

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2023

Работа выполнена на кафедре биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН).

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Калинина Елена Валентиновна
профессор кафедры биохимии им. академика Т.Т. Березова
Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

доктор медицинских наук
Штиль Александр Альбертович
заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых
клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Посыпанова Галина Ароновна
ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и
молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-
природоподобных технологий ФГБУ «Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт»

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент
Академии наук РТ
Бойчук Сергей Васильевич
заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-
биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский
государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор
Якушева Елена Николаевна
заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 6 октября 2023 г. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: <https://www.rudn.ru/science/dissovet> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.025
доктор биологических наук, профессор

Е.В. Лукашева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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). Метод ФДТ основан на применении экзогенных фотосенсибилизаторов (ФС), способных накапливаться в опухоли; под действием света 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 механизме противоопухолевого действия ФДТ в первую очередь 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 [Donohoe C. et al., 2019; dos Santos A.F. et al., 2019].

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 [Moisenovich M.M. et al., 2010].

В этой связи актуальным является исследование нового соединения (условные названия фторборхлорин, фторированный карборанилхлорин, ФБХ, химическое название – {5,10,15,20-тетраakis[4-(1-карба-клизозо-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 излучения [Hamblin M.R., 2020; dos Santos A.F. et al., 2019]. В настоящее время различные химические классы ФС используются в клинике или проходят клинические испытания [Josefsen L.B. et al., 2008]. Среди них природные и синтетические хлорины [Taniguchi M. et al., 2017; Nyman E.S. et al., 2004] 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 [Lovell J.F. et al., 2010; Singh S. et al., 2015; Tian J. et al., 2020]. 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 [Ol'shevskaya V.A. et al., 2007; V. Gottumukkala V. et al., 2006]. Карборанилсодержащие хлорины стали перспективными двойными сенсибилизаторами для использования как в ФДТ, так и в БНЗТ [Hiramatsu R. et al., 2015]. 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.) [Galluzzi L. et al., 2018; Kessel D. et al., 2018; Soriano J. et al., 2017]. В зависимости от типа опухолевых клеток, физико-химических свойств и концентрации ФС, внутриклеточной локализации, интенсивности облучения может запускаться тот или иной тип гибели [Piette J., 2015; Mishchenko T. et al., 2022].

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

Для достижения цели 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 ФДТ и борнейтронозахватной терапии в модели трансплантированной меланомы у лабораторных мышей.

Теоретическая и практическая значимость работы. В диссертационном исследовании впервые проведена оценка 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 в культуре клеток и показана его перспективность для углубленного 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).

Методология и методы диссертационного исследования. При выполнении работы использован ряд современных экспериментальных методов: МТТ-тест для оценки жизнеспособности клеток, оценка экспрессии генов с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени, флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, оценка апоптоза методом проточной цитофлуориметрии с помощью окрашивания клеток пропидия йодидом и аннексином V.

Научные результаты, полученные лично автором, содержащие научную новизну, заключаются в следующих положениях, выносимых 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 B16.

Степень достоверности результатов работы. Выводы, представленные в данной работе, подтверждаются экспериментальными данными. Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны и статистически достоверны.

Оценка статистической значимости различий проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента и непараметрического Манна-Уитни. Уровни значимости критериев Стьюдента и Манна-Уитни были установлены равными 0,05. Статистическая обработка результатов проводилась с применением программных пакетов MO Excel, Statistica 10, BioStat.

Соответствие темы требованиям паспорта специальности ВАК. Работа выполнена в рамках паспорта специальности 1.5.4 – Биохимия: п.5 «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства» и 3.1.6 – Онкология: п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Апробация результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационного исследования представлены на IV Всероссийской конференции с международным участием «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Санкт-Петербург, РФ, 2015), I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, РФ, 2015), XXVIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, РФ, 2015), XVI Международной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии» с элементами школы молодых ученых (Москва, РФ, 2015), конкурсе У.М.Н.И.К. (Москва, РФ, 2015), X Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев-2017» (Санкт-Петербург, РФ, 2017), VIII Международной научной конференции #SCIENCE4HEALTH2017 (Москва, РФ, 2017), XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии - 2017» (Санкт-Петербург, РФ, 2017), VI Всероссийской конференции с международным участием «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Ростов-на-Дону, РФ, 2017), XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2018» (Санкт-Петербург, РФ, 2018), 43rd FEBS Congress (Prague, Czech Republic, 2018), IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, РФ, 2018), XXXI Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, РФ, 2019), XIII Международной конференции «Синтез и применение порфиринов и их аналогов» (Костромская область, Серебряный плес, РФ, 2019), 44th FEBS Congress (Krakow, Poland, 2019). Получены диплом за 2 место в конкурсе молодых ученых на конференции «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Санкт-Петербург, РФ, 2015), 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. Автором опубликовано 11 научных работ: 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, и тезисы 6 докладов.

Структура и объем диссертации. 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые соединения. 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 до 10 мМ, ФБХ растворяли в воде до 10 мМ, растворы хранили при 4 °С.

Культуры клеток. В работе использованы культуры клеток линий ПФЧ (постнатальные фибробласты человека), С6 (глиома крысы), В16 (меланома мыши), НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека), НСТ116р53КО (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).

В работе были использованы следующие методики:

Экспрессию генов изучали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни мРНК нормализовали относительно экспрессии референсного гена β-актина.

Оценку внутриклеточного накопления ФС и исследование клеточного цикла проводили с помощью проточной цитофлуориметрии.

Для оценки фотоактивности и темновой токсичности ФБХ использовали МТТ-теста [Mosmann T., 1985].

Оценка фотоактивности ФБХ проведена методом флуоресцентной микроскопии. Клетки идентифицировали при помощи флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss, используя 20-кратный объектив или 200-кратное увеличение.

Анализ клеточной гибели проводили методом проточной цитофлуориметрии по анализу клеток, окрашенных пропидий йодидом и аннексином V, конъюгированным флуорохромом FITC (AnnV-FITC).

Спектры флуоресценции *синглетного кислорода* в ацетонитриле ($\lambda_{\max} \sim 1270$ нм) получены при облучении ксеноновой лампой (фотовозбуждение при 511 нм). Квантовые выходы синглетного кислорода определяли сравнением с тетрафенилпорфирином (ТФП) в качестве эталона ($\Phi_{\Delta} = 0, 60$) [Ramos L.D. et al., 2017].

Оценка фотодинамического воздействия ФБХ проводилась на 69 мышах-гибридах первого поколения F1(CBAxС57BL6) с меланомой В16. ФБХ вводили внутрибрюшинно в дозах 5 и 10 мг/кг. Через 24 часа опухолевый очаг облучали лазером с длиной волны возбуждения 661 нм. Контролем служили интактные животные-опухоленосители. Замеры диаметров опухоли производили до введения препарата и затем на 3, 7, 10, 14 и 21 сутки после проведения ФДТ. Объем опухолей рассчитывали по формуле: $V = \pi/6 * (d_1 * d_2 * d_3)$, где d_1 , d_2 и d_3 — три взаимно перпендикулярных измерения опухолевого узла. Эффективность терапии оценивали по показателям: торможение роста опухоли (ТРО), индекс прироста опухоли и переносимость терапии.

Оценка бор-нейтронозахватного действия проводилась в университете г. Киото (Япония). Действие нейтронов изучали на культуре клеток меланомы В16 и *in vivo* на мышах-гибридах F1(СВАхС57ВL6). Культуру В16 рассеивали на 60 мм чашки Петри 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 В16 [10В]=8.9 ppm, 3×10^5 клеток; для животных 0.2 Gy/[10В] ppm, 1 MW.

Оценка статистической значимости различий проводилась с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического Манна-Уитни [Гланц С., 1998]. 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 ($p \leq 0,05$). Статистическая обработка результатов проводилась с применением программных пакетов Statistica 10, BioStat.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Экспрессия генов, важных в контроле окислительно-восстановительного гомеостаза, 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.

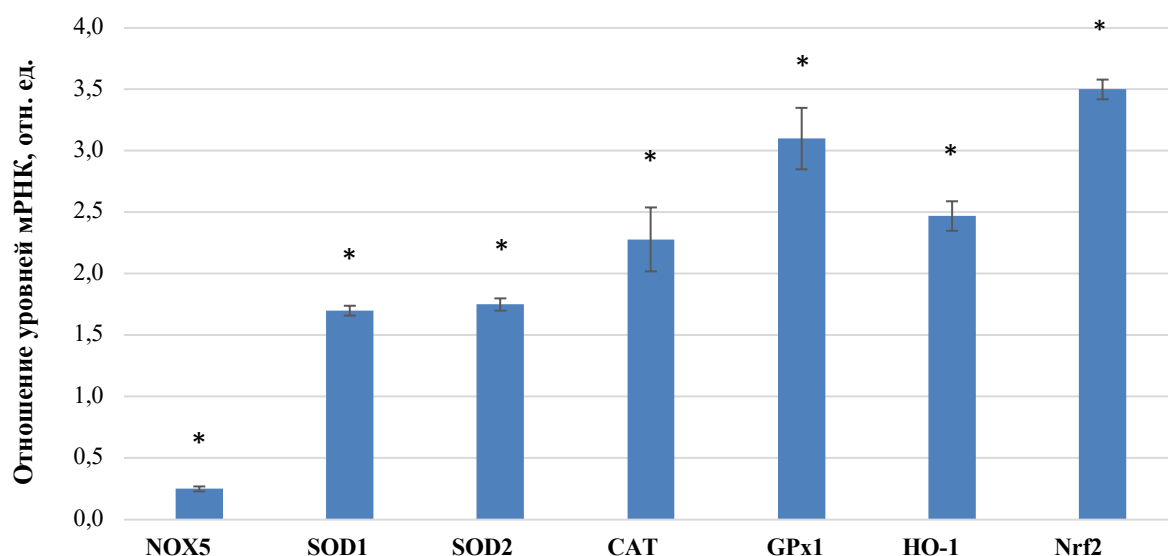


Рис. 1. Экспрессия генов *NOX5*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *HO-1* и *NFE2L2* в устойчивых клетках SKOV-3/CDDP относительно чувствительных SKOV-3 клеток. После нормализации на мРНК β -актина определяли изменения мРНК в резистентных клетках относительно данных в чувствительных клетках (принято за 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 в цитозоле и в митохондриальном матриксе, был значительно выше (в 2,3 и 3 раза, соответственно) в резистентных клетках по сравнению с родительскими клетками (рис. 1). 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. 1). Значительные изменения антиоксидантного статуса клеток SKOV-3/CDDP подтверждаются повышением экспрессии гена гемооксигеназы-1. Полученные результаты свидетельствуют о редокс-зависимом развитии адаптивного антиоксидантного ответа как важном процессе в механизме формирования устойчивости к цисплатину.

Оценка внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках

Методом проточной цитометрии нами было проанализировано внутриклеточное накопление производных хлорина: ФБХ, БХ и ФХ в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP. Структура соединений представлена на рис. 2.

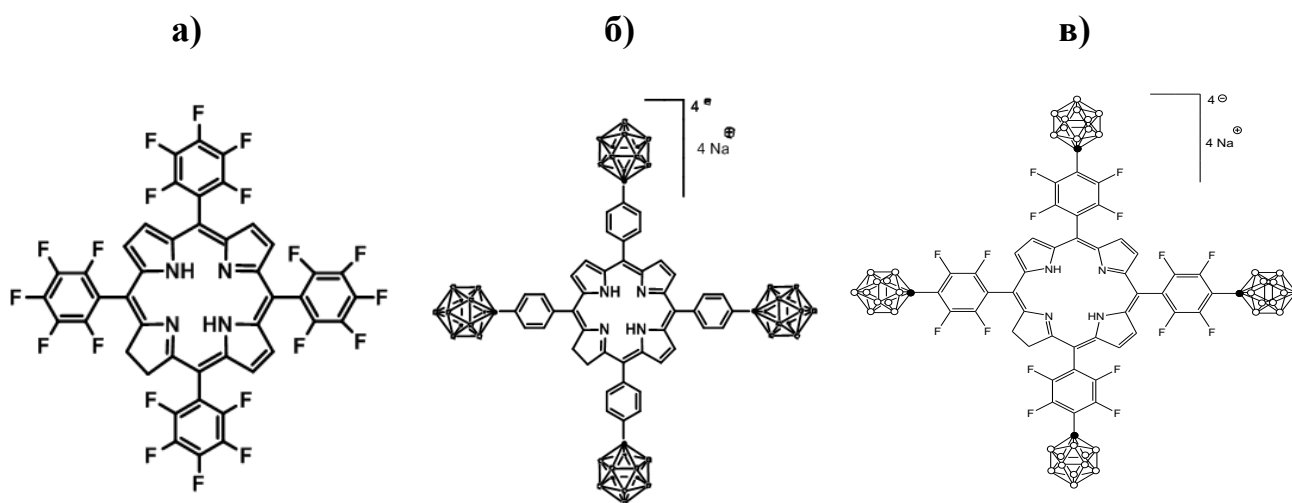


Рис. 2. Структура ФС – производных хлорина: **а)** фторхлорин (ФХ), **б)** борхлорин (БХ), **в)** фторированный карборанилхлорин (фторборхлорин, ФБХ).

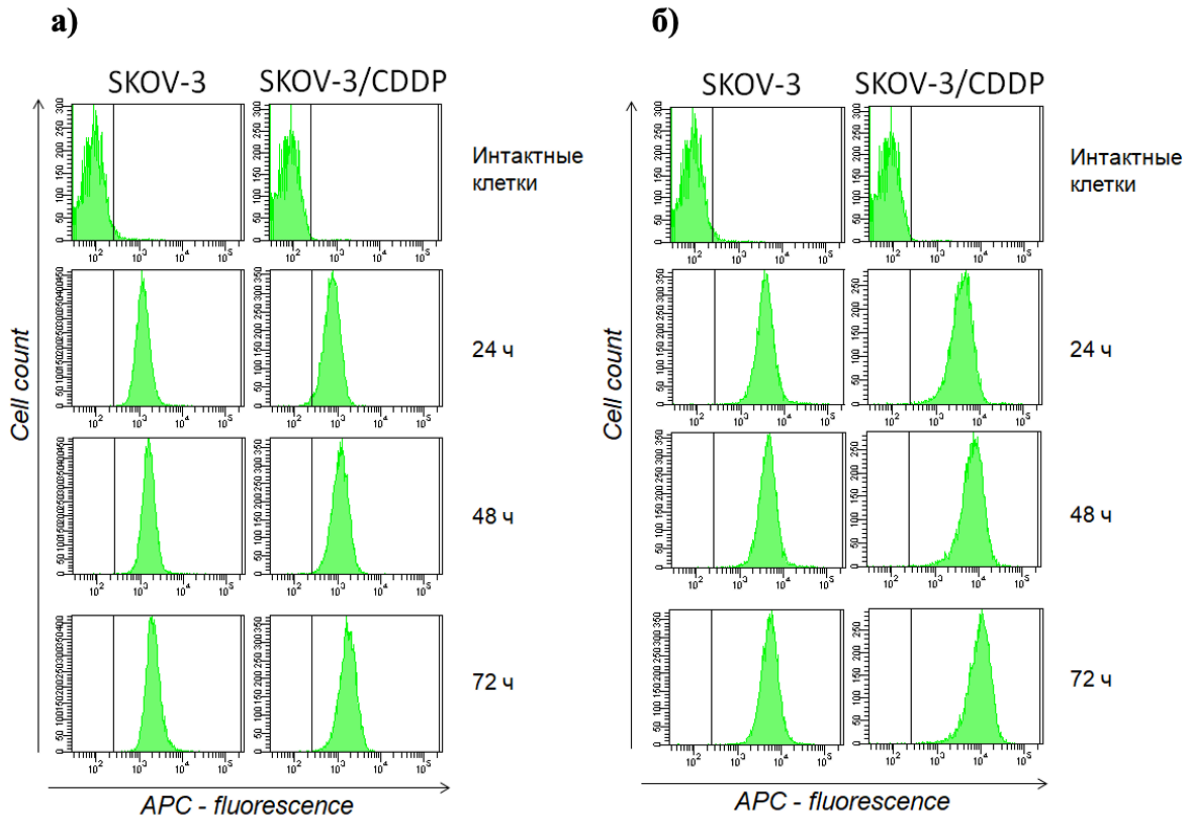


Рис. 3. Флуоресценция клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при накоплении **ФХ** (а) и **БХ** (б) в течение 24-72 часов. Ось X – интенсивность флуоресценции; ось Y – количество флуоресцентных «событий» (клеток).

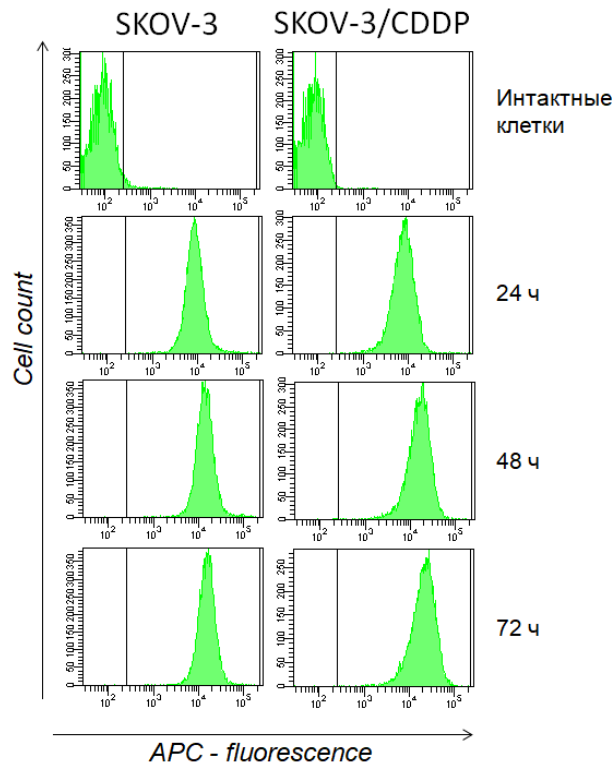


Рис. 4. Изменения флуоресценции клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при накоплении **ФБХ** в интервале времени 24-72 часа. Ось X – интенсивность флуоресценции; ось Y – количество флуоресцентных «событий» (клеток).

Анализ зависимости накопления производных хлорина от времени инкубации показывает, что фторхлорин быстрее накапливается в чувствительных SKOV-3 по сравнению с устойчивыми к цисплатину клетками SKOV-3/CDDP (рис. 3а). В отличие от ФХ, другое производное хлорина – БХ обладает более высокой скоростью накопления в опухолевых клетках (рис. 3б). При этом скорость поступления БХ в резистентные клетки выше скорости его накопления в исходных клетках. Появление в структуре хлорина фтора и бора усиливает способность ФБХ накапливаться по сравнению с БХ (рис. 4, 5). Как и в случае с БХ, скорость поступления ФБХ в резистентные клетки SKOV-3/CDDP выше скорости его накопления в чувствительных клетках SKOV-3.

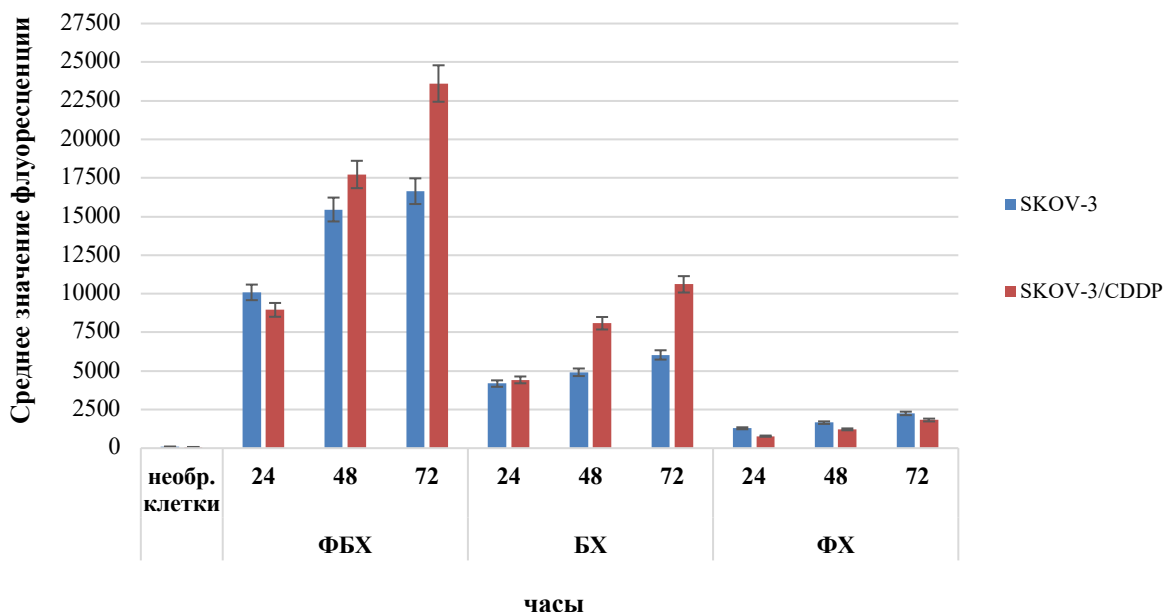


Рис. 5. Зависимость флуоресценции клеток от времени инкубации с производными хлорина ФБХ, БХ, ФХ (n=3; p<0,05).

Оценка темновой токсичности ФБХ

Для определения антинеопластической активности ФБХ использован МТТ-тест, выявляющий концентрации, необходимые для гибели 50% опухолевых клеток культуры (показатель IC_{50}). МТТ-тест проводили после 72-часовой инкубации 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. В качестве контроля использованы постнатальные фибробласты человека (ПФЧ).

Для постнатальных фибробластов человека (ПФЧ) $IC_{50}=44,3\pm 0,98$ 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 $IC_{50}>50$ мкМ. Полученные результаты показывают, что темновая токсичность ФБХ низкая.

Оценка фототоксичности ФБХ на культурах опухолевых клеток

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 йодид пропидия, который проникает в ядро только при поврежденной плазматической мембране. По данным микроскопии (рис. 6-8), среди клеток, не получивших ФБХ, практически нет погибших. Такой же результат отмечается для опухолевых клеток после накопления ФБХ в течение 24 часов. После освещения клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ116 и сублинии НСТ116р53КО (рис. 6), аденокарциномы яичника SKOV-3 и SKOV-3/CDDP (рис. 7), аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MCF-7/Dox (рис. 8), накопивших ФБХ в течение 24 часов, белым светом в течение 20 минут наблюдается 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 устойчивых к известным противоопухолевым препаратам – доксорубицину и цисплатину.

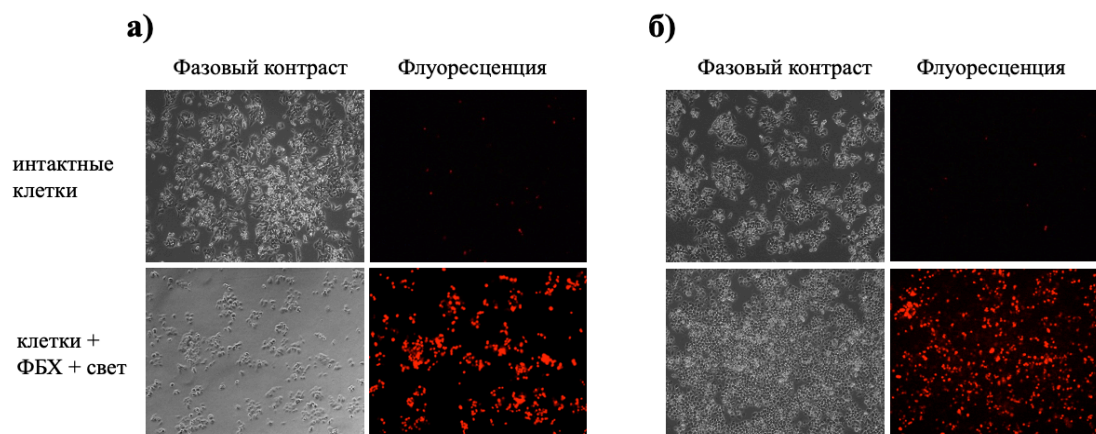


Рис. 6. Фотоповреждение клеток аденокарциномы толстой кишки НСТ116 (а) и клеток изогенной сублинии НСТ116р53КО, устойчивой к ряду ДНК-повреждающих противоопухолевых препаратов, (б) в присутствии ФБХ (200-кратное увеличение).

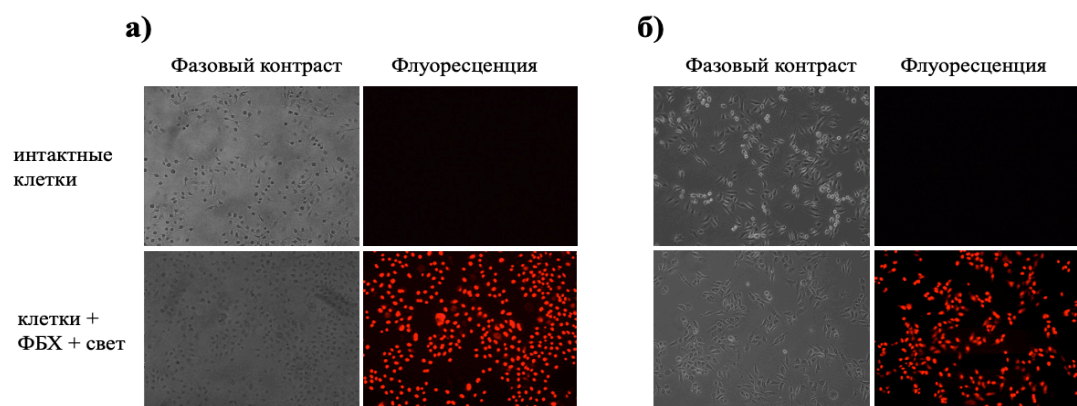


Рис. 7. Фотоповреждение клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 (а) и клеток сублинии аденокарциномы яичника SKOV-3/CDDP, устойчивой к цисплатину, (б) и в присутствии ФБХ (200-кратное увеличение).

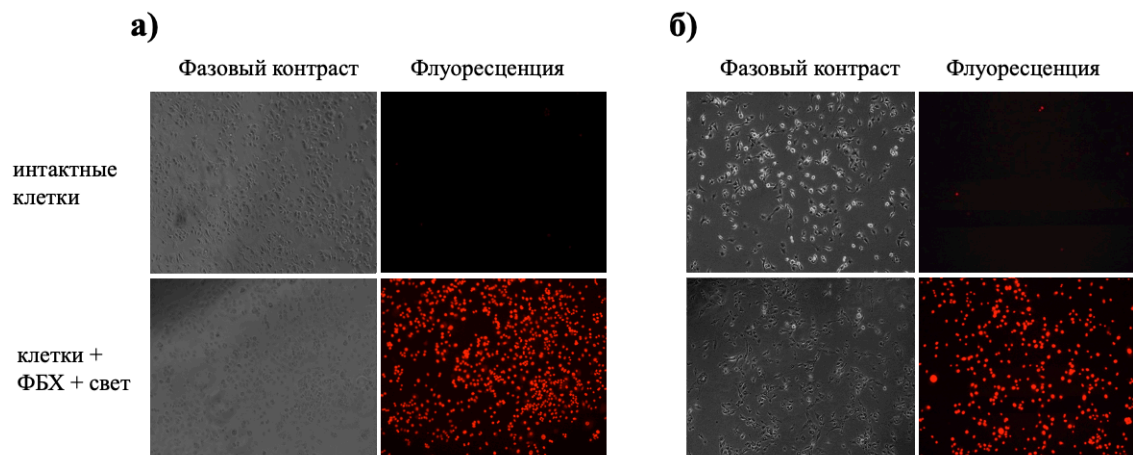


Рис. 8. Фотоповреждение клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 (а) клеток сублинии аденокарциномы молочной железы MCF-7/Dox, устойчивой к доксорубину, (б) в присутствии ФБХ (200-кратное увеличение).

Исследования фототоксичности ФБХ на опухолевых клетках с 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 (рис. 9).

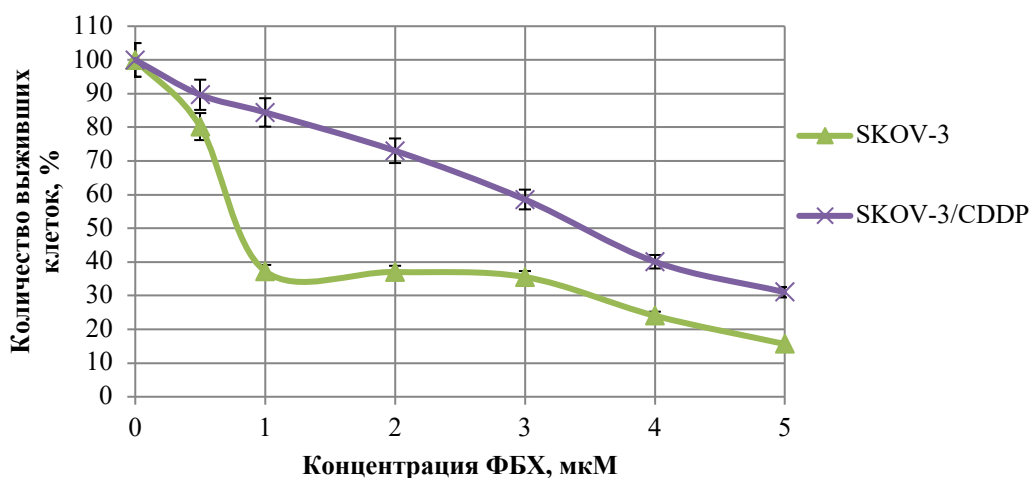


Рис. 9. Кривые выживаемости клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при фотоактивации ФБХ (n = 3, p<0,05).

Полученные данные о повышении $IC_{50}=3,4\pm 0,69$ мкМ для клеток SKOV-3/CDDP (IC_{50} $0,7\pm 0,50$ мкМ для SKOV-3) также говорит об определенной системе устойчивости SKOV-3/CDDP. Последнее подтверждается данными о значительном росте антиоксидантного статуса клеток SKOV-3 при формировании устойчивости к цисплатину.

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

Для оценки количества живых, апоптотических и некротических клеток использован метод двойного флуоресцентного окрашивания клеток аннексином V-FITC и йодидом пропидия.

Апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V-FITC, в то время как некротические клетки окрашиваются обоими реагентами. Жизнеспособные клетки остаются негативными.

Обнаружено, что в контроле количество живых клеток SKOV-3 составляет 73,7%, ранних апоптотических клеток – 4,4%, а условно некротических или поздних апоптотических – 0,8 и 21,1% (рис. 10). В сублинии, устойчивой к цисплатину, в контроле количество живых клеток составляет 76,5%, ранних апоптотических клеток – 6,1%, условно некротических или поздних апоптотических – 1,5% и 15,9% (рис. 10).

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. 10). 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. 10).

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. 10).

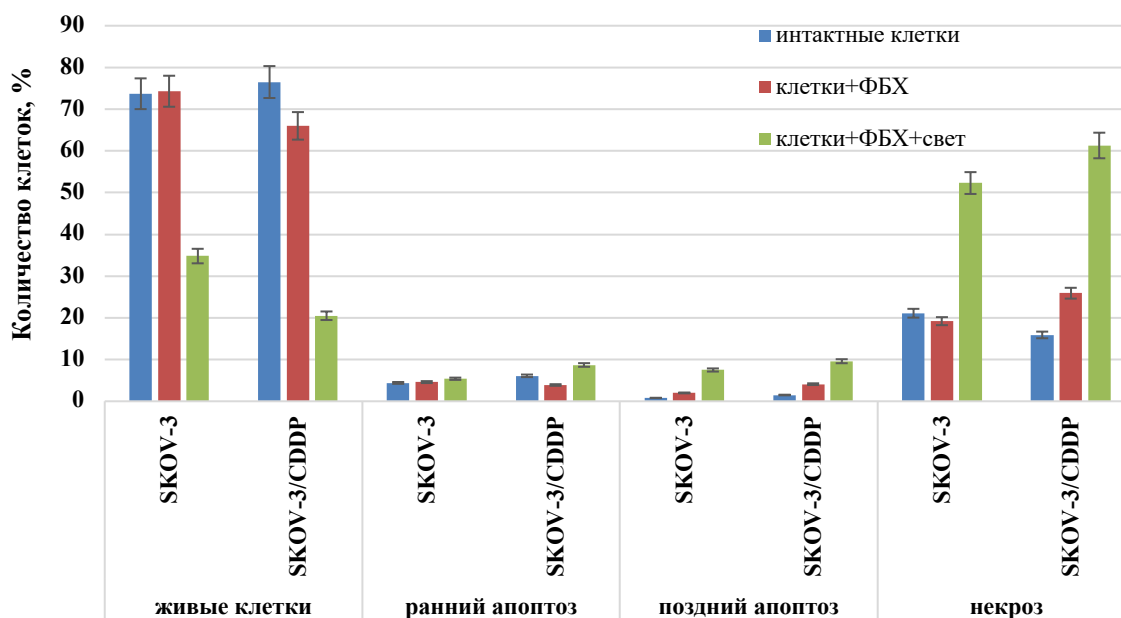


Рис. 10. Анализ клеток, окрашенных конъюгатом аннексина V-FITC и йодидом пропидия (n=3; p<0,05).

Исследование клеточного цикла после фотоактивации ФБХ

Влияние ФБХ при активации на распределение ploидности 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

получена динамика гибели опухолевых клеток в виде выраженного повышения пика sub-G1 (рис. 11). При этом клетки меланомы В16 демонстрировали более высокую чувствительность к фотоактивирующему действию ФБХ по сравнению с клетками глиомы С6.

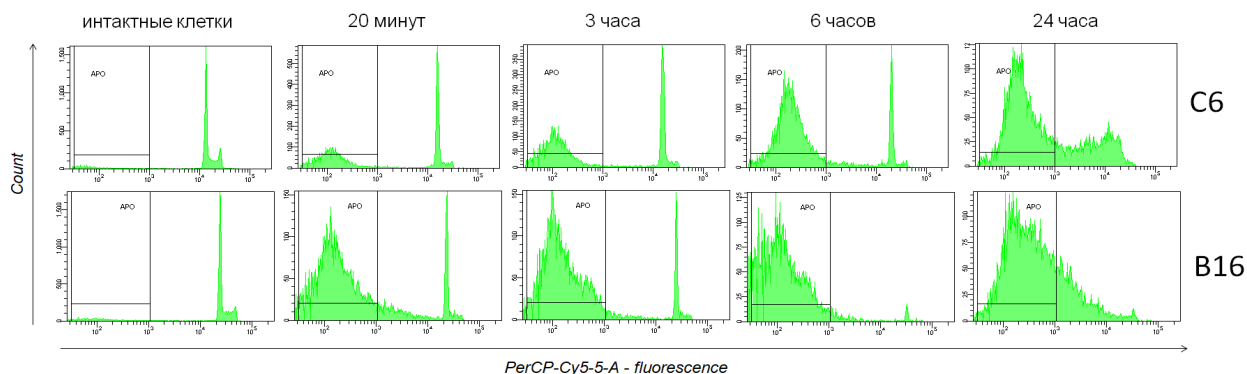


Рис. 11. Гистограммы флуоресценции клеток глиомы С6 и меланомы В16. Распределение клеток С6 и В16 по фазам цикла после освещения с 5 мкМ ФБХ.

Аргументом в пользу неапоптотического механизма гибели клеток С6 и В16 при действии ФБХ является окрашивание йодидом пропидия (рис. 6-8). Клетки, обработанные ФБХ (5 мкМ, 24 часа, освещение) накапливали йодид пропидия в первые минуты после освещения (рис. 6-8), что позволяет предположить некротический компонент механизма гибели. Такое повреждение нерепарируемо, поэтому можно говорить о полном эффекте воздействий, что и требуется для стойкого терапевтического результата.

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. 12, 13).

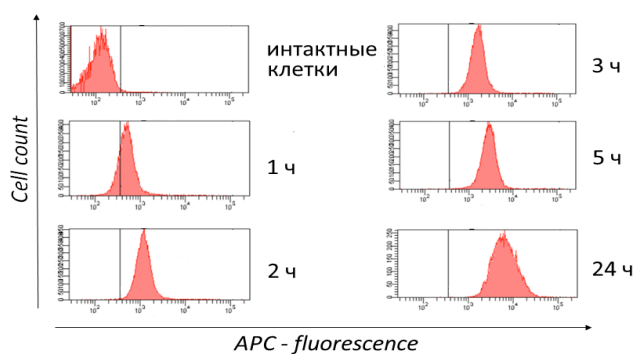


Рис. 12. Флуоресценция клеток меланомы В16 при накоплении ФБХ.

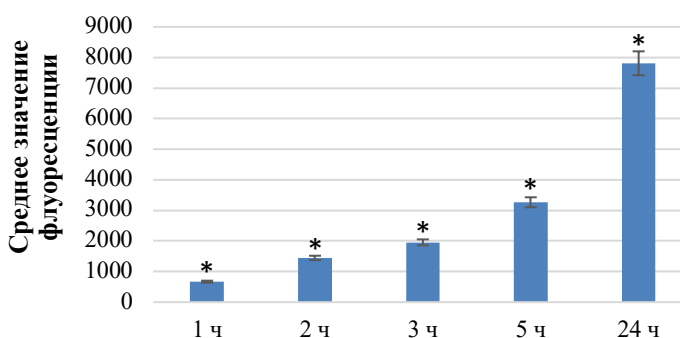


Рис. 13. Зависимость флуоресценции клеток от времени инкубации с ФБХ (n = 3; * p<0,05).

Оценка квантового выхода синглетного кислорода

На основании анализа параметров флуоресценции синглетного кислорода проведено исследование фотосенсибилизирующей способности производных хлорина. Спектры флуоресценции синглетного кислорода (рис. 14) в ацетонитриле ($\lambda_{\max} \sim 1270$ нм) 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]. Значения Φ ($^1\text{O}_2$): 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 соединений в качестве фотосенсибилизаторов.

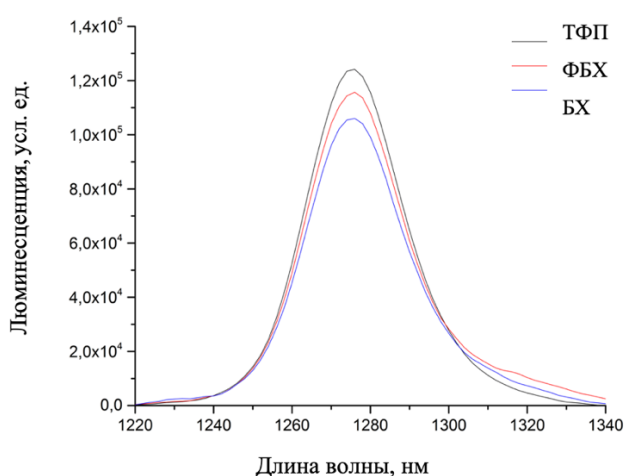


Рис. 14. Спектры флуоресценции синглетного кислорода при фотовозбуждении ФБХ, БХ, ТФП в насыщенных воздухом растворах ацетонитрила.

Оценка фотодинамического действия ФБХ

Исследовано фотодинамическое действие ФБХ на очаги перевивной меланомы В16. Оценка фотодинамического действия ФБХ на очаг меланомы 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 час. (время, требуемое для накопления ФБХ в опухоли) проводили освещали опухоли монохроматическим светом при плотности энергии 150 Дж/см² и мощности лазерного излучения 0,25 Вт/см². В первые 1-3 суток отмечен отек тканей в области воздействия, переходящий 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 лишь $7,15 \pm 1,85$ ($p < 0,009$), 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 внутривнутрибрюшинно).

3 группа. Увеличение плотности энергии лазерного излучения до 300 Дж/см^2 при неизменной дозе лекарственной формы ФБХ (5 мг/кг внутривнутрибрюшинно) 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 мыши) ($p < 0,01$). 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. 15).

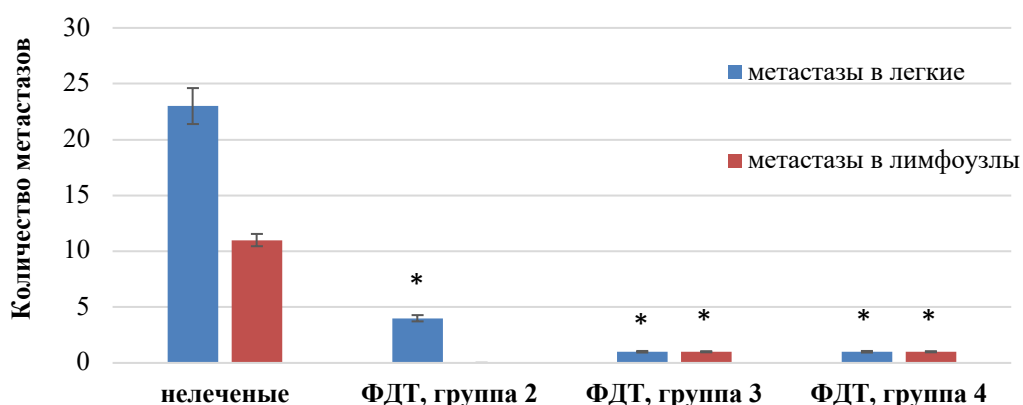


Рис. 15. Метастазирование меланомы В16 мышей после ФДТ с ФБХ ($n=3$; * $p < 0,05$).

Таким образом, экспериментальная ФДТ в присутствии лекарственной формы ФБХ 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 радиосенсибилизатора 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 быстро тормозятся (ядро Li - на длине 5 мкм, альфа-частица - на 7 мкм). Поскольку размер клетки порядка 10 мкм, то следует, что 80 % энергии ядерной реакции выделяется в клетке, содержащей ^{10}B . Вследствие этого БНЗТ более безопасна, чем стандартная рентгенотерапия.

Бор-нейрозахватная терапия меланомы В16 с использованием ФБХ

БНЗТ проводили с использованием исследовательского протонно-нейтронного реактора университета г. Киото (Япония) на основании двухстороннего меморандума о сотрудничестве с Институтом элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН. Разрешение на проведение испытаний получал профессор Н. Мийоши (университет префектуры Фукуи, Япония). Результаты (рис. 16 и 17) 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. 16) 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.

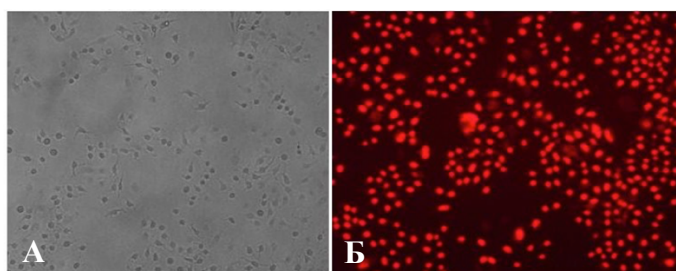


Рис. 16. Некротическая гибель клеток меланомы В16 при действии тепловых нейтронов. А – до воздействия, Б – через 24 часа после воздействия.

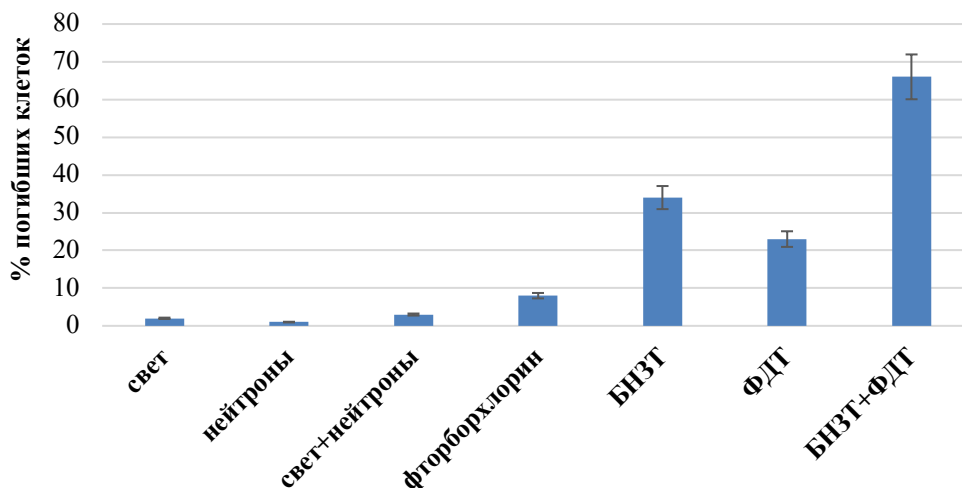


Рис. 17. Синергический эффект БНЗТ и ФДТ на жизнеспособность культивируемых клеток меланомы В16 (n=3; p<0,05).

Прививка опухоли и процедуры с животными-опухоленосителями не отличались от методов, использованных для ФДТ. Лекарственную форму ФБХ вводили внутривенно 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-опухоленосителям вначале проводили ФДТ однократно (5 мг/кг лекарственной формы ФБХ внутривенно, 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.

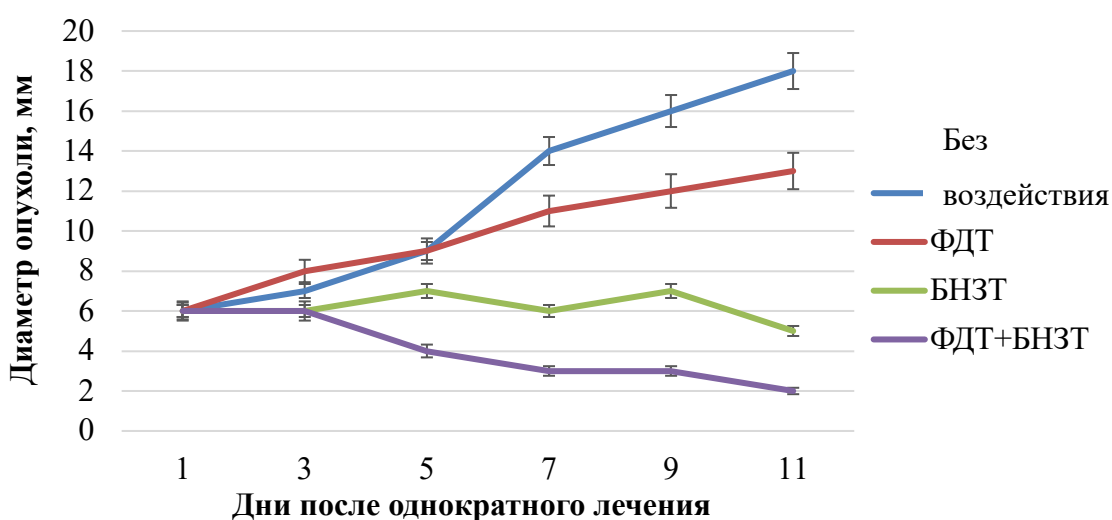


Рис. 18. Терапевтическая эффективность ФДТ, БНЗТ и их сочетания у мышей с трансплантированной меланомой В16 (n = 3; p<0,05).

Результаты сочетанного фотолучевого воздействия на очаг меланомы – ФДТ + БНЗТ в сравнении отдельными видами этих воздействий представлены на рис. 18. 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.

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

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать следующие 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых наукометрическими базами данных Scopus и Web of Science:

1. Ol'shevskaya V.A. β -Maleimide substituted meso-arylporphyrins: Synthesis, transformations, physico-chemical and antitumor properties / Ol'shevskaya V.A., Alpatova V.M., Radchenko A.S., Ramonova A.A., **Petrova A.S.**, Tatarskiy V.V., Zaitsev A.V., Kononova E.G., Ikonnikov N.S.,

- Kostyukov A.A., Egorov A.E., Moisenovich M.M., Kuzmin V.A., Bragina N.A., Shtil A.A. // *Dyes and Pigments*, 2019, 171, 107760.
2. Grin M.A. New Derivatives of Bacteriochlorophyll a With Au (I) Complexes Are Potent Antitumor Agents In the Dark and Upon Light Activation / Grin M.A., Tikhonov S.I., **Petrova A.S.**, Pogorilyy V.A., Noev A.N., Tatarskiy V.V., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R., Kalinina E.V., Chernov N.N., Shtil A.A., Mironov A.F., Kaprin A.D., Filonenko E.V. // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2020, 20(1), 49-58.
 3. Ol'shevskaya V.A. The synthetic fluorinated tetracarboranylchlorin as a versatile antitumor photoradiosensitizer / Ol'shevskaya V.A., Zaitsev A.V., **Petrova A.S.**, Arkhipova A.Yu., Moisenovich M.M., Kostyukov A.A., Egorov A.E., Koroleva O.A., Golovina G.V., Volodina Yu.L., Kalinina E.V., Kuzmin V.A., Sakurai Yo., Tanaka H., Miyoshi N., Shtil A.A. // *Dyes and Pigments*, 2021, 186, 108993.
 4. Spector D.V. Pt(IV) Prodrugs with Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Axial Position / Spector D.V., Pavlov K.G., Akasov R.A., Vaneev A.N., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Nikitina V.N., Lopatukhina E.V., Semkina A.S., Vlasova K.Yu., Skvortsov D.A., Roznyatovsky V.A., Ulyanovskiy N.V., Pikovskoi I.I., Sypalov S.A., Garanina A.S., Vodopyanov S.S., Abakumov M.A., Volodina Yu.L., Markova A.A., **Petrova A.S.**, Mazur D.M., Sakharov D.A., Zyk N.V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Krasnovskaya O.O. // *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(12), 8227-8244.
 5. Kalinina E.V. Redox-Dependent Expression of Genes Encoding NADPH Oxidase 5 and the Key Antioxidant Enzymes during Formation of Drug Resistance of Tumor Cells to Cisplatin / Kalinina E.V., Andreev Y.A., **Petrova A.S.**, Lubova K.I., Shtil' A.A., Chernov N.N., Novichkova M.D., Nurmuradov N.K. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2018, 165(5), 678-681.
 6. Kalinina E. Expression of genes encoding NADPH-oxidase 5 and key antioxidant enzymes under formation of cancer cell resistance to cisplatin / Kalinina E., Andreev Y., Lubova K., **Petrova A.**, Shtil A., Chernov N., Novichkova M., Nurmuradov N. // *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 120, Suppl. 1, S50.
 7. Kalinina E. Redox-dependent change in the expression of genes controlling cellular ROS/antioxidants balance under formation of cancer cell resistance to cisplatin / Kalinina E., Andreev Y., Lubova K., **Petrova A.**, Shtil A., Chernov N. // *FEBS Open Bio*, 2018, 8, Suppl.1, P. 357.
 8. **Petrova A.** Antioxidant mechanisms in ovary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin do not rescue from photonecrosis: implications for photodynamic therapy / Petrova A., Ol'shevskaya V., Zaitsev A., Tatarskiy V., Kalinina E., Andreev Y., Chernov N., Shtil A. // *FEBS Open Bio*, 2018, 8, Suppl. 1, P. 214.
 9. **Petrova A.** The novel tetracarboranylchlorin derivative for binary anticancer treatment: rapid tumor elimination via superoxide anion production / Petrova A., Ol'shevskaya V., Zaitsev A., Tatarskiy V.,

Radchenko A., Kostyukov A., Kalinina E., Kuzmin V., Miyoshi N., Shtil A. // FEBS Open Bio, 2019, 9, Suppl. 1, P. 334-335.

Публикации в других изданиях:

10. **Петрова А.С.** Механизмы антиоксидантной защиты чувствительных и резистентных к цисплатину клеток аденокарциномы яичника и их фотоиндуцированная гибель / Петрова А.С., Андреев Я.А., Зайцев А.В., Ольшевская В.А. Научные руководители – д.б.н., доц. Калинина Е.В., д.м.н. Штиль А.А. // Актуальные проблемы биомедицины – 2018: Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018 г. / Отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2018. – 272 с. – С. 182-183.
11. **Петрова А.С.** Фотодинамическая терапия преодолевает антиоксидантные механизмы в клетках аденокарциномы яичника, устойчивых к цисплатину/ Петрова А.С., Ольшевская В.А., Зайцев А.В., Татарский В.В., Андреев Я.А., Штиль А.А., Калинина Е.В. // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5, № 4, приложение. – С. 92-93. (Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, 17-19 декабря 2018 г., Москва).

Сокращения и условные обозначения

ФДТ	фотодинамическая терапия
ФС	фотосенсибилизатор
ФБХ	фторборхлорин, фторированный карборанилхлорин
БХ	борхлорин
ФХ	фторхлорин
МТТ	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид
IC ₅₀	(inhibitory concentration), концентрация, необходимая для ингибирования роста 50% клеток
БНЗТ	бор-нейтронозахватная терапия

Петрова Альбина Сергеевна (РФ)

Механизмы гибели опухолевых клеток при фотоактивации новых производных хлорина

Тетрапиррольные макроциклы подходят для различных химических модификаций, направленных на создание новых агентов для бинарного противоопухолевого лечения. В частности, конъюгация карборановой клетки с макроциклом хлорина е6, модификация, предназначенная для сенсбилизации опухоли при фотодинамической (ФДТ) и бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ). Дальнейшее изучение потенциала модифицированных тетрапиррольных соединений в качестве фоторадиосенсибилизаторов позволило синтезировать производное хлорина, несущее четыре *closo*-карборановые клетки (всего 44 атома ^{10}B) и 16 атомов фтора на периферии макроцикла (**ФБХ**, фторированный тетракарборанилхлорин). **ФБХ** хорошо растворялось в воде и проявляло незначительную темновую цитотоксичность. Заместители фтор и бор не изменяют фотоактивацию **ФБХ** *in vitro*. Внутриклеточное накопление **ФБХ** достигало максимума к 36 ч. Освещение монохроматическим светом клеточных линий человека и грызунов, нагруженных низкими микромолярными концентрациями **ФБХ**, вызывало быстрый (в течение нескольких минут) фотонекроз, определяемый проникновением йодида пропидия в клетки. Этот эффект был механистически связан с образованием супероксидных анион-радикалов, зарегистрированных с помощью внутриклеточного флуоресцентного зонда. Эксперименты *in vivo* показали, что **ФБХ** (вводимый внутрибрюшинно или внутривенно в дозе до 5 мг/кг) не вызывал значительной токсичности. Освещение подкожных трансплантатов меланомы B16 (сингенные мыши C57BL/6) или ксенотрансплантатов крысиной глиомы C6 у иммунодефицитных мышей после внутрибрюшинного введения **ФБХ** (5 мг/кг) приводило к уменьшению опухолевых очагов, замедлению роста опухоли и излечению животных. Экспериментальная БНЗТ привела к замедлению роста опухолей, происходящих из C6, по сравнению с ложнооблученными животными. Фоторадионекроз становится важным механизмом элиминации опухолевых клеток, если другие пути гибели не функционируют.

Petrova Albina Sergeevna (Russian Federation)

Mechanisms of tumor cell death upon photoactivation of new chlorin derivatives

Tetrapyrrolic macrocycles are suitable for a variety of chemical modifications aimed at new agents for binary antitumor treatment. In particular, the conjugation of the carborane cage to the chlorin e6 macrocycle, a modification designed for tumor sensitization in photodynamic (PDT) and boron neutron capture (BNCT) therapies. Further exploring the potential of modified tetrapyrrolic compounds as photo/radiosensitizers we synthesized a chlorin derivative carrying four *closo*-carborane cages (total 44 ^{10}B atoms) and 16 fluorine atoms at the periphery of the macrocycle (**FC**, fluorinated tetracarboranylchlorin). **FC** was readily soluble in water and showed a negligible dark cytotoxicity. Fluorine and boron substituents did not alter the photoactivation of **FC** *in vitro*. Intracellular accumulation of the bulky **FC** reached maximum by 36 h. A monochromatic light illumination of human and rodent cell lines loaded with low micromolar concentrations of **FC** triggered rapid (within a few minutes) photonecrosis as determined by the entry of propidium iodide into the cells. This effect was mechanistically associated with generation of superoxide anion radicals as registered with an intracellular fluorescent probe. *In vivo* experiments demonstrated that **FC** (administered *i.p.* or *i.v.* up to 5 mg/kg) caused no significant toxicity. Illumination of subcutaneous B16 melanoma transplants (syngeneic C57BL/6 mice) or C6 rat glioma xenografts (immunocompromised mice) after *i.p.* injection with **FC** (5 mg/kg) led to a decrease of tumor foci, tumor growth retardation and cure of a cohort of animals. Furthermore, experimental BNCT resulted in a growth retardation of C6 derived tumors compared to mock-irradiated animals. Thus, photo/radionecrosis emerges as an important mechanism of tumor cell elimination if other death pathways are not functional.