На правах рукописи

АЛЬЗЕИБАК РАЗАН

Механизмы гибели опухолевых клеток при действии фотосенсибилизаторов разной природы на примере фотосенса и фотодитазина

03.01.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2021

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

Научный руководитель:	**Балалаева Ирина Владимировна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
Официальные оппоненты:	**Горин Дмитрий Александрович**, доктор химических наук, профессор, профессор центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» **Терентьев Алексей Алексеевич**, кандидат биологических наук, заведующий отделом кинетики химических и биологических процессов ФГБУН Института проблем химической физики Российской академии наук
Ведущая организация:	ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» июля 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д 23, корп. 2.
С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: https://diss.unn.ru/files/2021/1121/diss-Alzeibak-1121.pdf

Автореферат разослан «__»_____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) основана на использовании нетоксичного светочувствительного красителя, называемого фотосенсибилизатором (ФС), который при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, в присутствии тканевого кислорода, способен к генерации цитотоксических агентов, приводящих к повреждению клеточных органелл, нарушению их работы и, в конечном итоге, к гибели клетки [Узденский, 2010].

По прогнозам Международного агентства по изучению рака (МАИР) ожидается, что рак станет основной причиной смерти и самым важным препятствием на пути увеличения продолжительности жизни в каждой стране мира в XXI веке. Поэтому разработка новых, более эффективных подходов к лечению онкологических заболеваний, в частности, развитие фотодинамической терапии, представляет одну из самых обширных и быстро растущих областей биологии и медицины.

В настоящее время в качестве ФС для фотодинамической терапии опухолей используются такие препараты, как производные гематопорфирина, хлорины, бактериохлорины, тексафирины, пурпурины, фталоцианины, гиперицин, 5-аминолевулиновая кислота, предшественник эндогенного протопорфирина IX и другие [Castano *et al.*, 2004]. Несмотря на то, что ФДТ активно применяют для диагностики и лечения злокачественных новообразований, а также для контроля доставки лекарственного агента в опухоль, механизм ответа клеток на фотодинамическое воздействие до конца не расшифрован. Известно, что в результате ФДТ могут запускаться множественные типы гибели клеток, которые могут быть случайными или программируемыми, в том числе некроз, апоптоз, ферроптоз, некроптоз, аутофагия-зависимая гибель клеток и т.д. [Donohoe *et al.*, 2019; Agostinis *et al.*, 2011], однако не известно, от каких факторов зависит тот или иной механизм гибели. Вероятно, решающую роль могут играть физико-химические свойства ФС, его внутриклеточная локализация, метаболические особенности опухолевых клеток или интенсивности воздействия.

Определение путей клеточной гибели, индуцируемой ФДТ, имеет большое практическое значение, поскольку позволяет справляться с резистентностью злокачественных клеток, зачастую устойчивых к апоптозу или некроптозу [Dos Santos *et al.*, 2019]. Кроме этого, накапливаются данные о том, что гибель клеток по определенным механизмам может запускать противоопухолевый иммунный ответ, что повышает эффективность ФДТ в элиминации опухолевых клеток [Castano *et al.*, 2006], или, наоборот, вызывать меньшее воспаление, делая такой режим подходящим, например, для лечения опухолей головного мозга, где отек ткани недопустим [Cramer *et al.*, 2020].

В связи с этим, исследование особенностей действия фотосенсибилизаторов, выяснение молекулярных механизмов их

фотодинамической активности и уточнение путей клеточной гибели является актуальной задачей как с точки зрения развития фундаментальных представлений, так и для поиска практических методов повышения эффективности ФДТ.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы заключалась в анализе механизма клеточной смерти, индуцируемой в опухолевых клетках при фотодинамическом воздействии с использованием фотосенсибилизаторов с разными физико-химическими свойствами на примере фотосенса и фотодитазина.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать взаимосвязь физико-химических свойств фотосенсибилизаторов с их внутриклеточной локализацией.
2. Определить темновую токсичность и фотодинамическую активность исследуемых фотосенсибилизаторов в отношении клеток ряда опухолевых линий.
3. Исследовать механизмы гибели опухолевых клеток и проанализировать возможное участие апоптоза, ферроптоза и некроптоза в гибели клеток при фотодинамическом воздействии с участием спектра взаимодополняющих методов.

Научная новизна

Установлена относительная фотодинамическая активность соединений фталоцианинового и хлоринового ряда в отношении опухолевых клеток разного происхождения, в том числе эпидермоидной карциномы человека A431, карциномы мочевого пузыря человека T24 и глиомы мыши GL261.

Впервые показана индукция клеточной гибели смешанного типа, сочетающей черты апоптоза и ферроптоза, при фотодинамическом воздействии с гидрофильным фотосенсибилизатором на примере фотосенса.

Впервые продемонстрирована индукция клеточной гибели смешанного типа, сочетающей черты некроптоза и апоптоза при действии мембранотропного фотосенсибилизатора на примере фотодитазина.

Предложена схема, объясняющая взаимосвязь между фотохимическими свойствами фотосенсибилизаторов и потенциальными видами индуцируемой ими клеточной смерти.

Научно-практическая значимость

Получены новые знания о свойствах фотосенсибилизирующих соединений и механизмах гибели клеток в ответ на фотодинамическое воздействие, расширяющие и дополняющие теоретические представления в соответствующей области.

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при рациональном дизайне агентов для фотодинамической терапии и разработке схем лечения онкологических заболеваний для достижения максимальной эффективности.

Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Различие в молекулярной структуре исследуемых фотосенсибилизаторов определяет различие фотофизических и биологических свойств, в том числе эффективность фотосенсибилизации клеток и запускаемые механизмы клеточной смерти.
2. Внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора определяет первичные мишени фотодинамического действия и, как следствие, является ключевым фактором, от которого зависит индукция конкретных молекулярных механизмов, реализующих гибель клетки.
3. Гидрофильные фотосенсибилизаторы с лизосомальной локализацией в концентрации IC_{50} (половинная ингибирующая концентрация) способны индуцировать смешанный тип клеточной смерти, сочетающий черты апоптоза и ферроптоза.
4. Мембранотропные фотосенсибилизаторы в концентрации IC_{50} могут индуцировать тип клеточной смерти, сочетающий черты некроптоза и апоптоза.

Личный вклад автора

Автором лично проведены экспериментальные исследования и выполнен анализ полученных данных. В случае конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметии исследования выполнены совместно с оператором оборудования. Принято непосредственное участие в обсуждении всех полученных результатов, подготовке научных статьей в составе авторского коллектива, а также апробации результатов на научных конференциях.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов обусловлена надежностью используемых экспериментальных методов исследования и подтверждена воспроизводимостью экспериментальных данных, а также качественным и количественным согласием с теоретическими выводами и обоснованиями.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих международных и всероссийских конференциях: Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2019, 2020); Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019, 2020); Международной конференции «7th OncoPoint Symposium» (Гент, Бельгия, 2019); XXI Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2020).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 6 статей в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.

Структура и объём работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Объем составляет 114 страниц машинописного текста, иллюстрированного 28 рисунками и 3 таблицами. Список литературы включает 215 источников, в том числе 205 англоязычных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: принципу фотодинамической терапии, включая механизмы фотосенсибилизации, физико-химические характеристики фотосенсибилизаторов и их внутриклеточную локализацию, фотодинамическое воздействие на клеточные структуры; механизмам, обуславливающим выживание клеток при фотодинамическом воздействии; механизмам клеточной гибели при фотодинамической терапии, включая прямой и непрямой.

В главе 2 перечислены использованные в работе материалы и оборудование, описаны методики исследований.

Клеточные культуры. Исследования проведены на культурах клеток эпидермоидной карциномой кожи человека A431, карциномы мочевого пузыря человека T24, глиомы мыши GL261. В ряде экспериментов использована полученная ранее в лаборатории стабильная линия A431-Casper3BG, экспрессирующая генетически-кодируемый сенсор активации каспаз Casper3 BG (A431-Casper3 BG, Evrogen, Россия).

Исследуемые фотосенсибилизаторы. В работе исследовали коммерческие препараты Фотосенс® (ФГУП ГНЦ НИОПИК, Россия), который представляет собой смесь ди-, три- и тетразамещенных фракций фталоцианина алюминия с числом сульфогрупп 3,4, и Фотодитазин® (Ветагранд, Россия), который представляет собой N-диметилглюкаминовую соль хлорина е6 (рис. 1). Спектральные свойства исследуемых ФС исследованы с использованием планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek Instruments Inc., США).

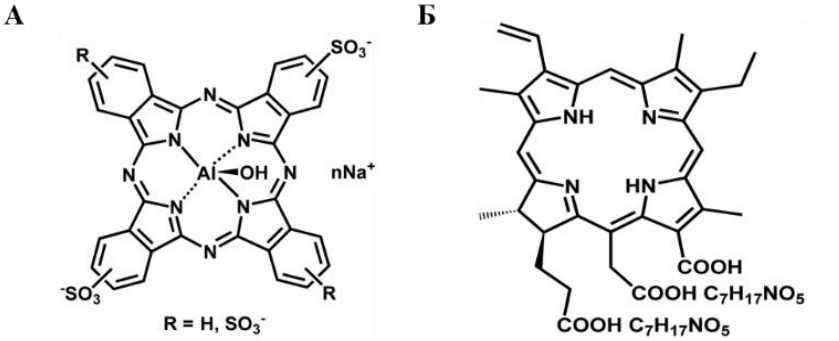

Рис. 1. Структурные формулы фотосенса (А) и фотодитазина (Б)

Внутриклеточное распределение фотосенсибилизаторов. Анализ внутриклеточной локализации ФС проведен на системе лазерной сканирующей микроскопии Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO (Carl Zeiss, Германия). Локализация ФС установлена с использованием специфических красителей клеточных органелл (Lysotracker, ER-tracker, BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA) и клеточных линий, производных A431, экспрессирующих флуоресцентный белок HyPer в цитоплазме или митохондриях.

Анализ темновой токсичности и фотодинамической активности ФС проведен методом МТТ-теста [Mosmann, 1983]. Инкубация с фотосенсибилизатором составляла 4 часа, после чего проводилось облучение (в случае темновой токсичности клетки выдерживали вне CO_2-инкубатора в темноте), жизнеспособность клеток оценивали через 24 часа после облучения. Для облучения использовали светодиодный излучатель для 96-луночных планшетов [Шилягина и др., 2014]. Доза облучения составляла 20 Дж/см^2 с плотностью мощности 20 мВт/см^2 (615-635 нм или 655-675 нм). Рассчитаны значения полуингибирующих концентраций (IC_{50}) ФС в отношении исследованных линий клеток.

Исследование скорости пермеабилизации клеточной мембраны. В микроскопических исследованиях критерием гибели клеток являлось необратимое нарушение целостности клеточной мембраны. При анализе скорости пермеабилизации мембраны клетки подвергались фотодинамическому воздействию (633 нм, 20 Дж/см^2) через объектив конфокального микроскопа в присутствии в среде йодида пропидиума (PI). При этом регистрировали окрашивание PI ядер и их фрагментов в погибших клетках.

Ингибиторный анализ. Для анализа механизма клеточной гибели применялся метод ингибиторного анализа с использованием соединений, селективно блокирующих развитие апоптоза (панкаспазный ингибитор zVAD-fmk, 25 мкМ), некроптоза (ингибитор киназы RIP1 некростатин-1s, 20 мкМ) или ферроптоза (ловушка липидных радикалов ферростатин-1, 1 мкМ, и хелатор железа дефероксамин, 10 мкМ), совместно с исследуемыми соединениями в концентрациях, соответствующих IC_{50}. Определение метаболической активности клеток проводилось с использованием МТТ-теста через 13 часов после облучения в дозе 20 Дж/см^2.

Анализ экстернализации фосфатидилсерина. Появление фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны определяли путем окраски фотосенсибилизированных клеток (IC_{50}, через 13 часов после облучения в дозе 20 Дж/см^2) аннексином V, конъюгированным с флуоресцентным красителем FITC, и PI с помощью набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США). Анализ популяций клеток проведен методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра-сортера Aria III (BD, США).

Визуализация активности каспазы-3 в клетках. Для специфического подтверждения участия апоптоза в гибели клеток использовали линию клеток, экспрессирующих FRET-сенсор активации каспазы 3 – Casper3 BG. Через 13 часов после облучения в дозе 20 Дж/см^2 получали конфокальные изображения культуры клеток. Casper3 BG возбуждали при 405 нм (поглощение донора, TagBFP), флуоресценцию регистрировали в диапазоне 430-470 нм (сигнал донора) и 490-530 нм (сигнал акцептора, TagGFP2). Активация каспазы сопровождается расщеплением линкера между донорной и акцепторной частью сенсора и исчезновением сигнала акцептора.

Анализ активации перекисного окисления липидов. Для подтверждения возможности участия ферроптоза в гибели клеток проведено исследование активации перекисного окисления липидов при фотодинамическом воздействии (IC_{50}, через 13 часов после облучения в дозе 20 Дж/см^2) с ратиометрическим флуоресцентным зондом Bodipy™ 581/591 C11 (Invitrogen, США). Анализ проводили методом проточной цитометрии, флуоресценция регистрировалась в двух каналах, 488@510–545 нм и 561@590–620 нм, полученные значения использовали для расчета ратиометрического индекса.

Анализ фосфорилирования MLKL. Для специфического подтверждения участия некроптоза в гибели клеток использовали метод вестерн-блота с детектированием присутствия фосфорилированной формы киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (pMLKL) в фотосенсибилизированных клетках (IC_{50}, через 13 часов после облучения в дозе 20 Дж/см^2). Использовали систему блоттинга Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, США), первичные кроличьи антитела против MLKL, pMLKL и тубулина (Abcam, Великобритания) и регистрацию методом хемолюминесценции при помощи ChemiDoc™ (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка данных. Анализ данных проводился с использованием программы GraphPad Prism (v. 6.01, GraphPad Software, Inc, США). Использованы методы параметрической статистики (дисперсионный анализ, методы множественных сравнений).

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Фотофизические свойства исследуемых фотосенсибилизаторов

Исследуемые соединения показали наличие в спектре максимумов поглощения в коротковолновой области спектра (350-404 нм), известной как полоса Соре, и в длинноволновой (красной) области спектра, известной как Q-полоса (рис. 2). Фталоцианин фотосенс характеризуется преобладанием Q-полосы с максимумом на длине волны 678 нм (коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon = 3\times10^5$ л×моль$^{-1}$×см$^{-1}$), тогда как фотодитазин, относящийся к производным хлорина, характеризуется преобладанием полосы Соре ($\varepsilon = 3\times10^5$ л×моль$^{-1}$×см$^{-1}$) и имеет слабую Q-полосу поглощения на длине волны 643 нм ($\varepsilon = 4{,}6\times10^4$ л×моль$^{-1}$×см$^{-1}$).

Флуоресценция фотосенса и фотодитазина зарегистрирована на длинах волн 690 и 650 нм, соответственно (рис. 2).

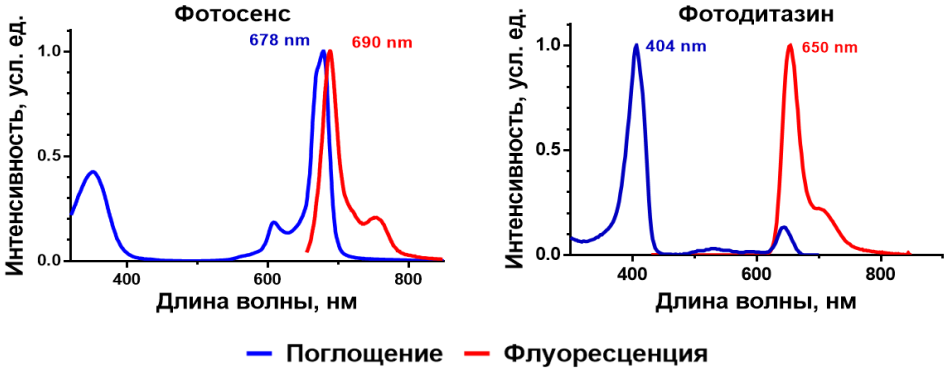

Рис. 2. Спектры поглощения и флуоресценции исследуемых фотосенсибилизаторов

Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов

Анализ внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов показал, что основным местом накопления фотосенса в клетках A431 являются лизосомы и другие везикулы, предположительно эндосомы (рис. 3). В случае фотодитазина была зарегистрирована локализация в клеточных мембранных структурах, таких как, ЭПР и аппарат Гольджи (рис. 3). Аналогичные результаты были получены для линии клеток GL261.

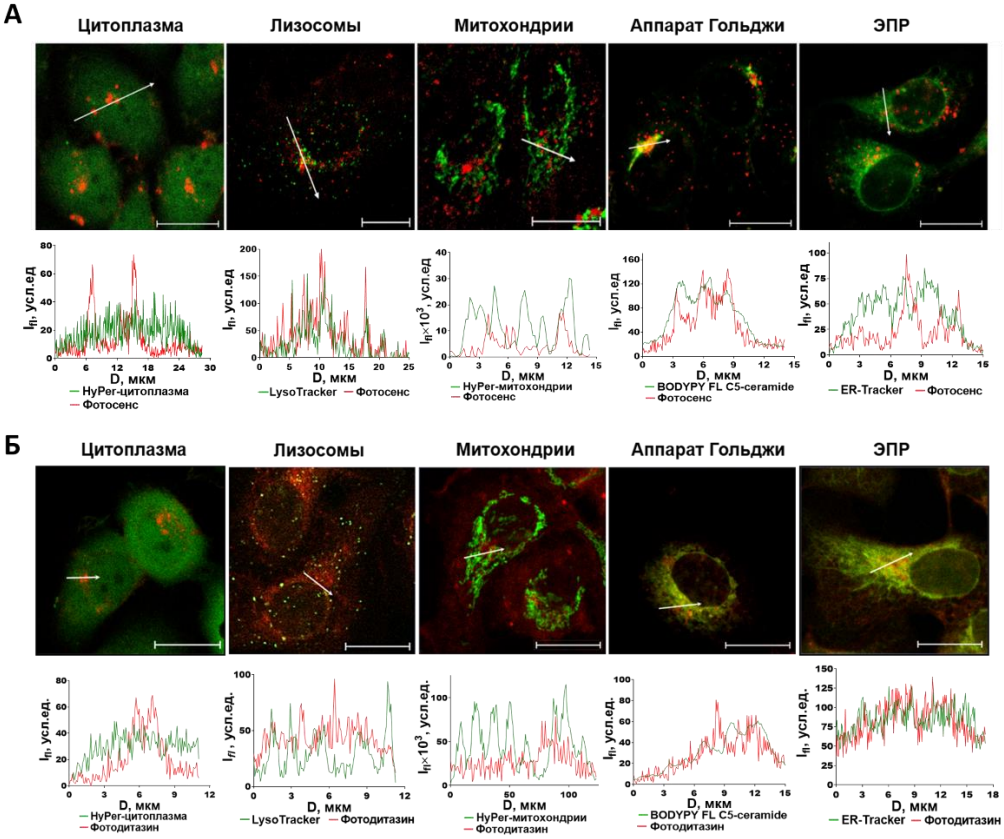

Рис. 3. Внутриклеточная локализация фотосенса (А) и фотодитазина (Б) в клетках A431. Для солокализационного анализа окрашены цитоплазма клеток (белок HyPer), лизосомы (LysoTracker Green), митохондрии (белок HyPer с органелло-специфичной экспрессией), аппарат Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide), ЭПР (ER-Tracker). Красный канал – флуоресценция ФС, зеленый канал – флуоресценция красителей органелл. Масштабная линейка 20 мкм. Внизу показаны профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях

Предполагается, что внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора является одним из ключевых факторов, определяющих клеточный ответ на фотоповреждение [Agostinis *et al.*, 2011]. Таким образом, подтвержденные различия в характере распределения фотосенсибилизаторов в клетках позволяют сравнивать ответ клеток на фотодинамическое воздействие при первичном повреждении разных компартментов.

Темновая токсичность и фотодинамическая активность фотосенсибилизаторов

Для исследуемых красителей проанализирована способность индукции смерти опухолевых клеток разного происхождения при краткосрочной инкубации (4 часа) в различных концентрациях в темноте, а также при облучении в дозе 20 Дж/см^2.

Инкубация клеток с ФС в темноте показала негативное действие соединений только при концентрациях 50 мкМ и более (рис. 4, синий).

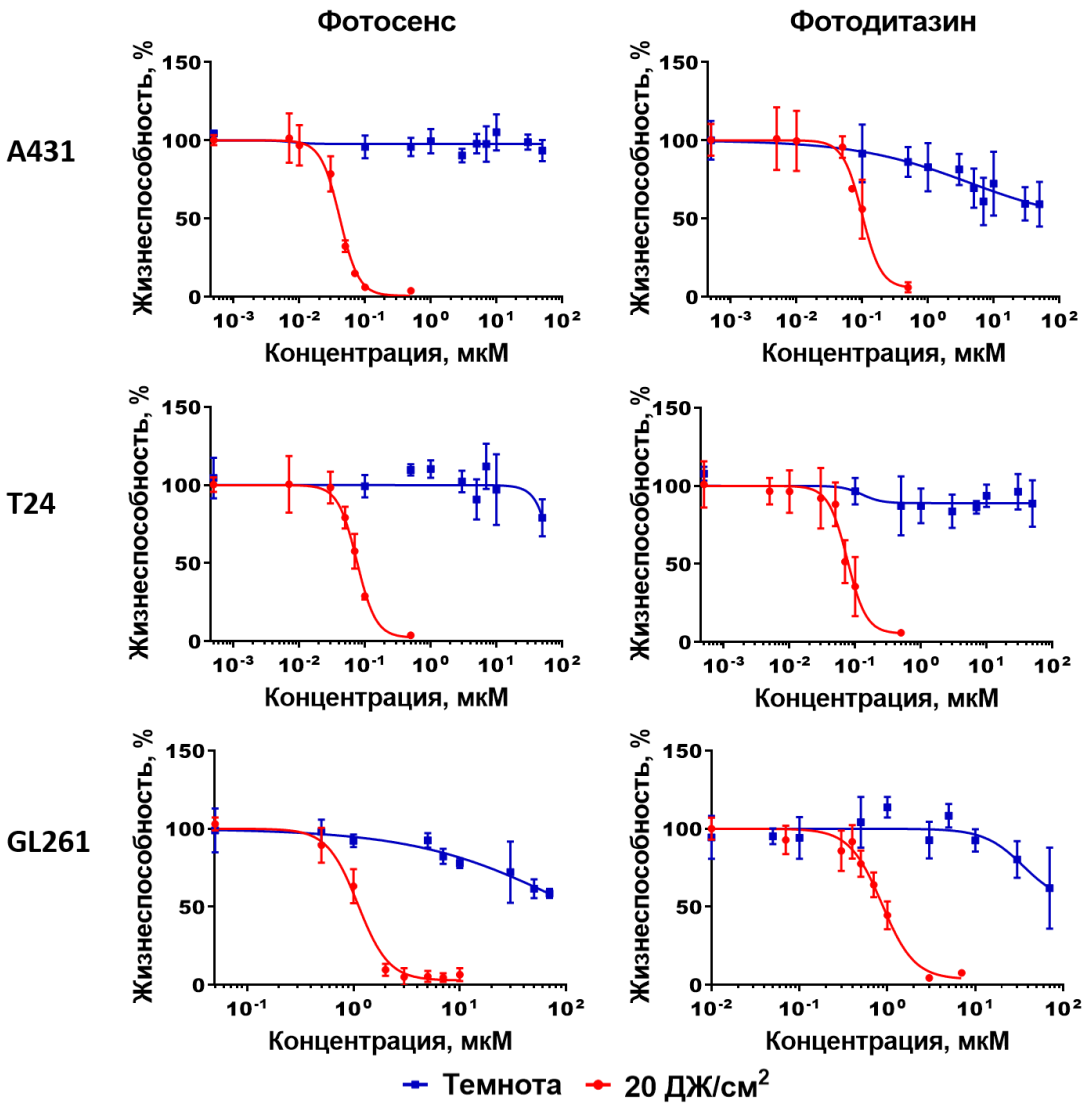

Рис. 4. Эффективность индукции клеточной смерти на культурах клеток A431 (А), T24 (Б) и GL261 (В) в зависимости от концентрации ФС в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см^2. Показаны типичные зависимости из 3-5 независимых экспериментов. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n=3)

Клетки линий A431 и T24 показали схожие дозозависимые ответы на фотодинамическое воздействие с длиной волны 655-675 нм (рис. 4, красный). При этом облучение приводило к гибели клеток при концентрациях более ~70 нМ для фотосенса и более ~100 нМ для фотодитазина (табл. 1).

В случае клеток глиомы GL261 было использовано облучение при длине волны 615-635 нм, в этом случае воздействие приводило к гибели клеток при концентрациях ФС, не превышающих 1 мкМ (рис. 4, табл. 1).

Таблица 1.

Значения IC_{50} для исследуемых фотосенсибилизаторов при облучении в дозе 20 Дж/см^2 в отношении опухолевых клеток различного происхождения

ФС	Полумаксимальная ингибирующая концентрация IC_{50}[1], мкМ		
	A431	T24	GL261
Фотосенс	0,045 (0,036; 0,046)	0,075 (0,067; 0,085)	0,96 (0,79; 1,18)
Фотодитазин	0,099 (0,076; 0,13)	0,085 (0,061; 0,093)	0,80 (0,67; 0,92)

[1] – для расчета IC_{50} использована модель логнормального распределения, указаны средние значения и границы 95% доверительного интервала, n= 9–15

Морфологические особенности фотосенсибилизированных клеток и скорость пермеабилизации клеточной мембраны

Облучение фотосенсибилизированных клеток приводило к появлению выраженных морфологических изменений, при этом необходимо отметить различие в морфологии клеток при действии фотосенса и фотодитазина, показанное для всех исследованных линий, A431, T24 и GL261. В случае фотосенса наблюдается сжимание клеток, характерна сильная степень вакуолизации цитоплазмы и формирование объемных мембранных пузырей, тогда как для клеток, обработанных фотодитазином, формирования пузырей практически не наблюдалось, отмечена грануляция цитоплазмы, «фиксация» клеток и в некоторых случаях ошаривание (рис. 5).

С целью детального анализа скорости гибели опухолевых клеток была проведена серия экспериментов по мониторингу пермеабилизации мембраны клеток A431 после краткосрочного интенсивного воздействия. В данном эксперименте были использованы концентрации ФС, приводящие к гибели более 90% клеток (10^{-6} М).

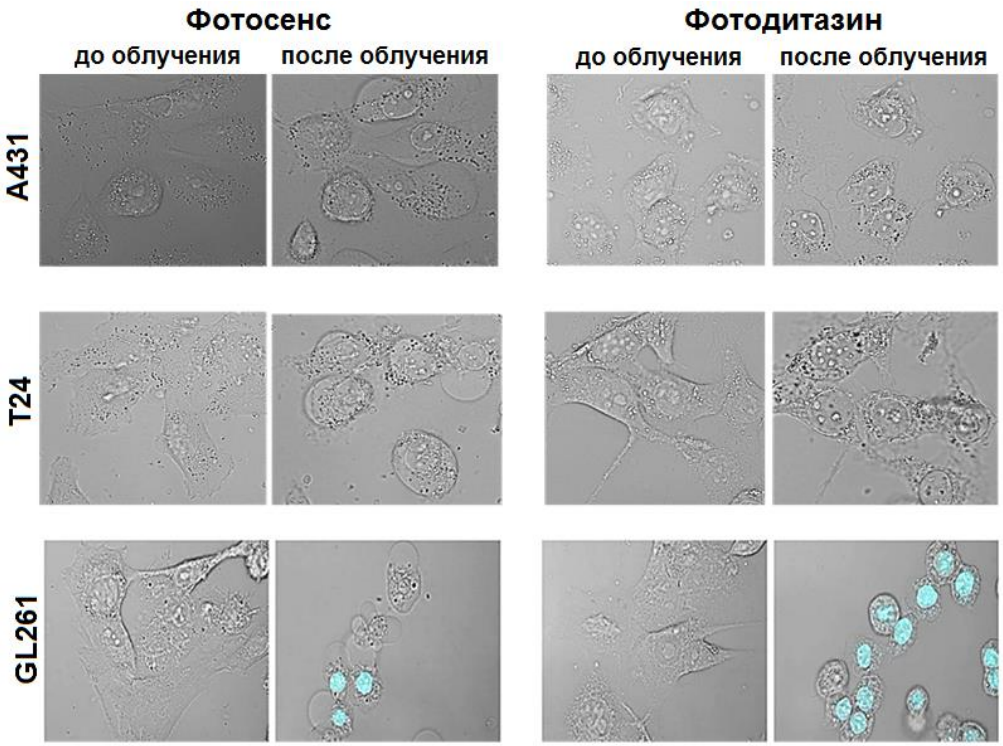

Рис. 5. Морфология клеток A431, T24 и GL261, предобработанных фотосенсом и фотодитазином и облученных в дозе 20 Дж/см^2. В случае GL261 в среде инкубации присутствует PI (голубой), проникающий в мертвые клетки. Размер кадра 50×50 мкм

Показано, что ответ клеток на фотодинамическое воздействие с исследуемыми фотосенсибилизаторами принципиально различался (рис. 6). Так, в случае фотосенса, проникновение PI в большинство клеток (около 25-30%) наблюдалось через 20-30 минут после облучения, при этом даже через 60 минут окрашивание популяции клеток было неполным (рис. 7). В то же время при использовании фотодитазина потеря целостности мембраны наблюдалась существенно раньше, через 10 минут после облучения более 75% ядер клеток было окрашено, а через 20 минут окрашивание PI наблюдалось во всех клетках популяции (рис. 7).

С учетом полученных результатов было сделано предположение, что соединения с различной локализацией могут запускать в клетках разные каскады событий, что, в конечном итоге, выражается в различном механизме гибели клеток. Наличие временного промежутка между облучением и нарушением целостности клеточной мембраны в случае фотосенса свидетельствует о том, что гибель клеток не является следствием нерегулируемого разрыва мембраны вследствие сильного воздействия (некроз), а представляет собой результат регулируемого процесса.

Для установления механизма клеточной гибели при фотодинамическом воздействии фотосенса и фотодитазина были использован спектр взаимодополняющих подходов, описанных ниже. В данном исследовании мы исследовали возможность участия в фотоиндуцированной гибели клеток таких видов смерти как апоптоз, некроптоз и ферроптоз.

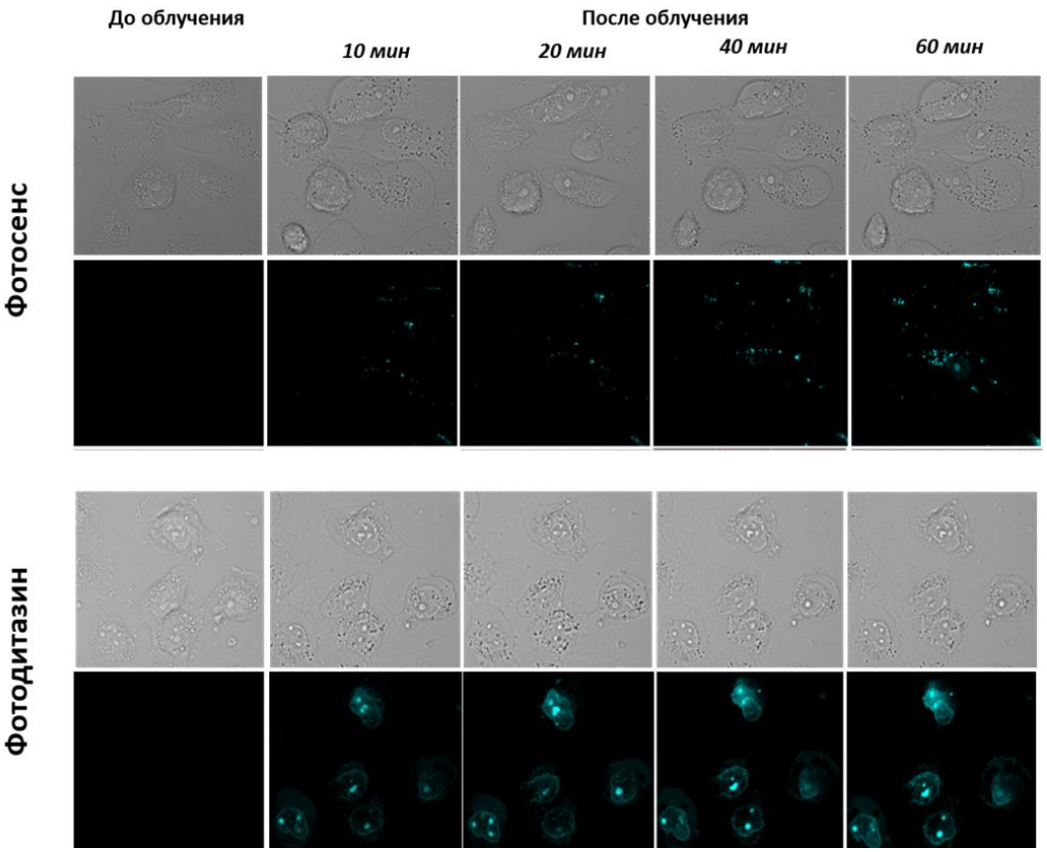

Рис. 6. Анализ скорости пермеабилизации мембраны клеток A431, предобработанных фотосенсом (10^{-6} М) и облученных в дозе 20 Дж/см^2. В среде инкубации присутствует PI, проникающий в клетки в случае нарушения целостности плазматической мембраны. Показаны изображения клеток в проходящем свете и флуоресценция PI (голубой). Размер кадра 50×50 мкм

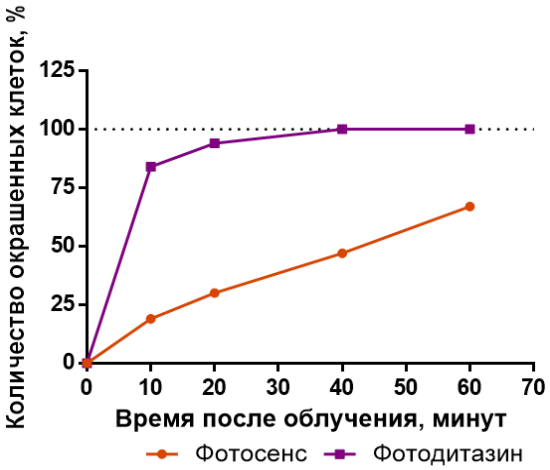

Рис. 7. Доля клеток с нарушенной целостностью мембраны через различное время после фотодинамического воздействия с фотосенсом и фотодитазином (10^{-6} М, 20 Дж/см^2)

Ингибиторный анализ

С целью предварительного определения типа гибели клеток, индуцируемой при фотодинамическом воздействии с исследуемыми фотосенсибилизаторами, был проведен ингибиторный анализ с использованием соединений, селективно блокирующих различные виды

регулируемой клеточной смерти: панкаспазного ингибитора zVAD-fmk, селективно блокирующего развитие апоптоза; ингибитора киназы RIP1 некростатина-1s (nec-1s), блокирующего развитие некроптоза; ловушки липидных радикалов ферростатина-1 (fer-1) и хелатора железа дефероксамина (DFO), блокирующих развитие ферроптоза.

Ни один из ингибиторов в использованных концентрациях сам по себе, в отсутствие ФС, не оказывал какого-либо влияния на жизнеспособность культуры при инкубации в течение 13 часов, также не показано и влияния ДМСО, использованного в качестве растворителя (рис. 8).

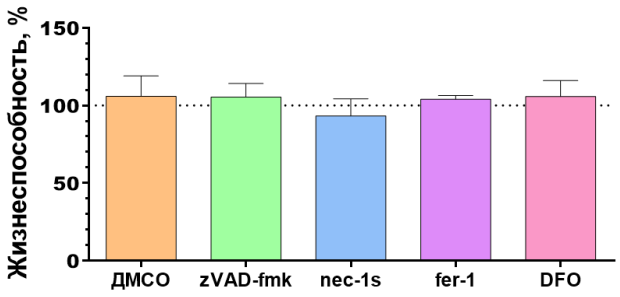

Рис. 8. Жизнеспособность клеток A431 в присутствии ингибиторов клеточной смерти. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без добавления ингибиторов (обозначено пунктиром). Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n≥3)

Механизм гибели клеток зависит как от выбранного фотосенсибилизатора, так и от его концентрации, а также дозы облучения. Если при очень интенсивных воздействиях, приводящих к гибели подавляющего большинства клеток культуры, стоит ожидать нерегулируемой смерти (нерегулируемый некроз) [Zhou *et al.*, 2009], то при более слабых воздействиях может существенно возрастать вклад различных видов регулируемой клеточной смерти. В связи с этим, были выбраны концентрации ФС, соответствующие индукции смерти около 50% клеток культуры (IC_{50}).

При обработке фотосенсом было показано защитное действие на клетки панкаспазного ингибитора zVAD-fmk и ферростатина-1 (рис. 9).

В случае фотодитазина, наряду с действием zVAD-fmk, показано существенное увеличение выживаемости клеток в присутствии некростатина-1s, блокирующего развитие некроптоза (рис. 9). Стоит отметить отсутствие защитного эффекта ловушки липидных радикалов Ferr-1 или хелатора железа DFO при фотосенсибилизации данным соединением. Для всех исследованных клеточных линий получены сходные результаты.

Таким образом, эффективность защитного действия ингибиторов разных типов клеточной смерти качественно отличается в случае фотосенсибилизации разными соединениями. Это подтверждает сделанное нами предположение о том, что тип индуцированной гибели клеток зависит от физико-химических свойств фотодинамического соединения и его внутриклеточной локализации. Так, по данным ингибиторного анализа оба исследованные соединения могут вызывать апоптоз, в тоже время, в случае фотосенса показан значительный вклад ферроптоза, а при действии фотодитазина показано участие некроптоза.

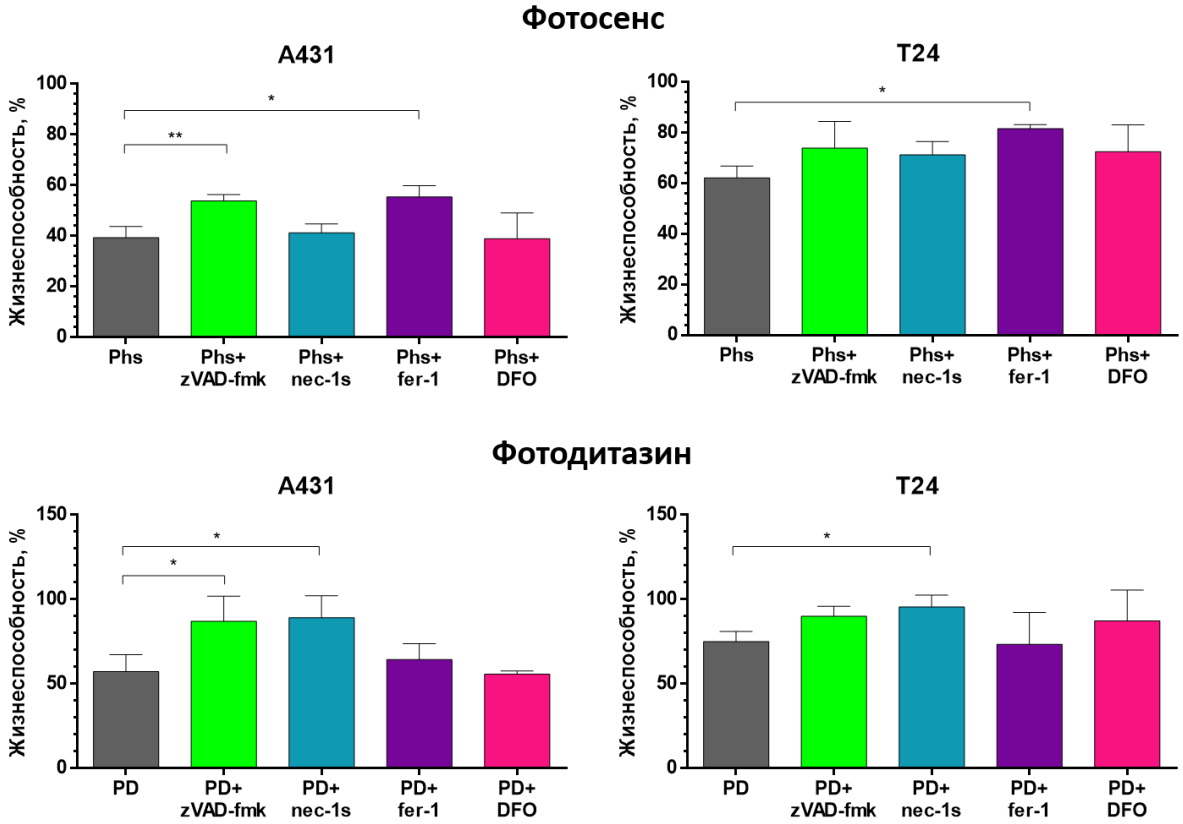

Рис. 9. Влияние ингибиторов клеточной смерти на жизнеспособность культур клеток A431 и T24 при фотодинамическом воздействии с фотосенсом и фотодитазином (IC_{50}, 20 Дж/см^2). PhS – фотосенс, PD – фотодитазин. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без обработки ФС или ингибиторами. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n≥3). *, ** – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки (t-критерий с поправкой Бонферрони, p <0,05)

Экстернализация фосфатидилсерина на мембранах фотосенсибилизированных клеток

Одном из принципиальных признаков апоптоза считается выход фосфатидилсерина на наружную сторону плазматической мембраны. Для определения экстернализации фосфатидилсерина в ответ на фотодинамическое воздействие использовали метод проточной цитометрии. Клетки окрашивали фосфатидилсерин-связывающим белком аннексином V, конъюгированным с флуоресцентным красителем FITC, и PI, проникающим только в мёртвые клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны.

Через 13 часов после облучения в присутствии фотосенса или фотодитазина показано наличие большого количества (до 40-50%) живых клеток, окрашенных AnxV и находящихся предположительно на стадии раннего апоптоза (рис. 10, 11). Это подтверждает результаты ингибиторного анализа об индукции апоптоза фотосенсибилизированных клеток. Отметим, однако, что к настоящему времени показана возможность экспонирования фосфатидилсерина при некроптозе [Shlomovitz *at el.*, 2019], поэтому данный анализ не является абсолютно специфичным.

Количество мертвых клеток, окрашенных обоими красителями, достигало 10-15% для фотосенса и 25-30% для фотодитазина; данный метод не позволяет разделить клетки, погибшие вследствие апоптоза, некроптоза или другого вида смерти.

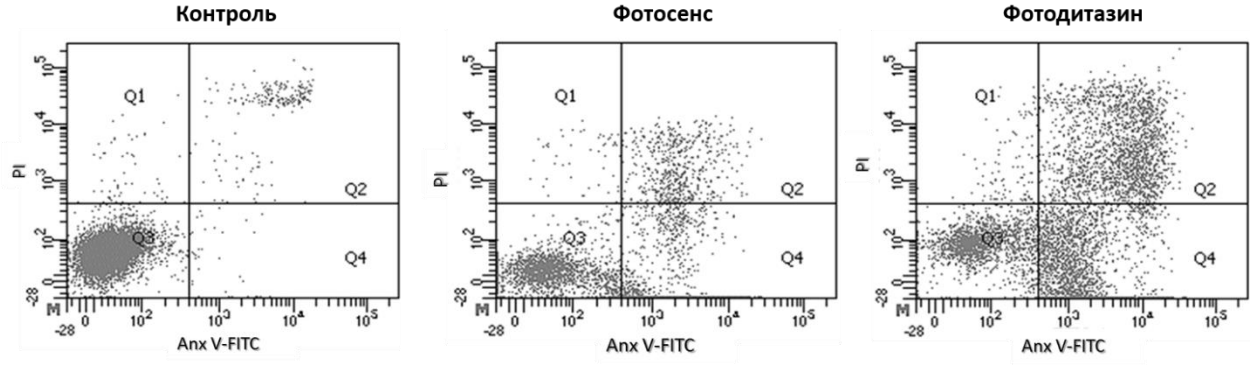

Рис. 10. Анализ выхода фосфатидилсерина на наружную поверхность мембраны клеток A431 при обработке фотосенсом и фотодитазином (IC_{50}, 20 Дж/см^2, 13 часов после облучения). Клетки окрашены PI и AnxV-FITC и проанализированы методом проточной цитометрии. Показано типичное распределение в одном из 3 независимых экспериментов

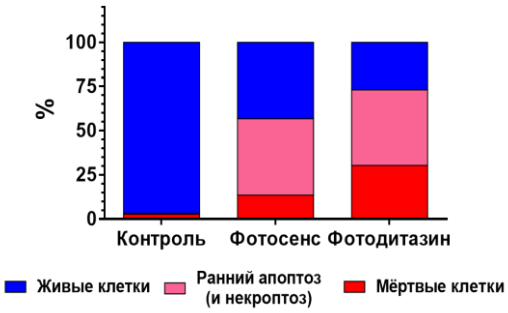

Рис. 11. Распределение клеток A431 по стадиям смерти после обработки фотосенсом и фотодитазином (IC_{50}, 20 Дж/см^2, 13 часов после облучения). Представлена доля живых клеток (Anx^-, PI^-), находящихся на стадии раннего апоптоза и некроптоза (Anx^+, PI^-) и мёртвых клеток (PI^+)

Активация каспазы-3 в фотосенсибилизированных клетках

Для специфического подтверждения участия апоптоза в гибели клеток при фотодинамическом воздействии был проведен анализ активации каспазы-3 с использованием генетически-кодируемого каспаза-чувствительного сенсора Casper3 BG. Эксперименты выполнены на линии клеток A431-Casper3BG, экспрессирующих данный сенсор в цитоплазме. Принцип действия сенсора основан на явлении флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET, от англ. Förster resonance energy transfer), осуществляемого между флуоресцентными белками TagBFP (донор) и TagGFP2 (акцептор), связанными полипептидным линкером с последовательностью DEVD. Специфическое распознавание данной последовательности каспазой-3, активируемой из прокаспазы при развитии апоптоза, и последующее расщепление молекулы сенсора на два фрагмента приводит к нарушению FRET, исчезновению зеленой флуоресценции акцептора и увеличению синей флуоресценции донора при возбуждении в полосе поглощения последнего.

В контрольной культуре клеток показано присутствие незначительного количества (<3%) клеток с активной каспазой-3, демонстрирующих также характерную для апоптоза морфологию (рис. 12).

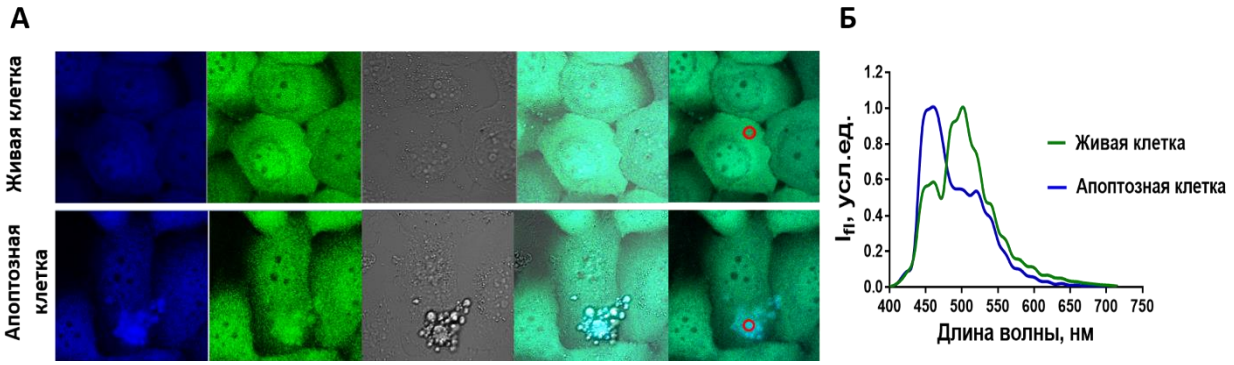

Рис. 12. Визуализация активности каспазы-3 при апоптозе клетки в культуре A431-Casper3 BG. (А) – изображения клеток линии A431-Casper3 BG, полученные методом конфокальной микроскопии. Показаны изображения в канале, соответствующем флуоресценции донорной части Casper3 BG (λ_{ex} 405 нм, λ_{em} 430-470 нм, синий канал); в канале, соответствующем флуоресценции акцепторной части Casper3 BG (λ_{ex} 405 нм, λ_{em} 490-530 нм, зеленый канал); проходящем свете; их наложение и наложение только синего и зеленого каналов. Размер кадра 50×50 мкм. (Б) – спектры флуоресценции, полученные в областях, отмеченных на (А) кружками

Обработка клеток A431-Casper3BG фотосенсом и фотодитазином в темноте не влияла на состояние сенсора (рис. 13). В то же время, через 13 часов после облучения фотосенсибилизированных клеток в дозе 20 Дж/см^2 показано присутствие в культуре клеток, различных по морфологии и активности каспазы-3. Отметим, что при действии фотосенсибилизаторов в концентрации IC_{50} наблюдались отличия в морфологии погибающих клеток по сравнению с $IC_{>90}$. В частности, не наблюдалось формирования крупных мембранных пузырей при действии фотосенса (рис. 5, 13).

В случае фотосенса около 43% клеток показали активацию каспаза-чувствительного сенсора, в то же время присутствовали предположительно мертвые клетки с серьезными нарушениями структуры без признаков активации апоптоза (рис. 13, 14). При фотосенсибилизации фотодитазином доля апоптотических клеток составляла лишь 20%, также было отмечено присутствие большого количества клеток, до 24%, с очень низким уровнем флуоресценции сенсора (рис. 13, 14). Предположительно, последнее связано с нарушением целостности мембраны и выходом содержимого цитоплазмы в среду. Такое возможно, в частности, при развитии некроза или некроптоза.

Таким образом, при действии обоих фотосенсибилизаторов действительно происходит активация апоптоза, однако, наряду с этим присутствуют клетки, погибшие по другому пути, причем соотношение разных видом гибели различно при исследованных вариантах обработки. Отметим, что полученные результаты согласуются с результатами ингибиторного анализа для данных фотосенсибилизаторов.

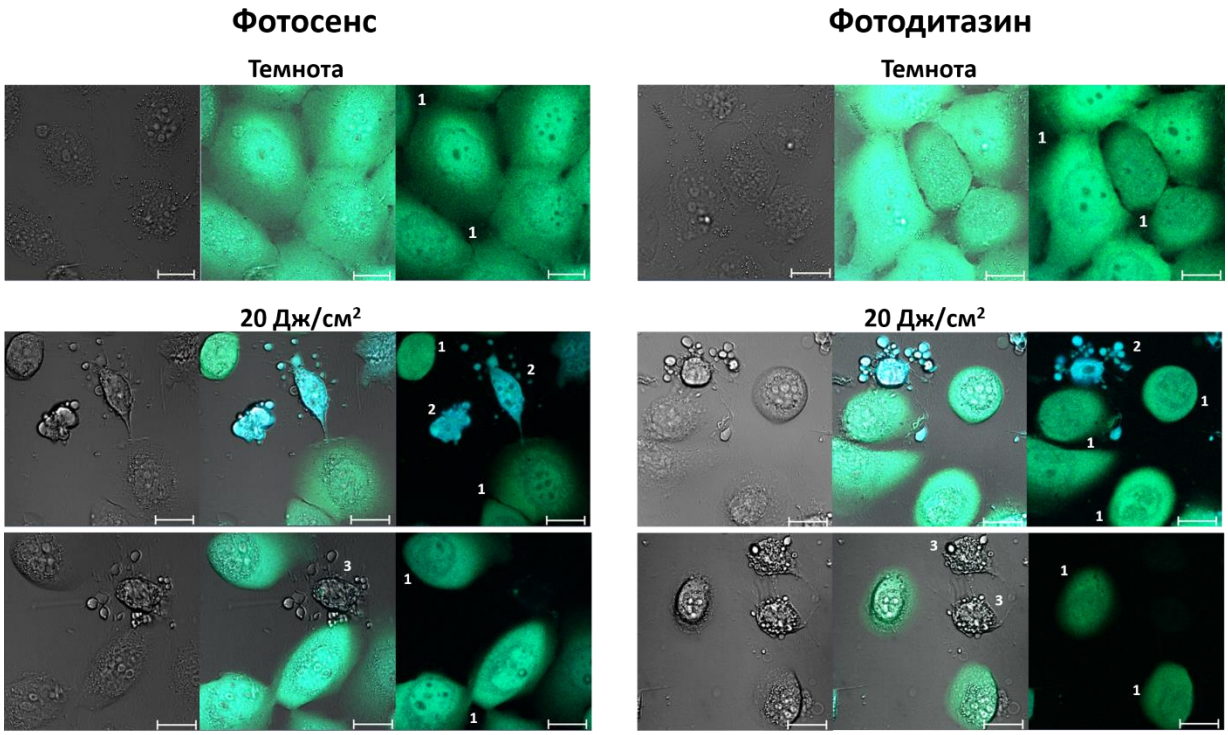

Рис. 13. Визуализация активности каспазы-3 при развитии апоптоза в культуре клеток A431-Casper3BG после обработки фотосенсом и фотодитазином (IC_{50}, в условиях темноты или облучения в дозе 20 Дж/см^2, через 13 часов после обработки). Показаны изображения в проходящем свете; наложение проходящего света, синего и зеленого каналов и наложение только синего и зеленого каналов. Масштабная линейка 20 мкм. На изображениях отмечены клетки без активации каспазы-3 (1), клетки с активацией каспазы-3 (2) и клетки с потерей сигнала сенсора Casper3BG (3)

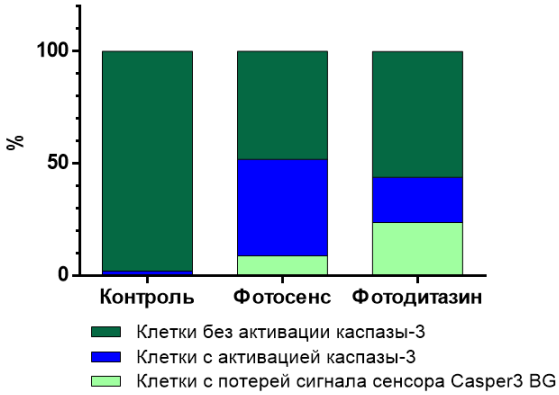

Рис. 14. Распределение клеток по ответу сенсора Casper3 BG после обработки фотосенсом и фотодитазином (IC_{50}, 20 Дж/см^2, 13 часов после облучения). Представлена доля клеток без активации каспазы-3, с активацией каспазы-3 и клеток с потерей сигнала сенсора Casper3 BG (n=300-400 клеток для каждого варианта обработки)

Активация перекисного окисления липидов в фотосенсибилизированных клетках

Характерным признаком развития ферроптоза является неконтролируемая активация перекисного окисления липидов и накопление в мембранах гидроперекисных производных. Для подтверждения возможности участия ферроптоза в гибели клеток использовали метод проточной цитометрии с ратиометрическим флуоресцентным зондом Bodipy™ 581/591 C11. При окислении ненасыщенного углеводородного хвоста данного зонда изменяется соотношение интенсивности его флуоресценции в зеленой и красной области спектра.

Нами было показано, что при облучении культуры клеток А431, обработанных фотосенсом, действительно наблюдалось значительное увлечение уровня перекисного окисления, существенно превосходящее остальные варианты обработки (рис. 15).

Как было показано при ингибиторном анализе, ловушка липидных радикалов ферростатин-1 защищал клетки от фотодинамического действия фотосенса, что в совокупности позволяет предположить участие ферроптоза в гибели клеток при действии данного фотосенсибилизатора.

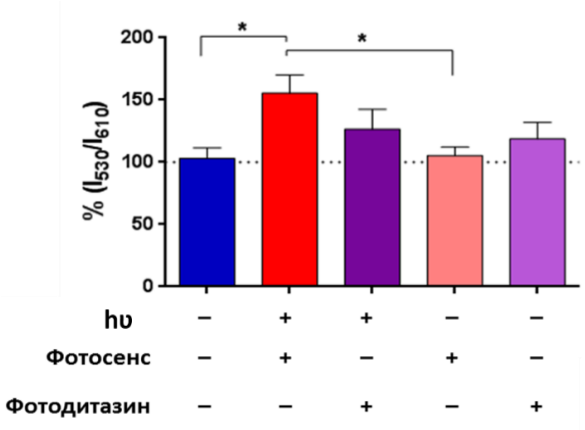

Рис. 15. Генерация перекисей липидов и индукция ферроптоза в культуре клеток А431, обработанных фотосенсом и фотодитазином в концентрациях, соответствующих IC_{50}, и облученных (hυ) в дозе 20 Дж/см^2. Анализ проведен через 13 часов после облучения.
* – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки (t-критерий с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$)

Фосфорилирование киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (MLKL)

Для специфического подтверждения участия некроптоза в гибели клеток мы использовали метод вестерн-блота. Показано, что при облучении культуры клеток А431, обработанных фотодитазином, наблюдалось увлечение количества фосфорилированной формы MLKL (pMLKL), одного из ключевых белков в каскаде реализации некроптоза (рис. 16). Ни при одном другом варианте обработки появления значимого количества pMLKL не наблюдалось. Следовательно, можно утверждать, что при действии фотодитазина, в отличие от фотосенса, происходила индукция некроптоза, что согласуется с результатом ингибиторного анализа.

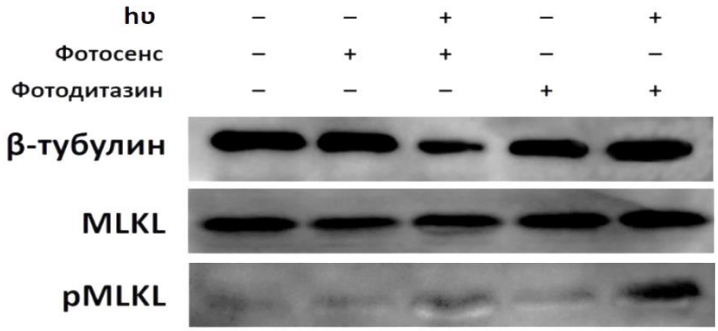

Рис. 16. Детекция фосфорилированной формы MLKL (pMLKL) в клетках А431, обработанных фотосенсом и фотодитазином в концентрациях, соответствующих IC_{50}, и облученных (hυ) в дозе 20 Дж/см^2. Анализ проведен через 13 часов после облучения. Тубулин использован в качестве контроля загрузки

Таким образом, на основании проведенного исследования мы полагаем, что фотосенсибилизаторы с разными физико-химическими свойствами индуцируют принципиально разные пути регулируемой гибели клеток, что показано на примере фотосенса и фотодитазина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ механизмов клеточной смерти, индуцируемой в опухолевых клетках при фотодинамическом воздействии с использованием фотосенсибилизаторов с разными свойствами, имеет большое практическое значение для повышения эффективности ФДТ, уменьшения побочных эффектов и поиска подходов к преодолению резистентности опухолевых клеток к терапии. В работе для этой цели были исследованы фотосенсибилизаторы с разными физико-химическими свойствами на примере фотосенса и фотодитазина.

Физико-химические свойства фотосенсибилизаторов определяют их локализацию в разных компартментах, таких как лизосомы в случае гидрофильного фотосенса или ЭПР и аппарат Гольджи в случае амфифильного мембранотропного фотодитазина. Это приводит к тому, что первичными мишенями фотодинамического воздействия являются различные клеточные структуры и процессы. Как следствие, молекулярные пути, запускаемые при облучении, отличаются и приводят к различным последствиям. Нами показано, что фотодинамическое воздействие с использованием фотосенса и фотодитазина сопровождается индукцией гибели опухолевых клеток разного происхождения, при этом полуингибирующие концентрации ФС различаются для разных линий клеток, но не превышают 1 мкМ при облучении в дозе 20 Дж/см^2. Показано участие различных видов регулируемой клеточной смерти, в том числе апоптоза, ферроптоза и некроптоза в гибели клеток при облучении. Это согласуется с тем, что ответ клеток на фотодинамическое воздействие различался как морфологически, так и по динамике пермеабилизации мембраны в зависимости от использованного типа фотосенсибилизатора.

С использованием собственных и литературных данных нами предложена следующая схема (рис. 17). Фотодинамическое воздействие фотосенса, локализированного в лизосомах, приводит к гибели клеток вследствие увеличения проницаемости лизосомальной мембраны и высвобождения в цитозоль катепсинов, что может привести к расщеплению проапоптотического белка Bid с последующей активацией апоптоза [Droga-Mazovec *et al.*, 2008]. С другой стороны, высвобождение из лизосом ионов железа активирует реакцию Фентона, что, в свою очередь, приводит к усилению перекисного окисления липидов и индуцирует ферроптоз [Torii *et al.*, 2016].

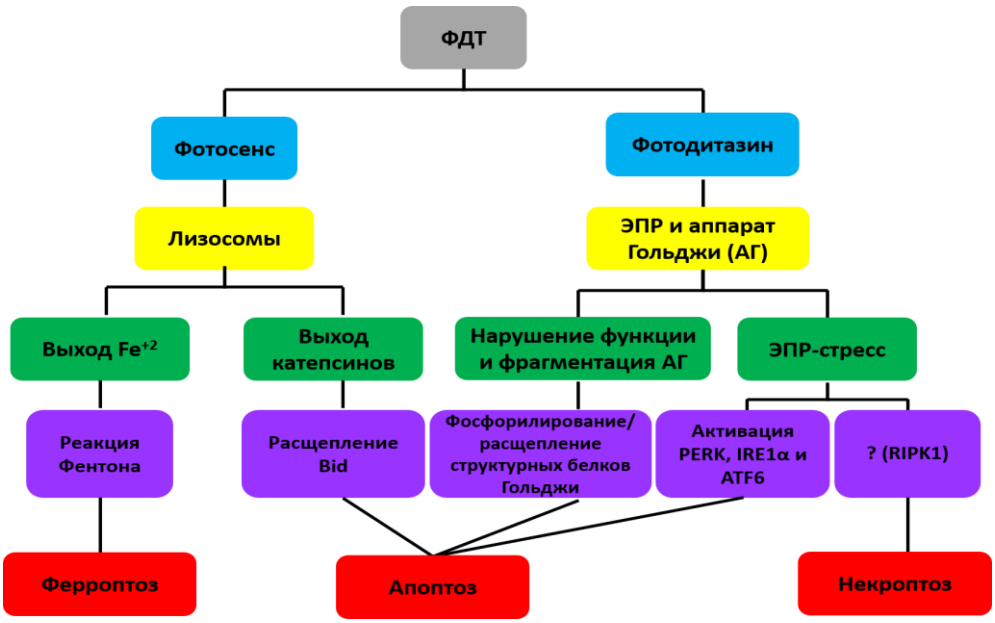

Рис. 17. Предлагаемая схема, объясняющая зависимость типа клеточной смерти от используемого фотосенсибилизатора

Иная ситуация наблюдается при использовании фотодитазина, локализированного в ЭПР и аппарате Гольджи клеток. В этом случае фотодинамическое воздействие может вызывать АФК-опосредованный ЭПР-стресс и так называемый «ответ на накопление неправильно свернутых белков» (UPR, от англ. unfolded protein response), что, в свою очередь, индуцирует активацию сигнальных белков PERK, IRE1α и ATF6 и также приводит к апоптозу [Tabas, Ron, 2011]. Также показано, что нарушение микротрубочек или фосфорилирование и расщепление структурных белков Гольджи, таких как структурный белок организации аппарата Гольджи GRASP65 и гольджины, индуцирует апоптоз [Machamer, 2015; He *et al.*, 2020]. На сегодняшний день имеется ряд исследований, показывающих, возможность индукции некроптоза в ответ на ЭПР-стресс при участии киназы RIPK1, но детальные механизмы этого молекулярного пути пока не известны [Kishino *et al.*, 2019].

ВЫВОДЫ

1. Показано, что внутриклеточная локализация фотосенса и фотодитазина в клетках исследуемых опухолевых линий различаются. Гидрофильный отрицательно заряженный фотосенс накапливается преимущественно в лизосомах, тогда как для амфифильного фотодитазина характерно распределение в ЭПР и аппарате Гольджи.

2. Определены значения темновой токсичности и фотодинамической активности исследуемых фотосенсибилизаторов в отношении опухолевых клеток разного происхождения. Концентрации фотосенсибилизаторов, приводящие к 50%-му ингибированию роста клеточной культуры, варьируют для разных линий клеток, но не превышают 1 мкМ при облучении в дозе 20 Дж/см^2.

3. Фотосенс, локализуемый в лизосомах, индуцирует смешанный тип регулируемой гибели клеток исследуемых опухолевых линий, объединяющий черты апоптоза и ферроптоза, что может объясняться выходом гидролитических ферментов и ионов свободного железа из лизосом при фотодинамическом повреждении лизосомальной мембраны.

4. Мембранотропный фотодитазин индуцирует тип регулируемой клеточной гибели с чертами некроптоза и апоптоза, по-видимому, вследствие нарушения нормального функционирования аппарата Гольджи и развития ЭПР-стресса.

5. Локализация фотосенсибилизатора является важнейшим фактором, определяющим механизмы клеточной гибели, запускаемые при ответе клетки на фотодинамическое воздействие. Воздействие эквивалентных по фотодинамической активности доз фотосенсибилизаторов с разной локализацией может индуцировать типы гибели клетки, принципиально различающиеся по морфологическим признакам, скорости развития и молекулярным механизмам.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых журналах, входящих в список ВАК

1. Kutova O.M., Guryev E.L., Sokolova E.A., **Alzeibak R.**, Balalaeva I.V. Targeted delivery to tumors: multidirectional strategies to improve treatment efficiency // Cancers (Basel). 2019. V. 11. P.68.

2. Turubanova V.D., Balalaeva I.V., Mishchenko T.A., Catanzaro E., **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Efimova I., Bachert C., Mitroshina E.V., Krysko O., Vedunova M.V., Krysko D.V. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine // Journal for immunotherapy of cancer. 2019. V. 7. P. 350.

3. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Турубанова В.Д., **Альзеибак Р.**, Балалаева И.В., Ведунова М.В., Krysko D.V. Сравнительный анализ действия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гиперицин на клетки глиомы и первичные нейрональные культуры in vitro // Современные технологии в медицине. 2019. Т. 11. № 4. С. 52-63.

4. Mishchenko T.A., Turubanova V.D., Mitroshina E.V., **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Lermontova S.A., Klapshina L.G., Balalaeva I.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Effect of novel porphyrazine photosensitizers on normal and tumor brain cells // Journal of biophotonics. 2020. V. 13. P. e201960077.

5. **Alzeibak R.**, Mishchenko T.A., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future // Journal for immunotherapy of cancer. 2021. V. 9. P. e001926.

6. **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Kutova O.M., Shanwar S., Balalaeva I.V. Mechanisms of photodynamic killing of cancer cells by photodithazine // Opera medica et physiologica. 2021. V. 8(1). P. 51-61.

Тезисы конференций:

7. **Альзеибак Р.**, Пескова Н.Н., Турубанова В.Д., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Балалаева И.В., Крысько Д.В. Сравнительный анализ гибели клеток глиомы при фотодинамическом воздействии с фотосенсибилизаторами разной природы // Сборник тезисов 23-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI Века». Пущино, 2019. С. 395.

8. **Альзеибак Р.**, Пескова Н.Н., Турубанова В.Д., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Крысько Д.В., Балалаева И.В. Фотоиндуцированная гибель клеток глиомы при использовании ряда фотосенсибилизирующих соединений // Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». Нижний Новгород, 2019. С. 25.

9. Mishchenko T.A., Turubanova V.D., **Alzeibak R.**, Peskova N.N., Balalaeva I.V., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Krysyko D.V. Features of glioma cell death under photodynamic treatment with different types of photosensitizers // Abstract book of «7th OncoPoint Symposium». Ghent, Belgium, 2019. P. 59.

10. **Альзеибак Р.**, Пескова Н.Н., Горохова А.А., Турубанова В.Д., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Балалаева И.В., Крысько Д.В. Сравнение эффективности фотосенса и фотодитазина в отношении опухолевых клеток разного происхождения // Сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века». Пущино, 2020. С. 294.

11. **Альзеибак Р.**, Пескова Н.Н., Горохова А.А., Турубанова В.Д., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Крысько Д.В., Балалаева И.В. Сравнительный анализ гибели опухолевых клеток разного происхождения при фотодинамическом воздействии фотосенса и фотодитазина // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». Нижний Новгород, 2020. С. 15.

12. Турубанова В.Д., Балалаева И.В., **Альзеибак Р.**, Пескова Н.Н., Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Индуцируемые фотодинамической терапией иммуногенные пути клеточной гибели опухолевых клеток // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Гатчина, 2020. С. 214-215.