

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-33-44>
УДК



Обзорная статья/Review article

Перспектива создания лекарственных препаратов на основе наночастиц селена (обзор)

К. Д. Скоринова¹, В. В. Кузьменко¹, И. А. Василенко¹

¹ – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

*Контактное лицо: Скоринова Кристина Довлетовна. E-mail: kristina.skorinova@gmail.com

Статья получена: 16.03.2020. Статья принята к печати: 15.05.2020

Резюме

Введение. В настоящее время в литературе широко обсуждаются перспективы использования наночастиц при создании лекарственных препаратов. Количество регистрационных удостоверений, выданных национальными регуляторами только за 2018 год на лекарственные препараты, в которых наночастицы используются в том или ином виде, составляет около сорока. Большинство из них составляют лекарственные препараты на основе липосом, полимеров, оксидов железа, мицелл. До сих пор не выдано ни одного регистрационного удостоверения на наночастицы селена. Одна из причин такого положения в данной области, с нашей точки зрения, заключается в том, что механизмы взаимодействия наночастиц с клетками изучены недостаточно. Отсутствие фундаментальных исследований в данной области является одним из основных препятствий при разработке лекарственных препаратов нового поколения на основе наночастиц.

Текст. Данный обзор посвящен анализу научной литературы по исследованию взаимодействия наночастиц селена с разными видами клеток. В статье рассматриваются биологические свойства селена и его роль в метаболизме клеток. Приводятся данные о цитотоксическом действии наночастиц селена на различные клеточные культуры. Описаны методы получения наночастиц и методы исследования взаимодействия наночастиц с клеточными культурами.

Заключение. Анализ литературных данных позволяет сделать выводы об актуальности исследований взаимодействия наночастиц селена с живыми клетками. Это необходимо для определения механизмов поглощения наночастиц селена, изучения их цитотоксического и/или цитостатического действия, распределения в клетках. Исследования биологического взаимодействия наночастиц селена с опухолевыми и нормальными клетками позволит определить наиболее информативные методы регистрации и количественной оценки их противоопухолевой активности, что актуально при разработке новых лекарственных средств против рака.

Ключевые слова: селен, наночастицы селена, взаимодействие наночастиц с клетками, методы исследования наночастиц с клетками, получение наночастиц селена, биологические свойства наночастиц селена, цитостатическое действие наночастиц селена.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор К. Д. Скоринова провела обзор публикаций по теме статьи. Все авторы участвовали в написании и редактировании текста статьи.

Для цитирования: Скоринова К. Д., Кузьменко В. В., Василенко И. А. Перспектива создания лекарственных препаратов на основе наночастиц селена. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 33–44.

The Prospect of Creating Medicines Based on Selenium Nanoparticles (Review)

Kristina D. Skorinova¹, Valeriya V. Kuzmenko¹, Ivan A. Vasilenko¹

¹ – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Kristina D. Skorinova. E-mail: kristina.skorinova@gmail.com

Received: 16.03.2020. Accepted: 15.05.2020

Abstract

Introduction. The prospects of using nanoparticles in the production of medicines are widely discussed in the literature. In 2018 alone, the quantity of registration certificates issued by national regulators for medicines that use nanoparticles in one form or another is around forty. Most of them are medicines based on liposomes, polymers, iron oxides, micelles. So far, no registration certificates have been issued for selenium nanoparticles. One of the reasons for this situation in this area, from our point of view, is that the mechanisms of interaction of nanoparticles with cells are not sufficiently studied. The lack of basic research in this area is one of the main obstacles to the development of new-generation drugs based on nanoparticles.

Text. This review is devoted to the analysis of scientific data on the interaction of selenium nanoparticles with different types of cells. The article discusses the biological properties of selenium and its role in cell metabolism. Data on the cytotoxic effect of selenium nanoparticles on various cell cultures are presented. Methods of preparation of nanoparticles and methods for studying the interaction of nanoparticles with cell cultures are described.

Conclusion. Analysis of the literature data allows us to draw conclusions about the relevance of research on the interaction of selenium nanoparticles with living cells. This is necessary to determine the mechanisms of selenium nanoparticles absorption, study their cytotoxic and / or cytostatic action, and distribution in cells. Investigation of the biological interaction of selenium nanoparticles with tumor and normal cells will determine the most informative methods for registering and quantifying their antitumor activity, which is relevant for the development of new drugs to treat cancer.

Keywords: selenium, selenium nanoparticles, interaction of nanoparticles with cells, research methods for nanoparticles with cells, synthesis of selenium nanoparticles, biological properties of selenium nanoparticles, cytostatic effect of selenium nanoparticles.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Скоринова К. Д., Кузьменко В. В., Василенко И. А., 2020

© Skorinova K. D., Kuzmenko V. V., Vasilenko I. A., 2020

Contribution of the authors. Author Kristina D. Skorinova reviewed publications on the topic of the article. All authors participated in writing and editing the text of the article.

For citation: Skorinova K. D., Kuzmenko V. V., Vasilenko I. A. The prospect of creating medicines based on selenium nanoparticles. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 33–44.

ВВЕДЕНИЕ

В литературе широко обсуждаются перспективы использования наночастиц при создании лекарственных препаратов. Количество регистрационных удостоверений, выданных национальными регуляторами на лекарственные препараты, в которых наночастицы (НЧ) используются в том или ином виде, крайне мало. По данным только за 2018 год порядка сорока препаратов были одобрены и разрешены для использования в клинической практике [1]. Большинство из них составляют лекарственные препараты на основе липосом, полимеров, оксидов железа, мицелл. До сих пор не выдано ни одного регистрационного удостоверения на НЧ селена. Одна из причин такого положения в данной области, с нашей точки зрения, заключается в том, что механизмы взаимодействия НЧ с клетками изучены недостаточно. Отсутствие фундаментальных исследований в данной области является одним из основных препятствий для создания лекарственных препаратов на основе НЧ. В этом обзоре представлены данные научных исследований по свойствам НЧ селена и механизмам взаимодействия этих НЧ с разными видами клеток. Также описаны основные методы получения НЧ селена и методы исследования взаимодействия НЧ с клетками.

В настоящее время изучены НЧ металлов Ag, Au, Cu, Pt, Fe, Se, Si и Zn [2–8]. Особое место занимают НЧ Se. Селен является важным микроэлементом. Он включен в селенопротеины в виде селеноцистеина, представляющего наиболее важную часть активного центра их ферментативной активности. Многие селенопротеины обладают оксидоредуктазной активностью и, таким образом, регулируют физиологический окислительно-восстановительный баланс. Селен имеет узкую границу между терапевтической дозой и токсичностью, тогда как НЧ селена обладают заметно сниженной токсичностью.

В работе Khurana с соавторами [9] было изучено влияние НЧ селена на ряд заболеваний, таких как артрит, рак, диабет и нефропатия с потенциальными терапевтическими преимуществами. Изучение терапевтического действия НЧ селена, по-видимому, обусловлено их специфическими свойствами. Они имеют высокую химическую активность за счет большой удельной площади поверхности, в тоже время НЧ могут преодолевать ограничения обычных систем высвобождения лекарственных средств и имеют высокую проницаемость в клетки. Эти свойства НЧ исполь-

зуются для поиска новых потенциально возможных лекарственных препаратов на их основе, а также систем направленной доставки биологически активных веществ как для диагностики, так и для терапевтического применения.

Цель статьи – изучение и сравнение данных, полученных в результате исследований биологических свойств селена и его роли в метаболизме клеток, в частности, цитотоксического действия наночастиц селена. Рассмотрены методы получения наночастиц селена и методы исследования взаимодействия наночастиц с клетками.

Биологические свойства селена и его роль в метаболизме клеток

Селен является важным микроэлементом человеческого организма, он действует как кофактор в некоторых ферментных структурах, называемых *селенопротеинами* [10]. На сегодняшний день в клетках и тканях человека обнаружено около 25 видов различных селенопротеинов. Селен включен в селеноцистеин в различных антиоксидантных ферментах, таких как глутатионпероксидаза, тиоредоксинредуктаза, селенофосфатсинтаза и селенопротеин Р. Селен действует как окислительно-восстановительный центр всех этих ферментов и имеет важное значение для их биохимической активности [11].

В антиоксидантной системе защиты организма наиболее чувствительным ферментом к дефициту селена является *глутатионпероксидаза*. При дефиците селена (менее 0,02 мг/кг) биосинтез этого фермента не происходит и, как правило, отсутствует его активная форма, антигенный полипептид и его мРНК. Увеличение содержания селена в организме способствует синтезу селеноферментов до оптимального уровня (по разным данным, примерно 0,2 мг/кг для глутатионпероксидазы и 0,1 мг/кг для селенопротеинов Р и W) [12].

Селенопротеины принимают участие в регуляции и метаболизме тиреоидных гормонов (тироксина) и йодтиронин дейодиназ трех типов. Йодтиронин дейодиназа играет важную роль в активации и инактивации гормонов щитовидной железы. В условиях дефицита селена именно дейодиназы приоритетно обеспечиваются селеном [13]. Аналогично, селен влияет на секрецию инсулина и функцию островков, которые доминируют в гомеостазе глюкозы в крови. Предполагается, что диабетогенное действие, наблюдаемое у здоровых людей с высоким потреблением

селена, частично опосредовано селенопротеинами. Однако селенопротеины могут положительно регулировать метаболизм глюкозы в организме посредством редокс-чувствительной передачи сигналов. Преимущества и риски селена для сахарного диабета являются диалектическими. Высокое потребление селена у здорового человека имеет тенденцию вызывать дисфункцию секреции инсулина, тогда как для диабетического пациента высокое потребление селена полезно для поддержания гомеостаза глюкозы в крови благодаря функции, имитирующей инсулин [14].

Существует ряд заболеваний, связанных с дефицитом селена. Например, форма детской эндемической миокардиомиопатии, болезнь Кешана. Заболевание суставов и костей с множественной деформацией, болезнь Кашина-Бека также может быть связана с дефицитом селена. Болезнь Кешана, как известно, не является результатом окислительного стресса: болезнь Кашина-Бека, вероятно, имеет многофакторную этиологию, дефицит селена может быть ускоряющей причиной или фактором [15].

Для профилактики дефицита селена в организме людей был разработан препарат Селен-Актив®, зарегистрированный как биологически активная добавка (БАД) к пище. Этот препарат рекомендуется применять для нормализации обмена холестерина, для улучшения функционального состояния сердечно-сосудистой системы и повышения функциональной активности антиоксидантной системы организма [16].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) норма потребления селена составляет: для взрослых женщин – 55 мкг/сутки, для взрослых мужчин – 70 мкг/сутки [17]. По разным источникам верхний допустимый уровень потребления селена может составлять от 300 до 600 мкг/сутки [18, 19]. Токсичной дозой считается 900 мкг/сутки. Таким образом, граница между терапевтической и токсической дозой является очень узкой.

Общетоксические свойства наночастиц селена

Исследования отечественных и зарубежных учёных по изучению острой токсичности препаратов на основе селена указывают на более низкую токсичность наночастиц селена по сравнению с селенитом натрия. В исследовании Е. А. Карпов с соавторами [20] изучали токсичность композитного препарата (арабиногалактан + наноселен) на мышах. В дозе 9,12 мг Se/кг препарат НЧ селена не вызвал смерть ни одной мыши; в дозе 20 мг Se/кг – все мыши опытной группы остались живы; доза 40 мг Se/кг также не явилась летальной для животных. Препаратом сравнения являлся селенит натрия, который вызвал 100%-ую гибель мышей в дозе 9,50 мг Se/кг.

В другом исследовании [21] при внутрибрюшинном введении препарата с НЧ селена мышам, LD_{50} составляет $32,9 \pm 0,3$ мг/кг. Соответствующий показатель для селенита натрия составил 10 мг/кг.

Исследование острой токсичности на мышах для НЧ селена стабилизированных различными полимерами подтвердило меньшую токсичность наночастиц селена по сравнению с селенитом натрия. Полученные данные по определению LD_{50} (мг Se/кг) и LD_{100} (мг Se/кг) показали, что для поливинилпирролидона $LD_{50} = 32,9$ и $LD_{100} = 56,4$; для желатина $LD_{50} = 23,4$ и $LD_{100} = 48,71$; для хитозана $LD_{50} = 29,7$ и $LD_{100} = 53,2$. Токсичность препарата сравнения – селенита натрия составила $LD_{50} = 8,11$; $LD_{100} = 10,16$ [22].

Исследователи из Китая [3] определяли острую токсичность НЧ селена, который был получен реакцией селенита натрия с глутатионом, содержащим бычий сывороточный альбумин (БСА). Исследования показали, что LD_{50} для НЧ селена (БСА) составила 113,0 мг Se/кг, а LD_{50} для селенита натрия – 15,7 мг Se/кг. Летальная доза органического селена в форме метилселеноцистеина – 27,5 мг Se/кг (вызывает 100%-ую гибель мышей при пероральном введении). Однако НЧ селена (БСА) в дозе 36 мг Se/кг вызывает гибель только 10 % мышей и 70 % мышей в дозе 150 мг Se/кг. Таким образом, острая токсичность НЧ селена в несколько раз ниже селенита натрия.

Биологические свойства наночастиц селена

Исследования биологических свойств НЧ селена, проведенных разными авторами [4, 24–26], подтверждают, что НЧ селена по сравнению с различными формами селена (селенит, селенометионин) обладают заметно сниженной острой и субхронической токсичностью. Все эти соединения селена обладают эквивалентной эффективностью в отношении их способности увеличивать активность селеноферментов [4, 25]. Кроме того, НЧ селена более эффективны, чем селенит натрия и селенометионин, в повышении активности глутатион-S-трансферазы [25, 26] и одинаково эффективны в индукции апоптоза некоторых типов раковых клеток [27]. В дополнение к профилактике рака, НЧ селена также показывают антимикробные свойства [28].

НЧ селена были исследованы при различных окислительных стрессах и заболеваниях, включая рак, диабет, воспалительные заболевания, фиброз печени и токсичность, вызванную лекарственными средствами [29–32]. НЧ селена поглощают свободные радикалы *in vitro* в зависимости от размера (5–200 нм). Во Huang и соавторы провели исследование и выявили, что НЧ селена с размерами 5–15 нм обладают лучшей способностью поглощать свободные радикалы и предотвращают окисление ДНК. НЧ селена показали превосходные эффекты при концентрации менее 0,5 мМ по сравнению с селенитом натрия, IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) которого составляет более 1,5 мМ [33]. В другом исследовании НЧ селена были конъюгированы с синтезированным циклическим пептидом, которые показали улучшенную проницаемость в клеточной линии аденокарциномы яичника SK-OV-3 [34].

Фармакокинетика наночастиц селена

В настоящее время в научной литературе имеются единичные публикации о фармакокинетике НЧ селена. Поглощение, распределение, метаболизм и выведение селена было исследовано группой исследователей из Национального института питания технического университета Дании [35]. Они определяли концентрацию селена в печени, почках, моче, кале, желудке, легких и плазме крови после введения низких и высоких доз НЧ селена размером от 10 до 80 нм и селенита натрия крысам. Результаты показали, что элементный селен присутствовал в печени, почках и кале животных, подвергшихся воздействию низких и высоких доз НЧ селена и селенита натрия. Оба препарата селена были биодоступными, что продемонстрировано с использованием биомаркера крови селенопротеина Р, который был одинаково активен у животных при использовании больших доз. Наконец, выделение селена с мочой и его появление в виде Se-метилселено-N-ацетилгалактозамина и триметилселеноний-иона показали, что НЧ селена и селенит натрия метаболизируются и выводятся из организма. Результаты исследования показали, что оба препарата селена были в равной степени поглощены, распределены, метаболизированы и выведены из организма крыс. Более детальный механизм воздействия НЧ селена и селенита натрия на желудочно-кишечный тракт крыс ещё не изучен [35].

Цитостатическое действие наночастиц селена

Существует проблема использования соединений селена (например, селенита натрия, селеноцистеина, селенометионина) в терапевтическом лечении рака из-за его токсичности и биодоступности. В результате были проведены исследования немодифицированных и модифицированных НЧ селена, которые демонстрируют противоопухолевую активность против нескольких линий раковых клеток в зависимости от времени и дозы [5, 36–39]. НЧ селена способны значительно снизить токсичность элементного селена при использовании их для химиотерапии.

Противораковые свойства НЧ селена широко исследованы как *in vitro*, так и *in vivo* [5–8, 40]. НЧ селена показали ингибирование роста раковых клеток LNCaP простаты *in vitro* частично через апоптоз, опосредованный каспазой [27]. Кроме того, НЧ селена подавляют транскрипционную активность рецептора андрогена посредством подавления экспрессии его мРНК и белка. Результаты *in vitro* дополнительно подтверждаются исследованиями *in vivo*, в которых было обнаружено, что НЧ селена, вводимые перорально мышам BALB/c с опухолями рака молочной железы 4T1, уменьшают объем опухоли и, следовательно, приводят к лучшему прогнозу (более высокому коэффициенту выживаемости) мышей [41].

Изучая потенциал НЧ селена, все больше внимания уделяется модифицированным НЧ селена, в которых конъюгация НЧ селена с функциональными лигандами усиливает их стабилизацию, клеточное поглощение и биоактивность. Было показано, что положительно заряженные НЧ селена усиливают противораковую эффективность, избирательное клеточное поглощение раковыми клетками. Это было продемонстрировано Yu и другими авторами [5] на модифицированных хитозаном НЧ селена. Разработка конъюгированных НЧ селена включает различные соединения: аденозинтрифосфат (АТФ) [42], полисахариды спирулины [43], грибные полисахариды [44], полисахариды *Gracilaria lemaneiformis* [45], полисахаридно-белковый комплекс *Polyporus rhinoceros* [46], полисахариды *Undaria pinnatifida* [47], сиаловая кислота [48, 64], куркумин [49], аминокислоты – валин, аспарагиновая кислота и лизин [50], рутений-тиол [51, 52], полиэтиленгликоль [8, 53], 11-меркапто-1-ундеканол [30], трансферрин [31], 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (Trolox) [54] и фолат [36]. Одна из основных целей конъюгации НЧ селена заключается в возможности направленной доставки лекарственных препаратов.

В исследовании *in vivo* Huang [31] рассматривал селективное клеточное поглощение и индукцию апоптоза НЧ селена и их потенциальное использование в качестве системы доставки лекарственных средств, нацеленных на рак. НЧ селена синтезировали из селенита натрия (Na_2SeO_3) и конъюгировали с трансферрином (Tf), хитозаном (CS), и загружали доксорубицином (DOX) с образованием Tf-CS-DOX-SeNP (сферическая форма, размер – 130 нм). Клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 инъецировали мышам. После того, как опухоли увеличились до объема 50–75 мм³, мышам внутривенно вводили 2,5; 5,0 и 7,5 мг/кг Tf-CS-DOX-SeNP каждые 2 дня. Результаты показали уменьшение объема и массы опухоли без значительного снижения массы тела у мышей, которым вводили Tf-CS-DOX-SeNP по сравнению с мышами, которым вводили только физиологический раствор. Это свидетельствует о том, что Tf-CS-DOX-SeNP ингибировали пролиферацию клеток MCF-7 в зависимости от дозы. Хотя предполагается, что поддержание массы тела указывает на минимальные побочные эффекты Tf-CS-DOX-SeNP. Однако возможно 16 дней – это слишком короткий период времени для изучения побочных эффектов НЧ селена без анализа других параметров для определения самочувствия мышей. Отмечены два механизма доставки Tf-CS-DOX-SeNPs, нацеленных на раковые клетки: 1) Tf-лиганд нацелен на раковые клетки со сверхэкспрессией рецепторов Tf, усиливается клеточное поглощение DOX (как часть Tf-CS-DOX-SeNPs) через клатрин-опосредованный эндоцитоз и кавеолин-опосредованный эндоцитоз; и 2) Tf-CS-DOX-SeNPs индуцируют внутриклеточное образование активных форм кислорода (АФК), активируя метаболические пути p53 и MAPK, способствующие клеточному апоптозу раковых клеток.

CuI и группа ученых исследовала противоопухолевое действие НЧ селена, синтезированных с использованием экстракта боярышника [38]. Противоопухолевая активность НЧ была изучена с помощью серии анализов на клеточных культурах HepG2 (рак печени человека) и HL02 (нормальные клетки печени). В результате анализ цитотоксичности показал, что раствор НЧ селена с экстрактом боярышника имеет значительную противоопухолевую активность против клеток HepG2. Исследование противоопухолевых механизмов продемонстрировало, что апоптоз, вызванный НЧ селена с экстрактом боярышника, опосредуется через митохондриальный путь с активацией АФК и нарушением митохондриального мембранного потенциала.

Учеными из Китая были проведены исследования на противоопухолевую активность модифицированных катехинами селеновые гидроксипатитовые НЧ [39]. Анализ клеточного поглощения проводили на клеточной линии остеосаркомы человека MNNG/HOS. Для исследования безопасности разработанных НЧ их токсический эффект, определяли по отношению к стволовым клеткам (hBMSC). Анализ клеточной токсичности показал, что модификация катехинов улучшает противоопухолевую активность НЧ селен-гидроксипатит, индуцируя апоптоз клеточных линий остеосаркомы человека посредством генерации АФК, которые, в свою очередь, активируют путь каспазы-3, не оказывая значительного влияния на рост человеческих нормальных стволовых клеток костного мозга.

Исследователи из России получали конъюгаты НЧ селена с использованием силимарина (гепатопротектор растительного происхождения). Цитотоксические исследования проводили на клеточных линиях SPEV-2 (иммortalизованные клетки почки эмбриона свиньи) и Hep-2 (опухолевые клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека). В результате полученный конъюгат НЧ селена с силимарином проявлял ярко выраженный цитотоксический эффект по отношению к линии опухолевых клеток Hep-2 с уменьшением количества жизнеспособных клеток примерно в 6,5 раза по сравнению с контролем (против примерно 2,3-кратного снижения этого показателя в линии клеток SPEV-2) [55].

Получение наночастиц селена

Для получения НЧ селена используют различные методы: физические, химические и биологические. Наиболее часто используемыми физическими методами синтеза НЧ селена являются гидротермальная обработка, микроволновое облучение и лазерная абляция. Синтез НЧ селена методом импульсной лазерной абляции проводится с использованием жидкой фазы в деионизированной воде. В результате получается коллоидный раствор с разными размерами частиц сферической формы [56, 57]. Лазерная абляция имеет преимущества по сравнению с другими методами – отсутствие загрязнения химическими реагентами, дешевое оборудование, легкий способ получения НЧ и высокая стабильность.

Метод синтеза НЧ селена с помощью микроволн заключается в нагреве водного раствора соли селена с помощью этого излучения [58]. Время реакции, мощность облучения и тип поверхностно-активного вещества оказывают существенное влияние на морфологию и размер наночастиц продукта при применении микроволнового метода [59].

Для химического синтеза НЧ селена используются разные подходы. Однако наиболее распространенным методом синтеза является химическое восстановление и стабилизация различными химическими агентами [60, 61]. Для синтеза НЧ селена химическим путем в качестве прекурсора используется неорганический селен. Модификация поверхности или использование различных укупорочных средств, таких как хитозан или карбоксиметилхитозан, может привести к увеличению размера частиц и увеличению стабильности [62, 63]. В случае кислотно-индуцированного синтеза в качестве индукторов могут быть использованы различные органические кислоты. Например, сиаловая кислота [64]; аскорбиновая кислота [65]; фолиевая кислота [66]; уксусная, щавелевая, галловая кислоты [67]; бензойная кислота [68].

В последние годы биосинтез НЧ с использованием растительных экстрактов и микроорганизмов стал возможной альтернативой химическим и физическим методам [69]. Микроорганизмы могут применяться в качестве потенциальных биореакторов для получения НЧ селена различных форм и размеров. Успешно были синтезированы НЧ селена с помощью таких микроорганизмов, как *Zooglea ramigera* (размер частиц 30–150 нм, частицы сферической формы, имеющие кристаллическую природу) [70], *Gliocladium roseum* (размер частиц 20–80 нм, имеют гексагональную кристаллическую природу) [71], *Lactobacillus Acidophilus* (частицы размером 15–50 нм) [72], *Bacillus cereus* (размер наносфер 150–200 нм) [73] и др.

Растительные экстракты могут использоваться в качестве восстановителей и стабилизаторов. CuI и другие соавторы разработали метод синтеза НЧ селена с помощью водного экстракта плодов боярышника. Полученные НЧ имели монодисперсную сферическую морфологию и были достаточно стабильны в водном растворе со средним диаметром 113 нм [38]. Листья *Terminalia arjuna* были использованы также для приготовления НЧ селена. Экстракт листьев работал как хорошее укупорочное средство, а также как стабилизирующий агент [74].

Методы исследования взаимодействия наночастиц селена с клетками

Трансмиссионная электронная микроскопия

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) используется для визуализации пространственных отношений между НЧ и клетками. [69, 75]. В частности, Dongdong Sun с соавторами исследовали взаимодействия НЧ селена, модифицированных полипириди-

лом рутения(II) размером 100 нм с эндотелиальными клетками пупочной вены человека HUVEC и клетками гепатоцеллюлярной карциномы печени человека HepG2 [51]. В результате было обнаружено, что НЧ селена проникали в клетки путем эндоцитоза, были локализованы преимущественно в цитоплазме и в перинуклеарном пространстве клетки, взаимодействуя с белками и вызывая изменение формы ядра.

Xiaoxiao Song и др. с помощью ТЭМ изучали клеточное поглощение и внутриклеточное распределение НЧ селена, модифицированных хитозаном в клетках HepG2 [76]. НЧ селена были локализованы во внутриклеточных структурах, таких как эндосомы и лизосомы.

В работе [39] с помощью ТЭМ проводили анализ клеточного поглощения гидроксиапатитовых НЧ селена, модифицированных катехинами, клетками остеосаркомы человека MNNG/HOS. Было обнаружено, что НЧ проникали в клетки посредством типичного процесса эндоцитоза. Изображения ТЭМ иллюстрируют: инвагинацию клеточной мембраны, за которой следует образование эндосом; вновь созданные эндосомы, загруженные НЧ; первичную лизосому в сочетании с эндосомой; разложение и высвобождение активных агентов; деградацию наночастиц во вторичной лизосоме; НЧ в непосредственной близости от ядра.

Таким образом, ТЭМ позволяет визуализировать НЧ, связанные с электронными плотными метками в различных везикулярных структурах. С помощью ТЭМ, благодаря высокому разрешению и визуализации НЧ во внутриклеточной среде, можно получить информацию о морфологических изменениях клеточных мембран при контакте с НЧ и поглощении НЧ клетками, о взаимодействиях НЧ с клеточными органеллами и их возможное повреждающее действие на них. Также возможно получение информации о накоплении НЧ Se в клетках и их деградации с последующим выведением из клеток.

ТЭМ имеет также и недостатки. Для подготовки образцов, которые исследуются в условиях сверхвысокого вакуума (УСВ), требуется их фиксация, так как высокая энергетическая доза электронного луча несовместима с жизнью клетки. Следовательно, изучение клеток в живом состоянии и исследования динамических событий невозможны [77]. Кроме того, выбор пробоподготовки должен быть тщательно скорректирован с учетом стабильности полимерных НЧ в ответ на гидрофобные и высокореактивные химические вещества, используемые для встраивания и химической фиксации клеток. Электронная микроскопия представляет собой метод, который обычно не предназначен для высокопроизводительных исследований. Поэтому тщательный анализ статистических данных, полученных на основе изображений ТЭМ, может повысить достоверность интерпретации воздействия НЧ на клетки. Число частиц, локализованное в органеллах, может подчеркнуть предполагаемые механизмы и, таким образом, повысить значимость полученных данных [78, 79]. В качестве предварительного

исследования взаимодействия НЧ с клетками может использоваться метод темнопольной микроскопии (ТМ) [78]. Для подтверждения результатов ТЭМ применяется метод конфокальной микроскопии [51].

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) включает в себя конъюгирование различных флуоресцентных меток с белком и НЧ, что позволяет анализировать распределение цвета или резонансного переноса энергии флуоресценции по всему клеточному компартменту. Изучение клеточного поглощения, распределения и локализацию НЧ селена с помощью КЛСМ описывается в работах [34, 47, 51, 64, 76].

Преимущество такого подхода заключается в том, что он позволяет выявлять локализацию НЧ селена в живых клетках. Ограничением этого метода является то, что маркеры эндоцитоза недостаточно селективны по отношению к специфическим путям циркуляции и могут использовать различные механизмы эндоцитоза в различных типах клеток.

Основными достоинствами КЛСМ является существенное увеличение контрастности изображения. Это достигается за счет применения сфокусированной подсветки в области анализа и диафрагмирования излучения в плоскости наблюдения. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1, а также обеспечивает повышение разрешения как в плоскости объекта, так и вдоль оптической оси. Путём смещения объекта относительно фокальной плоскости конфокальный микроскоп позволяет сканировать послойно объект. Очевидное преимущество такой системы в том, что нет необходимости разрезать объект на слои и фиксировать их, а это всегда ведёт к разрушению клеток объекта и изменению их характеристик [80].

Jarockyte с соавторами проводили исследования при различных методах культивирования клеток [81]. Авторы изучали накопление квантовых точек в клеточном монослое и 3D-сфероиде (сфероидальная трехмерная модель клеточной культуры). 3D-сфероиды представляют собой компактные агрегаты клеток с клеточно-матричным и межклеточным взаимодействиями. Диаметры клеточных сфероидов варьировались в диапазоне от 150–200 мкм. Несмотря на то, что было достигнуто лучшее разрешение и увеличенное проникновение света по оси z, визуализация была ограничена до 50–60 мкм, что также является хорошим результатом.

Tianfeng Chen с соавторами изучали изменения плазматической мембраны клеток меланомы человека A375 НЧ селена (44–92 нм), модифицированными полисахаридом *Undaria pinnatifida* [47]. После инкубации с НЧ селена клетки окрашивали аннексином-V-FLUOS/PI. Образцы были непосредственно проанализированы с

помощью конфокальной микроскопии. Флуоресцентные изображения показывают транслокацию фосфатидилсерина в клетках A375, подвергнутых воздействию НЧ селена в течение 24 часов.

КЛСМ чаще всего используют для визуализации поглощения НЧ селена клетками. Однако КЛСМ в сочетании с ТЭМ можно использовать и для количественного определения интернализированных НЧ в клетках [79]. Rothen-Rutishauser с соавторами для изучения интернализации НЧ золота (≈ 13 нм), покрытых полимером Поли (изобутилен-АЛТ-малеиновый ангидрид) и меченых флуоресцентным красителем в альвеолярных опухолевых клетках A549, по отношению к различным механизмам поглощения использовали КЛСМ для получения стереологической информации о клетках. Изображения КЛСМ показывают количество частиц, т. е. количество флуоресцентных пятен, соответствующих маркировке НЧ, которые, скорее всего, представляют собой заполненные эндосомы, внутри клеточной оболочки. Они применили ингибиторы для блокирования различных путей поглощения и сравнили данные о количестве НЧ золота в клетке, полученные с помощью КЛСМ, с данными, полученными на основе изображений ТЭМ. Результаты показали, что средний флуоресцентный сигнал соответствует кластеру из 150 НЧ. Был определен основной путь поглощения, это кавеол-опосредованный эндоцитоз. Основным фактором являлось то, что $\approx 95\%$ частиц локализовалось в везикулах в контроле, а также в обработанных ингибитором клетках [79].

Количественное определение наночастиц селена в клетках

В исследованиях по изучению различных НЧ селена широко применяется метод определения количества НЧ селена в клетках с применением флуоресцентного считывателя для микропланшетов или проточного цитофлуориметра [5, 6, 30, 31, 42, 44, 45, 48, 50, 53, 82]. Клетки инкубируют в течение различного времени в планшете с НЧ селена, загруженными флуоресцентным красителем кумарин-6. После чего клетки промывают трижды холодным натрий-фосфатным буфером (PBS), чтобы удалить НЧ вне клеток и лизируют раствором Тритона с гидроксидом натрия. Клеточное поглощение выражается в процентах интенсивности флуоресценции кумарина-6 в тестируемых лунках по сравнению с флуоресценцией в лунках с положительным контролем.

Концентрацию селена в клетках определяют с помощью таких аналитических методов, как масс-спектрометрия (ICP-MS) или атомно-эмиссионная спектроскопия (ICP-AES) с индуктивно-связанной плазмой [6, 42, 48].

Проточная цитофлуориметрия

Проточная цитофлуориметрия широко применяется для исследования взаимодействия НЧ селена с клетками [34, 47, 83, 84]. С помощью проточной цито-

флуориметрии определяется флуоресценция НЧ селена, обработанных флуоресцентным красителем и поглощенных клетками. Таким образом можно посчитать процентное содержание НЧ в клетках. Обработка клеток специфичными ингибиторами позволяет определить тип поглощения. Использование флуоресцентных красителей, которые способны связываться с определенными компонентами клеток, позволяет изучать механизм клеточной гибели: апоптоз, некроз, аутофагия. По состоянию клеточной культуры данным методом определяют воздействие НЧ на пролиферацию и клеточный цикл. Ранним маркером процесса апоптоза в клетках является трансмембранный потенциал митохондрий. В данном случае используются катионные красители, которые проникают через мембрану клетки и образуют агрегаты в митохондриях. Флуоресценцию таких красителей также определяют проточным цитофлуориметром.

Проточный цитофлуориметр позволяет анализировать индивидуальные клетки в суспензии. При этом суспензия клеток облучается одним или несколькими лазерами таким образом, что позволяет детектировать светорассеяние каждой клетки, в прямом и боковом направлениях. Вместе с сигналом светорассеяния детектируется сигнал флуоресценции. Несколько флуорофоров могут быть обнаружены одновременно с использованием различных фильтров и комбинаций лазеров. Проточный цитофлуориметр обеспечивает измерение до нескольких десятков тысяч клеток в секунду, при этом для каждой клетки, в зависимости от конструкции прибора, может измеряться от 5 до 14 и более параметров [85].

С помощью проточной цитофлуориметрии можно изучать поглощение НЧ селена клетками [86]. Hongyan Li с соавторами исследовали НЧ селена, стабилизированные полисахаридом 1,6- α -D-глюкан (размер $53,7 \pm 4,0$ нм). Роковые клетки шейки матки человека HeLa инкубировали с НЧ селена обработанными флуоресцентным красителем кумарином-6 в течение разного времени (1, 2, 4, 8 и 12 ч). После инкубации клетки промывали трижды PBS и измеряли интенсивность флуоресценции НЧ селена на проточном цитофлуориметре.

Изучение цитотоксического действия наночастиц селена на клетки

Клеточные культуры являются одними из самых распространенных тест-систем для определения токсичности различных препаратов, в том числе и на основе НЧ селена. Такие эксперименты имеют очевидные преимущества. Клеточные культуры являются легко доступными, при этом количество используемого вещества на порядок ниже. Методы определения токсичности НЧ на клеточных культурах основаны на определении жизнеспособности клеток [23]. Для оценки митохондриальной дыхательной активности клеток после воздействия НЧ применяется МТТ-анализ.

Определение цитотоксичности НЧ селена с помощью МТТ-анализа можно рассмотреть на примере работы Haiying Luo [83]. Авторы исследовали токсичность НЧ селена размером 133 нм на клеточных линиях рака шейки матки человека HeLa и рака молочной железы человека MDA-MB-231. Клетки инкубируются с (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромидом (МТТ), который восстанавливается клеточными ферментами и образует водонерастворимый формазан. Количество формазана коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Интенсивность окраски раствора формазана определяется с помощью спектрофотометра при длине волны 570 нм.

Недостатком такого метода является то, что нельзя определить абсолютную летальную концентрацию, поскольку какая-то часть МТТ-реагента восстанавливается внеклеточными ферментами. На практике дыхательную активность менее 10 % условно принимают за LC_{100} [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных позволяет сделать выводы об актуальности исследований взаимодействия наночастиц селена с живыми клетками. Это необходимо для определения механизмов поглощения наночастиц селена, изучения их цитотоксического и/или цитостатического действия, распределения в клетках. Исследования биологического взаимодействия наночастиц селена с опухолевыми и нормальными клетками позволит определить наиболее информативные методы регистрации и количественной оценки их противоопухолевой активности, что актуально при разработке новых лекарственных средств против рака.

ЛИТЕРАТУРА

- Agarwal V., Bajpai M., Sharma A. Patented and approval scenario of nanopharmaceuticals with relevancy to biomedical application, manufacturing procedure and safety aspects. *Recent patents on drug delivery & formulation*. 2018; 12(1): 40–52. DOI: 10.2174/1872211312666180105114644.
- Gehr P., Zellner R. Biological Responses to Nanoscale Particles. *Springer Nature Switzerland AG*. Cham, Switzerland. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12461-8>.
- Zhang J., Wang X., Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. *Toxicological sciences*. 2008; 101(1): 22–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm221>.
- Zhang J. S., Gao X. Y., Zhang L. D. et al. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*. 2001; 15(1): 27–38. DOI: 10.1002/biof.5520150103.
- Yu B., Zhang Y., Zheng W. et al. Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Inorganic chemistry*. 2012; 51(16): 8956–8963. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic301050v>.
- Xia Y., You P., Xu F. et al. Novel functionalized selenium nanoparticles for enhanced anti-hepatocarcinoma activity in vitro. *Nanoscale research letters*. 2015; 10(1): 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1051-8>.
- Bhattacharjee A., Basu A., Biswas J. et al. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017; 424(1-2): 13–33.
- Mary T. A., Shanthi K., Vimala K. et al. PEG functionalized selenium nanoparticles as a carrier of crocin to achieve anticancer synergism. *Rsc Advances*. 2016; 6(27): 22936–22949.
- Khurana A., Tekula S., Saifi M. A. et al. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 111: 802–812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>.
- Beckett G. J., Arthur J. R. Selenium and endocrine systems. *Journal of endocrinology*. 2005; 184(3): 455–465. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05971>.
- Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179(4073): 588–590. DOI: 10.1126/science.179.4073.588.
- Степанов Ю. М., Белицкий В. В., Косинская С. В. Селен как микроэлемент: характеристика и значение для человека. *Сучасна гастроентерологія*. 2012; 65(3): 91–96.
- Бирюкова Е. В. Современный взгляд на роль селена в физиологии и патологии щитовидной железы. *Эффективная фармако-терапия*. 2017; 8: 34–41.
- Guan B., Yan R., Li R. et al. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2018; 13: 7473. DOI: 10.2147/IJN.S181343.
- Jayaprakash V., Marshall J. R. Selenium and other antioxidants for chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25(4-5): 507–518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.09.006>.
- Регистр лекарственных средств России. Available at: https://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_23728.htm (accessed 22.04.2020).
- Селен. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – Женева: ВОЗ. 1989; 58: 270.
- Методические рекомендации «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации»: МР 2.3.1.2432-08 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 18 декабря 2008 г.).
- Третьяк Л. Н., Герасимов Е. М. Специфика влияния селена на организм человека и животных (применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания). *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2007: 12.
- Карпова Е. А., Демиденко О. К., Ильина О. П. К вопросу о токсичности препаратов на основе наноселена. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2014: 4.
- Храмцов А. Г., Серов А. В., Тимченко В. П. и др. Новый биологически активный препарат на основе наночастиц селена. *Вестник Северо-Кавказского федерального университета*. 2010; 4: 122–125.
- Патент RU 2392944. Препарат для лечения и профилактики нарушения обмена селена для сельскохозяйственных животных / В. А. Оробец, А. В. Серов, В. А. Беляев, И. В. Киреев, М. В. Мирошниченко; патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Ставропольский государственный аграрный университет. – Заявл. 18.09.2008; опублик. 27.06.2010.
- Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб: *Университет ИТМО*. 2019: 43.
- Jia X., Li N., Chen J. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats. *Life sciences*. 2005; 76 (17): 1989–2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.026>.
- Wang H., Zhang J., Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 42(10): 1524–1533. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013>.
- Zhang J., Wang H., Peng D. et al. Further insight into the impact of sodium selenite on selenoenzymes: high-dose selenite enhances hepatic thioredoxin reductase 1 activity as a consequence of liver injury. *Toxicology letters*. 2008; 176(3): 223–229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.12.002>.
- Kong L., Yuan Q., Zhu H. et al. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(27): 6515–6522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.032>.

28. Tran P. A., Webster T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International journal of nanomedicine*. 2011; 6: 1553. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
29. Wang H., Wei W., Zhang S. Y. et al. Melatonin-selenium nanoparticles inhibit oxidative stress and protect against hepatic injury induced by *Bacillus Calmette–Guérin*/lipopolysaccharide in mice. *Journal of pineal research*. 2005; 39(2): 156–163. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00231.x>.
30. Li Y., Li X., Wong Y. S. et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(34): 9068–9076. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.001>.
31. Huang Y., He L., Liu W. et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34(29): 7106–7116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.067>.
32. Kumar G. S., Kulkarni A., Khurana A. et al. Selenium nanoparticles involve HSP-70 and SIRT1 in preventing the progression of type 1 diabetic nephropathy. *Chemico-biological interactions*. 2014; 223: 125–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.017>.
33. Huang B., Zhang J., Hou J. et al. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35(7): 805–813. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00428-3).
34. Nasrolahi Shirazi A., Tiwari R. K., Oh D. et al. Cyclic peptide–selenium nanoparticles as drug transporters. *Molecular pharmaceutics*. 2014; 11(10): 3631–3641. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp500364a>.
35. Loeschner K., Hadrup N., Hansen M. et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics*. 2014; 6(2): 330–337. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3MT00309D>.
36. Pi J., Jin H., Liu R. et al. Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013; 97(3): 1051–1062.
37. Gao F., Yuan Q., Gao L. et al. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(31): 8854–8866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.004>.
38. Cui D., Liang T., Sun L. et al. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharmaceutical Biology*. 2018; 56(1): 528–534. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1510974>.
39. Khan S., Ullah M. W., Siddique R. et al. Catechins-modified selenium-doped hydroxyapatite nanomaterials for improved osteosarcoma therapy through generation of reactive oxygen species. *Frontiers in oncology*. 2019; 9: 499. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00499>.
40. Wang Y., Wang J., Hao H. et al. *In vitro* and *in vivo* mechanism of bone tumor inhibition by selenium-doped bone mineral nanoparticles. *ACS nano*. 2016; 10(11): 9927–9937. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03835>.
41. Yazdi M. H., Mahdavi M., Faghfuri E. et al. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model. *Iranian journal of biotechnology*. 2015; 13(2): 1. DOI: 10.15171/ijb.1056.
42. Zhang Y., Li X., Huang Z. et al. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013; 9(1): 74–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.002>.
43. Trickler W. J., Lantz S. M., Schrand A. M. et al. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine*. 2012; 7(6): 835–846. DOI: 10.2217/nnm.11.154.
44. Wu H., Li X., Liu W. et al. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides–protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. *Journal of Materials Chemistry*. 2012; 22(19): 9602–9610. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2JM16828F>.
45. Jiang W., Fu Y., Yang F. et al. *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy. *ACS applied materials & interfaces*. 2014; 6(16): 13738–13748. DOI: <https://doi.org/10.1021/am5031962>.
46. Wu H., Zhu H., Li X. et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung adenocarcinoma cells by surface-capping selenium nanoparticles: an effect enhanced by polysaccharide–protein complexes from *Polyporus rhinoceros*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(41): 9859–9866. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf403564s>.
47. Chen T., Wong Y. S., Zheng W. et al. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2008; 67(1): 26–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.010>.
48. Zheng J. S., Zheng S. Y., Zhang Y. B. et al. Sialic acid surface decoration enhances cellular uptake and apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 83(1): 183–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.023>.
49. Kumari M., Ray L., Purohit M. P. et al. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017; 117: 346–362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.05.003>.
50. Feng Y., Su J., Zhao Z. et al. Differential effects of amino acid surface decoration on the anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Dalton Transactions*. 2014; 43(4): 1854–1861. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3DT52468J>.
51. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. The effects of luminescent ruthenium (II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling. *Biomaterials*. 2013; 34(1): 171–180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.031>.
52. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. Inhibition of tumor growth and vasculature and fluorescence imaging using functionalized ruthenium-thiol protected selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(5): 1572–1583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.007>.
53. Zheng S., Li X., Zhang Y. et al. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction. *International journal of nanomedicine*. 2012; 7: 3939. DOI: 10.2147/IJN.S30940.
54. Li Y., Li X., Zheng W. et al. Functionalized selenium nanoparticles with nephroprotective activity, the important roles of ROS-mediated signaling pathways. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013; 1(46): 6365–6372. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3TB21168A>.
55. Староверов С. А., Дыкман Л. А., Меженный П. В. и др. Получение наночастиц селена с использованием силимарина и изучение их цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам. *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52(6): 1206–1213. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.6.1206rus.
56. Quintana M., Haro-Poniatowski E., Morales J. et al. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation. *Applied surface science*. 2002; 195(1-4): 175–186. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00549-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00549-4).
57. Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E. et al. Anti-bacterial selenium nanoparticles produced by UV/VIS/NIR pulsed nanosecond laser ablation in liquids. *Laser Physics Letters*. 2014; 12(1): 016003. DOI: 10.1088/1612-2011/12/1/016003.
58. Hou J. Y., Ai S. Y., Shi W. J. Preparation and characterization of nano-Se/silk fibroin colloids. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2011; 27(1): 158–160.
59. Panahi-Kalamuei M., Salavati-Niasari M., Hosseini-pour-Mashkani S. M. Facile microwave synthesis, characterization, and solar cell application of selenium nanoparticles. *Journal of alloys and compounds*. 2014; 617: 627–632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.07.174>.
60. Petros R. A., DeSimone J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(8): 615–627. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
61. Dhand C., Dwivedi N., Loh X. J. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *Rsc Advances*. 2015; 5(127): 105003–105037. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>.
62. Chen W., Li Y., Yang S. et al. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2015; 132: 574–581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.064>.

63. Zhang C., Zhai X., Zhao G. et al. Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *Carbohydrate polymers*. 2015; 134: 158–166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.065>.
64. Yin T., Yang L., Liu Y. et al. Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood–brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Acta biomaterialia*. 2015; 25: 172–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.035>.
65. Bartůněk V., Junková J., Šuman J. et al. Preparation of amorphous antimicrobial selenium nanoparticles stabilized by odor suppressing surfactant polysorbate 20. *Materials Letters*. 2015; 152: 207–209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.092>.
66. Liu T., Zeng L., Jiang W. et al. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015; 11(4): 947–958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.009>.
67. Dwivedi C., Shah C.P., Singh K. et al. An organic acid-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/651971>.
68. Kumar S., Tomar M. S., Acharya A. Carboxylic group-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its anti-tumor potential on Dalton's lymphoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015; 126: 546–552. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.009>.
69. Questera K., Avalos-Borjab M., Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. 2013; 54: 1–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>.
70. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zoogaea ramigera*. *Powder technology*. 2013; 244: 26–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.050>.
71. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles using *Gliocladium roseum*. *Journal of Cluster Science*. 2015; 26(5): 1473–1482. DOI: 10.1007/s10876-014-0833-y.
72. Visha P., Nanjappan K., Selvaraj P. et al. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles using *Lactobacillus Acidophilus* bacteria by wet sterilization process. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology*. 2015; 4(1): 178–183. DOI: 10.23953/cloud.ijavst.183.
73. Dhanjal S., Cameotra S. S. Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial cell factories*. 2010; 9: 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-52>.
74. Prasad K. S., Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biological trace element research*. 2014; 157(3): 275–283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9891-0>.
75. Reifarth M., Hoeppener S., Schubert U. S. Uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles in mammalian cells: capabilities and limitations of transmission electron microscopy-polymer-based nanoparticles. *Advanced Materials*. 2018; 30(9): 1703704. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201703704>.
76. Song X., Chen Y., Zhao G., Sun H., Che H., & Leng, X. Effect of molecular weight of chitosan and its oligosaccharides on antitumor activities of chitosan-selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2020; 231: 115689. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115689>.
77. De Jonge N., Peckys D. B. Live cell electron microscopy is probably impossible. *ACS nano*. 2016; 10(10): 9061–9063. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02809>.
78. Rosman C., Pierrat S., Henkel A. et al. A new approach to assess gold nanoparticle uptake by mammalian cells: combining optical dark-field and transmission electron microscopy. *Small*. 2012; 8(23): 3683–3690. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.201200853>.
79. Rothen-Rutishauser B., Kuhn D. A., Ali Z. et al. Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. *Nanomedicine*. 2014; 9(5): 607–621. DOI: 10.2217/nnm.13.24.
80. Лазерная конфокальная микроскопия. Методические указания / Сост. Тимченко П. Е., Тимченко Е. В. Самара: Изд-во Самарского государственного аэрокосмического университета имени академика С. П. Королёва. 2014: 76.
81. Jarockyte G., Dapkute D., Karabanovas V. et al. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2018; 1862(4): 914–923. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.014>.
82. Luesakul U., Puthong S., Neamati N., Muangsins N. pH-responsive selenium nanoparticles stabilized by folate-chitosan delivering doxorubicin for overcoming drug-resistant cancer cells. *Carbohydrate polymers*. 2018; 181: 841–850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.068>.
83. Luo H., Wang F., Bai Y., Chen T., Zheng W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 94: 304–308. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.006>.
84. Wang X., Sun K., Tan Y., Wu S., Zhang J. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 72: 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.003>.
85. Проточная цитофлуориметрия. Учебно-методическое пособие / Сост. Балалаева И. В. Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. 2014: 75.
86. Li H., Liu D., Li S., Xue C. Synthesis and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by α-D-glucan from *Castanea mollissima* Blume. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 129: 818–826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.085>.

REFERENCE

1. Agarwal V., Bajpai M., Sharma A. Patented and approval scenario of nanopharmaceuticals with relevancy to biomedical application, manufacturing procedure and safety aspects. *Recent patents on drug delivery & formulation*. 2018; 12(1): 40–52. DOI: 10.2174/1872211312666180105114644.
2. Gehr P., Zellner R. Biological Responses to Nanoscale Particles. *Springer Nature Switzerland AG*. Cham, Switzerland. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12461-8>.
3. Zhang J., Wang X., Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. *Toxicological sciences*. 2008; 101(1): 22–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm221>.
4. Zhang J. S., Gao X. Y., Zhang L. D. et al. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*. 2001; 15(1): 27–38. DOI: 10.1002/biof.5520150103.
5. Yu B., Zhang Y., Zheng W. et al. Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Inorganic chemistry*. 2012; 51(16): 8956–8963. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic301050v>.
6. Xia Y., You P., Xu F. et al. Novel functionalized selenium nanoparticles for enhanced anti-hepatocarcinoma activity in vitro. *Nanoscale research letters*. 2015; 10(1): 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1051-8>.
7. Bhattacharjee A., Basu A., Biswas J. et al. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017; 424(1–2): 13–33.
8. Mary T. A., Shanthi K., Vimala K. et al. PEG functionalized selenium nanoparticles as a carrier of crocin to achieve anticancer synergism. *Rsc Advances*. 2016; 6(27): 22936–22949.
9. Khurana A., Tekula S., Saifi M. A. et al. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 111: 802–812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>.
10. Beckett G. J., Arthur J. R. Selenium and endocrine systems. *Journal of endocrinology*. 2005; 184(3): 455–465. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05971>.
11. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179(4073): 588–590. DOI: 10.1126/science.179.4073.588.
12. Stepanov Yu. M., Belitskiy V. V., Kosinskaya S. V. Selenium as a trace element: characteristics and importance for a human. *Modern gastroenterology*. 2012; 65(3): 91–96. (in Ukraine).

13. Biryukova Ye. V. A Contemporary View on a Role Played by Selenium in Physiology and Pathology of the Thyroid Gland. *Effective Pharmacotherapy*. 2017; 8: 34–41. (in Russ.).
14. Guan B., Yan R., Li R. et al. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2018; 13: 7473. DOI: 10.2147/IJN.S181343.
15. Jayaprakash V., Marshall J. R. Selenium and other antioxidants for chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25(4-5): 507–518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.09.006>.
16. Register of medicines of Russia. Available at: https://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_23728.htm (accessed 22.04.2020). (in Russ.).
17. Selenium. Hygienic criteria for the state of the environment. – Geneva: WHO. 1989; 58: 270. (in Russ.).
18. Methodological recommendations «Norms of physiological needs in energy and food substances for various groups of the population of the Russian Federation»: MP 2.3.1.2432-08 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 18 dekabrja 2008 g.). (in Russ.).
19. Tretyak L. N., Gerasimov E. M. Specificity of the effect of selenium on the human body and animals (in relation to the problem of creating selenium-containing foods). *Bulletin of the Orenburg State University*. 2007; 12. (in Russ.).
20. Karpova E. A., Demidenko O. K., Ilina O. P. The question of the toxicity of drugs on the basis of nanoselenium. *The Bulletin of KrasGAU*. 2014; 4. (in Russ.).
21. Hramcov A. G., Serov A. V., Timchenko V. P. et al. New biologically active preparation on the basis of selenium nanoparticles. *Newsletter of North-Caucasus federal university*. 2010; 4: 122–125. (in Russ.).
22. Patent RU 2392944. Preparation for the treatment and prevention of selenium metabolism disorders for farm animals / V. A. Orobec, A. V. Serov, V. A. Beljaev, I. V. Kireev, M. V. Miroshnichenko; Patent holder Federal State Educational Institution of Higher Professional Education Stavropol State Agrarian University. – Appl. 18.09.2008; publ. 27.06.2010. (in Russ.).
23. Prilepskiy A. Ju., Drozdov A. S., Bogatyrev V. A., Staroverov S. A. Methods of working with cell cultures and determining the toxicity of nanomaterials. St.-Petersburg: ITMO University. 2019; 43. (in Russ.).
24. Jia X., Li N., Chen J. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats. *Life sciences*. 2005; 76 (17): 1989–2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.026>.
25. Wang H., Zhang J., Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 42(10): 1524–1533. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013>.
26. Zhang J., Wang H., Peng D. et al. Further insight into the impact of sodium selenite on selenoenzymes: high-dose selenite enhances hepatic thioredoxin reductase 1 activity as a consequence of liver injury. *Toxicology letters*. 2008; 176(3): 223–229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.12.002>.
27. Kong L., Yuan Q., Zhu H. et al. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(27): 6515–6522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.032>.
28. Tran P. A., Webster T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International journal of nanomedicine*. 2011; 6: 1553. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
29. Wang H., Wei W., Zhang S. Y. et al. Melatonin-selenium nanoparticles inhibit oxidative stress and protect against hepatic injury induced by *Bacillus Calmette–Guérin*/lipopolysaccharide in mice. *Journal of pineal research*. 2005; 39(2): 156–163. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00231.x>.
30. Li Y., Li X., Wong Y. S. et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(34): 9068–9076. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.001>.
31. Huang Y., He L., Liu W. et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34(29): 7106–7116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.067>.
32. Kumar G. S., Kulkarni A., Khurana A. et al. Selenium nanoparticles involve HSP-70 and SIRT1 in preventing the progression of type 1 diabetic nephropathy. *Chemico-biological interactions*. 2014; 223: 125–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.017>.
33. Huang B., Zhang J., Hou J. et al. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35(7): 805–813. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00428-3).
34. Nasrolahi Shirazi A., Tiwari R. K., Oh D. et al. Cyclic peptide–selenium nanoparticles as drug transporters. *Molecular pharmaceutics*. 2014; 11(10): 3631–3641. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp500364a>.
35. Loeschner K., Hadrup N., Hansen M. et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics*. 2014; 6(2): 330–337. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3MT00309D>.
36. Pi J., Jin H., Liu R. et al. Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013; 97(3): 1051–1062.
37. Gao F., Yuan Q., Gao L. et al. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(31): 8854–8866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.004>.
38. Cui D., Liang T., Sun L. et al. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharmaceutical Biology*. 2018; 56(1): 528–534. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1510974>.
39. Khan S., Ullah M. W., Siddique R. et al. Catechins-modified selenium-doped hydroxyapatite nanomaterials for improved osteosarcoma therapy through generation of reactive oxygen species. *Frontiers in oncology*. 2019; 9: 499. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00499>.
40. Wang Y., Wang J., Hao H. et al. *In vitro* and *in vivo* mechanism of bone tumor inhibition by selenium-doped bone mineral nanoparticles. *ACS nano*. 2016; 10(11): 9927–9937. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03835>.
41. Yazdi M. H., Mahdavi M., Faghfuri E. et al. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model. *Iranian journal of biotechnology*. 2015; 13(2): 1. DOI: 10.15171/ijb.1056.
42. Zhang Y., Li X., Huang Z. et al. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013; 9(1): 74–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.002>.
43. Trickler W. J., Lantz S. M., Schrand A. M. et al. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine*. 2012; 7(6): 835–846. DOI: 10.2217/nnm.11.154.
44. Wu H., Li X., Liu W. et al. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides–protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. *Journal of Materials Chemistry*. 2012; 22(19): 9602–9610. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2JM16828F>.
45. Jiang W., Fu Y., Yang F. et al. Gracilaria lemaneiformis polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy. *ACS applied materials & interfaces*. 2014; 6(16): 13738–13748. DOI: <https://doi.org/10.1021/am5031962>.
46. Wu H., Zhu H., Li X. et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung adenocarcinoma cells by surface-capping selenium nanoparticles: an effect enhanced by polysaccharide–protein complexes from *Polyporus rhinoceros*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(41): 9859–9866. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf403564s>.
47. Chen T., Wong Y. S., Zheng W. et al. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2008; 67(1): 26–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.010>.
48. Zheng J. S., Zheng S. Y., Zhang Y. B. et al. Sialic acid surface decoration enhances cellular uptake and apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 83(1): 183–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.023>.
49. Kumari M., Ray L., Purohit M. P. et al. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017; 117: 346–362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.05.003>.

50. Feng Y., Su J., Zhao Z. et al. Differential effects of amino acid surface decoration on the anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Dalton Transactions*. 2014; 43(4): 1854–1861. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3DT52468J>.
51. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. The effects of luminescent ruthenium (II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling. *Biomaterials*. 2013; 34(1): 171–180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.031>.
52. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. Inhibition of tumor growth and vasculature and fluorescence imaging using functionalized ruthenium-thiol protected selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(5): 1572–1583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.007>.
53. Zheng S., Li X., Zhang Y. et al. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction. *International journal of nanomedicine*. 2012; 7: 3939. DOI: 10.2147/IJN.S30940.
54. Li Y., Li X., Zheng W. et al. Functionalized selenium nanoparticles with nephroprotective activity, the important roles of ROS-mediated signaling pathways. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013; 1(46): 6365–6372. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3TB21168A>.
55. Staroverov S. A., Dykman L. A., Mezhenyi P. V. et al. Preparation of selenium nanoparticles by using silymarin and study of their cytotoxicity to tumor cells. *Agricultural Biology*. 2017; 52(6): 1206–1213. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.6.1206rus (in Russ.).
56. Quintana M., Haro-Poniatowski E., Morales J. et al. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation. *Applied surface science*. 2002; 195(1-4): 175–186. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00549-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00549-4).
57. Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E. et al. Anti-bacterial selenium nanoparticles produced by UV/VIS/NIR pulsed nanosecond laser ablation in liquids. *Laser Physics Letters*. 2014; 12(1): 016003. DOI: 10.1088/1612-2011/12/1/016003.
58. Hou J. Y., Ai S. Y., Shi W. J. Preparation and characterization of nano-Se/silk fibroin colloids. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2011; 27(1): 158–160.
59. Panahi-Kalamuei M., Salavati-Niasari M., Hosseinpour-Mashkani S. M. Facile microwave synthesis, characterization, and solar cell application of selenium nanoparticles. *Journal of alloys and compounds*. 2014; 617: 627–632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.07.174>.
60. Petros R. A., DeSimone J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(8): 615–627. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
61. Dhand C., Dwivedi N., Loh X. J. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *Rsc Advances*. 2015; 5(127): 105003–105037. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>.
62. Chen W., Li Y., Yang S. et al. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2015; 132: 574–581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.064>.
63. Zhang C., Zhai X., Zhao G. et al. Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *Carbohydrate polymers*. 2015; 134: 158–166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.065>.
64. Yin T., Yang L., Liu Y. et al. Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood–brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Acta biomaterialia*. 2015; 25: 172–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.035>.
65. Bartůňek V., Junková J., Šuman J. et al. Preparation of amorphous antimicrobial selenium nanoparticles stabilized by odor suppressing surfactant polysorbate 20. *Materials Letters*. 2015; 152: 207–209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.092>.
66. Liu T., Zeng L., Jiang W. et al. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015; 11(4): 947–958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.009>.
67. Dwivedi C., Shah C.P., Singh K. et al. An organic acid-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/651971>.
68. Kumar S., Tomar M. S., Acharya A. Carboxylic group-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its anti-tumor potential on Dalton's lymphoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015; 126: 546–552. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.009>.
69. Questera K., Avalos-Borjab M., Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. 2013; 54: 1–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>.
70. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powder technology*. 2013; 244: 26–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.050>.
71. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles using *Gliocladium roseum*. *Journal of Cluster Science*. 2015; 26(5): 1473–1482. DOI: 10.1007/s10876-014-0833-y.
72. Visha P., Nanjappan K., Selvaraj P. et al. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles using *Lactobacillus Acidophilus* bacteria by wet sterilization process. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology*. 2015; 4(1): 178–183. DOI: 10.23953/cloud.ijavst.183.
73. Dhanjal S., Cameotra S. S. Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial cell factories*. 2010; 9: 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-52>.
74. Prasad K. S., Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biological trace element research*. 2014; 157(3): 275–283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9891-0>.
75. Reifarth M., Hoepfner S., Schubert U. S. Uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles in mammalian cells: capabilities and limitations of transmission electron microscopy-polymer-based nanoparticles. *Advanced Materials*. 2018; 30(9): 1703704. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201703704>.
76. Song X., Chen Y., Zhao G., Sun H., Che H., & Leng, X. Effect of molecular weight of chitosan and its oligosaccharides on antitumor activities of chitosan-selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2020; 231: 115689. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115689>.
77. De Jonge N., Peckys D. B. Live cell electron microscopy is probably impossible. *ACS nano*. 2016; 10(10): 9061–9063. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02809>.
78. Rosman C., Pierrat S., Henkel A. et al. A new approach to assess gold nanoparticle uptake by mammalian cells: combining optical dark-field and transmission electron microscopy. *Small*. 2012; 8(23): 3683–3690. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.201200853>.
79. Rothen-Rutishauser B., Kuhn D. A., Ali Z. et al. Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. *Nanomedicine*. 2014; 9(5): 607–621. DOI: 10.2217/nnm.13.24.
80. Laser confocal microscopy. Guidelines / Comp. Timchenko P. E., Timchenko E. V. Samara: Publishing House Mar State Aerospace University named after academician S. P. Korolev. 2014: 76. (in Russ.).
81. Jarockyte G., Dapkute D., Karabanovas V. et al. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2018; 1862(4): 914–923. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.014>.
82. Luesakul U., Puthong S., Neamati N., Muangsinn N. pH-responsive selenium nanoparticles stabilized by folate-chitosan delivering doxorubicin for overcoming drug-resistant cancer cells. *Carbohydrate polymers*. 2018; 181: 841–850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.068>.
83. Luo H., Wang F., Bai Y., Chen T., Zheng W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 94: 304–308. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.006>.
84. Wang X., Sun K., Tan Y., Wu S., Zhang J. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 72: 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.003>.
85. Flow cytometry. Educational and methodological guide / Comp. Balalaeva I. V. Nizhny Novgorod: Publishing House of the Nizhny Novgorod State University. N. I. Lobachevsky 2014: 75. (in Russ.).
86. Li H., Liu D., Li S., Xue C. Synthesis and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by α -D-glucan from *Castanea mollissima* Blume. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 129: 818–826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.085>.