

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса
Лумумбы»

На правах рукописи

Петрова Альбина Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ
ФОТОАКТИВАЦИИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА**

1.5.4. Биохимия

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор
Калинина Е.В.
доктор медицинских наук
Штиль А.А.

Москва – 2023

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
Степень разработанности проблемы	5
Научная новизна	7
Теоретическая и практическая значимость	7
Методы исследования	8
Положения, выносимые на защиту	8
Личный вклад автора	9
Степень достоверности и апробация результатов	9
Публикации	11
Структура и объем работы	11
Список сокращений и терминов	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
2.1. ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ	24
2.1.1. Механизм ФДТ. Окислительный стресс при фотоактивации.	24
2.1.1. Типы ФС	29
2.1.1.1. Фотосенсибилизаторы первого поколения на основе порфиринов	29
2.1.1.2. Фотосенсибилизаторы второго поколения	31
2.1.1.3. Разработки, которые привели к созданию ФБХ	34
3.1. МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ ФДТ	36
3.1.1. Апоптоз	38
3.1.2. Некроз	42
3.1.2.1. Случайный некроз (нерегулируемая гибель клеток)	42
3.1.2.2. Некроптоз (регулируемая форма некроза)	43
3.1.3. Аутофагия	45
3.1.4. Ферроптоз	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.3. Оценка экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени	49
2.4. Оценка внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов	50
2.5. МТТ-тест для определения темновой токсичности ФБХ	50
2.6. Оценка фотоактивности ФБХ методом флуоресцентной микроскопии	51
2.7. Оценка фотоактивности ФБХ с помощью МТТ-теста	52
2.8. Оценка жизнеспособности опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии при окрашивании клеток Annexin V-FITC в комбинации с PI	52
2.9. Исследование клеточного цикла	53

2.10. Оценка накопления ФБХ в клетках меланомы	53
2.11. Оценка квантового выхода генерации синглетного кислорода	54
2.12. Оценка фотодинамического воздействия ФБХ	54
2.13. Оценка бор-нейтронозахватного действия	56
2.14. Методы статистического анализа	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1. Оценка экспрессии генов, контролирующих редокс статус клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP	59
3.2. Оценка накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках	60
3.3. Оценка темновой токсичности ФБХ	63
3.4. Оценка фототоксичности ФБХ на культурах опухолевых клеток	65
3.5. Исследование фототоксичности ФБХ на опухолевых клетках, обладающих лекарственной устойчивостью	66
3.6. Анализ клеточной гибели по связыванию Аннексина V-FITC и PI методом проточной цитофлуориметрии	67
3.7. Исследование клеточного цикла после активации ФБХ	70
3.8. Накопление ФБХ в клетках меланомы мыши В16	71
3.9. Оценка квантового выхода синглетного кислорода	71
3.10. Оценка фотодинамического действия ФБХ	73
3.11. Бор-нейтронозахватная терапия меланомы В16 с использованием ФБХ	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ВЫВОДЫ	80
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	81
БЛАГОДАРНОСТИ	100

Введение

Актуальность проблемы. В терапии опухолей особое внимание уделяется подходам к разработке препаратов, способных селективно уничтожать пораженные ткани при минимальном повреждении окружающих тканей. Среди методов лечения злокачественных новообразований получают распространение лазерная хирургия и фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ включает в себя использование светочувствительных соединений – фотосенсибилизаторов (ФС), способных накапливаться в злокачественных опухолях; под действием света с соответствующей длиной волны запускаются фотохимические реакции, приводящие к разрушению опухолевых клеток. Исходно являясь нетоксичными соединениями, ФС, активируясь светом, передают энергию фотонов молекулярному кислороду с образованием активных форм последнего. В результате возникают фототоксические эффекты – гибель опухолевых клеток, повреждение микроциркуляторного русла, а также индукция иммунологических реакций. В первую очередь в механизме противоопухолевого действия ФДТ следует отметить фотохимические реакции с образованием синглетного кислорода, повреждающего клеточные мембраны. Усиление прямого фототоксического эффекта происходит благодаря нарушению кровообращения опухоли при повреждении эндотелия сосудов опухоли в зоне воздействия света, термическому действию поглощенных квантов света, цитокиновым реакциям, обусловленным стимуляцией продукции фактора некроза опухоли, активации макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов [44, 45].

Актуальной задачей является поиск путей повышения эффективности ФДТ, один из которых – создание новых ФС, поглощающих в дальнем красном и ближнем инфракрасном диапазоне. Для выполнения этой задачи в Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС РАН; лаборатория тонкого органического синтеза, к.х.н. В.А. Ольшевская) синтезированы серии производных хлорина с высоким содержанием атомов бора и фтора. Идея синтеза таких соединений – получение оригинальных веществ, предположительно амфифильных, для накопления и в водной среде клетки

(цитоплазма), и в мембранных органеллах. В лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина в соавторстве с ИНЭОС РАН установлено, что мембранотропность фотосенсибилизатора важна для его противоопухолевых свойств [114].

В этой связи актуальным является исследование нового соединения (условные названия фторборхлорин, фторированный карборанилхлорин, ФБХ, химическое название – {5,10,15,20-тетраakis[4-(1-карба-клозо-додекаборан-1-ил)тетрафторфенил]17,18-дигидропорфирин}) тетра-натрий) на способность накапливаться в опухолевых клетках, вызывать темновую и фотоактивированную гибель опухолевых клеток. Эти исследования важны как часть проекта по изучению ФБХ как перспективного противоопухолевого соединения для сочетанной фотодинамической и лучевой терапии.

Степень разработанности проблемы

ФДТ является многообещающим подходом к лечению локализованного рака, который основан на введении фотосенсибилизатора с последующим действием лазерного облучения [45, 52]. В настоящее время различные химические классы ФС используются в клинике или проходят клинические испытания [88]. Среди них природные и синтетические хлорины [119, 155] с ядром на основе порфиринового скелета и восстановленной двойной связью в одном из четырех пиррольных колец. Эта структурная модификация усиливает длинноволновое поглощение за счет смещения λ_{\max} в инфракрасную область спектра. Смещенная в красную область полоса поглощения хлорина ($\lambda_{\max} = 660$ нм) обеспечивает более глубокое проникновение света в ткани. Кроме того, ФС на основе хлорина являются высокоэффективными агентами, генерирующими АФК. Эти фотофизические свойства соответствуют требованиям, предъявляемым к ФС, и делают хлорины (в т.ч. ФБХ) перспективными кандидатами для применения в ФДТ [106, 143, 158]. Широкие возможности химических модификаций на периферии тетрапиррольного макроцикла были использованы для получения множества новых ФС. Так,

конъюгаты с полиэдрами бора, которые первоначально были синтезированы как соединения для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ), продемонстрировали повышенную фотодинамическую активность по сравнению с неборированными аналогами [66, 120]. Карборанилсодержащие хлорины стали перспективными двойными сенсбилизаторами для использования как в ФДТ, так и в БНЗТ [82]. Сочетанное действие ФДТ и БНЗТ на злокачественные новообразования может оказаться более эффективным, чем воздействие этих методов в отдельности.

Для существования и функционирования клетке необходимо поддерживать определённый баланс восстановленных и окисленных форм молекул. В частности, с повышенной антиоксидантной способностью связана устойчивость к терапии многих злокачественных заболеваний, а также антибиотикорезистентность ряда бактерий. Понимание механизмов редокс-регуляции таких клеток позволит создать препараты, снижающие их адаптационный потенциал, и увеличить их чувствительность к имеющимся лекарственным препаратам.

Гибель клеток, вызванная ФДТ может быть «нерегулируемой» (некроз) или программируемой (апоптоз, некроптоз, аутофагия, ферроптоз и т.д.) [58, 94, 144]. В зависимости от типа опухолевых клеток, физико-химических свойств и концентрации ФС, внутриклеточной локализации, интенсивности облучения может запускаться тот или иной тип гибели [112, 131].

Цель и задачи исследования

Цель работы – исследовать механизм гибели опухолевых клеток при фотоактивации новых производных хлоринов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить темновую токсичность ФБХ на линиях опухолевых клеток и оценить внутриклеточное накопление ФБХ и других производных хлорина (борхлорина (БХ), фторхлорина (ФХ));
2. Оценить экспрессию генов, контролирующих редокс статус чувствительных и резистентных к цисплатину клеток аденокарциномы яичника SKOV-3.

3. Изучить фототоксичность ФБХ на опухолевых клетках: HCT116, SKOV-3, MCF-7 и сублиниях, устойчивых к противоопухолевым препаратам: HCT116p53KO, SKOV-3/CDDP, MCF-7/Dox;
4. Установить механизм гибели чувствительных и резистентных опухолевых клеток в ответ на фотоокислительный стресс;
5. Изучить эффективность фотодинамического воздействия, бор-нейтронозахватного действия ФБХ на модели трансплантированной меланомы мышей.

Научная новизна

Впервые изучена темновая токсичность и внутриклеточное накопление нового производного хлорина – ФБХ.

Установлено, что фотоактивация ФБХ вызывает гибель опухолевых клеток (как чувствительных, так и обладающих устойчивостью к противоопухолевым препаратам) путем быстрого фотонекроза.

Впервые установлены режимы (доза лекарственной формы ФБХ, параметры освещения и нейтронного пучка) для фотодинамического и бор-нейтронозахватного воздействий. Показана эффективность использования ФБХ как нового фоторадиосенсибилизатора при сочетанном действии фотодинамической и бор-нейтронозахватной терапии, которое приводит к высокому противомеланомному результату.

Теоретическая и практическая значимость

В диссертационном исследовании впервые проведена оценка *in vitro* цитотоксичности и фотодинамической активности нового производного хлорина, синтезированного в Институте элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН.

На основании экспериментальных исследований нового производного хлорина установлена высокая противоопухолевая эффективность нового производного хлорина при ФДТ при исследовании *in vitro* и показана его

перспективность для дальнейшего медико-биологического и клинического изучения.

Результаты диссертационной работы включены в патент «Борированные производные фторированных бактериохлоринов и их металлокомплексов, обладающие противоопухолевой активностью» (Патент РФ № 2615770 от 21.12.2015/Зарегистрирован 11.04.2017 Бюл. Роспатента. – 2017. – № 11).

Методы исследования

В работе использованы современные экспериментальные методы: ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии генов, МТТ-тест для оценки жизнеспособности клеток, флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, анализ клеточной гибели проводили методом проточной цитофлуориметрии с помощью окрашивания клеток аннексином V и пропидием йодидом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследуемый фоторадиосенсибилизатор обладает низкой темновой токсичностью для линий опухолевых клеток человека и изогенных сублиний с лекарственной устойчивостью: аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7/Dox, аденокарциномы кишки HCT116, меланомы мыши B16 и глиомы крысы C6.
2. Фотоактивация ФБХ вызывает фотогибель родительских и резистентных опухолевых клеток в течение первых минут. Механизм фотогибели – некроз.
3. Формирование резистентности клеток SKOV-3 к цисплатину связано с развитием адаптивного антиоксидантного ответа.
4. ФБХ вызывает гибель опухолевых клеток с лекарственной устойчивостью, обусловленной антиоксидантной защитой.

5. Водорастворимая лекарственная форма ФБХ позволяет получить противоопухолевый эффект (при фотоактивации и нейтронном облучении) в виде регрессии трансплантированных очагов меланомы В16.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, лично выполнены биологические исследования, осуществлен анализ результатов работы, статистическая обработка полученных данных, написана и оформлена диссертационная работа.

Степень достоверности и апробация результатов

Выводы, представленные в данной работе, подтверждаются большим количеством воспроизводимых результатов. Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны и статистически достоверны.

Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

- IV Всероссийская конференция с международным участием «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Санкт-Петербург, РФ, 2015);
- I Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, РФ, 2015);
- XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, РФ, 2015);
- XVI Международная научно-техническая конференция «Наукоемкие химические технологии» с элементами школы молодых ученых (Москва, РФ, 2015);
- Конкурс У.М.Н.И.К. (Москва, РФ, 2015);

- XXIII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (Санкт-Петербург, РФ, 2017);
- X Международная конференция молодых ученых по химии «Менделеев-2017» (Санкт-Петербург, РФ, 2017);
- VIII Международная научная конференция #SCIENCE4HEALTH2017 (Москва, РФ, 2017);
- VI Всероссийская конференция с международным участием «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Ростов-на-Дону, РФ, 2017);
- XXIV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018» (Санкт-Петербург, РФ, 2018);
- 43rd FEBS Congress (Prague, Czech Republic, 2018);
- IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, РФ, 2018);
- XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, РФ, 2019);
- XIII Международная конференция «Синтез и применение порфиринов и их аналогов» (Костромская область, Костромской район, д. Кузьминка «Серебряный плес», РФ, 2019);
- 44th FEBS Congress (Krakow, Poland, 2019).

Получены:

1. Диплом за 2 место в конкурсе молодых ученых на конференции «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Санкт-Петербург, РФ, 2015);
2. Диплом III степени за доклад «Механизмы антиоксидантной защиты и фотоиндуцированная гибель клеток аденокарциномы яичника, чувствительных и устойчивых к цисплатину» на секции молодых ученых

«Актуальные вопросы биохимии» XXIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (Санкт-Петербург, РФ, 2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, среди которых 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, и тезисы 6 докладов.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы с описанием полученных результатов и их с обсуждением, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 100 страницах текста, включая 26 рисунков и 3 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 181 источник.

Список сокращений и терминов

ФДТ	фотодинамическая терапия
ФС	фотосенсибилизатор
ФБХ	фторборхлорин, фторированный карборанилхлорин
БХ	борхлорин
ФХ	фторхлорин
АФК	активные формы кислорода
NO	оксид азота
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ОС	оксидативный стресс
КоQ	убихинон
НАДФ ⁺ , НАДФН(H ⁺)	никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный и восстановленный
NOS	NO-синтаза
SOD	супероксиддисмутаза
CAT	каталаза
GPx	глутатионпероксидаза
GSH	восстановленный глутатион
4-HNE	4-гидрокси-2-ноненаль
МДА	малоновый диальдегид
HrD	гематопорфирин
IC ₅₀	(inhibitory concentration), концентрация, необходимая для ингибирования роста 50% клеток
БНЗТ	бор-нейтронозахватная терапия

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оксидативный стресс как патогенетический фактор развития патологий

Адаптация клеток к кислородсодержащей среде привела к возникновению активных форм кислорода (АФК) и включению их в регуляцию клеточных процессов (пролиферации, дифференцировки, биоэнергетики, программируемой гибели) в зависимости от уровня их генерации. Физиологически значимый уровень, необходимый для поддержания жизнедеятельности клетки, определяется балансом систем, генерирующих АФК, и антиоксидантной системы, блокирующей их образование. Клеточный редокс-статус, определяемый балансом окислительно-восстановительных процессов, является необходимым фактором, участвующим в формировании клеточного гомеостаза.

АФК используются для целого ряда физиологически значимых для организма функций, которые включают:

- активацию широкого спектра сигналов внутри клетки, участие (через АФК-зависимый сигналинг) в выполнении физиологических функций, таких как клеточная адгезия, миграция и рост; выживаемость и пролиферация клеток; или остановка и гибель клеток [169]. Многие сигнальные пути, опосредованные АФК, активируют механизмы выживания клеток, такие как активация антиклеточной гибели членов семейства Bcl-2 (через NF- κ B) или повышенная экспрессия антиоксидантных ферментов, которая предотвращает накопление генерируемых АФК повреждений клеток, например, через путь Nrf2. Наоборот, АФК-опосредованная передача сигналов может активировать пути гибели клеток, такие как передача сигналов JNK [139, 159, 180]. Генерация АФК различными изоформами НАДФН-оксидазы играет важную роль в регуляции каскада межклеточной сигнализации в различных типах фагоцитирующих клеток, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов, миоциты и клетки тиреоидной ткани.

- бактерицидное действие;
- активацию иммунных реакций лейкоцитов;
- регуляцию состояния сосудистой системы. Оксид азота (NO) снижает агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию, регулирует сосудистый тонус, вызывая расслабление гладких мышц кровеносных сосудов;
- ускорение обновления белковых структур. Протеазы быстрее гидролизуют окисленный белок, что ускоряет обновление клеточных структур;
- регуляцию микровязкости клеточных мембран. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) играет роль не только повреждающего, но и регулирующего фактора, поддерживая микровязкость мембран на определенном уровне. Реакции ПОЛ, например, усиливаются при повышении содержания холестерина, уплотняющего фосфолипидный бислой.

Нарушение редокс-баланса в результате гиперпродукции АФК и/или дефицита антиоксидантной системы вызывает развитие оксидативного стресса (ОС) в результате роста свободнорадикальных процессов и окислительного повреждения макромолекул – белков, липидов, нуклеиновых кислот, что приводит к деструкции клеточных структур и гибели клеток [132].

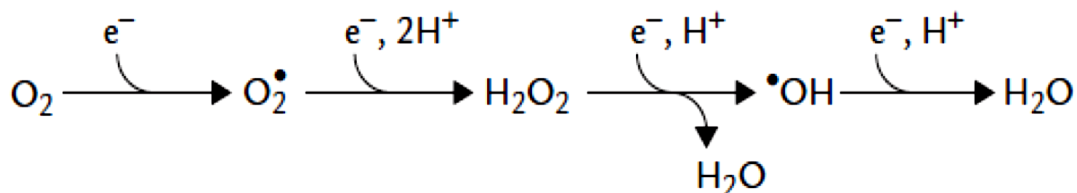
Хронический ОС в настоящее время рассматривается как одна из причин развития многих заболеваний, включая атеросклероз, хроническую обструктивную болезнь легких, болезнь Альцгеймера и злокачественные новообразования [54].

В то же время деструктивное действие ОС на клетки активно используется как перспективный терапевтический подход для разработки эффективных способов лечения таких патологий как злокачественные новообразования [132].

1.1.1. Активные формы кислорода и источники их образования.

Полное восстановление O_2 до воды происходит путем присоединения четырех электронов. Особенности электронной структуры молекулы кислорода предполагают ее поэтапное одноэлектронное восстановление, при котором возникают промежуточные свободнорадикальные состояния кислорода. Активные

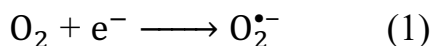
формы кислорода представляют собой продукты неполного восстановления молекулярного кислорода до воды. АФК включают свободные радикалы и пероксиды, имеющие неспаренный электрон на внешнем электронном уровне, вследствие чего обладают высокой реакционной способностью [6].



супероксид пероксид водорода гидроксильный радикал

К наиболее важным АФК относят супероксид-анион радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$, перекись водорода H_2O_2 , синглетный кислород $^1\text{O}_2$, пероксильный HO_2^{\bullet} и гидроксильный $^{\bullet}\text{OH}$ радикалы, пероксинитрит ONOO^- и гипохлорит-анион OCl^- [132].

Одноэлектронное восстановление молекулы кислорода приводит к образованию $\text{O}_2^{\bullet-}$ (реакция 1):

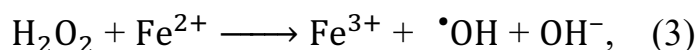
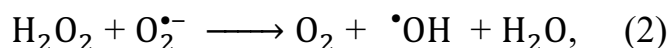


$\text{O}_2^{\bullet-}$ обладает длительным временем полужизни в биологических субстратах (10^{-6} с) и является родоначальником других активных форм кислорода, включая HO_2^{\bullet} , $^{\bullet}\text{OH}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$. В основном, $\text{O}_2^{\bullet-}$ образуется в результате работы систем электронного транспорта и действия НАДН- и НАДФН-зависимых оксидоредуктаз, являющиеся донорами электронов в митохондриях и микросомах. $\text{O}_2^{\bullet-}$ может действовать как окислитель и восстановитель, а также спонтанно дисмутировать (один атом может выступать в качестве акцептора электрона, а другой в качестве донора) до H_2O_2 . В водной среде $\text{O}_2^{\bullet-}$ способен повреждать белки, содержащие железо-серные кластеры, такие как аконитаза, сукцинатдегидрогеназа и НАДН-убихинон оксидоредуктаза [132] в результате участия в последовательно протекающих реакциях Хабера–Вайса и Фентона, которые приводят к образованию высоко реакционноспособных свободнорадикальных продуктов.

При кислых значениях $O_2^{\bullet-}$ протонируется с образованием более реакционноспособного пероксильного радикала (HO_2^{\bullet}), представляющего собой слабую кислоту.

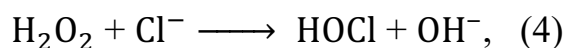
Синглетный кислород (1O_2), время полужизни 10^{-6} с, может образовываться в реакциях фотоактивации фотосенсибилизаторов и в процессе дисмутации супероксидных радикалов [5]. 1O_2 высоко активен в отношении остатков ненасыщенных жирных кислот сложных липидов в структуре мембран, вызывая образование гидроперекисей, которые в присутствии металлов с переменной валентностью могут участвовать в активации цепных реакций окислительной деградации липидов.

Пероксид водорода (H_2O_2), время полужизни 10–100 с, способен далеко мигрировать от места образования вследствие высокой диффузной способности. Химически малоактивен, но в реакциях Хабера–Вайса (реакция 2) и Фентона (реакция 3) способствует образованию наиболее реакционно-способной АФК – гидроксил-радикала $\bullet OH$:



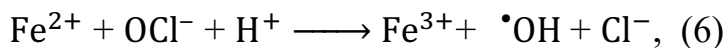
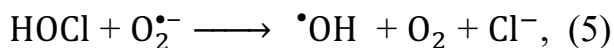
Перенос электрона от ионов Fe^{2+} на H_2O_2 в реакции Фентона происходит с разрывом O–O связи, приводя к образованию $\bullet OH$ радикалов. Помимо ионов Fe^{2+} генерация $\bullet OH$ радикалов возможна и с участием ионов других металлов переменной валентности (Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+}).

Гипохлорит-анион (OCl^-), время полужизни 10^{-6} с, представляет собой активную форму хлора, обладает сходными свойствами окислителя, по этой причине условно относится к АФК. Образуется в реакции, катализируемой миелопероксидазой нейтрофильных гранулоцитов, при окислении хлорид-аниона, (реакция 4):



Гипохлорит-анион опасен сам по себе, а также может взаимодействовать с $O_2^{\bullet-}$ – с образованием гидроксильного радикала (реакция 5), с Fe^{2+} с образованием

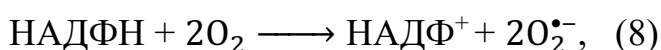
гидроксильного радикала (реакция 6) и с H_2O_2 с образованием синглетного кислорода (реакция 7):



Гидроксил-радикал ($\bullet\text{OH}$) наиболее реакционноспособная АФК, обладает коротким временем полужизни (10^{-9} с). Радиус действия $\bullet\text{OH}$ не превышает двух молекулярных диаметров, поэтому вызываемые повреждения локализованы непосредственно в местах генерации таких радикалов. Окислительное действие $\bullet\text{OH}$ проявляется в прямом окислении молекул и в активации цепных свободнорадикальных реакций, (в частности, перекисного окисления липидов, ПОЛ. См. ниже) [11]. $\bullet\text{OH}$ высоко активен в отношении нуклеиновых кислот и белков, вызывая разрыв цепей ДНК и пептидных связей, окисление сульфгидрильных групп.

АФК генерируются практически во всех компартментах клетки. Около 5% от вдыхаемого O_2 используется на образование АФК [31]. Главным источником генерации АФК является дыхательная цепь переноса электронов митохондрий, где они образуются в результате «утечки» e^- с I и III комплексов (НАДН-убихинол-оксидоредуктаза и убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктаза) [7]. Кроме того, АФК могут образовываться в результате «утечки» электронов в электрон-транспортной системе мембран ЭПР и ядра, которые содержат цитохромы P-450 и b_5 , а также НАДФН- и НАДН-зависимые редуктазы (в том числе микросомальную НАДФН-цитохром P-450-зависимую редуктазу) [7]. Нарушения функционирования электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом усиливает генерацию АФК [5].

В организме человека и животных одним из важных источников АФК являются фагоциты [5], содержащие мультибелковый комплекс (НАДФН-оксидазу), который использует НАДФН для восстановления O_2 до $\text{O}_2^{\bullet-}$ (реакция 8):



В ходе стимуляции неспецифической защиты организма для разрушения бактерий НАДФН-оксидаза в фагоцитах обеспечивает «респираторный взрыв» – быструю избыточную генерацию супероксид радикала $O_2^{\bullet-}$ [7]. Помимо НАДФН-оксидазы, АФК в фагоцитах образуются благодаря миелопероксидазе, катализирующей образование гипохлорита из Cl^- и H_2O_2 (реакция 4), взаимодействие которой с OCl^- приводит к образованию $\bullet OH$ радикала (реакция 7).

АФК образуются в результате активности многих ферментов [132]. Генерацию $O_2^{\bullet-}$ катализируют НАДФН-оксидаза, пероксидазы и ксантинооксидаза. После образования $O_2^{\bullet-}$ участвует в реакциях, продуктами которых являются H_2O_2 , $\bullet OH$, пероксинитрит ($ONOO^-$), $HOCl$. Перекись водорода продуцируется множеством ферментов класса оксидаз, например, L-оксидазой аминокислот, ксантинооксидазой, моноаминооксидазой. Радикал оксида азота $NO\bullet$, который играет важную физиологическую роль, синтезируется в результате окисления аргинина в цитруллин NO-синтазой (NOS) [15, 46, 60, 101, 102, 127, 164, 175]. Активное образование гидропероксидов катализируют липоксигеназа и циклооксигеназа в метаболизме арахидоновой кислоты [18].

Свободные радикалы образуются как из эндогенных, так и из экзогенных источников [14]. Активация иммунных клеток, воспаление, ишемия, инфекция, злокачественные новообразования, чрезмерные физические нагрузки, умственное напряжение и старение – все эти процессы связаны активацией свободнорадикальных процессов. Генерация свободных радикалов может происходить в результате воздействия факторов окружающей среды: УФ, ионизирующей радиации, поллютантов, тяжелых металлов (Cd, Hg, Pb, Fe и As), некоторых лекарств (циклоспорин, такролимус, гентамицин и блеомицин), химических растворителей, приготовления пищи (копченое мясо, отработанное масло и жир), сигаретного дыма, алкоголя, приводя к развитию патологических процессов [15, 46, 60, 127, 128, 134, 162, 163, 175, 178].

1.1.2. Ключевые ферменты антиоксидантной защиты

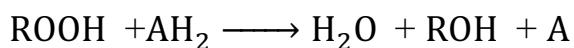
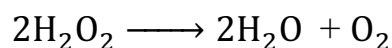
Физиологически значимый уровень АФК во многом определяется существованием антиоксидантной системы, включающей антиоксидантные ферменты и неферментативные антиоксиданты (глутатион, карнозин, билирубин, биливердин, мочевая кислота, убихинон, церуллоплазмин). Супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPx) являются главными ферментами антиоксидантной системы [41].

Супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1) катализирует реакцию дисмутации супероксида с образованием молекулярного кислорода и перекиси водорода. Существует три изоформы SOD у млекопитающих: цитоплазматическая Cu/ZnSOD (SOD1), митохондриальная MnSOD (SOD2) и внеклеточная Cu/ZnSOD (SOD3), все из которых требуют металл (Cu или Mn) в качестве кофактора для их активации, который непрерывно переключается между восстановленной и окисленной формами в активном центре. Активность SOD важна не только потому, что она предотвращает накопление супероксида, но также благодаря тому, что SOD предотвращает реакцию образования пероксинитрита ($O_2^{\bullet-} + NO_2^- \xrightarrow{SOD} ONOO^-$) и реакцию инактивации NO, обладающего противовоспалительными и антикоагулянтными свойствами.

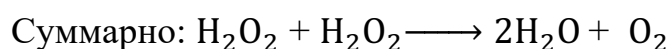
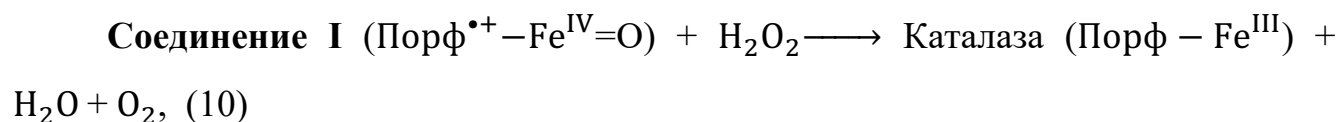
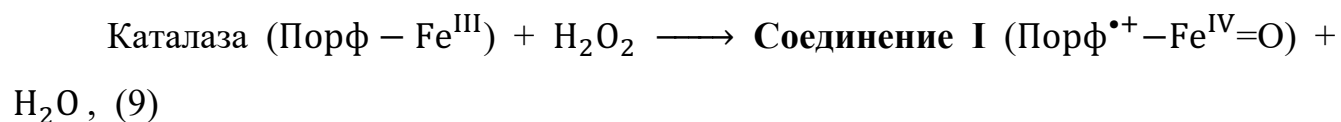
Наконец, дисмутация супероксида с помощью SOD приводит к образованию пероксида водорода (H_2O_2), которая является важным фактором, участвующим в клеточном редокс-зависимом сигналинге [29, 57].

Супероксиддисмутаза катализирует превращение супероксида путем дисмутации в H_2O_2 . В свою очередь, каталаза разлагает пероксид водорода на воду и кислород. Каталаза (CAT, КФ 1.11.1.6) представляет собой тетрамерный фермент, состоящий из четырех идентичных тетраэдрически расположенных субъединиц по 62 кДа, которые содержат по одной группе гема в каждой субъединице и имеют молекулярную массу около 240 кДа [62, 67].

CAT эффективно реагирует с H_2O_2 при её высоких концентрациях с образованием воды и молекулярного кислорода; и с донорами H (метанол, этанол, муравьиная кислота или фенолы), оказывая пероксидазную активность [161]:



Разложение H_2O_2 происходит в двух реакциях: в первой реакции гемовая группа каталазы окисляется одной молекулой пероксида водорода в гипервалентное промежуточное **соединение I** (катион-радикал оксоферрилпорфирина) с сопутствующим образованием воды (реакция 9), во второй реакции **соединение I** восстанавливается второй молекулой H_2O_2 до исходного состояния с образованием двух молекул воды и кислорода (реакция 10) [62, 67]:



У животных H_2O_2 разлагается с помощью САТ и GPx. Несмотря на то, что САТ не важна для некоторых типов клеток в нормальных условиях (при низких концентрациях H_2O_2), она играет важную роль в приобретении толерантности к оксидативному стрессу в адаптивном ответе клеток. Выживаемость крыс, подвергшихся воздействию 100% кислорода, увеличивалась, когда липосомы, содержащие SOD и САТ, вводились внутривенно до и во время воздействия [161]. Повышенная чувствительность трансфицированных САТ клеток к некоторым лекарствам и оксидантам объясняется свойством САТ в клетках предотвращать индуцированное лекарством потребление O_2 в результате либо прямого разрушения H_2O_2 до кислорода, либо за счет непосредственного взаимодействия с лекарством [145].

Каталаза – не единственный фермент-антиоксидант, восстанавливающий перекись водорода до воды. Глутатионпероксидаза (GPxs, КФ 1.11.1.19) катализирует разложение H_2O_2 до воды и органических гидропероксидов до

спиртов с использованием GSH в качестве восстановителя [22]. GPx обладает более высоким сродством к H_2O_2 , чем каталаза, что определяет её ведущую роль в катаболизме H_2O_2 при низких физиологических концентрациях. Хотя GPx восстанавливает H_2O_2 наряду с CAT, она может эффективно реагировать с липидами и другими органическими гидропероксидами, являясь основным источником защиты от низких уровней оксидативного стресса. У человека обнаружено восемь изоформ GPx. GPx1-4 и GPx6 являются селенопротеинами, тогда как GPx5, GPx7 и GPx8 содержат цистеин в активном центре [22, 33]. По своей структуре и субстратной специфичности GPx4 отличается от других изоформ. Этот мономер может реагировать не только с пероксидом водорода, но и с широким спектром гидропероксидов липидов, в том числе полученных из холестерина и эфиров холестерина, используя GSH в качестве восстанавливающего субстрата, также он может использовать тиолы белка в качестве восстановителей [172].

Тиоредоксины (Trx, КФ 1.8.1.9) представляют собой ферменты, восстанавливающие окисленные белки благодаря наличию в активном центре специфического, высококонсервативного мотива с двумя остатками цистеина. Существует две изоформы: Trx1, локализованная в цитозоле и ядре, и Trx2, обнаруженная в митохондриях. Ферменты тиоредоксинредуктазы непрерывно превращают окисленную форму Trx в восстановленную форму [85].

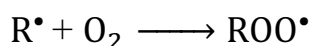
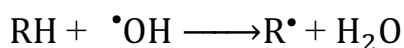
Пероксиредоксины (Prx, КФ 1.11.1.15) восстанавливают H_2O_2 , циклически переключаясь между реакциями окисления и восстановления благодаря их активному центру, включающему остатки цистеина, участвующие в разложении H_2O_2 . Во время этих окислительно-восстановительных реакций восстановление окисленных остатков цистеина опосредовано GSH, аскорбиновой кислотой или сульфиредоксинами [166].

1.1.3. АФК и окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот при оксидативном стрессе

Развитие оксидативного стресса сопровождается значительным ростом АФК, вызывающих окислительную деструкцию макромолекул, таких как липиды, белки, нуклеиновые кислоты [71]. Кислородсодержащие радикалы, в частности $O_2^{\bullet-}$, NO_2^{\bullet} , $\bullet OH$, являются мощными инициаторами ПОЛ, роль которого хорошо установлена в патогенезе широкого спектра заболеваний.

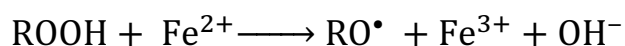
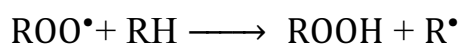
Процессы ПОЛ принято делить на несколько стадий: инициирование, развитие, разветвление и обрыв [11]. Непременным условием осуществления ПОЛ и начальным этапом его развития является активация генерации АФК [149]. Образовавшиеся АФК воздействуют на фосфолипиды, точнее, на ненасыщенные жирные кислоты, входящие в их состав и высвобождающиеся при распаде фосфолипидов, и подвергают их перекисному окислению. В результате этого окисления образуются гидроперекиси и диеновые конъюгаты (первичные продукты), являющиеся нестабильными, альдегиды и диальдегиды (вторичные продукты ПОЛ), шиффовы основания (третичные продукты ПОЛ). Избыточная активация процессов цепного свободнорадикального окисления липидов может привести к деструкции и увеличению проницаемости клеточных мембран, окислительной модификации структурных белков, ферментов, биологически активных веществ [59, 149].

В момент инициации радикал $\bullet OH$ атакует метиленовую группу, расположенную между двойными связями, и выбивается электрон, восстанавливающий гидроксильный радикал до воды. Далее следует перестановка двойной связи, смещение радикальной группы и взаимодействие ее с кислородом. В результате образуется липопероксидный радикал:

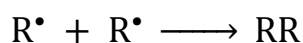
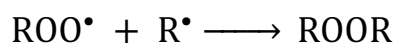
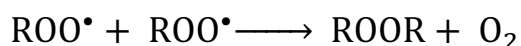


Дальнейшее взаимодействие полученного липопероксидного радикала со структурами соседних жирных кислот приводит к его нейтрализации и появлению

новых липоперекисных радикалов, то есть к развитию линейной цепной реакции с появлением новых окисленных ВЖК («лавина»). Кроме линейного развития может происходить разветвление реакции за счет получения электронов гидропероксидом от ионов металлов или при воздействии излучения:



Обрыв цепной реакции происходит при взаимодействии радикалов друг с другом или в реакциях с различными антиоксидантами, например, витамином E, который отдает электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму:



ПОЛ изменяет свойства мембран: повышается микровязкость, изменяется ионная проницаемость (разрушение ионных каналов и ионных насосов, например, Na^+/K^+ -АТФазы), растет проницаемость мембран, что приводит к набуханию, образуются «мега» поры.

Основными продуктами ПОЛ являются 4-гидрокси-2-ноненаль (4-HNE) и малоновой диальдегид (МДА). Впервые 4-HNE охарактеризовал Esterbauer и др. в 1991 году и с тех пор количество исследований с участием этого соединения неуклонно растет [17]. Помимо 4-HNE высоко реакционноспособным из вторичных продуктов ПОЛ является МДА. МДА способен образовывать сшивки в белках (путем взаимодействия с ϵ -аминогруппой в радикале лизина и N-концевыми аминокислотами белков), а также за счет связи с аминокислотами фосфолипидов и гликозаминогликанов с образованием оснований Шиффа [17, 47, 117].

АФК вызывают окислительные модификации белков, которые приводят к подавлению их функциональной активности. Наиболее чувствительны к действию оксидативного стресса являются серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин), остатки лизина, триптофана, гистидина [39, 140, 179]. Окисление

аминокислотных остатков цистеина и метионина потенциально обратимо; репарация окисленного метионина происходит с помощью метионин-сульфоксидоредуктазы.

Действие гипохлорит-иона сопоставимо с активностью гидроксил-радикала, в белках $OSCl^-$ атакует ϵ -аминогруппы остатков лизина с образованием структур хлораминов [77, 78], что приводит к снижению функциональной активности бактериальных белков, однако главный бактерицидный эффект обусловлен дальнейшим отщеплением хлораминовой группы, окислением δ -углеродного атома лизина до альдегидной группы и появлением новой аминокислоты аллизина. Аналогичным действием обладают гидроксильные радикалы и пероксинитрит. Аллизин играет важную роль в образовании поперечных связей, которые стабилизируют коллаген и эластин [105]. Высокое содержание окисленного коллагена может быть связано с появлением фиброза.

Активация оксидативного стресса вызывает повреждения РНК и ДНК: появление модифицированных и неспаренных оснований, одно- и двунитевые разрывы между нуклеотидами цепи, разрывы гликозидных связей между азотистым основанием и пентозой, образование димеров тимидина, возникновение окисленных пентозных остатков [30, 146].

2.1. Фотодинамическая терапия

2.1.1. Механизм ФДТ. Окислительный стресс при фотоактивации.

По данным Глобальной онкологической обсерватории (GCO), онкологические заболевания представляют собой одну из главных причин смертности во всем мире, на их долю приходится почти 10 миллионов смертей в 2020 году [151]. Установленные стандартные методы лечения (хирургия, лучевая терапия и химиотерапия) в последние годы продемонстрировали умеренный успех при лечении определенных видов рака. Несмотря на это, такие проблемы как устойчивость опухолевых клеток, рецидивы и метастазы, не были преодолены. По этой причине для лечения злокачественных опухолей необходимы новые технологии. Методом лечения солидных опухолей, имеющий преимущества перед

стандартными методами лечения, является фотодинамическая терапия (ФДТ) [72]. Метод обеспечивает избирательное терапевтическое действие, щадя окружающие нормальные ткани за счет преимущественного накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани, и ограничения лазерного облучения тканью-мишенью, при необходимости может быть неоднократно повторена и сочетаться с классическими методами лечения злокачественных новообразований [34].

В настоящее время ФДТ оценивается как метод лечения онкологических и инфекционных заболеваний, основанный на поглощении молекулы ФС, которая при возбуждении светом определенной длины волны вступает в реакцию с кислородом и генерирует АФК в тканях-мишенях, что приводит к гибели клеток [26, 69]. Было установлено, что цитотоксические свойства ФДТ обусловлены окислением широкого спектра биомолекул в клетках, включая нуклеиновые кислоты, липиды и белки, что приводит к серьезным изменениям в клеточных сигнальных каскадах или в регуляции экспрессии генов [98, 125].

Механизм действия ФДТ включает развитие оксидативного стресса в результате фотоактивации ФС и его цитотоксическое действие на клетки. ФС способен поглощать энергию света с определенной длиной волны. При поглощении кванта света молекула ФС переходит из основного состояния $ФС(S_0)$ в возбужденное синглетное состояние $ФС(S_1)$ и в более долгоживущее триплетное возбужденное состояние $ФС(T_1)$, что приводит к генерации АФК двумя фотохимическими реакциями I и II типа [45]. В реакциях I типа $ФС(T_1)$ может непосредственно реагировать с биомолекулами, такими как белки или липиды, приводя к образованию радикалов, таких как $ФС^*$, которые инициируют свободнорадикальные цепные реакции. С другой стороны, в механизме реакции типа II, характерной для большинства ФС, энергия возбуждения от $ФС(T_1)$ передается молекулярному кислороду (O_2), что приводит к образованию синглетного кислорода (1O_2), который чрезвычайно электрофилен и способен вызывать повреждение мембран, белков и ДНК [45] (рис. 1).

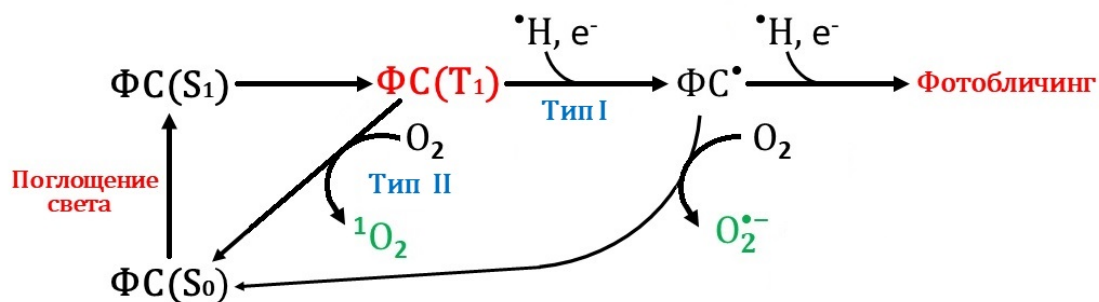


Рис. 1. Механизмы фотосенсибилизации. $\text{ФС}(\text{S}_0)$ – основное синглетное состояние ФС; $\text{ФС}(\text{S}_1)$ – возбужденное синглетное состояние ФС; $\text{ФС}(\text{T}_1)$ – возбужденное триплетное состояние ФС.

Образование триплетных возбужденных частиц при любом механизме является важнейшим фактором для оценки эффективности ФС. И трициклические соли фенотиазиния, и макроциклические полипирролы (порфирины и их производные) генерируют необходимое количество триплетов при электронном возбуждении, поэтому они обычно используются для ФДТ [45]. Поиск новых ФС остается в основном сосредоточенным на синтезе соединений, которые производят синглетный кислород с большей эффективностью, помимо этого необходимо учитывать множество факторов, включая агрегацию и фотодеградацию [18].

Повреждения белков и мембран имеют особое значение для ФДТ и являются необходимыми для цитотоксического эффекта. ФС, демонстрирующие высокую степень накопления в мембранах клеток и/или органелл, обычно более цитотоксичны [86, 130], так как фотосенсибилизированное окисление липидов вызывает их пермеабиллизацию [19]. Изменения в фосфолипидах происходят из-за ПОЛ, которое представляет собой реакции, запускающиеся вследствие образования свободных радикалов и синглетного кислорода. После этой начальной точки процесс становится автокаталитическим, что приводит к образованию гидропероксидов и других побочных продуктов. На рис. 2 обобщены основные этапы фотоиндуцированного повреждения мембраны. Первый этап обычно включает «еновую» реакцию между липидом LH и синглетным кислородом, образованным в результате фотохимической реакции II типа, продуктом которой является гидропероксид LOOH. Кроме того, возможны реакции с $\text{ФС}(\text{T}_1)$ по фотохимическому механизму I типа. Необратимое повреждение происходит при

отрыве атома водорода от высшей жирной кислоты LH, имеющей двойные связи, что приводит к образованию алкильного радикала L[•]. Далее к алкильному радикалу присоединяется молекулярный кислород, в результате реакции образуется пероксильный радикал LOO[•], который реагируя с другой жирной кислотой LH, способен инициировать новый цикл окисления, ведущий к образованию неустойчивого липидного гидропероксида LOOH и еще одного алкильного радикала L[•]. Фаза продолжения цепной реакции включает реакции распада гидропероксидов липидов на другие промежуточные радикалы и инициирование новой цепи окисления пероксильным радикалом LOO[•]. Под действием света между триплетным ФС(T₁) и двойной связью гидропероксида липида образуется алкоксильные радикалы LO[•], что приводит к обрыву цепи. Этот процесс приводит к образованию укороченных альдегидов и других продуктов, которые пермеабелизуют мембраны.

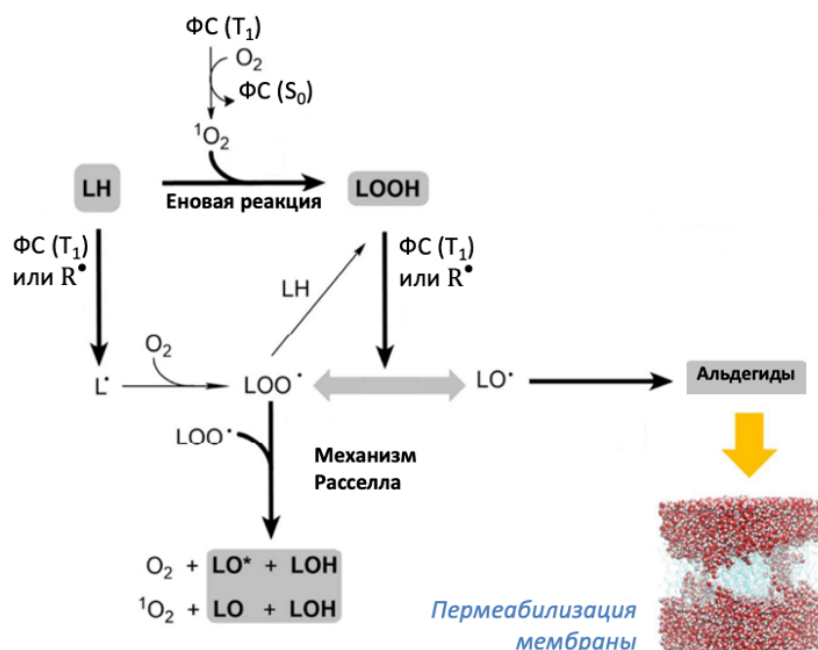


Рис. 2. Механизмы фотоиндуцированного повреждения мембран.

ФС(S₀) – основное синглетное состояние ФС; ФС(S₁) – возбужденное синглетное состояние ФС; ФС(T₁) – возбужденное триплетное состояние ФС; R[•] – радикалы; LH – неокисленный липид; L[•], LOO[•], LO[•] – алкильные, пероксильные и алкоксильные радикалы; LOOH, LOH, LO – гидропероксид, спирт и оксид липида.

Помимо ПОЛ, применение ФДТ часто также приводит к разрушению микроциркуляторного русла опухоли [2]. Подобно опухолевым клеткам,

эндотелиальные клетки сосудистой системы могут накапливать ФС для создания свободных радикалов при активации соответствующим светом. Разрушение сосудистых стенок приводит к нарушению или полному прекращению кровотока в ткани опухоли и запускается некротический механизм гибели клеток [2]. Подобные эффекты были описаны ранее также с фотофрином у крыс с экспериментальной хондросаркомой [52]. Ядерно-магнитно-резонансная томография с использованием *in situ* фтора продемонстрировали, что повреждение сосудистой сети опухоли предшествует некрозу опухоли [28].

Влияние иммунной системы на процессы ФДТ исследовалось несколькими группами. Было выявлено, что клеточный и гуморальный иммунитет у онкологических больных снижается, но группа исследователей G. Canti et al. наблюдала рост иммунитета при проведении фотодинамической терапии злокачественных опухолей [25]. J. Nieva et al. утверждают, что в защиту организма при этом вовлечены все типы иммуноглобулинов и они могут, вне зависимости от источника их антигенной специфичности [2], катализировать процесс образования перекиси водорода в реакции синглетного кислорода с водой, что является мощной противоопухолевой защитой организма при ФДТ [118].

Многие исследования действия ФДТ сосредоточены на гибели клеток вследствие генерации АФК. Однако некоторые факторы могут оказывать действие на эффективность ФДТ и ее способность вызывать гибель клеток. Например, наличие антиоксидантных систем может влиять на эффективность ФДТ. Супероксиддисмутаза (SOD), будучи как конститутивной (Cu/ZnSOD), так и индуцибельной (MnSOD) изоформой, участвует в улавливании супероксид-ионов. ФДТ увеличивает продукцию MnSOD, но не изоформы Cu/ZnSOD [63]. В нескольких исследованиях предполагается соответствующее защитное действие индуцибельной изоформы MnSOD в опухолевых клетках, подвергшихся ФДТ [35, 37].

Другой элемент способный влиять на эффективность ФДТ, – количество меланина в клетке. Используя три различных бактериохлорина в качестве ФС, было продемонстрировано, что все бактериохлорины накапливаются в меланосомах,

вызывая их повреждение. Менее эффективные бактериохлорины в основном локализуются в лизосомах, тогда как более эффективные депонируются в митохондриях и генерируют значительно более высокие концентрации гидроксильных радикалов [32]. Накопление ФС в клетках меланомы может вызывать повреждение таких органелл, что приводит к гибели клеток под действием нескольких факторов, включая образование H_2O_2 и высокоактивных хинонов [38].

2.1.1. Типы ФС

Становление и развитие ФДТ опухолей связано с разработкой эффективных фотосенсибилизаторов на основе порфиринов. В основе всех порфириновых соединений лежит сопряженное макроциклическое кольцо (рис. 3), состоящее из четырех пиррольных остатков, соединенных между собой метиновыми мостиками. Двойная связь в хлоринах восстановлена в положениях 17 и 18, а в бактериохлоринах – в положениях 7, 8, 17 и 18.

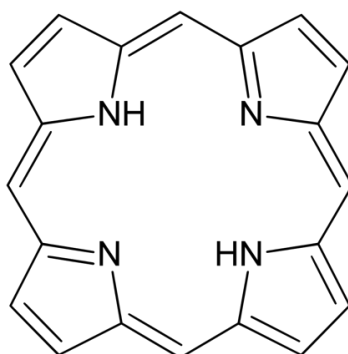


Рис. 3. Структура порфирина.

Во второй половине XX века различными научными группами в качестве сенсбилизаторов для фотодинамической терапии было исследовано большое количество порфиринов, наиболее перспективным из которых оказался гематопорфирин IX [9].

2.1.1.1. Фотосенсибилизаторы первого поколения на основе порфиринов

Первым фотосенсибилизатором, который был представлен Т. J. Dougherty et al. [79] была водорастворимая смесь порфиринов, названная «производным гематопорфирина» (HpD), а более очищенный препарат позже стал известен как

Фотофрин. С течением времени в продаже появлялись и другие коммерческие формы, содержащие активные фракции НpD: Фотокарцинорин (Китай), Фотосан (Германия), Фотогем (Россия), Гематодрекс (Болгария) и др [78].

К преимуществам фотофрина относят простоту получения из доступных соединений, выраженный противоопухолевый эффект [3, 96]. Несмотря на то, что фотофрин по-прежнему является наиболее часто используемым ФС во всем мире, он обладает целым рядом общепризнанных недостатков, в том числе недостаточной селективностью к опухолевым клеткам [91], накоплением в высоких концентрациях в клетках ретикуло-эндотелиальной системы, почках, селезенке, печени [93], фоточувствительностью кожи после проведения ФДТ, которая может продолжаться в течение недель или месяцев. Фотофрин имеет слабую полосу поглощения в ближней инфракрасной области, что делает его непригодным для глубоко расположенных опухолевых тканей.

Аналогом Фотофрина является отечественный препарат Фотогем, разработанный под руководством профессора А.Ф. Миронова в МИТХТ им. М.В. Ломоносова в 1990 году. Фотогем является смесью мономерных и олигомерных производных гематопорфирина. Клинические испытания, проводившиеся с февраля 1992 года, показали его высокую эффективность в терапии злокачественных опухолей: выраженный терапевтический эффект наблюдался у 91% пациентов, в 62% случаев опухоли полностью рассасывались, а в 29% – частично регрессировали. На ранних стадиях развития злокачественных заболеваний удалось полностью излечить 92% онкологических больных. Клинические испытания Фотогема завершились в 1995 году, с 1996 года препарат разрешен Министерством Здравоохранения России для широкого клинического применения. Курс терапии с Фотогемом успешно проведен на более чем 1500 больных [9, 10, 93].

«Препараты, основанные на гематопорфирине, требуют воздействия лазерным излучением с длиной волны 628-632 нм, при этом максимальный порог фотоиндуцированных некрозов не превышает 1 см. Дозы световой энергии

существенно различаются, зависят от размеров и локализации опухоли и лежат в диапазоне от 50 до 500 Дж/см²» [2].

Имеющиеся у фотосенсибилизаторов недостатки вынудили исследователей по всему миру заняться созданием соединений с улучшенными качествами, относящихся ко второму поколению, которым свойственны активная фармакодинамика, селективность накопления в опухолевых клетках без влияния на здоровые и улучшенные характеристики спектральных линий с максимумом поглощения более 650 нм [3].

2.1.1.2. Фотосенсибилизаторы второго поколения

Основные требования к фотосенсибилизаторам второго поколения можно сформулировать следующим образом:

- 1) интенсивный максимум поглощения в области 660 – 900 нм;
- 2) низкая токсичность и быстрое выведение из организма;
- 3) высокая селективность к опухолевым клеткам и низкое накопление в нормальных тканях;
- 4) слабое накопление в кожных покровах;
- 5) устойчивость при хранении;
- 6) высокий квантовый выход триплетного состояния с энергией не меньше 94 кДж/моль для эффективной генерации синглетного кислорода;
- 7) хорошая люминесценция для надежной диагностики опухоли.

Немаловажно также и то, что для этих соединений существует широкая сырьевая база.

К настоящему времени достаточно большое число ФС второго поколения уже прошло клинические испытания. По большей части это соединения относятся к классам хлоринов, бактериохлоринов, фталоцианинов и т.п. [3, 12].

В 1994 году был разработан и прошел клинические испытания под руководством профессора Г.Н. Ворожцова в Московском научно-производственном объединении НИОПИК (Москва) фотосенсибилизатор нового поколения Фотосенс (Photosens), который представляет собой водорастворимую

смесь сульфопталоцианинов алюминия с различной степенью сульфирования ($n = 2, 3$ или 4 , среднее значение $n = 3,1$). Фталоцианин относится к классу тетраазпорфиринов. Серьезных трудностей, возникающих при работе с фталоцианинами вследствие их высокой гидрофобности, удалось избежать за счет использования сульфированных металлокомплексов [72].

Фотосенс высокоактивен и интенсивно поглощает свет в красной области спектра с максимумом в водном растворе при 675 нм и 350 нм, «вызывая выраженную деструкцию опухолей при воздействии лазерным излучением с длиной волны $670-675$ нм. Его применяют при лечении базально-клеточной карциномы, рака легкого, рецидивирующего рака головы и шеи» [2], первичного или рецидивирующего рака желудка, рака пищевода, мезотелиомы плевры и метастаз рака молочной железы. Кроме того, было обнаружено, что фотосенс длительно задерживается в тканях пациентов, что позволило пролонгировать ФДТ [13].

Существенно отличается от наиболее известных зарубежных и отечественных аналогов по своим свойствам Фотодитазин (Fotoditazin). Фотодитазин представляет собой N-диметилглюкаминую соль хлорина еб, изобретенную профессором Г.В. Пономаревым, полученную ООО «Вета-Гранд» (Москва) [72]. «Фотодитазин растворим в воде и имеет полосу поглощения $\lambda_{\max} = 662$ нм, что позволяет наилучшим образом просвечивать биологические ткани. Высокая динамическая активность Фотодитазина обусловлена способностью связываться с клеточными мембранами опухолевых клеток» [2].

Среди прочих фотосенсибилизаторов второго поколения стоит выделить:

Фоскан (Foscan, Германия), также известный как темопорфирин или метатетрагидроксифенилхлорин (mTHPC). Был одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) в 2001 году для лечения распространенного плоскоклеточного рака головы и шеи. Является наиболее цитотоксически активным ФС из ныне существующих: Фоскан вводят в дозе всего $0,15$ мг/кг, а межлекарственный интервал обычно составляет 96 часов. Он активируется светом с длиной волны 652 нм мощностью 100 мВт/см² и дозой 20 Дж/см². Достоинствами

Фоскана считаются его высокая активность и высокий пик поглощения при 652 нм, который характерен для хлоринов. Однако к недостаткам Фоскана следует причислить наблюдаемые у пациентов случаи развития стеноза трахеи и бронхов, эзофаготрахеальных фистул, перфораций пищевода [72, 116].

Пурлитин (Purlytin, США) – этилэтиопурпурин олова. Представляет собой синтетический порфирин, который структурно подобен хлорофиллу и может активироваться видимым красным светом с длиной волны 664 нм. Более длинная длина волны активации этого фотосенсибилизатора обеспечивает улучшенную глубину проникновения по сравнению с ФС первого поколения. Пурлитин разрешен для лечения метастазирующего рака молочной железы, базальноклеточного рака и саркомы Капоши у ВИЧ-инфицированных пациентов [89]. Его фотоактивность значительно ниже, чем у гематопорфирина и его аналогов, а светочувствительность при прохождении курса терапии может достигать 1 месяца [4].

Лютекс (Lu-tex, США) – тексафирин лютеция, водорастворимый макроцикл с центрально координированным атомом Lu. Применяется для лечения меланомы, базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи, метастазов рака молочной железы, саркомы Капоши [6]. Отличительным свойством фотосенсибилизатора является высокая селективность накопления в опухолях, при этом, в отличие от Пурлитина, для тексафирина лютеция характерно быстрое выведение из организма [8].

Аналоги порфиринов, содержащие иные типы внутримолекулярного связывания пиррольных циклов, в последнее время привлекают все больше внимания ученых. Как один из примеров можно привести «расширенный порфирин», в молекуле которого классические метиновые мостики расширены на два атома углерода, в результате чего максимум абсорбции световых волн смещен на 783 нм. Однако это привело к снижению квантового выхода синглетного кислорода. Дальнейшее расширение макроцикла еще больше смещает максимум поглощения, но при этом способность к генерации синглетного кислорода полностью утрачивается.

Наиболее похожими по строению на порфирины являются порфицены (рис. 4).

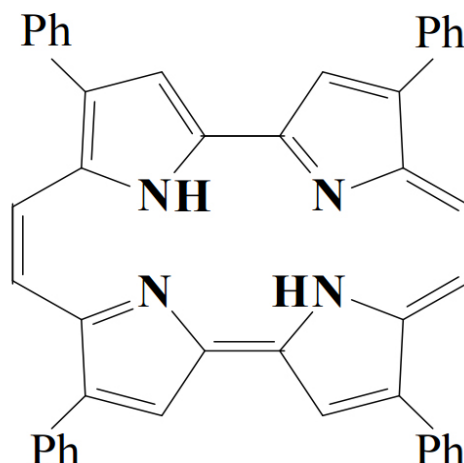


Рис. 4. Структура порфицена.

Характеристики их спектров поглощения граничат между ФС первого и второго поколения: основной максимум абсорбции расположен примерно в области 640 нм, при этом он в 15 раз интенсивнее полосы максимума для порфиринов. Порфирицены селективно накапливаются злокачественных новообразованиях и обладают низкой фототоксичностью [1, 9].

2.1.1.3. Разработки, которые привели к созданию ФБХ

В настоящее время различные химические классы ФС используются в клинике или проходят клинические испытания [88, 113], среди которых природные и синтетические хлорины [119, 155], с ядром на основе порфиринового скелета и восстановленной двойной связью в одном пиррольном кольце. Такая структурная модификация обеспечивает усиление длинноволнового поглощения за счет смещения λ_{\max} в инфракрасную область спектра ($\lambda_{\max} = 660$ нм), тем самым достигается более глубокое проникновение света в ткани, чем в случае ФС порфиринового типа ($\lambda_{\max} = 626$ нм). Кроме того, ФС на основе хлорина являются высокоэффективными агентами, генерирующими АФК. Эти фотофизические свойства соответствуют требованиям, предъявляемым к фотосенсибилизаторам, и делают хлорины перспективными кандидатами для применения в ФДТ [106, 143, 153, 158].

Биологические свойства макроциклов тетрапиррола сильно зависят от структуры макроцикла, и был разработан ряд синтетических стратегий для повышения их терапевтической эффективности и направленности [27, 42, 119, 158]. Широкие возможности химических модификаций на периферии тетрапиррольного макроцикла были использованы для получения множества новых ФС. Среди различных производных порфирина/хлорина, которые изучались на протяжении многих лет, конъюгаты с полиэдрами бора, которые первоначально были синтезированы как соединения для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ), продемонстрировали многообещающую эффективность в ФДТ на клетках и животных [66, 81, 120]. Ранее было показано, что водорастворимое боропроизводное природного протогемина IX продемонстрировало высокую эффективность при ФДТ крыс с саркомой [122]. Протогемин IX сам по себе не имел эффекта, что свидетельствует о том, что борирование ответственно за фототоксическую активность конъюгата. Затем борированный амид хлорина еб [123] продемонстрировал замечательную эффективность в качестве фотосенсибилизатора в клеточной ФДТ и в моделях пересаженной меланомы В16 и саркомы М-1 у грызунов. Это соединение не вызывало темновой токсичности и продемонстрировало значительно более высокую фотосенсибилизирующую эффективность, чем не борированный хлорин еб. Таким образом, функционализация порфириновых макроциклов полиэдрическими карборанами и боранами позволяет получить фоторадиосенсибилизаторы двойной активности, подходящие как для ФДТ, так и для БНЗТ [16, 82, 107, 121, 124].

При поиске оптимизированных агентов для ФДТ и БНЗТ фторированные порфирины вызвали значительный интерес благодаря их благоприятным свойствам, таким как низкая токсичность, метаболическая стабильность и особенно клеточное поглощение. Введение фторсодержащих фрагментов значительно усиливало терапевтический эффект или придавало новые активности. Замена фтора может повысить эффективность и повлиять на селективность мишени, влияя на константу диссоциации кислоты [136], модулируя конформацию, гидрофобные взаимодействия и липофильность. В частности, фтор может

ограничивать конформацию и усиливать взаимодействие с мембранами. Кроме того, фтор использовался в качестве инструмента для исследования метаболизма лекарств. Замещение фтором в качестве прямой замены лабильного атома (атомов) водорода может снизить метаболизм при установке на ароматическую группу, склонную к окислению (например, фенильные кольца, богатые электронами). Фтор часто входит в биоизостеры карбонилсодержащих фрагментов. В целом, применение фтора в разработке лекарств обеспечивает сильный стимул для разработки новых синтетических методологий; в свою очередь, это обеспечивает более легкий доступ к фторированным соединениям [61, 70, 84, 109].

3.1. Механизмы клеточной гибели при ФДТ

Дисбаланс между скоростью генерации АФК и способностью клеток к антиоксидантной защите и восстановлению повреждений может привести к окислительному стрессу, который в конечном итоге запускает различные механизмы гибели клеток. Эти разнообразные формы гибели клеток сложны и иногда частично перекрывают друг друга, что затрудняет их идентификацию. Некроз, апоптоз и аутофагия (рис. 5) по-прежнему являются наиболее известными формами гибели клеток, хотя такие термины, как некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, некроз, обусловленный переходом митохондриальной проницаемости, клеточное старение, митотическая катастрофа и иммуногенная гибель клеток [58], тоже могут индуцироваться при ФДТ [94, 111, 144, 150]. Идентификация этих различных путей должна учитывать морфологические, генетические, биохимические, молекулярные и функциональные параметры, как это было описано в последних рекомендациях номенклатурного комитета по механизмам гибели клеток 2018 г. [58].

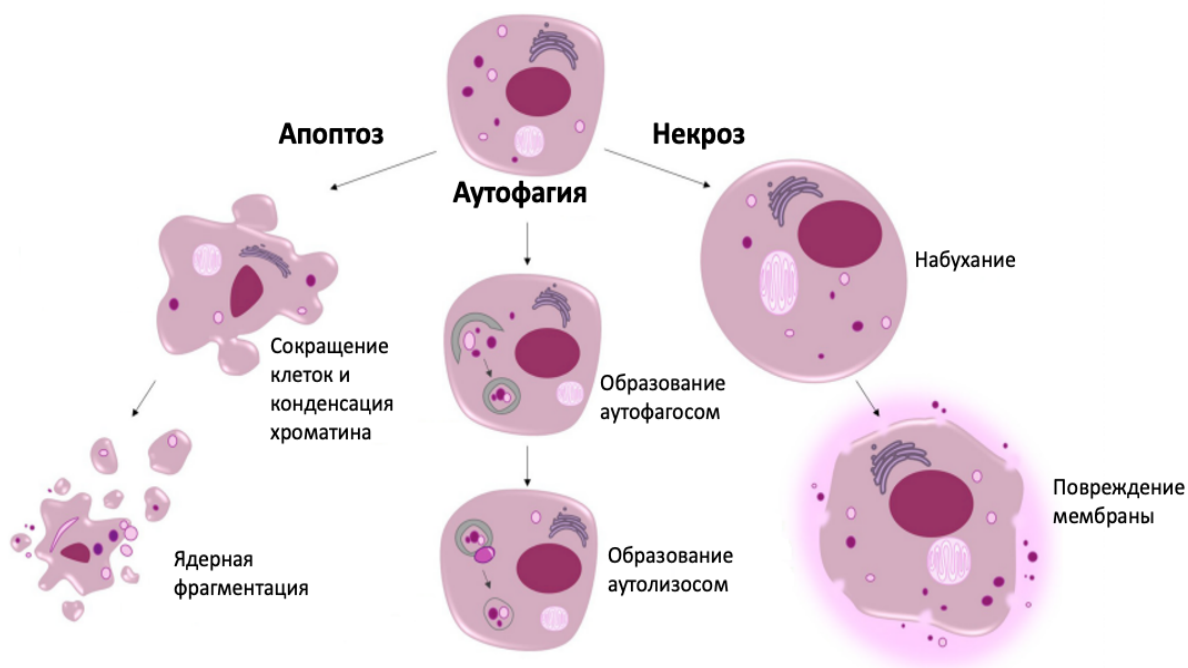


Рис. 5. Три наиболее известных пути гибели клеток. Апоптоз характеризуется сморщиванием клеток, конденсацией и фрагментацией хроматина, вздутием клеток и образованием апоптотических телец без утечки их содержимого. Некроз сопровождается набуханием цитозоля и органелл с последующим разрушением мембраны и высвобождением содержимого. При аутофагии наиболее характерными признаками являются образование аутофагосом и их слияние с лизосомами, образующими аутолизосомы, но иногда может происходить и вакуолизация.

Нерегулируемая гибель клеток (NRCD) или случайная гибель клеток (ACD), обычно известная как случайный некроз, представляет собой форму быстрой и неконтролируемой гибели клеток при сильном повреждении. Напротив, различные вариации регулируемой гибели клеток (RCD) очень сложны и контролируются несколькими сигнальными путями, которые могут модулироваться. Это может происходить в физиологических условиях, наблюдаемых во время развития и обновления тканей (запрограммированная гибель клеток), или опосредовано внешними факторами, вызывающими нарушения/повреждения, которые не могут адекватно корректироваться различными адаптивными реакциями [58]. Апоптоз, аутофагия и некроз при ФДТ являются наиболее изученными механизмами гибели клеток. Один и тот же ФС в зависимости от условий проведения ФДТ может индуцировать три механизма гибели. В большинстве случаев при использовании высокой интенсивности света и/или высокой концентрации ФС в опухолевых клетках запускается некроз. Предполагается, что апоптотическая гибель может

быть инициирована ФДТ, как правило, при умеренном повреждении (например, при использовании низких доз света). Наконец, незначительное повреждение вызывает аутофагию, скорее всего, адаптивную аутофагию, которая, в зависимости от степени повреждения, может дополнительно запускать другие механизмы регулируемой гибели клеток [115, 131]. Принимая это во внимание, можно сделать вывод, что *in vivo* в опухоли, подвергнутой ФДТ, одновременно индуцируются различные формы гибели клеток. Ожидается, что на поверхности опухоли, где поток фотонов выше, и в областях, расположенных ближе к кровеносным сосудам опухоли, окислительный стресс будет сильнее, что приведет к случайному некрозу. Напротив, клетки в более глубоких областях, дальше от кровеносных сосудов, могут погибнуть в результате регулируемых форм гибели клеток (например, апоптоза), а аутофагия ожидается в областях, где образуется меньше АФК.

3.1.1. Апоптоз

Апоптоз представляет собой регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, классифицируемый по двум основным путям: внутреннему (или митохондриальному) и внешнему (рецептор-зависимому). Первый путь может быть инициирован посредством внутриклеточных или внеклеточных нарушений, связанных с пермеабиллизацией внешней мембраны митохондрий. Это завершается активацией эффекторных каспаз (каспазы 3 и 7). Внешний путь возникает, когда нарушение во внеклеточной среде детектируется рецепторами плазматической мембраны, при специфическом участии каспазы 8, и также заканчивается активацией эффекторных каспаз. В обоих случаях целостность плазматической мембраны всегда поддерживается *in vivo*, при этом умирающие клетки и апоптотические тельца быстро удаляются иммунными клетками с фагоцитарной активностью (например, макрофагами), тогда как *in vitro* происходит разрушение мембраны, обычно обозначаемое как вторичный некроз [56].

Внутренний апоптоз является наиболее распространенным путем апоптотической гибели клеток при ФДТ. Это строго регулируемый путь, управляемый семейством В-клеточной лимфомы 2 (BCL-2), которое, в соответствии с организацией домена гомологии BCL-2 (BH), делится на

антиапоптотические и проапоптотические белки. Подсемейство антиапоптотических белков имеет все четыре домена BH (BH1, BH2, BH3 и BH4) и включает сам BCL-2, очень большой BCL (BCL-X_L), миелоидно-клеточный лейкоз-1 (MCL-1), BCL-подобный 2 (BCLL2, известный как BCL-W), и белки-члены семейства BCL A1 (BFL-1). К проапоптотическим белкам относятся белки с доменами BH1, BH2 и BH3 (например, BCL-2-ассоциированный X-белок (BAX), антагонист-киллер BCL-2-подобный белок 1 (BAK1) и регулятор апоптоза семейства BCL-2 (BOK)) и белки, содержащие только домен BH3 (например, промотор ассоциированной с BCL-2 смерти (BAD), взаимодействующий домен BH3 агонист смерти (BID), p53-активируемый модулятор апоптоза (PUMA), взаимодействующий с BCL-2 медиатор клеточной гибели (BIM) и форбол-12-миристан-13-ацетат-индуцируемый белок 1 (PMAIP1, наиболее известный как NOXA) [171].

Внутренний апоптоз может быть результатом прямого повреждения митохондрий или косвенно стимулироваться сигнальными путями, активируемыми из-за повреждения других клеточных структур. Стойкое нарушение гомеостаза в местах, альтернативных митохондриям (например, ЭПР), вызывает активацию белков BID, BIM, PUMA и NOXA, состоящих только из BH3, которые, в свою очередь, активируют белки BAX и BAK1 для образования пор на внешней митохондриальной мембране. Этот этап пермеабиллизации митохондриальной мембраны является необратимым и запускает диссипацию потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi_m$) и высвобождение митохондриальных белков (например, второго митохондриального активатора каспаз (SMAC) и цитохрома c) в цитозоль клетки. SMAC связывается с членами семейства белков-ингибиторов апоптоза (IAP), включая X-связанный ингибитор апоптоза (XIAP), который, как известно, физически блокирует каспазы. Цитохром c связывается с APAF1 и прокаспазой 9 с образованием комплекса, известного как апоптосома, запускающего активацию каспазы 9, которая, в свою очередь, опосредует протеолитическую активацию эффекторных/исполнительных каспаз 3 и 7. Каспазы расщепляют разные клеточные субстраты, что приводит к

морфологическим и биохимическим изменениям, обычно наблюдаемым при апоптозе. Это включает экстернализацию фосфатидилсерина и фрагментацию ДНК, вызванную каспазой 3. Активированные ВАХ и ВАК также могут вызывать пермеабиллизацию мембраны ЭПР, что способствует высвобождению шаперонов и Ca^{2+} в цитозоль клетки. Ca^{2+} поглощается митохондриями и способствует их пермеабиллизации. Пермеабиллизация митохондриальной мембраны может быть прервана антиапоптотическими членами семейства BCL-2 (собственно BCL2, BCL-X_L, MCL-1, BCL-W, BFL-1), которые обычно связаны с наружными митохондриальными мембранами и мембранами ЭПР. Они ингибируют апоптоз, напрямую воздействуя на проапоптотические белки семейства BCL-2, а именно ВАХ и ВАК, предотвращая их олигомеризацию и порообразующую активность посредством физической секвестрации на внешней митохондриальной мембране и действуя опосредованно путем ингибирования белков-активаторов апоптоза, содержащих только ВНЗ-домен [56, 171].

В ряде работ показано, что при проведении ФДТ с различными фотосенсибилизаторами на разных клеточных линиях наблюдается изменение уровней членов семейства BCL-2. Обычно отмечается повышенное соотношение про- и антиапоптотических белков, такое как соотношение ВАХ/BCL-2. Накопление ФС в митохондриях было связано с разрушением антиапоптотических белков, таких как BCL-2. Это наблюдалось при ФДТ с аминолевулиновой кислотой (АЛК) [90, 141], фотосенсибилизатором на основе фталоцианина кремния(IV) («Pc4») [147, 176], этиопурпурином олова («SnET2», (дихлор)(2-этоксикарбонил-2,7,12,17-тетраэтил-3,8,13,18-тетраметилциклопента[ат]порфирилат)олова(IV)), 9-капроилокси-2,7,12,17-тетра(метоксиэтил)порфицен («CPO»), темпорфином или фталоцианинатом цинка (II). Напротив, было обнаружено, что ВАХ активируется на митохондриальной мембране. Это коррелировало с высвобождением митохондриальных белков, таких как цитохром с. Фотосенсибилизаторы, воздействующие на ЭПР и аппарат Гольджи, такие как гиперидин и редапорфин, также могут активировать внутренний путь апоптоза. В обоих случаях наблюдались повышенные уровни цитозольного Ca^{2+} , вероятно, отражающие

прямое повреждение ЭПР. При связывании Ca^{2+} с помощью ВАРТА было обнаружено снижение цитотоксичности [64]. ФДТ с гиперацином продемонстрировала разрушение антиапоптотического BCL-XL [99], а также активацию плеча PERK-eIF2 α при стрессе ЭПР с индукцией нижестоящего игрока CHOP. CHOP является проапоптотическим фактором транскрипции, который увеличивает экспрессию проапоптотических белков BIM и NOXA с последующей активацией BAX и BAK [64, 90, 95, 99, 138, 141, 147, 167, 176]. Подавление NOXA, но не BIM, уменьшало гибель клеток. Кроме того, клетки PERK KO были менее чувствительны к фотоповреждению после ФДТ с гиперацином, что было связано с неспособностью этих клеток активировать NOXA. NOXA был независимым от CHOP, что позволяет предположить, что PERK регулирует апоптоз двумя независимыми путями: индукцией CHOP и активацией NOXA [80]. В другом исследовании с ФДТ с гиперацином было продемонстрировано, что активация BAX и/или BAK приводит к более высокой фототоксичности, тогда как их ингибирование снижает гибель клеток, хотя и не полностью. Это говорит о том, что задействованы другие механизмы, вероятно, независимые от каспаз. Фактически, клетки дикого типа (WT) демонстрировали типичные признаки апоптоза, тогда как клетки KO для BAX и BAK демонстрировали усиленную цитозольную вакуолизацию. Первое было предотвращено вортманнином (ингибитором PI3K), но не zDEVD-fmk (ингибитором каспазы), что позволяет предположить, что в отсутствие проапоптотических белков BAX и BAK при ФДТ с гиперацином приводит к зависимой от аутофагии гибели клеток вместо апоптоза [23, 24]. Недавняя работа показала, что ФДТ с редапорфином вызывает быстрое расширение и вакуолизацию ЭПР и комплекса Гольджи (КГ), а также снижение уровня нескольких белков этих органелл. ФДТ на основе редапорфина приводила к развитию внутреннего пути апоптоза, а именно: вызывая транслокацию BAX в митохондрии и митохондриальное высвобождение SMAC с частичной зависимостью от каспаз, BAX и BAK. Нарушение функции или гомеостаза КГ с помощью брефельдина А или голгицида А снижало пермеабиллизацию митохондрий и, как следствие, гибель клеток, опосредованную ФДТ с

редапорфином. Напротив, удаление проапоптотических белков ВАХ и ВАК или предварительная обработка ингибитором панкаспазы Z-VAD-fmk уменьшали гибель клеток, но не влияли на нарушение КГ. Эти эффекты были смягчены липофильным антиоксидантом токоферолом, что свидетельствует о том, что они были опосредованы АФК [64, 65]. Было показано, что ФДТ с протопорфирином IX или его производными вызывает гибель клеток, активируя апоптоз через внутренний путь [51].

3.1.2. Некроз

3.1.2.1. Случайный некроз (нерегулируемая гибель клеток)

Некроз или случайная гибель клеток представляет собой быструю и нерегулируемую форму гибель клеток, вызванную острым, сильным, физическим или химическим повреждением. Этот процесс приводит к выходу из строя ионных насосов в плазматической мембране, что сопровождается повышенной проницаемостью мембраны, приводит к притоку воды и ионов, набуханию клеток и органелл, вздутию цитоплазмы и скоплению хроматина [152]. Некроз рассматривается как пассивный процесс, поскольку в отличие от регулируемых способов гибели клеток он не требует синтеза белка, энергии или регуляции сигнальными путями. Некоторые исследования указывают на важную роль митохондрий, ЭПР и лизосом в процессе некроза [49]. Например, разрушение лизосом опосредует высвобождение в цитоплазму многочисленных ферментов, а именно протеаз, таких как катепсины и кальпаины. Также наблюдается повышенный цитоплазматический Ca^{2+} , что имеет решающее значение для активации семейства кальпаинов и для транслокации цитозольной фосфолипазы A_2 в клеточные мембраны, которые вместе опосредуют разрушение клеточной мембраны [152]. Разрушение плазматической мембраны высвобождает все клеточное содержимое, что приводит к сильному воспалению [53]. Общеизвестно, что высокие дозы ФДТ, либо с применением высокой концентрации фотосенсибилизатора, либо с применением высоких доз света, имеют тенденцию к гибели клеток путем некроза [108, 110, 133, 135].

Некроз также вызывают фотосенсибилизаторы, обладающие тропностью к клеточной мембране, которые при фотоактивации опосредуют потерю целостности мембраны и истощение АТФ. Понятно, что короткие периоды инкубации способствуют накоплению ФС в плазматической мембране, тогда как более длительные периоды инкубации способствуют накоплению ФС в различных органеллах. Клетки, инкубированные с Фотофрином в течение короткого периода времени (например, 1 час или 3 часа), демонстрировали накопление фотосенсибилизатора преимущественно в плазматической мембране, тогда как более длительное время инкубации (24 часа) приводило к преимущественному накоплению фотосенсибилизатора в КГ. В первом случае при фотоактивации клетки погибали путем некроза, тогда как апоптоз наблюдался, когда органеллой-мишенью был КГ [40, 83]. Аналогичные результаты наблюдались при ФДТ с фталоцианином цинка (II). После короткого периода инкубации (2 ч) индуцировался некротический фенотип, который коррелировал с потерей мембранных функций, тогда как та же концентрация после 24 часов инкубации вызывала повреждение КГ и гибель клеток путем апоптоза [48]. Другое исследование ФДТ с использованием гликозилированного хлорина в качестве фотосенсибилизатора (GLc₄) также показало, что короткие периоды инкубации (2 часа) удерживают ФС на плазматической мембране, что приводит к некрозу и демонстрирует накопление плазматической мембраны в качестве предпочтительной мишени для некроза [157].

3.1.1.2. Некроптоз (регулируемая форма некроза)

В настоящее время общепризнано, что некроз также может возникать строго регулируемым образом. Появились множественные пути регулируемого некроза, такие как некроптоз, партанатоз, окситоз, ферроптоз, нетоз, пиронекроз и пироптоз. В целом эти формы регулируемого некроза морфологически сходны с нерегулируемой формой некроза с высвобождением содержимого клетки во внеклеточное пространство, цитоплазматической грануляцией, набуханием клеток и органелл. Некроптоз является наиболее понятным примером регулируемого

некроза и единственным механизмом, уже идентифицированным в нескольких исследованиях ФДТ. Некроптоз запускается, когда нарушения (сигналы стресса, как внутриклеточные, так и внеклеточные) обнаруживаются рецепторами смерти (например, TNFR1, FAS, PRR), особенно при ингибировании каспаз (а именно, каспазы 8). Одним из наиболее известных триггеров (импульсов) некроптоза является комбинация TNF α , миметика SMAC и ингибитора пан-каспазы. TNF α обнаруживается с помощью TNFR1, который затем привлекает FADD и взаимодействующие с рецептором протеинкиназы 1 (RIPK1) и 3 (RIPK3). Взаимное фосфорилирование RIPK1 и RIPK3 индуцирует образование мультипротеинового комплекса RIPK1-RIPK3, известного как некросома, который стимулирует некроптоз путем рекрутирования белка, подобного домену киназы смешанного происхождения (MLKL). Последний фосфорилируется RIPK3, что запускает олигомеризацию MLKL и его транслокацию на плазматическую мембрану. Это опосредует проницаемость плазматической мембраны и, следовательно, гибель клеток [154, 165].

Недавно в ряде работ был выделен некроптоз как механизм гибели клеток, активируемый ФДТ. После ФДТ с 5-ALA сразу же следовал аутофагический механизм выживания, который зависел от фосфорилирования TSC2. Было показано, что этот механизм уравнивается активацией RIPK3, который дефосфорилирует TSC2, ингибируя его действие на выживание и индуцируя механизм некроптоза клеток [50]. Интересно, что некроптоз происходит в отсутствие миметиков SMAC и ингибиторов каспаз и характеризуется некрсомой RIPK1-RIPK3, в которой отсутствуют casp8 и FADD. В соответствии с этими наблюдениями меньшая гибель клеток была получена, когда ФДТ с 5-ALA выполнялась после предварительной обработки некростатином 1 (NEC1, ингибитором RIPK1) или подавлением RIPK3 [36]. ФДТ с фотосенсибилизатором талапорфином натрия также убивает опухолевые клетки по механизму некроптоза, о чем свидетельствуют более низкие уровни гибели клеток, наблюдаемые при предварительной обработке NEC1 или, альтернативно, подавлении RIPK3 или MLKL [111].

ФДТ с мезо-тетракис-(4-карбоксифенил)-порфирина-натриевой пластиной ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{TCPP}$) и его цинковым производным Na-ZnTCPP , испытанная на неопухолевых (MCF-10A) и опухолевых (SKBR3) линиях эпителиальных клеток молочной железы, индуцировала различные типы гибели клеток. Интересно, что опухолевые клетки в основном демонстрировали признаки апоптоза или случайного некроза, тогда как незлокачественные клетки демонстрировали признаки случайного некроза, а также форму регулируемого некроза, известную как партанатос. Партанатос характеризуется фрагментацией ядра, отсутствием пузырей мембран, деполяризацией митохондрий, транслокацией фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), из митохондрий в ядро и зависимостью от поли(АДФ-рибозо)полимеразы (PARP) [144]. Поскольку эти способы регулируемой клеточной гибели становятся все более известными и признанными, вполне вероятно, что будущие работы будут сосредоточены на регулируемом некрозе с помощью ФДТ с использованием различных фотосенсибилизаторов.

3.1.3. Аутофагия

Увеличение количества АФК может также стимулировать третий тип гибели клеток, аутофагию, событие, включающее избирательное разрушение клеточных компонентов. В стрессовых ситуациях, например, лишение питательных веществ, аутофагия способствует выживанию клеток (и росту опухоли), участвуя в обновлении белков и удалении поврежденных органелл [103, 126]. Однако, на очень поздних стадиях аутофагии может вызвать гибель клеток [100]. В любом случае после ФДТ была выявлена генерация аутофагического ответа, но сообщалось о двойном действии, поскольку оно может вызывать либо стимул выживания, либо усиление пути смерти [173].

Аутофагия – это лизосомальный путь деградации белков и клеточных органелл. В зависимости от пути доставки цитоплазматического материала в просвет лизосом известны три различных пути аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия [21, 92, 104, 129, 137, 174].

При макроаутофагии часть цитоплазмы, подлежащая деградации, сначала заворачивается внутрь специализированной органеллы, аутофагосомы, которая затем сливается с лизосомными везикулами и доставляет поглощенную цитоплазму для деградации. При микроаутофагии сама лизосомальная мембрана изолирует часть цитоплазмы посредством процесса, напоминающего отщипывание фагосом или пиносом от плазматической мембраны [104, 137, 174]. При шаперон-опосредованной аутофагии белки, обладающие специфическим сигналом последовательности, транспортируются из цитоплазмы через лизосомальную мембрану в просвет лизосом [21, 92].

3.1.4. Ферроптоз

Ферроптоз – это особая форма апоптоза, запускаемая накоплением цитозольных и липидных железозависимых активных форм кислорода (АФК) [55, 148]. Глутатионпероксидаза GPX4 катализирует восстановление перекисей липидов с использованием восстановленного глутатиона, функционируя как «центральный переключатель» для защиты клетки от ферроптоза [177]. Различные типы опухолевых клеток, включая лимфому, меланому, рак желудка и нейробластому, восприимчивы к ферроптозу [20, 74, 75, 160]. Дедифференцировка клеток меланомы, наблюдаемая при развитии резистентности к ингибиторам тирозинкиназы, происходит вместе с повышенной чувствительностью к ферроптозу [160]. Наличие мезенхимальноподобных клеточных особенностей (таких как повышенная экспрессия ZEB1) и повышенное накопление продуктов окисления липидов создают зависимость от GPX4. Эта зависимость может быть исследована как терапевтическая уязвимость в резистентных к лечению опухолях и может уничтожить остаточные опухолевые клетки и, таким образом, уменьшить рецидив заболевания [73]. Зависимость этого состояния мезенхимы от GPX4 вызвала интерес к терапевтическим стратегиям, основанным на индукции ферроптоза с использованием прямых ингибиторов GPX4 (таких как витаферин А, ML-210 и RSL3) [75, 142, 170 177], модуляторов уровня глутатиона (например, бутионин сульфоксимин) [177], ингибиторов цистеин-глутаматного антипортера

(такие как эрастин и сульфасалазин) или низкомолекулярного мультикиназного ингибитора сорафениба [43, 68, 148]. Наночастицы, несущие аферин А или другие химические вещества, могут вызывать ферроптоз в различных мышиных моделях рака [75, 97, 181]. p53 регулирует клеточную чувствительность к ферроптозу, что, возможно, вносит вклад в супрессорную функцию этого фактора транскрипции. В условиях окислительного стресса p53 способствует ферроптозу путем подавления цистеин-глутаматного антипортера SLC7A11, тем самым снижая поглощение клетками цистина [87]. В линиях опухолевых клеток с дефицитом TP53, подвергающихся метаболическому стрессу, восстановление p53 дикого типа защищает от ферроптоза [156]. Дальнейший прогресс в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе ферроптоза, может позволить разработать новые терапевтические стратегии, нацеленные на этот процесс, чтобы контролировать рост опухолевых клеток [76].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культуры клеток и условия культивирования

В работе были использованы линии клеток: ПФЧ (постнатальные фибробласты человека), С6 (глиома крысы), В16 (меланома мыши), НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека), НСТ116p53КО (сублиния аденокарциномы толстой кишки человека, характеризующаяся делецией гена *TP53*, который связан с развитием множественной лекарственной устойчивости в опухолях и увеличением резистентности опухоли к терапии), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), MCF-7/Dox (сублиния аденокарциномы молочной железы, устойчивая к доксорубину; фенотип Pgp-опосредованной МЛУ), SKOV-3 (аденокарцинома яичника), SKOV-3/CDDP (сублиния аденокарциномы яичника, устойчивая к цисплатину). Резистентность клеток к цисплатину получена путем ступенчатого повышения концентрации цитостатика в культуральной среде. Для исследований были использованы клеточные культуры в логарифмической фазе роста.

Клетки культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; ПанЭко, Россия), в которую добавляли 10% эмбриональную телячью сыворотку (HyClone, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко), 100 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко). Культуры клеток культивировали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С.

2.2. ФБХ и его производные

ФБХ и его производные были получены в лаборатории тонкого органического синтеза Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН к.х.н. А.В. Зайцевым и к.х.н. В.А. Ольшевской. Структуры всех новых соединений подтверждена данными ¹H- и ¹³C-ЯМР спектроскопии. БХ и ФХ растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до 10 mM, ФБХ растворяли в воде до 10 mM, растворы хранили при 4 °С.

2.3. Оценка экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени

Оценка экспрессии гена проводилась методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Общая РНК из исследуемых образцов (5×10^5 клеток) была выделена с использованием реагента Тризол (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Для синтеза первой цепи кДНК использовали 1,5 мкг суммарной РНК каждого образца (матрицы) и набора Mint для обратной транскрипции (Eurogen) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР в реальном времени проводили на системе ПЦР в реальном времени 7500 (AppliedBiosystems) с qPCRMix-HS SYBR + LowROX (Eurogen) и специфическими праймерами путем амплификации в объеме 20 мкл в соответствии со следующей программой: 95 °С 10 мин, затем 40 циклов: 95 °С 15 с, 60 °С 30 с, 72 °С 20 с. Ген β -актина служил эталонным геном. Результаты были обработаны с использованием программного обеспечения, поставляемого с оборудованием (AppliedBio-systems 7500 Software v2.0.6). Праймеры, использованные в исследовании, приведены в таблице 2.

Таблица 1. Праймеры, использованные для проведения ПЦР в реальном времени.

Ген	Праймер
NOX5	5'-GTGCTACAATCGATGGGCCTTATG-3' (прямой) 5'-CCCCGTGATGGAGTCTTTCTTC-3' (обратный)
CAT	5'-GCAGATACCTGTGAACTGTC-3' (прямой) 5'-GTAGAATGCCCGCACCTGAG-3' (обратный)
HO-1	5'-ATGGCCTCCCTGTACCACATC-3' (прямой) 5'-GCGAAGACTGGGCTCTCCT-3' (обратный)
SOD1	5'-TGGGCAAAGGTGGAAATGAA-3' (прямой) 5'-GCGATCCCAATTACACCACAA-3' (обратный)
SOD2	5'-AGCTATTTGGAATGTAATCAACTGG-3' (прямой) 5'-TAAGCAACATCAAGAAATGCTACA-3' (обратный)
Gpx1	5'-GGCTCCCTGCGGGGCAAGGT-3' (прямой) 5'-AAGCGGCGGCTGTACCTGCG-3' (обратный)
NRF2	5'-CCAGCTATGGAGACACACTAC-3' (прямой) 5'-TGTGAGATGAGCCTCCAAGCG-3' (обратный)
β -actin	5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3' (прямой) 5'-TCGTCATACTCCTTGCTTGCTGATCC-3' (обратный)

2.4. Оценка внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов

Клетки рассеивали на 35 мм чашки Петри накануне эксперимента в логарифмической фазе (150 000 клеток в 3 мл культуральной среды), инкубировали в течение 24 часов, после обработали 5 мкМ ФБХ, БХ и ФХ. Образцы инкубировали при 37 °С, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере в течение 24, 48, 72 часов. После окончания инкубации культуральную среду отбрасывали, клетки открепляли версеном (500 мкл), помещали в CO₂-инкубатор на 10 мин. Осторожно пипетировали для снятия монослоя со дна. Открепленные клетки осаждали, супернатант отбрасывали, клетки суспендировали в 200 мкл ледяного PBS. Суспензию клеток в PBS переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра, выставляли в лед, затем измеряли флуоресценцию.

Результаты эксперимента представлены в виде гистограмм распределения яркости суспензии клеток, нагруженных 5 мкМ ФХ, БХ, ФБХ в разные промежутки времени (флуоресценция соединений в клетках). Свечение клеток выражали в условных единицах яркости (средний канал флуоресценции). Для каждого образца накапливали 10 000 событий.

2.5. МТТ-тест для определения темновой токсичности ФБХ

Для исследования клеток на жизнеспособность использовали метод МТТ [Mosmann T., 1983]. Согласно методике, клетки были рассеяны в 96-луночные планшеты и инкубировались 72 часа с раствором ФБХ, разведенным до стандартных концентраций. После инкубации в лунки добавляли МТТ-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол), который живые клетки способны восстанавливать за счет дегидрогеназ до фиолетового кристаллического формазана. Мертвые, нежизнеспособные клетки не способны к восстановлению МТТ-реагента. Интенсивность превращения МТТ-реагента в формазан отражает общий уровень дегидрогеназной активности клеток, что определяет количество выживших клеток и, следовательно, цитотоксический эффект тестируемых веществ. Количественным показателем данного метода является изменение

интенсивности окраски раствора формазана в ДМСО, измеряемое колориметрически.

Методика проведения теста проводилась по следующему протоколу. «Клетки прикрепляли от субстрата раствором Версена, подсчитывали в камере Горяева и суспендировали в культуральной среде DMEM до концентрации 25 000 клеток/мл. В лунки 96-луночного планшета (NUNC, США) вносили 200 мкл клеточной взвеси (~ 5000 клеток), инкубировали в течение суток при 37 °С, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В день эксперимента вносили по 5-10 мкл раствора фотосенсибилизатора в культуральной среде, приготовленного серийными разведениями из исходного водного раствора (10 мМ) до конечных концентраций (0,1-50 мкМ). Клетки инкубировали 72 часа при 37 °С, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. За 2 часа до окончания инкубации каждую лунку обрабатывали 20 мкл водного раствора МТТ (Sigma, США; 5 мг/мл). После окончания инкубации культуральную среду удаляли, клетки ресуспендировали в 100 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора при 571 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (ThermoScientific, США). Процент клеток, выживших при действии конкретной дозы вещества, подсчитывали делением средней оптической плотности в лунках после инкубации с данной дозой на среднюю оптическую плотность контрольных лунок (значения последних приняты за 100%). Оценку действия каждой концентрации соединения изучали в 3 повторах» [Романова и др., 2008].

2.6. Оценка фотоактивности ФБХ методом флуоресцентной микроскопии

Клетки рассеивали в 35-мм чашки Петри в концентрации 1 250 000 клеток в 5 мл культуральной среды. В чашки вносили раствор ФБХ до конечной концентрации 5 мкМ. Культуры инкубировали при 37 °С в атмосфере с 5% содержанием CO₂ в течение 24 часов для максимального накопления. Затем среду удаляли и добавляли 1 мл фосфатно-солевого буфера. После чего освещали белым светом (30 Дж/см², 20 минут). В каждую чашку добавляли пропидия йодид до конечной концентрации 0,01 мг/мл. Погибшие клетки идентифицировали при

помощи флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss, используя 20-кратный объектив или 200-кратное увеличение.

2.7. Оценка фотоактивности ФБХ с помощью МТТ-теста

Клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета (NUNC, США) (5000 клеток в 190 мкл культуральной среды), инкубировали 24 часа при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. Вносили по 2-10 мкл раствора ФБХ в культуральной среде, приготовленных серийными разведениями из исходного раствора, до 6 конечных концентраций от 0,5 до 5 мкМ.

Контролем в эксперименте служили клетки без фотосенсибилизатора. Клетки инкубировали 24 часа, по окончании инкубации клетки освещали 20 минут светодиодным источником (длина волны 660 нм, мощность 27 мВт). Выживаемость клеток оценивали методом МТТ теста.

2.8. Оценка жизнеспособности опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии при окрашивании клеток Annexin V-FITC в комбинации с PI

Клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP рассеивали в 35-мм чашки Петри в концентрации 150 000 клеток в 3 мл культуральной среды. Инкубировали 24 часа при 37 °C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. Клетки инкубировали с 5 мкМ ФБХ в течение 24 часов, затем часть клеток осветили белым светом. После окончания инкубации и освещения клетки открепляли версеном (500 мкл), помещали в CO₂-инкубатор на 10 мин. Осторожно пипетировали для снятия монослоя со дна. Открепленные клетки осаждали центрифугированием (2 000 об/мин., 2 мин).

Клетки однократно отмывали солевым фосфатным буфером (PBS; 2 000 об/мин 2-3 мин. на настольной центрифуге), добавляли 100 мкл «связывающего» буфера, клетки суспендировали, добавляли 5 мкл Аннексина V-FITC и 10 мкл пропидия йодида (PI) (5 мкг/мл).

Контроль – необработанные клетки, разделяли на 4 части:

к одной части реагенты не добавляли;

к 2-й части добавляется только Аннексин-FITC,
к 3-й части только йодид пропидия,
к 4-й части - оба красителя.

Далее клетки пипетировали и инкубировали в темноте 15 минут при комнатной температуре. Открутили клетки при 2 000 об/мин 2-3 минуты на настольной центрифуге. Надосадоk удалили, к осадку клеток добавляли 400-500 мкл связывающего буфера, помещали в лед и анализировали на проточном цитофлуориметре. Для каждого образца накапливали 10 000 событий.

2.9. Исследование клеточного цикла

150 000 клеток рассеивали на 35-мм чашки Петри в логарифмической фазе, обрабатывали 5 мкМ ФБХ и инкубировали 24 часа. В качестве контроля служили необработанные препаратом клетки.

После окончания инкубации освещали 20 минут белым светом, далее инкубировали пробы 20 минут, 3 часа, 6 часов, 24 часа. Далее переносили клетки в центрифужные пробирки и осаждали центрифугированием (1 000 об/мин., 2 мин.). К осадку клеток добавляли 0,4 мл лизирующего буфера (состав водного раствора: цитрат Na - 0.1%, NP40 - 0.3%, РНКаза А - 100 мкг/мл, пропидий йодид - 50 мкг/мл), тщательно пипетировали и перемешивали на Vortex. Распределение фаз клеточного цикла (по плоидности ДНК) анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFlex B2-R2-V0 (США). Накапливали 20000 событий для каждого образца.

Анализировали показатели в областях SubG1, G1 и G2/M.

2.10. Оценка накопления ФБХ в клетках меланомы

150 000 клеток рассеивали на 35 мм чашки Петри накануне эксперимента в логарифмической фазе, инкубировали 24 часа при 37 °С, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере, обработали 5 мкМ ФБХ. Далее инкубировали в течение 1, 2, 3, 5 и 24 часов. По окончании инкубации культуральную среду отбрасывали, клетки открепляли версеном (500 мкл), помещали в CO₂-инкубатор на 10 мин. Осторожно пипетировали для снятия монослоя со дна. Открепленные клетки осаждали

центрифугированием (2 000 об/мин., 2 мин). Супернатант отбрасывали, клетки суспендировали в 200 мкл ледяного PBS. Суспензию клеток в PBS переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра, выставляли в лед, затем измеряли флуоресценцию.

Результаты эксперимента представлены в виде гистограмм распределения яркости суспензии клеток, нагруженных 5 мкМ ФБХ в разные промежутки времени (флуоресценция соединения в клетках). Свечение клеток выражали в условных единицах яркости (средний канал флуоресценции). Для каждого образца накапливали 10 000 событий.

2.11. Оценка квантового выхода генерации синглетного кислорода

Исследование фотосенсибилизирующей способности производных хлорина проведено на основании анализа параметров фосфоресценции синглетного кислорода. Спектры фосфоресценции синглетного кислорода в ацетонитриле ($\lambda_{\max} \sim 1270$ нм) были получены при облучении ксеноновой лампой (фотовозбуждение при 511 нм, насыщенные воздухом растворы при комнатной температуре). Квантовые выходы синглетного кислорода определяли сравнением с тетрафенилпорфирином (ТФП) в качестве эталона ($\Phi_{\Delta} = 0,60$) (Ramos L. D. et al., 2017).

2.12. Оценка фотодинамического воздействия ФБХ

В работе исследовано терапевтическое действие ФБХ на перевивных опухолях. Исследования проведены на 69 мышах-гибридах первого поколения F1(CBAxС₅₇BL₆) с меланомой В16 массой 20-23 г. Опухоли перевивали под кожу в область бедра мышам в виде суспензии клеток в объеме 0,10-0,15 мл физиологического раствора NaCl (0,9%). За день до перевивки опухоли на бедре в области прививки шерстный покров выстригали и депилировали. В опыты брали мышей на 4-5 день после прививки клеток меланомы, когда диаметр опухоли был 4-6 мм. Исследование проведено на 4 группах животных:

1 группа: 5,0 мг/кг, 150 Дж/см², 0,25 Вт/см²;

- 2 группа: 5,0 мг/кг, 150 Дж/см², 0,44 Вт/см²;
- 3 группа: 5,0 мг/кг, 300 Дж/см², 0,25 Вт/см²;
- 4 группа: 10,0 мг/кг, 150 Дж/см², 0,25 Вт/см²;
- 5 контрольные группы:

- мышцы-опухоленосители без каких-либо воздействий,
- мышцы-опухоленосители, получавшие только лекарственную форму ФБХ без лазерного воздействия,
- мышцы-опухоленосители, получавшие только лазерное воздействие без введения лекарственной формы ФБХ.

Лекарственную форму ФБХ вводили внутривенно в дозах 5 и 10 мг/кг. Через 24 часа опухолевый очаг облучали монохроматическим светом (лазером) с длиной волны возбуждения 661 нм. Контролем служили животные-опухоленосители, которым не проводили никакого лечения. Время подготовки животных, краткосрочной иммобилизации с использованием наркоза и собственно освещения составляло 20-30 мин.

Опухоли получены из Банка опухолевых штаммов лаборатории комбинированной терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

На протяжении лазерного воздействия животные находились под общим тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно 1,25% раствор в объеме 0,04-0,05 мл/10 г массы). Источником лазерного излучения служил аппарат «Аткус-2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 661±1нм. Диаметр поля облучения составлял 1-1,5 см, плотность энергии излучения 150 и 300 Дж/см², плотность мощности 0,25 или 0,44 Вт/см². Время облучения зависело от используемой плотности мощности и плотности энергии. Замеры диаметров опухоли производили до введения препарата (V₀) и затем на 3, 7, 10, 14 и 21 сутки (V_t) после проведения ФДТ.

Эффективность ФДТ оценивали:

1. по динамике роста опухоли. Вычисляли объем опухоли по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi * d_1 * d_2 * d_3 \quad (1)$$

где: d_1, d_2, d_3 , - три взаимно перпендикулярные диаметры новообразования,
 V - объем опухоли (см^3).

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0} \quad (2)$$

где V_0 - объем опухоли до воздействия,

V_t - объем опухоли на определенный срок наблюдения.

2. По проценту животных с полной регрессией опухоли (ПР, %)

Под полной регрессией принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли ($K = -1,00$).

3. По торможению роста опухоли: $-1,00 < K < 0$;

4. Дополнительно оценивали процент животных с метастазами в легких.

Для определения метастазов животных по окончании срока наблюдения (21 сутки) выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. Извлеченные легкие промывали от крови, разделяли на доли и под микроскопом МБС-1 при увеличении в 12 раз подсчитывали метастатические очаги.

У мышей с полной регрессией опухоли проводили общепринятое гистологическое исследование тканей места бывшего роста опухоли. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

2.13. Оценка бор-нейтронозахватного действия

Эксперименты с потоком тепловых нейтронов проводили в университете г. Киото (Япония). Исследовали действие тепловых нейтронов как самостоятельный вид терапии и сочетанное действие фотодинамической терапии и тепловых нейтронов. Действие нейтронов изучали на культуре клеток меланомы В16 и *in vivo* на мышцах-гибридах F1(СВАхС57ВL6). Культуру В16 рассеивали на 60 мм чашки Петри (300 000 клеток в 5мл питательной среды) и облучали в реакторе 10 мин., суммарная доза 2 Гр. Прививка опухоли, процедуры с животными-опухоленосителями, определение терапевтической эффективности не отличались

от методов, использованных для ФДТ. Характеристики нейтронного пучка: в культуре меланомы B16 [^{10}B]=8.9 ppm, 3×10^5 клеток; для животных 0.2 Gy/[^{10}B] ppm, 1 MW.

2.14. Методы статистического анализа

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью программных статистических пакетов «Statistica 10» и «BioStat». Для каждого показателя проанализированы результаты трех независимых экспериментов. Значения представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M \pm SD$). Уровни значимости критериев Стьюдента и Манна-Уитни установлены равными 0,05 ($p \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внутриклеточный баланс окисления-восстановления – важнейший комплекс биохимических механизмов регуляции гомеостаза. Это равновесие поддерживает динамическое соотношение внутриклеточных сигналов, опосредующих выживание или гибель клеток. Нарушение редокс-баланса – преобладание окисления – может быть использовано в терапевтических целях, в частности, для индукции гибели опухолевых клеток. С этой целью в клетки доставляется экзогенное низкомолекулярное соединение (фотосенсибилизатор), которое при активации светом вызывает образование реактивных форм кислорода, повреждающих белки, липиды, ДНК и др., что приводит к гибели клетки. При этом не нарушается жизнеспособность окружающих клеток, не накопивших фотосенсибилизатор. Такое фотоактивируемое повреждение оказывается особенно важным для элиминации опухолевых клеток, приобретших лекарственную устойчивость (как правило, множественную). В этих клетках инактивированы ряд сигнальных каскадов гибели, поэтому невозможно рассчитывать на терапевтическое использование физиологических механизмов апоптоза. Требуется активация многих процессов, что возможно лишь при существенном сдвиге общерегуляторных механизмов, главным образом, редокс-баланса. Кроме этого, требуется создание современных «топических» фотосенсибилизаторов, локализующимися во внутриклеточных компартментах, важных для выживания (митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум). Уникальные производные природного хлорина еб получены в Институте элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН и доступны для выполнения настоящего исследования. Необходимо установить, возможно ли добиться достаточного уровня внутриклеточного окисления при активации “топических” фотосенсибилизаторов в устойчивых клетках. Иными словами, преодолеть механизм выживания таких клеток, обусловленный ограничением внутриклеточного окисления. Таким образом, актуальным для фундаментальной биохимии и важным для разработки новых лекарств является установление молекулярных механизмов редокс-баланса в опухолевых клетках и их сублиниях с

различными фенотипами лекарственной устойчивости. Внутриклеточное окисление (при активации «топических» фотосенсибилизаторов) выступает как механизм преодоления указанного равновесия и индукции многочисленных каскадов гибели.

3.1. Оценка экспрессии генов, контролирующих редокс статус клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP

Экспрессия генов, играющих значительную роль в контроле клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, была изучена при развитии лекарственной устойчивости клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 к цисплатину. Развитие лекарственной устойчивости сопровождалось усилением экспрессии генов, кодирующих ключевые антиоксидантные ферменты (SOD2, CAT, GPX1 и HO-1) и гена транскрипционного фактора Nrf2 (*NFE2L2*), контролирующего их экспрессию.

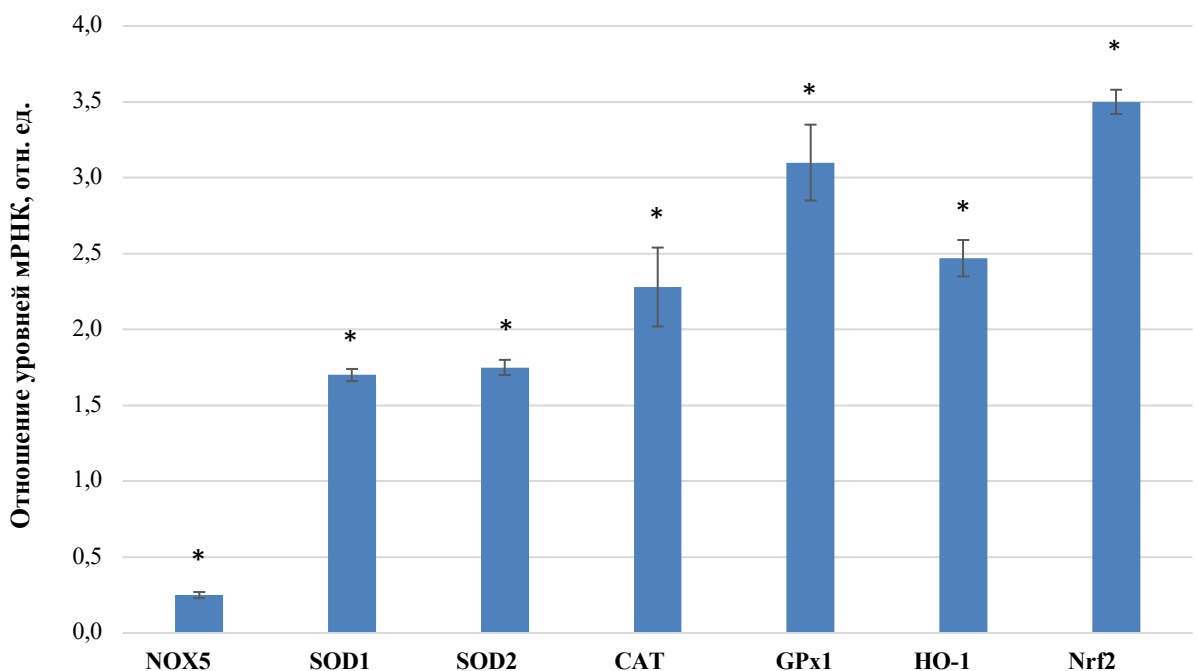


Рис. 6. Экспрессия генов NOX5, SOD1, SOD2, CAT, GPX1, HO-1 и Nrf2 в устойчивых клетках SKOV-3/CDDP относительно чувствительных SKOV-3 клеток. После нормализации β -актина определяли кратные изменения мРНК в резистентных клетках относительно данных в чувствительных клетках (принято за 1) (n = 4; * p<0,05).

В резистентных клетках SKOV-3/CDDP наблюдалось повышение уровня мРНК как цитозольной Cu, Zn-супероксиддисмутазы (SOD1), так и митохондриальной Mn-супероксиддисмутазы (SOD2) (в 1,7 раза), катализирующих дисмутацию супероксид анион-радикала в менее реакционноспособную H_2O_2 , которая в дальнейшем катаболизируется до H_2O каталазой и селен-зависимой глутатионпероксидазой.

Уровень мРНК каталазы, преимущественно локализованной в пероксисомах, и изоформы глутатионпероксидазы GPx1, локализованной как в цитозоле, так и в митохондриальном матриксе, был значительно выше (в 2,3 и 3 раза соответственно) в резистентных клетках по сравнению с чувствительными (рис. 6). В то же время развитие устойчивости опухолевых клеток к цисплатину привело к значительному снижению экспрессии изоформы NADPH-оксидазы - NOX5, активность которой вносит значительный вклад в образование АФК путем НАДФН-зависимой генерации супероксид анион-радикала. Уровень мРНК NOX5 в клетках SKOV-3/CDDP был в 4 раза ниже, чем в родительских клетках (рис. 6). Значительные изменения антиоксидантного статуса клеток SKOV-3/CDDP подтверждаются повышением экспрессии гена гемоксигеназы-1.

Полученные результаты свидетельствуют о редокс-зависимом развитии адаптивного антиоксидантного ответа как важном процессе в механизме формирования устойчивости к цисплатину.

3.2. Оценка накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках

Методом проточной цитометрии нами было проанализировано внутриклеточное накопление в опухолевых клетках SKOV-3 (дикого типа) и SKOV-3/CDDP (обладающих лекарственной устойчивостью к цисплатину) производных хлорина: ФБХ, БХ и ФХ, структура которых представлена на рис. 7.

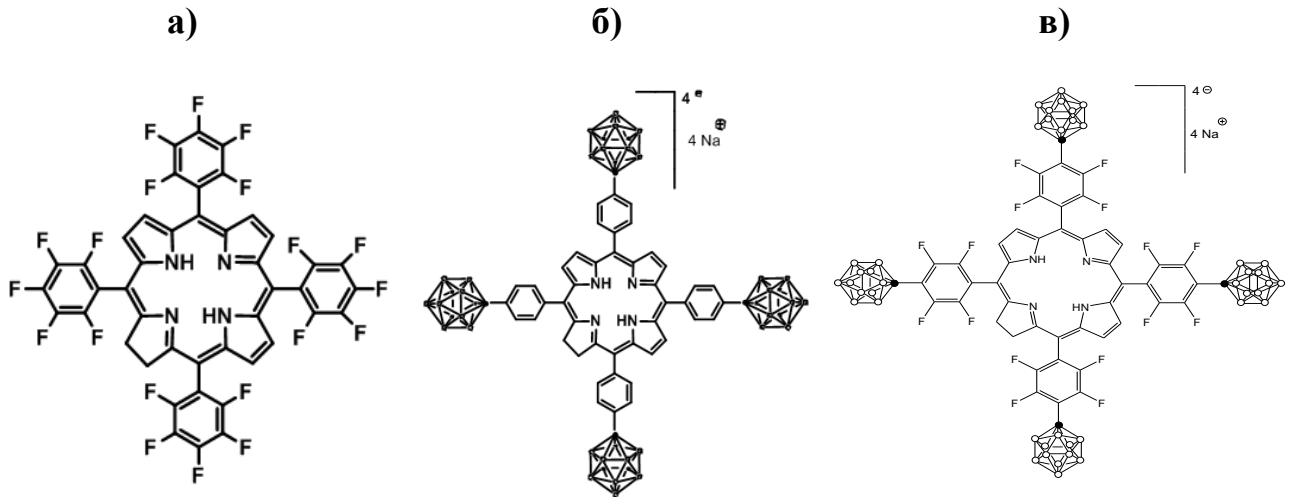


Рис. 7. Структура фотосенсибилизаторов – производных хлорина: **а)** фторхлорин (ФХ), **б)** борхлорин (БХ), **в)** фторированный карборанилхлорин (фторборхлорин, ФБХ).

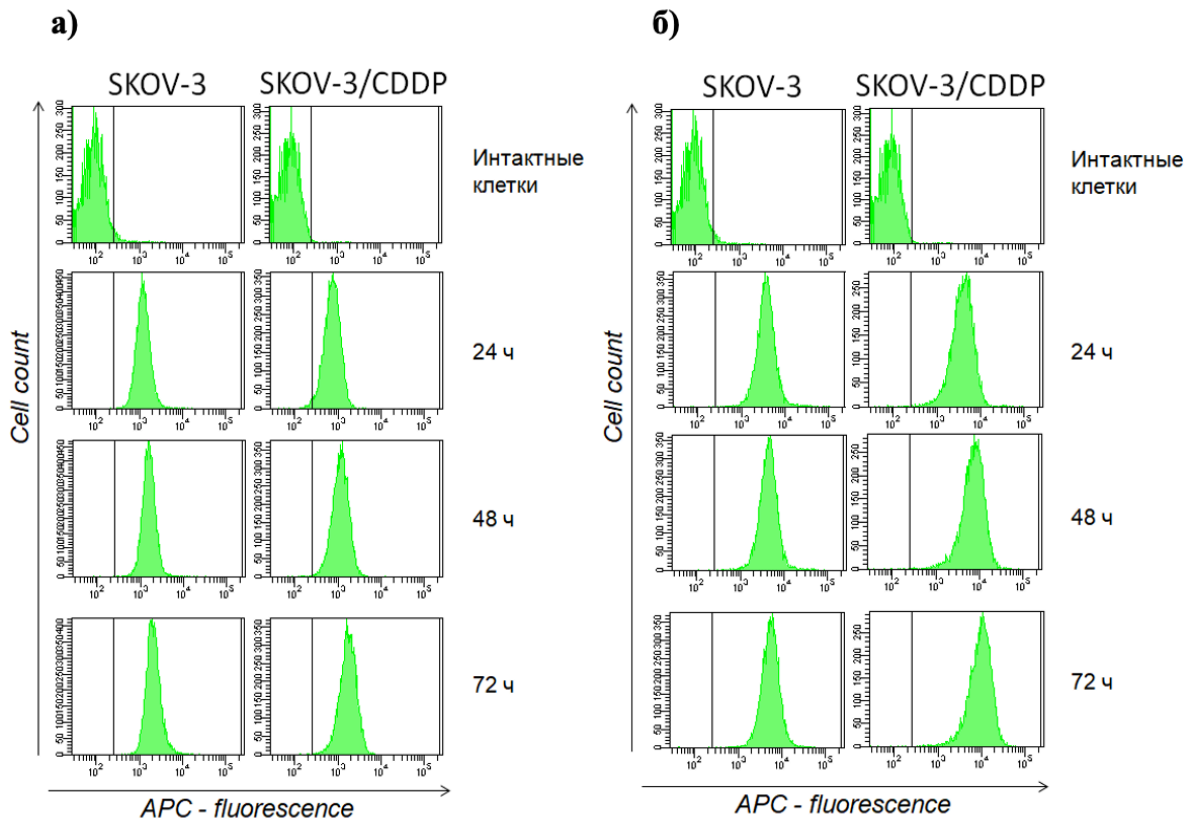


Рис. 8. Флуоресценция клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при накоплении **ФХ (а)** и **БХ (б)** 24-72 часа (по оси X – интенсивность флуоресценции; по оси Y – количество флуоресцентных “событий” (клеток)).

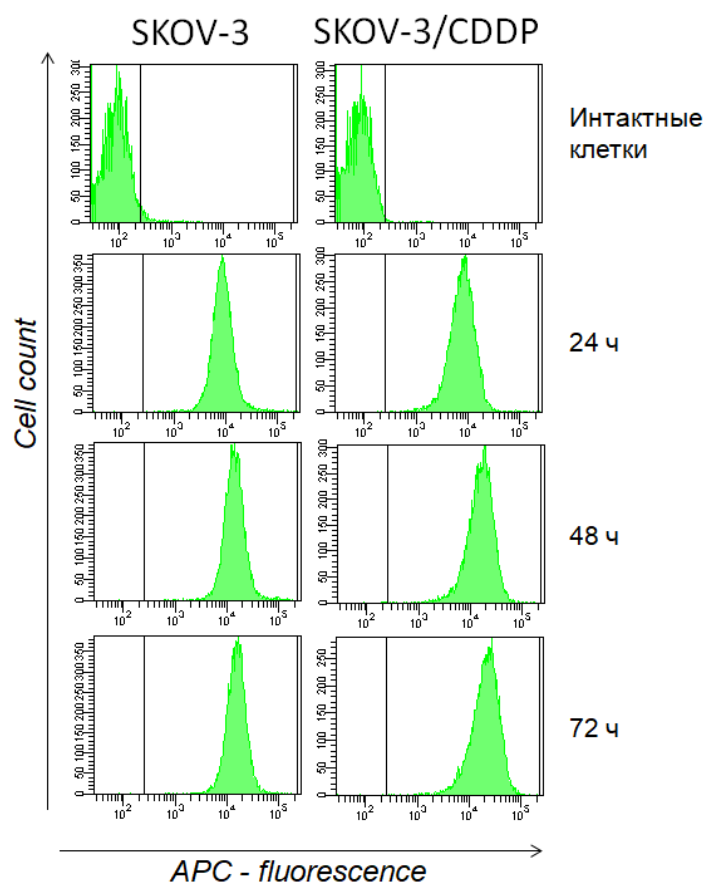


Рис. 9. Флуоресценция клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при накоплении **ФБХ** в интервале времени от 24 до 72 часов (По оси X – интенсивность флуоресценции; по оси Y – количество флуоресцентных “событий” (клеток)).

Анализ зависимости накопления производных хлорина от времени инкубации показывает, что фторхлорин быстрее накапливается в чувствительные SKOV-3 по сравнению с устойчивыми к цисплатину клетками аденокарциномы яичника SKOV-3/CDDP (рис. 8а). В отличие от ФХ, другое производное хлорина – БХ обладает более высокой скоростью накопления в опухолевых клетках (рис. 8б). При этом скорость поступления БХ в резистентные клетки выше скорости его накопления в чувствительные клетки. Появление в структуре хлорина фтора и бора усиливает способность ФБХ накапливаться в опухолевых клетках по сравнению с БХ (рис. 9, 10). Как и в случае БХ, скорость поступления ФБХ в резистентные клетки SKOV-3/CDDP выше скорости его накопления в чувствительных клетках SKOV-3.

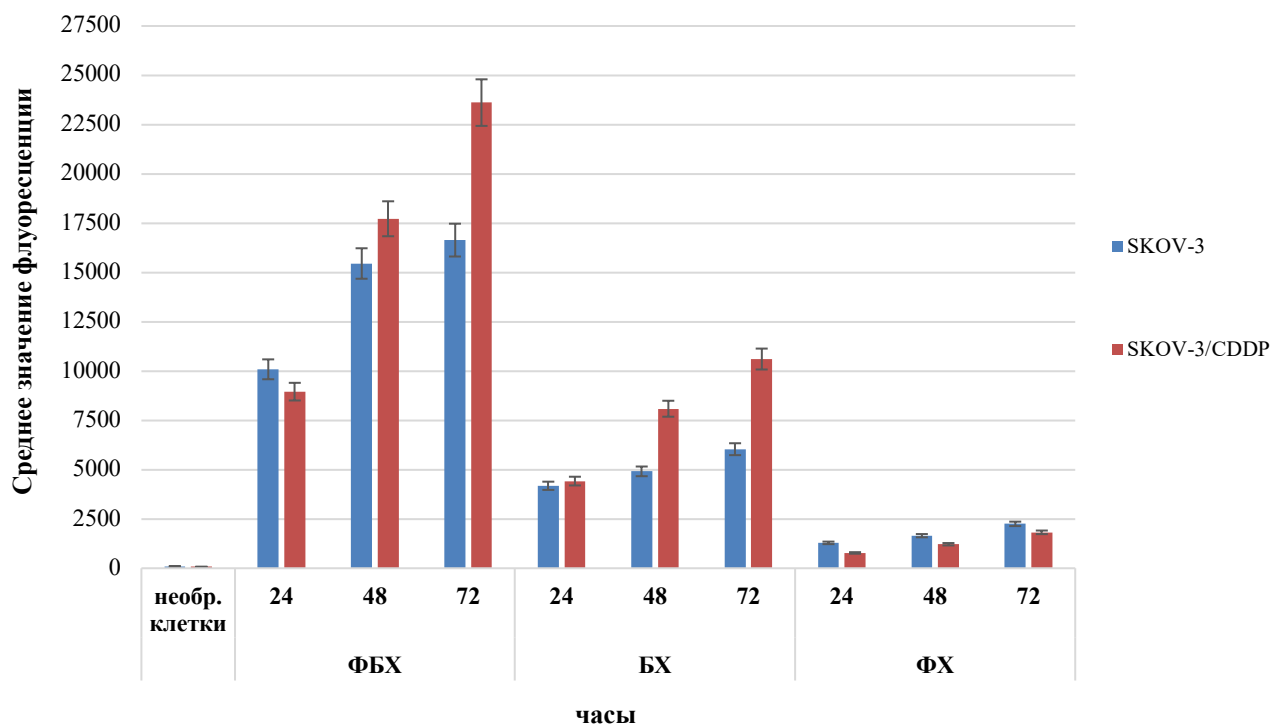


Рис. 10. Зависимость флуоресценции клеток от времени инкубации с производными хлорина - ФБХ, БХ, ФХ (n=3; p<0,05).

Внутриклеточное накопление ФБХ в клетках относительно медленное: нарастание флуоресценции довольно равномерно, что может быть обусловлено разветвленной структурой соединения и его амфифильностью.

3.3. Оценка темновой токсичности ФБХ

Для определения антинеопластической активности ФБХ был использован МТТ-тест, выявляющий концентрации, необходимые для гибели 50% опухолевых клеток культуры (показатель IC_{50}). МТТ-тест проводили после 72-часовой инкубации опухолевых клеток аденокарциномы яичника SKOV-3, сублинии аденокарциномы яичника, устойчивой к цисплатину SKOV-3/CDDP, аденокарциномы молочной железы MCF-7, сублинии аденокарциномы молочной железы, устойчивой к доксорубину MCF-7/Dox, меланомы мыши B16, глиомы крысы C6, аденокарциномы толстой кишки HCT116 с исследуемым соединением (рис. 11). В качестве контроля использованы постнатальные фибробласты человека (ПФЧ).

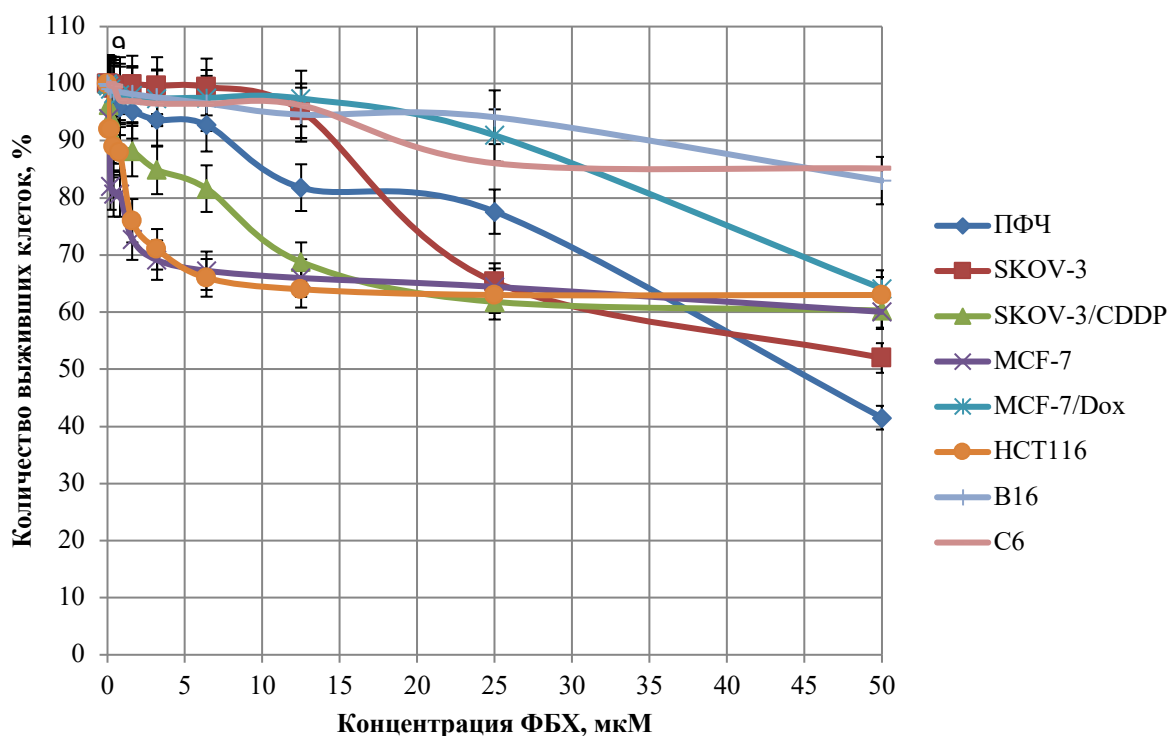


Рис. 11. Кривые выживаемости клеток при действии ФБХ, (n = 3, p<0,05) .

Таблица 2. Показатели IC₅₀ для темновой токсичности ФБХ.

Линии клеток	IC ₅₀ , мкМ
ПФЧ	44,3±0,98
SKOV-3	>50
SKOV-3/CDDP	>50
MCF-7	>50
MCF-7/Dox	>50
HCT116	>50
B16	>50
C6	>50

Полученные результаты (табл. 2) показывают, что темновая токсичность ФБХ низкая и находится в мкМ: для постнатальных фибробластов человека (ПФЧ) IC₅₀ = 44,3±0,98 мкМ, для линий аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7/Dox, аденокарциномы толстой кишки HCT116, меланомы мыши B16, глиомы крысы C6 значения IC₅₀>50 мкМ.

3.4. Оценка фототоксичности ФБХ на культурах опухолевых клеток

Была проведена оценка эффективности фотоактивации ФБХ *in vitro*. После накопления клетками ФБХ и освещения белым светом (30 Дж/см², 20 минут), в течение первых минут наблюдается быстрый фотонекроз (Moisenovich M.M. et al., 2010). Для определения доли погибших клеток к образцам добавляли пропидий йодид, который проникает в ядро только при поврежденной плазматической мембране.

По данным микроскопии (рис. 12-14), среди клеток, не получавших ФБХ, практически отсутствуют погибшие клетки (отсутствие светящихся клеток, так как мембраны остались неповрежденными). Такой же результат отмечается для опухолевых клеток после накопления ФБХ в течении 24 часов.

После освещения клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ116 и сублинии НСТ116р53КО (рис. 12), аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP (рис. 13), аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7/Dox (рис. 14), накопивших ФБХ в течение 24 часов, белым светом в течение 20 минут наблюдается их гибель, о чем свидетельствует нарастание свечения погибших клеток. Непосредственно после окончания освещения клеток, нагруженных ФБХ, йодид пропидия – маркер некроза – окрашивает ядра. Данный механизм работает для опухолевых клеток, как чувствительных, так и обладающих устойчивостью к известным противоопухолевым препаратам – доксорубицину и цисплатину.

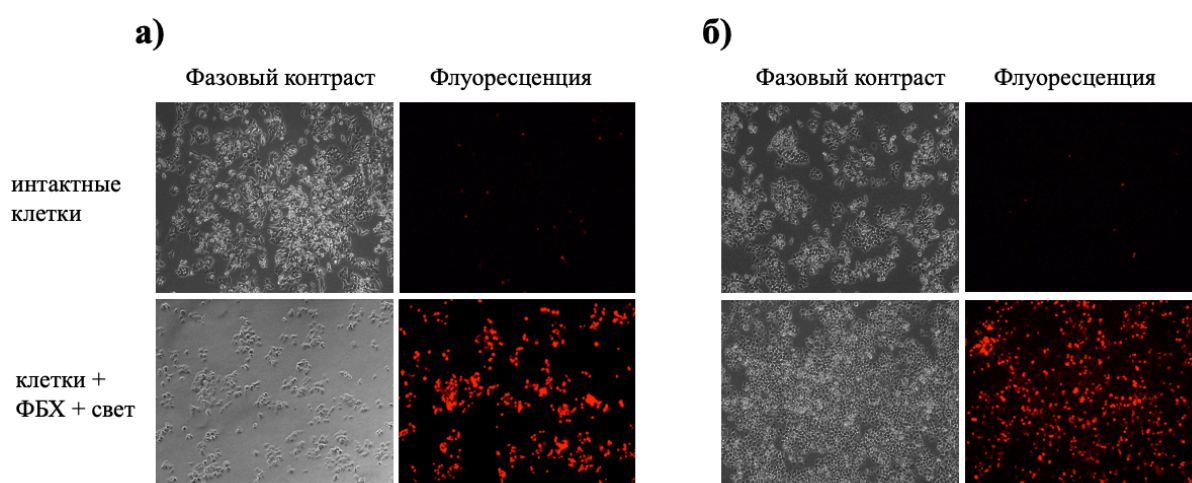


Рис. 12. Фотоповреждение клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ116 (а) и клеток изогенной сублинии НСТ116р53КО, устойчивой к ряду ДНК-повреждающих противоопухолевых препаратов, (б) в присутствии ФБХ (200-кратное увеличение).

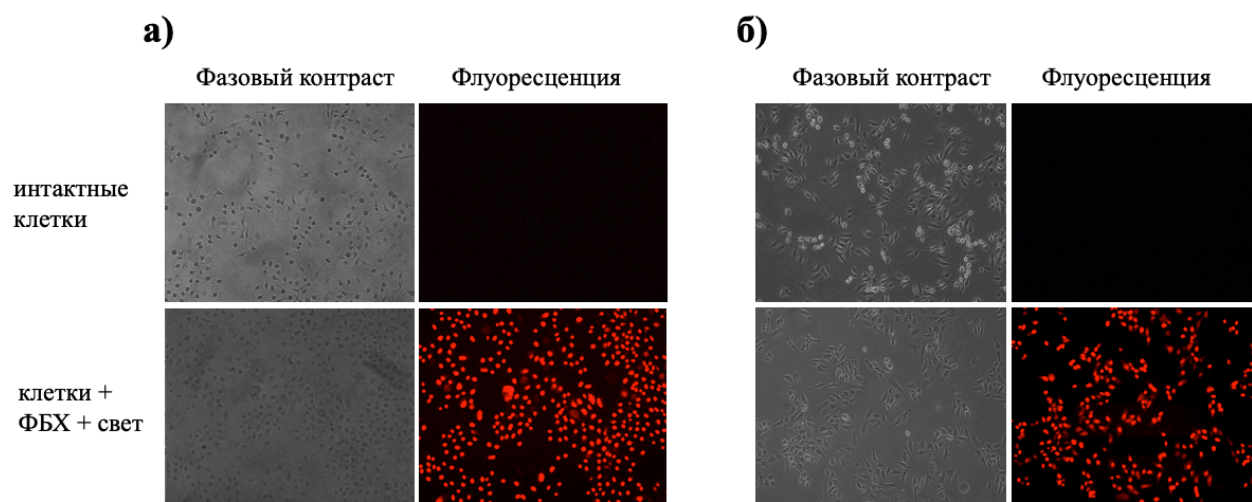


Рис. 13. Фотоповреждение клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 **(а)** и клеток сублинии аденокарциномы яичника SKOV-3/CDDP, устойчивой к цисплатину, **(б)** и в присутствии ФБХ (200-кратное увеличение).

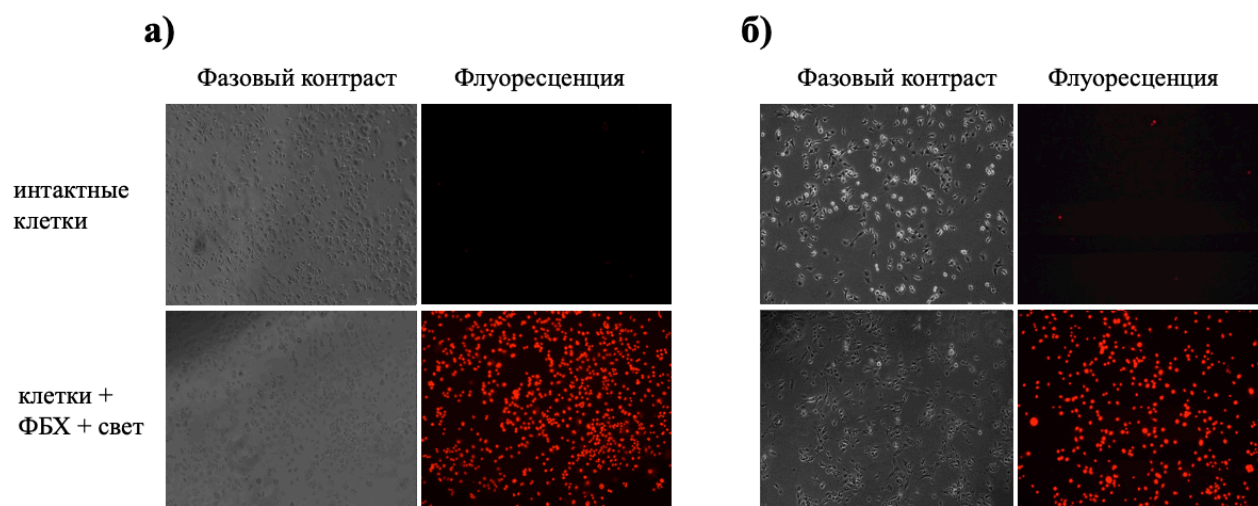


Рис. 14. Фотоповреждение клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 **(а)** клеток сублинии аденокарциномы молочной железы MCF-7/Dox, устойчивой к доксорубину, **(б)** в присутствии ФБХ (200-кратное увеличение).

3.5. Исследование фототоксичности ФБХ на опухолевых клетках, обладающих лекарственной устойчивостью

Проведены эксперименты по активации ФБХ светодиодным источником (длина волны 660 нм, мощность 27 мВт) в течение 20 минут. При фотоактивации разница при 5 мкМ ФБХ между гибелью клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP небольшая, однако при 1 мкМ - существенная разница (рис. 15).

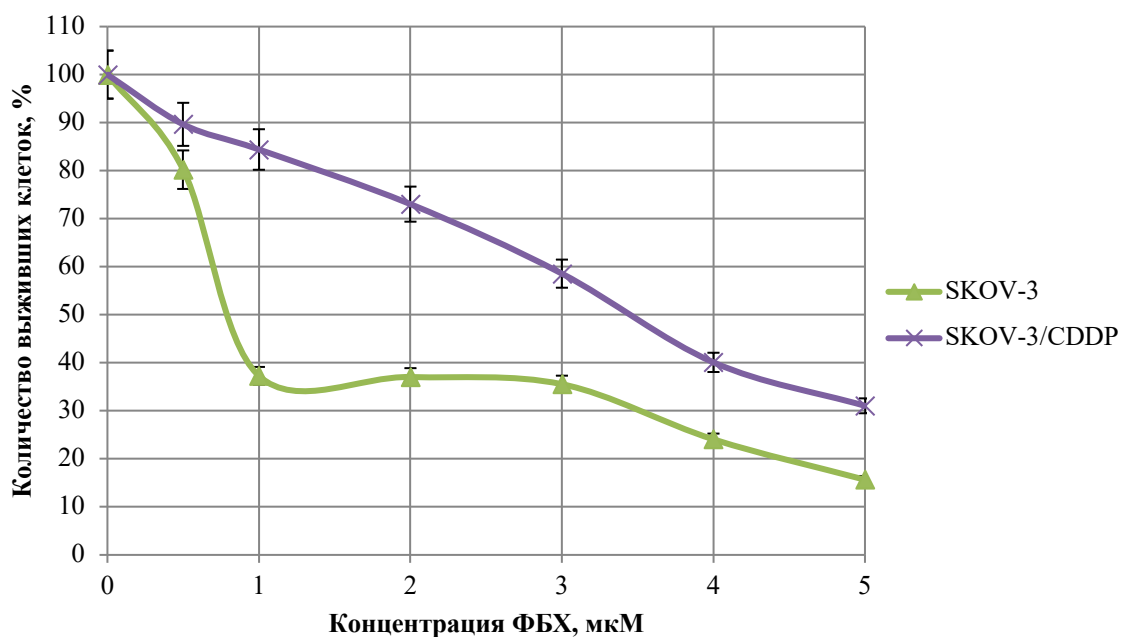


Рис. 15. Кривые выживаемости клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при действии ФБХ (n = 3, p<0,05).

Таблица 3. Показатели фототоксичности ФБХ при освещении светодиодным источником на линиях опухолевых клеток.

Линия клеток	Значение IC ₅₀ , мкМ
SKOV-3	0,7±0,50
SKOV-3/CDDP	3,4±0,69

Полученные данные о повышении IC₅₀ для клеток SKOV-3/CDDP (табл. 3) также говорит об определенной системе устойчивости SKOV-3/CDDP. Последнее подтверждается полученными нами данными о значительном росте антиоксидантного статуса клеток SKOV-3 при формировании устойчивости к цисплатину.

3.6. Анализ клеточной гибели по связыванию Аннексина V-FITC и PI методом проточной цитофлуориметрии

Для оценки количества живых, апоптотических и некротических клеток мы использовали метод, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином V-FITC и йодидом пропидия. Апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V-FITC, поскольку они сохраняют целостность

мембраны на ранних стадиях апоптоза, в то время как некротические клетки окрашиваются и обоими реагентами. Жизнеспособные клетки остаются негативными.

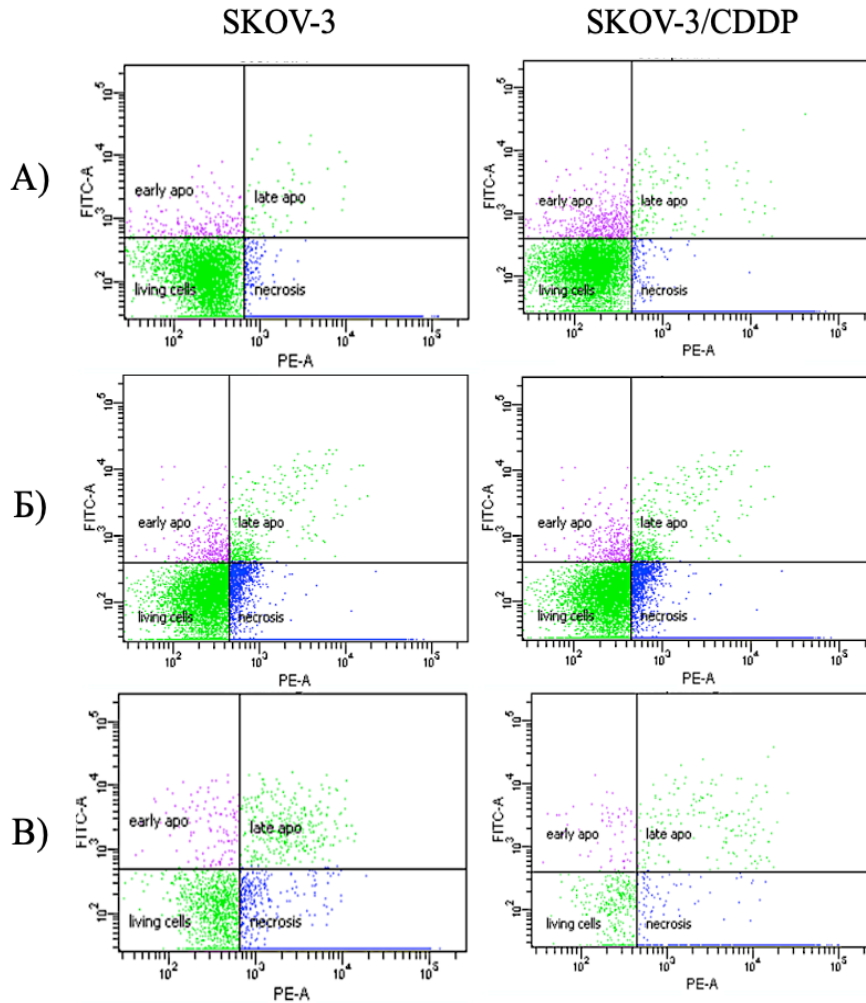


Рис. 16. Гистограммы флуоресценции клеток, окрашенных аннексином V-FITC и йодидом пропидия, методом проточной цитометрии. А – интактные клетки линии SKOV-3 и SKOV-3/CDDP; Б - клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP после инкубации с ФБХ без фотоактивации (темновая токсичность); В - клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP после инкубации с ФБХ с последующей фотоактивацией (фототоксичность).

Обнаружено, что в контроле количество живых клеток SKOV-3 составляет 73,7%, ранних апоптотических клеток – 4,4%, а условно некротических или поздних апоптотических клеток – 0,8 и 21,1% (рис. 16А, 17). В сублинии SKOV-3/CDDP в контроле количество живых клеток составляет 76,5%, ранних апоптотических клеток – 6,1%, а условно некротических или поздних апоптотических клеток – 1,5 и 15,9% (рис. 16А, 17).

После инкубации клеток с 5 мкМ ФБХ в течение 24 часов без фотоактивации наблюдается незначительная разница по популяциям в сравнении с интактными пробами как для чувствительных, так и для резистентных к цисплатину клеток (рис. 16Б). В то время как инкубация с 5 мкМ ФБХ с последующим освещением приводит к значительному снижению популяции живых клеток (на 65,2%), однако популяция ранних апоптотических клеток практически не изменяется – 5,4%, тогда как популяция поздних апоптотических клеток/некротических увеличивается: до 7,5% – поздний апоптоз, 52,3% – некроз (рис. 16В, 17).

Похожую картину наблюдаем и для сублинии SKOV-3/CDDP. Популяция ранних апоптотических клеток практически не изменяется – 8,7%, тогда как популяция поздних апоптотических клеток/некротических увеличивается: до 9,6% – поздний апоптоз, 61,3% – некроз (рис. 16В, 17).

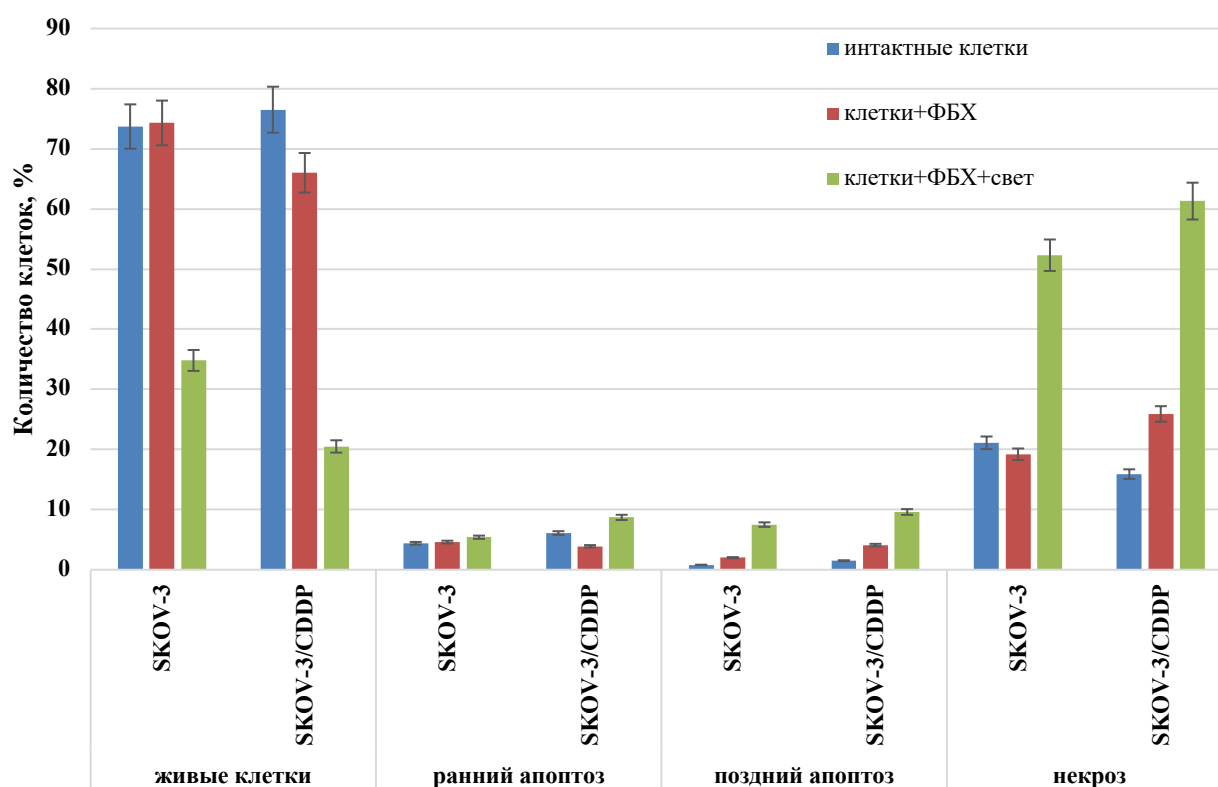


Рис. 17. Анализ клеток, окрашенных конъюгатом аннексина V-FITC и йодидом пропидия (n=3; p<0,05).

3.7. Исследование клеточного цикла после активации ФБХ

Влияние ФБХ при активации на распределение плоидности клеток линии глиомы крысы С6 и меланомы мыши В16 было изучено нами методом проточной цитофлуориметрии. Через 24 часа после внесения 5 мкМ ФБХ, освещения белым светом (20 минут) и последующей инкубации проб (20 минут, 3 часа, 6 часов, 24 часа) нами была получена динамика гибели опухолевых клеток в виде выраженного повышения пика sub-G1 (область слева от пика G1; гиподиплоидные ядра) (рис. 18). При этом клетки меланомы В16 демонстрировали более высокую чувствительность к фотоактивирующему действию ФБХ по сравнению с клетками глиомы С6.

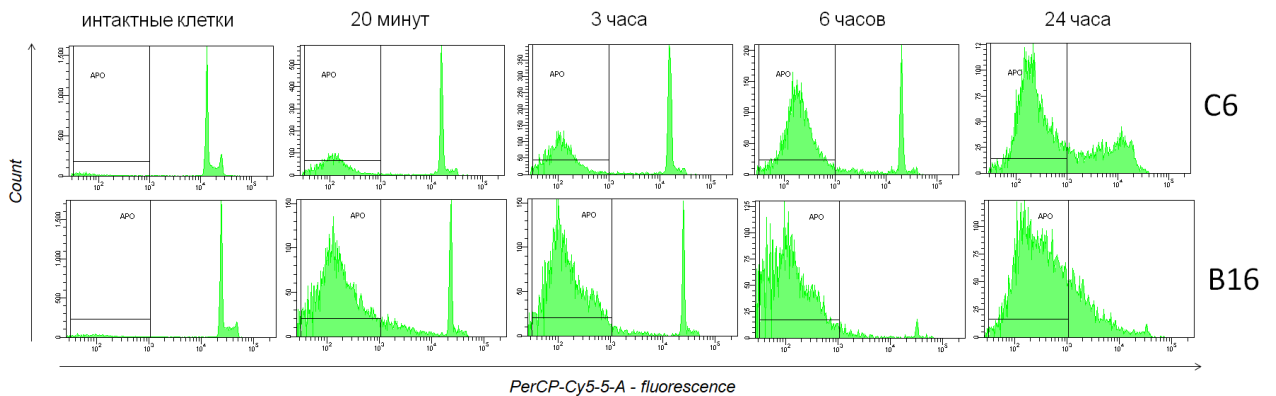


Рис. 18. Гистограммы флуоресценции клеток глиомы С6 и меланомы В16. Распределение клеток линии С6 и В16 по фазам цикла после освещения с 5 мкМ ФБХ.

Аргументом в пользу неапоптотического механизма гибели клеток С6 и В16 при действии ФБХ является окрашивание йодидом пропидия (рис. 12-14). Клетки, обработанные ФБХ (5 мкМ, 24 часа, освещение) накапливали йодид пропидия в первые минуты после освещения (рис. 12-14), что позволяет предположить некротический компонент механизма гибели. Такое повреждение нерепарируемо, поэтому можно говорить о полном эффекте воздействий, что и требуется для стойкого терапевтического результата.

3.8. Накопление ФБХ в клетках меланомы мыши В16

Анализ динамики накопления показывает, что ФБХ хорошо накапливается в клетках меланомы мыши В16, максимум накопления достигается к 24 часам (рис. 19, 20).

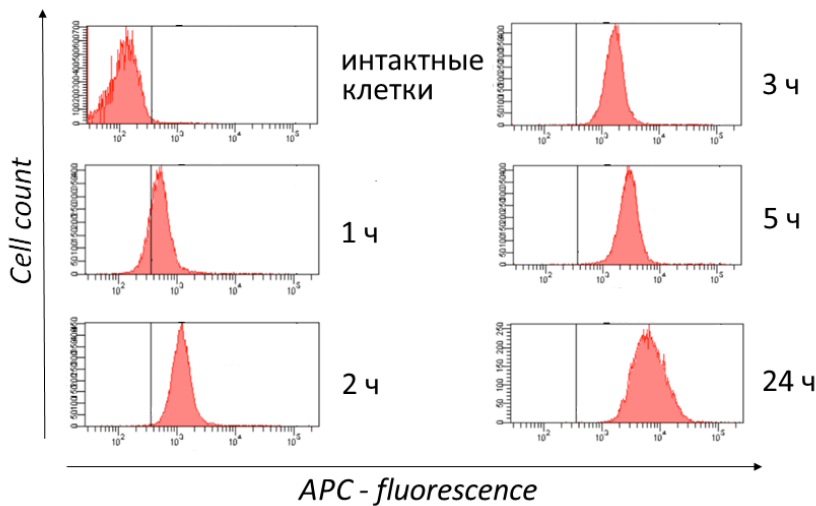


Рис. 19. Флуоресценция клеток меланомы В16 при накоплении ФБХ.

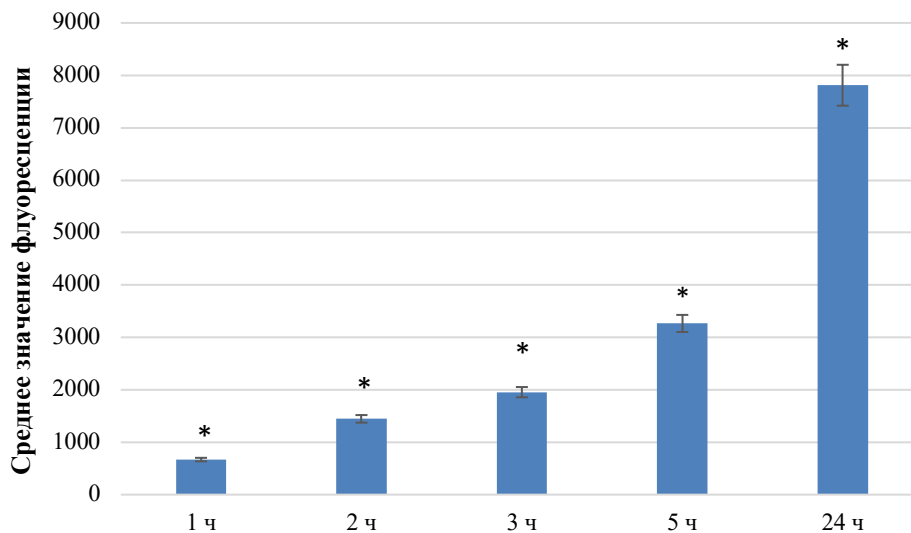


Рис. 20. Зависимость флуоресценции клеток от времени инкубации с ФБХ (n = 3; * p<0,05).

3.9. Оценка квантового выхода синглетного кислорода

«Одним из основных механизмов повреждения опухолей при фотохимиотерапии является образование высокоактивных форм молекулярного кислорода посредством переноса энергии электронного возбуждения от фотосенсибилизатора на молекулу кислорода, в результате чего кислород из

основного триплетного состояния переходит в возбужденное синглетное. Полученный таким образом синглетный кислород $^1\text{O}_2$ при взаимодействии с биологическими объектами приводит к их гибели» [Каплевский К.Н., 2012].

Синглетный кислород генерируется в результате переноса энергии из триплетного состояния фотосенсибилизатора в молекулу кислорода основного состояния. На основании анализа параметров фосфоресценции синглетного кислорода нами проведено исследование фотосенсибилизирующей способности производных хлорина. Спектры фосфоресценции синглетного кислорода (рис. 21) в ацетонитриле ($\lambda_{\text{max}} \sim 1270$ нм) были получены нами при облучении ксеноновой лампой (фотовозбуждение при 511 нм, насыщенные воздухом растворы при комнатной температуре). Квантовые выходы синглетного кислорода определяли сравнением с тетрафенилпорфирином (ТФП) в качестве эталона ($\Phi_{\Delta} = 0,60$) [Sainuddin T. et al., 2015]. Полученные значения $\phi(^1\text{O}_2)$ были оценены как 0,59 для ФБХ и 0,54 для БХ.

Таким образом, введение атомов фтора в молекулу полиборированного хлорина существенно не изменило квантовый выход синглетного кислорода. Высокие значения квантового выхода триплетных состояний и квантового выхода синглетного кислорода ФБХ и БХ подтверждают перспективу каждого соединения в качестве фотосенсибилизаторов.

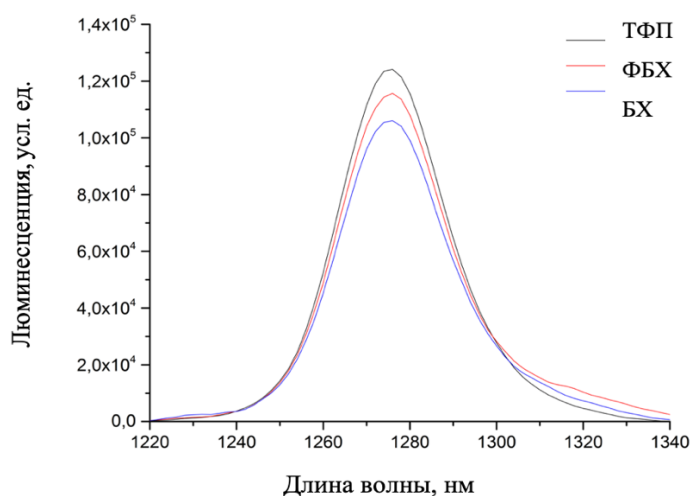


Рис. 21. Спектры фосфоресценции синглетного кислорода при фотовозбуждении ФБХ, БХ, ТФП в насыщенных воздухом растворах ацетонитрила.

3.10. Оценка фотодинамического действия ФБХ

Исследовано фотодинамическое действие ФБХ на перевивную меланому В16. Для меланомы – одной из наиболее агрессивных опухолей – характерен быстрый рост с инвазией подлежащих слоев дермы, жировой клетчатки, мышц и метастазирование. Штамм поддерживается на мышах линии С57ВL6 подкожной перевивкой взвеси опухолевых клеток. Опухоль метастазирует в легкие гематогенным путем и в регионарные лимфатические узлы - лимфогенным. Средняя продолжительность жизни мышей с привитым подкожно очагом меланомы, как правило, не превышает 3-4 недели.

На рис. 22 показана возможность визуализации и преимущественное накопление лекарственной формы ФБХ у мыши с подкожным трансплантатом меланомы В16.

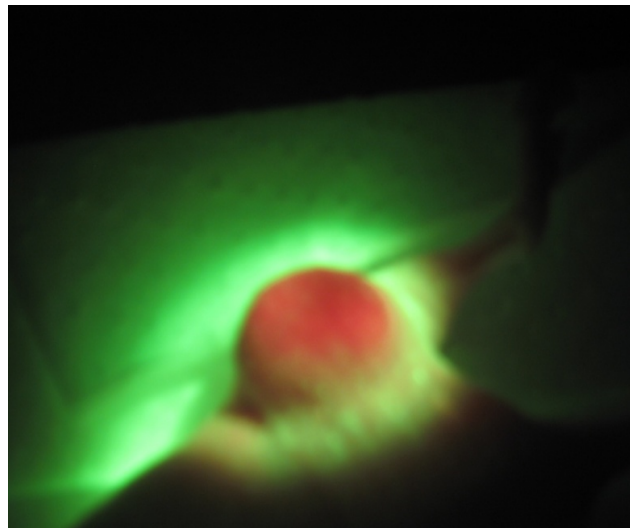


Рис. 22. Флуоресценция очага меланомы В16 (после подкожной трансплантации) через 36 часов после внутрибрюшинного введения лекарственной формы ФБХ (5 мг/кг).

Оценка фотодинамического действия ФБХ на перевивную меланому В16 проведена на 4 группах мышей с разной дозой ФБХ, плотности энергии и мощности лазерного излучения.

1 группа. Мышам с привитым подкожно очагом меланомы (средний диаметр 0,5 см) вводили лекарственную форму ФБХ внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Через 24-36 ч. (время, требуемое для накопления ФБХ в опухоли) проводили облучение опухолевого очага монохроматическим светом при плотности энергии 150 Дж/см² и мощности лазерного излучения 0,25 Вт/см². В первые 1-3 сутки отмечен отек

тканей в области лазерного воздействия, преходящий и не требовавший специальных мер для купирования. Через 3-6 суток после освещения отмечали уменьшение размеров опухоли. К 7-8 суткам у 100% мышей в группе опухоль регрессировала полностью (не определялась пальпаторно и при визуальном обследовании). При дальнейшем наблюдении через 15-21 сутки отсутствие рецидива (продолженного роста) отмечено у 20 % животных. К 21-24 суткам у остальных мышей в группе отмечено рецидивирование в месте первичного очага. Коэффициент абсолютного прироста опухоли составил всего $7,15 \pm 1,85$ ($p < 0,009$), в контроле $80,44 \pm 8,51$. Такой результат можно считать в целом обнадеживающим, хотя и недостаточным.

2 группа. Увеличение плотности мощности лазерного облучения до $0,44 \text{ Вт/см}^2$ повысило терапевтический эффект. Хотя уже на 7 сутки у некоторых животных появился продолженный рост. Но коэффициент абсолютного прироста опухоли на всех сроках наблюдения был достоверно ниже (от $p < 0,01$ до $p < 0,05$), чем в контроле. На 7 сутки полная регрессия наблюдалась у 78% мышей, на 10 сутки – у 67% на 14 сутки - у 44%, а на 21 сутки – только у 37,5% животных. Для животных группы 3 решено увеличить плотность энергии лазерного излучения при прежней дозе лекарственной формы ФБХ (5 мг/кг внутрибрюшинно).

3 группа. Увеличение плотности энергии лазерного излучения до 300 Дж/см^2 при неизменной дозе лекарственной формы ФБХ (5 мг/кг внутрибрюшинно) и неизменной плотности мощности $0,25 \text{ Вт/см}^2$ – усилило терапевтическое воздействие. На 7-10 сутки исследования полная регрессия опухоли отмечена у 90% мышей, на 14 сутки – у 70% и на 21 сутки исследования у 50% животных.

4 группа. Увеличение дозы лекарственной формы ФБХ до 10 мг/кг (150 Дж/см^2 и $0,25 \text{ Вт/см}^2$) несколько усилило терапевтический эффект фотовоздействия. На 7-8 сутки после освещения опухолевого очага монохроматическим светом полная регрессия опухоли отмечена у 90% животных. К 12-15 суткам наблюдения у 24% мышей отмечен продолженный рост (рецидив) в первичном очаге. В этих ситуациях коэффициент абсолютного прироста опухоли был значительно ниже, чем в контрольных когортах (нелеченые и ложно леченые

мышь) ($p < 0,01$). Частота полной регрессии опухоли на 10 сутки составила 75 %, на 14-21 сутки – 62,5 %.

Результаты вскрытия животных. У интактных животных и в группах ложно леченых мышей-опухоленосителей (лекарственная форма без освещения и освещение без введения лекарственной формы) обнаружены метастазы в паренхиме легких. Исследования лимфатических узлов мышей на наличие метастазов показало, что при всех параметрах проведения ФДТ с лекарственной формой ФБХ количество метастазов резко уменьшалось или отсутствовало. В группе нелеченых мышей выявлены метастазы в легкие (главным образом) и в лимфатические узлы (рис. 23).

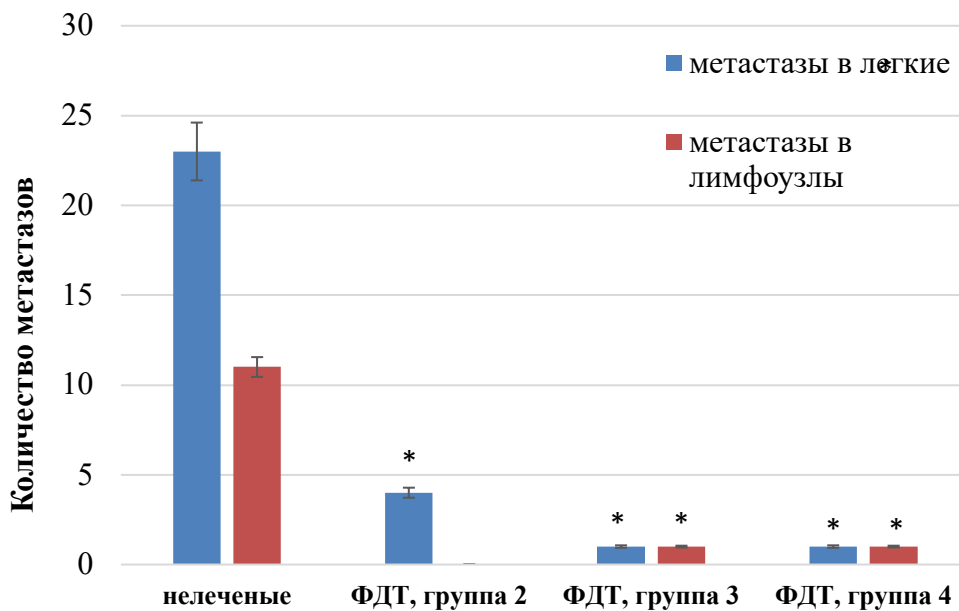


Рис. 23. Метастазирование меланомы В16 мышей после ФДТ с ФБХ ($n=3$; * $p < 0,05$).

Таким образом, экспериментальная ФДТ в присутствии лекарственной формы фторборхлорина в переносимых дозах позволяет получать определенный терапевтический эффект в виде регрессии очага меланомы. Однако этот эффект нередко нестойк и непродолжителен и сменяется продолженным ростом опухоли. Требуется дополнительное воздействие. Тот факт, что ФБХ содержит большое (44) количество атомов ^{10}B – природного стабильного изотопа, используемого в радиотерапии опухолей, делает возможным использование его в качестве фото- и радио-сенсбилизатора для проведения ФДТ в сочетании с БНЗТ. Накопление в

опухолевой клетке изотопа ^{10}B повышает её чувствительность к нейтронному излучению. В результате поглощения нейтрона изотопом ^{10}B образуется возбужденное ядро ^{11}B , которое за 10^{-12} секунды распадается на ядро лития-7 и альфа-частицу, разлетающиеся с большой энергией. Однако образующиеся частицы имеют короткий радиус действия, поэтому преимущественно воздействуют на опухолевые ткани, щадя более дистальные нормальные ткани. Поэтой причине БНЗТ более безопасна, чем стандартная рентгенотерапия.

3.11. Бор-нейтронозахватная терапия меланомы В16 с использованием ФБХ

БНЗТ проводили с использованием исследовательского протонно-нейтронного реактора университета г. Киото (Япония) на основании двухстороннего меморандума о сотрудничестве и обмене научными результатами с Институтом элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН. Разрешение на проведение испытаний получал профессор Н. Мийоши (университет префектуры Фукуи, Япония).

Результаты представлены на рис. 24, 25, которые демонстрируют нарастание количества клеток меланомы В16, погибших после однократного действия ФДТ, БНЗТ или их сочетания. Культуры инкубировали с 5 мкМ лекарственной формы ФБХ 36 час (максимум накопления) и подвергали воздействию тепловых нейтронов, света или их последовательной комбинации. Процент нежизнеспособных клеток оценивали по включению пропидия йодида (рис. 24) или трипанового синего – соединений, проникающих в клетки только при нарушении целостности плазматической мембраны (некроз или исход апоптоза). Такое повреждение нерепарируемо, поэтому можно говорить о полном эффекте воздействий, что и требуется для стойкого терапевтического результата.

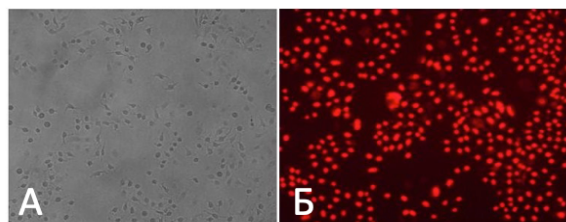


Рис. 24. Некротическая гибель клеток меланомы В16 при действии тепловых нейтронов. А – до воздействия, Б – через 24 часа после воздействия.

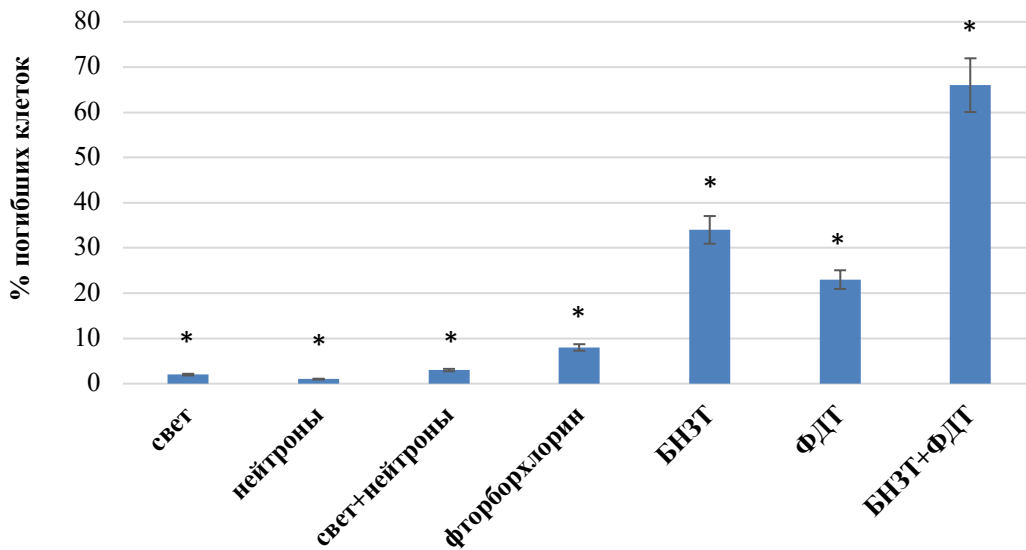


Рис. 25. Синергический эффект БНЗТ и ФДТ на жизнеспособность культивируемых клеток меланомы В16 (n=3, p<0,05).

Прививка опухоли и процедуры с животными-опухоносителями не отличались от методов, использованных для ФДТ. Лекарственную форму ФБХ вводили внутривентриально мышам F1(CBAxС₅₇BL₆) за 36 часов до облучения. Мышей фиксировали к горизонтальной пластинке и помещали в зону облучения тепловыми нейтронами. Время облучения – 15 мин. Доза облучения 2 Гр однократно на область очага. После процедуры животных доставляли в виварий и наблюдали до 21 суток, измеряя диаметр опухолей каждые 2 дня.

В сочетанном режиме воздействия мышам-опухоносителям вначале проводили ФДТ однократно (5 мг/кг лекарственной формы ФБХ внутривентриально, через 36 часов освещение 0,44 Вт/см², 150 Дж/см²). Через 1 сутки проводили облучение тепловыми нейтронами. Лекарственную форму ФБХ повторно не вводили. Животных наблюдали до 2 недель после сочетанного воздействия.

Результаты сочетанного фотолучевого воздействия на очаг меланомы – ФДТ + БНЗТ в сравнении отдельными видами этих воздействий представлены на рис. 26. Каждый из этих методов в отдельности дает частичный терапевтический эффект в виде регрессии новообразований, довольно часто сменяющейся рецидивом. Эти результаты подтверждают также способность лекарственной

формы ФБХ повышать чувствительность меланомы к воздействию нейтронов. Однако терапевтическая эффективность БНЗТ в самостоятельном режиме оказывается ограниченной: не удается добиться полного излечения и длительного безрецидивного периода. Столь агрессивная опухоль требует комбинирования терапевтических воздействий.

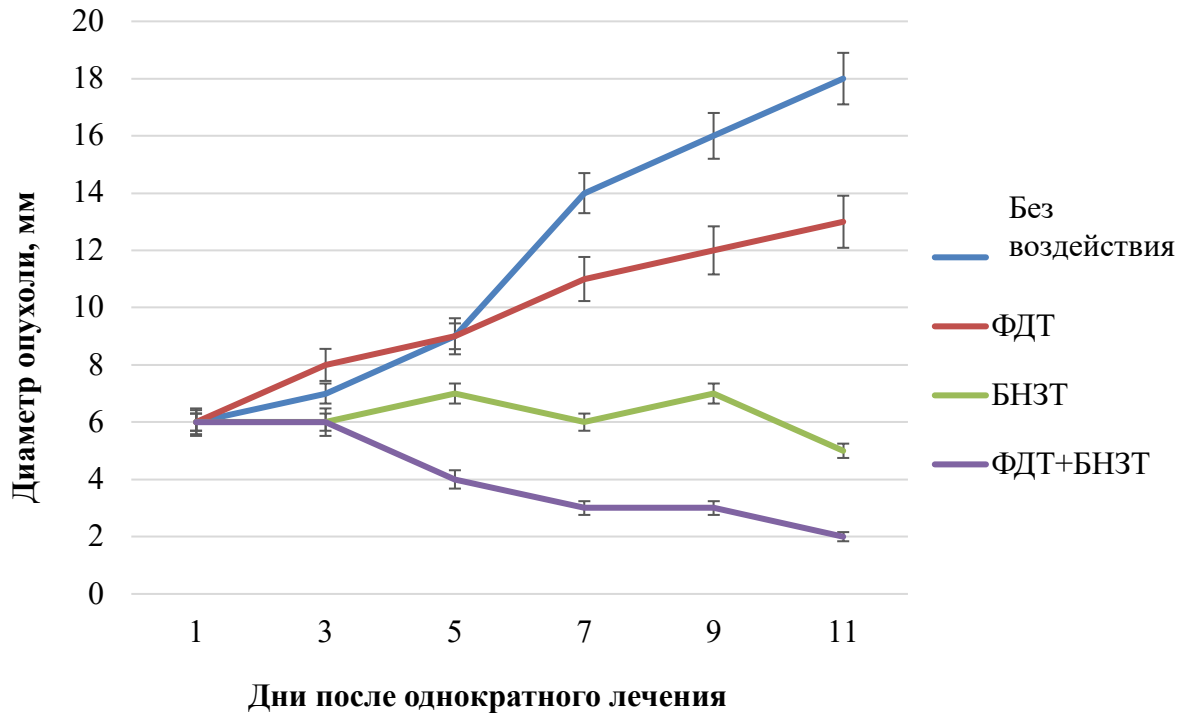


Рис. 26. Терапевтическая эффективность ФДТ, БНЗТ и их сочетания у мышей с трансплантированной меланомой В16 ($n=3$, $p<0,05$).

Сочетание ФДТ и БНЗТ позволило получить стойкое излечение мышей: на протяжении 21 суток не отмечено случаев рецидивирования. Требуется более длительный мониторинг (не менее 60 дней и пожизненный – до 2 лет).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проделанной работы показали, что темновая токсичность нового производного хлорина - ФБХ низкая. Для линий аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7/Dox, аденокарциномы толстой кишки HCT116, меланома мыши B16, глиомы крысы C6 значения $IC_{50} > 50$ мкМ, для ПФЧ – $44,3 \pm 0,98$ мкМ. В сравнении с другими производными хлорина (фторхлорин, борхлорин) ФБХ обладает лучшей накопительной способностью. Фотонекроз в течение первых минут освещения опухолевых клеток с ФБХ позволяет добиться летального (нерепарируемого) повреждения опухолевых клеток, в том числе устойчивых к важнейшим противоопухолевым препаратам. Таким образом, механизмы апоптоза, часто нефункционирующие в устойчивых клетках, оказываются преодолимыми при индукции фотонекроза.

Механизм действия ФБХ полностью отвечает требованиям к противоопухолевым лекарствам. Новый фоторадиосенсибилизатор вызывает полную гибель опухолевых клеток (в культуре и в трансплантатах у лабораторных животных), при этом окружающие ткани не страдают, и общерезорбтивная токсичность отсутствует. Благодаря способности фотосенсибилизатора поглощать свет в относительно длинноволновом диапазоне (650 нм), возможно разрушение опухолей на глубине $> 0,5$ мм из-за повышенного проникновения света в ткани. Наличие атомов фтора обеспечивают липофильность и мембранотропность. Карбораны (борсодержащие полиэдрические структуры на периферии хлоринового макроцикла) обуславливают высокую эффективность борнейтронозахватного воздействия. Низкая общерезорбтивная токсичность позволяет сочетать два физических воздействия – свет и тепловые нейтроны, а также вводить соединение повторно, что важно для терапии трудно поддающихся лучевому лечению опухолей.

ВЫВОДЫ

1. Установлена низкая темновая токсичность ФБХ для линий опухолевых клеток человека и изогенных сублиний с лекарственной устойчивостью: аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7/Dox, аденокарциномы толстой кишки HCT116, меланомы мыши B16 и глиомы крысы C6.
2. Фотоактивация ФБХ вызывает фотогибель родительских и резистентных опухолевых клеток в течение первых минут. Механизм фотогибели – некроз.
3. Формирование резистентности клеток SKOV-3 к цисплатину связано с развитием адаптивного антиоксидантного ответа.
4. ФБХ вызывает гибель опухолевых клеток с лекарственной устойчивостью, обусловленной антиоксидантной защитой.
5. Водорастворимая лекарственная форма ФБХ позволяет получить противоопухолевый эффект (при фотоактивации и нейтронном облучении) в виде регрессии трансплантированных очагов меланомы B16.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Березин, Д.Б.* Макроциклический эффект и структурная химия порфиринов. — М.: КРАСАНД, 2010. — 424 с. ISBN: 978-5-396-00112-1.
2. *Гейниц, А.В.* Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы / А.В. Гейниц, А.Е. Сорокатый, Д.М. Ягудаев, Р.С. Трухманов // Лазерная медицина. — 2007. — Т. 11. — № 3. — С. 42–46.
3. *Гельфонд, М.Л.* Фотодинамическая терапия в онкологии // Практическая онкология. — 2007. — Т. 8. — № 4. — С. 204–210.
4. *Генина, Э.А.* Методы биофотоники: фототерапия. Учебное пособие. — Саратов: «Новый ветер», 2012. — 119 с. ISBN: 978-5-98116-149-0.
5. *Донцов, В.И.* Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Б.М. Мрикаев, С.В. Уханов // Труды ИСА РАН. — 2006. — Т. 19. — С. 50–69.
6. *Каплан, М.А.* Фотодинамическая терапия: результаты и перспективы / М.А. Каплан, В.Н. Капинус, В.В. Попучиев и др. // Радиация и риск. — 2013. — Т. 22. — № 3. — С. 115-121.
7. *Маянский, А.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука: Сиб. отд-ние, 1983. — 256 с.
8. *Медведев, И. Б.* Фотодинамическая терапия в офтальмологии / И. Б. Медведев, Е. И. Беликова, М. П. Сямичев. — Москва, 2006. — 128 с.
9. *Миронов, А.Ф.* Фотодинамическая терапия – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей / А.Ф. Миронов // Соросовский образовательный журнал. — 1996. — Т. 2. — № 8. — С. 32-40.
10. *Михайлова, И.А.* Основные принципы применения лазерных систем в медицине / Михайлова И.А., Папаян Г.В., Золотова Н.Б., Гришачева Т.Г. Под ред. Н.Н. Петрищева. — Спб., 2007. — 44 с.
11. *Узбеков, М.Г.* Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психиатрических заболеваниях. Сообщение II / М.Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. — 2014. — Т. 24. — № 4. — С. 97–103.

12. Улащик, В.С. Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. — 2013. — С. 36-43.
13. Филоненко, Е.В. История развития флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии и их возможности в онкологии // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева). — 2013. — Том 57. — №2.
14. Al-Gubory, K.H. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress / K.H. Al-Gubory, C. Garrel, P. Faure, N. Sugino // Reproductive Biomedicine Online. — 2012. — Vol. 25(6). — P. 551–560.
15. Alkadi, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants // Infectious Disorders - Drug Targets. — 2020. — Vol. 20(1). — P. 16–26.
16. Asano, R. Synthesis and biological evaluation of new BSH-conjugated chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer / R. Asano, A. Nagami, Y. Fukumoto et al. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2014. — Vol. 140. — P. 140–149.
17. Ayala, A. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal / A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2014. — Vol. 2014(6). — Article ID 360438.
18. Bacellar, I.O.L. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death / I.O.L. Bacellar, T.M. Tsubone, C. Pavani, M.S. Baptista // International Journal of Molecular Sciences. — 2015. — Vol. 16(9). — P. 20523–20559.
19. Bacellar, I.O.L. Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids / I.O.L. Bacellar, M.C. Oliveira, L.S. Dantas, E.B. Costa, H.C. Junqueira et al. // Journal of the American Chemical Society. — 2018. — Vol. 140(30). — P. 9606–9615.
20. Baumann, C. GAS6-expressing and self-sustaining cancer cells in 3D spheroids activate the PDK-RSK-mTOR pathway for survival and drug resistance / C. Baumann, A. Ullrich, R. Torka // Molecular Oncology. — 2017. — Vol. 11(10). — P. 1430–1447.

21. *Boland, B.* Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing / B. Boland, W.H. Yu, O. Corti et al. // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2018. — Vol. 17(9). — P. 660-688.
22. *Brigelius-Flohé, R.* Glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2013. — Vol. 1830(5). — P. 3289–3303.
23. *Buytaert, E.* Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum / E. Buytaert, G. Callewaert, J.R. Vandenheede, P. Agostinis // *Autophagy*. — 2006. — Vol. 2(3). — P. 238-240.
24. *Buytaert, E.* Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy / E. Buytaert, G. Callewaert, N. Hendrickx et al. // *FASEB Journal*. — 2006. — Vol. 20(6). — P. 756–758.
25. *Canti, G.* Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology / G. Canti, A. De Simone, M. Korbelik // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. — 2002. — Vol. 1(1). — P. 79–80.
26. *Casas, A.* Mechanisms of resistance to photodynamic therapy / A. Casas, G. Di Venosa, T. Hasan, Al Batlle // *Current Medicinal Chemistry*. — 2011. — Vol. 18(16). — P. 2486–2515.
27. *Castano, A.P.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization / A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. — 2004. — Vol. 1(4). — P. 279–293.
28. *Ceckler, T.L.* In situ assessment of tumor vascularity using fluorine NMR imaging / T.L. Ceckler, S.L. Gibson, R. Hilf, R.G. Bryant // *Magnetic Resonance in Medicine*. — 1990. — Vol. 13(3). — P. 416–433.
29. *Che, M.* Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer / M. Che, R. Wang, X. Li et al. // *Drug Discovery Today*. — 2016. — Vol. 21(1). — P. 143–149.

30. *Che, Y.* Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness / Y. Che, J.F. Wang, L. Shao, T. Young // *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. — 2010. — Vol. 35(5). — P. 296–302.
31. *Cheesman, K.H.* An introduction to free radical biochemistry / K.H. Cheesman, T.F. Slater // *British Medical Bulletin*. — 1993. — Vol. 49(3). — P. 481–493.
32. *Chen, B.* Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy / B. Chen, B.W. Pogue, P.J. Hoopes, T. Hasan // *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. — 2006. — Vol. 16(4). — P. 279–305.
33. *Chen, Y.* GPx6 is involved in the in vitro induced capacitation and acrosome reaction in porcine sperm / Y. Chen, K. Wang, D. Zhang et al. // *Theriogenology*. — 2020. — Vol. 156. — P. 107–115.
34. *Chiaviello, A.* Targets and Mechanisms of Photodynamic Therapy in Lung Cancer Cells: A Brief Overview / A. Chiaviello, I. Postiglione, G. Palumbo // *Cancers*. — 2011. — Vol. 3(1). — P. 1014–1041.
35. *Clichici, S.* The dynamics of reactive oxygen species in photodynamic therapy with tetra sulfophenyl-porphyrin / S. Clichici, A. Filip, D. Daicoviciu, R.M. Ion, T. Mocan, C. Tatomir, L. Rogojan, D. Olteanu, A. Muresan // *Acta Physiologica Hungarica*. — 2010. — Vol. 97(1). — P. 41–51.
36. *Coupienne, I.* 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma / I. Coupienne, G. Fettweis, N. Rubio et al. // *Photochemical and Photobiological Sciences*. — 2011. — Vol. 10(12). — P. 1868-1878.
37. *Daicoviciu, D.* Oxidative photodamage induced by photodynamic therapy with methoxyphenyl porphyrin derivatives in tumour-bearing rats / D. Daicoviciu, A. Filip, R.M. Ion, S. Clichici, N. Decea, A. Muresan // *Folia Biol Prague*. — 2011. — Vol. 57(1). — P. 12–19.
38. *Davids, L.M.* Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool / L.M. Davids, B. Kleemann // *Cancer Treatment Reviews*. — 2011. — Vol. 37(6). — P. 465–475.
39. *Davies, M.J.* Protein oxidation and peroxidation // *Biochemical Journal*. — 2016. — Vol. 473(7). — P. 805–825.

40. *Dellinger, M.* Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol // *Photochemistry and Photobiology*. — 1996. — Vol. 64(1). — P. 182-187.
41. *Deponte, M.* Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2013. — Vol. 1830(5). — P. 3217–3266.
42. *DeRosa, M.C.* Photosensitized singlet oxygen and its applications / M.C. DeRosa, R.J. Crutchley // *Coordination Chemistry Reviews*. — 2002. — Vol. 233–234. — P.351-371.
43. *Dixon, S.J.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht et al. // *Cell*. — 2012. — Vol. 149(5). — P. 1060–1072.
44. *Donohoe, C.* Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity / C. Donohoe, M.O. Senge, L.G. Arnaut, L.C. Gomes-da-Silva // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. — 2019. — Vol. 1872(2). — Article ID 188308.
45. *dos Santos, A.F.* Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review / A.F. dos Santos, de Almeida D.R.Q., Terra L.F. et al. // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. — 2019. — Vol. 5. — P. 25–44.
46. *Droge, W.* Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiological Reviews*. — 2002. — Vol. 82(1). — P. 47–95.
47. *Ellis, E.M.* Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention // *Pharmacology & Therapeutics*. — 2007. — Vol. 115(1). — P. 13–24.
48. *Fabris, C.* Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis / C. Fabris, G. Valduga, G. Miotto et al. // *Cancer Research*. — 2001. — Vol. 61(20). — P. 7495–7500.
49. *Ferri, K.F.* Organelle-specific initiation of cell death pathways / K.F. Ferri, G. Kroemer // *Nature Cell Biology*. — 2001. — Vol. 3(11). — P. E255–E263.

50. *Fettweis, G.* RIP3 antagonizes a TSC2-mediated pro-survival pathway in glioblastoma cell death / G. Fettweis, E. Di Valentin, L. L'Homme et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2017. — Vol. 1864 (1). — P. 113–124.
51. *Fidanzì-Dugas, C.* Analysis of the in vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on prostate cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives / C. Fidanzì-Dugas, B. Liagre, G. Chemin et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2017. — Vol. 1861(7). — P. 1676–1690.
52. *Fingar, V.H.* The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin / V.H. Fingar, T.J. Wieman, P.S. Haydon // *Photochemistry and Photobiology*. — 1997. — Vol. 66(4). — P. 513–517.
53. *Fink, S.L.* Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells / S.L. Fink, B.T. Cookson // *Infection and Immunity*. — 2005. — Vol. 73(4). — P. 1907–1916.
54. *Forman, H.J.* Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy / H.J. Forman, H. Zhang // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2021. — Vol. 20(9). — P. 689–709.
55. *Friedmann Angeli, J.P.* Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion / J.P. Friedmann Angeli, D.V. Krysko, M. Conrad // *Nature Reviews Cancer*. — 2019. — Vol. 19(7). — P. 405–414.
56. *Fuchs, Y.* Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells / Y. Fuchs, H. Steller // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2015. — Vol. 16(6). — P. 329–344.
57. *Fukai, T.* Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases / T. Fukai, M. Ushio-Fukai // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2011. — Vol. 15(6). — P. 1583–1606.
58. *Galluzzi, L.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson // *Cell Death & Differentiation*. — 2018. — Vol. 25(3). — P. 486–541.

59. *Gaschler, M.M.* Lipid peroxidation in cell death / M.M. Gaschler, B.R. Stockwell // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2017. — Vol. 482(3). — P. 419–425.
60. *Genestra, M.* Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants // *Cellular Signalling*. — 2007. — Vol. 19(9). — P. 1807–1819.
61. *Gillis, E.P.* Applications of fluorine in medicinal chemistry / E.P. Gillis, K.J. Eastman, M.D. Hill et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2015. — Vol. 58(21). — P. 8315–8359.
62. *Glorieux, C.* Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach / C. Glorieux, P.B. Calderon // *Biological Chemistry*. — 2017. — Vol. 398(10). — P. 1095–1108.
63. *Golab, J.* Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor / J. Golab, D. Nowis, M. Skrzycki, H. Czczot, A. Baranczyk-Kuzma, G.M. Wilczynski, M. Makowski, P. Mroz, K. Kozar, R. Kaminski et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2003. — Vol. 278(1). — P. 407–414.
64. *Gomes-da-Silva, L.C.* Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus / L.C. Gomes-da-Silva, L. Zhao, L. Bezu et al. // *The EMBO Journal*. — 2018. — Vol. 37(13). — Article ID e98354.
65. *Gomes-da-Silva, L.C.* Redaporfin induces immunogenic cell death by selective destruction of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus / L.C. Gomes-da-Silva, L. Zhao, L.G. Arnaut, G. Kroemer, O. Kepp // *Oncotarget*. — 2018. — Vol. 9(58). — P. 31169–31170.
66. *Gottumukkala, V.* Synthesis, cellular uptake and animal toxicity of a tetra(carboranylphenyl)-tetrabenzoporphyrin / V. Gottumukkala, O. Ongayi, D.G. Baker et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2006. — Vol. 14(6). — P. 1871–1879.
67. *Goyal, M.M.* Human catalase: looking for complete identity / M. M. Goyal, A. Basak // *Protein & Cell*. — 2010. — Vol. 1(10). — P. 888–897.

68. *Guan, J.* The xc- cystine/glutamate antiporter as a potential therapeutic target for small-cell lung cancer: use of sulfasalazine / J. Guan, M. Lo, P. Dockery et al. // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. — 2009. — Vol. 64(3). — P. 463–472.
69. *Gunaydin, G.* Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer – A Review of the Current Clinical Status / G. Gunaydin, M.E. Gedik, S. Ayan // *Frontiers in Chemistry*. — 2021. — Vol. 9. — Article ID 686303.
70. *Hagmann, W.K.* The many roles for fluorine in medicinal chemistry // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2008. — Vol. 51(15). — P. 4359–4369.
71. *Halliwell, B.* Free radicals and antioxidants - quo vadis? // *Trends in Pharmacological Sciences*. — 2011. — Vol. 32(3). — P. 125–130.
72. *Hamblin, M.R.* Photodynamic therapy for cancer: what's past is prologue // *Photochemistry and Photobiology*. — 2020. — Vol. 96(3). — P. 506–516.
73. *Hangauer, M.J.* Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition / M.J. Hangauer, V.S. Viswanathan, M.J. Ryan et al. // *Nature*. — 2017. — Vol. 551(7679). — P. 247–250.
74. *Hao, S.* Cysteine Dioxygenase 1 Mediates Erastin-Induced Ferroptosis in Human Gastric Cancer Cells / S. Hao, J. Yu, W. He et al. // *Neoplasia*. — 2017. — Vol. 19(12). — P. 1022–1032.
75. *Hassannia, B.* Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma / B. Hassannia, B. Wiernicki, I. Ingold et al. // *Journal of Clinical Investigation*. — 2018. — Vol. 128(8). — P. 3341–3355.
76. *Hassannia, B.* Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer / B. Hassannia, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe // *Cancer Cell*. — 2019. — Vol. 35(6). — P. 830–849.
77. *Hawkins, C.L.* Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C.L. Hawkins, D.I. Pattison, M.J. Davies // *Amino Acids*. — 2003. — Vol. 25(3-4). — P. 259–274.
78. *Hawkins, C.L.* Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences // *Essays in Biochemistry*. — 2020. — Vol. 64(1). — P. 75–86.

79. *Henderson, B.W.* How does photodynamic therapy work? / B.W. Henderson, T.J. Dougherty // *Photochemistry and Photobiology*. — 1992. — Vol. 55(1). — P. 145–157.
80. *Hensel, E.* Frequency and localization of facets in adults with correct dental arches and malocclusion in anterior teeth region regarding periodontal reaction and occlusal guidance / E. Hensel, S. Hensel, R. Sielaff // *Stomatol. DDR*. — 1990. — Vol. 40(5). — P. 232–235.
81. *Hiramatsu, R.* Application of a novel boronated porphyrin (H₂OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT / R. Hiramatsu, S. Kawabata, S. Miyatake et al. // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2011. — Vol. 43(1). — P. 52–58.
82. *Hiramatsu, R.* Tetrakis(p-carboranylthio-tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC): application for photodynamic therapy and boron neutron capture therapy / R. Hiramatsu, S. Kawabata, H. Tanaka et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2015. — Vol. 104(3). — P. 962–970.
83. *Hsieh, Y.J.* Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets / Y.J. Hsieh, C.C. Wu, C.J. Chang, J.S. Yu // *Journal of Cellular Physiology*. — 2003. — Vol. 194(3). — P. 363–375.
84. *Isanbor, C.* Fluorine in medicinal chemistry: a review of anti-cancer agent / C. Isanbor, D. O'Hagan // *Journal of Fluorine Chemistry*. — 2006. — Vol. 127(3). — P. 303–319.
85. *Jastrzb, A.* Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors / A. Jastrzb, E. Skrzydlewska // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2021. — Vol. 36(1). — P. 362–371.
86. *Jensen, T.J.* Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEP2 cells / T.J. Jensen, M.G.H. Vicente, R. Luguya et al. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2010. — Vol. 100(2). — P. 100–111.
87. *Jiang, L.* Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression / L. Jiang, N. Kon, T. Li et al. // *Nature*. — 2015. — Vol. 520(7545). — P. 57–62.

88. *Josefsen, L.B.* Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? / L.B. Josefsen, R.W. Boyle // *British Journal of Pharmacology*. — 2008. — Vol. 154(1). — Article ID 2438986.
89. *Kaplan, M.J.* Photodynamic therapy in the management of metastatic cutaneous adenocarcinomas: case reports from phase 1/2 studies using tin ethyl etiopurpurin (SnET2) / M.J. Kaplan, R.G. Somers, R.H. Greenberg et al. // *Journal of Surgical Oncology*. — 1998. — Vol. 67(2). — P.121–125.
90. *Karmakar, S.* 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells / S. Karmakar, N.L. Banik, S.J. Patel, S.K. Ray // *Neuroscience Letters*. — 2007. — Vol. 415(3). — P. 242–247.
91. *Kato, H.* Five-year disease-free survival survival of a lung cancer patient treated only by photodynamic therapy / H. Kato, C. Konaka, N. Kawate et al. // *Chest*. — 1986. — Vol. 90(5). — P. 768–770.
92. *Kaushik, S.* Chaperone-mediated autophagy at a glance / S. Kaushik, U. Bandyopadhyay, S. Sridhar et al. // *Journal of Cell Science*. — 2011. — Vol. 124 (Pt 4). — P. 495–499.
93. *Kaye, A.H.* Photodynamic therapy of brain tumors / Kaye A.H., Hill J.S. // *Annals of the Academy of Medicine of Singapore*. — 1993. — Vol. 22. — P. 470–481.
94. *Kessel, D.* Cell death pathways associated with photodynamic therapy: an update / D. Kessel, N.L. Oleinick // *Photochemistry and Photobiology*. — 2018. — Vol. 94(2). — P. 213–218.
95. *Kessel, D.* Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response / D. Kessel, M. Castelli // *Photochemistry and Photobiology*. — 2001. — Vol. 74(2). — P. 318–322.
96. *Kessel, D.* Photodynamic Therapy: A Brief History // *Journal of Clinical Medicine*. — 2019. — Vol. 8(10). — Article ID 1581.
97. *Kim, S.E.* Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth / S.E. Kim, L. Zhang, K. Ma et al. // *Nature Nanotechnology*. — 2016. — Vol. 11(11). — P. 977–985.

98. *Klotz, L.O.* Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells / L.O. Klotz, K.D. Kröncke, H. Sies // *Photochemical and Photobiological Sciences*. — 2003. — Vol. 2(2). — P. 88–94.
99. *Koval, J.* Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy / J. Koval, J. Mikes, R. Jendzelovsky et al. // *Photochemistry and Photobiology*. — 2010. — Vol. 86(1). — P. 200–205.
100. *Kroemer, G.* Autophagic cell death: the story of a misnomer / G. Kroemer, B. Levine // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2008. — Vol. 9(12). — P. 1004–1010.
101. *Kumar, S.* Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview / S. Kumar, A.K. Pandey // *The Scientific World Journal*. — 2013. — Vol. 2013. — Article ID 162750.
102. *Kumar, S.* Free radicals: health implications and their mitigation by herbals / S. Kumar, A.K. Pandey // *British Journal of Medicine and Medical Research*. — 2015. — Vol. 7(6). — P. 438–457.
103. *Levine, B.* Biological functions of autophagy genes: a disease perspective / B. Levine, G. Kroemer // *Cell*. — 2019. — Vol. 176(1-2). — P. 11–42.
104. *Li, W.W.* Microautophagy: lesser-known self-eating / W.W. Li, J. Li, J.K. Bao // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2012. — Vol. 69(7). — P. 1125–1136.
105. *Liburkin-Dan, T.* Lysyl Oxidase Family Enzymes and Their Role in Tumor Progression / T. Liburkin-Dan, S. Toledano, G. Neufeld // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23(11). Article ID 6249.
106. *Lovell, J.F.* Activatable photosensitizers for imaging and therapy / J.F. Lovell, T.W.B. Liu, J. Chen, G. Zheng // *Chemical Reviews*. — 2010. — Vol. 110(5). — P. 2839–2857.
107. *Luguya, R.* Synthesis of novel carboranylchlorins with dual application in boron neutron capture therapy (BNCT) and photodynamic therapy (PDT) / R. Luguya, F.R. Fronczek, K.M. Smith, M.G.H. Vicente // *Applied Radiation and Isotopes*. — 2004. — Vol. 61(5). — P.1117–1123.

108. *Luo, W.* Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line / W. Luo, R.S. Liu, J.G. Zhu et al. // *Oncology Letters*. — 2015. — Vol. 9(2). — P. 551–556.
109. *Mei, H.* Applications of fluorine-containing amino acids for drug design / H. Mei, J. Han, K.D. Klika et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. — 2020. — Vol. 186. — Article ID 111826.
110. *Miki, Y.* Effect of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy on cell death modalities in human glioblastoma T98G cells / Y. Miki, J. Akimoto, M. Hiranuma, Y. Fujiwara // *The Journal of Toxicological Sciences*. — 2014. — Vol. 39(6). — P. 821–827.
111. *Miki, Y.* Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells / Y. Miki, J. Akimoto, K. Moritake et al. // *Lasers in Medical Science*. — 2015. — Vol. 30. — P. 1739–1745.
112. *Mishchenko, T.* Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? / T. Mishchenko, I. Balalaeva, A. Gorokhova // *Cell Death & Disease*. — 2022. — Vol. 13(5). — Article ID 455.
113. *Mody, T.D.* Pharmaceutical development and medical applications of porphyrin-type macrocycles // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. — 2000. — Vol. 4(4). — P. 362–367.
114. *Moisenovich, M.M.* Novel photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization / M.M. Moisenovich, V.A. Ol'shevskaya, T.I. Rokitskaya et al. // *PLOS One*. — 2010. — Vol. 5(9). — Article ID e12717.
115. *Mroz, P.* Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer / P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin // *Cancers (Basel)*. — 2011. — Vol. 3(2). — P. 2516–2539.
116. *Muller, S.* Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light / S. Muller, H. Walt, D. Dobler-Girdziunaite et al. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 1998. — Vol. 42 (1). — P. 67–70.

117. *Negre-Salvayre, A.* Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors / A. Negre-Salvayre, C. Coatrieux, C. Ingueneau, R. Salvayre // *British Journal of Pharmacology*. — 2008. — Vol. 153(1). — P. 6–20.
118. *Nieva, J.* The antibody-catalyzed water oxidation pathway – a new chemical arm to immune defense? / J. Nieva, P. Wentworth Jr. // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2004. — Vol. 29(5). — P. 274–278.
119. *Nyman, E.S.* Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy / E.S. Nyman, P.H. Hynninen // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2004. — Vol. 73(1-2). — P. 1–28.
120. *Ol'shevskaya, V.A.* Boronated porphyrins and chlorins as potential anticancer drugs / V.A. Ol'shevskaya, A.V. Zaytsev, A.N. Savchenko, A.A. Shtil et al. // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. — 2007. — Vol. 28(11). — P. 1910–1916.
121. *Ol'shevskaya, V.A.* beta-Maleimide substituted meso-arylporphyrins: synthesis, transformations, physicochemical and antitumor properties / V.A. Ol'shevskaya, V.M. Alpatova, A.S. Radchenko et al // *Dyes and Pigments*. — 2019. — Vol. 171. — Article ID 107760.
122. *Ol'shevskaya, V.A.* Boronated protohaemins: synthesis and in vivo antitumour efficacy / V.A. Ol'shevskaya, R.G. Nikitina, A.V. Zaitsev et al. // *Organic and Biomolecular Chemistry*. — 2006. — Vol. 4(20). — P. 3815–3821.
123. *Ol'shevskaya, V.A.* Novel metal complexes of boronated chlorin e6 for photodynamic therapy / V.A. Ol'shevskaya, A.N. Savchenko, A.V. Zaitsev et al. // *Journal of Organometallic Chemistry*. — 2009. — Vol. 694(11). — P. 1632-1637.
124. *Ol'shevskaya, V.A.* Synthesis and antitumor properties of carborane conjugates of 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin / V.A. Ol'shevskaya, V.N. Luzgina, Y.A. Kurakina // *Doklady Chemistry*. — 2012. — Vol. 443. — P. 91–96.
125. *Oleinick, N.L.* Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis / N.L. Oleinick, R.L. Morris, A.L. Nieminen // *Apoptosis, Senescence and Cancer* — 2007. — P. 557–578.

126. *Ornatowski, W.* Black Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease / W. Ornatowski, Q. Lu, M. Yegambaram et al. // *Redox Biology*. — 2020. — Vol. 36. — Article ID 101679.
127. *Pacher, P.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiological Reviews*. — 2007. — Vol. 87(1). — P. 315–424.
128. *Parthasarathy, S.* Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal / S. Parthasarathy, N. Santanam, S. Ramachandran, O. Meilhac // *Journal of Lipid Research*. — 1999. — Vol. 40(12). — P. 2143–2157.
129. *Parzych, K.R.* An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation / K.R. Parzych, D.J. Klionsky // *Antioxidants & Redox Signaling*. — 2014. — Vol. 20(3). — P. 460–473.
130. *Pavani, C.* Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: effect of zinc chelation / C. Pavani, Y. Iamamoto, M.S. Baptista // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. — 2012. — Vol. 88(4). — P. 774–781.
131. *Piette, J.* Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF-kappaB at the crossroad between oncology and immunology // *Photochemical and Photobiological Sciences*. — 2015. — Vol. 14(8). — P. 1510–1517.
132. *Pizzino, G.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health / G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. — 2017. — Vol. 3. — P. 1–13.
133. *Plaetzer, K.* Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT / K. Plaetzer, T. Kiesslich, B. Krammer, P. Hammerl // *Photochemical and Photobiological Sciences*. — 2002. — Vol. 1(3). — P. 172–177.
134. *Pruchniak, M.P.* Biochemistry of oxidative stress / M.P. Pruchniak, M. Arażna, U. Demkow // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. — 2016. — Vol. 878. — P. 9–19.

135. *Pucelik, B.* Design of Pluronic-based formulation for enhanced Redaporfin-photodynamic therapy against pigmented melanoma / B. Pucelik, L.G. Arnaut, G. Stochel, J.M. Dabrowski // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2016. — Vol. 8(34). — P. 22039–22055.
136. *Purser, S.* Fluorine in medicinal chemistry / S. Purser, P.R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur // *Chemical Society Reviews*. — 2008. — Vol. 37(2). — P. 320–330.
137. *Ravikumar, B.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology / B. Ravikumar, S. Sarkar, J.E. Davies et al. // *Physiological Reviews*. — 2010. — Vol. 90(4). — P. 1383–1435.
138. *Rello-Varona, S.* Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine / S. Rello-Varona, J.C. Stockert, M. Canete et al. // *International Journal of Oncology*. — 2008. — Vol. 32(6). — P. 1189–1196.
139. *Reynaert, N.L.* Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta / N.L. Reynaert, A. van der Vliet, A.S. Guala et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2006. — Vol. 103(35). — P. 13086–13091.
140. *Rosenfeld, M.A.* Oxidation of proteins: is it a programmed process? / M.A. Rosenfeld, A.D. Vasilyeva, L.V. Yurina, A.V. Bychkova // *Free Radical Research*. — 2018. — Vol. 52(1). — P. 14–38.
141. *Shen, X.Y.* Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 colon carcinoma cells / X.Y. Shen, N. Zacal, G. Singh, A.J. Rainbow // *Photochemistry and Photobiology*. — 2005. — Vol. 81(2). — P. 306–313.
142. *Shimada, K.* Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis / K. Shimada, R. Skouta, A. Kaplan et al. // *Nature Chemical Biology*. — 2016. — Vol. 12(7). — P. 497–503.
143. *Singh, S.* Glycosylated porphyrins, phthalocyanines, and other porphyrinoids for diagnostics and therapeutics / S. Singh, A. Aggarwal, N.V.S.D.K. Bhupathiraju et al. // *Chemical Reviews*. — 2015. — Vol. 115. — P. 10261–10306.

144. *Soriano, J.* Cell death mechanisms in tumoral and non-tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: apoptosis, necrosis and parthanatos / J. Soriano, I. Mora-Espi, M.E. Alea-Reyes et al. // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — Article ID 41340.
145. *Speranza, M.J.* Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin, and paraquat / M.J. Speranza, A.C. Bagley, R.E. Lynch // *Journal of Biological Chemistry*. — 1993. — Vol. 268(25). — P. 19039–19043.
146. *Srinivas, U.S.* ROS and the DNA damage response in cancer / U.S. Srinivas, B.W.Q. Tan, B.A. Vellayappan, A.D. Jeyasekharan // *Redox Biology*. — 2019. — Vol. 25(12). — Article ID 101084.
147. *Srivastava, M.* Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis / M. Srivastava, N. Ahmad, S. Gupta, H. Mukhtar // *Journal of Biological Chemistry*. — 2001. — Vol. 276(18). — P. 15481–15488.
148. *Stockwell, B.R.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease / B.R. Stockwell, J.P. Friedmann Angeli, H. Bayir et al. // *Cell*. — 2017. — Vol. 171(2). — P. 273–285.
149. *Su, L.J.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis / L.J. Su, J.H. Zhang, H. Gomez et al. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. — 2019. — Vol. 30. — P. 1–13.
150. *Sun, M.* Hiporfin-mediated photodynamic therapy in preclinical treatment of osteosarcoma / M. Sun, C. Zhou, H. Zeng et al. // *Photochemistry and Photobiology*. — 2015. — Vol. 91(3). — P. 533–544.
151. *Sung, H.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel et al. // *CA: A Cancer Journal for Clinicians* — 2021. — Vol. 71(3). — P. 209–249.
152. *Syntichaki, P.* Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? / P. Syntichaki, N. Tavernarakis // *EMBO Reports*. — 2002. — Vol. 3(7). — P. 604–609.

153. *Tamiaki, H.* 51 Photochemistry of chlorophylls and their synthetic analogs / H. Tamiaki, M. Kunieda // Handbook of Porphyrin Science. — 2011. — Vol. 11. — P. 223–290.
154. *Tang, D.* The molecular machinery of regulated cell death / D. Tang, R. Kang, T.V. Berghe et al. // Cell Research. — 2019. — Vol. 29(5). — P. 347–364.
155. *Taniguchi, M.* Synthetic chlorins, possible surrogates for chlorophylls, prepared by derivatization of porphyrins / M. Taniguchi, J.S. Lindsey // Chemical Reviews. — 2017. — Vol. 117(2). — P. 344–535.
156. *Tarangelo, A.* p53 Suppresses Metabolic Stress-Induced Ferroptosis in Cancer Cells / A. Tarangelo, L. Magtanong, K.T. Bieging-Rolett et al. // Cell Reports. — 2018. — Vol. 22(3). — P. 569–575.
157. *Thompson, S.A.* Compromising the plasma membrane as a secondary target in photodynamic therapy-induced necrosis / S.A. Thompson, A. Aggarwal, S. Singh et al. // Bioorganic & Medicinal Chemistry. — 2018. — Vol. 26(18). — P. 5224–5228.
158. *Tian, J.* Recent advances of multi-dimensional porphyrin-based functional materials in photodynamic therapy / J. Tian, B. Huang, M.H. Nawaz, W. Zhang // Coordination Chemistry Reviews. — 2020. — Vol. 420. — Article ID 213410.
159. *Tong, K.I.* Keap 1 recruits Neh 2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model / K. I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki et al. // Molecular and Cellular Biology. — 2006. — Vol. 26(8). — P. 2887–2900.
160. *Tsoi, J.* Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress / J. Tsoi, L. Robert, K. Paraiso et al. // Cancer Cell. — 2018. — Vol. 33(5). — P. 890–904.
161. *Turrens, J.F.* Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase / J.F. Turrens, J.D. Crapo, B.A. Freeman // Journal of Clinical Investigation. — 1984. — Vol. 73(1). — P. 87–95.
162. *Valko, M.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol et al. // Chemico-Biological Interactions. — 2006. — Vol. 160(1). — P. 1–40.

163. *Valko, M.* Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T.D. Cronin // *Current Medicinal Chemistry*. — 2005. — Vol. 12(10). — P. 1161–1208.
164. *Valko, M.* Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence / M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser // *Molecular and Cellular Biochemistry*. — 2004. — Vol. 266(1-2). — P. 37–56.
165. *Vanden Berghe, T.* Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways / T. Vanden Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet et al. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2014. — Vol. 15(2). — P. 135–147.
166. *Veal, E.A.* Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? / E.A. Veal, Z.E. Underwood, L.E. Tomalin et al. // *Antioxidants and Redox Signaling*. — 2018. — Vol. 28(7). — P. 574–590.
167. *Verfaillie, T.* PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress / T. Verfaillie, N. Rubio, A.D. Garg et al. // *Cell Death & Differentiation*. — 2012. — Vol. 19(11). — P. 1880–1891.
168. *Verfaillie, T.* Pro-apoptotic signaling induced by photo-oxidative ER stress is amplified by Noxa, not Bim / T. Verfaillie, A. van Vliet, A.D. Garg et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2013. — Vol. 438(3). — P. 500–506.
169. *Villalpando-Rodriguez, G.E.* Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat / Gloria E. Villalpando-Rodriguez, Spencer B. Gibson // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. — 2021. — Vol. 155. — P. 1–17.
170. *Viswanathan, V.S.* Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway / V.S. Viswanathan, M.J. Ryan, H.D. Dhruv et al. // *Nature*. — 2017. — Vol. 547(7664). — P. 453–457.
171. *Warren, C.F.A.* BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer / C.F.A. Warren, M.W. Wong-Brown, N.A. Bowden // *Cell Death & Disease*. — 2019. — Vol. 10(3). — Article ID 177.

172. *Weaver, K. N.* The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities // K. Weaver, R. Skouta / Biomedicines. — 2022. — Vol. 10(4). — Article ID 891.
173. *Wei, M.F.* Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells / M.F. Wei, M.W. Chen, K.C. Chen et al. // Autophagy. — 2014. — Vol. 10(7). — P. 1179–1192.
174. *Wesselborg, S.* Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks / S. Wesselborg, B. Stork // Cellular and Molecular Life Sciences. — 2015. — Vol. 72(24). — P. 4721–4757.
175. *Willcox, J.K.* Antioxidants and prevention of chronic disease / J.K. Willcox, S.L. Ash, G.L. Catignani // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2004. — Vol. 44(4). — P. 275–295.
176. *Xue, L.Y.* Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 / L.Y. Xue, S.M. Chiu, N.L. Oleinick // Oncogene. — 2001. — Vol. 20(26). — P. 3420–3427.
177. *Yang, W.S.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 / W.S. Yang, R. SriRamaratnam, M.E. Welsch et al. // Cell. — 2014. — Vol. 156(1-2). — P. 317–331.
178. *Young, I.* Antioxidants in health and disease / I. Young, J. Woodside // Journal of Clinical Pathology. — 2001. — Vol. 54(3). — P. 176–186.
179. *Zhang, W.* Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality / W. Zhang, S. Xiao, D.U. Ahn // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2013. — Vol. 53(11). — P. 1191–1201.
180. *Zhao, R.Z.* Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (review) / R. Z. Zhao, S. Jiang, L. Zhang, Z. B. Yu // International Journal of Molecular Medicine. — 2019. — Vol. 44(1). — P. 3–15.
181. *Zhao, Y.* Salinomycin-Loaded Gold Nanoparticles for Treating Cancer Stem Cells by Ferroptosis-Induced Cell Death / Y. Zhao, W. Zhao, Y.C. Lim, T. Liu // Molecular Pharmaceutics. — 2019. — Vol. 16(6). — P. 2532–2539.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научным руководителям проф., д.б.н. Е.В. Калининой и д.м.н. А.А. Штилю, а также соавторам, коллективу лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России и заведующему и сотрудникам кафедры биохимии им. Т.Т. Березова Медицинского института РУДН.