

Эффекты биологически активных веществ

УДК 615.32: 57.085.23

doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1206rus

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИЛИМАРИНА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПО ОТНОШЕНИЮ К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ*С.А. СТАРОВЕРОВ^{1, 2}, Л.А. ДЫКМАН^{1, 2}, П.В. МЕЖЕННЫЙ³, А.С. ФОМИН^{1, 2}, С.В. КОЗЛОВ³, А.А. ВОЛКОВ^{2, 3}, А.О. РЫБИН^{2, 3}, А.Б. ГОЛОВА², В.А. ХАНАДЕЕВ¹, А.А. КУРИЛОВА³, С.Ю. ЩЕГОЛЕВ^{1, 4}

В последние годы наблюдается существенный прогресс в ветеринарной онкологии: разрабатываются новые методы диагностики и лечения онкологических заболеваний у животных, расширяется спектр возможных терапевтических мероприятий. Представляют интерес, в частности, перспективы создания ветеринарных лекарственных препаратов с использованием разнообразных наночастиц (в том числе, коллоидного селена), на поверхности которых иммобилизованы биологически активные вещества, обладающие противоопухолевым действием. Наночастицы селена проявляют цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки и рассматриваются также в качестве эффективных носителей для адресной доставки *in vivo* лекарств, генетических материалов, белков и т.п. Хорошо «настраиваемые» поливалентные структуры поверхности селеновых наночастиц обеспечивают удобную платформу для интеграции нескольких терапевтических препаратов или биомакромолекул с ковалентным или нековалентным конъюгированием. Нами был синтезирован комплекс наночастиц селена с силимарином — гепатопротектором флавоноидного типа, выделяемым из плодов расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn., и оценена цитотоксичность полученного препарата для линий опухолевых клеток, различающихся происхождением и онкологическими свойствами. Методами электронной микроскопии и динамического рассеяния света установлено, что разработанная методика обеспечивает получение стабильных взвесей конъюгатов селеновых наночастиц с силимарином в диапазоне размеров порядка 20–40 нм. Показано, что полученный конъюгат проявляет ярко выраженный цитотоксический эффект в отношении линии опухолевых клеток Нер-2 с уменьшением количества жизнеспособных клеток примерно в 6,5 раза по сравнению с контролем, против уменьшения примерно 2,3 раза в отношении линии клеток SPEV-2. При этом препарат исходного коллоидного селена оказывал значительно более слабое воздействие на культуры клеток обоих типов, а чистый силимарин не проявлял статистически значимого влияния на клетки SPEV-2 (в отличие от Нер-2). Предполагается, что полученный препарат может быть использован в дальнейшем для разработки противораковых методик нового поколения и представляет интерес также с точки зрения реализации подходов на основе принципов «зеленой химии».

Ключевые слова: расторопша пятнистая, флаволигнаны, силимарин, наночастицы селена, конъюгация, цитотоксические эффекты.

Несмотря на то, что успехи современной ветеринарной медицины позволили снизить смертность животных, вызванную онкологическими заболеваниями, рак нередко продолжают рассматривать как одно из наиболее серьезных заболеваний нашего времени. По имеющимся данным, гибель более 50 % всех собак и кошек старше 10 лет обусловлена раком, а онкологические заболевания домашних животных остаются одной из наиболее распространенных причин обращения за ветеринарной помощью (1).

В последние годы наблюдается существенный прогресс в ветеринарной онкологии: разрабатываются новые методы диагностики и лечения онкологических заболеваний у животных, расширяется спектр возможных терапевтических мероприятий (2). Однако стоит отметить, что в арсенале ветеринарного врача практически отсутствуют специализированные лекарственные препараты, предназначенные для лечения онкологических заболеваний животных. Представляют интерес, в частности, перспективы со-

* В работе использовано оборудование ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Работа выполнена в рамках программы ФНИ (государственное задание № 0755-2015-0002) и частично поддержана грантом Российского научного фонда № 15-14-00002.

здания ветеринарных лекарственных средств с использованием разнообразных наночастиц (в том числе коллоидного селена), на поверхности которых иммобилизованы биологически активные вещества с противоопухолевым действием.

Селен (Se) — микроэлемент, имеющий важное значение для здоровья человека и животных (3, 4). Физиологическая роль селена в основном связана с его присутствием в селенометионине и селеноцистеине — аминокислотах, которые входят в относительно небольшой набор (около 25) селенопротеинов, обладающих, в том числе, окислительно-восстановительными и иммуномодулирующими свойствами (5).

Большой интерес представляет способность соединений селена оказывать цитотоксический эффект на опухолевые клетки, что связано с потенциальной способностью селенолата и селенида водорода эффективно реагировать с кислородом и тиолами, приводящей к нестехиометрическому потреблению тиолов и NADPH, окислительному стрессу и, в конечном итоге, гибели клеток вследствие апоптоза, некроза или некроптоза (6, 7). Онкоингибирующий эффект наночастиц селена был продемонстрирован, в частности, в ряде работ (8, 9).

Наночастицы селена рассматриваются также в качестве эффективных носителей для адресной доставки *in vivo* лекарств, генетических материалов, белков и т.п. Хорошо «настраиваемые» поливалентные структуры поверхности селеновых наночастиц обеспечивают удобную платформу для интеграции нескольких терапевтических препаратов или биомолекул с ковалентным или нековалентным конъюгированием (10). При «биосинтетическом» («зеленом») получении селеновых наночастиц используются аминокислоты (11, 12), грибные полисахариды (13), растительный экстракт из листьев *Terminalia arjuna* (14), фолиевая кислота (15), культуры клеток *Saccharomyces cerevisiae* (16) и др. При изучении механизмов действия модифицированных селеновых наночастиц ряд исследователей отмечают их тенденцию активировать митохондриальный апоптоз в клеточной линии MCF-7, вызывая окислительный стресс и в дальнейшем дисфункцию митохондрий, останавливая тем самым рост раковых клеток (15). Также отмечается снижение мембранного потенциала митохондрий и перепроизводство активных форм кислорода в клетках Hep-2 под действием селеновых наночастиц (17).

В последние годы описано около 30 классов химических веществ с раково-профилактическим эффектом, которые могут иметь практическое значение в снижении заболеваемости раком у человека (18). Среди них большое внимание уделяется полифенольным антиоксидантам естественного происхождения (19). Флаволигнаны, выделяемые из лекарственного растения расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaerth., являясь сильными антиоксидантами, способны инактивировать как свободные радикалы, так и активные формы кислорода в клетке. Также они блокируют рецепторы и транспортные системы на клеточной мембране, которые обеспечивают перенос токсических веществ в клетку, уменьшают активность макрофагальных клеток, участвующих в презентации антигенов, снижают продукцию γ -глобулинов, блокируют липооксигеназы и циклооксигеназы, оказывая тем самым противовоспалительное, иммуномодулирующее и антиканцерогенное действие (20).

В частности, было показано, что силибинин — один из флаволигнанов расторопши пятнистой, на долю которого приходится до 70 % от общего количества флаволигнанов (21), увеличивает ацетилирование гистонов H3 и H4 *in vitro* и *in vivo* в клетках линии Huh-7 ксенотрансплан-

татов у голых мышей (22, 23). В клетках немелкоклеточного рака легкого силибинин ингибирует активность деацетилаз гистонов (HDAC) и снижение их внутриклеточного содержания (24). Силимарин — аналог силибинина, также относящийся к категории гепатопротекторов растительного происхождения флавоноидного типа, который выделяют из плодов расторопши пятнистой.

Нами впервые предложена методика получения стабилизированного конъюгата наночастиц селена из исходно неустойчивых суспензий с использованием силимарина и изучена цитотоксичность такого конъюгата для иммортализованных клеток почки эмбриона свиньи (линия SPEV-2) и клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека (линия Hep-2).

Цель исследования заключалась в разработке способа стабилизации взвеси наночастиц селена при образовании комплекса с силимарином и оценке цитотоксических свойств полученного препарата по отношению к опухолевым клеткам.

Методика. Взвесь наночастиц селена получали, добавляя к 67 мл раствора селенистой кислоты 40 мл раствора L-цистеина. Для приготовления первого раствора к 0,128 г селенистой кислоты (АО «УЗПХ», Россия) добавляли 100 мл дистиллированной воды, для приготовления второго — к 0,726 г сухого L-цистеина (ООО «Неолаб», Россия) приливали 100 мл дистиллированной воды; pH растворов доводили до 8,5, используя 0,1 М NaOH. Полученная взвесь (исходный препарат наноселена) приобретала красно-коричневую окраску.

Диаметр (d) синтезированных наночастиц измеряли с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) и методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе Zetasizer Nano-ZS («Malvern», Великобритания), как описано (25).

Для получения конъюгатов наночастиц селена использовали коммерческий силимарин («TEVA Czech Industries s.r.o.», Чехия). Концентрацию силимарина в конечном препарате определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ выполняли на жидкостном хроматографе Стайер (ЗАО «Аквилон», Россия) со спектрофотометрическим детектором A₂₈₈ согласно прилагаемой инструкции. Для разделения компонентов использовали колонку Onix Monolithic C 18 (производство ЗАО «Аквилон» по лицензии фирмы «Merck KGaA», Германия).

Цитотоксические исследования проводили на клеточных линиях SPEV-2 (иммортализованные клетки почки эмбриона свиньи) и Hep-2 (опухолевые клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека). Клетки выращивали в пластиковых матрасах на среде Игла в модификации по способу Дульбекко (DMEM) («Biological Industries», Израиль), содержащей L-глутамин, 15 мМ NEPES, 10 % фетальной коровьей сыворотки и антибиотиков (20 мкг пенициллина с активностью 1000000 ЕД и 25 мкл гентамицина с активностью 1000 ЕД на 100 мл среды). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки отделяли от пластика обработкой раствором трипсина с версеном при температуре 37 °С в течение 10–15 мин, затем осаждали центрифугированием при 900 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере при pH 7,2–7,4 и повторно центрифугировали в указанном выше режиме. После ресуспендирования клеток в полной DMEM их помещали в лунки культурального планшета (1×10⁵ клеток на лунку).

Для изучения цитотоксического действия синтезированных наночастиц клетки предварительно культивировали в течение 18–24 ч до формирования слоя, занимающего 80 % поверхности лунки. Препарат наноча-

стиц селена, конъюгированных с силимарином, лиофильно высушивали, перерастворяли в среде для инкубации (рН 7,2-7,4) и вносили в лунки планшета с культурами перевиваемых клеток (в 8 повторях в дозе 8 мкг силимарина на лунку). Для сравнения использовали раствор силимарина той же концентрации в культуральной среде. Контролем служили лунки, в которые препараты не добавляли. Жизнеспособность культивируемых клеток оценивали по их способности восстанавливать нитротетразолевым синий (МТТ) до формазана (МТТ-тест, МТТ tetrazolium assay technology) (26) с определением концентрации формазана.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным методикам с использованием t -критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между выборками в опытных и контрольных экспериментах. По результатам вычисления среднеарифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) для выборки определяли стандартную ошибку среднеарифметического ($\pm SEM$) и границы его доверительно-го интервала с учетом коэффициента Стьюдента t при уровне значимости 95 % ($p = 0,05$) и числе измерений $n = 8$.

Результаты. Согласно данным, полученным методом ДРС (рис. 1), размер частиц исходного препарата селена составил $d \approx 43$ -110 нм. Однако коллоидный раствор неконъюгированных наночастиц имел довольно низкую стабильность, и в течение 10-15 мин в нем выпадал осадок (предположительно аморфного селена) кирпично-красного цвета. В связи с поставленной целью нами была разработана следующая оригинальная методика получения конъюгата силимарина с наночастицами селена. Силимарин в количестве 1,38 г растворяли в 100 мл 0,1 М раствора NaOH. Далее к 100 мл раствора силимарина добавляли 67 мл раствора селенистой кислоты, затем 40 мл раствора L-цистеина. Значение рН системы доводили до 8,5 добавлением 0,1 М раствора HCl (для нейтрализации избытка щелочи). По результатам метода ДРС (рис. 1), размер 97 % всех наночастиц в препарате селена с силимарином находится в пределах $d \approx 16$ -44 нм.

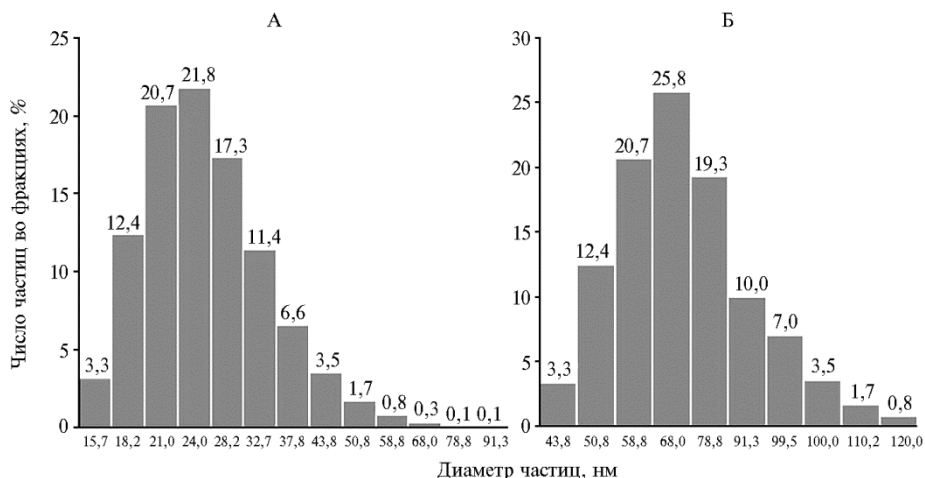


Рис. 1. Распределение наночастиц по размерам в препаратах селена, конъюгированного с силимарином (А), и без силимарина (Б) по данным метода динамического рассеяния света (анализатор Zetasizer Nano-ZS, «Malvern», Великобритания).

В отличие от исходного препарата наноселена, полученная взвесь конъюгата селеновых наночастиц с силимарином, приобретая красно-коричневую окраску и становясь прозрачной с отсутствием видимой опалесценции, в течение длительного времени сохраняла стабильность. Таким

образом, достигнутая стабилизация коллоидной взвеси селена силимарином сопровождалась увеличением ее дисперсности (уменьшением значений d), характерным для коллоидных систем подобного типа, что также подтвердила электронная микроскопия (рис. 2).

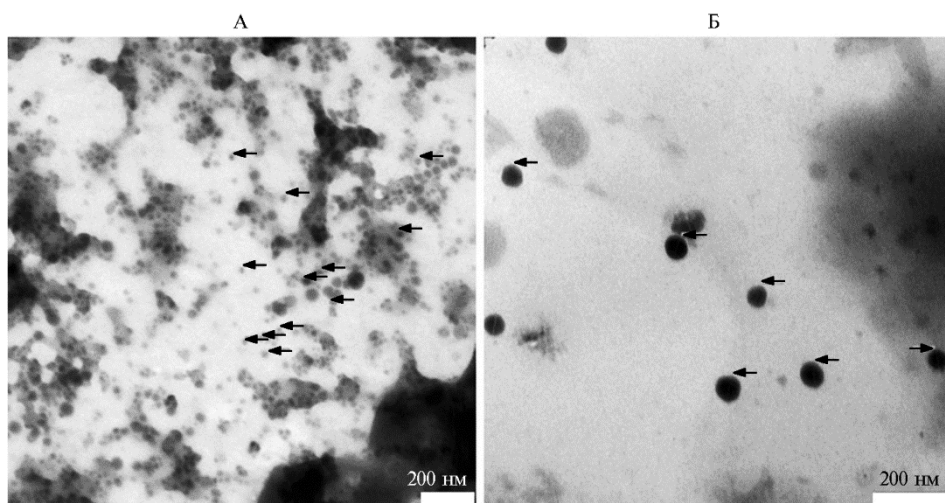


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение наночастиц (отмечены стрелками) в конъюгате селена с силимарином (А) и исходных наночастиц селена (Б) (наночастицы отмечены стрелками).

Было установлено, что добавление сухого порошка селена, конъюгированного с силимарином, в среду для инкубации клеток не приводило к изменению ее рН.

Оценка цитотоксичности двух полученных препаратов селена и нативного силимарина, проведенные с использованием клеточных культур SPEV-2 и Нер-2, показала, что чистый силимарин не вызывал статистически значимого уменьшения жизнеспособности клеток SPEV-2 (рис. 3, А). Однако его добавление к культурам клеток Нер-2 приводило к уменьшению концентрации формазана на 10,3 % (см. рис. 3 Б), о достоверности которого свидетельствуют установленные неравенства $t_{\text{факт.}} = 2,45 > t_{\text{теор.}} = 2,14$; $p_{\text{факт.}} = 0,028 < 0,05$. Внесение в лунки взвеси исходного наноселена вызывало достоверное угнетение жизнеспособности культуры SPEV-2 в ММТ-тесте (на 7,3 %), тогда как конъюгат селена с силимарином приводил к уменьшению концентрации формазана на 55,6 % (см. рис. 3, А).

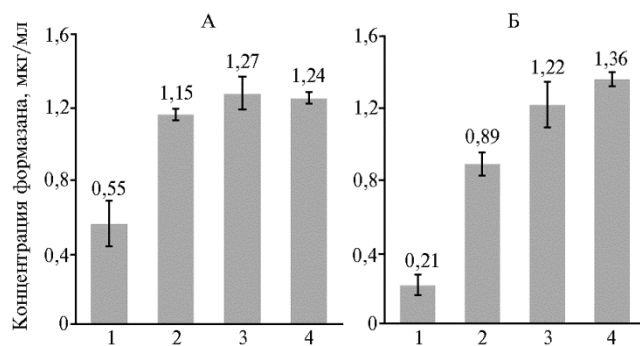


Рис. 3. Оценка жизнеспособности клеток линий SPEV-2 (А) и Нер-2 (Б) по концентрации формазана при культивировании в присутствии селеновых наночастиц, конъюгированных с силимарином (1), исходных селеновых наночастиц (2) и чистого силимарина (3) по сравнению с контролем (без добавления препаратов) (4). Вертикальные штрихи — доверительные интервалы для среднеарифметических при уровне значимости 95 %.

Более интенсивная ответная реакция на введение полученного нами конъюгированного препарата наблюдалась у опухолевых клеток линии Нер-2 (см. рис. 3, Б): конъюгат селена с силимарином вызывал умень-

шение количества жизнеспособных клеток (концентрации формазана) на 84,6 % (исходный коллоидный раствор селена снижал этот показатель у той же линии только на 34,6 %).

Учитывая результаты этого эксперимента и описанные в литературе свойства исходных субстанций, рассмотренные нами выше, усиление цитотоксического действия селеновых наночастиц с силимарином можно объяснить синергетическим эффектом в результате конъюгирования компонентов. Предполагается, что наблюдаемое действие полученного конъюгата может быть использовано для развития подходов к созданию противораковых препаратов нового поколения. Усовершенствованный «биосинтез» селеновых наночастиц с использованием силимарина, по-видимому, представляет интерес и с точки зрения реализации принципов «зеленой» химии (27).

Таким образом, добавление силимарина в реакционную смесь при восстановлении селенистой кислоты L-цистеином приводит к образованию стабильной взвеси с органолептическими свойствами (цвет и прозрачность), характерными для коллоидных взвесей селена, при среднем (наиболее вероятном) диаметре частиц 25 нм, что примерно втрое меньше, чем в исходном, менее стабильном коллоидном растворе селена. Полученный конъюгат наночастиц селена с силимарином проявляет ярко выраженный цитотоксический эффект по отношению к линии опухолевых клеток Нер-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).

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,

410049 Россия, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13,
e-mail: staroverovsergey@me.com, dykman_l@ibppm.ru,
khanadeev_v@ibppm.ru, shegolev_s@ibppm.ru;

²ФГБНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт,

410028 Россия, г. Саратов, ул. 53-й Стрелковой дивизии, 6,
e-mail: strazth87@bk.ru volkov-aleksei@yandex.ru, alinagolova@mail.ru;

³ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова,

410012 Россия, г. Саратов, Театральная площадь, 1,
e-mail: v1rus-m@rambler.ru, kozlov12@inbox.ru,
N89063171899@gmail.com, goffa2009@yandex.ru;

⁴ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,

410012 Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

Поступила в редакцию
12 декабря 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 6, pp. 1206-1213

PREPARATION OF SELENIUM NANOPARTICLES BY USING SILYMARIN AND STUDY OF THEIR CYTOTOXICITY TO TUMOR CELLS

S.A. Staroverov^{1, 2}, L.A. Dykman^{1, 2}, P.V. Mezhenyi³, A.S. Fomin^{1, 2}, S.V. Kozlov³,
A.A. Volkov^{2, 3}, A.O. Rybin^{2, 3}, A.B. Golova², V.A. Khanadeev¹, A.A. Kurilova³,
S.Yu. Shchyogolev^{1, 4}

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, 13, prosp. Entuziastov, Saratov, 410049 Russia, e-mail staroverovsergey@me.com, dykman_l@ibppm.ru, khanadeev_v@ibppm.ru, shegolev_s@ibppm.ru (corresponding author);

²Saratov Research Veterinary Institute RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, 6, ul. 53 Strelkovoi divizii, Saratov, 410028 Russia, e-mail strazth87@bk.ru volkov-aleksei@yandex.ru, alinagolova@mail.ru;

³N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, 1, Teatralnaya ploshchad, Saratov, 410012 Russia, e-mail v1rus-m@rambler.ru, kozlov12@inbox.ru, N89063171899@gmail.com, goffa2009@yandex.ru;

⁴N.G. Chernyshevsky National Research Saratov State University, 83, ul. Astrakhanskaya, Saratov, 410012 Russia
ORCID:

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The experiments were carried out using equipment of the SIMBIOZ Center (BPPM RAS).

The study was implemented under the Basic Science Research Program (State Assignment № 0755-2015-0002) and supported financially in part by Russian Science Foundation (grant № 15-14-00002)

Received December 12, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2017.6.1206eng

Abstract

The past few years have seen substantial progress in veterinary oncology: new methods have been developed for the diagnosis and treatment of oncological diseases in animals, and the range of possible therapeutic interventions has been broadened. Of interest, in particular, are the prospects for the creation of veterinary pharmaceuticals with the use of various nanoparticles, including colloidal selenium, on the surface of which are immobilized biologically active substances that have antitumor action. Selenium nanoparticles are cytotoxic to tumor cells and have also been considered as effective carriers for the *in vivo* targeted delivery of drugs, genetic materials, proteins, and so on. The well-tunable polyvalent structures of the selenium nanoparticle surface provide a convenient platform for integrating several therapeutic agents or biomacromolecules with covalent or noncovalent surface conjugation. We synthesized selenium nanoparticles in complex with silymarin, a flavonoid hepatoprotector extracted from the fruit of milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], and we evaluated the cytotoxicity of the resultant preparation to normal and tumorous cells. By using electron microscopy and dynamic light scattering, it was found that the developed procedure ensured the preparation of stable suspensions of silymarin-conjugated selenium nanoparticles with sizes ranging from 20 to 40 nm. The obtained conjugate was shown to be markedly cytotoxic to the Hep-2 tumor cell line, suppressing cell respiration approximately 6.5-fold as compared to the control, whereas the respiration of SPEV-2 normal cells was inhibited approximately 2.3-fold. Initial colloidal selenium had much weaker effects on both cell types, and pure silymarin had no statistically significant influence on SPEV-2 cells (in contrast to Hep-2 cells). The results of this study could be used in developing next-generation anticancer agents and are of interest in the implementation of green chemistry-based approaches.

Keywords: *Silybum marianum*, flavonolignans, silymarin, selenium nanoparticles, conjugation, cytotoxic effects.

REFERENCES

1. Woods J.P. Palliative care for the cancer patient. In: *Cancer management in small animal practice* /C.J. Henry, Higginbotham M.L. (eds.). Maryland Heights, Saunders Elsevier, 2010: 183-185.
2. Paoloni M.C., Khanna C. Comparative oncology today. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, 2007, 37: 1023-1032 (doi: 10.1016/j.cvsm.2007.08.003).
3. Navarro-Alarcón M., Lopez-Martinez M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Total Environ.*, 2000, 249: 347-371 (doi: 10.1016/S0048-9697(99)00526-4).
4. Rayman M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 2000, 356: 233-241 (doi: 10.1016/S0140-6736(00)02490-9).
5. Cone J.E., Del Río R.M., Davis J.N., Stadtman T.C. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: Identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *PNAS USA*, 1976, 73: 2659-2663.
6. Wallenberg M., Olm E., Hebert C., Björnstedt M., Fernandes A.P. Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. *Biochem. J.*, 2010, 429: 85-93 (doi: 10.1042/BJ20100368).
7. Selenius M., Rundlof A.K., Olm E., Fernandes A.P., Björnstedt M. Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010, 12: 867-880 (doi: 10.1089/ars.2009.2884).
8. Vekariya K.K., Kaur J., Tikoo K. ER signaling imparts chemotherapeutic selectivity to selenium nanoparticles in breast cancer. *Nanomedicine*, 2012, 8: 1125-1132 (doi: 10.1016/j.nano.2011.12.003).
9. Liu W., Li X., Wong Y.S., Zheng W., Zhang Y., Cao W., Chen T. Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism. *ACS Nano*, 2012, 6: 6578-6591 (doi: 10.1021/nn202452c).
10. Chaudhary S., Umar A., Mehta S.K. Surface functionalized selenium nanoparticles for biomedical applications. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, 10: 3004-3042 (doi: 10.1166/jbn.2014.1985).
11. Yang L., Chen Q., Liu Y., Zhang J., Sun D., Zhou Y., Liu J. Se/Ru nanoparticles as inhibitors of metal-induced A aggregation in Alzheimer's disease. *J. Mater. Chem. B*,

- 2014, 2: 1977-1987 (doi: 10.1039/C3TB21586E).
12. Feng Y., Su J., Zhao Z., Zheng W., Wu H., Zhang Y., Chen T. Differential effects of amino acid surface decoration on the anti-cancer efficacy of selenium nanoparticles. *Dalton Trans.*, 2014, 43: 1854-1861 (doi: 10.1039/c3dt52468j).
 13. Wu H., Li X., Liu W., Chen T., Li Y., Zheng W., Man C.W.-Y., Wong M.K., Wong K.H. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides-protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. *J. Mater. Chem.*, 2012, 22: 9602-9610 (doi: 10.1039/C2JM16828F).
 14. Prasad K.S., Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As(III) induced toxicity on human lymphocytes. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2014, 157: 275-283 (doi: 10.1007/s12011-014-9891-0).
 15. Pi J., Jin H., Liu R.Y., Song B., Wu Q., Liu L., Jiang J., Yang F., Cai H., Cai J. Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97: 1051-1062 (doi: 10.1007/s00253-012-4359-7).
 16. Drevko Ya.B., Sitnikova T.S., Burov A.M., Drevko B.I., Shchegolev S.Yu. *Biotechnologiya*, 2015, 6: 65-71 (doi: 10.21519/0234-2758-2015-6-65-71).
 17. Zhang Y., Li X., Huang Z., Zheng W., Fan C., Chen T. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine*, 2013, 9: 74-84 (doi: 10.1016/j.nano.2012.04.002).
 18. Wattenberg L.W. An overview of chemoprevention: current status and future prospects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1997, 216: 133-141 (doi: 10.3181/00379727-216-44163).
 19. Dragsted L.O. Natural antioxidants in chemoprevention. *Arch. Toxicol.*, 1998, 20: 209-226 (doi: 10.1007/978-3-642-46856-8_19).
 20. Volkov A.A., Staroverov S.A., Kozlov S.V., Kalyuzhniy I.I., Domnitsky I.J., Nikulin I.A., Derezhina T.N. Study of therapeutic properties of the prototype injection of a hepatoprotective drug based on flavolignans of *Silybum marianum*. *Biol. Med. (Aligarh)*, 2015, 7: 2 (http://www.biomedonline.com/Articles/Vol7_2_2015/BM-094-15_Study-of-therapeutic-properties-of-the-prototype-injection-of-hepatoprotective-drug-based-on-flavolignans-of-Silybum-mari.pdf).
 21. Pradhan S.C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J. Med. Res.*, 2006, 124: 491-504.
 22. Lah J.J., Cui W., Hu K.Q. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines. *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13: 5299-5305 (doi: 10.3748/wjg.v13.i40.5299).
 23. Cui W., Gu F., Hu K.Q. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15: 1943-1950 (doi: 10.3748/wjg.15.1943).
 24. Mateen S., Raina K., Jain A., Agarwal C., Chan D., Agarwal R. Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silibinin on non-small cell lung cancer cells. *Epigenetics*, 2012, 7: 1161-1172 (doi: 10.4161/epi.22070).
 25. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, 2010, 111: 1-35 (doi: 10.1016/j.jqsrt.2009.07.012).
 26. Oez S., Platzer E., Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut*, 1990, 60: 97-102 (doi: 10.1007/BF01720515).
 27. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, 2011, 13: 2638-2650 (doi: 10.1039/C1GC15386B).