

УДК 616.348-006.66-085.277.3:546.59

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ112525>

## Оценка цитотоксичности гликонаночастиц золота на клетках аденокарциномы ободочной кишки человека

И. В. Черных<sup>1</sup>, М. А. Копаница<sup>1</sup>✉, А. В. Щулькин<sup>1</sup>, Е. Н. Якушева<sup>1</sup>, А. Ю. Ершов<sup>2</sup>,  
А. А. Мартыненко<sup>2</sup>, И. В. Лагода<sup>3</sup>, А. М. Волкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

### АННОТАЦИЯ

**Введение.** Перспективным направлением онкотерапии является использование наночастиц металлов.

**Цель.** Оценить цитотоксичность наночастиц золота (НЧЗ), модифицированных остатками фукозы, лактозы и галактозы, на клетках *Caco-2*.

**Материалы и методы.** Клетки культивировали до монослоя с НЧЗ в концентрациях 10–600 мкг/мл для частиц с фукозой, 10–900 мкг/мл для частиц с лактозой и 10–550 мкг/мл для частиц с галактозой. В качестве неопухолевых использовали клетки *Caco-2* после дифференцировки в тонкокишечные энтероциты (инкубация — 21 сут). Цитотоксичность НЧЗ оценивалась МТТ-тестом после инкубации с клетками в течение 2 ч, 8 ч и 24 ч. В качестве препарата сравнения использовался фторурацил в концентрациях 50–2000 мкг/мл. Концентрацию полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism 8.4.3.

**Результаты.**  $IC_{50}$  для НЧЗ с фукозой по отношению к опухолевым клеткам составила  $582 \pm 29$  и  $336 \pm 36$  мкг/мл после 2 и 8 ч инкубации соответственно; для НЧЗ с лактозой —  $769 \pm 50$  и  $515 \pm 45$  мкг/мл, для НЧЗ с галактозой —  $467 \pm 299$  и  $299 \pm 28$  мкг/мл. В отношении дифференцированных клеток  $IC_{50}$  для всех типов НЧЗ была выше, чем для опухолевых клеток при 2 ч и 8 ч инкубации: для частиц с фукозой —  $530 \pm 3$  и  $410 \pm 15$  мкг/мл; для частиц с лактозой —  $831 \pm 7$  и  $639 \pm 14$  мкг/мл; для частиц с галактозой —  $511 \pm 21$  ( $p = 0,018$ ) и  $376 \pm 36$  мкг/мл соответственно. При 24-часовой инкубации клеток *Caco-2* с НЧЗ фукозой  $IC_{50}$  по отношению к опухолевой и дифференцированной их разновидностям не отличалась. В случае остальных НЧЗ  $IC_{50}$  по отношению к опухолевым клеткам превосходила данный параметр для дифференцированных клеток. Фторурацил проявил цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам с  $IC_{50}$   $2108 \pm 19$  и  $1764 \pm 193$  мкг/мл при 2 ч и 8 ч инкубации соответственно. По отношению к дифференцированным клеткам его  $IC_{50}$  составляла  $1995 \pm 20$  мкг/мл после 2 ч инкубации и  $1694 \pm 102$  мкг/мл при 8 ч инкубации. Различий между  $IC_{50}$  фторурацила по отношению к дифференцированным и опухолевым клеткам с равной длительностью инкубации не наблюдалось.

**Заключение.** НЧЗ с фукозой, лактозой и галактозой оказывают цитотоксическое действие на клетки аденокарциномы ободочной кишки человека, превосходя по активности фторурацил.

**Ключевые слова:** гликонаночастицы золота; аденокарцинома ободочной кишки человека; *Caco-2*; фторурацил; МТТ-тест

### Для цитирования:

Черных И.В., Копаница М.А., Щулькин А.В., Якушева Е.Н., Ершов А.Ю., Мартыненко А.А., Лагода И.В., Волкова А.М. Оценка цитотоксичности гликонаночастиц золота на клетках аденокарциномы ободочной кишки человека // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2023. Т. 31, № 2. С. 255–264. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ112525>

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ112525>

# Evaluation of Cytotoxicity of Gold Glyconanoparticles of Human Colon Adenocarcinoma Cells

Ivan V. Chernykh<sup>1</sup>, Mariya A. Kopanitsa<sup>1</sup>✉, Aleksey V. Shchul'kin<sup>1</sup>, Elena N. Yakusheva<sup>1</sup>, Andrey Yu. Ershov<sup>2</sup>, Aleksandr A. Martynenkov<sup>2</sup>, Igor' V. Lagoda<sup>3</sup>, Aleksandra M. Volkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation;

<sup>3</sup>State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine, Saint-Petersburg, Russian Federation

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Use of metal nanoparticles is a promising trend in oncotherapy.

**AIM:** To evaluate cytotoxicity of gold nanoparticles (GNPs) modified with fucose, lactose and galactose residues, on *Caco-2* cells.

**MATERIALS AND METHODS:** Cells were cultured to a monolayer with GHPs in concentrations of 10 µg/ml–600 µg/ml for particles with fucose, 10 µg/ml–900 µg/ml for particles with lactose and 10 µg/ml–550 µg/ml for particles with galactose. As non-tumor cells, *Caco-2* cells were used after differentiation into small-intestine enterocytes (incubation time — 21 days). The cytotoxicity of GNPs was evaluated in MTT-test after incubation with cells for 2 hours, 8 hours and 24 hours. A comparison drug was fluorouracil in concentrations of 50 µg/ml–2000 µg/ml. The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated in GraphPad Prism 8.4.3 program.

**RESULTS:** IC<sub>50</sub> for GNPs with fucose for tumor cells was 582 ± 29 and 336 ± 36 µg/ml after incubation for 2 hours and 8 hours, respectively; for GNPs with lactose — 769 ± 50 and 515 ± 45 µg/ml, for GNPs with galactose — 467 ± 299 and 299 ± 28 µg/ml. For differentiated cells, IC<sub>50</sub> for all types of GNPs was higher than for tumor cells after incubation for 2 and 8 hours: for particles with fucose — 530 ± 3 and 410 ± 15 µg/ml; for particles with lactose — 831 ± 7 and 639 ± 14 µg/ml; for particles with galactose — 511 ± 21 (p = 0.018) and 376 ± 36 µg/ml, respectively. After 24-hour incubation of *Caco-2* cells with fucose, IC<sub>50</sub> did not differ for tumor and differentiated varieties. For other GNPs, IC<sub>50</sub> for tumor cells was higher than for differentiated cells. Fluorouracil showed cytotoxicity for tumor cells with IC<sub>50</sub> 2108 ± 19 and 1764 ± 193 µg/ml after 2 hours and 8 hours of incubation, respectively. For differentiated cells, IC<sub>50</sub> of fluorouracil was 1694 ± 102 µg/ml after 2-hour incubation and 1694 ± 102 µg/ml after 8-hour incubation. There were no differences between IC<sub>50</sub> of fluorouracil for differentiated and tumor cells with equal incubation time.

**CONCLUSION:** GNPs with fucose, lactose and galactose have a cytotoxic effect on human colon adenocarcinoma cells and in the activity are superior to fluorouracil.

**Keywords:** gold glyconanoparticles; human colon adenocarcinoma cells; *Caco-2*; fluorouracil; MTT-test

## For citation:

Chernykh IV, Kopanitsa MA, Shchul'kin AV, Yakusheva EN, Ershov AY, Martynenkov AA, Lagoda IV, Volkova AM. Evaluation of Cytotoxicity of Gold Glyconanoparticles of Human Colon Adenocarcinoma Cells. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2023;31(2):255–264. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ112525>

Received: 11.11.2022

Accepted: 10.04.2023

Published: 30.06.2023

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НЧЗ — наночастицы золота

ГНЧЗ — гликонаночастицы золота

IC<sub>50</sub> — 50% inhibitory concentration (концентрация полумаксимального ингибирования)

Au-Fuc-MNH — aurum-fucose-mercaptohexanoylhydrazide (золото-фукоза-меркаптогексаноилгидразид)

Au-Lac-MPH — aurum-lactose-mercapto-propanoylhydrazide (золото-лактоза-меркаптопропаноилгидразид)

Au-Gal-MPH — aurum-galactose-mercapto-propanoylhydrazide (золото-галактоза-меркаптопропаноилгидразид)

МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий

## ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются второй по частоте причиной смертности в мире после сердечно-сосудистой патологии и составляют более 15% в структуре общей смертности [1]. В настоящее время реализуется Национальная стратегия по борьбе с онкологическими заболеваниями на долгосрочный (до 2030 г.) период, приоритетным направлением которой является 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].

Наиболее распространенными формами онкологических заболеваний являются опухоли легких и груди (8,09 млн смертей в 2018 г.), колоректальные опухоли (1,8 млн), опухоли предстательной железы (1,28 млн), кожи (1,04 млн) и желудка (1,03 млн), требующие своих способов лечения: хирургического, радио- и фармакотерапии [2].

Одним из перспективных направлений противоопухолевой лекарственной терапии, а также таргетной доставки химиопрепаратов является использование наночастиц благородных металлов, благодаря наличию у них комплекса специфических оптических и электрических свойств, развитой поверхности и возможности ее модификации прежде всего путем введения заместителей посредством тиольной группы, имеющей высокое сродство к металлам [3–5].

Для использования НЧЗ *in vivo* на экспериментальных моделях опухолей необходимо проанализировать цитотоксичность тестируемых веществ на культурах нормальных и опухолевых клеток *in vitro* с целью установления концентраций и длительности инкубации, при которых они являются более токсичными по отношению именно к мальформированным клеткам.

**Цель** — оценить цитотоксичность растворов наночастиц золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, на культуре клеток аденокарциномы ободочной кишки человека *Caco-2*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали следующие водные коллоидные растворы модифицированных НЧЗ

с диаметром 18–21 нм [7], синтезированные в лаборатории полимерных наноматериалов и композиций для оптических сред Института высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург, Россия):

1) золото-фукоза-меркаптогексаноилгидразид (Au-Fuc-MNH) (1 мг/мл);

2) золото-лактоза-меркаптопропаноилгидразид (Au-Lac-MPH) (2 мг/мл);

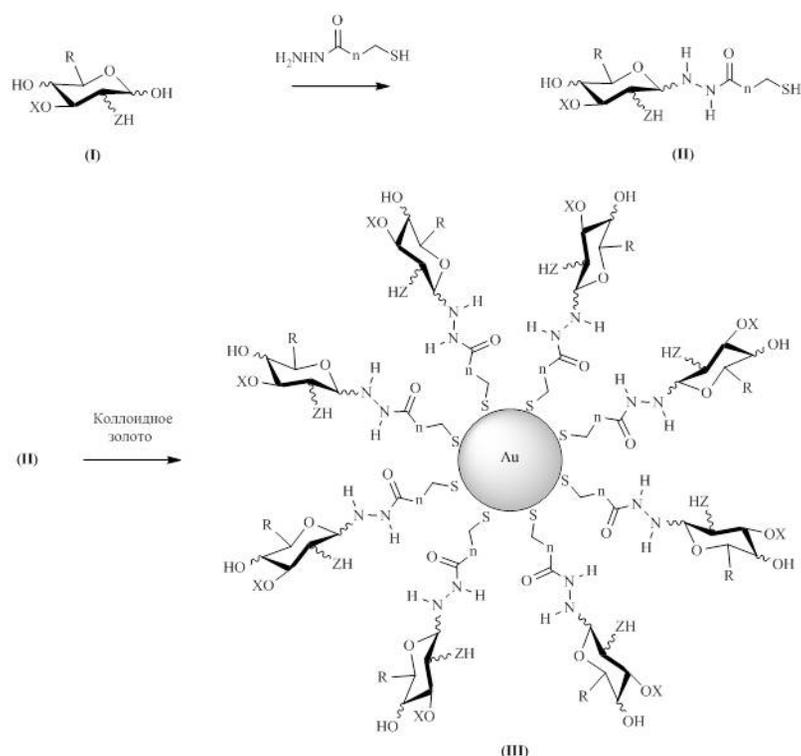
3) золото-галактоза-меркаптопропаноилгидразид (Au-Gal-MPH) (1 мг/мл).

Синтез гликонаночастиц золота (ГНЧЗ) (III) включал две стадии: взаимодействие природных моно- и дисахаридов (I) с гидразидами 3-меркаптопропионовой или 6-меркаптогексановой кислот и модификация коллоидного золота продуктами конденсации (II), полученными на первой стадии процесса (рис. 1) [6, 7].

Для приготовления рабочих растворов ГНЧЗ маточные растворы разбавляли средой для культивирования клеток до конечных концентраций 10–600 мкг/мл для частиц, модифицированных остатками фукозы (10, 25, 50, 100, 200, 400, 450, 475, 500, 550, 600 мкг/мл), 10–900 мкг/мл для частиц, покрытых остатками лактозы (10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 650, 700, 750, 850, 900 мкг/мл), и 10–550 мкг/мл для частиц, модифицированных остатками галактозы (10, 25, 50, 100, 200, 400, 450, 475, 500, 550 мкг/мл). Сроки инкубации веществ с клетками составили 2 ч, 8 ч и 24 ч.

В качестве препарата сравнения использовали фторурацил (стандартный фармакопейный образец Nantong Jinghua Pharmaceutical Co., Ltd.), который рекомендован для адъювантной терапии колоректальных опухолей [8], в концентрациях 50–2000 мкг/мл (50, 200, 600, 800, 1000, 1500, 2000 мкг/мл). Продолжительность его инкубации с клетками — 2 ч и 8 ч в связи с продемонстрированной в данной работе более высокой цитотоксичностью ГНЧЗ по отношению к опухолевым клеткам именно при указанных сроках.

Исследование цитотоксичности ГНЧЗ и фторурацила выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека — *Caco-2* (Центр коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO<sub>2</sub> в инкубаторе WS-189C (WorldScience, Корея) в Дульбекко



**Рис. 1.** Схематичное изображение синтеза гликонаночастицы золота [6, 7].

*Примечания:* X — атом водорода или фрагмент D-галактозы, Z — атом кислорода, R — метильная или гидроксиметильная группа, n — 1-тиопропаноильная группа или 4-тиогексаноильная группа; I — природные моно- и дисахариды, II — продукт конденсации, III — гликонано частицы золота.

модифицированной среде Игла с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 15% бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все компоненты Sigma-Aldrich, Германия) соответственно. После достижения 80%-го монослоя клетки снимали с фласка добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Германия) и высевали в 96-луночный планшет (Corning, США) в количестве 10<sup>4</sup> клеток на лунку. Далее клетки культивировали в течение 48 ч после достижения монослоя (культура опухолевых клеток — аденокарциномы ободочной кишки человека — первая серия) или 21 сут после образования монослоя (культура клеток, подобная эпителиоцитам тонкого кишечника человека — дифференцированные клетки — вторая серия [9]). Смену питательной среды производили ежедневно.

Цитотоксичность (влияние на интенсивность клеточного метаболизма) растворов ГНЧЗ и фторурацила оценивали в ходе МТТ-теста. Растворы тестируемых веществ описанных концентраций в среде инкубации добавляли в лунки с клетками первой и второй серий на 2 ч, 8 ч и 24 ч. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5%-го изотонического

раствора бромиды 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ; Sigma, США) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия). Оптическую плотность растворов измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 (Awareness Technology, США) с дифференциальным фильтром на 620 нм.

Цитотоксичность рассчитывали по формуле:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП blank}) / (\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП blank}) \times 100\%}{}$$

где ОП — оптическая плотность, blank — лунка без клеток, контрольные лунки — лунки с клетками при инкубации с чистой питательной средой.

Для каждой ГНЧЗ и срока инкубации использовали по 4 повторения.

В дальнейшем с помощью программы GraphPad Prizm 8.4.3 была рассчитана концентрация полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) в мкг/мл для каждой из ГНЧЗ и фторурацила при всех сроках инкубации, и проведено сравнение данных параметров для опухолевых и дифференцированных клеток.

Для анализа влияния изучаемых ГНЧЗ и фторурацила в концентрациях, соответствующих  $IC_{50}$  при сроках инкубации, на фоне которых  $IC_{50}$  для опухолевых клеток была достоверно ниже, чем для дифференцированных, на выживаемость опухолевых клеток проводилась их окраска красителем трипановым синим (Bio-Rad, США) путем смешивания 10 мкл клеточной суспензии с 10 мкл красителя и нанесения смеси на картридж автоматического счетчика клеток Countess II FL (Thermo FS, США). Для проведения анализа клетки культивировали в 96-луночных планшетах. В качестве контроля использовали клетки, инкубируемые с питательной средой без добавления исследуемых соединений. На каждое вещество и срок инкубации использовали по 3 повторения.

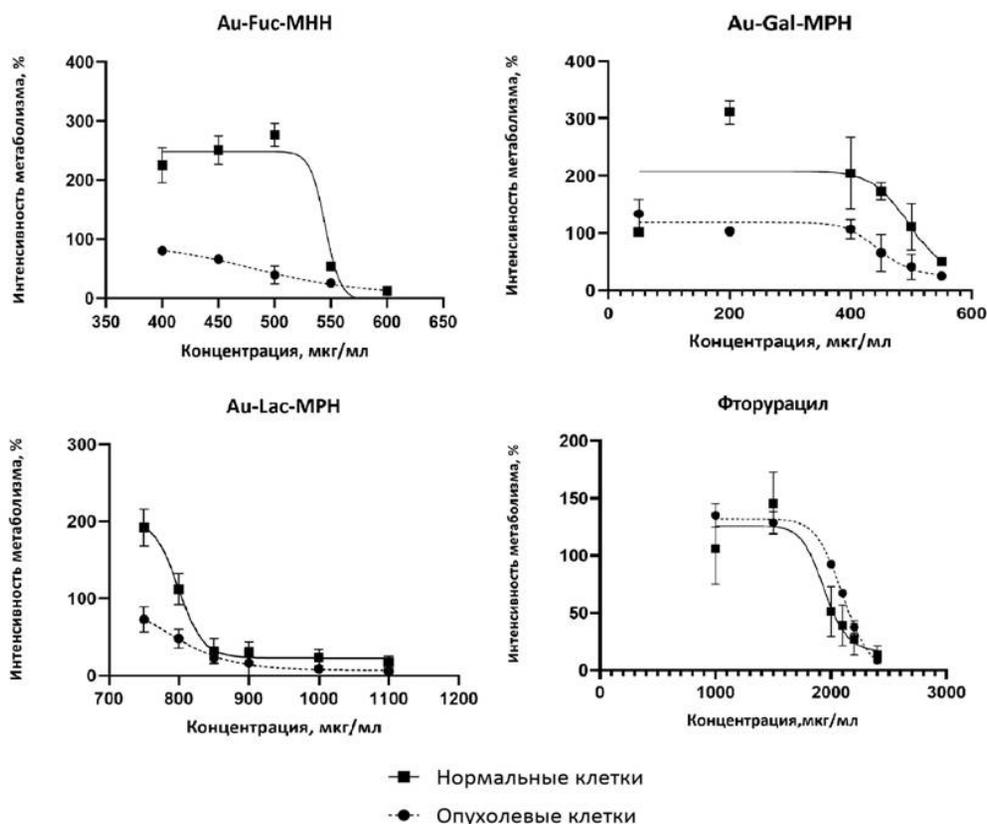
Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0 (Stat Soft Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Распределение данных анализировали, используя критерий Шапиро–Уилка. Межгрупповые различия  $IC_{50}$  ГНЧЗ

и фторурацила при разных сроках инкубации с клетками, а также между опухолевыми и дифференцированными клетками анализировали с помощью критерия Стьюдента для несвязанных выборок. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

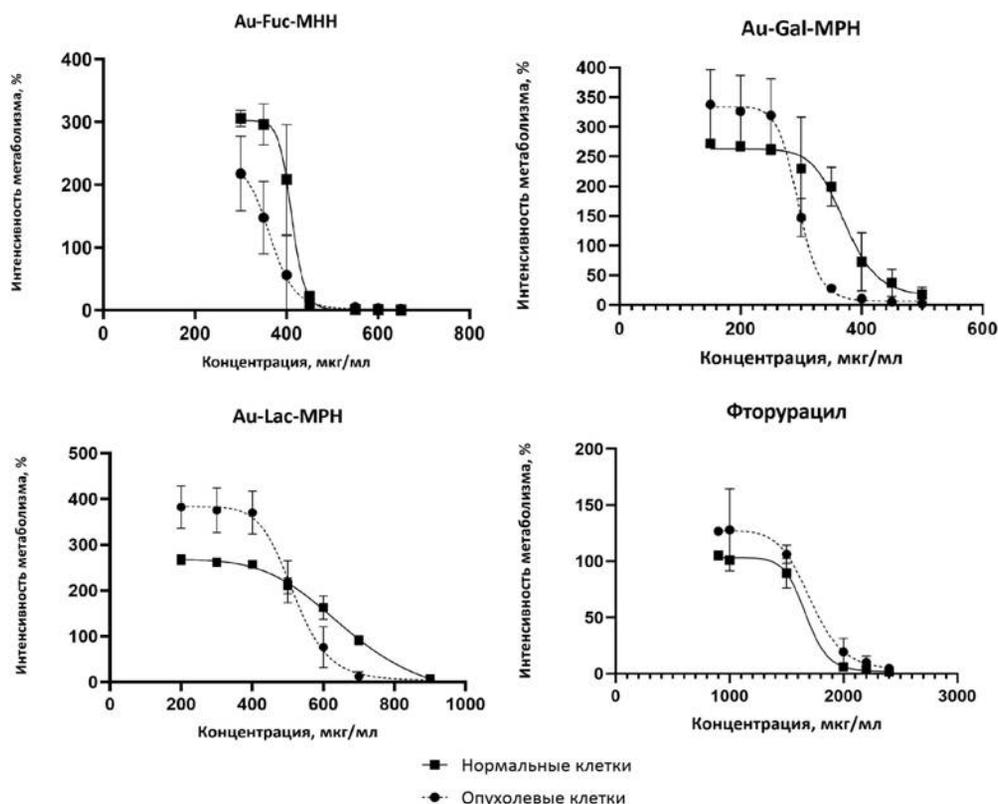
При исследовании цитотоксичности ГНЧЗ и фторурацила на клетки *Caco-2* были получены следующие результаты (рис. 2–4).

$IC_{50}$  для наночастиц с фукозой по отношению к опухолевым клеткам (первая серия) составила  $581,5 \pm 28,9$  мкг/мл и  $335,5 \pm 35,5$  мкг/мл после 2- и 8-ми часовой инкубации соответственно; для наночастиц с лактозой —  $768,9 \pm 50,3$  мкг/мл и  $514,5 \pm 44,8$  мкг/мл, для наночастиц с галактозой —  $466,9 \pm 29,2$  мкг/мл и  $298,6 \pm 27,8$  мкг/мл. Более длительная инкубация привела к достоверному снижению  $IC_{50}$  протестированных наночастиц в 1,43 ( $p = 0,0007$ ), в 1,50 ( $p = 0,0003$ ) и в 1,56 раза ( $p = 0,0003$ ) в сравнении с 2 ч инкубацией соответственно.



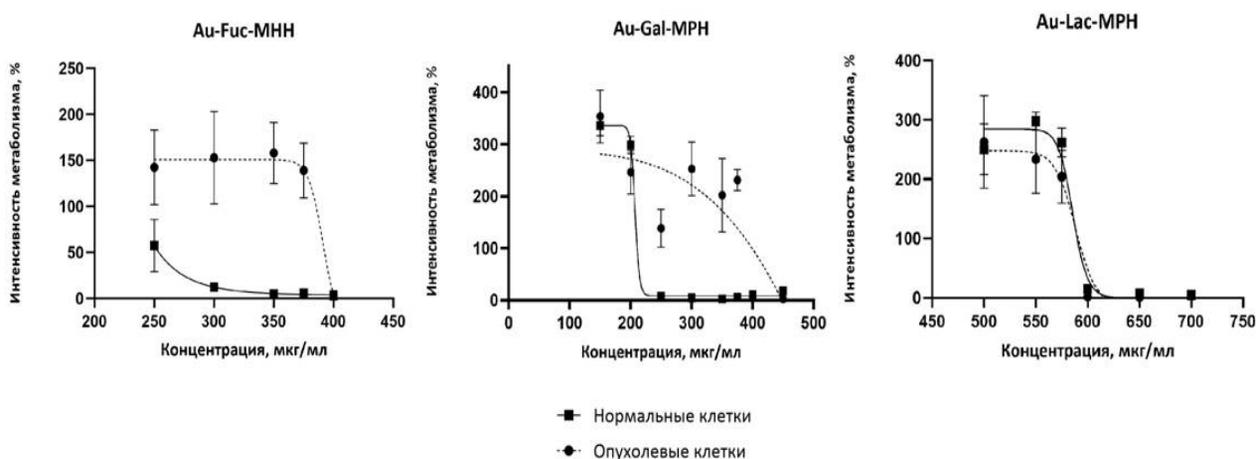
**Рис. 2.** Графики метаболической активности клеток *Caco-2* при их инкубации с гликонаночастицами золота и фторурацилом в течение 2 часов.

Примечания: Au-Fuc-MNH — золото-фукоза-меркаптогексаноилгидразид, Au-Gal-MPH — золото-галактоза-меркаптопропаноилгидразид, Au-Lac-MPH — золото-лактоза-меркаптопропаноилгидразид. Точки на графике соответствуют среднему арифметическому значению, разброс — стандартному отклонению.



**Рис. 3.** Графики метаболической активности клеток *Caco-2* при их инкубации с гликонаночастицами золота и фторурацилом в течение 8 часов.

*Примечания:* Au-Fuc-MNH — золото-фукоза-меркаптогексаноилгидразид, Au-Gal-MPH — золото-галактоза-меркаптопропаноилгидразид, Au-Lac-MPH — золото-лактоза-меркаптопропаноилгидразид. Точки на графике соответствуют среднему арифметическому значению, разброс — стандартному отклонению.



**Рис. 4.** Графики метаболической активности клеток *Caco-2* при их инкубации с гликонаночастицами золота и фторурацилом в течение 24 часов.

*Примечания:* Au-Fuc-MNH — золото-фукоза-меркаптогексаноилгидразид, Au-Gal-MPH — золото-галактоза-меркаптопропаноилгидразид, Au-Lac-MPH — золото-лактоза-меркаптопропаноилгидразид. Точки на графике соответствуют среднему арифметическому значению, разброс — стандартному отклонению.

В отношении дифференцированных клеток (вторая серия)  $IC_{50}$  для всех типов наночастиц была достоверно выше, чем для опухолевых клеток: для наночастиц с фукозой —  $530,1 \pm 2,7$  мкг/мл при 2 ч инкубации ( $p = 0,037$ ) и  $410,0 \pm 14,7$  мкг/мл при 8 ч инкубации ( $p = 0,002$ ); для наночастиц с лактозой —  $830,9 \pm 6,5$  мкг/мл при 2 ч инкубации ( $p = 0,019$ )  $638,9 \pm 13,7$  мкг/мл при 8 ч инкубации ( $p = 0,015$ ); для наночастиц с галактозой —  $510,7 \pm 20,9$  мкг/мл при 2 ч инкубации ( $p = 0,018$ ) и  $376,1 \pm 35,8$  мкг/мл при 8 ч инкубации ( $p = 0,007$ ).

Увеличение продолжительности инкубации дифференцированных клеток с ГНЧЗ, содержащих остатки фукозы, лактозы и галактозы, с 2 ч до 8 ч привело к достоверному снижению  $IC_{50}$  в 1,29 ( $p = 0,000004$ ) и 1,30 ( $p < 0,00001$ ) в 1,36 раза ( $p = 0,0006$ ) соответственно.

При 24-часовой инкубации клеток *Caco-2* с наночастицами, поверхность которых модифицирована фукозой,  $IC_{50}$  по отношению к опухолевой и дифференцированной их разновидностям достоверно не отличалась ( $p > 0,05$ ):  $386,2 \pm 9,2$  мкг/мл — для первой

серии,  $246,5 \pm 1,6$  мкг/мл — для второй серии. В случае остальных ГНЧЗ  $IC_{50}$  по отношению к опухолевым клеткам достоверно превосходила данный параметр для дифференцированных клеток:  $730,6 \pm 139,5$  мкг/мл и  $591,9 \pm 7,8$  мкг/мл для наночастиц с лактозой ( $p < 0,0001$ );  $381,4 \pm 13,3$  мкг/мл и  $235,0 \pm 7,9$  мкг/мл для наночастиц с галактозой ( $p < 0,0001$ ).

В ряде случаев наблюдалось повышение интенсивности клеточного метаболизма дифференцированных (преимущественно) и опухолевых клеток выше 100% при инкубации с ГНЧЗ в низких дозах.

При изучении выживаемости опухолевых клеток было обнаружено, что при их инкубации с НЧЗ, модифицированными фукозой, лактозой и галактозой, в течение 2 ч процент живых клеток не отличался от значений при инкубации с чистой питательной средой ( $p > 0,05$ ). При 8 ч инкубации с наночастицами данные показатели были ниже значений контроля и составили соответственно  $24,17 \pm 0,39\%$  ( $p = 0,041$ ),  $30,55 \pm 8,56\%$  ( $p = 0,046$ ),  $32,81 \pm 3,13\%$  ( $p = 0,030$ , табл. 1).

**Таблица 1.** Значения выживаемости опухолевых клеток при инкубации с исследуемыми соединениями, %

Срок инкубации	Au-Fuc-MNH	Au-Lac-MPH	Au-Gal-MPH	Фторурацил
Контроль	100	100	100	100
2 часа	$36,6 \pm 1,78$	$60,6 \pm 15,0$	$41,8 \pm 7,33$	$28,8 \pm 1,25$
8 часов	$24,17 \pm 0,39^*$	$30,55 \pm 8,56^*$	$32,81 \pm 3,13^*$	$45,37 \pm 18,88^*$

Примечания: \* — различия по сравнению с контролем с  $p < 0,05$ ; Au-Fuc-MNH — золото-фукоза-меркаптогексаноилгидразид, Au-Lac-MPH — золото-лактоза-меркаптопропаноилгидразид, Au-Gal-MPH — золото-галактоза-меркаптопропаноилгидразид

Контрольный препарат фторурацил проявил цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам с  $IC_{50}$   $2107,5 \pm 19,1$  мкг/мл и  $1764,0 \pm 192,8$  мкг/мл при 2 ч и 8 ч инкубации соответственно. По отношению к дифференцированным клеткам  $IC_{50}$  фторурацила составляла  $1995,0 \pm 19,7$  мкг/мл после 2 ч инкубации и  $1694,4 \pm 101,5$  мкг/мл при 8 ч инкубации (рис. 2, 3). Значимой разницы между  $IC_{50}$  фторурацила по отношению к дифференцированным и опухолевым клеткам с одинаковой продолжительностью инкубации не наблюдалось ( $p > 0,05$ ). Увеличение продолжительности инкубации привело к снижению  $IC_{50}$  по отношению к опухолевым клеткам в 1,19 раза ( $p = 0,012$ ); по отношению к дифференцированным клеткам — в 1,18 раза ( $p = 0,0024$ ).  $IC_{50}$  фторурацила по отношению к клеткам первой серии достоверно превосходила данный параметр для Au-Fuc-MNH, Au-Lac-MPH и Au-Gal-MPH: при 2 ч инкубации соответственно в 3,62 раза ( $p = 0,00019$ ), 2,74 раза ( $p = 0,00018$ ) и 4,51 раза ( $p = 0,0002$ ); при 8 ч инкубации соответственно в 5,25 раза ( $p = 0,00019$ ), 3,73 раза ( $p = 0,00017$ ) и 5,90 раза ( $p = 0,0002$ ).

Процент живых опухолевых клеток при инкубации с фторурацилом в концентрациях, соответствующих его

$IC_{50}$ , был ниже контроля только при 8 ч инкубации и составил  $45,37 \pm 18,88\%$  ( $p = 0,035$ ).

При сравнении процента мертвых опухолевых клеток после 8 ч инкубации с протестированными ГНЧЗ и фторурацилом разницы выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Таким образом, эффективность цитостатического действия веществ не отличается.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Целью исследования послужил анализ цитотоксичности НЧЗ, модифицированных фрагментами фукозы, лактозы и галактозы через остаток тиолсодержащих гидразидов карбоновых кислот по отношению к культуре клеток *Caco-2* с помощью МТТ-теста. Причем клетки линии *Caco-2* культивировали в 96-луночном планшете или 48 ч после достижения монослоя для получения опухолевых клеток, или в течение 21 сут после образования монослоя, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в физиологически поляризованный монослой, подобный эпителию тонкого кишечника [9]. Таким образом, в работу включали клетки

разной морфологии, но одного предшественника — аденокарциномы ободочной кишки человека.

В нашей работе показана цитотоксичность НЧЗ по отношению к культуре клеток *Caco-2* уже при 2-часовом инкубировании. При этом наблюдались более высокие значения  $IC_{50}$  протестированных частиц по отношению к клеткам, дифференцированным в эпителиоциты тонкого кишечника. Аналогичные результаты выявлены и при 8-часовой инкубации.

Полученные результаты могут быть связаны с разной степенью накопления ГНЧЗ в дифференцированных и опухолевых клетках, что обусловлено наличием на поверхности частиц остатков сахаров, обладающих сродством к поверхностным лектинам опухолевых клеток [10]. Дальнейший анализ содержания наночастиц в клетках после инкубации может подтвердить это предположение. Увеличение продолжительности инкубации до 24 ч приводило к тому, что  $IC_{50}$  наночастиц по отношению к опухолевым и дифференцированным клетками либо не отличалась (Au-Fuc-MNH), либо для опухолевых клеток становилась выше, чем для нормальных (Au-Lac-MPH и Au-Gal-MPH), что, вероятно, вызвано проникновением частиц также в нормальные клетки механизмом, отличным от рецептор-зависимого [11]. Так, в опухолевые ткани наночастицы способны проникать также пассивным путем, с помощью эффекта повышенной проницаемости и удерживания — EPR-эффекта (англ.: *enhanced permeability and retention*, эффект повышенной проницаемости и удерживания), связанного с ускоренным ростом опухолевых тканей и возникновением между клетками и в клеточных мембранах значительных полостей, а также с дефективной опухолевой васкуляризацией и нерегулярным эпителием, сниженным количеством лимфатических сосудов и незначительным поглощением интерстициальной жидкости [5].

Следует отметить выявленное возрастание метаболической активности как дифференцированных в эпителиоциты тонкого кишечника (преимущественно), так и опухолевых клеток при инкубировании с ГНЧЗ в течение указанных сроков. Одна из возможных причин данного феномена — это G2/M блокада клеточного цикла, которая сопровождается повышенной митохондриальной активностью. Данный процесс предшествует клеточной смерти [12].

Еще одна вероятная причина роста метаболической активности — ингибирование эффлюксного белка-транспортера гликопротеина-P (ABCB1-белка) наночастицами. МТТ является субстратом гликопротеина-P, и на фоне снижения его активности возможно более интенсивное внутриклеточное накопление вещества и его восстановление до формазана, поглощающего свет в ультрафиолетовом диапазоне [13]. Необходимо обратить внимание на то, что предварительное совместное инкубирование ГНЧЗ и МТТ в течение 8 ч не приводило к изменению оптического поглощения последнего, что теоретически

могло бы привести к переоценке метаболической активности клеток при проведении МТТ-теста.

Превалирование того или иного механизма внутриклеточного проникновения наночастиц и, следовательно, последствия их применения зависят от типа клеток. Например, продемонстрирована повышенная потребность в моносахариде L-фукозе клеток колоректального рака, что создало предпосылки использования липосом с данным веществом для таргетной доставки противоопухолевых агентов [14]. На мембранах клеток рака поджелудочной железы также обнаружены специфические рецепторы, связывающиеся с фукозой [15], а культура клеток меланомы *B16F10* более интенсивно взаимодействует с галактозо-модифицированными магнитными наночастицами [16].

В нашей работе в качестве препарата сравнения был выбран одобренный FDA (англ.: *Food and Drug Administration*, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) препарат — фторурацил, так как он продемонстрировал эффективность в терапии большого числа злокачественных новообразований, в т. ч. аденокарциномы толстого кишечника. Препарат ингибирует фермент тимидилсинтазу, что приводит к внутриклеточному дисбалансу нуклеотидов и двуцепочечным разрывам ДНК [17]. Также имеются сведения о стимуляции препаратом транскрипционного фактора p53 [18].

Результаты нашего исследования демонстрируют более высокую избирательность цитотоксического действия ГНЧЗ по сравнению с химиопрепаратом сравнения. Актуальным является дальнейший анализ *in vitro* возможных механизмов цитотоксичности НЧЗ. При этом рационально применять 2- и 8-часовую продолжительность инкубации, что связано с более высокой активностью частиц против опухолевых клеток по сравнению с дифференцированными в кишечный эпителий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наночастицы золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы, лактозы и галактозы, оказывают цитотоксическое действие на клетки аденокарциномы ободочной кишки человека, превосходя по активности классический цитостатик фторурацил.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Финансирование.** Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2022).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Вклад авторов:** Черных И. В. — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных; Копаница М. А. — проведение исследований, редактирование рукописи; Щулькин А. В. — концепция и дизайн исследования, статистическая обработка данных; Якушева Е. Н. — концепция и дизайн исследования; Ершов А. Ю., Мартыненко А. А., Лагода И. В. — синтез исследуемых соедине-

ний; Волкова А. М. — проведение исследований. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

**Funding.** The work was supported by a scholarship of the President of the Russian Federation for young scientists and graduate students (Competition SP-2022).

**Conflict of interests.** The authors declare no conflicts of interests.

**Contribution of the authors:** I. V. Chernykh — study concept and design, data analysis and interpretation; M. A. Kopanitsa — conducting research, editing the manuscript; A. V. Shchul'kin — concept and design of the study, statistical data processing; E. N. Yakusheva — concept and design of the study; A. Yu. Ershov, A. A. Martynenkov, I. V. Lagoda — synthesis of the studied compounds; A. M. Volkova — researching. The authors confirm the correspondence of their authorship to the ICMJE International Criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бойцов С.А., Деев А.Д., Шальнова С.А. Смертность и факторы риска неинфекционных заболеваний в России: особенности, динамика, прогноз // *Терапевтический архив*. 2017. Т. 89, № 1. С. 5–13. doi: [10.17116/terarkh20178915-13](https://doi.org/10.17116/terarkh20178915-13)
2. V Юбилейный международный форум онкологии и радиотерапии. Москва, 23 сентября 2022 г. Доступно по: <https://drive.google.com/file/d/1-wylUcOIASC8Rnsc1BAAPit8kuy9MEGJ/view>. Ссылка активна на 11.11.2022.
3. Рагузин Е.В., Юдин М.А., Глушенко Н.Г., и др. Анализ и оценка современных подходов к созданию лекарственных средств с использованием микро- и нанотехнологий // *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. 2022. Т. 3, № 3. С. 397–410. doi: [10.17816/PAVLOVJ104787](https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ104787)
4. Ершов А.Ю., Копаница М.А., Короткова Н.В., и др. Антиоксидантная активность гликонаночастиц серебра на основе меркаптопропионилгидразонов моно- и дисахаридов // *Наука Молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019. Т. 7, № 2. С. 247–254. doi: [10.23888/HMJ201972247-254](https://doi.org/10.23888/HMJ201972247-254)
5. Курапов П.Б., Бахтенко Е.Ю. Наночастицы золота для диагностики и терапии онкологических заболеваний // *Вестник РГМУ*. 2018. № 6. С. 86–93. doi: [10.24075/vrgmu.2018.090](https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.090)
6. Ershov A.Yu., Martynenkov A.A., Lagoda I.V., et al. Synthesis of aldose 11-mercaptoundecanoyl hydrazones as promising glycoligands of noble metal nanoparticles // *ChemistrySelect*. 2019. Vol. 4, No. 44. P. 12938–12941. doi: [10.1002/slct.201902942](https://doi.org/10.1002/slct.201902942)
7. Ершов А.Ю., Мартыненко А.А., Лагода И.В., и др. Синтез гликонаночастиц золота на основе 3-меркаптопропионилгидразонов 6-дезоксигалактозы и 2-(ацетиламино)альдоз // *Журнал общей химии*. 2021. Т. 91, № 2. С. 260–268. doi: [10.31857/S0044460X21020098](https://doi.org/10.31857/S0044460X21020098)
8. Blondy S., David V., Verdier M., et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes // *Cancer Science*. 2020. Vol. 111, No. 9. P. 3142–3154. doi: [10.1111/cas.14532](https://doi.org/10.1111/cas.14532)
9. Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., et al. 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 // *Cell Biology and Toxicology*. 2005. Vol. 21, No. 1. P. 1–26. doi: [10.1007/s10565-005-0085-6](https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6)
10. Catanzaro E., Calcabrini C., Bishayee A., et al. Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 18, No. 1. P. 11. doi: [10.3390/md18010011](https://doi.org/10.3390/md18010011)
11. Setyawati M.I., Tay C.Y., Bay B.H., et al. Gold nanoparticles induced endothelial leakiness depends on particle size and endothelial cell origin // *ACS Nano*. 2017. Vol. 11, No. 5. P. 5020–5030. doi: [10.1021/acsnano.7b01744](https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01744)
12. Pagliaccia M.C., Spinozza F., Migliorati G., et al. 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 // *European Journal of Cancer*. 1993. Vol. 29A, No. 11. P. 1573–1577. doi: [10.1016/0959-8049\(93\)90297-s](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90297-s)
13. Vellonen K.-S., Honkakoski P., Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004. Vol. 23, No. 2. P. 181–188. doi: [10.1016/j.ejps.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.07.006)
14. Osuga T., Takimoto R., Ono M., et al. Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer // *Journal of the National Cancer Institute*. 2016. Vol. 108, No. 8. P. djw038. doi: [10.1093/jnci/djw21](https://doi.org/10.1093/jnci/djw21)
15. Yoshida M., Takimoto R., Murase K., et al. Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, No. 7. P. e39545. doi: [10.1371/journal.pone.0039545](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039545)
16. Kavunja H.W., Voss P.G., Wang J.L., et al. Identification of lectins from metastatic cancer cells through magnetic glyconanoparticles // *Israel Journal of Chemistry*. 2015. Vol. 55, No. 3–4. P. 423–436. doi: [10.1002/IJCH.201400156](https://doi.org/10.1002/IJCH.201400156)
17. Casale J., Patel P. Fluorouracil. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Доступно по: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549808/>. Ссылка активна на 11.11.2022.
18. Prince G.T., Cameron M.C., Fathi R., et al. Topical 5-fluorouracil in dermatologic disease // *International Journal of Dermatology*. 2018. Vol. 57, No. 10. P. 1259–1264. doi: [10.1111/ijd.14106](https://doi.org/10.1111/ijd.14106)

## REFERENCES

1. Boytsov SA, Deev AD, Shalnova SA. Mortality and risk factors for non-communicable diseases in Russia: Specific features, trends, and prognosis. *Terapevticheskii Arkhiv*. 2017;89(1):5–13. (In Russ). doi: [10.17116/terarkh20178915-13](https://doi.org/10.17116/terarkh20178915-13)
2. *The 5th Anniversary International Forum of Oncology and Radiotherapy, Moscow, 19–23 September 2022*. Available at: <https://drive.google.com/file/d/1-wylUcOIASC8Rnsc1BAAPit8kuy9MEGJ/view>. Accessed: 2022 November 11. (In Russ).
3. Raguzin EV, Yudin MA, Glushenko DD, et al. Analysis and evaluation of modern approaches to development of medical drugs using micro- and nanotechnologies. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2022;30(3):397–410. (In Russ). doi: [10.17816/PAVLOVJ104787](https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ104787)

4. Ershov AYu, Kopanitsa MA, Korotkova NV, et al. Antioxidant activity of silver glyconanoparticles based on mercaptopropionylhydrazones of mono- and disaccharides. *Nauka Molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2019;7(2):247–54. (In Russ). doi: [10.23888/HMJ201972247-254](https://doi.org/10.23888/HMJ201972247-254)
5. Kurapov PB, Bakhtenko EYu. Gold nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer. *Bulletin of RSMU*. 2018;6(6):86–93. (In Russ). doi: [10.24075/vrgmu.2018.090](https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.090)
6. Ershov AYu, Martynenkov AA, Lagoda IV, et al. Synthesis of aldose 11-mercaptopundecanoyl hydrazones as promising glycoligands of noble metal nanoparticles. *ChemistrySelect*. 2019;4(44):12938–41. doi: [10.1002/slct.201902942](https://doi.org/10.1002/slct.201902942)
7. Ershov AYu, Martynenkov AA, Lagoda IV, et al. Synthesis of the Gold Glyconanoparticles Based on 6-Deoxyand 2-(Acetylamino)aldoses 3-Mercaptopropionylhydrazones. *Russian Journal of General Chemistry*. 2021;91(2):260–8. (In Russ). doi: [10.31857/S0044460X21020098](https://doi.org/10.31857/S0044460X21020098)
8. Blondy S, David V, Verdier M, et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci*. 2020;111(9):3142–54. doi: [10.1111/cas.14532](https://doi.org/10.1111/cas.14532)
9. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. 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. *Cell Biol Toxicol*. 2005;21(1):1–26. doi: [10.1007/s10565-005-0085-6](https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6)
10. Catanzaro E, Calcabrini C, Bishayee A, et al. Antitumor potential of marine and freshwater lectins. *Mar Drugs*. 2019;18(1):11. doi: [10.3390/md18010011](https://doi.org/10.3390/md18010011)
11. Setyawati MI, Tay CY, Bay BH, et al. Gold nanoparticles induced endothelial leakiness depends on particle size and endothelial cell origin. *ACS Nano*. 2017;11(5):5020–30. doi: [10.1021/acsnano.7b01744](https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01744)
12. Pagliaccia MC, Spinozzia F, Migliorati G, et al. 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. *Eur J Cancer*. 1993;29A(11):1573–7. doi: [10.1016/0959-8049\(93\)90297-s](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90297-s)
13. Vellonen K-S, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci*. 2004;23(2):181–8. doi: [10.1016/j.ejps.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.07.006)
14. Osuga T, Takimoto R, Ono M, et al. Relationship between increased fucosylation and metastatic potential in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(8):djw21. doi: [10.1093/jnci/djw21](https://doi.org/10.1093/jnci/djw21)
15. Yoshida M, Takimoto R, Murase K, et al. Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach. *PLoS One*. 2012;7(7):e39545. doi: [10.1371/journal.pone.0039545](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039545)
16. Kavunja HW, Voss PG, Wang JL, et al. Identification of lectins from metastatic cancer cells through magnetic glyconanoparticles. *Isr J Chem*. 2015;55(3–4):423–36. doi: [10.1002/IJCH.201400156](https://doi.org/10.1002/IJCH.201400156)
17. Casale J, Patel P. Fluorouracil. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549808/>. Accessed: 2022 November 11.
18. Prince GT, Cameron MC, Fathi R, et al. Topical 5-fluorouracil in dermatologic disease. *Int J Dermatol*. 2018;57(10):1259–64. doi: [10.1111/ijd.14106](https://doi.org/10.1111/ijd.14106)

## ОБ АВТОРАХ

**Черных Иван Владимирович**, д.б.н., доцент;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>;  
elibrary SPIN: 5238-6165; e-mail: [ivchernykh88@mail.ru](mailto:ivchernykh88@mail.ru)

**\*Копаница Мария Андреевна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-4538>;  
elibrary SPIN: 8147-5006; e-mail: [kopanitsa412@yandex.ru](mailto:kopanitsa412@yandex.ru)

**Шулькин Алексей Владимирович**, д.м.н., доцент;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;  
elibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: [alekseyshulkin@rambler.ru](mailto:alekseyshulkin@rambler.ru)

**Якушева Елена Николаевна**, д.м.н., профессор;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>;  
elibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: [enya.rzn@yandex.ru](mailto:enya.rzn@yandex.ru)

**Ershov Андрей Юрьевич**, д.х.н.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2266-4380>;  
elibrary SPIN: 2997-1043; e-mail: [ershov305@mail.ru](mailto:ershov305@mail.ru)

**Мартыненко Александр Алексеевич**, к.х.н.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0951-1451>;  
elibrary SPIN: 1736-1306; e-mail: [martynenkoff@gmail.com](mailto:martynenkoff@gmail.com)

**Лагода Игорь Викторович**, к.х.н.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3906-2909>;  
elibrary SPIN: 2791-1103; e-mail: [lagodai@peterstar.ru](mailto:lagodai@peterstar.ru)

**Волкова Александра Максимовна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2516-2095>;  
elibrary SPIN: 4378-3029; e-mail: [saashavolkovaaa@mail.ru](mailto:saashavolkovaaa@mail.ru)

## AUTHOR'S INFO

**Ivan V. Chernykh**, Dr. Sci. (BioL.), Associate Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>;  
elibrary SPIN: 5238-6165; e-mail: [ivchernykh88@mail.ru](mailto:ivchernykh88@mail.ru)

**Mariya A. Kopanitsa**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-4538>;  
elibrary SPIN: 8147-5006; e-mail: [kopanitsa412@yandex.ru](mailto:kopanitsa412@yandex.ru)

**Aleksey V. Shchul'kin**, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;  
elibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: [alekseyshulkin@rambler.ru](mailto:alekseyshulkin@rambler.ru)

**Elena N. Yakusheva**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>;  
elibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: [enya.rzn@yandex.ru](mailto:enya.rzn@yandex.ru)

**Andrey Yu. Ershov**, Dr. Sci. (Chem.);  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2266-4380>;  
elibrary SPIN: 2997-1043; e-mail: [ershov305@mail.ru](mailto:ershov305@mail.ru)

**Aleksandr A. Martynenkov**, Cand. Sci. (Chem.);  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0951-1451>;  
elibrary SPIN: 1736-1306; e-mail: [martynenkoff@gmail.com](mailto:martynenkoff@gmail.com)

**Igor' V. Lagoda**, Cand. Sci. (Chem.);  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3906-2909>;  
elibrary SPIN: 2791-1103; e-mail: [lagodai@peterstar.ru](mailto:lagodai@peterstar.ru)

**Aleksandra M. Volkova**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2516-2095>;  
elibrary SPIN: 4378-3029; e-mail: [saashavolkovaaa@mail.ru](mailto:saashavolkovaaa@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author