в течение 8 часов не приводило к изменению оптического поглощения последнего (возможное, например, путем восстановления МТТ под действием наночастиц золота), что теоретически, могло бы привести к переоценке метаболической активности клеток при проведении МТТ-теста. Полученные данные говорят в пользу описанных выше причин.

В ходе исследования препаратом сравнения был выбран фторурацил – одобренный FDA, а также российскими клиническими рекомендациями для адьювантной терапии колоректальных опухолей препарат [10]. Механизм действия



лекарственного средства основан на ингибировании тимидилсинтазы, что приводит к внутриклеточному дисбалансу нуклеотидов и двуцепочечным разрывам ДНК [74]. По данным литературы, фторурацил также способен стимулировать транскрипционный фактор p53, инициируя апоптоз [310].

Результаты экспериментов (МТТ-тест) показали, что препарат сравнения обладал меньшей селективностью по отношению к опухолевым клеткам, а его IC<sub>50</sub> при 2- и 8-часовой инкубации не отличались от показателя для «нормальных» клеток.

Выживаемость опухолевых клеток после их инкубации с фторурацилом в течение 8 часов в концентрации IC<sub>50</sub> была достоверно ниже контроля и составила чуть менее 50%. Инкубация гликонаночастиц золота с опухолевыми клетками в течение 8 часов приводила к достоверному снижению количества жизнеспособных опухолевых клеток относительно контроля (около 30%), но по сравнению со значениями для фторурацила разница была недостоверной.

Таким образом, подтверждена перспективность использования гликонаночастиц золота в качестве противоопухолевых агентов *in vitro* при их воздействии на опухолевые клетки в течение 2 и 8 часов. Относительно короткое время, необходимое для реализации цитотоксичности является их преимуществом в связи с незначительной энтеральной абсорбцией наночастиц золота по литературным данным [97, 328] и нахождением их в толстом кишечнике в течение 4–8 часов [90]. При этом в сравнении с фторурацилом наблюдалась более высокая активность гликонаночастиц золота по отношению к опухолевым клеткам; эффективность же гликонаночастиц, характеризуемая процентом погибших клеток, не отличалась от препарата сравнения.

Следующий этап исследования заключался в анализе возможных механизмов цитотоксичности гликонаночастиц золота по отношению к опухолевым клеткам (48 часов после образования монослоя). Из научной литературы известно, что наночастицы золота способны усиливать выработку активных форм кислорода (АФК) и запускать процесс липопероксидации, как за счет взаимодействия с митохондриями, так и являясь непосредственными источниками прооксидантов

[291]. Кроме того, одним из предполагаемых механизмов цитотоксичности наночастиц золота по данным научной литературы может быть индукция апоптоза [291], которая опосредуется в том числе активацией окислительного стресса или повышением уровня проапоптотического фактора p53, как результат их повреждающего действия на ДНК или факторов ее репликации и репарации [199, 281]. Также возможно ингибирование наночастицами золота эффлюксной активности ABCB1-белка [88, 298], для которого продемонстрирована способность защищать опухолевые клетки от запрограммированной клеточной гибели, опосредованной химиопрепаратами [258] и ультрафиолетовым облучением [68].

Было доказано, что наночастицы золота, модифицированные остатками фукозы, проявляют прооксидантные свойства, что подтверждается повышением количества малонового диальдегида (МДА) и резким снижением уровня общих сульфгидрильных групп в клеточном лизате после 2- и 8-часовой инкубации с опухолевыми клетками. Отсутствие достоверного возрастания МДА после инкубации клеток с наночастицами, модифицированными лактозой и галактозой, говорит о том, что их механизм цитотоксичности, вероятно, не связан с развитием окислительного стресса.

Прооксидантная активность наночастиц золота может быть реализована несколькими путями. За счет электронно-активной поверхности наночастиц золота происходит их взаимодействие с кислородом. Донорные электроны переносятся с поверхности наночастиц на молекулы кислорода и формируется супероксид, который может привести к образованию АФК путем дисмутации [77, 137, 218]. Образование АФК под действием наночастиц золота может происходить и косвенно, посредством вмешательства их в структуру и функцию митохондрий, что приводит к утечке из цепи переноса электронов в цитозоль с образованием супероксиданионов, которые могут превращаться в молекулы  $H_2O_2$  [118, 2019]. Снижение количества общих SH-групп, которое наблюдалось после инкубации со всеми исследуемыми гликонаночастицами золота, может объясняться высокой тропностью тяжелых металлов, а именно золота, к SH-группам, содержащимся в

белках, а также к их небелковым формам [192], что также может служить одним из звеньев их прооксидантного эффекта.

Данные научной литературы подтверждают развитие окислительного стресса на фоне воздействия наночастиц золота и свидетельствуют о зависимости данного эффекта от их размеров. Прооксидантными свойствами *in vitro* обладают наночастицы золота, имеющие диаметр 13 нм, способные приводить к повреждению мембран митохондрий, вызывать снижение их трансмембранного потенциала и увеличивать продукцию АФК, что приводит к развитию окислительного стресса [142]. При проведении экспериментов *in vivo* наблюдался аналогичный эффект наночастиц золота с диаметром 50 нм. Крысам внутрибрюшинно вводили частицы гексагональной формы, что приводило к увеличению количества провоспалительных цитокинов в печени и почках [133]. Однако в других работах есть данные об отсутствии влияния наночастиц золота, имеющих диаметр 60 нм, на интенсивность липопероксидации *in vivo* [153].

Таким образом, наличие или отсутствие прооксидантного действия наночастиц золота, вероятно, зависит от способа модификации их поверхности и от механизма и интенсивности внутриклеточного накопления. С типом углеводного остатка на поверхности протестированных нами наночастиц могут быть связаны различные механизмы их рецептор-опосредованного эндоцитоза: клатрин- или кавеолин-зависимого [142]. Следствием клатрин-опосредованного эндоцитоза обычно является секвестрация частиц внутри лизосом и их дальнейший экзоцитоз, тогда как кавеолин-опосредованный процесс не приводит к подобной секвестрации и лизосомальной деградации, что позволяет наночастицам длительно контактировать с внутриклеточными компонентами, в том числе, с митохондриями, – вероятно, основной мишенью их действия, и вызывать повреждение их мембран и активацию окислительного стресса [142].

Глутатионпероксидаза IV типа является изоформой селен-зависимого антиоксидантного фермента с широким спектром субстратов, которая локализована в цитоплазме, ядре и митохондриях [194]. Отсутствие в ходе эксперимента достоверных изменений уровня данного фермента после инкубации

опухолевых клеток со всеми исследуемыми растворами гликонаночастиц золота может объясняться недостаточной для интенсификации экспрессии кодирующего его гена длительностью инкубации [116].

На следующем этапе исследования было изучено влияние гликонаночастиц золота на маркеры активации запрограммированной клеточной гибели – каспазу-3 и белок p53. Каспаза-3 является основной эффекторной каспазой [75] и играет ключевую роль в процессе апоптоза. Активированная (т.е. образованная из прокаспазы-3 путем воздействия на нее активированной каспазы-8 [76]) каспаза-3 способна расщеплять широкий спектр субстратов, что приводит к характерным морфологическим изменениям в клетках, погибающих путем апоптоза (прежде всего индукция конденсации хроматина и фрагментации ДНК [109]). Ее активность достигает максимума через 2–4 часа после индукции апоптотического процесса [102]. Ввиду того, что каспаза-3 расположена в конце каскада каспаз и активируется как внутренним, так и внешним путями, она считается наиболее важным белком апоптотического процесса [176].

Отсутствие изменений уровня каспазы-3 в клеточном лизате после инкубации с растворами гликонаночастиц золота в нашем исследовании может говорить о том, что, вероятно, длительность их воздействия оказалась недостаточной для активации эффекторных каспаз, либо гибель опухолевых клеток происходит отличным от апоптоза путем. Одним из возможных вариантов гибели клеток может быть аутофагия, что показано при воздействии на клеточную линию рака яичников (SKOV-3) [261] некоторых наночастиц золота [142]. Известно, что аутофагия является каспазо-независимым процессом и запуск ее происходит в том числе под действием транскрипционного фактора p53 [92]. Аутофагия представляет собой внутриклеточную деградацию, в процессе которой поврежденные белки/белковые комплексы/органеллы в виде аутофагосом попадают в лизосомы и подвергаются уничтожению по действием лизосомальных гидролаз [89].

Белок p53 способен транслировать сигналы стресса в различные клеточные процессы, такие как остановка клеточного цикла или гибель клеток [175]. В

физиологических условиях данный белок локализуется как в цитоплазме, так и в ядре, экспрессируется в незначительном количестве и существует в латентной, неактивной форме [173].

В ответ на генотоксический стресс (повреждение ДНК, вызванное АФК, воздействием ультрафиолета или гамма-лучей) [188], а также на негенотоксическое воздействие (лишение факторов роста, нарушение связи p53–MDM2 (за счет фосфорилирования p53), p53 подвергается различным посттрансляционным модификациям, которые приводят к его стабилизации, накоплению в ядре (большая часть) и цитоплазме и превращают его в активную ДНК-связывающую форму, активирующую экспрессию факторов, способствующих апоптозу, таких как bax, PUMA, NOXA, bad, Fas, AIP1 и др. [252], аутофагии – DRAM1 [87], AMPK [132], TSC2, а также p14ARF и DAPK-1 [201], ферроптоза – GLS2, SAT1, ALOX12, FDXR [40, 115, 177, 307].

Считается, что стабилизация p53 является результатом его фосфорилирования трифосфатом фосфатидинозитола (фосфолипид клеточных мембран) [28] по N-концу и разрушения связи p53-MDM2 [182]. Стабилизации p53 также способствует процесс его ацетилирования и метилирования [60]. MDM2 – онкопротеин (фосфопротеин), гиперэкспрессирующийся в злокачественных опухолях, который в физиологических условиях связан с p53 и представляет собой p53-специфическую E3-убиквитинлигазу, подавляющую транскрипционную активность p53 путем связывания с NH<sub>2</sub>-терминальным трансактивационным доменом p53 (постоянно моноубиквитинирует его) [64, 122, 130, 177].

Накопление p53 обычно наблюдается через 2–8 часов после развития клеточного стресса [171]. Таким образом, продолжительности экспозиции опухолевых клеток Сасо-2 с гликонаночастицами золота может быть достаточно для повышения его количества. Активированный белок p53 с помощью ДНК-связывающего домена присоединяется к митохондриальной мембране через белок bcl2. Дальнейшее взаимодействие p53 с про- и антиапоптотическими членами семейства bcl2 приводит к высвобождению из митохондрий факторов (за счет нарушения целостности митохондриальной мембраны и повышения ее

проницаемости), стимулирующих апоптоз (цитохром С, АIF, кавеолин-1) [83, 319]. Цитохром С далее образует высокомолекулярный комплекс – апоптосому, состоящую из белка-адаптера Аraf-1 и каспазы-9, которая приобретает протеолитическую активность. Активированная каспаза-9 далее расщепляет и активирует эффекторные каспазы, такие как каспаза-3 и -7, которые выполняют программу смерти – инициируют расщепление ключевых клеточных белков (белки цитоплазмы и ядерной ламины) и ДНК, способствуют конденсации хроматина и формированию апоптотического тела [36, 165].

В ходе исследования было показано возрастание уровня транскрипционного фактора p53 после 8-часовой инкубации клеток с растворами гликонаночастиц золота. Препарат сравнения фторурацил повышал уровень проапоптотического фактора и при 2- и при 8-часовой инкубации, что является одним из звеньев его фармакологического действия [310].

Таким образом, цитотоксичность протестированных веществ, возможно, реализуется путем активации одного из путей запрограммированной клеточной гибели, в развитии которого участвует белок p53.

В пользу данного предположения говорит то, что через 8 часов инкубации опухолевых клеток с растворами гликонаночастиц золота наблюдалось снижение величины трансмембранного потенциала митохондрий (ТМПМ), который является прогностическим фактором, сигнализирующим о запуске процесса апоптоза [66] и аутофагии [249], в то время как активация эффекторных каспаз имеет более длительный латентный период [43].

ТМПМ формируется разностью концентраций протонов на внешней и внутренней стороне внутренней мембраны митохондрий и способствует синтезу АТФ, а также обеспечивает транспорт заряженных соединений, необходимых для жизнеспособности митохондрий [162].

Внутренняя сторона внутренней мембраны относительно ее внешней стороны имеет отрицательный заряд (-180 мВ), что придает ей низкую проницаемость для проапоптотических факторов [195]. ТМПМ может быть понижен под действием АФК, что приводит к деполяризации митохондриальной

мембраны и повышению ее проницаемости и провоцирует запуск апоптоза из-за высвобождения из митохондриального матрикса в цитоплазму проапоптотических белков (цитохрома С, АIF, кавеолина-1 и эндонуклеаз [299]), а также факторов аутофагии (АМРК, mTOR – атипичная серин/треонинпротеинкиназа, ключевой каталитический компонент) [240].

Другим механизмом, посредством которого происходит деполяризация митохондриальной мембраны, является способность АФК взаимодействовать с полиненасыщенными жирными кислотами и образовывать высокотоксичные и реакционноспособные молекулы (МДА, 4-гидроксиноненаль), которые способствуют образованию перекисей липидов и приводят к повреждению клеточных мембран [49, 304].

Согласно литературным данным, митохондрии являются ключевыми внутриклеточными мишенями наночастиц [225]. Авторы отмечают, что снижение ТМППМ при исследовании опухолевых клеток легкого (А549) может быть также опосредовано длительной адсорбцией наночастиц золота на митохондриальных мембранах за счет их катионного поверхностного заряда [264].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о реализации цитотоксического действия гликонаночастиц золота на клетки аденокарциномы ободочной кишки за счет взаимодействия с митохондриями, снижения их трансмембранного потенциала, а также за счет накопления транскрипционного фактора р53, что приводит к инициации одного из путей запрограммированной клеточной гибели.

По данным научной литературы известно, что наночастицы металлов *in vitro* способны ингибировать функционирование АВСВ1-белка [159]. Снижение активности данного эффлюксного транспортера позволяет повысить цитотоксичность противоопухолевых препаратов, которые относятся к числу субстратов белка-транспортера (винбластин, винкристин, циклоспорин, метотрексат) [26, 170] и обеспечить преодоление феномена множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) [106]. Кроме того, АВСВ1-белок способен защищать клетки от апоптоза за счет препятствования активации каспазы-8 и

каспазы-3 [129], а также путем выведения активных каспаз-8, -9 или / и каспазы-3 из клеток [117]. Известно, что ABCB1-белок защищает клетки от окислительного стресса путем удаления из клеток МДА, являющегося субстратом транспортера [47]. ABCB1-белок обладает способностью, подобно белку множественной лекарственной устойчивости (MRP), выбрасывать из клетки окисленные производные глутатиона, таким образом, его индукция, возможно, является адаптивным механизмом [274].

Таким образом, можно рассматривать ингибирование ABCB1-белка как возможный механизм цитотоксичности гликонаночастиц золота.

В ходе исследования не было установлено снижение относительного количества ABCB1-белка под действием гликонаночастиц золота. Напротив, наночастицы, модифицированные остатками лактозы, даже увеличивали уровень транспортера на мембранах клеток. Полученные результаты могут быть объяснены индукцией транскрипционного фактора p53 под действием гликонаночастиц золота, выявленной нами ранее. Известно, что мутантные формы проапоптотического белка p53 (mutp53) способны взаимодействовать с промотором гена *MDR1*, который кодирует ABCB1-белок, и индуцировать его экспрессию в различных клеточных линиях [69, 206, 312]. Транскрипционный фактор p53 является наиболее часто мутирующим геном в опухолях человека [207]. Наибольшее число мутаций p53 встречается при колоректальном раке и составляет 43% [177]. Около 90% мутаций p53 являются миссенс-мутациями (экспрессия полноразмерного белка с заменой одной аминокислоты) [322].

Мутировавший p53 ослабляет свою проапоптотическую функцию и ингибирует p53 дикого типа, что приводит к снижению чувствительности опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам и способствует уклонению от p53-опосредованного апоптоза [86].

Также существуют данные об индукции ABCB1-белка, реализуемой в результате влияния на ряд других транскрипционных факторов, в частности – сенсора окислительного стресса Nrf2 [161]. Выявленное нами ранее резкое снижение количества общих SH-групп в клеточном лизате под действием



гликонаночастиц золота, возрастание уровня МДА под действием Au-MNH-Fuc может стимулировать данный фактор, что согласуется с данными других авторов [308].

Кроме того, возрастание количества ABCB1-белка под действием исследуемых растворов может быть следствием неспецифического компенсаторного механизма в ответ на действие ксенобиотиков [161].

Полученные в результате исследования данные об отсутствии ингибирования синтеза ABCB1-белка препаратом сравнения фторурацилом подтверждаются литературными сведениями [187].

Следует отметить, что количество ABCB1-белка не всегда коррелирует с его эффлюксной активностью, в связи со значительным числом регуляторных воздействий на транспортер в посттрансляционном периоде [113, 231]. В связи с этим целесообразно было проанализировать непосредственно функциональную активность белка-транспортера – наиболее клинически значимый показатель, от которого в частности зависит формирование феномена МЛУ [276].

Одним из вариантов оценки функциональной активности ABCB1-белка является анализ внутриклеточного накопления маркерных субстратов транспортера, таких как дабигатрана этексилат, дигоксин, фексофенадин, домперидон, талинолол и ряд других [81]. В нашем исследовании в качестве маркерного субстрата был выбран фексофенадин, так как он не подвержен биотрансформации, обладает низкой токсичностью [184], и его проникновение через клеточные мембраны контролируется преимущественно ABCB1-белком [200]. Суть эксперимента сводилась к оценке внутриклеточного накопления фексофенадина в клетках Caco-2 и HEK-293 после их предварительной инкубации с растворами гликонаночастиц золота. Исследование было проведено на двух культурах с целью подтвердить, что рост накопления фексофенадина в клетках не связан с неспецифическим повышением проницаемости клеточных мембран, а объясняется снижением эффлюксной активности ABCB1-белка. С учетом предполагаемого незначительного проникновения фексофенадина через клеточные мембраны, была осуществлена разработка и валидация высокочувствительной и

селективной методики его количественного определения в клеточном лизате – ВЭЖХ с масс-детектированием.

В научной литературе описан ряд методик количественного определения фексофенадина в различных матрицах. Некоторые из них предусматривают применение УФ-детектора, обладающего низкой чувствительностью [7, 217]. Ряд методик предполагает сложную пробоподготовку, так как определение целевого вещества проводится в биожидкостях [17] или гомогенатах органов [7]. Разработанная нами методика не имеет указанных недостатков и обладает специфичностью, достаточной чувствительностью и простотой выполнения, а также высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью и линейностью в диапазоне рабочих концентраций.

Полученные результаты (увеличение содержания фексофенадина в клетках Сасо-2) могут свидетельствовать о снижении эффлюксной активности ABCB1-белка под действием гликонаночастиц золота после 8-часового срока инкубации. Менее длительной – 2-часовой экспозиции было недостаточно для проявления ингибирующего действия исследуемых растворов [243] что, вероятно, связано с процессом эндоцитоза, который подразумевает проникновение частиц внутрь клеток в течении более длительного промежутка времени [209].

Препарат сравнения фторурацил по результатам исследования не оказывал влияния на функциональную активность и количество ABCB1-белка при инкубации с клетками Сасо-2, что согласуется с данными литературы [187].

Напротив, хинидин – вещество с доказанной ингибирующей активностью по отношению к транспортеру [166] повышал внутриклеточное содержание фексофенадина в клетках Сасо-2, то есть снижал эффлюксную активность ABCB1-белка. Это подтверждает адекватность использованной нами методики.

Аналогичный эксперимент, проведенный на культуре клеток НЕК-293 (не экспрессирующих ABCB1-белок), позволил подтвердить, что накопление фексофенадина внутри клеток Сасо-2 происходило именно за счет ингибирующего действия гликонаночастиц золота по отношению к ABCB1-белку, а не за счет повреждения клеточных мембран. По данным эксперимента, напротив,

наблюдалось снижение содержания вещества внутри клеток НЕК-293 после инкубации с исследуемыми растворами, что может быть связано с неспецифической адсорбцией наночастиц на поверхности клеточных мембран, способное приводить к снижению адсорбции фексофенадина и его внутриклеточного транспорта путем простой диффузии или фильтрации [3]. С другой стороны, известно, что для клеток линии Сасо-2 характерен более интенсивно протекающий эндоцитоз [318], таким образом, адсорбированные гликонаночастицы подвергаются проникновению внутрь клеток и подобного препятствия внутриклеточному накоплению фексофенадина не наблюдается.

Следует отметить, что препарат сравнения фторурацил после 8-часовой инкубации с клетками НЕК-293 приводил к интенсификации накопления фексофенадина внутри клеток, что, вероятно, связано с его цитотоксическим действием и нарушением целостности клеточных мембран [197].

Ингибирующее действие гликонаночастиц золота по отношению к АВСВ1-белку может быть связано с непосредственным контактом исследуемых наночастиц с местами связывания субстратов на трансмембранном домене транспортера и их вытеснение. Подобный механизм характерен в случае сходства химической структуры вещества-ингибитора и субстратов [52] или при соответствии размеров вещества-ингибитора размерам субстрат-связывающего сайта АВСВ1-белка [196]. Следовательно, основным параметром, определяющим ингибирующее действие наночастиц, является их диаметр. Диаметр протестированных наночастиц соответствует ингибирующему диапазону. Согласно литературным данным, наночастицы золота с диаметром 22 нм оказывают ингибирующее действие по отношению к АВСВ1-белку [204], так же, как наночастицы золота, имеющие диаметр 4,1–5,4 нм (выявлено на культуре клеток MCF-7/ADR). Наночастицы меньшего диаметра могут быть подвержены эффлюксу транспортером из клеток, являясь, таким образом, его субстратами [298]. Также имеются сведения о снижении функциональной активности АВСВ1-белка в связи с образованием ковалентных связей между наночастицами металла и аминокислотными остатками молекулы транспортера за счет SH-групп, которыми

богат белок-транспортер [26]. Следует отметить, что выявленное снижение эффлюксной активности ABCB1-белка под действием гликонаночастиц золота коррелирует с продемонстрированной нами ранее интенсификацией накопления в клетках МТТ, что привело к мнимой активации метаболической активности.

Таким образом, цитотоксичность гликонаночастиц золота, вероятно, не реализуется посредством одного механизма. Их способность проникать внутриклеточно как пассивным путем, так и эндоцитозом (за счет специфической модификации поверхности) позволяет воздействовать на их, очевидно, основную мишень – митохондриальную мембрану. Причем это воздействие происходит как непосредственно (из-за разности зарядов), так и за счет образующихся АФК, но приводит к общему результату – повышению проницаемости мембран и снижению ТМППМ, что, в свою очередь, также инициирует образование АФК (путем нарушения работы дыхательной цепи) и способствует выходу из митохондриального матрикса проапоптотических факторов и белков, активирующих другие механизмы клеточной гибели (апоптоз, аутофагия, ферроптоз).

Дополнительно наночастицы золота способны проникать в ядро клетки и повреждать структуру ДНК посредством окислительного воздействия и нарушения механизмов транскрипции [192], активировать транскрипционный фактор p53, который также действует на митохондрии, дополнительно стимулируя выход из них факторов клеточной гибели.

Кроме того, одним из возможных общих механизмов цитотоксичности гликонаночастиц золота может быть их прямое ингибирующее действие по отношению к ABCB1-белку – эффлюксному мембранному транспортеру, одной из функций которого является защита опухолевых клеток от запрограммированной клеточной гибели и ряда стрессовых воздействий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования показано, что наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, оказывают цитотоксическое действие по отношению к клеткам аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) после 2- и 8-часовой инкубации. При этом по эффективности цитотоксического действия наночастицы не отличаются от препарата сравнения – фторурацила, а по активности – превышают его. Цитотоксическое действие наночастиц золота, модифицированных остатками фукозы, реализуется за счет прооксидантного эффекта, что подтверждается снижением количества общих SH-групп и повышением уровня малонового диальдегида. Также показано, что гликонаночастицы золота способны инициировать один из механизмов запрограммированной клеточной гибели, реализуемый за счет активации транскрипционного фактора p53.

Выявлена способность наночастиц ингибировать функциональную активность мембранного ABCB1-белка, что может также служить одним из механизмов их цитотоксичности в связи с доказанной протекторной ролью данного транспортера.

## ВЫВОДЫ

1. Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, при 2- и 8-часовой инкубации оказывают селективное цитотоксическое действие на опухолевые клетки Сасо-2, превышая по активности препарат сравнения – фторурацил, а по эффективности – не отличаясь от него.

2. Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, при 2- и 8-часовой инкубации с опухолевыми клетками в концентрациях, соответствующих IC50 (480 мкг/мл и 340 мкг/мл соответственно по данным МТТ-теста) оказывают прооксидантный эффект по отношению к ним, проявляемый снижением уровня общих сульфгидрильных групп и ростом концентрации малонового диальдегида.

3. Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, при 8-часовой инкубации в концентрациях 340 мкг/мл, 520 мкг/мл и 300 мкг/мл соответственно инициируют один из механизмов запрограммированной клеточной гибели, реализуемый за счет повышения количества транскрипционного фактора p53 и проявляемый снижением трансмембранного потенциала митохондрий.

4. Наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы и галактозы не влияют на относительное количество ABCB1-белка в опухолевых клетках Сасо-2 в максимальных концентрациях, не снижающих интенсивность клеточного метаболизма (450 мкг/мл и 300 мкг/мл при 2- и 8-часовой экспозиции соответственно для Au-MNH-Fuc и 400 мкг/мл и 250 мкг/мл при 2- и 8-часовой экспозиции соответственно для Au-MPH-Gal); наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками лактозы, повышают относительное количество транспортера в аналогичных условиях.

5. Разработана и валидирована методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка – фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС. С помощью данной методики продемонстрировано, что

гликонаночастицы золота в максимальных концентрациях, не снижающих интенсивность клеточного метаболизма, ингибируют функциональную активность белка-транспортера через 2 часа (Au-MPH-Lac – 700 мкг/мл) и 8 часов (Au-MNH-Fuc – 300 мкг/мл и Au-MPH-Gal – 250 мкг/мл) экспозиции, что проявляется ростом уровня фексофенадина внутри клеток.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные данные о противоопухолевой активности гликонаночастиц золота *in vitro* могут быть использованы для расчета необходимой концентрации их растворов с целью проведения *in vivo* исследований на моделях опухолей животных.

Полученные результаты об ингибирующем потенциале гликонаночастиц золота по отношению к ABCB1-белку позволяют рекомендовать указанные вещества в качестве положительного контроля сниженной активности транспортера при поиске веществ аналогичного действия в экспериментальных исследованиях, а также как средств преодоления феномена множественной лекарственной устойчивости опухолей, обусловленного данным белком-транспортером. Ингибирование ABCB1-белка под действием гликонаночастиц золота необходимо учитывать в случае дальнейшего их испытания совместно с субстратами транспортера (дигоксин, дабигатрана этексилат и др.) в клинике во избежание относительной передозировки последних.

Разработанная и валидированная ВЭЖХ-МС/МС методика количественного определения фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 может быть рекомендована для исследования лекарственных веществ на предмет принадлежности к модуляторам активности ABCB1-белка.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГИФА – гетерогенный иммуноферментный анализ
- ГНЧЗ –гликонаночастицы золота
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК – инфракрасный
- ИФА – иммуноферментный анализ
- МДА – малоновый диальдегид
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- МОЛТ-4 – культура периферической крови Т-лимфобластной лейкемии человека
- MTS – 5-(3-(карбоксиметокси)фенил)-3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2-(4-сульфофенил)-гидроксида
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид
- НПКО – нижний предел количественного определения
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ППР – поверхностный плазмонный резонанс
- p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл
- ТМПМ –трансмембранный потенциал митохондрий
- УФ – ультрафиолетовый
- <sup>3</sup>H- тимидин – меченый тритием тимидин
- A549 – культура клеток аденокарциномы альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека
- АВСВ1-белок – АТФ-связывающий кассетный транспортер (Р-гликопротеин)
- AIF – фактор, индуцирующий апоптоз (англ.: Apoptosis Inducing Factor)

AIP1 – белок, регулирующий сигнал апоптоза, взаимодействующий с киназой 1 (англ.: ASK1-interactive)

ALOX12 – арахидонат-12-липооксигеназа (англ.: arachidonate 12-lipoxygenase)

АМРК – аденозин-5'-монофосфатактивируемая протеинкиназа (англ.: AMP activated protein kinase)

Araf-1 – клеточный цитозольный белок, инициирующий апоптоз (англ.: Apoptotic protease activating factor 1)

Au-MNH-Fuc – Золото-меркаптогексаноил-фукоза

Au-MPH-Gal – Золото-меркаптопропаноил-галактоза

Au-MPH-Lac – Золото-меркаптопропаноил-лактоза

B16F10 – культура клеток высокометастатичной меланомы мыши

bad – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (англ.: Bcl2-associated agonist of cell death)

bax – Bcl-2-ассоциированный X-белок (англ.: Bcl-2 associated X protein)

bcl-2 – белок внутренней мембраны митохондрий, блокирующий запрограммированную смерть клеток (антиапоптотический протеин), В-клеточная лимфома 2 (англ.: B-cell lymphoma 2)

BCRP – белок резистентности рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein)

Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)

CDER – Center for Drug Evaluation and Research

Colo320 – культура клеток карциномы сигмовидной кишки человека

CT26 – культура клеток карциномы кишечника мыши

DAPK-1 – ассоциированная со смертью протеинкиназа-1 (англ.: Death-associated protein kinase 1)

DMEM – Дульбекко модифицированная среда Игла

DRAM1 – лизосомный белок, способный вмешиваться в несколько различных стадий формирования аутофагосом (англ.: DNA Damage Regulated Autophagy Modulator 1)

EGFR – киназный домен рецептора эпидермального фактора роста (англ.: epidermal growth factor receptor)

EMA – European medicines agency

EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания (англ.: enhanced permeability and retention effect)

Fas – рецептор смерти, расположенный на поверхности клеток (англ.: Fas receptor)

FDA – Food and Drug Administration

FDXR – фермент ферредоксинредуктаза, способствующий переносу электрона от NADPH к цитохрому P450 через ферредоксин в митохондриях (англ.: Ferredoxin reductase)

G2/M – переход клеточного цикла от фазы G2 (постсинтетической) в M (митотическую)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

GLS2 – глутаминаза (англ.: Glutaminase 2)

G-per – глутатионпероксидаза (англ.: glutathione peroxidase)

GST – глутатион S-трансфераза

HEK-293 – культура клеток эмбриональных почек человека (англ.: Human Embryonic Kidney 293)

HeLa – культура клеток карциномы шейки матки (англ.: Henrietta Lacks)

HepG2 – культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека, полученная из тканей печени 15-летнего белого кавказского мужчины с хорошо дифференцированной гепатоцеллюлярной карциномой

HK-2 – культура иммортализованных клеток проксимальных канальцев почки человека

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования (англ.: half maximal inhibitory concentration)

IC<sub>90</sub> – концентрация, обеспечивающая 90% максимального ингибирования (англ.: 90% of maximal inhibition)

IGROV-1 – культура клеток карциномы яичников человека

K562 – культура клеток миелолейкоза человека

LL2 – культура клеток карциномы легкого Льюиса

MCF-7 – культура клеток рака молочной железы (англ.: breast cancer cell line или Michigan Cancer Foundation-7)

MCF-7/ADR – культура клеток рака молочной железы, резистентной к адриамицину

MDM2 – онкопротеин (фосфопротеин), гиперэкспрессирующийся в злокачественных опухолях, кодируемый геном mouse double minute-2

MDR1 – белок множественной лекарственной устойчивости 1 (англ.: multidrug resistance protein 1)

MG63 – культура клеток остеосаркомы человека

MRP1/ABCC1 – белок-транспортер, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью, кодируемый геном ABCC1 (англ.: multidrug resistance-associated protein)

mTOR – атипичная серин/треонинпротеинкиназа (англ.: mammalian target of rapamycin)

NanoEL – эффект повышения проницаемости сосудов (англ.: nanomaterial-induced endothelial leakiness)

NOXA – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (англ.: NADPH Oxidase Activator)

Nrf2 – ядерный фактор эритроидного происхождения-2 (англ.: nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

OATP-B – полипептид, транспортирующий органические анионы 2B1

p14ARF – белок-супрессор опухоли человека (англ.: P14 Alternate Reading Frame)

PEPT1 – транспортер H<sup>+</sup>/ди-трипептида

PUMA – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (англ.: p53 upregulated modulator of apoptosis)

RPMI-1640 – питательная среда, разработанная в Roswell Park Memorial Institute для культивирования лейкоцитов

SAT1 – спермин N1-ацетилтрансфераза, контролирующий катаболизм полиаминов в клетках (англ.: Spermine N1-Acetyltransferase 1)

SKOV-3 – культура клеток рака яичников

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей альфа

TSC2 – ген, кодирующий опухолевый супрессор туберин (англ.: TSC complex subunit 2, tuberin)

UGT – уридиндифосфоглюкуронозилтрансфераза

VE-cad – кадгерин эндотелия сосудов

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов (англ.: vascular endothelial growth factor)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилов, А.С. Нанотехнологии, метрология, стандартизация и сертификация в терминах и определениях / А.С. Авилов, В.М. Каневский, А.С. Батулин [и др.]. – М.: Техносфера, 2009. – 135 с. – Текст: непосредственный.
2. Ассоциация онкологов России. – Текст: электронный. – URL: <https://oncology-association.ru/> (дата обращения: 20.09.2022).
3. Балабаньян, В.Ю. Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц / В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С. 3-10.
4. Бойцов, С.А. Смертность и факторы риска неинфекционных заболеваний в России: особенности, тенденции и прогноз / С.А. Бойцов, А.Д. Деев, С.А. Шальнова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89, № 1. – С. 5-13.
5. Влияние афобазола на функциональную активность ABCB1-белка у добровольцев с низкой тревожностью / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 3. – С. 17-21.
6. Влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Р-гликопротеина через клеточный монослой / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева [и др.] // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2021. – Т. 38, № 4. – С. 292-305.
7. ВЭЖХ-методика количественного анализа фексофенадина в печени кроликов / П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 40-47.
8. Гуренцов, Е.В. Фотосинтез наночастиц / Е.В. Гуренцов, А.В. Еремин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нанотехнологии в России. – 2009. – Т. 4, № 5. – С. 319-330.

9. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных новообразований в 2014 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель. – Текст (визуальный) : непосредственный // Евразийский онкологический журнал. – 2015. – Т. 4, № 4. – С. 692-879.
10. Клинические рекомендации – Злокачественное новообразование ободочной кишки – 2022-2023-2024 (12.12.2022) – Утверждены Минздравом РФ . М.: 2022.
11. Курапов, П.Б. Наночастицы золота для диагностики и терапии онкологических заболеваний / П.Б. Курапов, Е.Ю. Бахтенко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник РГМУ. – 2018. – №6. – С. 86-93.
12. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р *in vitro* / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17, №. 1. – С. 71-78.
13. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов; под ред. А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
14. Морфологические реакции лабиринтной зоны плаценты белых крыс на парентеральное введение наночастиц золота разной величины / Н.А. Михеева, Р.М. Хайруллин, Г.С. Терентюк [и др.] // Морфологические ведомости. – 2015. – № 3. – С.46-51.
15. Национальная стратегия по борьбе с онкологическими заболеваниями на долгосрочный период до 2030 года. – Текст: электронный. – URL: <https://mpmo.ru/content/2018/02/Natsionalnaya-strategiya-po-onkologii-do-2030-goda.pdf> (дата обращения: 23.10.2023).
16. Николова, М.П. Последние новости о биогенных наночастицах металлов и оксидов металлов: терапия, доставка лекарств и цитотоксичность / М.П. Николова, П.Б. Джоши, М.С. Чавали. – Текст (визуальный) : непосредственный // Фармацевтика. – 2023, Т. 15, № 6. – С. 1650.

17. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в плазме крови / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2017. – №2. – С.35-38.
18. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». – 2016.
19. Синтез гликонаночастиц золота на основе 3-меркаптопропионилгидразонов 6-дезоксид- и 2-(ацетиламино)альдоз / А.Ю. Ершов, А.А. Мартыненко, И.В. Лагода [и др.] // Журнал общей химии. – 2020. – Т. 91, № 2. – С. 260-268.
20. Синтез гликонаночастиц золота на основе тиолсодержащих ацилгидразонов D-гексоз и их модификация тиолированной поли (2-дезоксид-2-метакрилоиламино-D-глюкозой) / А.Ю. Ершов, А.А. Мартыненко, И.В. Лагода [и др.] // Журнал общей химии. – 2019. – Т. 89, №. 2. – С. 309-318.
21. Синтез наночастиц магнетит-золото, имеющих структуру типа ядро-оболочка / П.Г. Рудаковская, Е.К. Белоглазкина, А.Г. Мажуга [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2015. – Т. 56, № 3. – С. 181-187.
22. Смирнова, Т.Д. Влияние поверхностного плазмонного резонанса на флуориметрические свойства молекул и комплексов / Т.Д. Смирнова, Е.А. Желобицкая, Т.Г. Данилина – Текст (визуальный) : непосредственный // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 132-136.
23. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 239 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
24. Способ ингибирования белка ABCB1 в гематоэнцефалическом барьере *in vivo* / И.В. Черных, А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2022. – Т. 16, № 3. – С. 47-52.



25. Ставровская, А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток / А.А. Ставровская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 95-106.
26. Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, Н.А. Попова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 3-11.
27. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes / S. Blondy, V. David, M. Verdier [et al.]. – Text: visual // Cancer science. – 2020. – Vol. 111, N 9. – P. 3142-3154.
28. A p53–phosphoinositide signalosome regulates nuclear AKT activation / M. Chen, S. Choi, T. Wen [et al.]. – Text: visual // Nature cell biology. – 2022. – Vol. 24, N 7. – P. 1099-1113.
29. A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome / S. Hazama, Y. Nakamura, H. Takenouchi [et al.]. – Text: visual // J Transl Med. – 2014. – Vol. 12, N 63. – P. 1-11.
30. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis / T. Sawicki, M. Ruzkowska, A. Danielewicz [et al.]. – Text: visual // Cancers. – 2021. – Vol. 13, N 9. – P. 2025
31. A review of the role and mechanism of surfactants in the morphology control of metal nanoparticles / T. Song, F. Gao, S. Guo [et al.]. – Text: visual // Nanoscale. – 2021. – Vol. 13, N 7. – P. 3895-3910.
32. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* / S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, N 46. – P. 35908-35913.
33. ABC transporters affects tumor immune microenvironment to regulate cancer immunotherapy and multidrug resistance / J. Fan, K.K.W. To, Z.S. Chen [et al.]. – Text: visual // Drug Resistance Updates. – 2023. – Vol. 66. – P. 100905.

34. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43 / F.M. Tuccillo, A. de Laurentiis, C. Palmieri [et al.]. – Text: visual // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 742831.
35. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanocarriers *in vivo* and their influences / A. Zhang, K. Meng, Y. Liu [et al.]. – Text: visual // *Advances in colloid and interface science.* – 2020. – Vol. 284. – P. 102261.
36. Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53 / S.M. Sykes, T.J. Stanek, A. Frank [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry.* – 2009. – Vol. 284, N 30. – P. 20197-20205.
37. Adjuvant chemotherapy for resected colorectal cancer metastases: Literature review and meta-analysis / G. Brandi, S. De Lorenzo, M. Nannini [et al.]. – Text: visual // *World J Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 22, N 2. – P. 519.
38. Advances and perspectives in the use of carbon nanotubes in vaccine development / E.N. de Carvalho Lima, R.S. Diaz, J.F. Justo [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Nanomedicine.* – 2021. – Vol. 16. – P. 5411-5435.
39. Aldahhan, R. Emerging trends in the application of gold nanoformulations in colon cancer diagnosis and treatment / R. Aldahhan, D. Almohazey, F.A. Khan. – Text: visual // *Seminars in Cancer Biology.* – 2022. – Vol. 86. – P. 1056-1065.
40. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway / B. Chu, N. Kon, D. Chen [et al.]. – Text: visual // *Nat. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 21, N 5. – P. 579-591.
41. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers / S.H. Lee, K.H. Bae, S.H. Kim [et al.]. – Text: visual // *Int J Pharm.* – 2008. – Vol. 364, N 1. – P. 94-101.
42. Antitumor potential of marine and freshwater lectins / E. Catanzaro, C. Calcabrini, A. Bishayee [et al.]. – Text: visual // *Marine drugs.* – 2019. – Vol. 18, N 1. – P. 11.
43. Anuradha, C.D. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells / C.D. Anuradha, S.

Kanno, S. Hirano. – Text: visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2001. – Vol. 31, N 3. – P. 367-373.

44. Application of different nanoparticles in the diagnosis of colorectal cancer / F. Ghorbani, P. Kokhaei, M. Ghorbani [et al.]. – Text: visual // Gene Reports. – 2020. – Vol. 21. – P. 100896.

45. Application of titanium dioxide nanoparticles in photothermal and photodynamic therapy of cancer: An updated and comprehensive review / S. Sargazi, E.R. Simge, S.S. Gelen [et al.]. – Text: visual // Journal of drug delivery science and technology. – 2022. – Vol. 75. – P. 103605.

46. Aquatic lectins: An overview (a paradigm) / A. Abraham, C.M. Rafeeq, R. Karim [et al.]. – Text: visual // Aquatic Lectins: Immune Defense, Biological Recognition and Molecular Advancements. – 2022. – P. 3-21.

47. Assessment of malondialdehyde belonging to modulators and substrates of the p-glycoprotein transporter protein / A.V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, P.Y. Mylnikov [et al.]. – Text: visual // Dokl Biochem Biophys. – 2022. – Vol. 507, N 1. – P. 247-255.

48. Assessment of the *in vivo* toxicity of gold nanoparticles / Y.S. Chen, Y.C. Hung, I. Liao [et al.]. – Text: visual // Nanoscale research letters. – 2009. – Vol. 4. – P. 858-864.

49. Aucubin attenuates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting the HMGB1/TLR-4/NF-kappaB signaling pathway, oxidative stress, and apoptosis / S. Zhang, Z. Feng, W. Gao [et al.]. – Text: visual // Front. Pharm. – 2020. – Vol. 11. – P. 544124.

50. Banerjee, A. Carbohydrate and Cancer: Where are We Now / A. Banerjee, A. Czinn, N. May. – Text: visual // Trends in Carbohydrate Research. – 2023. – Vol. 15, N 1. – P. 19-24.

51. Benarba, B. Colorectal cancer and medicinal plants: principle findings from recent studies / B. Benarba, B.A. Pandiella. – Text: visual // Biomed Pharma. – 2018. – Vol. 107. – P. 408-423.

52. Beyond competitive inhibition: regulation of ABC transporters by kinases and protein-protein interactions as potential mechanisms of drug-drug interactions / R.R. Crawford, P.K. Potukuchi, E.G. Schuetz [et al.]. – Text: visual // Drug metabolism and disposition. – 2018. – Vol. 46, N 5. – P. 567-580.
53. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? / S. Bhattacharjee. – Text: visual // Journal of controlled release. – 2016. – Vol. 235. – P. 337-351.
54. Biegging, K.T. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression / K.T. Biegging, S.S. Mello, L.D. Attardi. – Text: visual // Nature Reviews Cancer. – 2014. – Vol. 14, N 5. – P. 359-370.
55. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice / C. Lasagna-Reeves, D. Gonzalez-Romero, M.A. Barria [et al.]. – Text: visual // Biochemical and biophysical research communications. – 2010. – Vol. 393, N 4. – P. 649-655.
56. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats / M. Semmler-Behnke, W. G. Kreyling, J. Lipka [et al.]. – Text: visual // Small. – 2008. – Vol. 4, N 12. – P. 2108–2111.
57. Biodistribution of maltose and gum arabic hybrid gold nanoparticles after intravenous injection in juvenile swine / G.M. Fent, S.W. Casteel, D.Y. Kim [et al.]. – Text: visual // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2009. – Vol. 5, N 2. – P. 128-135.
58. Biological applications of gold nanoparticles / R.A. Sperling, P.R. Gil, F. Zhang [et al.]. – Text: visual // Chemical Society Reviews. – 2008. – Vol. 37, N 9. – P. 1896-1908.
59. Biological characterization of cetuximab-conjugated gold nanoparticles in a tumor animal model / H.W. Kao, Y.Y. Lin, C.C. Chen [et al.]. – Text: visual // Nanotechnology. – 2014. – Vol. 25, N 29. – P. 295102.
60. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization / S. Rosa, C. Connolly, G. Schettino [et al.]. – Text: visual // Cancer Nano. – 2017. – Vol. 8. – P. 1-25.

61. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Azospirillum brasilense* / M.A. Kupryashina, E.P. Vetchinkina, A.M. Burov [et al.]. – Text: visual // *Microbiology*. – 2013. – Vol. 82. – P. 833-840.
62. Blanco, E. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery / E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari [et al.]. – Text: visual // *Nature biotechnology*. – 2015. – Vol. 33, N 9. – P. 941-951.
63. Bolisetty, S. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology / S. Bolisetty, E.A. Jaimes. – Text: visual // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 6306-6344.
64. Boyd, M.T. A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2 / M.T. Boyd, N. Vlatkovic, D.S. Haines [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, N 41. – P. 31883-31890.
65. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text: visual // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, N 1-2. – P. 248-254.
66. Bras, M. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying / M. Bras, B. Queenan, S.A. Susin. – Text: visual // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – Vol. 70. – P. 231-239.
67. Brenner, D. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die / D. Brenner, H. Blaser, T.W. Mak. – Text: visual // *Nature Reviews Immunology*. – 2015. – Vol. 15, N 6. – P. 362-374.
68. Bullatacin triggered ABCB1-overexpressing cell apoptosis via the mitochondrial-dependent pathway / Y.J. Liang, X. Zhang, C.L. Dai [et al.]. – Text: visual // *BioMed Research International*. – 2009. – Vol. 2009. – P. 86712.
69. Bush, J.A. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters / J.A. Bush, G. Li. – Text: visual // *International journal of cancer*. – 2002. – Vol. 98, N 3. – P. 323-330.

70. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine / P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed [et al.]. – Text: visual // *The journal of physical chemistry B*. – 2006. – Vol. 110, N 14. – P. 7238-7248.

71. Cancer nanomedicine: mechanisms, obstacles and strategies / H. Li, H. Jin, W. Wan [et al.]. – Text: visual // *Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13, N 13. – P. 1639-1656.

72. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology / N. Bertrand, J. Wu, X. Xu [et al.]. – Text: visual // *Advanced drug delivery reviews*. – 2014. – Vol. 66. – P. 2-25.

73. Carbohydrate recognition by boronolactins, small molecules, and lectins / S. Jin, Y. Cheng, S. Reid [et al.]. – Text: visual // *Medicinal research reviews*. – 2010. – Vol. 30, N 2. – P. 171-257.

74. Casale, J. Fluorouracil / J. Casale, P. Patel. – Text: visual // *StatPearls Publishing*. – 2022.

75. Caspase 3 and cleaved caspase 3 expression in tumorigenesis and its correlations with prognosis in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis / F.F.V. Silva, M.E. Padín-Iruegas, V.C.A. Caponio [et al.]. – Text: visual // *Int. J. Mol. Sci*. – 2022. – Vol. 23, N 19. – P. 11937.

76. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects / M. Asadi, S. Taghizadeh, E. Kaviani [et al.]. – Text: visual // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2022. – Vol. 69, N 4. – P. 1633-1645.

77. Catalytic activity of unsupported gold nanoparticles / Y. Mikami, A. Dhakshinamoorthy, M. Alvaro [et al.]. – Text: visual // *Catal Sci Technol*. – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 58-69.

78. Cekanova, M. Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations / M. Cekanova, K. Rathore. – Text: visual // *Drug Des Devel Ther*. – 2014. – P. 1911-1922.

79. Chemo-photothermal therapy combination elicits anti-tumor immunity against advanced metastatic cancer / J. Nam, S. Son, L. J. Ochyl [et al.]. – Text: visual // *Nat. Commun*. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 1074.

80. Chufan, E.E. Drug–protein hydrogen bonds govern the inhibition of the ATP hydrolysis of the multidrug transporter P-glycoprotein / E.E. Chufan, K. Kapoor, S.V. Ambudkar. – Text: visual // *Biochemical Pharmacology*. – 2016. – Vol.101, N 1. – P. 40-53.
81. *Clinical Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry* / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) // *Clinical Pharmacology*. – 2020. – January. – 24 p.
82. Clogston, J. D. Zeta potential measurement / J. D. Clogston, A. K. Patri. – Text: visual // *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. – 2011. – P. 63-70.
83. Coenzyme Q10 protects hepatocytes from ischemia reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress via regulation of Bax/Bcl-2/PUMA and Nrf-2/FOXO-3/Sirt-1 signaling pathways / A.R. Mahmoud, F.E.M. Ali, T.H. Abd-Elhamid [et al.]. – Text: visual // *Tissue and Cell*. – 2019. – Vol. 60. – P. 1-13.
84. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery / G.F. Paciotti, L. Myer, D. Weinreich [et al.]. – Text: visual // *Drug delivery*. – 2004. – Vol. 11, N 3. – P. 169-183.
85. Colorectal cancer / E. Dekker, P.J. Tanis, J.L. Vleugels [et al.]. – Text: visual // *The Lancet*. – 2019. – Vol. 394, N 10207. – P. 1467-1480.
86. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer / A. Reles, W.H. Wen, A. Schmider [et al.]. – Text: visual // *Clin Cancer Res*. – 2001. – Vol. 7, N 10. – P. 2984-2997.
87. Crighton, D. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death / D. Crighton, S. Wilkinson, K.M. Ryan. – Text: visual // *Autophagy*. – 2007. – Vol. 3, N 1. – P. 72-74.
88. Current understanding of interactions between nanoparticles and ABC transporters in cancer cells / J. Yin, X. Deng, J. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Current Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 25, N 42. – P. 5930-5944.

89. Debnath, J. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer J. Debnath, N. Gammoh, K.M. Ryan. – Text: visual // Nature reviews Molecular cell biology. – 2023. – Vol. 24, N 8. – P. 560-575.
90. Degen, L.P. Variability of gastrointestinal transit in healthy women and men / L.P. Degen, S.F. Phillips. – Text: visual // Gut. – 1996. – Vol. 39, N 2. – P. 299-305.
91. Dembic, Z. Antitumor drugs and their targets / Z. Dembic. – Text: visual // Molecules. – 2020. – Vol. 25, N 23. – P. 5776.
92. Denisenko, T.V. p53-autophagy-metastasis link / T.V. Denisenko, A.D. Pivnyuk, B. Zhivotovsky. – Text: visual // Cancers. – 2018. – Vol. 10, N 5. – P. 148.
93. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure / M. Van der Zande, R.J. Vandebriel, E. Van Doren [et al.]. – Text: visual // ACS nano. – 2012. – Vol. 6, N 8. – P. 7427-7442.
94. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells / F. Wang, Y.C. Wang, S. Dou [et al.]. – Text: visual // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5, N 5. – P. 3679-3692.
95. Dykman, L.A. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov. – Text: visual // Acta Naturae. – 2011. – Vol. 3, N 2 (9). – P. 34-55.
96. Dykman, L.A. Gold nanoparticles in chemo-, immuno-, and combined therapy: review / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov. – Text: visual // Biomedical optics express. – 2019. – Vol. 10, N 7. – P. 3152-3182.
97. Dykman, L.A. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov. – Text: visual // Chemical reviews. – 2014. – Vol. 114, N 2. – P. 1258-1288.
98. Effects of P-glycoprotein and its inhibitors on apoptosis in K562 cells / Y. Zu, Z. Yang, S. Tang [et al.]. – Text: visual // Molecules. – 2014. – Vol. 19, N 9. – P. 13061-13075.



99. Ejazi, S.A. Mechanisms of nanoparticle transport across intestinal tissue: an oral delivery perspective / S.A. Ejazi, R. Louisthelmy, K. Maisel. – Text: visual // ACS nano. – 2023. – Vol. 17, N 14. – P. 13044-13061.

100. Elahi, N. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review / N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad. – Text: visual // Talanta. – 2018. – Vol. 184. – P. 537-556.

101. Electrochemical impedimetric detection of anti-HIV drug taking gold nanorods as a sensing interface / J. Narang, N. Malhotra, G. Singh [et al.]. – Text: visual // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – Vol. 66. – P. 332-337.

102. Elliott, M.R. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance / M.R. Elliott, K.S. Ravichandran. – Text: visual // Dev. Cell. – 2016. – Vol. 38, N 2. – P. 147-160.

103. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman. – Text: visual // Arch Biochem Biophys. – 1959. – Vol. 82, N 1. – P. 70-77.

104. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore. – Text: visual // Toxicologic pathology. – 2007. – Vol. 35, N 4. – P. 495-516.

105. Emerging theranostic gold nanomaterials to combat colorectal cancer: a systematic review / H. Barabadi, H. Vahidi, K. Damavandi Kamali [et al.]. – Text: visual // Journal of Cluster Science. – 2020. – Vol. 31, N 4. – P. 651-658.

106. Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells / M.K. Gopisetty, D. Kovács, N. Igaz [et al.]. – Text: visual // Journal of nanobiotechnology. – 2019. – Vol. 17. – P. 1-15.

107. Engineered polymeric iron oxide nanoparticles as potential drug carrier for targeted delivery of docetaxel to breast cancer cells / J. Panda, B.S. Satapathy, S. Majumder [et al.]. – Text: visual // Journal of magnetism and magnetic materials. – 2019. – Vol. 485. – P. 165-173.

108. Entry and exit of extracellular vesicles to and from the blood circulation / D. Iannotta, A.W. Kijas, A.E. Rowan [et al.]. – Text: visual // Nature Nanotechnology. – 2024. – Vol. 19, N 1. – P. 13-20.

109. Eskandari, E. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis / E. Eskandari, C.J. Eaves. – Text: visual // *J Cell Biol.* – 2022. – Vol. 221, N 6. – P. e202201159.

110. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making / H.J. Schmoll, E. Van Cutsem, A. Stein [et al.]. – Text: visual // *Ann Oncol.* – 2012. – Vol. 23, N 10. – P. 2479-2516.

111. Evidence does not support absorption of intact solid lipid nanoparticles via oral delivery / X. Hu, W. Fan, Z. Yu [et al.]. – Text: visual // *Nanoscale.* – 2016. – Vol. 8, N 13. – P. 7024-7035.

112. Experimental and theoretical explorations of nanocarriers' multistep delivery performance for rational design and anticancer prediction / W. Bao, F. Tian, C. Lyu [et al.]. – Text: visual // *Sci. Adv.* – 2021. – Vol. 7, N 6. – P. eaba2458.

113. Factors affecting the expression and function of P-glycoprotein in rats: drug treatments and diseased states / T. Murakami, R. Yumoto, J. Nagai [et al.]. – Text: visual // *Pharmazie.* – 2002. – Vol. 57, N 2. – P. 102-107.

114. Fan, J. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and biomedical applications / J. Fan, Y. Cheng, M. Sun. – Text: visual // *The Chemical Record.* – 2020. – Vol. 20, N 12. – P. 1474-1504.

115. Ferredoxin reductase is critical for p53-dependent tumor suppression via iron regulatory protein 2 / Y. Zhang, Y. Qian, J. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Genes Dev.* – 2017. – Vol. 31, N 12. – P. 1243-1256.

116. Ferroptosis and its modulation by autophagy in light of the pathogenesis of lysosomal storage diseases / K. Pierzynowska, E. Rintz, L. Gaffke [et al.]. – Text: visual // *Cells.* – 2021. – Vol. 10, N 2. – P. 365.

117. FG020326 sensitized multidrug resistant cancer cells to docetaxel-mediated apoptosis via enhancement of caspases activation / X.W. Wang, X.K. Wang, X. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, N 5. – P. 5442-5458.

118. Flores-López, L.Z. Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review: AgNP

beneficial and toxicological effects / L.Z. Flores-López, H. Espinoza-Gómez, R. Somanathan. – Text: visual // J. Appl. Toxicol. – 2019. – Vol. 39, N 1. – P. 16-26.

119. Fogh, J. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice / J. Fogh, J.M. Fogh., T. Orfeo. – Text: visual // Journal of the National Cancer Institute. – 1977. – Vol. 59, N 1. – P. 221-226.

120. Forest, V. Experimental and computational nanotoxicology–Complementary approaches for nanomaterial hazard assessment / V. Forest. – Text: visual // Nanomaterials. – 2022. – Vol. 12, N 8. – P. 1346.

121. Forest, V. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: a too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona / V. Forest, J. Pourchez. – Text: visual // Mater. Sci. Eng. – 2017. – Vol. 70. – P. 889-896.

122. Freedman, D.A. Functions of the MDM2 oncoprotein / D.A. Freedman, L. Wu, A.J. Levine. – Text: visual // Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 1999. – Vol. 55. – P. 96-107.

123. Fuller, M.A. Biomedical applications of polyelectrolyte coated spherical gold nanoparticles / M.A. Fuller, I.Köper. – Text: visual // Nano convergence. – 2019. – Vol. 6, N 1. – P. 11.

124. Gabius, H.J. Concepts of tumor lectinology / H.J. Gabius. – Text: visual // Cancer investigation. – 1997. – Vol. 15, N 5. – P. 454-464.

125. Gao, K. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles / K. Gao, X. Jiang. – Text: visual // Int. J. Pharm. – 2006. – Vol. 310, N 1-2. – P. 213-219.

126. Genetic predictors of antipsychotic efflux impairment via blood-brain barrier: role of transport proteins / R.F. Nasyrova, N.A. Shnayder, S.M. Osipova [et al.]. – Text: visual // Genes. – 2023. – Vol. 14, N 5. – P. 1085.

127. Genistein inhibits tumour cell growth *in vitro* but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival / M.C. Pagliacci, F. Spinozzi, G. Migliorati [et al.]. – Text: visual // European journal of cancer. – 1993. – Vol. 29, N 11. – P. 1573-1577.

128. Genome-wide association studies of toxicity to oxaliplatin and fluoropyrimidine chemotherapy with or without cetuximab in 1800 patients with advanced colorectal cancer / K. Watts, C. Wills, A. Madi [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 149, N 9. – P. 1713-1722.

129. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1) / T. Mizutani, M. Masuda, E. Nakai [et al.]. – Text: visual // *Current drug metabolism*. – 2008. – Vol. 9, N 2. – P. 167-174.

130. Geyer, R.K. The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export / R.K. Geyer, Z.K. Yu, C.G. Maki. – Text: visual // *Nature cell biology*. – 2000. – Vol. 2, N 9. – P. 569-573.

131. 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.]. – Text: visual // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2021. – Vol. 71, N 3. – P. 209-249.

132. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses / D.K. Broz, S.S. Mello, K.T. Bieging [et al.]. – Text: visual // *Genes Dev*. – 2013. – Vol. 27, N 9. – P. 1016-1031.

133. Glyco-nanoparticles: New drug delivery systems in cancer therapy / H. Khan, H. R. Mirzaei, A. Amiri [et al.]. – Text: visual // *Seminars in cancer biology*. – Academic Press. – 2021. – Vol. 69. – P. 24-42.

134. Gold derivatives development as prospective anticancer drugs for breast cancer treatment / I. Ielo, D. Iacopetta, C. Saturnino [et al.]. – Text: visual // *Appl. Sci*. – 2021. – Vol. 11, N 5. – P. 2089.

135. Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications / E.H. Jeong, G. Jung, C.A. Hong [et al.]. – Text: visual // *Arch. Pharmacol Res*. – 2014. – Vol. 37. – P. 53-59.

136. Gold nanoparticle-based drug delivery platform for antineoplastic chemotherapy / J.J. Liang, Y.Y. Zhou, J. Wu [et al.]. – Text: visual // *Current drug metabolism*. – 2014. – Vol. 15, N 6. – P. 620-631.

137. Gold nanoparticle-initiated free radical oxidations and halogen abstractions / P. Ionita, M. Conte, B.C. Gilbert [et al.]. – Text: visual // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2007. – Vol. 5, N 21. – P. 3504-3509.

138. Gold nanoparticles (GNPs) in biomedical and clinical applications: A review / M.I. Anik, N. Mahmud, A.Al. Masud [et al.]. – Text: visual // *Nano Select*. – 2022. – Vol. 3, N 4. – P. 792-828.

139. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity / E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole [et al.]. – Text: visual // *Small*. – 2005. – Vol. 1, N 3. – P. 325-327.

140. Gold nanoparticles displaying tumor-associated self-antigens as a potential vaccine for cancer immunotherapy / S. Ahn, I.H. Lee, S. Kang [et al.]. – Text: visual // *Adv. Healthc. Mater*. – 2014. – Vol. 3, N 8. – P. 1194-1199.

141. Gold nanoparticles in conjunction with nucleic acids as a modern molecular system for cellular delivery / A. Graczyk, R. Pawlowska, D. Jedrzejczyk [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, N 1. – P. 204.

142. Gold nanoparticles induce oxidative stress and apoptosis in human kidney cells / M. Enea, E. Pereira, M. Peixoto de Almeida [et al.]. – Text: visual // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10, N 5. – P. 995.

143. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage / Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau [et al.]. – Text: visual // *Small*. – 2009. – Vol. 5, N 18. – P. 2067-2076.

144. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. *In vitro* and *in vivo* studies / C. Lopez-Chaves, J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon [et al.]. – Text: visual // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med*. – 2018. – Vol. 14, N 1. – P. 1-12.

145. Gold nanorods: synthesis, characterization and applications / J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán [et al.]. – Text: visual // *Coordination chemistry reviews*. – 2005. – Vol. 249, N 17-18. – P. 1870-1901.

146. Gold-based nanomaterials for the treatment of brain cancer / L. Tu, Z. Luo, Y.L. Wu [et al.]. – Text: visual // *Cancer Biology & Medicine*. – 2021. – Vol. 18, N 2. – P. 372.

147. Gold-based therapy: From past to present / A. Balfourier, J. Kolosnjaj-Tabi, N. Luciani [et al.]. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117, N 37. – P. 22639-22648.

148. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as beneficial prospect for cancer theranostics / K.K. Bharadwaj, B. Rabha, S. Pati [et al.]. – Text: visual // Molecules. – 2021. – Vol. 26, N 21. – P. 6389.

149. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). – London, 2018. – 41 p.

150. Gupta, A. Emerging applications of lectins in cancer detection and biomedicine / A. Gupta. – Text: visual // Materials Today: Proceedings. – 2020. – Vol. 31. – P. 651-661.

151. Hammami, I. Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications / I. Hammami, N.M. Alabdallah. – Text: visual // Journal of king Saud university-science. – 2021. – Vol. 33, N 7. – P. 101560.

152. Hilgers, A.R. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa / A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton. – Text: visual // Pharmaceutical research. – 1990. – Vol. 7. – P. 902-910.

153. Histopathology of the liver, kidney, and spleen of mice exposed to gold nanoparticles / K.E. Ibrahim, M.G. Al-Mutary, A.O. Bakhiet [et al.]. – Text: visual // Molecules. – 2018. – Vol. 23, N 8. – P. 1848.

154. Identification of a cryptic bacterial promoter in mouse (*mdr1a*) P-glycoprotein cDNA / K.M. Pluchino, D. Esposito, J.K. Moen [et al.]. – Text: visual // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 8. – P. e0136396.

155. Identification of lectins from metastatic cancer cells through magnetic glyconanoparticles / H.W. Kavunja, P.G. Voss, J.L. Wang [et al.]. – Text: visual // Israel journal of chemistry. – 2015. – Vol. 55, N 3-4. – P. 423-436.

156. Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors / S. Dallavalle, V. Dobričić, L. Lazzarato [et al.]. – Text: visual // Drug Resistance Updates. – 2020. – Vol. 50. – P. 100682.

157. *In Vitro* Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) // Clinical Pharmacology. – 2020. – January. – 43 p.

158. *In vivo* biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure / S. Harper, C. Usenko, J.E. Hutchison [et al.]. – Text: visual // Exp. Nanosci. – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 195–206.

159. Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma / M. Susa, A.K. Iyer, K. Ryu [et al.]. – Text: visual // PloS one. – 2010. – Vol. 5, N 5. – P. e10764.

160. Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia / A. Spudich, E. Kilic, H. Xing [et al.]. – Text: visual // Nature Neuroscience. 2006. Vol. 9, N 4. – P. 487-488.

161. Involvement of ABC transporters in the detoxification of non-substrate nanoparticles in lung and cervical cancer cells / T. Yuan, J. Sun, J. Tia [et al.]. – Text: visual // Toxicology. – 2021. – Vol. 455. – P. 152762.

162. Is the mitochondrial membrane potential ( $\Delta \Psi$ ) correctly assessed? Intracellular and intramitochondrial modifications of the  $\Delta \Psi$  probe, Rhodamine 123 / L.D. Zorova, E.A. Demchenko, G.A. Korshunova [et al.]. – Text: visual // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, N 1. – P. 482.

163. Ju-Nam, Y. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications / Y. Ju-Nam, J.R. Lead. – Text: visual // Science of the total environment. – 2008. – Vol. 400, N 1-3. – P. 396-414.

164. Kciuk, M. Irinotecan–still an important player in cancer chemotherapy: a comprehensive overview / M. Kciuk, B. Marciniak, R. Kontek. – Text: visual // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, N 14. – P. 4919.

165. Khalil, A.M. Apoptosis, guardian of the genome / A.M. Khalil. – Text: visual // World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences. – 2021. – Vol. 5, N 1. – P. 037-054.

166. Kharasch, E.D. The effect of quinidine, used as a probe for the involvement of P-glycoprotein, on the intestinal absorption and pharmacodynamics of methadone / E.D. Kharasch, C. Hoffer, D. Whittington. – Text: visual // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2004. – Vol. 57, N 5. – P. 600-610.

167. Khlebtsov, N. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies / N. Khlebtsov, L. Dykman. – Text: visual // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Vol. 40, N 3. – P. 1647-1671.

168. Khoo, K.H. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy / K.H. Khoo, C.S. Verma, D.P. Lane. – Text: visual // *Nature reviews Drug discovery*. – 2014. – Vol. 13, N 3. – P. 217-236.

169. Kim, C. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles / C. Kim, P. Ghosh, V. M. Rotello. – Text: visual // *Nanoscale*. – 2009. – Vol. 1, N 1. – P. 61-67.

170. Kim, R.B. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers / R.B. Kim. – Text: visual // *Drug Metab Rev*. – 2002. – Vol. 34, N 1-2. – P. 47-54.

171. Klibanov, S.A. Accumulation of soluble and nucleolar-associated p53 proteins following cellular stress / S.A. Klibanov, H.M. O'Hagan, M. Ljungman. – Text: visual // *Journal of cell science*. – 2001. – Vol. 114, N 10. – P. 1867-1873.

172. Krzyzanowski, D. Differential Action of Silver Nanoparticles on ABCB1 (MDR1) and ABCC1 (MRP1) Activity in Mammalian Cell Lines / D. Krzyzanowski, M. Kruszewski, A. Grzelak. – Text: visual // *Materials*. – 2021. – Vol. 14, N 12. – P. 3383.

173. Lane, D. Awakening angels / D. Lane. – Text: visual // *Nature*. – 1998. – Vol. 394, N 6694. – P. 616-617.

174. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents / E. de Oliveira Figueiroa, C.R. Albuquerque da Cunha, P.B. S. Albuquerque [et al.]. – Text: visual // *Current medicinal chemistry*. – 2017. – Vol. 24, N 34. – P. 3667-3680.

175. Levine, A.J. The first 30 years of p53: Growing ever more complex / A.J. Levine, M. Oren. – Text: visual // *Nat. Rev. Cancer*. – 2009. – Vol. 9, N 10. – P. 749-758.



176. Li, L. Balance cell apoptosis and pyroptosis of caspase-3-activating chemotherapy for better antitumor therapy / L. Li, S. Wang, W. Zhou. – Text: visual // *Cancers*. – 2022. – Vol. 15, N 1. – P. 26.

177. Liebl, M.C. The role of p53 signaling in colorectal cancer / M.C. Liebl, T.G. Hofmann. – Text: visual // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, N 9. – P. 2125.

178. Lin, Z. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles / Z. Lin, N.A. Monteiro-Riviere, J.E. Riviere. – Text: visual // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2015. – Vol. 7, N 2. – P. 189-217.

179. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease / C. Mas-Bargues, C. Escriva, M. Dromant [et al.]. – Text: visual // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2021. – Vol. 709. – P. 108941.

180. Liu, Y. Gold nanoparticles-mediated photothermal therapy and immunotherapy / Y. Liu, B.M. Crawford, T. Vo-Dinh. – Text: visual // *Immunotherapy*. – 2018. – Vol. 10, N 13. – P. 1175-1188.

181. Lynch, I. Protein–nanoparticle interactions / I. Lynch, K. Dawson. – Text: visual // *Nano-enabled medical applications*. – 2020. – P. 231-250.

182. Maki, C.G. Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2 / C.G. Maki. – Text: visual // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 23. – P. 16531-16535.

183. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update / R. Cordiano, M. Di Gioacchino, R. Mangifesta [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, N 16. – P. 5979.

184. Mason, J. The systemic safety of fexofenadine HCl / J. Mason, R. Reynolds, N. Rao. – Text: visual // *Clin. Exp. Allergy*. – 1999. – Vol.29, N 3. – P.163-170.

185. McKinnon, K. M. Flow cytometry: an overview / K. M. McKinnon. – Text: visual // *Current protocols in immunology*. – 2018. – Vol. 120, N 1. – C. 5.1.-5.1.11.

186. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models / F.X. Mahon, F. Belloc, V. Lagarde [et al.]. – Text: visual //

Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2003. – Vol. 101, N 6. – P. 2368-2373.

187. Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel7402 / J. Jin, M. Huang, H.L. Wei [et al.]. – Text: visual // World Journal of Gastroenterology. – 2002. – Vol. 8, N 6. – P. 1029.

188. Meek, D.W. The p53 response to DNA damage / D.W. Meek. – Text: visual // DNA Repair. – 2004. – Vol. 3, N 8-9. – P. 1049-1056.

189. Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model / Y.H. Chen, C.Y. Tsai, P.Y. Huang [et al.]. – Text: visual // Molecular pharmaceutics. – 2007. – Vol. 4, N 5. – P. 713-722.

190. Methotrexate-loaded PEGylated gold nanoparticles as hemocompatible and pH-responsive anticancer drug nanoconjugate / M. Rahman, J.A. Khan, U. Kanwal [et al.]. – Text: visual // Journal of Nanoparticle Research. – 2021. – Vol. 23, N 8. – P. 195.

191. Microbial synthesis of gold nanoparticles and their application / N.K. Chowdhury, R. Choudhury, B. Gogoi [et al.]. – Text: visual // Current Drug Targets. – 2022. – Vol. 23, N 7. – P. 752-760

192. Mikhailova, E.O. Gold nanoparticles: biosynthesis and potential of biomedical application / E.O. Mikhailova. – Text: visual // J. Funct. Biomater. – 2021. – Vol. 12, N 4. – P. 70.

193. Milan, J. Treasure on the earth—gold nanoparticles and their biomedical applications / J. Milan, K. Niemczyk, M. Kus-Liśkiewicz. – Text: visual // Materials. – 2022. – Vol. 15, N 9. – P. 3355.

194. Mitochondrial regulation of ferroptosis in cancer therapy / X. Cheng, J. Zhang, Y. Xiao [et al.]. – Text: visual // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24, N 12. – P. 10037.

195. Mitochondria-targeted cancer therapy based on functional peptides / Y. Sun, H. Zhang, G. Lu [et al.]. – Text: visual // Chinese Chemical Letters. – 2023. – Vol. 34, N 5. – P. 107817.

196. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy / R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo [et al.]. – Text: visual // *Pharmacology & therapeutics*. – 2015. – Vol. 149. – P. 1-123.

197. Mohiyuddin, S. Enhanced antineoplastic/therapeutic efficacy using 5-fluorouracil-loaded calcium phosphate nanoparticles / S. Mohiyuddin, S. Naqvi, G. Packirisamy. – Text: visual // *Beilstein journal of nanotechnology*. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 2499-2515.

198. Molecular and cellular paradigms of multidrug resistance in cancer / F.U. Vaidya, A. Sufiyan Chhipa, V. Mishra [et al.]. – Text: visual // *Cancer reports*. – 2022. – Vol. 5, N 12. – P. e1291.

199. Molecular mechanism of cytotoxicity, genotoxicity, and anticancer potential of green gold nanoparticles on human liver normal and cancerous cells / M.N. Bin-Jumah, M. Al-Abdan, G. Al-Basher [et al.]. – Text: visual // *Dose-Response*. – 2020. – Vol. 18, N 2. – P. 1559325820912154.

200. Molimard, M. Comparison of pharmacokinetics and metabolism of desloratadine, fexofenadine, levocetirizine and mizolastine in humans / M. Molimard, B. Diquet, M.S. Benedetti. – Text: visual // *Fund. & Clin. Pharmacol.* – 2004. – Vol.18, N 4. – P.399-411.

201. Mrakovcic, M. p53-mediated molecular control of autophagy in tumor cells / M. Mrakovcic, L.F. Fröhlich. – Text: visual // *Biomolecules*. – 2018. – Vol. 8, N 2. – P. 14.

202. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review / A.V.B. Pintor, L.D. Queiroz, R. Barcelos [et al.]. – Text: visual // *International Endodontic Journal*. – 2020. – Vol. 53, N 10. – P. 1348-1373.

203. Multidrug resistance (MDR): A widespread phenomenon in pharmacological therapies / A. Catalano, D. Iacopetta, J. Ceramella [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, N 3. – P. 616.

204. Multifunctional gold nanoparticles in cancer diagnosis and treatment / Y. Yang, X. Zheng, L. Chen [et al.]. – Text: visual // *International journal of nanomedicine*. – 2022. – P. 2041-2067.

205. Mundekkad, D. Nanoparticles in clinical translation for cancer therapy / D. Mundekkad, W.C. Cho. – Text: visual // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23, N 3. – P. 1685.

206. Mutant p53 cooperates with ETS and selectively upregulates human MDR1 not MRP1 / J. Sampath, D. Sun, V.J. Kidd [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276, N 42. – P. 39359-39367.

207. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types / C. Kandoth, M.D. McLellan, F. Vandin [et al.]. – Text: visual // *Nature*. – 2013. – Vol. 502, N 7471. – P. 333-339.

208. Nair, R.V. Gold nanorods decorated with a cancer drug for multimodal imaging and therapy / R.V. Nair, H. Santhakumar, R.S. Jayasree. – Text: visual // *Faraday Discuss*. – 2018. – Vol. 207. – P. 423-435.

209. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency / A. Lesniak, A. Salvati, M.J. Santos-Martinez [et al.]. – Text: visual // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – Vol. 135, N 4. – P. 1438-1444.

210. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date / D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutical research*. – 2016. – Vol. 33. – P. 2373-2387.

211. Nanoparticle-induced ferroptosis: detection methods, mechanisms and applications / H. Zheng, J. Jiang, S. Xu [et al.]. – Text: visual // *Nanoscale*. – 2021. – Vol. 13, N 4. – P. 2266-2285.

212. Nanoparticles: The future of effective diagnosis and treatment of colorectal cancer? / R. Naeimi, R. Najafi, P. Molaei [et al.]. – Text: visual // *European journal of pharmacology*. – 2022. – Vol. 936. – P. 175350.

213. Nanotechnology-based drug delivery systems for enhanced diagnosis and therapy of oral cancer / Z. Ding, K. Sigdel, L. Yang [et al.]. – Text: visual // *J Mater Chem B*. – 2020. – Vol. 8, N 38. – P. 8781-8793.

214. Nanotherapeutics approaches to overcome P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance in cancer / J. Halder, D. Pradhan, B. Kar [et al.]. – Text: visual // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2022. – Vol. 40. – P. 102494.

215. Narayanan, R. Effect of catalysis on the stability of metallic nanoparticles: Suzuki reaction catalyzed by PVP-palladium nanoparticles / R. Narayanan, M. El-Sayed. – Text: visual // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – Vol. 125, N 27. – P. 8340-8347.

216. Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses / H. Cortés, H. Hernández-Parra, S.A. Bernal-Chávez [et al.]. – Text: visual // *Materials*. – 2021. – Vol. 14, N 12. – P. 3197.

217. Oliveira, D.C. Simple and reliable HPLC analysis of fexofenadine hydrochloride in tablets and its application to dissolution studies / D.C. Oliveira, A. Weich, C.M.B. Rolim. – Text: visual // *Pharmazie*. – 2007. – Vol. 62, N 2. – P. 96-100.

218. On the interactions of free radicals with gold nanoparticles / Z. Zhang, A. Berg, H. Levanon [et al.]. – Text: visual // *J Am Chem Soc*. – 2003. – Vol. 125, N 26. – P. 7959-7963.

219. Oppenheimer S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics / H. Ghazarian, B. Idoni, S.B. Oppenheimer [et al.]. – Text: visual // *Acta histochemica*. – 2011. – Vol. 113, N 3. – P. 236-247.

220. Optimizing the geometry of photoacoustically active gold nanoparticles for biomedical imaging / R. García-Álvarez, L. Chen, A. Nedilko [et al.]. – Text: visual // *ACS photonics*. – 2020. – Vol. 7, N 3. – P. 646-652.

221. Orntoft, T.F. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer / T.F. Orntoft, E.M. Vestergaard. – Text: visual // *Electrophoresis*. – 1999. – Vol. 20, N 2. – P. 362–371.

222. Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743 / A. Kanzaki, Y. Takebayashi, X.Q. Ren [et al.]. – Text: visual // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2002. – Vol. 1, N 14. – P. 1327-1334.

223. Paciorek, P. Products of lipid peroxidation as a factor in the toxic effect of silver nanoparticles / P. Paciorek, M. Żuberek, A. Grzelak. – Text: visual // Materials. – 2020. – Vol. 13, N 11. – P. 2460.

224. Park, K. Depletion-induced shape and size selection of gold nanoparticles / K. Park, H. Koerner, R.A. Vaia. – Text: visual // Nano Lett. – 2010, Vol. 10, N 4. – P. 1433–1439.

225. Pathak, R.K. Targeted nanoparticles in mitochondrial medicine / R.K. Pathak, N. Kolishetti, S. Dhar. – Text: visual // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2015. – Vol. 7, N 3. – P. 315-329.

226. Patra, J.K. Comparative study of proteasome inhibitory, synergistic antibacterial, synergistic anticandidal, and antioxidant activities of gold nanoparticles biosynthesized using fruit waste materials / J.K. Patra, K.H. Baek. – Text: visual // International journal of nanomedicine. – 2016. – Vol. 11. – P. 4691-4705.

227. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer / L.S. Schwartzberg, F. Rivera, M. Karthaus [et al.]. – Text: visual // J Clin Oncol. – 2014. – Vol. 32, N 21. – P. 2240–2247.

228. PEGylated inorganic nanoparticles / A.S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan [et al.]. – Text: visual // Angewandte Chemie International Edition. – 2011. – Vol. 50, N 9. – P. 1980-1994.

229. Petrelli, F. The predictive role of skin rash with cetuximab and panitumumab in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis of published trials / F. Petrelli, K. Borgonovo, S. Barni. – Text: visual // Target Oncol. – 2013. – Vol. 8. – P. 173-181.

230. P-glycoprotein induction by breast milk attenuates intestinal inflammation in experimental necrotizing enterocolitis / Y.S. Guner, A.L. Franklin, N.K. Chokshi [et al.]. – Text: visual // Laboratory investigation. – 2011. – Vol. 91, N 11. – P. 1668-1679.

231. P-glycoprotein protein expression versus functionality at the blood-brain barrier using immunohistochemistry, microdialysis and mathematical modeling / E.C.M.

De Lange, D.J. Vd Berg, F. Bellanti [et al.]. – Text: visual // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – Vol.124, N 1. – P. 61-70.

232. Photoacoustic excitation profiles of gold nanoparticles / A. Feis, C. Gellini, P.R. Salvi [et al.]. – Text: visual // *Photoacoustics*. – 2014. – Vol. 2, N 1. – P. 47-53.

233. Photoregulated release of caged anticancer drugs from gold nanoparticles / S.S. Agasti, A. Chompoosor, C.C. You [et al.]. – Text: visual // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131, N 16. – P. 5728-5729.

234. Plasmonic nanosensors for imaging intracellular biomarkers in live cells / S. Kumar, N. Harrison, R. Richards-Kortum [et al.]. – Text: visual // *Nano Lett.*– 2007. – Vol. 7, N 5. – P. 1338-1343.

235. Pokharkar, V.B. Metallic nanoparticulate drug delivery systems / V.B. Pokharkar, V.V. Dhapte, S.S. Kadam. – Text: visual // *Nanotechnology and Drug Delivery*. – 2014. – Vol. 1. – P. 41.

236. Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media / J. Manson, D. Kumar, B.J. Meenan [et al.]. – Text: visual // *Gold bulletin*. – 2011. – Vol. 44. – P. 99-105.

237. Prasad, S. K. Mechanical engineering. Modern concepts in nanotechnology / S.K. Prasad. – Text: visual // *Discovery Publishing House*. – 2008. – 257 p.

238. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis / F. Pietrantonio, F. Petrelli, A. Coinu [et al.]. – Text: visual // *Eur J Cancer*. – 2015. – Vol. 51, N 5. – P. 587-594.

239. Preparation and antibacterial properties of gold nanoparticles: A review / X. Gu, Z. Xu, L. Gu [et al.]. – Text: visual // *Environ. Chem. Lett.* – 2021. – Vol. 19. – P. 167–187.

240. Programmed cell death pathways in hearing loss: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis / J. Wu, J. Ye, W. Kong [et al.]. – Text: visual // *Cell proliferation*. – 2020. – Vol. 53, N 11. – P. e12915.

241. Progress in the studies on the molecular mechanisms associated with multidrug resistance in cancers / L. Zhang, B. Ye, Z. Chen [et al.]. – Text: visual // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2023. – Vol. 13, N 3. – P. 982-997.

242. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding / X. Jiang, S. Weise, M. Hafner [et al.]. – Text: visual // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2010. – Vol. 7, N 1. – P. S5-S13.

243. Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles / C. Brandenberger, C. Mühlfeld, Z. Ali [et al.]. – Text: visual // *Small*. – 2010. – Vol. 6, N 15. – P. 1669-1678.

244. Quantitatively understanding cellular uptake of gold nanoparticles via radioactivity analysis / X. Shao, P. Schnau, W. Qian [et al.]. – Text: visual // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. – 2015. – Vol. 15, N 5. – P. 3834-3838.

245. Rahimi, N. C-type lectin CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN: cell adhesion molecules turned to pathogen recognition receptors / N. Rahimi. – Text: visual // *Biology*. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 1.

246. Recent advances in cancer therapy based on dual mode gold nanoparticles / E. Spyratou, M. Makropoulou, E.P. Efstathopoulos [et al.]. – Text: visual // *Cancers*. – 2017. – Vol. 9, N 12. – P. 173.

247. Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery / C. Yang, T. Wu, Y. Qi [et al.]. – Text: visual // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, N 2. – P. 464.

248. Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications / K.X. Lee, K. Shameli, Y.P. Yew [et al.]. – Text: visual // *International journal of nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – C. 275-300.

249. Recent insights into the mitochondrial role in autophagy and its regulation by oxidative stress / V. Roca-Agujetas, C. de Dios, L. Lestón [et al.]. – Text: visual // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 3809308.

250. Redox control of multidrug resistance and its possible modulation by antioxidants / A. Cort, T. Ozben, L. Saso [et al.]. – Text: visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4251912.



251. Regulation of P-Glycoprotein during Oxidative Stress / A.V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, O.V. Kosmachevskaya [et al.]. – Text: visual // *Antioxidants*. – 2024. – Vol. 13, N 2. – P. 215.

252. Regulation of programmed cell death by the p53 pathway / R. Khosravi-Far, E. White, K. Kuribayashi [et al.]. – Text: visual // *Programmed cell death in cancer progression and therapy*. – 2008. – P. 201-221.

253. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation / J.M. Suski, M. Lebiezinska, M. Bonora [et al.]. – Text: visual // *Mitochondrial bioenergetics: methods and protocols*. – 2012. – Vol. 810. – P. 183-205.

254. Relationship between increased fucosylation and metastatic potential in colorectal cancer / T. Osuga, R. Takimoto, M. Ono [et al.]. – Text: visual // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2016. – Vol. 108, N 8. – P. djw038.

255. Restoration of p53 function in ovarian cancer mediated by gold nanoparticle-based EGFR targeted gene delivery system / R. Kotcherlakota, K. Vydiam, D.J. Srinivasan [et al.]. – Text: visual // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2019. – Vol. 5, N 7. – P. 3631-3644.

256. Reversible differentiation of Caco-2 cells reveals galectin-9 as a surface marker molecule for human follicle-associated epithelia and M cell-like cells / J.F. Pielage, C. Cichon, L. Greune [et al.]. – Text: visual // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2007. – Vol. 39, N 10. – P. 1886-1901.

257. Reversion of multidrug resistance by a pH-responsive cyclodextrin-derived nanomedicine in drug resistant cancer cells / Q. Shi, L. Zhang, M. Liu [et al.]. – Text: visual // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 67. – P. 169-182.

258. Role of ABCB1 in mediating chemoresistance of triple-negative breast cancers / Y.S. Abd El-Aziz, A.J. Spillane, P.J. Jansson [et al.]. – Text: visual // *Bioscience reports*. – 2021. – Vol. 41, N 2. – P. BSR20204092.

259. Role of free thiol on protein adsorption to gold nanoparticles / O. Awotunde, S. Okyem, R. Chikoti [et al.]. – Text: visual // *Langmuir*. – 2020. – Vol. 36, N 31. – P. 9241-9249.

260. Romberg, B. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles / B. Romberg, W.E. Hennink, G. Storm. – Text: visual // *Pharm Res.* – 2008. – Vol. 25. – P. 55–71.

261. ROS-mediated apoptosis and autophagy in ovarian cancer cells treated with peanut-shaped gold nanoparticles / E. Piktel, I. Ościłowska, Ł. Suprewicz [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Nanomedicine.* – 2021. – P. 1993-2011.

262. Russell, T.M. The relationship of glutathione-S-transferase and multi-drug resistance-related protein 1 in nitric oxide (NO) transport and storage / T.M. Russell, M.G. Azad, D.R. Richardson. – Text: visual // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26, N 19. – P. 5784.

263. Sani, A. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review / A. Sani, C.Cao, D. Cui. – Text: visual // *Biochemistry and biophysics reports.* – 2021. – Vol. 26. – P. 100991.

264. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: Implications for cancer therapy / L. Wang, Y. Liu, W. Li [et al.]. – Text: visual // *Nano Lett.* – 2011. – Vol. 11, N 2. – P. 772-780.

265. Selim, M.E. Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells / M.E. Selim, A.A. Hendi. – Text: visual // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* – 2012. – Vol. 13, N 4. – P. 1617-1620.

266. SFRP2 improves mitochondrial dynamics and mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and apoptosis in diabetic cardiomyopathy / T. Ma, X. Huang, H. Zheng [et al.]. – Text: visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2021. – Vol. 2021, N 1. – P. 9265016.

267. Shimmin, R. G. Polymer size and concentration effects on the size of gold nanoparticles capped by polymeric thiols / R.G. Shimmin, A.B. Schoch, P.V. Braun. – Text: visual // *Langmuir.* – 2004. – Vol. 20, N 13. – P. 5613-5620.

268. Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins / K.F. Bornhöfft, T. Goldammer, A. Rebl [et al.]. – Text: visual // *Developmental & Comparative Immunology.* – 2018. – Vol. 86. – P. 219-231.

269. Singh, R. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins / R. Singh, A. Letai, K. Sarosiek. – Text: visual // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2019. – Vol. 20, N 3. – P. 175-193.

270. Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications / A. Woźniak, A. Malankowska, G. Nowaczyk [et al.]. – Text: visual // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2017. – Vol. 28. – P. 1-11.

271. Size-dependent apoptotic activity of gold nanoparticles on osteosarcoma cells correlated with SERS signal / A. Chakraborty, A. Das, S. Raha [et al.]. – Text: visual // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – Vol. 203. – P. 111778.

272. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo / K. Huang, H. Ma, J. Liu [et al.]. – Text: visual // *ACS nano*. – 2012. – Vol. 6, N 5. – P. 4483-4493.

273. Stealthy nanoparticles protect endothelial barrier from leakiness by resisting the absorption of VE-cadherin / Y. Huang, S. Wang, J. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Nanoscale*. – 2021. – Vol. 13, N 29. – P. 12577-12586.

274. Steinmeier, J. Exposure of cultured astrocytes to menadione triggers rapid radical formation, glutathione oxidation and Mrp1-mediated export of glutathione disulfide / J. Steinmeier, R. Dringen. – Text: visual // *Neurochemical Research*. – 2019. – Vol. 44. – P. 1167-1181.

275. Stoddart, M. J. Cell viability assays: introduction / M.J. Stoddart. – Text: visual // *Mammalian cell viability: methods and protocols*. – 2011. – Vol. 740. – P. 1-6.

276. Strategies to overcome cancer multidrug resistance (MDR) through targeting P-glycoprotein (ABCB1): an updated review / J. Dong, L. Yuan, C. Hu [et al.]. – Text: visual // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2023. – P. 108488.

277. Structure-activity relationship and mechanism of flavonoids on the inhibitory activity of P-glycoprotein (P-gp)-mediated transport of rhodamine123 and daunorubicin in P-gp overexpressed human mouth epidermal carcinoma (KB/MDR) cells

/ Y. Fang, F. Liang, M. Xia [et al.]. – Text: visual // *Food Chem. Toxicol.* – 2021. – Vol. 155. – P. 112381.

278. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity / A. Mishra, A. Behura, S. Mawatwal [et al.]. – Text: visual // *Food Chem. Toxicol.* – 2019. – Vol. 134. – P. 110827.

279. Subcellular performance of nanoparticles in cancer therapy / C.G. Liu, Y.H. Han, R.K. Kankala [et al.]. – Text: visual // *Int. J. Nanomed.* – 2020. – P. 675-704.

280. Sun, H. Permeability, transport, and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: a theoretical study / H. Sun, K.S. Pang. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition.* – 2008. – Vol. 36, N 1. – P. 102-123.

281. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity / N.M. Schaeublin, L.K. Braydich-Stolle, A.M. Schrand [et al.]. – Text: visual // *Nanoscale.* – 2011. – Vol. 3, N 2. – P. 410-420.

282. Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna* / J.S. Bozich, S.E. Lohse, M.D. Torelli [et al.]. – Text: visual // *Environmental Science: Nano.* – 2014. – Vol. 1, N 3. – P. 260-270.

283. Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells / K. Saha, S.T. Kim, B. Yan [et al.]. – Text: visual // *Small.* – 2013. – Vol. 9, N 2. – P. 300-305.

284. Surface plasmon resonance-induced photoactivation of gold nanoparticles as mitochondria-targeted therapeutic agents for pancreatic cancer / L. Mocan, I. Ilie, F.A. Tabaran [et al.]. – Text: visual // *Expert opinion on therapeutic targets.* – 2013. – Vol. 17, N 12. – P. 1383-1393.

285. Synergistic effect induced by gold nanoparticles with polyphenols shell during thermal therapy: macrophage inflammatory response and cancer cell death assessment / V. De Matteis, M. Cascione, L. Rizzello [et al.]. – Text: visual // *Cancers.* – 2021. – Vol. 13, N 14. – P. 3610.

286. Synthesis and characterization of size-and shape-controlled silver nanoparticles / S. Mukherji, S. Bharti, G. Shukla [et al.]. – Text: visual // *Physical Sciences Reviews.* – 2019. – Vol. 4, N 1. – P. 20170082.

287. Synthesis and stabilization of gold nanoparticles using water-soluble synthetic and natural polymers / Z.A. Nurakhmetova, A.N. Azhkeyeva, I.A. Klassen [et al.]. – Text: visual // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12, N 11. – P. 2625.

288. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system / M. Brust, M. Walker, D. Bethell [et al.]. – Text: visual // *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. – 1994. – N 7. – P. 801-802.

289. Szewczyk-Roszczenko, O. The role of p53 in nanoparticle-based therapy for cancer / O. Szewczyk-Roszczenko, N.A. Barlev. – Text: visual // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, N 24. – P. 2803.

290. Sztandera, K. Gold nanoparticles in cancer treatment / K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, B. Klajnert-Maculewicz. – Text: visual // *Molecular pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 16, N 1. – P. 1-23.

291. Talarska, P. Current knowledge of silver and gold nanoparticles in laboratory research–application, toxicity, cellular uptake / P. Talarska, M. Boruckowski, J. Żurawski. – Text: visual // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11, N 9. – P. 2454.

292. Targeted delivery of paclitaxel drug using polymer-coated magnetic nanoparticles for fibrosarcoma therapy: *in vitro* and *in vivo* studies / R. Al-Obaidy, A.J. Haider, S. Al-Musawi [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13, N 1. – P. 3180.

293. Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach / M. Yoshida, R. Takimoto, K. Murase [et al.]. – Text: visual // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7, N 7. – P. e39545.

294. Tepus, M. Non-invasive colorectal cancer screening: an overview / M. Tepus, T.O. Yau. – Text: visual // *Gastrointestinal tumors*. – 2020. – Vol. 7, N 3. – P. 62-73.

295. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives / J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo [et al.]. – Text: visual // *Acta histochemica*. – 2018. – Vol. 120, N 3. – P. 159-167.

296. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics / Y. Sambuy, I. De Angelis, G. Ranaldi [et al.]. – Text: visual // Cell biology and toxicology. – 2005. – Vol. 21. – P. 1-26.

297. The clinical implications of immunogenomics in colorectal cancer: A path for precision medicine / J.M. Riley, A.W. Cross, C.M. Paulos [et al.]. – Text: visual // Cancer. – 2018. – Vol. 124, N 8. – P. 1650–1659.

298. The critical size of gold nanoparticles for overcoming P-gp mediated multidrug resistance / Y. Jiang, Z. Wang, W. Duan [et al.]. – Text: visual // Nanoscale. – 2020. – Vol. 12, N 31. – P. 16451-16461.

299. The effect of zinc acexamate on oxidative stress, inflammation and mitochondria induced apoptosis in rat model of renal warm ischemia / N.H. Abdallah, A. Baulies, A. Bouhlel [et al.]. – Text: visual // Biomed. Pharm. – 2018. – Vol. 105. – P. 573-581.

300. The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution / I. Ozcicek, N. Aysit, C. Cakici [et al.]. – Text: visual // Materials Science and Engineering: C. – 2021. – Vol. 128. – P. 112308.

301. The influence of size and chemical composition of silver and gold nanoparticles on *in vivo* toxicity with potential applications to central nervous system diseases / D. F. Báez, E. Gallardo-Toledo, M.P. Oyarzún [et al.]. – Text: visual // International journal of nanomedicine. – 2021. – P. 2187-2201.

302. The influence of the route of administration of gold nanoparticles on their tissue distribution and basic biochemical parameters: *in vivo* studies / M. Bednarski, M. Dudek, J. Knutelska [et al.]. – Text: visual // Pharmacol. Rep. – 2015. – Vol. 67, N 3. – P. 405–409.

303. The many faces of gold nanorods / C.J. Murphy, L.B. Thompson, A.M. Alkilany [et al.]. – Text: visual // The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2010. – Vol. 1, N 19. – P. 2867-2875.

304. The molecular mechanisms of iron metabolism and its role in cardiac dysfunction and cardioprotection / T. Ravingerová, L. Kindernay, M. Barteková [et al.]. – Text: visual // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, N 21. – P. 7889.

305. The most effective gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: theory and *in vitro* experiments / M.A. Mackey, M.R.K. Ali, L.A. Austin [et al.]. – Text: visual // The Journal of Physical Chemistry B. – 2014. – Vol. 118, N 5. – P. 1319-1326.

306. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment / K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao [et al.]. – Text: visual // The Journal of Physical Chemistry B. – 2003. – Vol. 107, N 3. – P. 668-677.

307. The regulation of ferroptosis by tumor suppressor p53 and its pathway / J. Liu, C. Zhang, J. Wang [et al.]. – Text: visual // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, N 21. – P. 8387.

308. The role of organosulfur compounds as Nrf2 activators and their antioxidant effects / M.C. Egbujor, M. Petrosino, K. Zuhra [et al.]. – Text: visual // Antioxidants. – 2022. – Vol. 11, N 7. – P. 1255.

309. Tian, Y. Multifunctional nanotherapeutics for photothermal combination therapy of cancer / Y. Tian, R. Guo, W. Yang. – Text: visual // Adv. Ther. – 2018. – Vol. 1, N 8. – P. 1800049.

310. Topical 5-fluorouracil in dermatologic disease / G.T. Prince, M.C. Cameron, R. Fathi [et al.]. – Text: visual // International Journal of Dermatology. – 2018. – Vol. 57, N 10. – P. 1259-1264.

311. Toxicologic effects of gold nanoparticles *in vivo* by different administration routes / X.D. Zhang, H.Y. Wu, D. Wu [et al.]. – Text: visual // Int. J. Nanomed. – 2010. – Vol. 5. – P. 771–781.

312. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants / K.T. Nguyen, B. Liu, K. Ueda [et al.]. – Text: visual // Oncol Res. – 1994. – Vol. 6, N 2. – P. 71-77.

313. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk / H. Lebrech, R. Ponce, B.D. Preston [et al.]. – Text: visual // Current medical research and opinion. – 2015. – Vol. 31, N 3. – P. 557-574.

314. Tumor stressors induce two mechanisms of intracellular P-glycoprotein-mediated resistance that are overcome by lysosomal-targeted thiosemicarbazones / L. Al-Akra, D.H. Bae, S. Sahni [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Vol. 293, N 10. – P. 3562-3587.

315. Turkevich, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold / J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier. – Text: visual // Discussions of the faraday society. – 1951. – Vol. 11. – P. 55-75.

316. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine / M.S. de Almeida, E. Susnik, B. Drasler [et al.]. – Text: visual // Chemical society reviews. – 2021. – Vol. 50, N 9. – P. 5397-5434.

317. Utilization of adjuvant radiotherapy for resected colon cancer and its effect on outcome / R.E. Wegner, S. Abel, D. Monga [et al.]. – Text: visual // Annals of surgical oncology. – 2020. – Vol. 27. – P. 825-832.

318. Van Breemen, R.B. Expert. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption / R.B. Van Breemen, Y. Li. – Text: visual // Opin Drug Metab Toxicol. – 2005. – Vol. 1, N 2. – P. 175-185.

319. Variable but consistent pattern of Meningioma 1 gene (MN1) expression in different genetic subsets of acute myelogenous leukaemia and its potential use as a marker for minimal residual disease detection / S. Carturan, J. Petiti, V. Rosso [et al.]. – Text: visual // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, N 45. – P. 74082.

320. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation / G.D. Yancopoulos, S. Davis, N.W. Gale [et al.]. – Text: visual // Nature. – 2000. – Vol. 407, N 6801. – P. 242–248.

321. Vellonen, K.S. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity / K.S. Vellonen, P. Honkakoski, A. Urtti. – Text: visual // European journal of pharmaceutical sciences. – 2004. – Vol. 23, N 2. – P. 181-188.



322. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? / E.H. Baugh, H. Ke, A.J. Levine [et al.]. – Text: visual // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, N 1. – P. 154-160.

323. Xanthonas as P-glycoprotein modulators and their impact on drug bioavailability / V. Silva, E. Gil-Martins, B. Silva [et al.]. – Text: visual // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2021. – Vol. 17, N 4. – P. 441-482.

324. Xiao, X. Novel amino-modified silica nanoparticles as efficient vector for hepatocellular carcinoma gene therapy / X. Xiao, Q. He, K. Huang. – Text: visual // *Medical Oncology.* – 2010. – Vol. 27. – P. 1200-1207.

325. X-ray computed tomography imaging of a tumor with high sensitivity using gold nanoparticles conjugated to a cancer-specific antibody via polyethylene glycol chains on their surface / T. Nakagawa, K. Gonda, T. Kamei [et al.]. – Text: visual // *Science and Technology of advanced MaTerialS.* – 2016. – Vol. 17, N 1. – P. 387-397.

326. Youle, R.J. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death / R.J. Youle, A. Strasser. – Text: visual // *Nature reviews Molecular cell biology.* – 2008. – Vol. 9, N 1. – P. 47-59.

327. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles / W.-S. Cho, R. Duffin, F. Thielbeer [et al.]. – Text: visual // *Toxicol. Sci.* – 2012. – Vol. 126, N 2. – P. 469–477.

328. Zhang, X. Gold nanoparticles: recent advances in the biomedical applications / X. Zhang. – Text: visual // *Cell biochemistry and biophysics.* – 2015. – Vol. 72. – P. 771-775.

329. Zhang, X. The glyconanoparticle as carrier for drug delivery / X. Zhang, G. Huang, H. Huang. – Text: visual // *Drug Delivery.* – 2018. – Vol. 25, N 1. – P. 1840-1845.

330. Zhou, S.F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition / S.F. Zhou. – Text: visual // *Xenobiotica.* – 2008. – Vol. 38, N 7-8. – P. 802-832.

SFRP2 improves mitochondrial dynamics and mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and apoptosis in diabetic cardiomyopathy / T. Ma, X. Huang, H. Zheng [et al.]. – Text: visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2021. – Vol. 2021, N 1. – P. 9265016.