

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

*На правах рукописи*

АЛЬЗЕЙБАК РАЗАН

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

03.01.02 – Биофизика

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., доц. Балалаева Ирина Владимировна,  
доцент кафедры биофизики ИББМ ННГУ

**Нижегород – 2021**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Принцип фотодинамической терапии.....	12
1.1.1. Механизмы фотосенсибилизации.....	12
1.1.2. Фотофизические и фотохимические характеристики фотосенсибилизаторов и их внутриклеточная локализация .....	16
1.1.3. Фотодинамическое воздействие на клеточные структуры .....	21
1.2. Механизмы защиты клеток при фотодинамическом воздействии.....	25
1.3. Механизмы клеточной гибели при фотодинамической терапии .....	27
1.3.1. Прямой механизм гибели клеток при ФДТ .....	28
1.3.1.1. Апоптоз.....	29
1.3.1.2. Некроптоз.....	33
1.3.1.3. Ферроптоз.....	35
1.3.1.4. Другие типы регулируемой клеточной смерти .....	37
1.3.2. Непрямой механизм смерти клеток при ФДТ .....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	44
2.1. Клеточные культуры .....	44
2.2. Исследуемые фотосенсибилизаторы .....	44
2.3. Анализ спектральных свойств фотосенсибилизаторов .....	45
2.4. Исследование внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов .....	45
2.5. Определение темновой токсичности и фотодинамической активности фотосенсибилизаторов .....	47
2.6. Исследование механизмов клеточной гибели .....	48
2.6.1. Исследование скорости пермеабиллизации клеточной мембраны фотосенсибилизированных клеток.....	49
2.6.2. Метод ингибиторного анализа.....	49
2.6.3. Анализ экстернализации фосфатидилсерина на мембранах фотосенсибилизированных клеток.....	50
2.6.4. Визуализация активности каспазы 3 в клетках .....	51
2.6.5. Анализ активации перекисного окисления липидов .....	53

2.6.6. Анализ фосфорилирования MLKL .....	54
2.6.6.1. Получение клеточных лизатов и определение количества белка ...	54
2.6.6.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле и перенос белков на мембрану .....	55
2.6.6.3. Блокировка, окраска и визуализация белков.....	55
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>57</b>
3.1. Фотофизические свойства исследуемых фотосенсибилизаторов .....	57
3.2. Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов .....	58
3.3. Темновая токсичность и фотодинамическая активность фотосенсибилизаторов .....	61
3.4. Анализ механизмов клеточной гибели.....	64
3.4.1. Морфологические особенности фотосенсибилизированных клеток и скорость пермеабиллизации клеточной мембраны .....	64
3.4.2. Ингибиторный анализ .....	70
3.4.3. Анализ экстернализации фосфатидилсерина на мембранах фотосенсибилизированных клеток.....	75
3.4.4. Активация каспазы 3 в фотосенсибилизированных клетках.....	77
3.4.5. Активация перекисного окисления липидов в фотосенсибилизированных клетках.....	80
3.4.6. Фосфорилирование киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (MLKL), в фотосенсибилизированных клетках.....	81
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>83</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>86</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>87</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<sup>1</sup>ФС\* – возбужденное синглетное состояние фотосенсибилизатора,  
<sup>3</sup>ФС\* – возбужденное триплетное состояние фотосенсибилизатора,  
АТФ – аденозинтрифосфат,  
АФК – активные формы кислорода,  
ДК – дендритные клетки,  
ДМСО – диметилсульфоксид,  
ЛПНП – липопротеин низкой плотности,  
СОД – супероксиддисмутаза,  
ФДТ – фотодинамическая терапия,  
ФС – фотосенсибилизатор,  
ЭПР – эндоплазматический ретикулум,  
АРАФ1 – апоптотический активирующий пептидазу фактор 1 (от англ. Apoptotic protease activating factor 1),  
ВАК – гомологичный BCL2 антагонист/киллер (от англ. Bcl-2 homologous antagonist/killer),  
ВАХ – BCL2-ассоциированный белок X (от англ. Bcl-2-associated X protein),  
BCL2 – белок В-клеточной лимфомы 2 (от англ. B cell lymphoma 2),  
ВІD – агонист смерти домена, взаимодействующего с ВНЗ (от англ. ВНЗ interacting-domain death agonist),  
ВІМ – BCL2-подобный белок 11 (от англ. Bcl-2-like protein 11),  
CASP – каспаза,  
CD – кластеры дифференцировки (от англ. Cluster of differentiation),  
cyt *c* – цитохром *c* (от англ. cytochrome *c*),  
DAMP – молекулярные структуры, связанные с повреждением (от англ. Damage-associated molecular pattern),  
DFO – дефероксамин (от англ. deferoxamine),

DIABLO/SMAC – белок, связывающий с клеточными ингибиторами белков апоптоза (от англ. direct IAP binding protein with low pI, or Second mitochondria-derived activator of caspases),

FRET – Фёрстеровский резонансный перенос энергии (от англ. Förster resonance energy transfer),

GPX4 – глутатионпероксидаза 4 (от англ. Glutathione peroxidase 4),

GSH – глутатион (от англ. glutathione),

HpD – производное гематопорфирина (от англ. Hematoporphyrin derivative),

HPPH – 2-(1-гексилоксиэтил)-2-девинилпиррофеофорбид (от англ. 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide),

HSP – белки теплового шока (от англ. Heat shock protein),

IAP – клеточный ингибитор белков апоптоза (от англ. Inhibitors of apoptosis proteins),

IC<sub>50</sub> – полумаксимальная ингибирующая концентрация,

ICD – иммуногенная гибель клеток (от англ. Immunogenic cell death),

IFN – интерферон (от англ. Interferon),

IL – интерлейкин (от англ. Interleukin),

MLKL – киназный домен смешанной линии, подобный псевдокиназе (от англ. Mixed lineage kinase domain-like protein),

MOMP – повышенная проницаемость внешней мембраны митохондрий (от англ. Mitochondrial outer membrane permeabilization),

Nrf2 – ядерный фактор 2 (от англ. Nuclear factor 2),

NPeб – N-аспартилхлорин *еб*,

Omi/HtrA2 – фактор потребности в высокой температуре A2 (от англ. High temperature requirement factor A2),

ОММ – наружная митохондриальная мембрана (от англ. Outer mitochondrial membrane),

PARP1 – поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (от англ. Poly [ADP-ribose] polymerase 1),

PBS – фосфатно-солевой буфер (от англ. Phosphate-buffered saline),

PI – йодид пропидиума (от англ. Propidium iodide),  
pMLKL – фосфорилированный белок MLKL,  
PRR – рецепторы распознавания патогенов (от англ. Pathogen recognition receptors),  
PUFA – полиненасыщенные жирные кислоты (от англ. Polyunsaturated fatty acids),  
Pz –порфиразин,  
RCD – регулируемая гибель клеток (от англ. Regulated cell death),  
RIPK – рецептор-взаимодействующая протеинкиназа (от англ. Receptor-interacting protein kinase),  
SDS – додецилсульфат натрия (от англ. sodium dodecyl sulfate),  
t-BID – усеченная форма белка BID,  
TLR – толл-подобный рецептор (от англ. Toll-like receptor),  
TNFR1 – рецептор фактора некроза опухолей 1 (от англ. Tumor necrosis factor receptor 1),  
UPR – ответ на неправильно свернутые белки (от англ. unfolded protein response),  
zVAD-fmk – N-бензилоксикарбонил-вал-ала-асп(O-Me)-флуорометилкетон (от англ. N-Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone),  
 $\lambda_{em}$  – диапазон регистрации флуоресценции,  
 $\lambda_{ex}$  – длина волны возбуждения,  
 $\phi_{\Delta}$  – квантовый выход генерации синглетного кислорода,  
 $\phi_F$  – квантовый выход флуоресценции.

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность исследования**

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 [1].

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, гиперидин, 5-аминолевулиновая кислота, предшественник эндогенного протопорфирина IX и другие [2]. 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. [3, 4], 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 [5]. 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 [6], или, наоборот, вызывать меньшее воспаление, делая такой режим подходящим, например, для лечения опухолей головного мозга, где отек ткани недопустим [7].

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 цитофлуориметрии исследования выполнены совместно с оператором оборудования. Принято непосредственное участие в обсуждении всех полученных результатов, подготовке научных статей 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**

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, и 6 тезисов конференций.

## **Структура и объем 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Принцип фотодинамической терапии

#### 1.1.1. Механизмы фотосенсибилизации

В 1900 году опыты профессора Херманна фон Таппайнера и студента Оскара Рааба привели к открытию гибели клеток, вызванной сочетанием химических веществ и света. Они изучали влияние красителя акридина на инфузории *Paramecium* и заметили, что токсичность акридина варьирует в зависимости от его облучения светом [8]. В том же году французский невролог Жан Прайм обнаружил, что перорально вводимый эозин, используемый для лечения больных эпилепсией, вызывает дерматит при воздействии солнечного света [9]. Дальнейшее исследование открытий О. Рааба Х. фон Таппейнером привело к появлению нового термина – «фотодинамическое действие» [10]. Первое применение этого подхода на людях было выполнено Фридрихом Мейером-Бетцем с использованием порфирина, выделенного из гемоглобина и называемого гематопорфирином. При нанесении его на собственную кожу он наблюдал боль и припухлость на освещенных участках [11]. Более поздние исследования, проведенные Р. Липсоном [12] с использованием производного гематопорфирина (HrD), показали, что это соединение накапливалось в опухолях и испускало флуоресценцию. Эти свойства в сочетании с уменьшенной дозировкой по сравнению с неочищенным гематопорфирином сделали его полезным диагностическим инструментом [12]. Десять лет спустя И. Даймонд показал, что HrD можно использовать для лечения рака у мышей, и наблюдал остановку роста глиомы в течение нескольких недель после лечения, прежде чем более глубокие слои опухолевой ткани продолжили рост [13]. Усилия Т. Догерти и соавт. в 1970-х проложили путь для развития ФДТ в том виде, как она известна сегодня. Сначала они наблюдали полное уничтожение опухоли молочной железы у мышей с использованием HrD в сочетании с красным светом [14]. Второе исследование с участием 25 пациентов с раком кожи

показало полный ответ в 98 из 113 опухолей, частичный ответ в 13 и только две опухоли оказались резистентными к ФДТ [15]. Эти результаты были ключевыми для получения первого разрешения на клиническое использование ФДТ для лечения рака мочевого пузыря в Канаде в 1993 году, позднее ФДТ стала применяться в диагностике и лечении различных форм рака и многих других заболеваний.

ФДТ основана на фотохимической реакции между активируемым светом фотосенсибилизатором, светом, обычно в видимом спектре, и молекулярным кислородом. Эти три компонента безвредны по отдельности, но в сочетании приводят к образованию активных форм кислорода (АФК) [16], которые способны непосредственно вызывать повреждения клеточных органелл и мембран в зависимости от того, где АФК образуются [17]. В связи с этим выбор ФС и их локализация играет критическую роль в успешном применении ФДТ [18].

Молекула фотосенсибилизатора в своем нормальном состоянии характеризуется спаренными электронами с полным спином  $S=0$  и мультиплетностью спина, равной 1. Эта конфигурация называется синглетным состоянием, а конфигурация со всеми электронами на их энергетически низшей возможной орбитали называется основным состоянием  $S_0$ . Фотосенсибилизатор после попадания в клетки облучается светом с длиной волны, совпадающей с его спектром поглощения, что приводит к поглощению фотона и переводит ФС из основного синглетного состояния в возбужденное синглетное состояние  $S_1$  ( $^1\text{ФС}^*$ ). Из этого нестабильного и обычно короткоживущего состояния ФС может вернуться в основное состояние, преобразовав свою энергию в тепло или флуоресценцию, что может быть использовано для диагностики и оптического контроля [19].

Помимо указанных выше путей молекула ФС в  $S_1$  состоянии может подвергаться процессу, который называется интеркомбинационной конверсией, в результате чего ФС переходит в триплетное состояние  $T_1$ , в

котором два неспаренных электрона имеют одинаковый спин. Триpletное возбужденное состояние ФС ( $^3\text{ФС}^*$ ) обладает относительно долгим временем жизни (до секунд) [20] и может расходовать свою энергию посредством фосфоресценции или путем взаимодействия с другими молекулами. Образование АФК становится возможным вследствие участия  $^3\text{ФС}^*$  в двух типах реакций [21]. Эти процессы изображены на классической схеме Яблонского (рис. 1.).

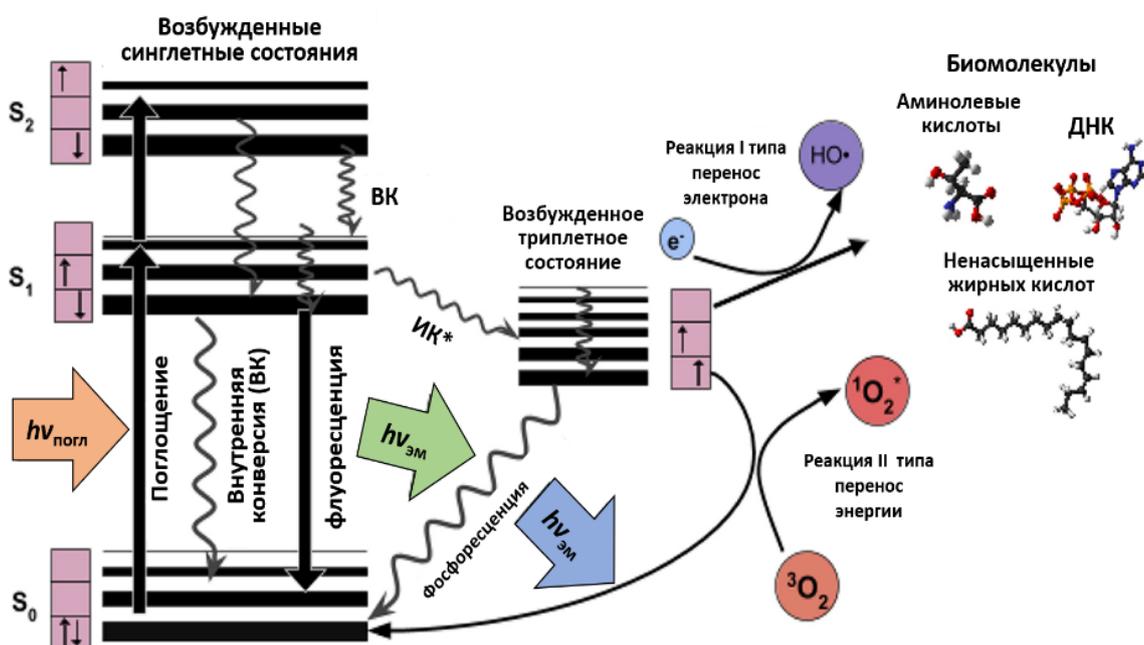


Рис. 1. Диаграмма Яблонского, показывающая переход молекулы фотосенсибилизатора в возбужденное состояние, генерацию активных форм кислорода и повреждение биомолекул [22]. ИК\* – интеркомбинационная конверсия

Фотохимическая реакция I типа означает перенос электронов или протонов на кислород или другие молекулы с образованием анион-радикала или катион-радикала соответственно. Эти радикалы могут вступать в реакцию с молекулярным кислородом с образованием АФК. Фотохимические реакции I типа часто приводят к образованию супероксид-анионов ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) при переносе электрона с  $^3\text{ФС}^*$  на молекулярный кислород [21, 23]. Супероксид-анион не очень реактивен в биологических системах, но он может реагировать с образованием пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Пероксид

водорода может легко проходить через биологические мембраны. Поскольку повреждения, индуцируемые  $\text{H}_2\text{O}_2$ , не ограничиваются одним клеточным компартментом, то пероксид водорода весьма важен для нарушения функционирования работы клетки в целом [24, 25]. При более высоких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  может реагировать с  $\text{O}_2^{\cdot-}$  с образованием очень реакционноспособного гидроксильного радикала  $\text{OH}^{\cdot}$  в ходе реакции Габера-Вейса.  $\text{OH}^{\cdot}$  может атаковать и окислять любую молекулу в клетке. В присутствии ионов металлов, таких как железо или медь, гидроксильные радикалы также могут образовываться в ходе реакции Фентона [26]. Также отметим, что  $\text{O}_2^{\cdot-}$  может реагировать с оксидом азота ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) с образованием пероксинитрита ( $\text{OONO}^{\cdot}$ ), другой высокореактивной окисляющей молекулы [2].

В реакциях II типа  $^3\text{FC}^*$  реагирует непосредственно с молекулярным кислородом  $^3\text{O}_2$  в основном триплетном состоянии путем передачи энергии с образованием синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$ , который характеризуется чрезвычайно сильными окислительными свойствами [27]. Поскольку  $^1\text{O}_2$  обладает высокой реакционной способностью, его время жизни в биологических тканях составляет порядка 40 нс, а максимальный радиус действия составляет около 20 нм [28, 29]. Этот малый радиус действия (меньший, чем диаметр большинства клеточных органелл) при использовании с локально накапливающимся ФС и активацией только путем облучения тканей-мишеней теоретически делает ФДТ очень специфичным и контролируемым методом. Это также означает, что локализация ФС влияет на место действия ФДТ на субклеточном уровне.

Предполагается, что механизм реакций II типа, является наиболее важным процессом, обуславливающим эффективность ФДТ. Тем не менее, соотношение вклада обоих механизмов зависит от многих факторов, включая природу фотосенсибилизатора, концентрацию кислорода и pH среды. По мере истощения кислорода реакции I типа начинают преобладать [30]. АФК вызывают фотоповреждение белков, жиров и других молекул в

фотосенсибилизированной области. Это приводит к прямой гибели опухолевых клеток [2, 31].

### **1.1.2. Фотофизические и фотохимические характеристики фотосенсибилизаторов и их внутриклеточная локализация**

Одним из трех критических элементов ФДТ, помимо света и кислорода, является присутствие фотосенсибилизаторов. Эти красители определяются как молекулы, способные поглощать свет с определенной длиной волны, вызывая фотофизические и фотохимические реакции [4].

Фотосенсибилизаторы впервые были получены в коммерческом масштабе в 1970-х годах Т. Догерти и его коллегами [15]. Они тестировали водорастворимую смесь порфиринов, называемую производным гематопорфирина, или HpD. HpD был получен путем очистки и химической модификации первого порфирина, используемого в качестве ФС – гематопорфирина (Hp). Впоследствии смесь димеров и олигомеров порфирина, выделенная из HpD, была использована для получения препарата Фотофрин<sup>®</sup> (Photofrin<sup>®</sup>). В настоящее время фотофрин остается наиболее часто используемым ФС [22]. Другими типами производных гематопорфирина являются Photogem<sup>®</sup> и Photosan-3<sup>®</sup>. Несмотря на широкое применение в ФДТ, производные гематопорфирина имеют некоторые ограничения для клинического применения, обусловленные сильной кожной фототоксичностью, слабым поглощением в красной области видимого спектра, а также сложным составом смеси веществ, получаемой в ходе синтеза. Эти недостатки фотосенсибилизаторов первого поколения обусловили необходимость исследования новых соединений и инициировали разработку фотосенсибилизаторов второго поколения [32].

Большинство ФС, используемых как клинически, так и экспериментально, получены из тетрапиррольного ароматического ядра, которое имеет относительно большую полосу поглощения в области 400 нм, известную как полоса Sore, и набор меньших полос поглощения в красной

области спектра, известных как Q-полосы. Однако существуют ФС из второго поколения, имеющие другую химическую структуру, например, фталоцианины и непорфириновые ФС (рис. 2) [2].

Обычно, ФС второго поколения делят на [22, 33]:

- порфирины, такие как мета-тетра(гидроксифенил)порфирин (m-THPP), 5,10,15,20-тетракис(4-сульфанатофенил)-21Н,23Н-порфирин (TPPS4) и эндогенный протопорфирин IX (PpIX), индуцированный введением экзогенной 1,5-аминолевулиновой кислоты (ALA);

- хлорины, такие как вертепорфин, Foscan<sup>®</sup> и N-аспартилхлорин еб (NPeб). По сравнению с порфиринами структура хлоринов отличается на два дополнительных водорода в одном из пиррольных колец. Это структурное изменение приводит к батохромному сдвигу в полосе поглощения от 640 до 700 нм;

- бактериохлорины, имеющие два пиррольных кольца с восстановленными двойными связями, что приводит к смещению полосы поглощения в ещё более длинноволновую область красного спектра;

- феофорбиды, также имеющие два дополнительных водорода в одном пиррольном кольце. К этой группе относятся 2-(1-гексилоксиэтил)-2-девинилпирофеофорбид (HPPH), который поглощает свет при 665 нм;

- бактериофеофорбиды, в структуре которых содержится на четыре атома водорода больше, чем у соответствующих порфиринов. Обычно эти соединения активируются поглощением света при 740–800 нм. Сюда относится WST09 (падопорфин);

- тексафирины, такие как мотексафин лютеций, который хорошо растворим в воде и поглощает свет при 732 нм;

- фталоцианины, как правило в виде металлокомплексов, поглощающие свет при 670-700 нм. Одним из примеров производного фталоцианинов является тетрасульфонат фталоцианина алюминия AlPcS4 (Photosens<sup>®</sup>/Фотосенс<sup>®</sup>), который поглощает свет при 676 нм. Фотосенс

используется в России для лечения рака желудка, кожи, губ, полости рта и молочной железы;

- порфиразины (Pz) и их производные, такие как, например, тетрацианопорфиразины [34], которые представляют собой тетрапиррольные ароматические ядра, подобные порфиринам и фталоцианинам. Pz отличаются от порфиринов тем, что содержат в макроцикле мезоатомы азота вместо атомов углерода, а в отличие от фталоцианинов их  $\beta$ -пиррольные позиции открыты для замещения;

- непорфириновые ФС, включая антрахиноны (например, гиперидин), фенотиазины, ксантены, цианины и куркуминоиды.

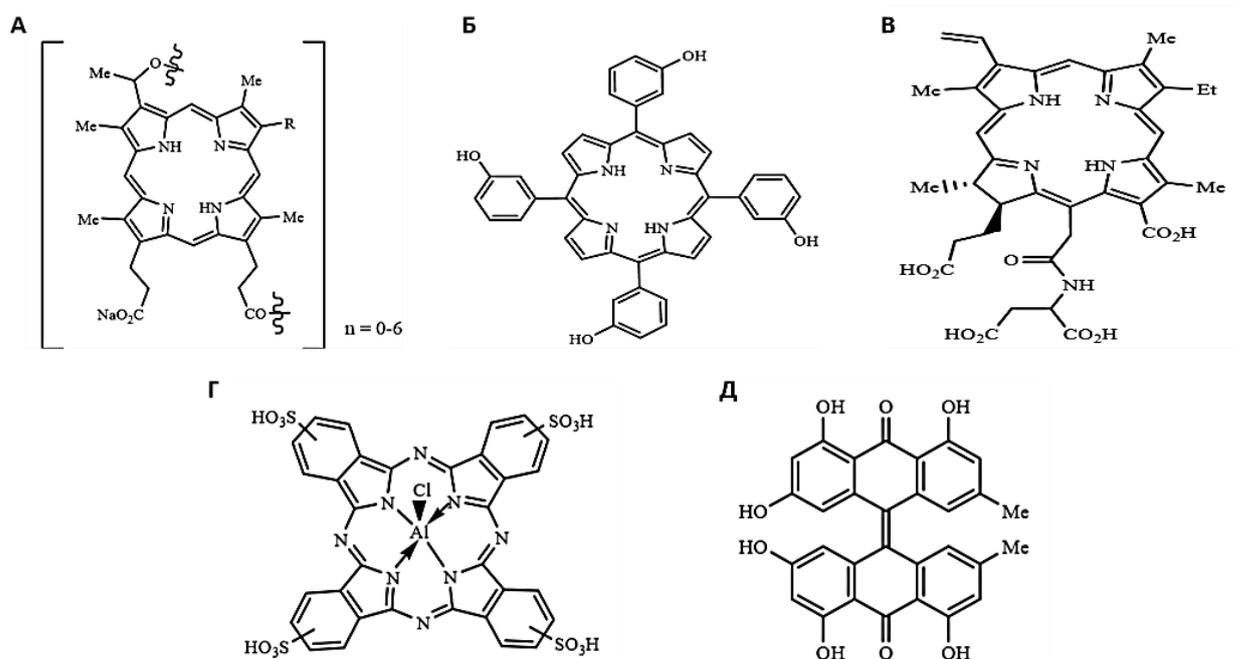


Рис. 2. Некоторые фотосенсибилизаторы, применяющиеся при ФДТ: А – производное гематопорфирина (HrD); Б – мета-тетра(гидрокси-фенил)порфирин (m-THPP); В – N-аспартилхлорин е6 (NPe6); Г – фотосенс; Д – гиперидин [33]

Фотосенсибилизаторы второго поколения характеризуются более высокой химической чистотой, более высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода и глубоким проникновением в ткани возбуждающего их света (диапазоне длин волн от 650 до 800 нм). Кроме

того, они демонстрируют меньшее количество побочных эффектов, что является следствием более высокой селективности в отношении опухолевых тканей и более быстрого выведения фотосенсибилизатора из организма [35].

Основным недостатком ФС второго поколения является плохая растворимость в воде большинства соединений, что является существенно ограничивающим фактором при их внутривенном введении и вынуждает искать новые методы их доставки. С этой целью были разработаны ФС третьего поколения, которые представляют собой модифицированные ФС второго поколения в виде биологических конъюгатов или комплексов с различными носителями (например, липосомами и наночастицами) или антителами для улучшения их физических, химических и терапевтических свойств. Эти соединения часто обладают способностью направленной доставки в опухолевые клетки, что приводит к более высокой селективности по сравнению с ФС предыдущих поколений [36, 37].

Накопленный опыт применения ФС на практике позволил сформулировать требования к так называемому «идеальному» соединению. Идеальный фотосенсибилизатор для успешного применения в ФДТ должен иметь следующий набор характеристик и условий [38]:

- высокая степень химической чистоты;
- фотодинамический эффект только при облучении с определенной длины волны;
- высокая фотохимическая активность и максимальное поглощение света на длинах волн от 600 до 800 нм;
- минимальное поглощение света в диапазоне от 400 до 600 нм. Это предотвращает возможную чрезмерную чувствительность к действию солнечного света;
- минимальная цитотоксичность в темноте;
- недорогой и простой синтез и легкая доступность;
- высокая селективность накопления в отношении опухолевых тканей;

- фармакокинетическая элиминация из организма должна быть быстрой, менее одного дня, чтобы избежать фотоиндуцированные побочные эффекты терапии.

Фотосенсибилизаторы накапливаются в значительно более высоких концентрациях в опухолях, чем в нормальных тканях. Причина такого биораспределения основана на многих факторах. Важную роль играет эффект повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффект, от англ. Enhanced Permeability and Retention effect), который является уникальным явлением солидных опухолей, связанным с большими промежутками между эндотелиальными клетками в незрелых кровеносных сосудах опухоли, что увеличивает проницаемость опухолевых сосудов, а также отсутствием функционального лимфодренажа при повышенном давлении интерстициальной жидкости [39]. Кроме того, неспецифическая аккумуляция ФС в опухоли может быть связана с низким межклеточным рН в опухоли, влияющим на растворимость молекул ФС, или с тенденцией гидрофобных ФС образовывать комплексы преимущественно с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) [40]. Роль ЛПНП заключается в снабжении тканей холестерином, необходимым для построения мембран во время клеточного деления [41]. Интенсивно делящиеся опухолевые клетки демонстрируют повышенное поглощение ЛПНП, которые действуют как «транспортёр» ФС в клетки опухоли. Кроме того, ткани с повышенной митотической активностью обнаруживают чрезмерную экспрессию рецепторов ЛПНП на поверхности клеток [40].

Клеточный ответ на фотодинамическое воздействие существенно зависит от ряда факторов, ключевым из которых является локализация ФС [42]. Внутриклеточные мишени действия ФДТ зависят от ФС и играют важную роль в последующей судьбе клетки. Поглощение ФС опухолевыми клетками, а также место его преимущественного накопления зависят от химических характеристик каждого соединения. Гидрофобные молекулы могут быстро диффундировать через плазматическую мембрану, в то время

как более полярные молекулы имеют тенденцию к интернализации посредством эндоцитоза или облегченного транспорта с помощью липидов и белков сыворотки [5]. Гидрофобные соединения и их агрегаты связываются и транспортируются с ЛПНП, тогда как гидрофильные молекулы связываются с альбумином и глобулинами [43, 44]. После интернализации в зависимости от характеристик ФС он обычно локализуется в таких органеллах, как плазматическая мембрана, лизосомы, митохондрии, аппарат Гольджи или эндоплазматическая ретикулум (ЭПР) [5, 45]. Компоненты цитоскелета и структуры клеточной адгезии также были описаны как мишени ФС [46]. Чтобы ограничить повреждение ДНК и избежать развития генетически устойчивых к терапии клеток, ФС не должен накапливаться в клеточных ядрах [4].

Накопление фотосенсибилизаторов в клеточных органеллах также зависит от их заряда. Катионные соединения, например, соли иминия, накапливаются в митохондриях, в то время как анионные молекулы, например, сульфированные и карбоксилированные соединения, обнаруживаются в лизосомах [43, 44]. ФС с одним или двумя анионными зарядами локализуются в перинуклеарной области, везикулах клетки и лизосомах, обеспечивая множественные участки накопления фотосенсибилизатора [47, 48]. Растворимость в воде является важной характеристикой для биодоступности ФС, тогда как липофильность важна для диффузии через липидные барьеры и локализации во внутриклеточных структурах [49].

### **1.1.3. Фотодинамическое воздействие на клеточные структуры**

Фотоповреждение клеток зависит от физико-химических свойств ФС, которые определяют их внутриклеточную локализацию. Вследствие короткого времени жизни  $\text{OH}^\cdot$  и  $^1\text{O}_2$  фотодинамическое действие напрямую влияет только на молекулы и структуры, расположенные наиболее близко к

области их образования, то есть к области локализации ФС. Клеточные мишени ФДТ представлены на рисунке 3.

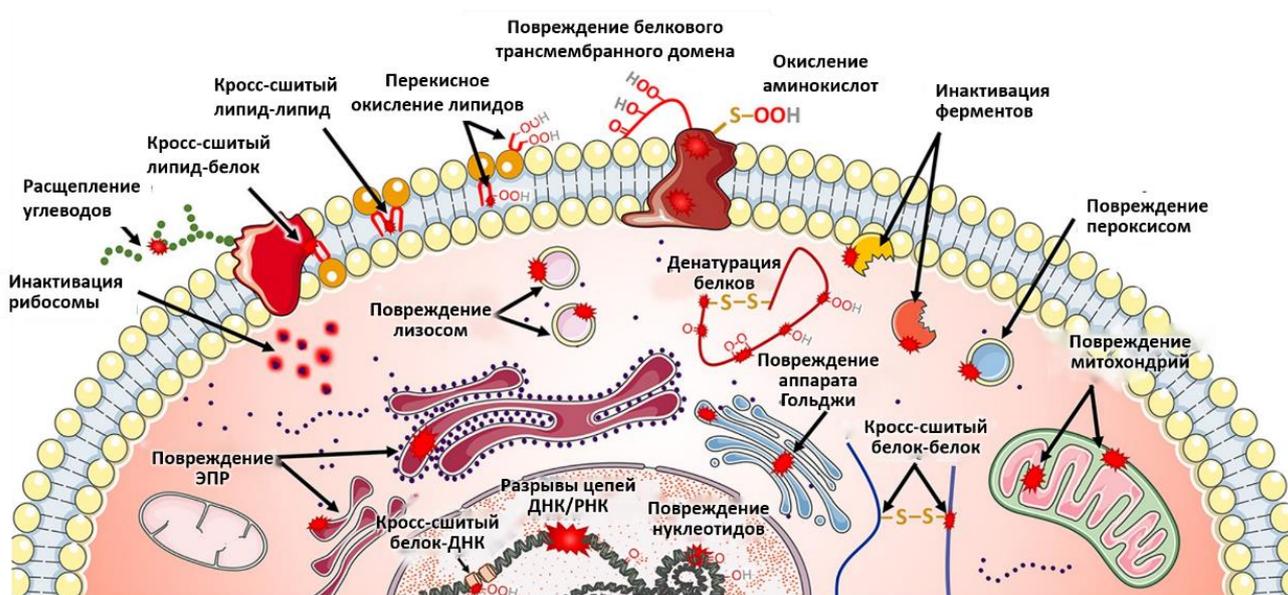


Рис. 3. Клеточные мишени ФДТ [50]

Роль, которую играют клеточные органеллы в жизнеспособности клетки после проведения ФДТ, определяет судьбу клеток (выживание или смерть) и путь, по которому они погибают. Радикальные АФК вместе с синглетным кислородом, образующиеся при ФДТ, являются окислителями и могут напрямую реагировать со многими биологическими молекулами.

Повреждения мембран имеют особое значение для ФДТ и зачастую считаются необходимыми для цитотоксического эффекта. Действительно, ФС, проявляющие более высокую степень накопления в клеточных и/или органеллярных мембранах, обычно более цитотоксичны [51, 52]. Первый этап фотоповреждения мембран обычно включает реакцию между липидом (LH) и  $^1\text{O}_2$ , образующимся при реакции II типа, что приводит к образованию гидропероксида (LOOH). Также возможны прямые реакции с  $^3\text{ФС}^*$  по реакциям I типа. Необратимое повреждение происходит при отщеплении атома водорода от ненасыщенной жирной кислоты (LH), что приводит к образованию липидного радикала ( $\text{L}^\bullet$ ). Присоединение молекулы кислорода приводит к образованию липопероксильного радикала ( $\text{LOO}^\bullet$ ), который, в свою очередь, способен реагировать с другой жирной кислотой LH,

инициируя реакционную цепь, приводящую к образованию LOOH и другого L<sup>•</sup>. Фаза развития реакции включает в себя инициирование новой окислительной цепи липопероксильным радикалом и распадом гидроперекисей липидов на другие промежуточные радикалы. В реакциях, индуцированных светом, также происходит образование алкоксидов в результате прямой реакции между <sup>3</sup>ФС\* и гидропероксидом липида с двойной связью, что приводит к разрыву углеродной цепи. Этот процесс приводит к образованию жирных альдегидов и других продуктов, которые являются молекулами, ответственными за начало процесса пермеабилзации мембраны [53].

Белки являются основными биологическими мишенями для фотоповреждения в клетках из-за их высокого содержания (65–70% сухой массы) и высоких констант скорости реакции с <sup>1</sup>O<sub>2</sub> [54]. Окисление может происходить как в основной цепи белка, так и в боковых цепях аминокислот. Продукты окисления белка <sup>1</sup>O<sub>2</sub> могут запускать специфические сигнальных пути в ответ на действие ФС. Данные кинетики показывают, что <sup>1</sup>O<sub>2</sub> реагирует со значительной селективностью с цистеином, метионином, тирозином, гистидином и триптофаном [54]. Кроме того, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> может генерировать с высоким выходом образование гидропероксидов в белках, что специфично для тиолзависимых реакций. Следовательно, могут образоваться высокомолекулярные агрегаты посредством межмолекулярной дисульфидной сшивки [55] и инактивации белков с цистеином в активном центре, таких как цистеиновые протеазы [56].

Фотоповреждения белков приводят к инактивации ионных каналов и транспортных АТФ-аз и, следовательно, к нарушению обмена ионов, повреждению мембранных ферментов и рецепторов, и, в конечном итоге, к нарушению клеточных функций [1].

Лизосомы были предложены в качестве критической внутриклеточной мишени для локализации ФС в 1993 году [57]. Большинство гидрофильных ФС, таких как отрицательно заряженные порфирины, NРeб и

фенотиазиновый краситель метиленовый синий, локализуются преимущественно в лизосомах [58-60]. Повреждение лизосом при ФДТ может привести к лизосомо-зависимой гибели клеток вследствие повышения проницаемости лизосомальной мембраны [61] и высвобождения катепсинов, что может привести к расщеплению проапоптотического белка BID с последующей активацией апоптоза [62]. Потенциальное преимущество лизосом в качестве ФДТ-мишени состоит в том, что разрушение мембраны лизосомы приводит к перераспределению ФС в клетке, неспецифическому окрашиванию цитоплазмы и его проникновению в различные органеллы [63].

Митохондрии, как было показано, являются важной субклеточной мишенью для многих катионных заряженных и гидрофобных ФС, используемых в ФДТ [64]. ФС, которые локализуются в митохондриях, могут индуцировать пермеабиллизацию митохондриальных мембран, что приводит к деполяризации митохондрий и высвобождению в цитозоль ряда апоптогенных белков [65]. Фотоповреждение митохондрий вызывает снижение их дыхательной активности, снижение клеточного содержания АТФ и снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [66].

Получены доказательства, показывающие важную роль эндоплазматического ретикулаума в поддержании внутриклеточного гомеостаза кальция, синтеза белка, посттрансляционной модификации и правильного сворачивания белков, а также их сортировки и транспорта. ФДТ может вызывать АФК-опосредованный ЭПР-стресс с участием  $\text{Ca}^{2+}$  сигнальных механизмов и запуском так называемого ответа на неправильно свернутый белок (англ. Unfolded Protein Response), что, в свою очередь, индуцирует апоптоз [67]. Например, использование при ФДТ таких фотосенсибилизаторов как mTHPC и гиперидин, которые преимущественно локализуются в ЭПР [68], или фоскан [69] и редапорфин [70], которые локализуются в ЭПР и компонентах аппарата Гольджи, приводит к развитию ЭПР-стресса и высвобождению молекулярных стрессовых сигналов, которые

могут воздействовать на митохондрии и запускать каскады, ведущие к смерти клеток.

ДНК также может быть повреждена в результате реакций с АФК, при этом повреждения могут быть локализованы как на азотистых основаниях, так и на углеводных остатках. Возможно формирование сшивок ДНК с белком; эта форма повреждения особенно трудна для восстановления клеткой. Хотя все клетки обладают некоторой способностью восстанавливать окислительное повреждение белков и ДНК, избыточное повреждение может вызывать мутации или гибель клеток. Из четырех оснований в нуклеиновых кислотах гуанин является наиболее чувствительным к окислению  $^1\text{O}_2$  [71].

## **1.2. Механизмы защиты клеток при фотодинамическом воздействии**

Существуют многочисленные публикации, описывающие цитопротекторные механизмы, используемые опухолевыми клетками с целью предотвращения цитотоксического эффекта ФДТ. Один из важнейших механизмов основан на значительном изменении уровня антиоксидантных молекул, экспрессируемых в опухолевых клетках [72]. Количество водорастворимых антиоксидантов, например, аминокислот, глутатиона или аскорбата, и жирорастворимых антиоксидантов, например, токоферола, в разных типах опухолевых клеток отличается, что объясняет большие различия в чувствительности клеток к ФДТ [73]. Второй механизм связан с экспрессией в опухолевых клетках ферментов, которые могут устранить токсическое действие АФК. Хотя нет специфического клеточного фермента, который может непосредственно устранить токсическое действие  $^1\text{O}_2$ , ферменты, участвующие в метаболизме других АФК, могут влиять на цитотоксический эффект ФДТ. Например, гиперэкспрессия супероксиддисмутазы (СОД) или обработка миметиками СОД, как было показано, противодействуют цитотоксическому эффекту ФДТ [74]. Повышение активности СОД также наблюдается в различных типах

опухолевых клеток при ФДТ, и это связано с уменьшением активности глутатионпероксидазы и каталазы [75]. Третий цитопротекторный механизм включает белки, чьи кодирующие гены индуцируются ФДТ. Большинство из них являются частью сигнальных путей, которые могут регулировать клеточную смерть, вызванную ФДТ, или участвуют в восстановлении повреждений, вызванных окислительным стрессом. Так, например, ингибирование ядерного фактора NF-κB вследствие гиперэкспрессии суперпрессора IκBα или использования фармакологических ингибиторов сильно сенсibiliзирует опухолевые клетки к апоптозу, индуцированному ФДТ [76]. Другие транскрипционные факторы, индуцируемые ФДТ, включают AP-1, индуцируемый гипоксией фактор (HIF) и ядерный фактор 2 (Nrf2). Было показано, что ФДТ усиливает экспрессию гемоксигеназы-1 (HO-1) и этот эффект зависит от накопления в ядре Nrf2, от активностей митоген-активируемой протеинкиназы p38 (p38<sup>MAPK</sup>) и от активности фосфоинозитол 3-киназы (PI3K). Учитывая антиоксидантную активность HO-1 можно предположить, что Nrf2-зависимая передача сигнала может управлять защитой клеток от ФДТ-опосредованного цитотоксического эффекта [77].

Было обнаружено, что ФДТ индуцирует экспрессию различных белков теплового шока (HSP), для которых описана защитная роль при ФДТ. Например, трансфекция опухолевых клеток геном HSP27, повышает выживаемость опухолевых клеток после применения ФДТ [78]. Аналогичным образом, повышенные уровни HSP60 и HSP70 обратно коррелируют с чувствительностью к ФДТ [79, 80]. Простейшим объяснением этих наблюдений является способность HSP связываться с окислительно поврежденными белками. Более того, внутриклеточная функция HSP не ограничивается рефолдингом белка. Многие HSP играют важнейшую роль в регуляции сигнальных путей клеточного выживания [4]. ФДТ также приводит к увеличению убиквитинирования карбонилированных белков, тем самым помечая их для деградации в протеасомах, что предотвращает образование токсичных белковых агрегатов [81].

### 1.3. Механизмы клеточной гибели при фотодинамической терапии

Смерть клеток является важнейшим биологическим процессом, играющим активную роль как в эмбриональном развитии человека, так и в возникновении различных заболеваний. Клеточная смерть контролируется на генетическом и биохимическом уровнях. Повреждение и смерть клеток являются сложными многостадийными процессами. Сначала клетка активно противодействует негативному воздействию, стараясь сохранить свою жизнеспособность, но по истощении защитного потенциала она теряет свои основные функции, и развиваются процессы, приводящие к её смерти.

ФДТ участвует как минимум в трёх основных механизмах разрушения опухолевой ткани (рис. 4). В результате ФДТ наблюдается широкий спектр патоморфологических изменений ткани опухоли, связанных, во-первых, с прямыми фототоксическими эффектами и гибелью клеток под действием АФК, образующихся при возбуждении ФС; во-вторых, с повреждением сосудистой системы опухоли и в-третьих, с развитием воспалительного и адаптивного иммунного ответа против опухолевых клеток [82, 83]. Вероятно, преобладание того или иного механизма зависит от типа ФС, его внутриклеточной локализации, типа опухоли, выбора режима облучения.

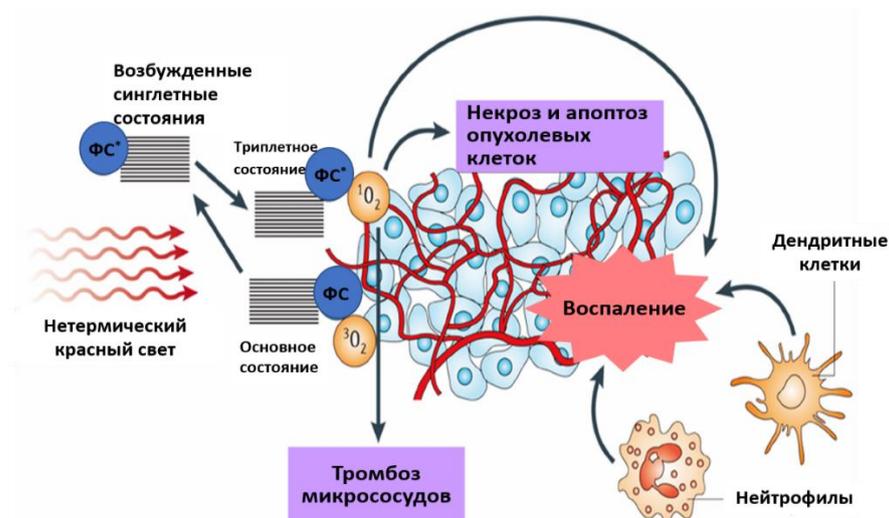


Рис. 4. Механизмы разрушения опухолевой ткани при ФДТ [6]

### 1.3.1. Прямой механизм гибели клеток при ФДТ

Для классификации клеточной смерти традиционно использовался подход, связанный со структурными и морфологическими различиями при реализации различных сценариев гибели. Согласно этой классификации, все варианты гибели могут быть разделены на три типа: тип I – апоптоз, тип II – аутофагия и тип III – некроз [84]. Неточность критериев и сложность дифференцировки всего многообразия видов гибели по морфологическим критериям делают ее применение весьма ограниченным. В этой связи Номенклатурный комитет по клеточной гибели в 2018 выпустил рекомендации по номенклатуре и классификации этого общебиологического явления, основанные на совокупности генетических, биохимических, фармакологических и функциональных (а не морфологических) признаков [85].

К настоящему времени показано, что ФДТ способно индуцировать различные типы гибели клеток, которые могут быть как случайными, так и регулируемы, в том числе некроз, апоптоз, некроптоз, ферроптоз, аутофагию, партанатос и параптоз, что позволяет ФДТ обходить резистентность злокачественных клеток к определенным видам смерти. Отдельные виды клеточной смерти при ФДТ описаны подробно далее.

Случайная гибель клеток, или нерегулируемый некроз, является неконтролируемой формой смерти, соответствующей физическому разрушению плазматической мембраны, вызванному экстремальными по силе воздействия физическими, химическими или механическими факторами. С другой стороны, регулируемая гибель клеток (RCD, от англ. Regulated Cell Death) является результатом активации одного или нескольких путей сигнальной трансдукции и, следовательно, может быть фармакологически или генетически модулирована, по крайней мере, до некоторой степени [85]. Выбор мишени в клетке для фотодинамического воздействия предположительно может играть определяющую роль в запуске того или иного пути клеточной гибели. Также, тип клеточной гибели может

отличаться в зависимости от типа клеток, их генетического или метаболического потенциала, а также от экспериментальной модели, интенсивности лазерного облучения, типа фотосенсибилизатора и его внутриклеточной локализации и концентрации кислорода [86].

Основное внимание будет уделено сигнальным путям, участвующим в иницировании, релизации и распространении основных типов RCD.

### **1.3.1.1. Апоптоз**

Апоптоз — регулируемый процесс запрограммированной клеточной гибели, в результате которого запускается каскад событий, который приводит к фрагментации ДНК в результате активации эндонуклеаз, разрушению ядерных белков и цитоскелета, сшиванию белков, экспрессии на внешней стороне плазматической мембраны лигандов для фагоцитарных клеток, таких как тромбоспондин, фосфатидилсерин, другие фосфолипиды, содержащие фосфосерин, и, в конечном итоге, фрагментации клеток на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазмалеммой [87]. Апоптотические тельца фагоцитируются макрофагами либо другими клетками с фагоцитарной активностью, такой процесс называется эффероцитоз [88]. Важно отметить, что апоптоз и последующий эффероцитоз не всегда иммунологически молчаливы, как считалось ранее [89].

Выделяют два пути развития апоптоза (рис. 5): внешний — запускаемый через поверхностные рецепторы клеточной гибели, и внутренний — запускаемый через цепь митохондриальных реакций [90]. Первый чаще всего идентифицируется при физиологическом гистогенезе тканей, а второй связан с повреждением митохондрий при патологических состояниях [91].

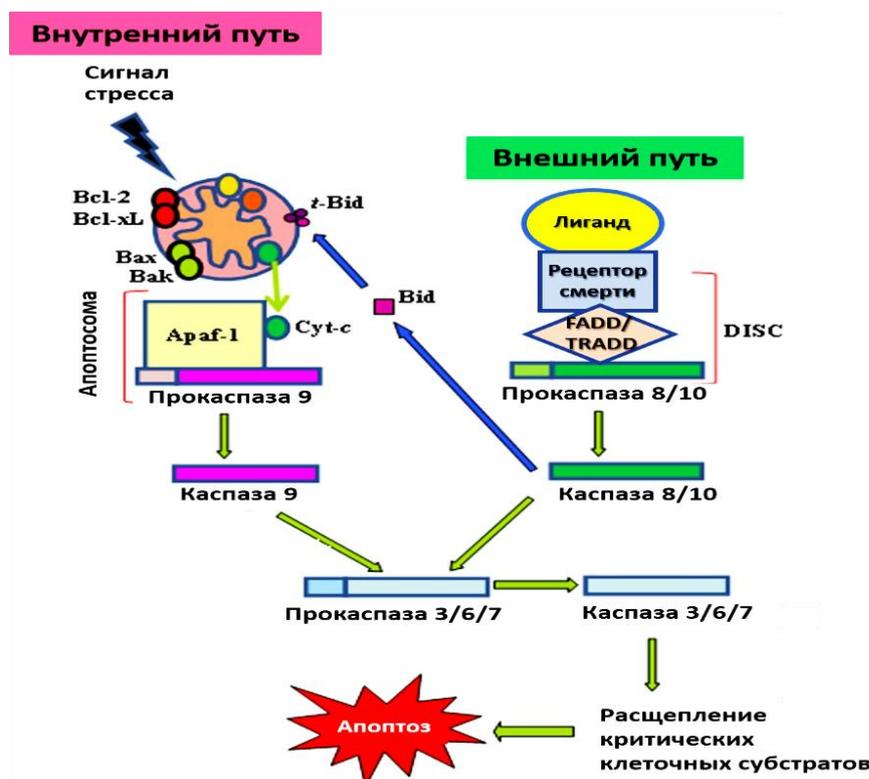


Рис. 5. Два пути развития апоптоза: внешний — запускаемый через поверхностные рецепторы клеточной гибели, и внутренний — запускаемый через цепь митохондриальных реакций [94]

### *Внешний путь апоптоза*

Внешний апоптоз инициируется событиями внеклеточной микросреды. Этот вид смерти в основном вызывается одним из двух типов рецепторов плазматической мембраны: (1) рецепторы смерти, такие как Fas и рецепторы фактора некроза опухолей (TNFR1), активация которых зависит от связывания родственного лиганда, и (2) зависимые рецепторы, активация которых происходит в случае, когда уровни их специфических лигандов падают ниже определенного порога [92, 93].

Основным реализующим механизмом внешнего апоптоза является активация инициаторных каспаз (CASP) 8 и/или 10 при работе формирующегося сигнального комплекса, индуцирующего смерть (DISC, от англ. Death-Inducing Signaling Complex) (рис. 5). CASP 8 способна индуцировать апоптоз по двух различных путям. В так называемых «клетках типа I» (например, зрелых лимфоцитах) CASP 8 непосредственно расщепляет

прокаспазы 3, 6 и 7 и, следовательно, непосредственно инициирует апоптоз [94]. И наоборот, в «клетках типа II» (например, гепатоцитах,  $\beta$ -клетках поджелудочной железы и большинстве опухолевых клеток) внешний апоптоз требует протеолитического расщепления агониста смерти домена, взаимодействующего с BH3 (BID) с помощью CASP 8. Это приводит к генерации усеченной формы BID (t-BID), которая транслоцируется во внешнюю митохондриальную мембрану (ОММ, от англ. Outer Mitochondrial Membrane), где действует как активатор только-BH3 белков и запускает последующий CASP 9-управляемый апоптоз [95].

#### *Внутренний путь апоптоз*

Внутренний путь апоптоза, также известный как митохондриальный путь апоптоза [96], запускается различными стимулами, которые действуют на внутриклеточные мишени. Эта форма апоптоза зависит от факторов, высвобождаемых из митохондрий в результате воздействия гипоксии, токсинов, радиации, накопления АФК, повреждения ДНК, цитозольной перегрузки  $Ca^{2+}$ , ЭПР-стресса, вирусов и различных токсических агентов [94].

Значительное количество исследований подтвердили индукцию апоптоза при ФДТ с использованием различных фотосенсибилизаторов на различных линиях опухолевых клеток. Данные для применяемых в настоящее время ФС представлены в таблице 1.

При воздействии стимулов апоптоза активируются про-апоптотические члены семейства белков В-клеточной лимфомы 2 (BCL2), содержащие один домен BH3 (только-BH3 белки), которые способны активировать гомологичный BCL2 антагонист/киллер (BAK) и BCL2-ассоциированный белок X (BAX) [97]. Затем активированные BAX и BAK образуют гомодимеры и подвергаются дальнейшей олигомеризации [98]. Олигомеризация в конечном итоге приводит к образованию тороидальной липидной поры, которая изменяет проницаемость внешней мембраны митохондрий (MOMP, от англ. mitochondrial outer membrane permeabilization)

и вызывает глубокие перестройки ультраструктуры митохондрий [99, 100]. MOMP напрямую способствует высвобождению в цитозоль апоптогенных факторов, которые исходно находятся в митохондриальном межмембранном пространстве. Эти митохондриальные белки включают цитохром *c* (cyt *c*), белок, связывающий с клеточными ингибиторами белков апоптоза (DIABLO/SMAC), и фактор потребности в высокой температуре A2 (Omi/HtrA2) [101].

Таблица 1

Фотосенсибилизаторы, для которых показана способность индуцировать апоптоз при ФДТ

<b>Фотосенсибилизатор</b>	<b>Внутриклеточная локализация ФС</b>	<b>Опухолевая клеточная линия</b>	<b>Ссылка</b>
Фотофрин	Митохондрии; Клеточная мембрана	C-26	[106]
		SCCVII	[107]
Гиперицин	ЭПР	T24	[108]
		CT26	
		GL261	[109]
Ацетат бенгальского розового	Цитоскелет; Митохондрии; Аппарат Гольджи; ЭПР	Hela	[110]
Протопорфирин IX, индуцированный экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой (5-ALA)	Митохондрии	U87, U251	[111]
		PECA	[112]
		GL261	[109]
2- [1-гексилоксиэтил] -2- девинил пиррофеофорбид- $\alpha$ (HPPH)	Митохондрии	Colo26, 4T1	[113]
Гликоконъюгированный хлорин	Митохондрии	CT26	[114]
Протопорфирин IX, индуцированный эндогенной Me-аминолевулиновой кислотой (Me-ALA)	ЭПР	B16-OVA	[115]
8-метоксипсорален	Н.О. <sup>1</sup>	B16-OVA	[116]

<sup>1</sup> - Н.О.= не определен

Цитозольный пул *cyc* связывается с апоптотическим активирующим пептидазу фактором 1 (APAF1) и прокаспазой 9 с образованием надмолекулярного комплекса, известного как апоптосома, который отвечает за активацию прокаспазы 9 [102]. Активированная прокаспаза 9 может катализировать протеолитическую активацию прокаспазы 3 и прокаспазы 7, недавние данные позволяют также предположить участие прокаспазы 6 в инициации апоптоза [103]. Каталитическая активность CASP 3, 6 и 7 ускоряет гибель клеток и ответственна за многие морфологические и биохимические проявления апоптоза. С другой стороны, цитозольные DIABLO/SMAC и Omi/HtrA2 ускоряют апоптоз, связываясь с членами семейства ингибиторов апоптоза (IAP) [104]. Необходимо отметить, однако, что без высвобождения *cyc* ингибирование одних только IAP недостаточно для инициации апоптоза [105].

### 1.3.1.2. Некроптоз

Некроптоз — вид программируемой гибели клеток, протекающий с морфологическими проявлениями, аналогичными некрозу, но при этом индуцируемый внешними или внутренними по отношению к клетке причинами через посредство рецепторов смерти или рецепторов распознавания патогенов (PRR, от англ. Pathogen Recognition Receptors), включая толл-подобные рецепторы (TLR, от англ. toll-like receptors) и Z-ДНК-связывающий белок 1 (ZBP1) [117].

Термин «некроптоз» был впервые введен в 2005 году, для указания способности некростатина-1 ингибировать регулируемой формы неапоптотической гибели клеток, зависимую от активности рецептор-взаимодействующей протеинкиназы 1 (RIPK1) и запускаемую рецептором TNFR1 в условиях генетического или фармакологического ингибирования каспазы [118]. Как было позднее выяснено, RIPK1 передает про-некроптотический сигнал путем последующей активации киназы RIPK3, при этом наблюдается физическое взаимодействие между их доменами с мотивом

гомотипического взаимодействия RIP (RHIM) и каталитическая активность RIPK1 [119-121]. Затем происходит RIPK3-зависимое фосфорилирование Thr-357 и Ser-358 киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (MLKL, от англ. Mixed lineage kinase domainlike protein), что приводит к образованию олигомеров MLKL, которые затем транслоцируются в плазматическую мембрану, где связывают определенные виды фосфатидилинозитолфосфата и приводят к увеличению проницаемости плазматической мембраны и её последующему разрыву [122].

Активация MLKL происходит в мультимолекулярном комплексе, получившем название «некросома». Некросома включает в себя MLKL, RIPK3 и, в некоторых случаях, RIPK1 [122]. Некросома имеет амилоидоподобную структуру и играет роль преобразователя некроптотического сигнала. Кроме того, предполагается, что некросома участвует в дыхательном взрыве в митохондриях, генерации активных форм кислорода, увеличении проницаемости лизосомальной мембраны для ферментов, что необратимо повреждает клеточные органеллы и приводит к ее гибели [123, 124].

Некроптоз считается иммуногенным и сопровождается выраженным воспалительным ответом [125]. Некроптотические клетки высвобождают различные связанные с повреждением молекулярные паттерны (DAMP), что приводит к активации иммунной системы. Иммуногенность некроптотических опухолевых клеток и их роль в противоопухолевых иммунных реакциях привлекает значительный интерес в качестве альтернативной стратегии уничтожения раковых клеток [126], но надо отметить, что некроптоз сопровождается низким уровнем необходимого для запуска полноценного иммунного ответа аденозинтрифосфата (АТФ) в клетках, что считается биохимическим признаком некроптоза [127].

Было подтверждено, что некроптоз индуцируется при различных видах терапии рака [128], включая фотодинамическую терапию [129-131].

### 1.3.1.3. Ферроптоз

В 2012 г. была описана новая, железозависимая форма программируемой гибели клетки – ферроптоз [132]. Ферроптоз является одним из типов RCD, вызванной специфическими нарушениями внутриклеточного микроокружения, и характеризуется сильной активацией перекисного окисления липидов, которое зависит от образования АФК и доступности железа в клетках [133]. По морфологическим, биохимическим и генетическим особенностям ферроптоз отличается от апоптоза, аутофагии и некроза. На гибель клеток по данному пути не влияют ингибиторы каспаз или ингибиторы некроптоза [134]. Ферроптоз также может сопровождаться высвобождением иммуностимулирующих DAMP [135]. Для гибели клетки по типу ферроптоза характерны такие морфологические изменения, как сжатие клетки и уменьшение размеров митохондрий, уменьшение и даже исчезновение митохондриальных крист. Наблюдается также повышение плотности внутренних мембран митохондрий [132].

Очень важную роль в индукции ферроптоза играет глутатион (GSH), который является антиоксидантом и синтезируется из цистина, транспортируемого в клетку цистин-глутаматным антипортером (системой  $X_c^-$ ), обменивающим внеклеточный L-цистин на внутриклеточный L-глутамат. GSH способен предотвращать повреждение клеточных компонентов, вызванное АФК, свободными радикалами, пероксидами, гидропероксидами липидов (LOOH) и тяжелыми металлами, посредством обеспечения работы глутатионпероксидазы 4 (GPX4), которая катализирует восстановление LOOH за счет окисления GSH. Этот процесс предотвращает неконтролируемое перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот (PUFA, от англ. PolyUnsaturated Fatty Acids) и PUFA-содержащих мембранных фосфолипидов [136]. Следовательно, ингибирование GPX4 непосредственно или опосредованно, через ингибирование системы  $X_c^-$ , может привести к накоплению перекисей липидов и других окисленных

липидных производных, что приводит к развитию окислительного повреждения в клетках и, в конечном итоге, ферроптозу [137].

В индукции ферроптоза также имеют большое значение ионы железа. Свободные внутриклеточные ионы  $Fe^{2+}$  в ходе реакции Фентона могут из относительно стабильного пероксида водорода образовывать гидроксильные радикалы или гидропероксидные радикалы, которые инициируют реакции перекисного окисления липидов и генерируют продукты, приводящие к гибели клетки по пути ферроптоза [138]:



Известен ряд соединений, способных вызывать ферроптоз. К ним относятся эрастин, сульфасалазин и сорафениб, способные ингибировать функции системы  $X_c^-$  [139]; L-бутионинсульфоксимин (BSO), являющийся ингибитором глутамат-цистеинлигазы [140]; RSL3, DPI10 и DPI7, непосредственно ингибирующие активность GPX4 [136].

С другой стороны, ингибиторы ферроптоза также были идентифицированы. В основном это хелаторы железа, такие как дефероксамин (DFO), деферасирокс и липроксстатин-1, а также соединения, снижающие уровень АФК в клетке, например, липофильный антиоксидант тролокс, бутилгидроксианизол и синтетический антиоксидант ферростатин-1 (Fer-1) [132, 141, 142].

В последние несколько лет ферроптоз привлекает все большее внимание, поскольку он оказался эффективен в элиминации устойчивых опухолевых клеток [143, 144]. Это открывает новые возможности для повышения эффективности терапии путем сочетания терапевтических противоопухолевых препаратов с индукторами ферроптоза. Одной из таких перспективных схем противоопухолевой терапий является комбинация индукторов ферроптоза с ФС: опубликован ряд работ, показывающих возможное участие ферроптоза в гибели опухолевых клеток с использованием в качестве ФС хлорина е6 (Ce6) [145-148] и метиленового

синего [131]. Это показывает, что, включение индукторов ферроптоза в противоопухолевую терапию, в частности ФДТ, может быть весьма перспективным терапевтическим подходом.

#### **1.3.1.4. Другие типы регулируемой клеточной смерти**

В настоящее время в научной литературе опубликован ряд работ, описывающих индукцию при ФДТ других типов программируемой клеточной смерти, помимо апоптоза, некроптоза и ферроптоза.

- *Аутофагия-зависимая гибель клеток* — лизосомальный путь деградации внутриклеточных органелл и белков. Выделяют три формы аутофагии: макро-аутофагия, микро-аутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия [149].

Микро-аутофагия более специфична, чем макро-аутофагия, и может быть вызвана сигнальными молекулами, присутствующими на поверхности поврежденных органелл, таких как митохондрии или пероксисомы, что приводит к специфическому слиянию лизосом с этими органеллами.

Шаперон-опосредованная аутофагия избирательно направлена на белки, содержащие мотив KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Эти белки могут распознаваться шаперонами, такими как белок, сходный с белком теплового шока-70 (Hsc70), а затем подвергаться лизосомальной деградации [150].

Макро-аутофагия основана на образовании двухслойной мембранной везикулы (аутофагосомы), которая поглощает поврежденный материал, отделяя его от цитоплазмы, с последующим слиянием с лизосомами. При этом внутренняя мембрана аутофагосомы расщепляется, образуя аутолизосому, которая является однослойной везикулой. Аутофагический груз, заключенный в везикулу, разрушается лизосомальными гидролазами. Деградация позволяет как удалять поврежденный материал (денатурированные белки, поврежденные органеллы, микроорганизмы), так и повторно использовать переработанные питательные вещества для обеспечения нормальных клеточных процессов [149]. Образование

аутофагосом представляет собой очень сложный и регулируемый процесс, включающий многочисленные белки и сигнальные пути, такие как unc-51-подобная киназа 1 (ULK)1 и несколько белков генов, связанных с аутофагией (Atg), которые регулируются протеинкиназой mTOR и белком 1, ассоциированным с микротрубочками, легкой цепи 3 (LC3) [151].

Роль аутофагии как механизма выживания или смерти зависит от степени фотоповреждения, вызванного ФДТ. Возможность индукции аутофагии показана с использованием разных ФС, таких как синопорфирин натрия [152], вертепорфин [153], СРО, гиперидин и m-THPC [154].

- *Партанатос* представляет собой связанную с митохондриями гибель клеток, не зависящую от активности каспаз и характеризующуюся гиперактивацией специфического компонента ответа на повреждение ДНК, а именно поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (PARP1) [155].

Было подтверждено, что ФДТ может индуцировать партанатос, с использованием в качестве ФС натриевой соли мезотетраakis(4-карбоксифенил)порфирина (Na-H<sub>2</sub>TCPP) и его цинкового комплекса (Na-ZnTCPP) в эпителиальных клетках молочной железы человека MCF-10A [156].

- *Параптоз* — это тип клеточной смерти, характеризующийся появлением множества вакуолей, которые постепенно заполняют цитоплазму. Параптоз может наблюдаться после различных внешних раздражителей, включая химиотерапию [157, 158] и фотоповреждения ЭПР [153, 159].

На сегодняшний день имеется ряд исследований, показывающих, возможное участие параптоза в гибели клеток при ФДТ с использованием в качестве ФС ряда соединений, включая NРe6, вертепорфин (BPD) и гиперидин, которые локализуются в лизосомах, митохондриях и ЭПР, соответственно [159-161].

- *Иммуногенная клеточная гибель (ICD)* является всеобъемлющим термином, который включает в себя все типы гибели клеток, которые

способны активировать адаптивный иммунный ответ, специфичный против эндогенных (клеточных) или экзогенных (вирусных) антигенов, экспрессируемых умирающими клетками [162]. ICD может быть инициирована относительно ограниченным набором стимулов, включая вирусную инфекцию, некоторые химиотерапевтические средства, лучевую терапию и некоторые схемы фотодинамической терапии [162, 163].

Существуют другие виды запрограммированной клеточной смерти, такие как связанный с повышенной митохондриальной проницаемостью некроз, пироптоз, энтоз и связанная с нейтрофильными внеклеточными ловушками гибель клеток (нетоз) [85, 91]. К настоящему времени нет сведений о возможности их участия в гибели клеток при ФДТ, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

### **1.3.2. Непрямой механизм смерти клеток при ФДТ**

Помимо прямого цитотоксического эффекта при ФДТ имеют место сосудистые и иммунные механизмы противоопухолевого действия. Опухолевая сосудистая сеть является обычным путем распространения опухолевых клеток в отдаленные органы, а также способом получения питательных веществ и молекулярного кислорода, необходимых для их жизнедеятельности. В связи с этим разрушение сети сосудов, снабжающих опухоль, может привести к гипоксии тканей, недостатку питательных веществ, голоданию и гибели опухолевых клеток. С другой стороны, необходимо отметить, что повреждение сосудов при применении ФДТ может фактически ограничить эффективность терапии, так как протекание фотохимических реакций зависит от присутствия кислорода [164].

Обобщенная гипотеза о механизмах, ведущих к стазу сосудов, начинается с повреждения эндотелиальных клеток при облучении фотосенсибилизированных тканей, что приводит к появлению тромбогенных участков в просвете сосуда. Это инициирует физиологический каскад реакций, включая агрегацию тромбоцитов, высвобождение вазоактивных

молекул, адгезию лейкоцитов, увеличение проницаемости сосудов и сужение просвета сосудов. Эти эффекты в совокупности вызывают стаз кровотока [165, 166].

Было показано, что ФДТ на основе полигематопорфирина (РНР) или 5-ALA [167], вертепорфина [168], протопорфирина IX (PrIX) [169] и липосомального AlClPc (алюминий-хлор-фталоцианин) [170] индуцировала значительное снижение перфузии сосудов опухоли, вызывала полную остановку кровотока через 6 часов после применения, изменение размера целевого сосуда и закрытие опухолевых сосудов из-за образования тромба, соответственно, что способствовало гибели опухолевых клеток при применении ФДТ.

Кроме того, принципиально важной является способность противоопухолевой терапии стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, поскольку последний существенно усиливает терапевтический эффект лечения. В последние десятилетия возросло количество научных работ, доказывающих способность ФДТ индуцировать ICD и активацию иммунной системы как на доклинических моделях [68], так и в клинических исследованиях [171].

ФДТ в качестве индуктора ICD может активировать как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ против опухолевых клеток (рис. 6). Важнейшими компонентами врожденной иммунной системы являются фагоциты: макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки (ДК), поскольку они являются продуцентами различных цитокинов, хемокинов и других медиаторов, а также способны активировать иммунные клетки, участвующие в развитии адаптивного иммунного ответа. Врожденный иммунный ответ против опухолевых клеток представляет собой многостадийный процесс, включающий высвобождение цитокинов, иницирование воспалительного ответа, активацию каскада комплемента и врожденных иммунных клеток [172].

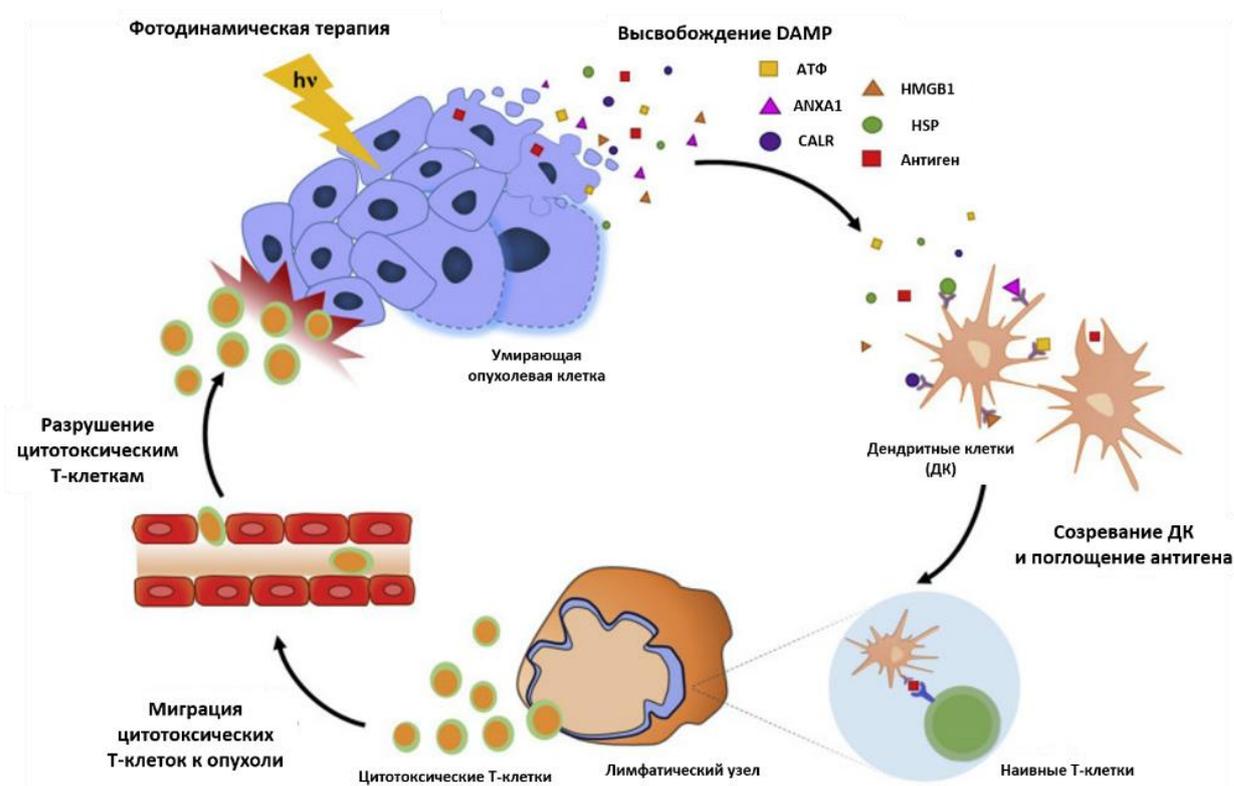


Рис. 6. Активация противоопухолевого иммунного ответа при ФДТ [3]

Фотодинамическое воздействие на опухолевую ткань вызывает окислительный стресс, приводит к изменениям в микроокружении и индуцирует выделение поврежденными/умирающими опухолевыми клетками связанных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP), таких как кальретикулин (CALR) [173], АТФ [174], белок box 1 из группы с высокой подвижностью (HMGB1) [175], интерферон (IFN) типа I [176], нуклеиновые кислоты [177] и аннексин A1 (ANXA1) [178]. Эти DAMP действуют как сигналы опасности и могут быть обнаружены клетками врожденного иммунитета путем взаимодействия с рецепторами CD91 и TLR на плазматической мембране последних. В результате наблюдается созревание иммунных клеток и наблюдается быстрая инфильтрация облученной области макрофагами, нейтрофильными гранулоцитами и ДК. Фактически, первым наблюдаемым ответом врожденного иммунитета после применения ФДТ является нейтрофилия [179]. Нейтрофилы играют важную роль в транспортировке и презентации опухолеспецифических антигенов CD4<sup>+</sup> Т-хелперам и регулировании антигенспецифического ответа [180].

Основную роль в активации адаптивного иммунитета играют дендритные клетки. Созревание ДК сопровождается морфологическими особенностями, такими как увеличение размера клеток и количества лизосом, фенотипическими особенностями, а именно высокой экспрессией на поверхности CD40, CD80, CD83, CD86 и главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II классов, а также функциональными признаками зрелости, такими как секреция IL-1 $\beta$ , усиление секреции IFN- $\gamma$  и IL-12 и способность зрелых ДК индуцировать пролиферацию Т-клеток [181, 182]. Созревание ДК является ключевой стадией, которая превращает их в профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АРС), ответственные за стимуляцию адаптивного иммунного ответа.

Созревание ДК сопровождается их миграцией в лимфатические узлы, где они презентуют опухоль-ассоциированные антигены (ТАА, от англ. Tumor Associated Antigens) Т-клеткам. Презентация антигена может инициировать активацию наивных Т-клеток, их дифференцировку в цитотоксические опухолеспецифические Т-клетки (CD8<sup>+</sup> CTL) и усиливать их пролиферацию [183]. CTL после активации непосредственно атакуют опухолевые клетки, приводя к их лизису, а также секретируют IFN- $\gamma$ . Стоит отметить, что В-клетки также участвуют в противоопухолевом иммунитете, индуцированном ФДТ. После распознавания В-клетками опухоль-ассоциированных антигенов и активации они дают начало плазматическим клеткам, продуцирующим специфические антитела против оставшихся в организме опухолевых клеток [184].

В последние годы было предпринято много попыток расширить список ФС способных индуцировать ICD и вызывать противоопухолевый иммунный ответ при применении ФДТ. Примерами таких ФС являются фотофрин [106], гиперидин [108], ацетат бенгальского розового [110], гликоконъюгированный хлорин [114], 5-ALA [111], НРРН [113] и m-ТНРС [185]. Способность ФДТ вызывать иммунный ответ против различных видов рака стимулирует исследования, направленные на использование ФДТ в качестве индуктора

ICD для создания противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток, которые в последнее время рассматриваются как перспективная форма иммунотерапии рака [186].

Таким образом, на сегодняшний день ФДТ является перспективным методом диагностики и лечения злокачественных новообразований с минимальными рисками развития неблагоприятных побочных эффектов. Сложность индуцируемых при ФДТ механизмов ответа клетки делает актуальным их дальнейшее изучение с целью создания единой картины развивающихся в клетке процессов и выяснения факторов, определяющих выбор клеткой того или иного пути гибели.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Клеточные культуры

Исследования проводились на культурах клеток эпидермоидной карциномы кожи человека A431 (ИНЦ РАН), карциномы мочевого пузыря человека T24 (НИИ вирусологии РАМН), глиомы мыши GL261 (предоставлена Университетом Гента, Бельгия). В ряде экспериментов использована полученная ранее в лаборатории стабильная линия A431-Casper3BG, экспрессирующая генетически-кодированный сенсор активации каспаз Casper3 BG (A431-Casper3 BG, Evrogen, Россия).

Клетки культивировали на питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия). При культивировании клеток GL261 к питательной среде добавляли 0,11 г/л пирувата натрия (Life Technologies, США).

По завершении периода экспоненциального роста клетки A431, T24 и A431-Casper3BG снимали с подложки раствором трипсин : ЭДТА (1:1) (ПанЭко, Россия); а клетки GL261 снимали с подложки раствором версена-трипсина (3:1), для промывки клеток использовали 10 mM фосфатно-солевой буфер (PBS). Жизнеспособность клеток поддерживали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора Shellab (Sheldon Manufacturing, США) при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Исследуемые фотосенсибилизаторы

В работе исследовали фотосенсибилизаторы, широко применяемые в настоящее время в клинической практике в России: Фотосенс<sup>®</sup> (ФГУП ГНЦ НИОПИК, Россия), который представляет собой смесь ди-, три- и тетразамещенных фракций фталоцианина алюминия с числом сульфогрупп 3,4 в дистиллированной воде (рис. 7А), и Фотодитазин<sup>®</sup> (Вета-гранд, Россия), который представляет собой бис-N-метилглюкаминовою соль хлорина еб (рис. 7Б).

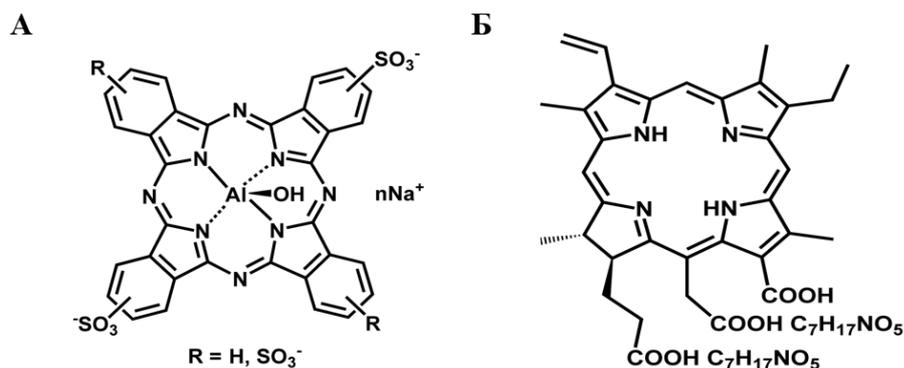


Рис. 7. Структурные формулы фотосенса (А) и фотодитазина (Б)

### 2.3. Анализ спектральных свойств фотосенсибилизаторов

При анализе спектральных свойств исследуемых фотосенсибилизаторов были получены их спектры поглощения и флуоресценции с использованием комбинированного планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek Instruments Inc., США). Измерения проводили для растворов соединений в воде, концентрация фотосенсибилизаторов составляла 5 мкМ. При регистрации спектров флуоресценции использовали возбуждение соединений в полосе Соре.

### 2.4. Исследование внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов

Для анализа внутриклеточной локализации исследуемых фотосенсибилизаторов клетки рассеивали на тонкодонные 96-луночные планшеты по  $4 \times 10^3$  клеток на лунку и инкубировали в течение ночи.

Субклеточная локализация соединений была проанализирована с использованием флуоресцентных красителей, специфичных к различным клеточным органеллам, или трансфицированных клеточных линий:

- LysoTracker Green DND-26 (Life Technologies, США) – окрашивает лизосомы;

- ER-Tracker Green (BODIPY FL glibenclamide) (Life Technologies, США) – окрашивает эндоплазматический ретикулум;
- Mitotracker Green FM (Life Technologies, США) – окрашивает митохондрии;
- BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA (Life Technologies, США) – окрашивает аппарат Гольджи;
- клеточные линии A431-HyPer-cyto и A431-HyPer-mito, производные A431, экспрессирующие флуоресцентный белок HyPer в цитоплазме или митохондриях соответственно.

Клетки инкубировали с исследуемыми фотосенсибилизаторами в концентрации 10 мкМ в течение 4-х часов при 37 °С.

За 30 минут до окончания инкубации к клеткам добавляли краситель на лизосомы, митохондрии или эндоплазматический ретикулум в концентрации 0,5 мкМ. По окончании инкубации проводили отмывку клеток путем замены среды.

В случае с красителем для аппарата Гольджи, окрашивание проводили по окончании инкубации с фотосенсибилизаторами. Заменяли среду с фотосенсибилизаторами на среду с красителем в концентрации 5 мкМ и инкубировали в течение 30 минут при температуре 4 °С. Затем производили замену среды на свежую без красителя и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37 °С.

Изображения клеток были получены на системе лазерной сканирующей микроскопии Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO (Carl Zeiss, Германия). Параметры съемки: длина волны возбуждения ( $\lambda_{ex}$ ) для красителей, специфических к различным клеточным органеллам, 488 нм, диапазон регистрации флуоресценции ( $\lambda_{em}$ ) 500–560 нм;  $\lambda_{ex}$  для фотосенса и фотодитазина 633 нм,  $\lambda_{em}$  650–735 нм.

## **2.5. Определение темновой токсичности и фотодинамической активности фотосенсибилизаторов**

Для определения темновой токсичности и фотодинамической активности исследуемых фотосенсибилизаторов использовали метод МТТ-теста [186], который применяется для измерения клеточной метаболической активности как показателя жизнеспособности клеток. Этот колориметрический анализ основан на восстановлении желтой тетразолиевого соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) до кристаллов сине-фиолетового формазана метаболически активными клетками. Водонерастворимые кристаллы формазана растворяют используя органические растворители, например, диметилсульфоксид (ДМСО), и затем методом фотометрии определяют отношение оптической плотности полученного окрашенного раствора к контролю. Оптическая плотность раствора формазана пропорциональна количеству жизнеспособных клеток [189].

Для определения световой токсичности тестируемых соединений проводили облучение культур с помощью светодиодного излучателя, адаптированного для создания равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах при прецизионном контроле температуры в ходе облучения культуры [190].

Клетки высаживали на 96-луночные культуральные планшеты в количестве  $6 \times 10^3$  на лунку и инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение суток. Затем в условиях темноты проводили замену культуральной среды на 100 мкл бессывороточной среды с исследуемыми соединениями в различных концентрациях. По истечении 4-х часового периода инкубации проводили полную замену среды с фотосенсибилизатором на полноценную ростовую среду. Использовали два режима облучения: при длине волны 615-635 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> с плотностью мощности 20 мВт/см<sup>2</sup> в течение 16 мин 40 секунд, и при длине волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> с плотностью мощности 32 мВт/см<sup>2</sup> в течение 10 мин 25 секунд. При исследовании

темновой токсичности планшеты с клетками аналогичное время выдерживали вне CO<sub>2</sub>-инкубатора в темноте.

Оценка жизнеспособности клеточной культуры осуществляли через 24 ч после облучения. В ростовую среду вносили МТТ-реагент (Alfa Aesar, Великобритания) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали клетки в течение 4 ч. Далее для растворения образовавшихся кристаллов формазана культуральную среду заменяли на 200 мкл ДМСО.

Определение оптической плотности раствора осуществляли с использованием комбинированного планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek Instruments Inc., США) на длине волны 570 нм.

Анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism (v. 6.01, GraphPad Software, Inc, США). Оценивали жизнеспособность клеток в каждой обработанной лунке планшета по отношению к контролю (клетки без добавления ФС). Полученные зависимости доза-эффект были аппроксимированы с использованием четырехпараметрической модели для логнормального распределения и дальше использованы для расчета концентрации ФС, приводящей к 50 %-му ингибированию роста клеточной культуры при выбранной дозе облучения (значения IC<sub>50</sub>, полумаксимальная ингибирующая концентрация).

## **2.6. Исследование механизмов клеточной гибели**

Для анализа и подтверждения механизма клеточной гибели при фотодинамическом воздействии фотосенса и фотодитазина, использовали комплекс взаимодополняющих подходов, описанных ниже.

### **2.6.1. Исследование скорости пермеабиллизации клеточной мембраны фотосенсибилизированных клеток**

Для анализа скорости гибели клеток при ФДТ была проведена серия экспериментов по мониторингу пермеабиллизации мембраны после краткосрочного интенсивного фотодинамического воздействия.

Использовали ФС в концентрации  $10^{-6}$  М, приводящей при облучении к ингибированию роста клеточной культуры более чем на 90% ( $IC_{>90}$ ). С этой целью тонкодонную чашку Петри с культурой предобработанных ФС клеток размещали на предметном столике микроскопа и облучение проводили через объектив. Так как используемый микроскоп (п. 2.4) укомплектован лазером с длиной волны 633 нм, был проведен пересчет доз облучения с учетом спектра поглощения используемых фотосенсибилизаторов. Итоговые рассчитанные дозы были эквивалентны дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> в диапазоне 655-675 нм, использованной в предыдущих экспериментах при проведении МТТ-теста. При этом время облучения не превышало 1 минуты. В среду инкубации был внесен йодид пропидиума (PI), проникающий только в клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны, что позволяло мониторировать динамику его проникновения в облученные клетки.

Конфокальные изображения получали через 10, 20, 40 и 60 минут после облучения. Флуоресценцию возбуждали при 633 нм и 488 нм для ФС и PI соответственно, а регистрацию флуоресценции осуществляли в диапазоне 650–735 нм и 610-640 нм для ФС и PI соответственно.

### **2.6.2. Метод ингибиторного анализа**

Для анализа механизма клеточной гибели использовали ингибиторы (Sigma-Aldrich, США), селективно блокирующие развитие апоптоза (панкаспазный ингибитор zVAD-fmk), некроптоза (ингибитор RIPK1 некростатин-1s) или ферроптоза (ловушка липидных радикалов ферростатин-1 и хелатор железа дефероксамин).

Клетки высаживали на 96-луночные культуральные планшеты в количестве  $6 \times 10^3$  на лунку и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение суток. Затем в условиях темноты проводили замену культуральной среды на 100 мкл бессывороточной среды, содержащей исследуемые соединения в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub>, и ингибиторы апоптоза (25 мкМ zVAD-fmk), некроптоза (20 мкМ некростатин-1s) или ферроптоза (1 мкМ ферростатин-1 или 10 мкМ дефероксамин), инкубировали клетки в течение 4 часов, после чего среду снова заменяли на среду без фотосенсибилизаторов, но с теми же ингибиторами. После этого культуру облучали в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> или инкубировали вне CO<sub>2</sub>-инкубатора в темноте в течение аналогичного времени.

Определение метаболической активности клеток с использованием МТТ-теста проводили по вышеописанной методике (п. 2.5) через 13 часов после облучения. Анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 6. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без обработки фотосенсибилизаторами или ингибиторами. При статистическом анализе отличий разных вариантов обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий с поправкой Бонферрони с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

### **2.6.3. Анализ экстернализации фосфатидилсерина на мембранах фотосенсибилизированных клеток**

Для определения экстернализации фосфатидилсерина на наружный слой клеточной мембраны при ответе клеток на фотодинамическое воздействие использовали метод проточной цитометрии с окраской клеток фосфатидилсерин-связывающим белком аннексином V, конъюгированным с флуоресцентным красителем FITC (AnxV-FITC), и йодидом пропидиума (PI), проникающим только в клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны. Экспонирование фосфатидилсерина на наружный слой мембраны долгое время считалось уникальной особенностью апоптотических клеток.

Однако, в последнее время, было показано экспонирование фосфатидилсерина при неапоптотических формах регулируемой гибели клеток, таких как некроптоз [191, 192].

Клетки A431 высаживали на 6-луночные культуральные планшеты в количестве  $4 \times 10^5$  на лунку и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение суток. Затем культуральную среду в лунках заменяли на свежую бессывороточную, содержащую исследуемые соединения в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub>, и клетки инкубировали в течение 4 часов. После этого среду снова заменяли на обычную ростовую среду, культуру облучали при длине волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> и инкубировали в течение 13 часов при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. После окончания инкубации клетки снимали с подложки и окрашивали AnxV-FITC и PI с помощью набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ образцов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра-сортера FACS Aria III (BD, США). Флуоресценцию FITC и PI возбуждали лазером с длиной волны 488 нм. Регистрацию флуоресценции осуществляли в диапазоне 515–545 нм и 564–606 нм для FITC и PI соответственно.

В соответствии с окраской выделяли популяции клеток, соответствующие типам и стадиям гибели: живые клетки (Anx<sup>-</sup>, PI<sup>-</sup>), мёртвые (Anx<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>) и (Anx<sup>-</sup>, PI<sup>+</sup>), а также клеток на стадии раннего апоптоза и некроптоза (Anx<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>).

#### **2.6.4. Визуализация активности каспазы 3 в клетках**

Для специфического подтверждения участия апоптоза в гибели клеток при фотодинамическом воздействии визуализировали предполагаемую активацию каспазы 3 с использованием линии клеток A431-Casper3 BG, экспрессирующей генетически-кодированный каспаза-чувствительный сенсор Casper3 BG.

Принцип работы сенсора основан на физическом явлении флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET, от англ. Förster resonance energy transfer), который осуществляется между флуоресцентными белками сенсора 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.

Клетки A431-Casper3 BG высаживали на тонкодонные 96-луночные культуральные планшеты в количестве  $6 \times 10^3$  на лунку и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение суток. Затем культуральную среду в лунках заменяли на свежую бессывороточную среду, содержащую исследуемые соединения в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub>, и клетки инкубировали в течение 4 часов. После этого среду снова заменяли на обычную ростовую среду, культуру облучали при длине волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. Также анализировали влияние на клетки облучения в отсутствие фотосенсибилизаторов в среде.

Конфокальные изображения получали через 13 часов после фотодинамического воздействия. Флуоресценция донорной части и акцепторной части Casper3 BG возбуждали при 405 нм, а регистрацию флуоресценции осуществляли в диапазоне 430-470 нм и 490-530 нм для донорной части и акцепторной части Casper3 BG соответственно.

Распределение клеток по типу ответа сенсора Casper3 BG (наличие или отсутствие активации, исчезновение сигнала) после обработки фотосенсом и фотодитазином рассчитывали на основании анализа 25 полей зрения, обсчет проводили для 300-400 клеток для каждого варианта обработки.

## 2.6.5. Анализ активации перекисного окисления липидов

Для подтверждения возможности участия ферроптоза в гибели клеток проведено исследование активации перекисного окисления липидов при фотодинамическом воздействии с ратиометрическим флуоресцентным зондом Bodipy<sup>TM</sup> 581/591 C11 (Invitrogen, США). При окислении ненасыщенного углеводородного хвоста данного зонда изменяется соотношение интенсивности его флуоресценции в зеленой и красной области спектра.

Клетки высаживали на 6-луночные культуральные планшеты в количестве  $4 \times 10^5$  на лунку и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение суток. Затем культуральную среду в лунках заменяли на свежую бессывороточную, содержащую исследуемые соединения в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub>, и клетки инкубировали в течение 4 часов. После этого среду снова заменяли на обычную ростовую среду, культуру облучали при длине волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> и инкубировали в течение 13 часов при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. После окончания инкубации культуры культуральную среду в лунках заменяли на свежую бессывороточную, содержащую Bodipy<sup>TM</sup> 581/591 C11 в концентрации 2,5 мкМ, и инкубировали клетки в течение 1 час при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Затем чего клетки снимали с подложки и центрифугировали при 1000 оборотах/мин в течение 5 минут. Осадок клеток ресуспендировали в 2 мл PBS для промывки клеток. Далее клетки осаждали центрифугированием в том же режиме, после чего осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS.

Анализ образцов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра-сортера FACS Aria III (BD, США). Флуоресценцию Bodipy<sup>TM</sup> 581/591 C11 регистрировали в двух каналах: при возбуждении на 488 нм и регистрации сигнала в диапазоне 510–545 нм, а также при возбуждении на 561 нм и регистрации в диапазоне 590–620 нм. На основании полученных средних значений интенсивности сигналов в каждом из каналов рассчитывали их соотношение ( $I_{530}/I_{610}$ ). Значение показателя

I<sub>530</sub>/I<sub>610</sub> в контроле без обработки фотосенсибилизаторами принимали за 100%.

Анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 6. При статистическом анализе отличий разных вариантов обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий с поправкой Бонферрони с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

### **2.6.6. Анализ фосфорилирования MLKL**

Для специфического подтверждения участия некроптоза в гибели клеток при фотодинамическом воздействии использовали метод вестерн-блота с детектированием присутствия фосфорилированной формы киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (pMLKL) в клеточных лизатах.

#### **2.6.6.1. Получение клеточных лизатов и определение количества белка**

Клетки высаживали на 6-луночные культуральные планшеты в количестве  $4 \times 10^5$  на лунку и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение суток. Затем культуральную среду в лунках заменяли на свежую бессывороточную, содержащую исследуемые соединения в концентрациях, соответствующих IC<sub>50</sub>, и клетки инкубировали в течение 4 часов. После этого среду снова заменяли на обычную ростовую среду, культуру облучали при длине волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> и инкубировали в течение 13 часов при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. После окончания инкубации культуры клетки снимали с подложки лизирующим буфером (0,5% NP-40, 0,5% Triton X-100, 50 мМ Трис-HCL pH 7,5, 150 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА и cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail по 1 таблетке на 10 мл буфера) и инкубировали на льду в течение 30 минут. После этого определяли концентрацию общего белка в пробах с использованием Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific,

США) в соответствии с инструкцией производителя. Для электрофореза использовали пробы в объеме, содержащем 20 мкг белка.

#### **2.6.6.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле и перенос белков на мембрану**

Для нанесения на электрофорез пробы клеточных лизатов разбавляли в соотношении 4:1 пятикратным буфером для образцов (250 мМ Трис-НСl pH 6,8, 10% додецилсульфат натрия (SDS, от англ. sodium dodecyl sulfates), 0,5% бромфеноловый синий, 50% глицерол и 20% β-меркаптоэтанол) и нагревали 20 минут при 99 °С.

В качестве маркера молекулярной массы использовали маркер PageRuler (Thermo Scientific, США) с молекулярной массой рекомбинантных белков от 10 до 180 кД. Для разделения белков использовали 8% полиакриламидные разделяющие гели. В качестве электродного буфера использовали 192 мМ трис и 25 мМ глицин, pH 8,3, и 0,1% SDS. При проведении электрофореза использовали источник питания PowerPac Basic, при постоянном напряжении 250 В в течение 40 минут (Bio-Rad, США).

Перенос белков из полиакриламидного геля на Immobilon®-P PVDF мембрану с размером пор 0,45 мкм (Merck, Германия) проводили с использованием системы блоттинга Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, США) при силе тока 2,5 А и постоянном напряжении 25 В в течение 7 минут. В качестве электродного буфера для блота использовали 192 мМ трис и 25 мМ глицин, pH 8,3, и 20% этанол. После переноса мембрану отмывали в течение 5 минут раствором TBS (20 мМ Трис и 150 мМ NaCl), pH 7,5.

#### **2.6.6.3. Блокировка, окраска и визуализация белков**

Для блокировки неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в течение 3 часа в буфере TBS, содержащем 5% обезжиренного сухого молока. Затем заблокированную мембрану помещали

в раствор первичных антител, разведенных в блокировочном растворе, и инкубировали на шейкере при 4 °С в течение ночи. В качестве первичных антител использовали: поликлональные антитела кролика против С-конца MLKL ab172868 (1:1000, Abcam, Великобритания); моноклональные антитела кролика против MLKL (фосфо S345) ab196436 (pMLKL) (1:1000, Abcam, Великобритания) и поликлональные антитела кролика против бета тубулина (1:1000, Abcam, Великобритания) для нормировки загрузки блотов. Избыток антител отмывали 2 раза по 10 минут в буфере TBS с добавлением 0,05% Tween 20 и затем один раз 10 минут в буфере TBS. После этого мембрану инкубировали с вторичным антителом (антитела осла против кроличьих IgG, 1:4000, GE Healthcare, Великобритания) в блокировочном растворе при комнатной температуре в течение 1 часа. Избыток вторичных антител также отмывали в описанном режиме.

Для визуализации использовали хемолюминесцентный субстрат Clarity Max™ Western ECL (Bio-Rad, США), люминесценцию регистрировали при помощи прибора ChemiDoc™ (Bio-Rad, США).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Фотофизические свойства исследуемых фотосенсибилизаторов

Оба исследуемых соединения показали наличие в спектре поглощения максимумов в коротковолновой области спектра (350-400 нм), известной как полоса Sore, и в длинноволновой (красной) области спектра, известной как Q-полоса (рис. 8, таблица 2).

Фталоцианин фотосенс демонстрирует преобладанием длинноволновой Q-полосы на длине волны 678 нм. Коэффициент молярной экстинкции ( $\epsilon$ ) в этой области спектра составил  $3 \times 10^5$  л $\times$ моль $^{-1} \times$ см $^{-1}$  (таблица 2).

Фотодитазин, относящийся к производным хлорина, характеризуется преобладанием коротковолновой полосы Sore на длине волны 404 нм и имеет слабую линию поглощения на длине волны 643 нм, что типично для этой группы красителей [193]. Коэффициенты молярной экстинкции составили  $3 \times 10^5$  л $\times$ моль $^{-1} \times$ см $^{-1}$  и  $4,6 \times 10^4$  л $\times$ моль $^{-1} \times$ см $^{-1}$  соответственно (таблица 2).

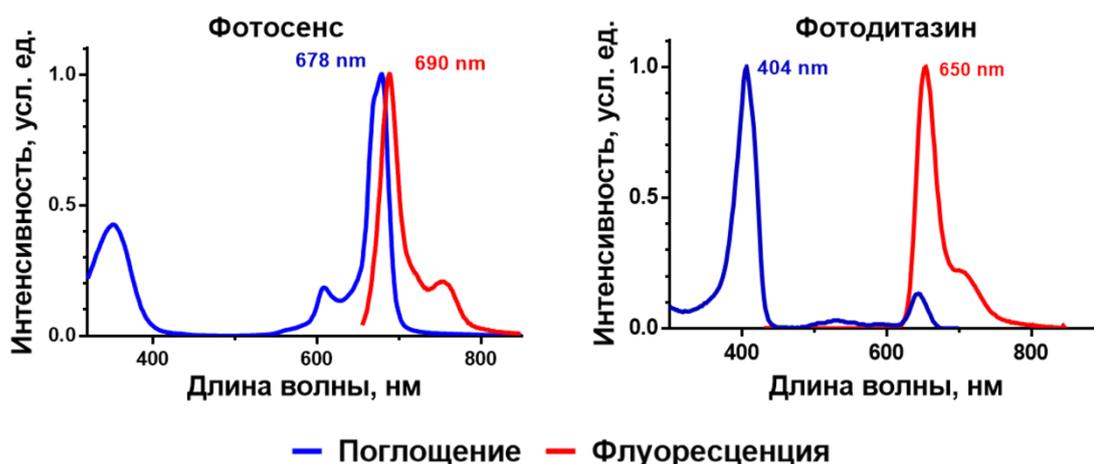


Рис. 8. Спектры поглощения и флуоресценции исследуемых фотосенсибилизаторов

Флуоресценция фотосенса и фотодитазина в водном растворе зарегистрирована на длине волны 690 и 650 нм соответственно (рис. 8).

Спектральные свойства исследуемых фотосенсибилизаторов

ФС	Максимум поглощения, нм		$\epsilon$ , л×моль <sup>-1</sup> ×см <sup>-1</sup>	Максимум флуоресценции, нм
	Коротковолновая область спектра	Красная область спектра		
Фотосенс	350	678	$3 \times 10^5$	690
Фотодитазин	404	643	$4,6 \times 10^4$	650

По данным литературы, исследуемые соединения характеризуются высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода ( $\phi_{\Delta}$ ). Было показано, что  $\phi_{\Delta}$  составляет 0.42 для фотосенса [194] и 0.56 для фотодитазина [195]. Квантовый выход флуоресценции  $\phi_F$  фталоцианиновых и хлориновых соединений существенно отличается. Если, величина  $\phi_F$  тетрасульфоната фталоцианина алюминия (AlPcS4) составляет 0,56 в растворе диметилформамида [196], 0,51 в этаноле и 0,37 в PBS [197], то в случае хлорина еб (себ)  $\phi_F$  составляет 0.18 в биологическом растворе (рН=7.4) [198] и 0.77 в этаноле [199].

### 3.2. Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов

Различие в молекулярной структуре фотосенсибилизаторов определяет их особые биологические свойства, а именно, внутриклеточную локализацию и фотодинамическую активность. Локализация исследуемых фотосенсибилизаторов была исследована на клетках эпидермоидной карциномы человека A431 и глиомы мыши GL261.

Показано, что локализация фотосенса и фотодитазина существенно отличается. Для определения областей преимущественного накопления фотосенсибилизаторов был проведен анализ солокализации флуоресцентных сигналов ФС с сигналом красителей, специфически окрашивающих

различные клеточные органеллы, такие как лизосомы, ЭПР, митохондрии и аппарат Гольджи, или с сигналом флуоресцентного белка NuPer, экспрессирующего в цитоплазме или митохондриях трансфицированных клеточных линий, производных линии A431.

Для обеих исследованных клеточных линий получены аналогичные результаты. Показано, что основным местом локализации фотосенса в клетках являются лизосомы и другие везикулы, предположительно эндосомы. В таких органеллах как митохондрии, ЭПР, аппарат Гольджи и цитоплазма клеток его присутствие практически не зарегистрировано (рис. 9А). Для фотодитазина была зарегистрирована локализация в клеточных мембранных структурах, таких как ЭПР и аппарат Гольджи (рис. 9Б).

Разница в распределении соответствует физико-химическим свойствам выбранных соединений. Так, установленная локализация фотодитазина согласуется с его свойствами амфифильного соединения с асимметричной полярностью и показанной ранее способностью проникать через липидный бислой плазматической мембраны с последующим перераспределением в мембранах органелл [200, 201]. Напротив, фотосенс является анионным гидрофильным соединением; ранее в ряде работ также показана локализация его аналога сульфированного фталоцианина алюминия AlPcS2a [202] и самого фотосенса [203] в основном во внутриклеточных везикулах, а именно в лизосомах клеток.

Предполагается, что внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора является одним из ключевых факторов, определяющих клеточный ответ на фотоповреждение, судьбу клетки и, в случае её гибели, тип развивающейся клеточной смерти [4]. В настоящее время фотосенсибилизаторы, которые преимущественно локализуются в ЭПР, имеют особое значение для ФДТ, так как они могут индуцировать так называемый ЭПР-стресс и дают возможность развития иммуногенной клеточной гибели. В последнем случае происходит активация противоопухолевого иммунитета через сигнальный механизм опасности,

вызванный активацией/выбросом DAMP [68], что улучшает эффективности ФДТ в элиминации опухолевых клеток.

Таким образом, подтвержденные различия в характере распределения фотосенсибилизаторов в клетке позволяют сравнивать ответ клеток на фотодинамическое воздействие при первичном повреждении разных компартментов.

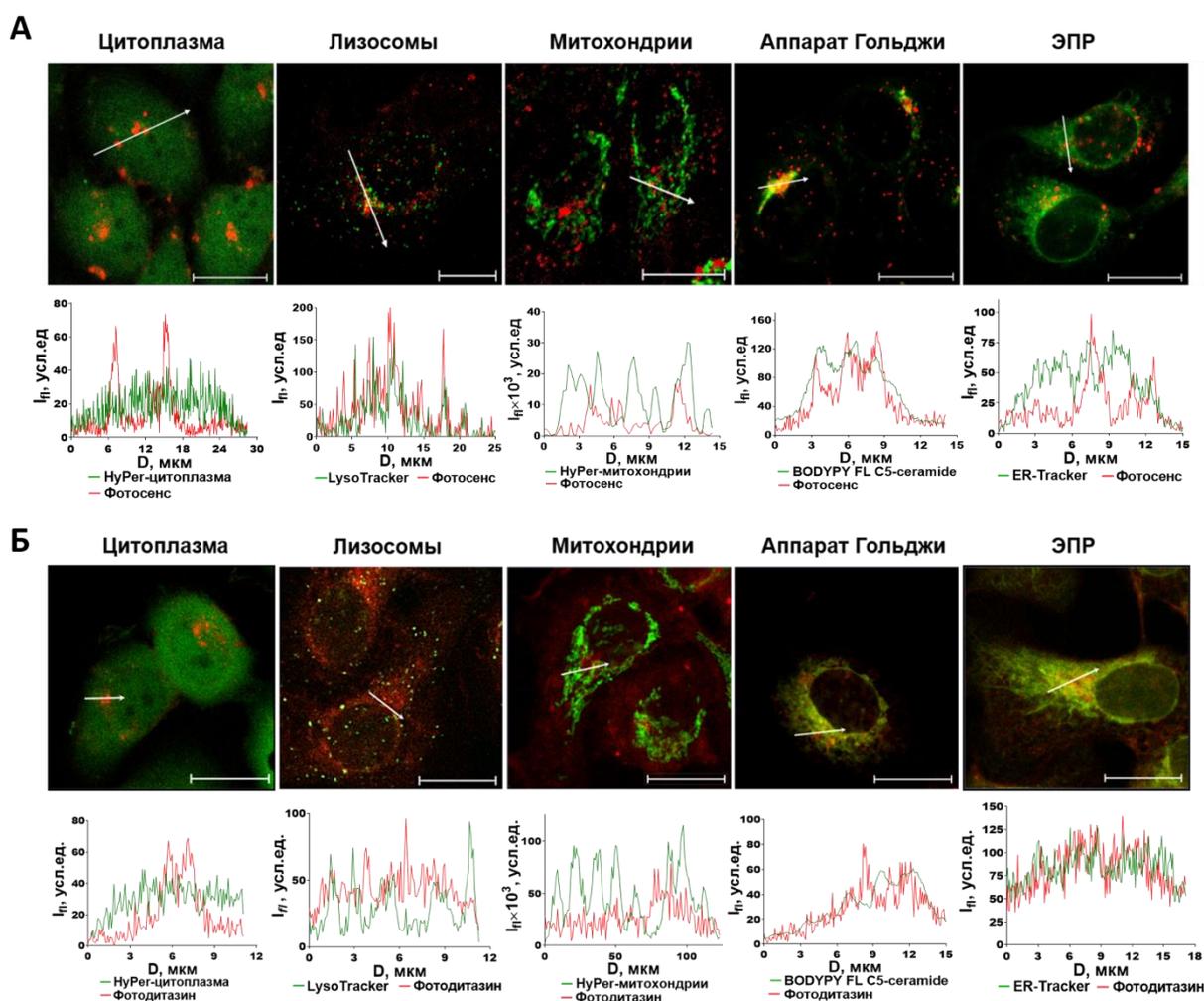


Рис. 9. Внутриклеточная локализация фотосенса (А) и фотодитазина (Б) в клетках А431. Для сококализационного анализа окрашены цитоплазма клеток (белок НyPer), лизосомы (LysoTracker Green), митохондрии (белок НyPer с органелло-специфичной экспрессией), аппарат Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide), ЭПР (ER-Tracker). 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.  $I_f$  – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

### **3.3. Темновая токсичность и фотодинамическая активность фотосенсибилизаторов**

Для исследуемых соединений была проанализирована возможность 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<sup>2</sup>. Анализ цитотоксичности проводился через 24 часа после облучения методом МТТ-теста.

Фотодинамическая активность фотосенса и фотодитазина была проанализирована в отношении клеток линий А431, Т24 и глиомы мыши GL261 (рис. 10 и таблица 3).

Инкубация клеток А431 и Т24 в темноте не выявила негативного действия фотосенса в концентрациях до 50 мкМ. В случае фотодитазина отмечено более высокое токсическое действие в отношении А431, при этом инкубация с данным соединением в концентрациях, превышающих 5 мкМ, приводила к снижению жизнеспособности культуры.

Клетки линий А431 и Т24 показали схожие дозозависимые ответы на фотодинамическое воздействие фотосенсибилизаторов. Облучение с длиной волны 655-675 нм в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> приводило к гибели клеток при концентрациях более 70 нМ и 100 нМ для фотосенса и фотодитазина, соответственно (рис. 10). Значения IC<sub>50</sub>, соответствующие концентрации ФС, приводящей к 50% ингибированию роста клеточной культуры, представлены в таблице 3.

Фотодинамическая активность фотосенса и фотодитазина была также проанализирована в отношении клеток глиомы мыши GL261. Инкубация в темноте с данными соединениями в концентрациях, превышающих 10 мкМ, приводила к заметному снижению жизнеспособности культуры. В случае клеток GL261 было использовано облучение при длине волны 615-635 нм, также в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>, которое приводило к гибели клеток при концентрациях ФС, не превышающих 1 мкМ (рис. 10, таблица 3).

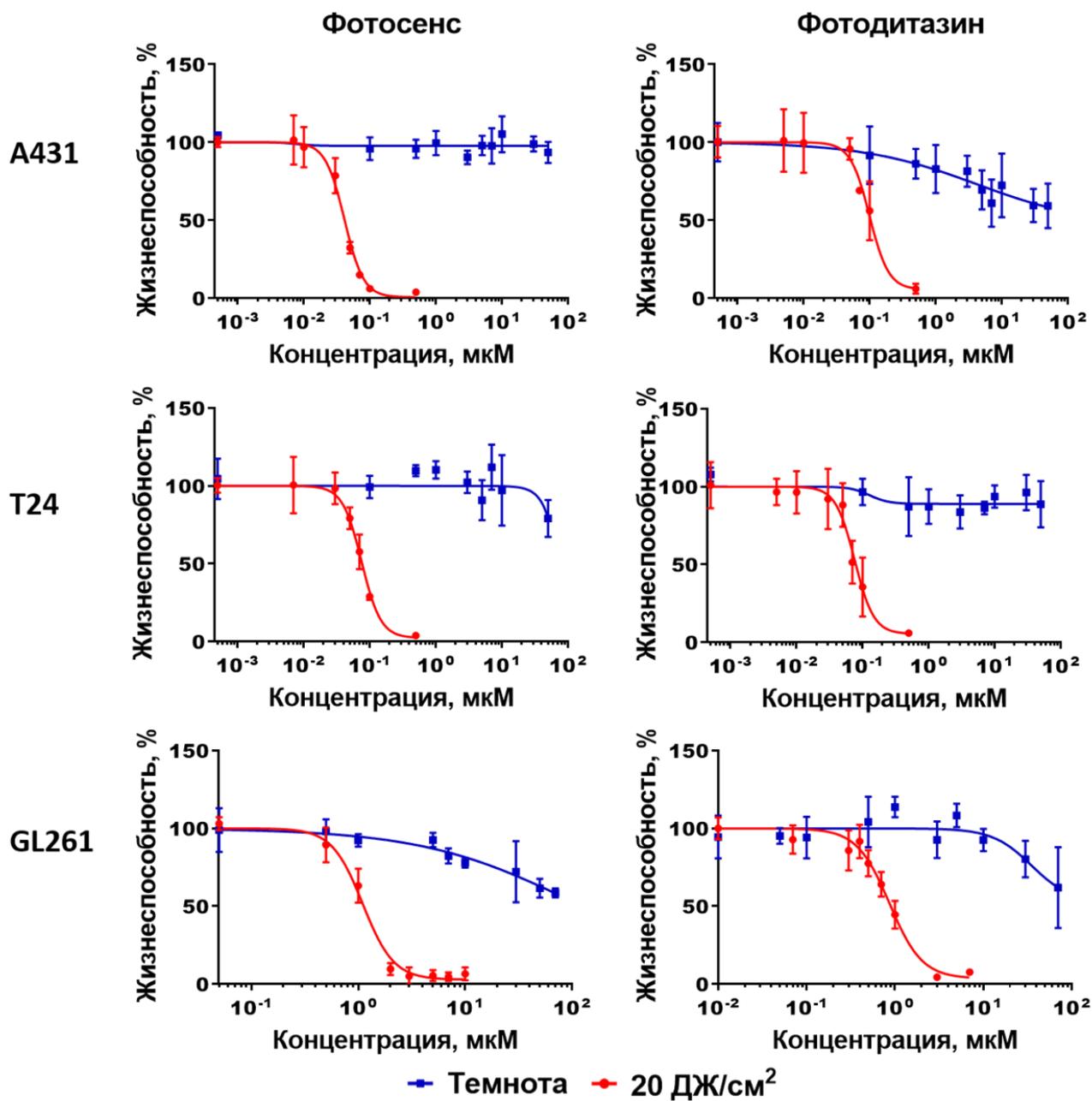


Рис. 10. Эффективность индукции клеточной смерти на культурах клеток A431, T24 и GL261 в зависимости от концентрации ФС в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. Показаны типичные зависимости из 3-5 независимых экспериментов. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n=3)

Таблица 3

Значения  $IC_{50}$  для исследуемых фотосенсибилизаторов при облучении в дозе  $20 \text{ Дж/см}^2$  в отношении линий опухолевых клеток разного происхождения

Фотосенсибилизатор	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)

<sup>1</sup> – для расчета  $IC_{50}$  использована модель логнормального распределения, указаны средние значения и границы 95% доверительного интервала

Необходимо отметить, что фотоиндуцированная токсичность существенно зависит от типа опухолевых клеток, дозы облучения и спектральных характеристик используемого источника света. Результаты других исследователей по фотодинамической активности фотосенсибилизаторов демонстрируют, что инкубация клеток A431 в темноте с AlPcS4 показывает небольшое снижение выживаемости клеток при концентрациях более 100 мкМ, тогда как при облучении доза, приводящая к смерти 50% клеточной культуры, составляет более 1 мкМ [204]. Кроме того, индуцированное фотосенсом (10 мкг/мл) подавление жизнеспособности в клетках T24 на 50% выявлено после облучения дозой  $4\text{-}5 \text{ Дж/см}^2$  [203]. В случае фотодитазина для клеток T24 проявилась темновая цитотоксичность при высокой концентрации ( $IC_{50}=10^{-4,5}$  моль/л), тогда как  $IC_{50}$  при облучении составляет  $10^{-6,3}$  моль/л [205].

### **3.4. Анализ механизмов клеточной гибели**

#### **3.4.1. Морфологические особенности фотосенсибилизированных клеток и скорость пермеабиллизации клеточной мембраны**

С целью проверки вероятности участия регулируемых типов гибели клеток при фотодинамическом воздействии исследуемых фотосенсибилизаторов на первом этапе был проведен анализ скорости гибели опухолевых клеток. Была проведена серия экспериментов по мониторингу пермеабиллизации мембраны клеток A431 и T24 после краткосрочного интенсивного фотодинамического воздействия. В данном эксперименте были использованы концентрации ФС, приводящие к гибели более 90% клеток ( $10^{-6}$  М).

В среду инкубации был внесен йодид пропидиума (PI), проникающий только в клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны, что позволяло мониторировать динамику его проникновения в клетки при облучении.

Облучение фотосенсибилизированных клеток в экстремальных дозах приводило к появлению выраженных морфологических изменений даже в течение очень короткого интервала времени, при этом необходимо отметить различие в морфологии клеток при действии фотосенса и фотодитазина, показанное для всех исследованных линий, A431, T24 и GL261 (рис. 11). В случае фотосенса наблюдается сжатие 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.

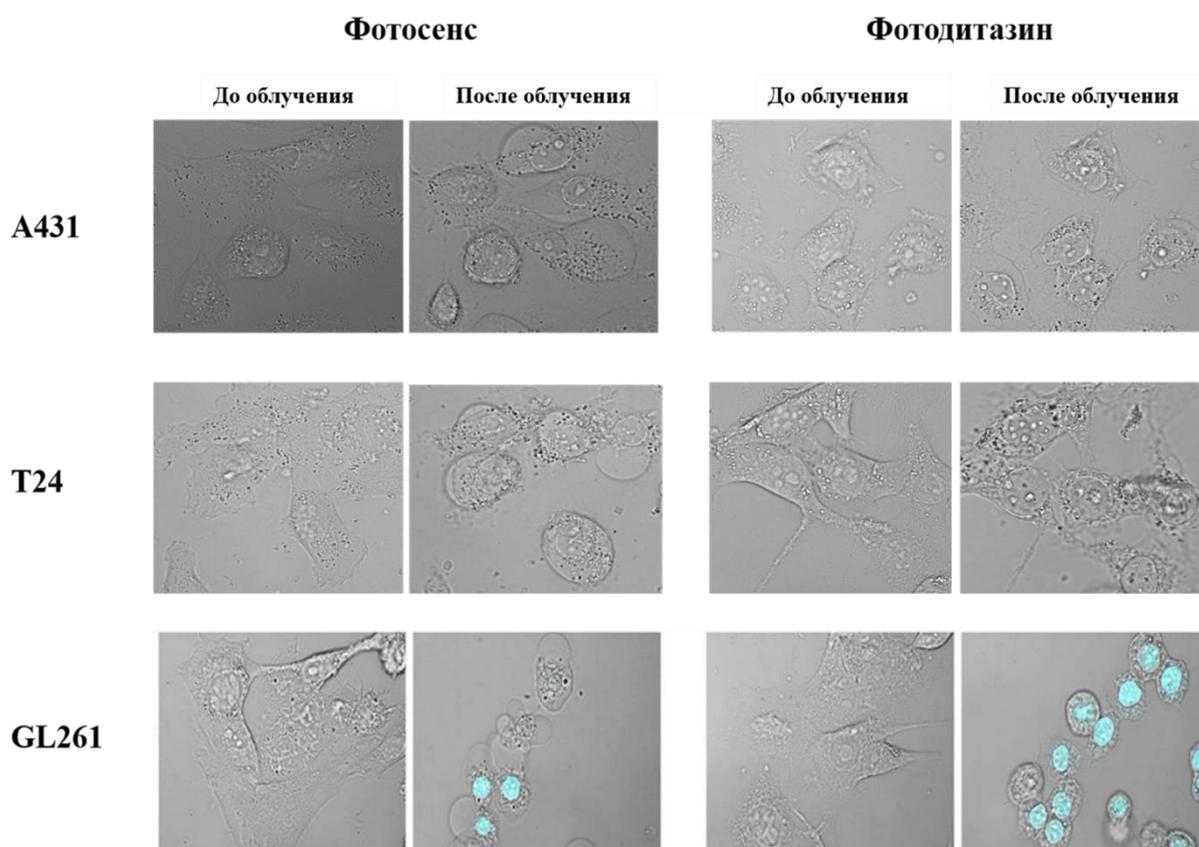


Рис. 11. Морфология клеток A431, T24 и GL261, предобработанных фотосенсом и фотодитазинном и облученных в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. В случае GL261 в среде инкубации присутствует PI (показан голубым), проникающий в мертвые клетки. Размер кадра 50×50 мкм

Показано, что ответ клеток на фотодинамическое воздействие с исследуемыми фотосенсибилизаторами принципиально различался по динамике пермеабиллизации мембраны (рис. 12-16). 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, около 60% общего количества клеток (рис. 12, 14, 15).

В то же время, при использовании фотодитазина потеря целостности мембраны наблюдалось 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. 13, 14, 16).

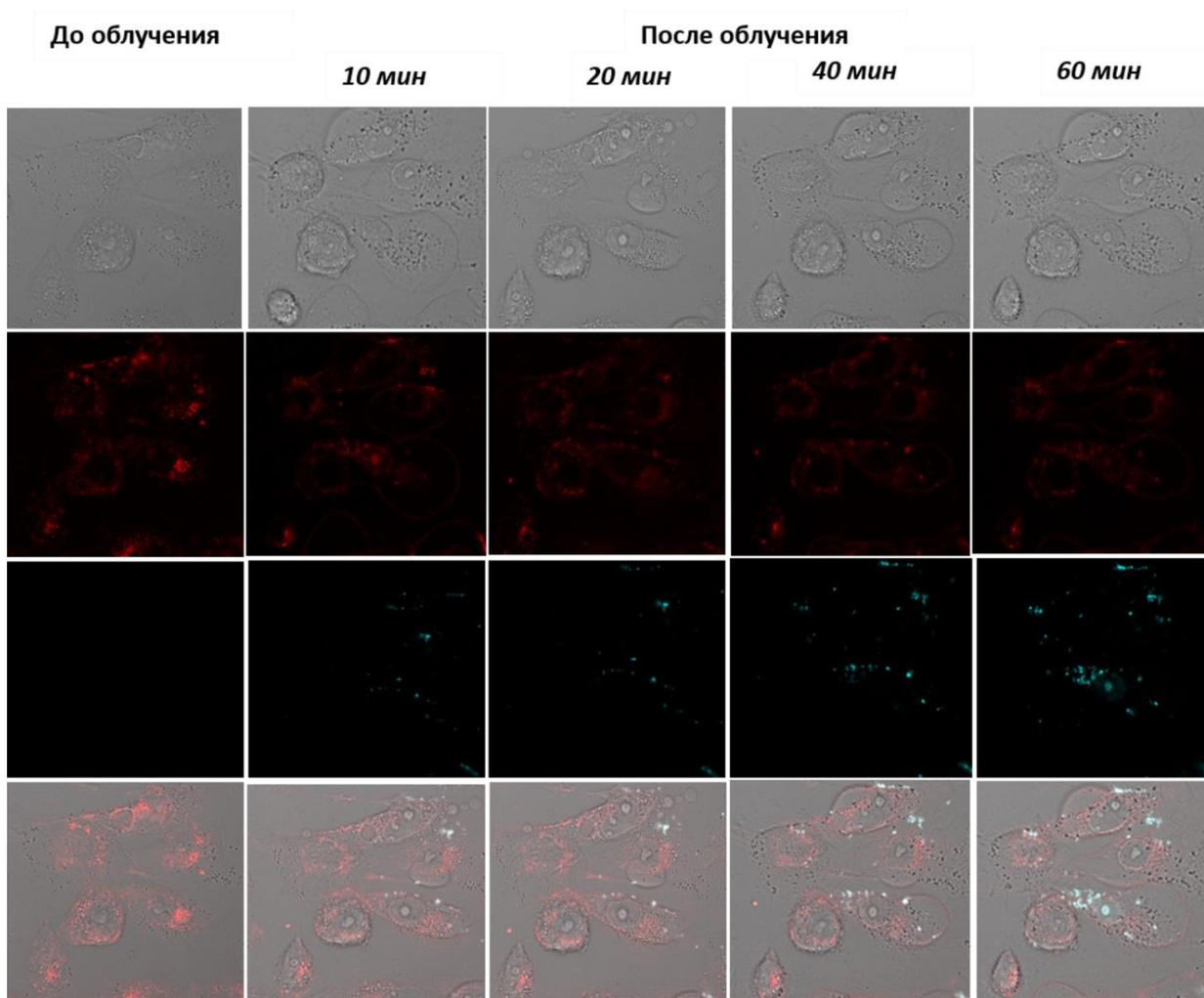


Рис. 12. Анализ скорости пермеабилзации мембраны клеток A431, предобработанных фотосенсом в концентрации  $10^{-6}$  М и облученных в дозе  $20 \text{ Дж/см}^2$ . В среде инкубации присутствует PI, проникающий в клетки в случае нарушения целостности плазматической мембраны. Показаны изображения клеток в проходящем свете, флуоресценция фотосенса ( $\lambda_{\text{ex}}$  633 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  650–735 нм, красный), флуоресценция PI ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  610–640 нм, голубой) и их наложение. Размер кадра  $50 \times 50 \text{ мкм}$

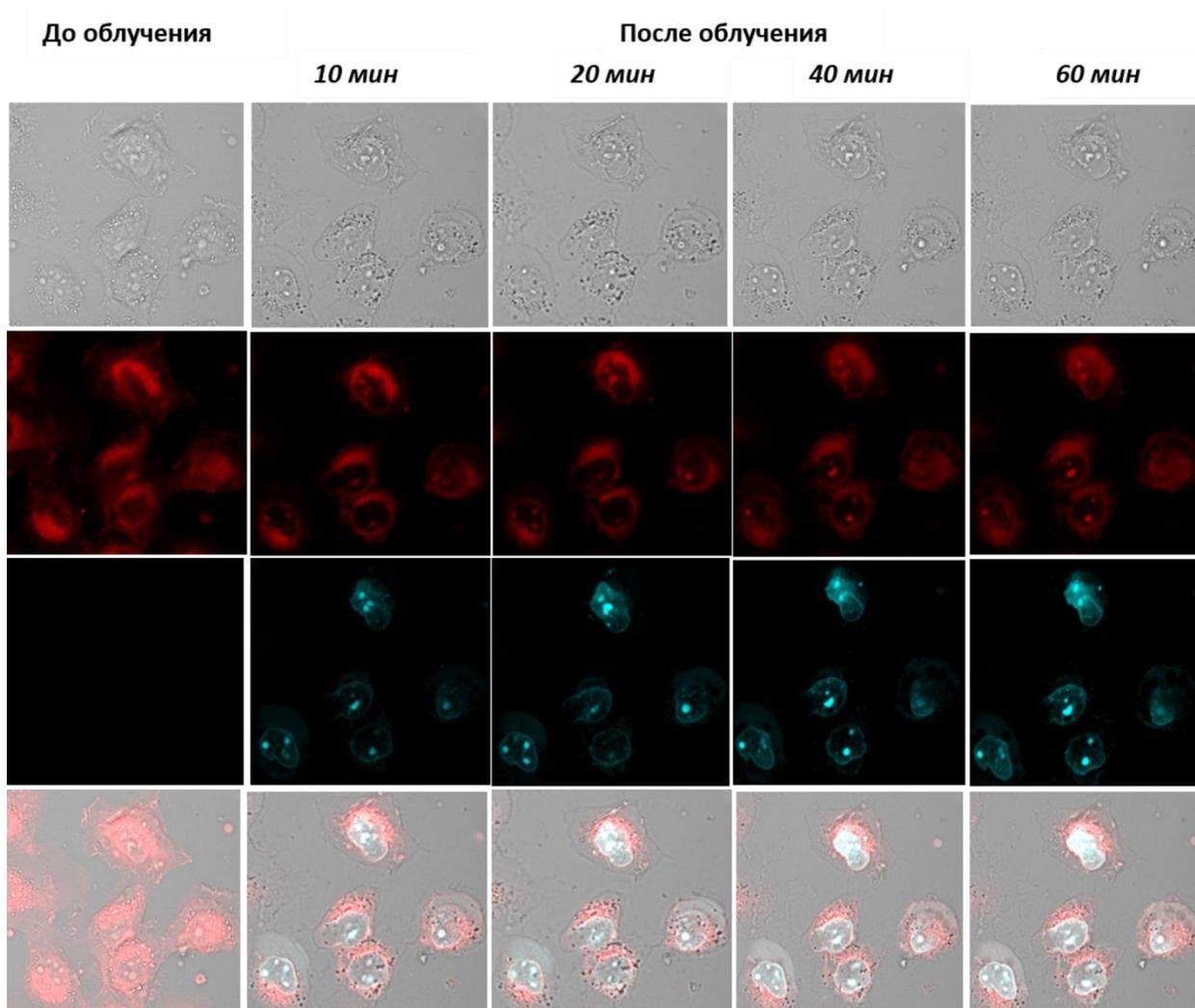


Рис. 13. Анализ скорости пермеабилзации мембраны клеток A431, предобработанных фотодитазинем в концентрации  $10^{-6}$  М и облученных в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. В среде инкубации присутствует PI, проникающий в клетки в случае нарушения целостности плазматической мембраны. Показаны изображения клеток в проходящем свете, флуоресценция фотодитазина ( $\lambda_{ex}$  633 нм,  $\lambda_{em}$  650–735 нм, красный), флуоресценция PI ( $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  610–640 нм, голубой) и их наложение. Размер кадра 50×50 мкм

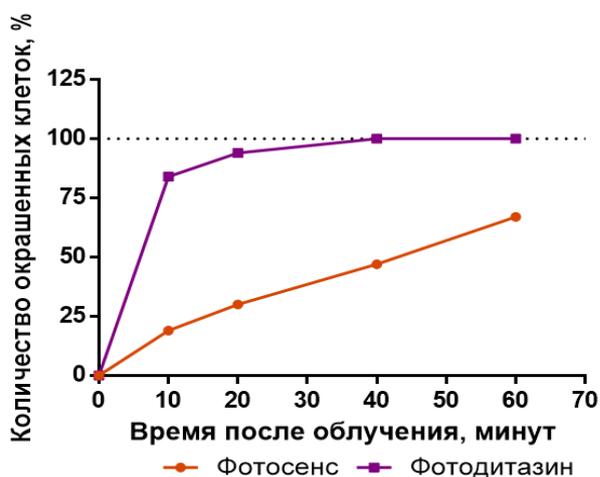


Рис. 14. Доля клеток A431 с нарушенной целостностью мембраны через различное время после фотодинамического воздействия с фотосенсом и фотодитазинем ( $10^{-6}$  М, 20 Дж/см<sup>2</sup>); n=40 для каждого варианта обработки

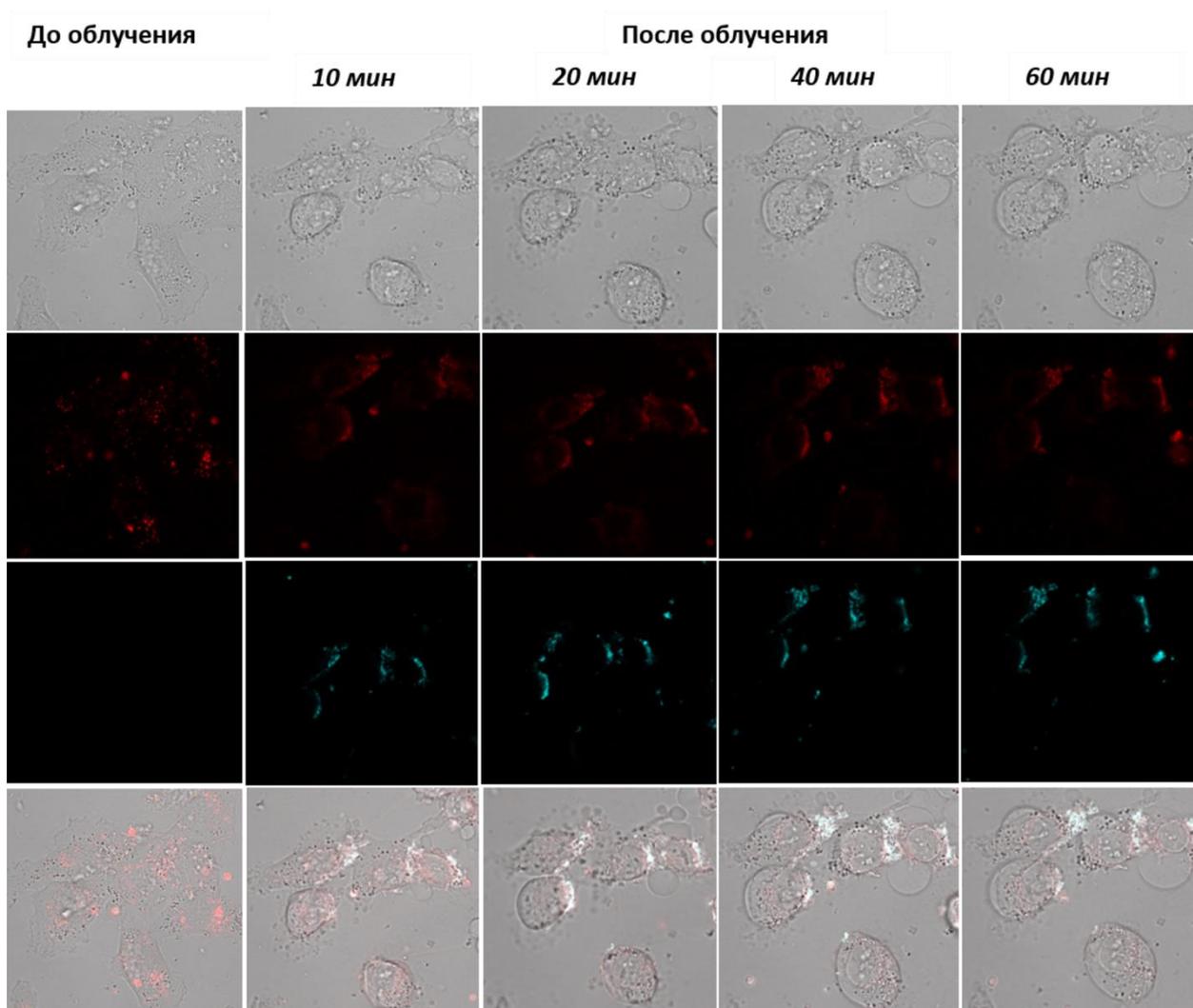


Рис. 15. Анализ скорости пермеабиллизации мембраны клеток T24, предобработанных фотосенсом в концентрации  $10^{-6}$  М и облученных в дозе  $20 \text{ Дж/см}^2$ . В среде инкубации присутствует PI, проникающий в клетки в случае нарушения целостности плазматической мембраны. Показаны изображения клеток в проходящем свете, флуоресценция фотосенса ( $\lambda_{\text{ex}}$  633 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  650–735 нм, красный), флуоресценция PI ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  610-640 нм, голубой) и их наложение. Размер кадра  $50 \times 50 \text{ мкм}$

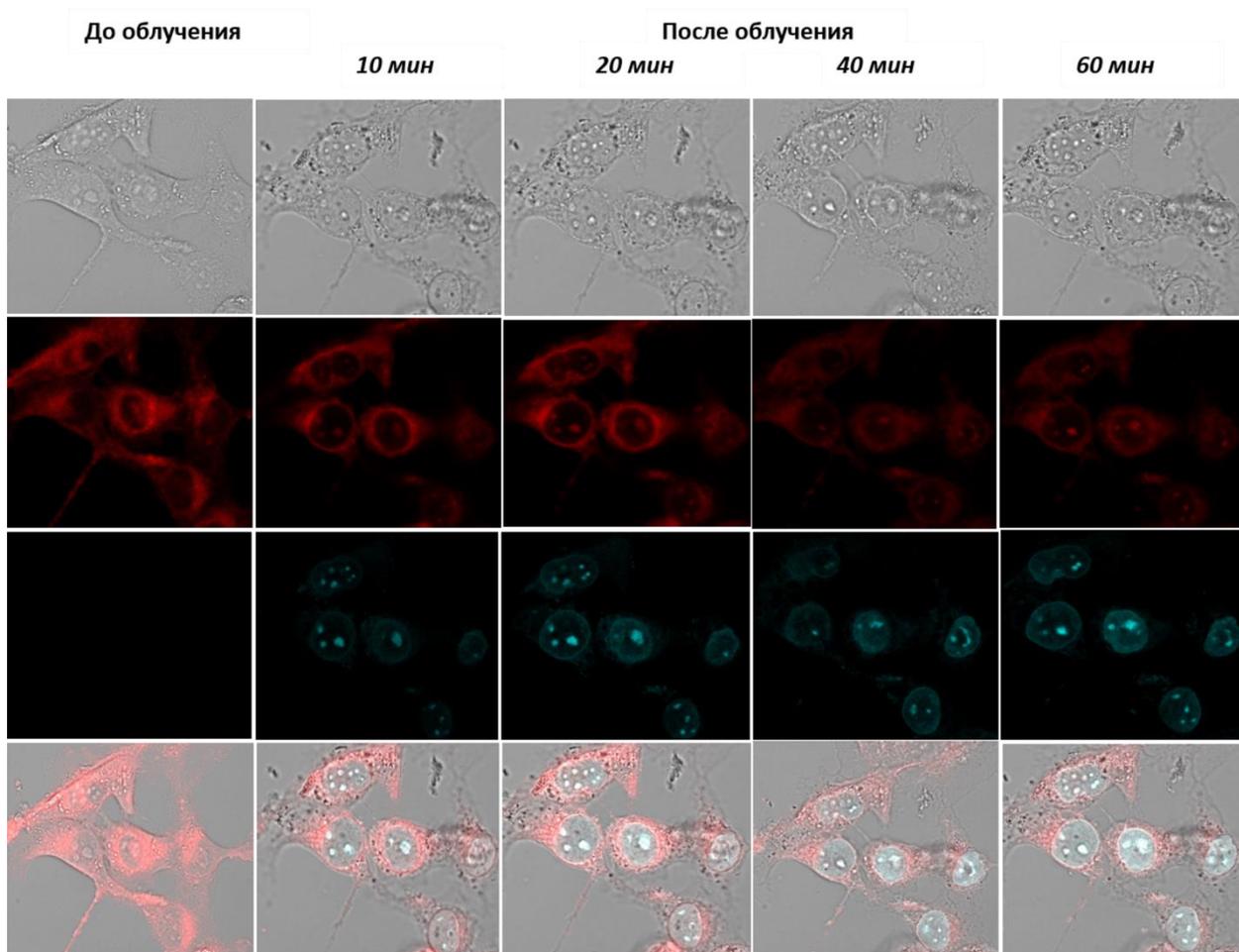


Рис. 16. Анализ скорости пермеабиллизации мембраны клеток T24, предобработанных фотодитазином в концентрации  $10^{-6}$  М и облученных в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. В среде инкубации присутствует PI, проникающий в клетки в случае нарушения целостности плазматической мембраны. Показаны изображения клеток в проходящем свете, флуоресценция фотодитазина ( $\lambda_{ex}$  633 нм,  $\lambda_{em}$  650–735 нм, красный), флуоресценция PI ( $\lambda_{ex}$  488 нм,  $\lambda_{em}$  610-640 нм, голубой) и их наложение. Размер кадра 50×50 мкм

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. Очевидно, что тип гибели будет зависеть от интенсивности воздействия. Если при очень интенсивных воздействиях, приводящих к гибели подавляющего большинства клеток культуры, стоит ожидать нерегулируемой смерти (нерегулируемый некроз) [206], то при более слабых воздействиях может существенно возрасти вклад различных видов регулируемой клеточной смерти. В связи с этим в последующей работе нами были использованы концентрация фотосенсибилизатора и режим облучения, приводящие к гибели 50% клеток. На основании анализа представленных в литературе сведений мы сконцентрировались на исследовании возможности участия в фотоиндуцированной гибели клеток таких видов смерти как апоптоз, некроптоз и ферроптоз.

### **3.4.2. Ингибиторный анализ**

С целью предварительного определения типа гибели клеток, индуцируемой при фотодинамическом воздействии исследуемых фотосенсибилизаторов, был проведен ингибиторный анализ с использованием соединений, селективно блокирующих различные виды регулируемой клеточной смерти: панкаспазного ингибитора zVAD-fmk, селективно блокирующего развитие апоптоза; ингибитора RIPK1 некростатина-1s (Nec-1s), блокирующего развитие некроптоза; ловушки липидных радикалов ферростатина-1 (Ferr-1) и хелатора железа дефероксамина (ДФО), блокирующих развитие ферроптоза.

Для проверки влияния ингибиторов и диметилсульфоксида (ДМСО), использованного в качестве растворителя при приготовлении растворов ингибиторов, на жизнеспособность культур клеток в темноте и при облучении, клетки предынкубировали в среде с тем или иным ингибитором в течение 4 часов, после чего культуру облучали или инкубировали вне CO<sub>2</sub>-инкубатора в темноте в течение аналогичного времени. Жизнеспособность оценивали через 13 часов после облучения методом МТТ. Было показано, что ни один из ингибиторов в использованных концентрациях сам по себе, в

отсутствие ФС, не оказывал какого-либо значимого влияния на жизнеспособность культур клеток при инкубации в течение 13 часов, как в темноте, так и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>, также не показано влияния ДМСО (рис. 17).

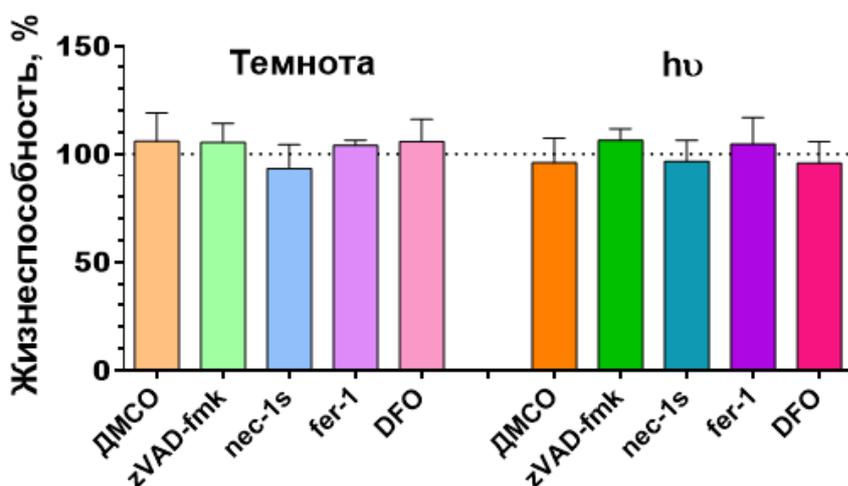


Рис. 17. Жизнеспособность клеток А431 в присутствии ингибиторов клеточной смерти в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> (hv); ДМСО – обработка диметилсульфоксидом в концентрации 0,2%; zVAD-fmk – обработка 25 мкМ панкаспазным ингибитором zVAD-fmk; nec-1s – обработка 20 мкМ некростатином-1s; fer-1 – обработка 1 мкМ ферростатином-1; DFO – обработка 10 мкМ дефероксамином. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без добавления ингибиторов (обозначено пунктиром). Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n≥3)

Тип гибели клеток, индуцируемой при фотодинамическом воздействии фотосенса и фотодитазина, был проанализирован в отношении клеток линий А431, Т24 и GL261. Жизнеспособность культуры клеток оценивали в присутствии ингибиторов клеточной смерти в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> через 13 часов после облучения.

В случае клеток А431 было показано, что при действии фотосенса панкаспазный ингибитор zVAD-fmk и ферростатин-1 существенно повышали жизнеспособность культуры клеток (рис. 18). При действии фотодитазина наряду с действием zVAD-fmk показано существенное увеличение выживаемости клеток в присутствии некростатина-1s, блокирующего развитие некроптоза (рис. 18).

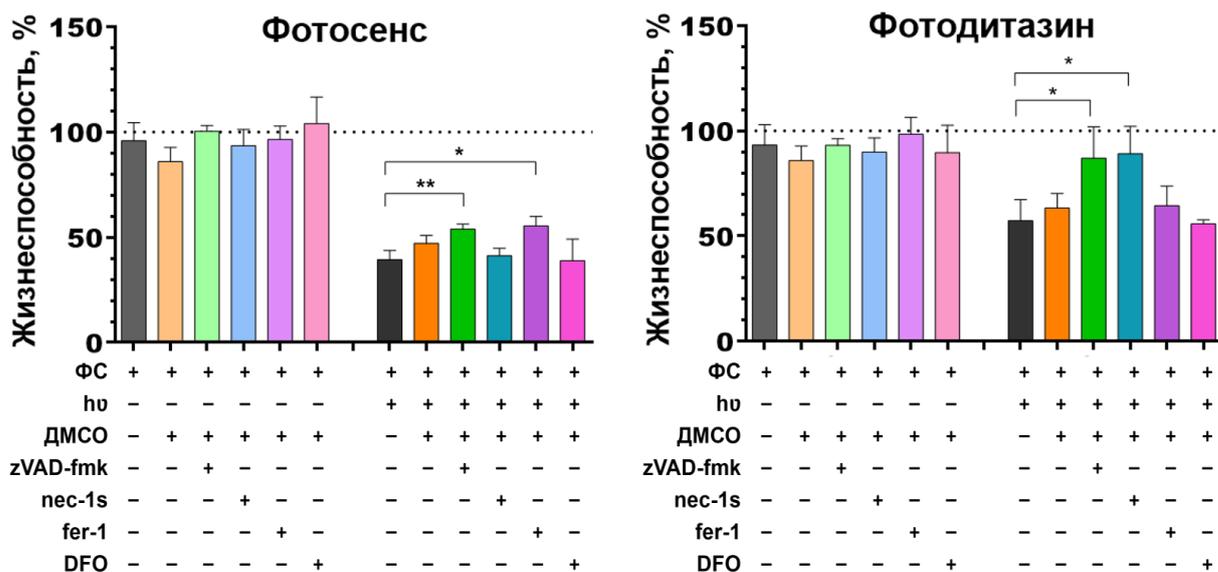


Рис. 18. Влияние ингибиторов клеточной смерти на жизнеспособность культуры клеток A431 при обработке фотосенсом и фотодитазином в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. ФС – обработка клеток фотосенсибилизатором в концентрации IC<sub>50</sub>; hv – облучение в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>; ДМСО – обработка диметилсульфоксидом в концентрации 0,2%; zVAD-fmk – обработка 25 мкМ панкаспазным ингибитором zVAD-fmk; nec-1s – обработка 20 мкМ некростатином-1s; fer-1 – обработка 1 мкМ ферростатином-1; DFO – обработка 10 мкМ дефероксамином. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без обработки ФС или ингибиторами (обозначено пунктиром). \*, \*\* – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки (t-критерий с поправкой Бонферрони, p < 0,05). Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n ≥ 3)

Похожее действие показано для ингибиторов смерти и в отношении клеток T24. При действии фотосенса ферростатин-1 существенно повышал жизнеспособность культуры клеток. Тем не менее, стоит отметить тенденцию к снижению эффективности фотодинамической индукции клеточной смерти при действии zVAD-fmk и дефероксамина (рис. 19). В случае фотодитазина показано защитное действие некростатина-1s. Кроме этого, выявлена тенденция к снижению эффективности фотодинамической индукции клеточной смерти при действии zVAD-fmk (рис. 19).

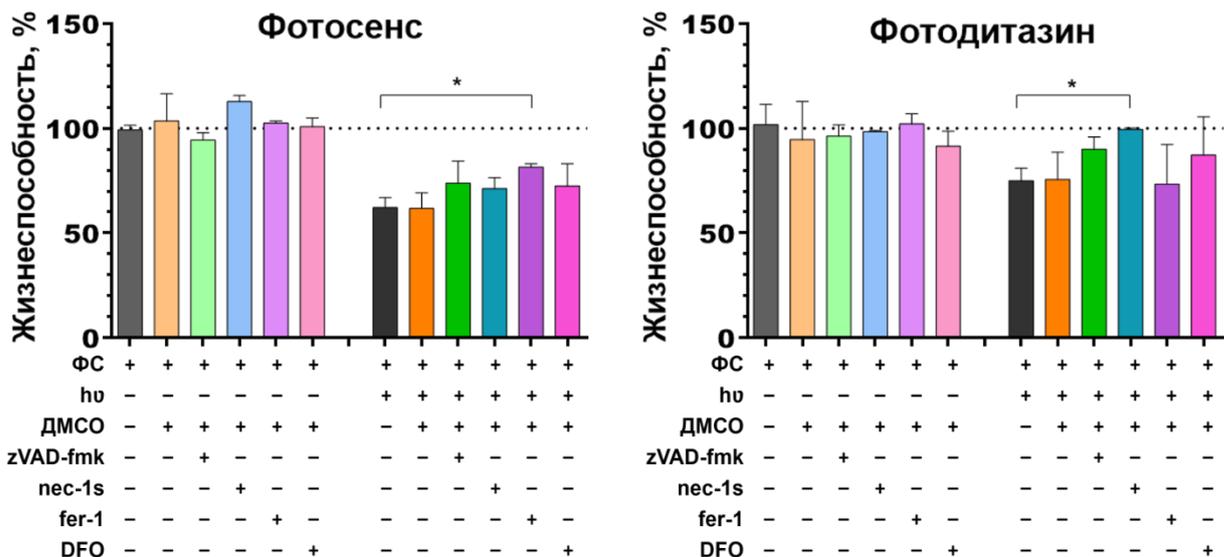


Рис. 19. Влияние ингибиторов клеточной смерти на жизнеспособность культуры клеток T24 при обработке фотосенсом и фотодитазином в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. ФС – обработка клеток фотосенсибилизатором в концентрации IC<sub>50</sub>; hv – облучение в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>; ДМСО – обработка диметилсульфоксидом в концентрации 0,2%; zVAD-fmk – обработка 25 мкМ панкаспазным ингибитором zVAD-fmk; nec-1s – обработка 20 мкМ некростатином-1s; fer-1 – обработка 1 мкМ ферростатином-1; DFO – обработка 10 мкМ дефероксамином. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без обработки ФС или ингибиторами (обозначено пунктиром). \* – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки (t-критерий с поправкой Бонферрони, p < 0,05). Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n≥3)

В случае клеток глиомы GL261 было показано, что при действии фотосенса как ферростатин-1 и дефероксамин, блокирующие развитие ферроптоза, так и панкаспазный ингибитор zVAD-fmk существенно повышали жизнеспособность культуры клеток (рис. 20). Тогда как, при действии фотодитазина защитный эффект выявлен только для панкаспазного ингибитора zVAD-fmk (рис. 20).

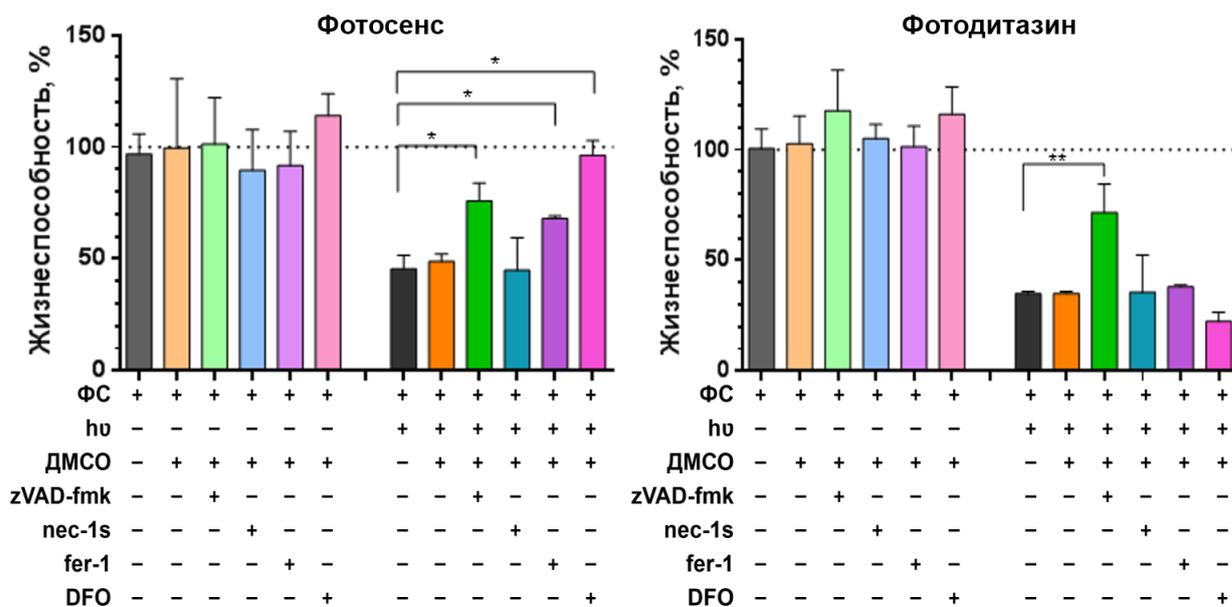


Рис. 20. Влияние ингибиторов клеточной смерти на жизнеспособность культуры клеток GL261 при обработке фотосенсом и фотодитазином в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. ФС – обработка клеток фотосенсибилизатором в концентрации IC<sub>50</sub>; hv – облучение в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>; ДМСО – обработка диметилсульфоксидом в концентрации 0,2%; zVAD-fmk – обработка 25 мкМ панкаспазным ингибитором zVAD-fmk; nec-1s – обработка 20 мкМ некростатином-1s; fer-1 – обработка 1 мкМ ферростатином-1; DFO – обработка 10 мкМ дефероксамином. За 100% принято значение жизнеспособности клеток в контроле без обработки ФС или ингибиторами (обозначено пунктиром). \*, \*\* – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки (t-критерий с поправкой Бонферрони, p < 0,05). Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (n≥3)

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.

### **3.4.3. Анализ экстернализации фосфатидилсерина на мембранах фотосенсибилизированных клеток**

Одним из принципиальных признаков апоптоза считается выход фосфатидилсерина на наружную сторону плазматической мембраны. Для определения экстернализации фосфатидилсерина при ответе клеток A431 на фотодинамическое воздействие фотосенса и фотодитазина использовали метод проточной цитометрии. Клетки окрашивали фосфатидилсерин-связывающим белком аннексином V, конъюгированным с флуоресцентным красителем FITC (AnxV-FITC) и йодидом пропидиума (PI), проникающим только в мёртвые клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны.

Экспонирование фосфатидилсерина на наружный слой мембраны долгое время считалось уникальной особенностью апоптотических клеток. Однако в последнее время было показано экспонирование фосфатидилсерина при неапоптотических формах регулируемой гибели клеток, таких как некроптоз [191, 192]. Детектирование апоптотических и некроптотических клеток обеспечивается за счет регистрации флуоресценции красителя, связанного с аннексином.

На рисунках 21 и 22 показано, что через 13 часов после облучения в дозе  $20 \text{ Дж/см}^2$  культуры фотосенсибилизированных клеток A431 количество живых клеток (Anx<sup>-</sup>, PI<sup>-</sup>) не превышало 40-50% и 30-40% для фотосенса и фотодитазина соответственно, что существенно ниже аналогичных значений в контроле (90-95%). Отметим, что подсчет «событий» методом проточной цитометрии как правило приводит к занижению доли живых клеток в случае фрагментации погибших клеток или выделения апоптотических телец.

Наличие лишь незначительного количества некротических клеток, окрашенных PI, но не окрашенных AnxV-FITC (Anx<sup>-</sup>, PI<sup>+</sup>), подтверждает предположение об индукции различных видов регулируемой клеточной смерти, поскольку нерегулируемый некроз является быстрым процессом и не требует значительного времени в масштабах клеточной жизни.

Это согласуется с присутствием в культурах большого количества сохранивших целостность клеток ( $Anx^+$ ,  $PI^-$ ), находящихся на стадии раннего апоптоза или некроптоза. Их количество достигало 40-50% для обоих исследуемых соединений.

Данный метод не позволяет разделить клетки на поздних стадиях развития смерти ( $Anx^+$ ,  $PI^+$ ) и определить, погибли они вследствие апоптоза, некроптоза или другого вида гибели. Количество таких клеток в культуре составляло 10-15% и 25-30% для фотосенса и фотодитазина соответственно.

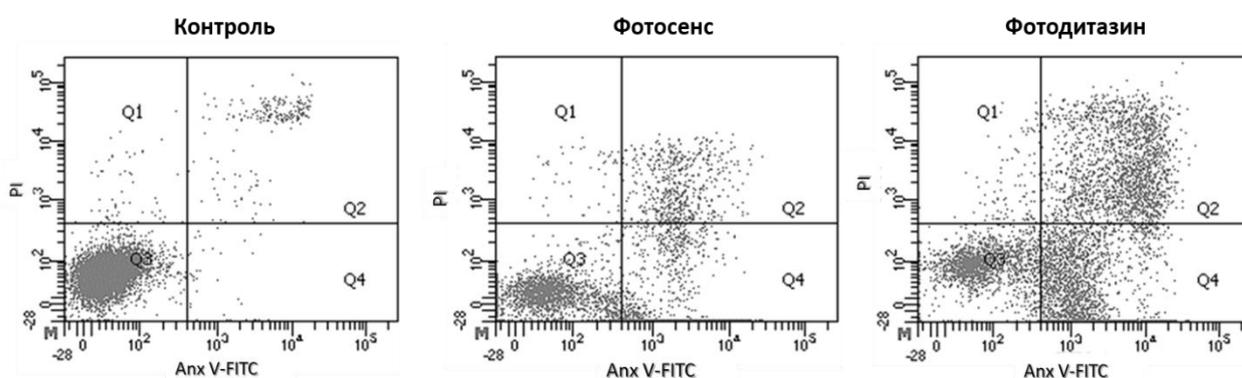


Рис. 21. Анализ выхода фосфатидилсерина на наружную поверхность мембраны клеток A431 при обработке фотосенсом и фотодитазином в концентрациях, соответствующих  $IC_{50}$ , через 13 часов после облучения в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. Клетки окрашены PI и AnxV-FITC и проанализированы методом проточной цитометрии. Показано типичное распределение в одном из 3 независимых экспериментов

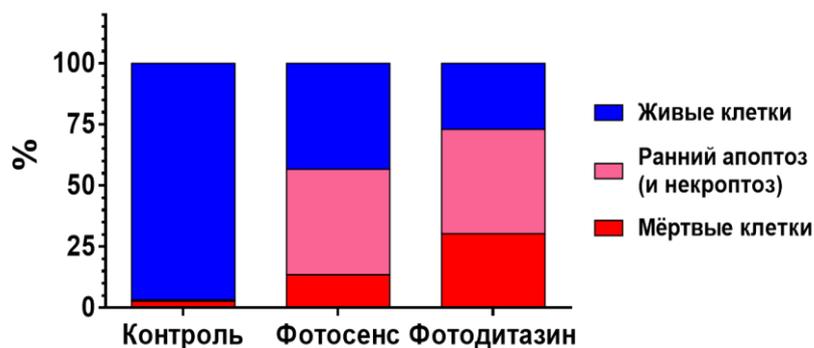


Рис. 22. Распределение клеток A431 по стадиям смерти после обработки фотосенсом и фотодитазином ( $IC_{50}$ , 20 Дж/см<sup>2</sup>, 13 часов после облучения). Представлена доля живых клеток ( $Anx^-$ ,  $PI^-$ ), находящихся на стадии раннего апоптоза и некроптоза ( $Anx^+$ ,  $PI^-$ ) и мёртвых клеток ( $PI^+$ )

#### 3.4.4. Активация каспазы 3 в фотосенсибилизированных клетках

Для специфического подтверждения участия апоптоза в гибели клеток при фотодинамическом воздействии фотосенса и фотодитазина 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 Casper3 BG основан на явлении флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET), 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 без воздействия показано присутствие незначительного количества (<3%) клеток с активной каспазой-3, демонстрирующих также характерную для апоптоза морфологию (рис. 23).

Обработка клеток A431-Casper3BG фотосенсом и фотодитазином в темноте не влияла на состояние сенсора (рис. 24). В то же время, через 13 часов после облучения фотосенсибилизированных клеток в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> показано присутствие в культуре клеток, различных по морфологии и активности каспазы 3. Стоит отметить, что при действии фотосенсибилизаторов в концентрации IC<sub>50</sub> наблюдались отличия в морфологии погибающих клеток по сравнению с зарегистрированной при IC<sub>>90</sub>. В частности, не наблюдалось формирования крупных мембранных пузырей при действии фотосенса (рис. 11, рис. 24).

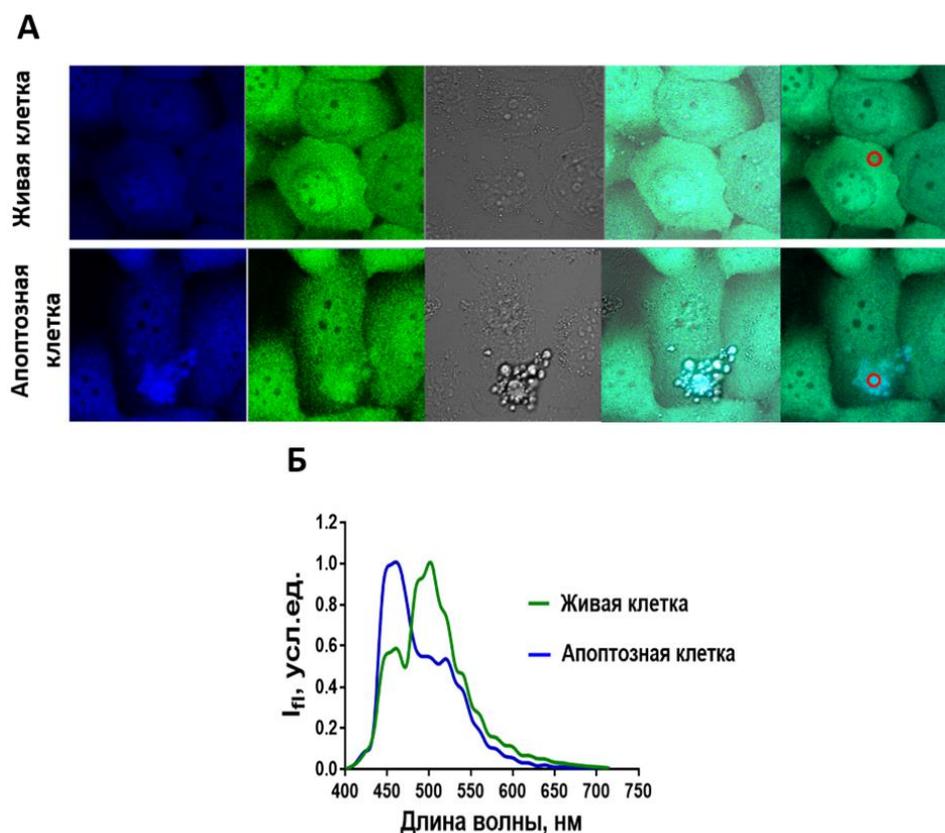


Рис. 23. Визуализация активности каспазы 3 при апоптозе в культуре A431-Casper3BG. (А) – изображения клеток линии A431-Casper3BG, полученные методом конфокальной микроскопии. Показаны изображения в канале, соответствующем флуоресценции донорной части Casper3 BG ( $\lambda_{ex}$  405 нм,  $\lambda_{em}$  430-470 нм, синий канал); в канале, соответствующем флуоресценции акцепторной части Casper3 BG ( $\lambda_{ex}$  405 нм,  $\lambda_{em}$  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

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. 24, 25). При фотосенсибилизации фотодитазинем доля апоптотических клеток составляла лишь 20%, также было отмечено присутствие большого количества клеток, до 24%, с очень низким уровнем флуоресценции сенсора (рис. 24, 25). Предположительно, последнее связано с нарушением целостности мембраны и выходом содержимого цитоплазмы в среду. Такое возможно, в частности, при развитии некроза или некроптоза.

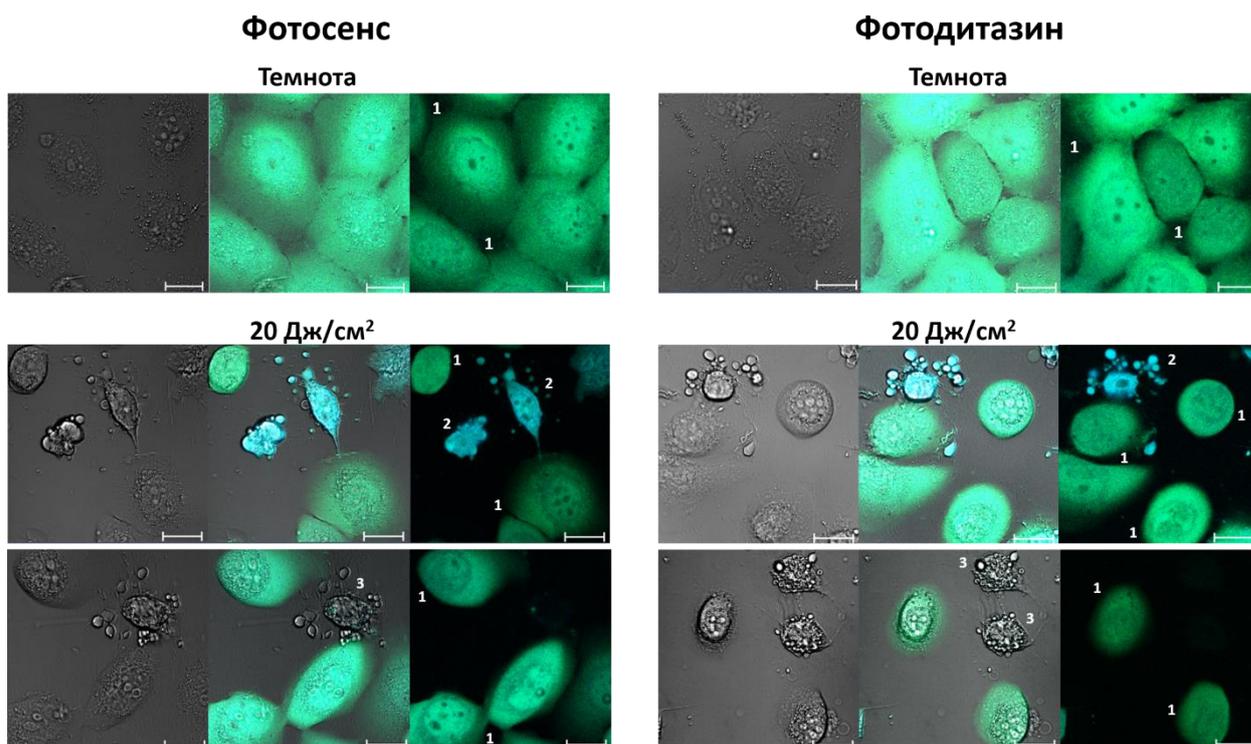


Рис. 24. Визуализация активности каспазы 3 при развитии апоптоза в культуре A431-Casper3BG после обработки фотосенсом и фотодитазинном ( $IC_{50}$ , в условиях темноты или облучения в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>, через 13 часов после обработки). Показаны изображения в проходящем свете; наложение проходящего 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 Casper3 BG (3)

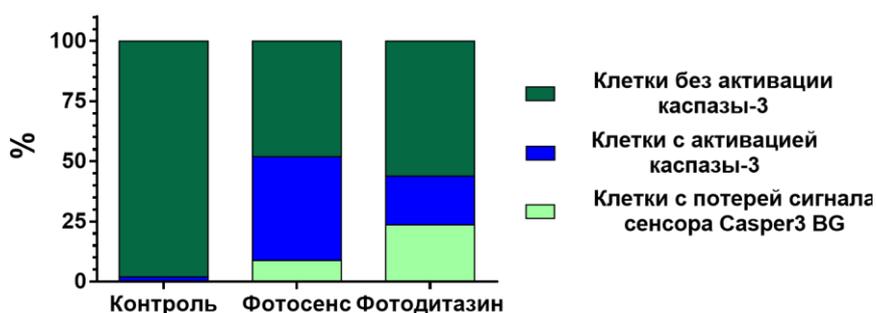


Рис. 25. Распределение клеток по ответу сенсора Casper3 BG после обработки фотосенсом и фотодитазинном ( $IC_{50}$ , 20 Дж/см<sup>2</sup>, 13 часов после облучения). Представлена доля клеток без активации каспазы 3, с активацией каспазы 3 и клеток с потерей сигнала сенсора Casper3 BG (n=300-400 клеток для каждого варианта обработки)

Таким образом, при действии обоих фотосенсибилизаторов действительно происходит активация апоптоза, однако, наряду с этим присутствуют клетки, погибшие по другому пути, причем соотношение разных видов гибели различно при исследованных вариантах обработки. Это подтверждает результаты ингибиторного анализа о защитном эффекте панкаспазного ингибитора zVAD-fmk от фотодинамического действия данных фотосенсибилизаторов, что в совокупности позволяет предположить участие апоптоза в гибели клеток при действии фотосенса и фотодитазина.

#### **3.4.5. 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, индуцированной фотодинамическим воздействием, использовали метод проточной цитометрии с ратиометрическим флуоресцентным зондом Bodipy<sup>TM</sup> 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 A431, обработанных фотосенсом, наблюдалось значительное увлечение уровня перекисного окисления липидов, существенно превосходящее все остальные варианты обработки (рис. 26).

Как было показано при ингибиторном анализе, ловушка липидных радикалов ферростатин-1 (а в случае клеток GL261 и хелатор железа DFO) защищал клетки от фотодинамического действия фотосенса, что в совокупности позволяет предположить участие ферроптоза в гибели клеток при действии данного фотосенсибилизатора.

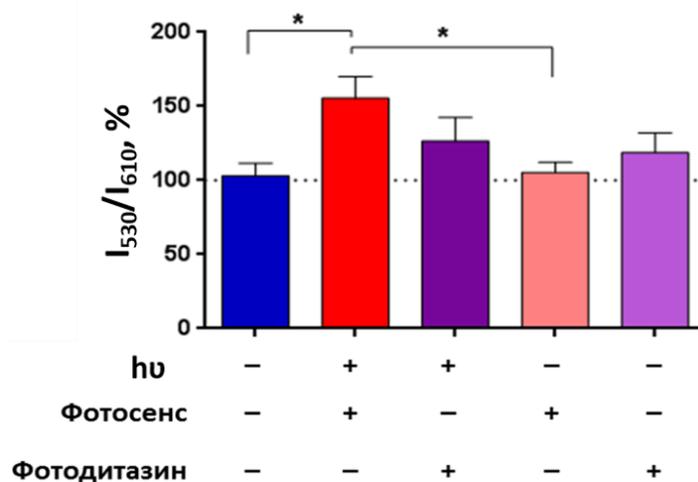


Рис. 26. Генерация перекисей липидов и индукция ферроптоза в культуре клеток A431, обработанных фотосенсом и фотодитазином в концентрациях, соответствующих  $IC_{50}$ , и облученных ( $h\nu$ ) в дозе  $20 \text{ Дж/см}^2$ . Анализ проведен через 13 часов после облучения. \* – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки (t-критерий с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ )

### 3.4.6. Фосфорилирование киназного домена смешанной линии, подобного псевдокиназе (MLKL), в фотосенсибилизированных клетках

Для специфического подтверждения участия некроптоза в гибели клеток при фотодинамическом воздействии мы использовали метод вестерн-блота с детекцией присутствия специфичного для этого вида смерти фосфорилированного белка MLKL (pMLKL) в клеточных лизатах.

Показано, что при облучении культуры клеток A431, обработанных фотодитазином, наблюдалось увлечение количества фосфорилированной формы MLKL, одного из ключевых белков в каскаде реализации некроптоза (рис. 27). 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.

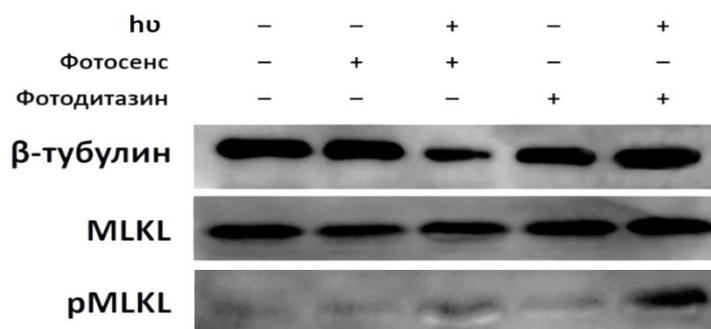


Рис. 27. Детекция фосфорилированной формы MLKL (pMLKL) в клетках A431, обработанных фотосенсом и фотодитазином в концентрациях, соответствующих  $IC_{50}$ , и облученных (hν) в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. Анализ проведен через 13 часов после облучения. Тубулин использован в качестве контроля загрузки

Было показано в ряде работ других исследователей, что фотодинамическое действие фотосенса может приводить к индукции некроза и апоптоза клеток глиомы C6 [207] и глиобластомы 101/8 [208]. В случае фотодитазина ранее был зафиксирован ранний и поздний апоптоз после фотодинамического воздействия на культуру клеток меланомы [209]. Индукция ферроптоза, некроптоза, или других видов клеточной смерти при действии исследуемых фотосенсибилизаторов ранее зарегистрирована не была.

На основании проведенного исследования мы полагаем, что фотосенсибилизаторы с разными физико-химическими свойствами индуцируют принципиально разные пути регулируемой гибели клеток, в том числе апоптоз, ферроптоз и некроптоз, 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<sup>2</sup>. 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 пермеабиллизации мембраны в зависимости от использованного типа фотосенсибилизатора.

С использованием собственных и литературных данных нами предложена следующая схема (рис. 28). Фотодинамическое воздействие фотосенса, локализованного 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 [210]. С другой стороны, высвобождение из лизосом ионов железа активирует реакцию Фентона, что, в свою очередь, приводит к усилению перекисного окисления липидов и индуцирует ферроптоз [211].

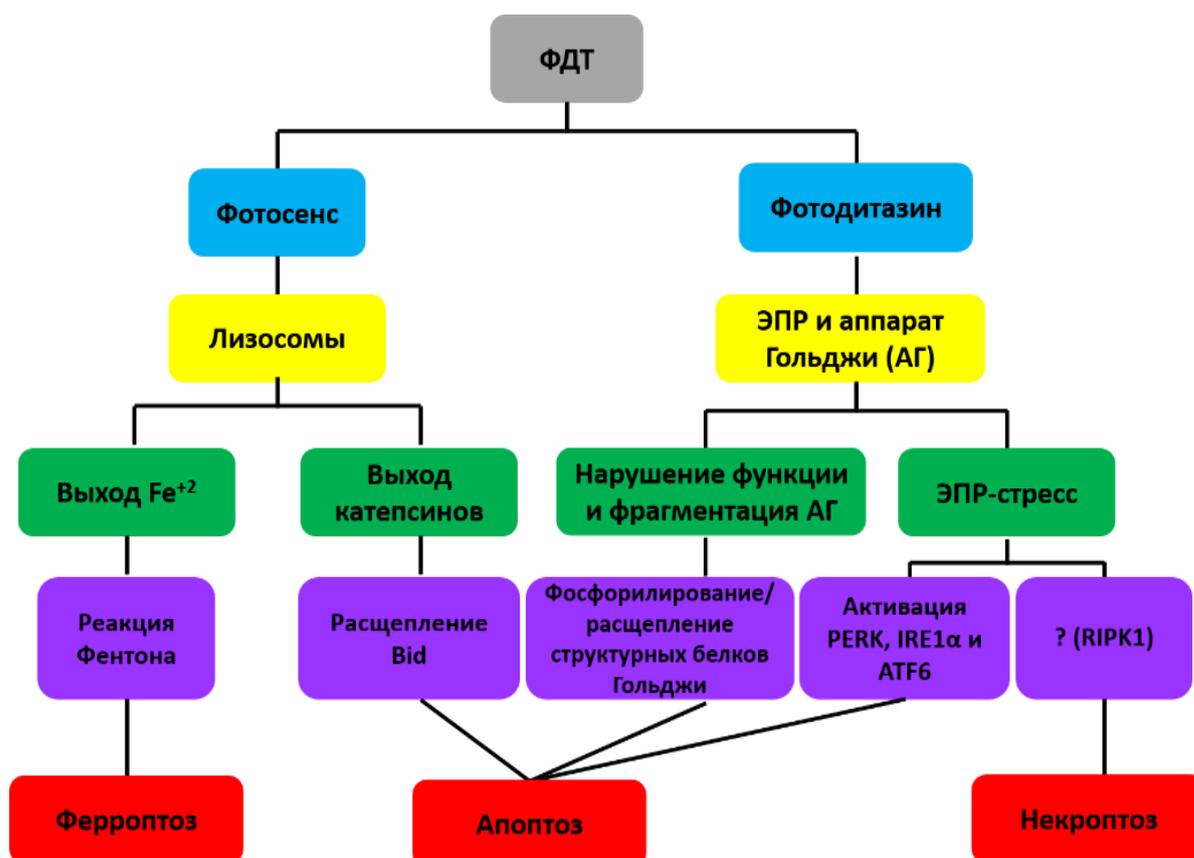


Рис. 28. Предлагаемая схема, объясняющая зависимость типа клеточной смерти от используемого фотосенсибилизатора

Иная ситуация наблюдается при использовании фотодитазина, локализованного 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, IRE1 $\alpha$  и ATF6 и также приводит к апоптозу [212]. Также показано, что нарушение микротрубочек или фосфорилирование и расщепление структурных белков Гольджи, таких

как структурный белок организации аппарата Гольджи GRASP65 и гольджины, индуцирует апоптоз [213, 214]. 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 [215].

## 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<sup>2</sup>.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Узденский, А. Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А.Б. Узденский // СПб: Наука, – 2010. – 327с.
2. Castano, A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization / A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2004. – V. 6. – № 7. – P. 279-293.
3. Donohoe, C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity / C. Donohoe, M.O. Senge, L.G. Arnaut, L.C. Gomes-da-Silva // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. – 2019. – V. 1872. – № 2. – P. 188308.
4. Agostinis, P. Photodynamic therapy of cancer: An update / P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, J. Golab // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2011. – V. 61. – № 4. – P. 250-281.
5. Dos Santos, A. F. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review / A.F. Dos Santos, D.R.Q. De Almeida, L.F. Terra, M.S. Baptista, L. Labriola // J Cancer Metastasis Treat. – 2019. – V. 5. – № 25. – P. 1-20.
6. Castano, A. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity / A. Castano, P. Mroz, M. Hamblin // Nat Rev Cancer 6, – 2006 – V. 1. – № 4. – P. 535-545.
7. Cramer, S. W. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma / S.W. Cramer, C.C. Chen // Front Surg. – 2020. – V. 6. – № 81.
8. Raab, O. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien / O. Raab // Zeitung Biol. – 1900. – V. 39. – P. 524-526.
9. Prime, J. Des Accidents Toxiques Produit par l'Eosinate se Sodium / J. Prime // 2nd ed., Jouve et Boyer, Paris, France. – 1900.

10. Von Tappeiner, H. A. Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen über die Photodynamische Erscheinung / H.A. Von Tappeiner, A. Jodlbauer // F.C.W. Vogel., Leipzig, Germany. – 1907.
11. Meyer-Betz, F. Untersuchungen über die biologische photodynamische Wirkung des hematoporphyrins und anderer derivative des blut und galenafarbstoffs / F. Meyer-Betz // Dtsch. Arch. Klin. – 1913. – V. 112. – P. 476-503.
12. Lipson, R. L. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection / R.L. Lipson, E.J. Baldes, A.M. Olsen // J. Natl. Cancer Inst. – 1961. – V. 26. – P. 1-11.
13. Diamond, I. Photodynamic therapy of malignant tumours / I. Diamond, S.G. Granelli, A.F. McDonagh, S. Nielsen, C.B. Wilson, R. Jaenicke // Lancet. – 1972. – V. 2. – № 7788. – P. 1175-1177.
14. Dougherty, T. J. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light / T.J. Dougherty, G.B. Grindey, R. Fiel, K.R. Weishaupt, D.G. Boyle // J. Natl. Cancer Inst. – 1975. – V. 55. – № 1. – P. 115-121.
15. Dougherty, T. J. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors / T.J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman // Cancer Res. – 1978. – V. 38. – № 8. – P. 2628-2635.
16. Dolmans, D.E. Photodynamic therapy for cancer / D.E. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain // Nat. Rev. Cancer. – 2003. – V. 3. – № 5. – P. 380-387.
17. Bacellar, I. O. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death / I.O. Bacellar, T.M. Tsubone, C. Pavani, M.S. Baptista // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – V. 16. – № 9. – P. 20523–20559
18. Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue / M.R. Hamblin // Photochem Photobiol. – 2020. – V. 96. – № 3. – P. 506-516.

19. Wagnieres, G. A. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications / G.A. Wagnieres, W.M. Star, B.C. Wilson // *Photochem. Photobiol.* – 1998. – V. 68. – № 5. – P. 603-632.
20. Robertson, C. A. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT / C.A. Robertson, D.H. Evans, H. Abrahamse // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2009. – V. 96. – № 1. – P. 1-8.
21. Foote, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation / C.S. Foote // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 54. – № 5. – P. 659.
22. Abrahamse, H. New photosensitizers for photodynamic therapy / H. Abrahamse, M.R. Hamblin // *Biochem. J.* – 2016. – V. 473. – P. 347-364.
23. Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours / M. Ochsner // *J Photochem Photobiol B.* – 1997. – V. 39. – № 1. – P. 1-18.
24. Sharman, W. M. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy / W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier // *Methods Enzymol.* – 2000. – V. 319. – P. 376-400.
25. Bergamini, C. M. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage / C.M. Bergamini, S. Gambetti, A. Dondi, C. Cervellati // *Curr Pharm Des.* – 2004. – V. 10. – № 14. – P. 1611-1626.
26. Girotti, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms / A.W. Girotti // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2001. – V. 63. – № 1-3. – P. 103-113.
27. Nowak-Stepniowska, A. Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy—mechanisms and applications / A. Nowak-Stepniowska, P. Pergol, A. Padzik-Graczyk // *Postepy Biochem.* – 2013. – V. 59. – № 1. – P. 53-63.
28. Moan, J. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen / J. Moan, K. Berg // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 53. – № 4. – P. 549-553.

29. Dysart, J. S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro / J.S. Dysart, M.S. Patterson // *Physics in Medicine and Biology*. – 2005. – V. 50. – № 11. – P. 2597-2616.
30. Castano, A. P. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death / A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin // *Photodiagn. Photodyn. Ther.* – 2005. – V. 2. – № 1. – P. 1-23.
31. Kessel, D. Photodynamic therapy and cell death pathways / D. Kessel, N.L. Oleinick // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – V. 635. – P. 35-46.
32. Zhang, J. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy / J. Zhang, C. Jiang, J.P. Figueiró Longo, R.B. Azevedo, H. Zhang, L.A. Muehlmann // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2018. – V. 8. – № 2. – P. 137-146.
33. Ormond, A. B. Dye sensitizers for photodynamic therapy / A.B. Ormond, H.S. Freeman // *Materials*. – 2013. – V. 6. – № 3. – P. 817-840.
34. Izquierdo, M. A. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers in photodynamic therapy / M.A. Izquierdo, A. Vyšniauskas, S.A. Lermontova, I.S. Grigoryev, N.Y. Shilyagina, I.V. Balalaeva, L.G. Klapshina, M.K. Kuimova // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2015. – V. 3. – № 6. – P. 1089-1096.
35. Josefsen, L.B. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics / L.B. Josefsen, R.W. Boyle // *Theranostics*. – 2012. – V. 2. – № 9. – P. 916-966.
36. Josefsen, L.B. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? / L.B. Josefsen, R.W. Boyle // *Br J Pharmacol*. – 2008. – V. 154. – № 1. – P. 1-3.
37. Kataoka, H. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers / H. Kataoka, H. Nishie, N. Hayashi, M. Tanaka, A. Nomoto, S. Yano, T. Joh, // *Ann. Transl. Med.* – 2017. – V. 5. – № 8. – P. 183.

38. Allison, R. R. Photosensitizers in clinical PDT / R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X.H. Hu, C.J. Childs, C.H. Sibata // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2004. – V. 1. – № 1. – P. 27-42.
39. Golombek, S.K. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses / S.K. Golombek, J.N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, T. Lammers // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2018. – V. 130. – P. 17-38.
40. Jori, G. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers / G. Jori, E. Reddi // *Int J Biochem*. – 1993. – V. 25. – № 10. – P. 1369-1375.
41. Cruz, P. M. R. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics / P.M.R. Cruz, H. Mo, W.J. McConathy, N. Sabnis, A.G. Lacko // *Front Pharmacol*. – 2013. – V. 25. – № 4. – P. 119.
42. Oliveira, C. S. Major determinants of photoinduced cell death: subcellular localization versus photosensitization efficiency / C.S. Oliveira, R. Turchiello, A.J. Kowaltowski, G.L. Indig, M.S. Baptista // *Free Radic Biol Med*. – 2011. – V. 51. – № 4. – P. 824-33.
43. Korbelik, M. Low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of Photofrin: How much is it relevant for selective accumulation of the photosensitizer in tumors? / M. Korbelik // *J. Photochem. Photobiol. B*. –1992. –V. 12. – № 1. – P. 107-113.
44. Vicente, M. G. H. Porphyrin-based sensitizers in the detection and treatment of cancer: Recent progress / M.G.H. Vicente // *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. – 2001. – V. 1. – № 2. – P. 175-194.
45. Moan J. Intracellular Localization of Photosensitizers / J. Moan, K. Berg, E. Kvam, A. Western, Z. Malik, A. Rück, H. Schneckenburger // *In Ciba Foundation Symposium 146 - Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* (eds G. Bock and S. Harnett). – 1989. – P. 95-111.

46. Juarranz, A. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications / A. Juarranz, P. Jaen, F. Sanz-Rodriguez, J. Cuevas, S. Gonzalez // *Clin. Transl. Oncol.* – 2008. – V. 10. – № 3. – P. 148-154.
47. Woodburn, K. W. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy / K.W. Woodburn, N.J. Vardaxis, J.S. Hill, A.H. Kaye, D.R. Phillips // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 54. – № 5. – P. 725-732.
48. Malik, Z. Subcellular localization of sulfonated tetraphenyl porphines in colon carcinoma cells by spectrally resolved imaging / Z. Malik, I. Amit, C. Rothmann // *Photochem. Photobiol.* – 1997. – V. 65. – № 3. – P. 389-396.
49. Jori, G. Tumor photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy / G. Jori // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1996. – V. 36. – № 2. – P. 87-93.
50. Abrahamse, H. Photomedicine and Stem Cells, The Janus face of photodynamic therapy (PDT) to kill cancer stem cells, and photobiomodulation (PBM) to stimulate normal stem cells / H. Abrahamse, M.R. Hamblin // Morgan & Claypool Publishers. – 2017.
51. Jensen, T. J. Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells / T.J. Jensen, M.G. Vicente, R. Luguya, J. Norton, F.R. Fronczek, K.M. Smith // *J. Photochem Photobiol B Biol.* – 2010. – V. 100. – № 2. – P. 100-111.
52. Pavani, C. Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: effect of zinc chelation / C. Pavani, Y. Iamamoto, M.S. Baptista // *Photochem Photobiol.* – 2012. – V. 88. – № 4. – P. 774-781.
53. Bacellar, I. O. L. Photosensitized membrane permeabilization requires contactdependent reactions between photosensitizer and lipids / I.O.L. Bacellar, M.C. Oliveira, L.S. Dantas, E.B. Costa, H.C. Junqueira, W.K. Martins, A.M. Durantini, G. Cosa, P. Di Mascio, M. Wainwright, R. Miotto, R.M. Cordeiro, S. Miyamoto, M.S. Baptista // *J Am Chem Soc.* – 2018. – V. 140. – № 30. – P. 9606-9615.

54. Davies, M. J. The oxidative environment and protein damage / M.J. Davies // *Biochim Biophys Acta.* – 2005. – V. 1703. – № 2. – P. 93-109.
55. Davies, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen / M.J. Davies // *Photochem Photobiol Sci.* – 2004. – V. 3 – № 1. – P. 17-25.
56. Berlett, B. S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *J Biol Chem.* – 1997. – V. 272. – № 33. – P. 20313-20316.
57. Gèze, M. Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications / M. Geze, P. Morlière, J.C. Mazière, K.M. Smith, R. Santus // *J Photochem Photobiol B.* – 1993. – V. 20. – № 1. – P. 23-35.
58. Tsubone, T. M. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage / T.M. Tsubone, W.K. Martins, C. Pavani, H.C. Junqueira, R. Itri, M.S. Baptista // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 6734.
59. Kessel, D. Promotion of proapoptotic signals by lysosomal photodamage / D. Kessel, J.J.Jr. Reiners // *Photochem Photobiol.* – 2016. – V. 91. – № 4. – P. 931-936.
60. Dos Santos, A.F. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells / A.F. Dos Santos, L.F. Terra, R.A. Wailemann, T.C. Oliveira, V.M. Gomes, M.F. Mineiro, F.C. Meotti, A. Bruni-Cardoso, M.S. Baptista, L. Labriola // *BMC Cancer.* – 2017. – V. 17. – № 1. – P. 194.
61. Wang, F. Lysosomal membrane permeabilization and cell death / F. Wang, R. Gómez-Sintes, P. Boya // *Traffic.* – 2018. – V. 19. – № 12. – P. 918-931.
62. Kessel, D. Death pathways associated with photodynamic therapy / D. Kessel // *Med Laser Appl.* – 2006. – V. 21. – № 4. – P. 219-24.
63. Moan, J. Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence

and photosensitivity in V79 cells / J. Moan, K. Berg, H. Anholt, K. Madslie // International Journal of Cancer. – 1994. – V. 58. – № 6. – P. 865-870.

64. Morgan, J. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy / J. Morgan, A.R. Oseroff // Adv Drug Deliv Rev. – 2001. – V. 49. – № 1-2. – P. 71-86.

65. Spring, B. Q. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance / B.Q. Spring, I. Rizvi, N. Xu, T. Hasan // Photochem Photobiol Sci. – 2015. – V. 14. – № 8. – P. 1476-1491.

66. Weizman, E. Mitochondrial localization and photodamage during photodynamic therapy with tetraphenylporphines / E. Weizman, C. Rothmann, L. Greenbaum, A. Shainberg, M. Adamek, B. Ehrenberg, Z. Malik // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2000. – V. 59. – № 1-3. – P. 92-102.

67. Garg, A. D. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin / A.D. Garg, D.V. Krysko, P. Vandenabeele, P. Agostinis // Cancer Immunol. Immunother. – 2012. – V. 61. – № 2. – P. 215-221.

68. Moserova, I. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways / I. Moserova, J. Kralova // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 3. – P. e32972.

69. Teiten, M. H. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells / M.H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morliere, R. Santus, F. Guillemin // Br J Cancer. – 2003. – V. 88. – № 1. – P. 146-52.

70. Gomes- da- Silva, L. C. Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus / L.C. Gomes- da- Silva, L. Zhao, L. Bezu, H. Zhou, A. Sauvat, P. Liu, G. Kroemer // The EMBO Journal. – 2018. – V. 37. – № 13. – P. e98354.

71. Buchko, G.W. Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine / G.W. Buchko, J.R. Wagner, J. Cadet, S. Raoul, M. Weinfeld // *Biochim Biophys Acta*. – 1995. – V. 1263. – № 1. – P. 17-24.
72. Sattler, U. G. A. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis / U.G.A. Sattler, W. Mueller-Klieser // *International Journal of Radiation Biology*. – 2009. – V. 85. – № 11. – P. 963-971.
73. Frank, J. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy / J. Frank, A. Flaccus, C. Schwarz, C. Lambert, H.K. Biesalski // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – V. 40. – № 5. – P. 827-836.
74. Golab, J. Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol / J. Golab, D. Nowis, M. Skrzycki, H. Czeczot, A. Baranczyk-Kuzma, G.M. Wilczynski, M. Makowski, P. Mroz, K. Kozar, R. Kaminski, A. Jalili, M. Kopec', T. Grzela, M. Jakobisiak // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 278. – № 1. – P. 407-414.
75. Hadjur, C. Photodynamic Effects of Hypericin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Melanoma Cells / C. Hadjur, M.J. Richard, M.O. Parat, P. Jardon, A. Favier // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – V. 64. – № 2. – P. 375-381.
76. Matroule, J. Y. Pyropheophorbide-a Methyl Ester-mediated Photosensitization Activates Transcription Factor NF- $\kappa$ B through the Interleukin-1 Receptor-dependent Signaling Pathway / J.Y. Matroule, G. Bonizzi, P. Morlière, N. Paillous, R. Santus, V. Bours, J. Piette // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – № 5. – P. 2988-3000.
77. Kocanova, S. Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38<sup>MAPK</sup> and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy / S. Kocanova, E. Buytaert, J.Y. Matroule, J. Piette, J. Golab, P. de Witte, P. Agostinis // *Apoptosis*. – 2007. – V. 12. – № 4. – P. 731-741.

78. Wang, H. P. Up-regulation of Hsp27 Plays a Role in the Resistance of Human Colon Carcinoma HT29 Cells to Photooxidative Stress / H.P. Wang, J.G. Hanlon, A.J. Rainbow, M. Espiritu, G. Singh // *Photochemistry and Photobiology*. – 2002. – V. 76. – № 1. – P. 98-104.

79. Hanlon, J. G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy / J.G. Hanlon, K. Adams, A.J. Rainbow, R.S. Gupta, G. Singh // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2001. – V. 64. – № 1. – P. 55-61.

80. Nonaka, M. Inhibitory Effect of Heat Shock Protein 70 on Apoptosis Induced by Photodynamic Therapy In Vitro / M. Nonaka, H. Ikeda, T. Inokuchi // *Photochemistry and Photobiology*. – 2004. – V. 79. – № 1. – P. 94-98.

81. Szokalska, A. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response / A. Szokalska, M. Makowski, D. Nowis, G.M. Wilczynski, M. Kujawa, C. Wójcik, I. Mlynarczuk-Bialy, P. Salwa, J. Bil, S. Janowska, P. Agostinis, T. Verfaillie, M. Bugajski, J. Gietka, T. Issat, E. Glodkowska, P. Mrówka, T. Stokłosa, M.R. Hamblin, P. Mróz, M. Jakóbisiak, J. Golab // *Cancer Res*. – 2009. – V. 69. – № 10. – P. 4235-4243.

82. Kwiatkowski, S. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations / S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O., Michel K. Kotowski, J. Kulbacka // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – V. 106. – P. 1098-1107.

83. Van Straten, D. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions / D. Van Straten, V. Mashayekhi, H. de Bruijn, S. Oliveira, D. Robinson // *Cancers*. – 2017. – V. 9. – № 2. – P. 19.

84. Galluzzi, L. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications / L. Galluzzi, M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Cell Death & Differentiation*. – 2007. – V. 14. – № 7. – P. 1237-1243.

85. Galluzzi, L. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E.S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D.W. Andrews, et al. // *Cell Death & Differentiation*. – 2018. – V. 25. – № 3. – P. 486-541.
86. Mroz, P. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer / P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin // *Cancers (Basel)*. – 2011. – V. 3. – № 2. – P. 2516-2539.
87. D'Arcy, M. Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy / M. D'Arcy // *Cell Biology International*. – 2019. – V. 43. – № 6. – P. 582-592.
88. Green, D.R. The clearance of dying cells: table for two / D.R. Green, T.H. Oguin, J. Martinez // *Cell Death Differ*. – 2016. – V. 23. – № 6. – P. 915-926.
89. Yatim, N. Dying cells actively regulate adaptive immune responses / N. Yatim, S. Cullen, M. Albert // *Nat Rev Immunol*. – 2017. – V. 17. – № 4. – P. 262-275.
90. Vaux, D. L. Apoptosis Timeline / D.L. Vaux // *Cell Death & Differentiation*. – 2002. – V. 9. – № 4. – P. 349-354.
91. Деев, Р. В. Современные представления о клеточной гибели / Р.В. Деев, А.И. Билялов, Т.М. Жампеисов // *Гены & Клетки*. – 2018. – Т. XIII. – № 1. – С. 6-19.
92. Ashkenazi, A. Death Receptors: Signaling and Modulation / A. Ashkenazi // *Science*. – 1998. – V. 281. – № 5381. – P. 1305-1308.
93. Gibert, B. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands / B. Gibert, P. Mehlen // *Cancer Research*. – 2015. – V. 75. – № 24. – P. 5171–5175.
94. Pistritto, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies / G. Pistritto, D. Triscioglio, C. Ceci, A. Garufi, G. D'Orazi // *Aging (Albany NY)*. – 2016. – V. 8. – № 4. – P. 603-619.

95. Khosravi-Far, R. Death receptor signals to mitochondria / R. Khosravi-Far, M.D. Esposti // *Cancer Biol Ther.* – 2004. – V. 3. – № 11. – P. 1051-1057.
96. Igney, F. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis / F.H. Igney, P.H. Krammer // *Nature Reviews Cancer.* – 2002. – V. 2. – № 4. – P. 277-288.
97. Chen, H. C. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family / H.C. Chen, M. Kanai, A. Inoue-Yamauchi, H.C. Tu, Y. Huang, D. Ren, H. Kim, S. Takeda, D.E. Reyna, P.M. Chan, Y.T. Ganesan, C.P. Liao, E. Gavathiotis, J.J. Hsieh, E.H. Cheng // *Nat Cell Biol.* – 2015. – V. 17. – № 10. – P. 1270-1281.
98. Oh, K. J. Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homo-oligomers / K.J. Oh, P. Singh, K. Lee, K. Foss, S. Lee, M. Park, S. Lee, S. Aluvila, M. Park, P. Singh, R.S. Kim, J. Symersky, D.E. Walters // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 37. – P. 28924-28937.
99. Aluvila, S. Organization of the mitochondrial apoptotic BAK pore: oligomerization of the BAK homodimers / S. Aluvila, T. Mandal, E. Hustedt, P. Fajer, J.Y. Choe, K.J. Oh // *J Biol Chem.* – 2014. – V. 289. – № 5. – P. 2537-2551.
100. Gillies, L. A. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes / L.A. Gillies, H. Du, B. Peters, C.M. Knudson, D.D. Newmeyer, T. Kuwana // *Mol Biol Cell.* – 2015. – V. 26. – № 2. – P. 339-349.
101. Tait, S. W. G. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond / S.W.G. Tait, D.R. Green // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2010. – V. 11. – № 9. – P. 621-632.
102. Li, P. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade / P. Li, D.

Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, X. Wang // *Cell*. – 1997. – V. 91. – № 4. – P. 479-489.

103. Julien, O. Caspases and their substrates / O. Julien, J.A. Wells // *Cell Death Differ.* – 2017. – V. 24. – № 8. – P. 1380-1389.

104. Brenner, D. Mitochondrial cell death effectors / D. Brenner, T.W. Mak // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2009. – V. 21. – № 6. – P. 871-877.

105. Ekert, P. G. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? / P.G. Ekert, D.L. Vaux // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2005. – V. 17. – № 6. – P. 626-630.

106. Jalili, A. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells / A. Jalili, M. Makowski, T. Switaj, D. Nowis, G.M. Wilczynski, E. Wilczek, M. Chorazy-Massalska, A. Radzikowska, W. Maslinski, L. Bialy, J. Sienko, A. Sieron, M. Adamek, G. Basak, P. Mroź, I.W. Krasnodebski, M. Jakońbisiak, J. Golab // *Clin Cancer Res.* – 2004. – V. 10. – № 13. – P. 4498-4508.

107. Korbelik, M. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: Relevance for tumor response / M. Korbelik, J. Sun, I. Cecic // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – № 3. – P. 1018-1026.

108. Garg, A. D. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death / A.D. Garg, D.V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G.B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A.J. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. de Witte, P. Vandenabeele, P. Agostinis // *EMBO J.* – 2012. – V. 31. – № 5. – P. 1062-1079.

109. Garg, A. D. Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma / A.D. Garg, L. Vandenberk, C. Koks, T. Verschuere, L. Boon, S.W. Van Gool, P. Agostinis // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – V. 8. – № 328. – P. 328ra27.

110. Panzarini, E. Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of Damage-Associated Molecular Patterns

(DAMPs) in human HeLa cells / E. Panzarini, V. Inguscio, G.M. Fimia, L. Dini // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. e105778.

111. Etminan, N. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro / N. Etminan, C. Peters, D. Lakbir, E. Bünemann, V. Börger, M.C. Sabel, D. Hänggi, H.J. Steiger, W. Stummer, R.V. Sorg // Br. J. Cancer. – 2011. – V. 105. – № 7. – P. 961-969.

112. Wang, X. Stimulation of dendritic cells by DAMPs in ALA-PDT treated SCC tumor cells / X. Wang, J. Ji, H. Zhang, Z. Fan, L. Zhang, L. Shi, F. Zhou, W.R. Chen, H. Wang, X. Wang // Oncotarget. – 2015. – V. 6. – № 42. – P. 44688-44702.

113. Shams, M. Development of photodynamic therapy regimens that control primary tumor growth and inhibit secondary disease / M. Shams, B. Owczarczak, P. Manderscheid-Kern, D.A. Bellnier, S.O. Gollnick // Cancer Immunol. Immunother. – 2015. – V. 64. – № 3. – P. 287-297.

114. Tanaka, M. Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin) / M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, T. Sawada, H. Akashi, M. Inoue, S. Suzuki, Y. Inagaki, N. Hayashi, H. Nishie, T. Shimura, T. Mizoshita, Y. Mori, E. Kubota, S. Tanida, S. Takahashi, T. Joh // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 30. – P. 47242-47251.

115. Lamberti, M. J. Photodynamic Modulation of Type 1 Interferon Pathway on Melanoma Cells Promotes Dendritic Cell Activation / M.J. Lamberti, F.M. Mentucci, E. Roselli, P. Araya, V.A. Rivarola, N.B. Rumie Vittar, M. Maccioni // Frontiers in Immunology. – 2019. – V. 10. – P. 2614.

116. Tatsuno, K. Extracorporeal photochemotherapy induces bona fide immunogenic cell death / K. Tatsuno, T. Yamazaki, D. Hanlon, P. Han, E. Robinson, O. Sobolev, A. Yurter, F. Rivera-Molina, N. Arshad, R.L. Edelson, L. Galluzzi // Cell Death & Disease. – 2019. – V.10. – № 8. – P. 578.

117. Galluzzi, L. Molecular mechanisms of regulated necrosis / L. Galluzzi, O. Kepp, S. Krautwald, G. Kroemer, A. Linkermann // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2014. – V. 35. – P. 24-32.

118. Degterev, A. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury / A. Degterev, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G.D. Cuny, T.J. Mitchison, M.A. Moskowitz, J. Yuan // *Nature Chemical Biology*. – 2005. – V. 1. – № 2. – P. 112-119.

119. Cho, Y. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation / Y. Cho, S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T.D. Ray, M. Guildford, F.K.M. Chan // *Cell*. – 2009. – V. 137. – № 6. – P. 1112-1123.

120. He, S. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$  / S. He, L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, X. Wang // *Cell*. – 2009. – V. 137. – № 6. – P. 1100-1111.

121. Li, J. The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis / J. Li, T. McQuade, A.B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y.S. Hsiao, E. Damko, D. Moquin, T. Walz, A. McDermott, F.K. Chan, H. Wu // *Cell*. – 2012. – V. 150. – № 2. – P. 339-350.

122. Rodriguez, D. A. Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis / D.A. Rodriguez, R. Weinlich, S. Brown, C. Guy, P. Fitzgerald, C.P. Dillon, A. Oberst, G. Quarato, J. Low, J.G. Cripps, T. Chen, D.R. Green // *Cell Death Differ.* – 2016. – V. 23. – № 1. – P. 76-88.

123. Vandenabeele, P. The Role of the Kinases RIP1 and RIP3 in TNF-Induced Necrosis / P. Vandenabeele, W. Declercq, F. Van Herreweghe, T. Vanden Berghe // *Science Signaling*. – 2010. – V. 3. – № 115. – P. re4.

124. Grootjans, S. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview / S. Grootjans, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele // *Cell Death Differ.* – 2017. – V. 24. – № 7. – P. 1184-1195.

125. Pasparakis, M. Necroptosis and its role in inflammation / M. Pasparakis, P. Vandenabeele // *Nature*. – 2015. – V. 517. – № 7534. – P. 311-320.
126. Krysko, O. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy / O. Krysko, T.L. Aaes, V.E. Kagan, K. D'Herde, C. Bachert, L. Leybaert, P. Vandenabeele, D.V. Krysko // *Immunological Reviews*. – 2017. – V. 280. – № 1. – P. 207-219.
127. Cai, Z. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis / Z. Cai, S. Jitkaew, J. Zhao, H.C. Chiang, S. Choksi, J. Liu, Y. Ward, L.G. Wu, Z.G. Liu // *Nature Cell Biology*. – 2013. – V. 16. – № 2. – P. 55-65.
128. Su, Z. Cancer therapy in the necroptosis era / Z. Su, Z. Yang, L. Xie, J.P. DeWitt, Y. Chen // *Cell Death Differ*. – 2016. – V. 23. – № 5. – P. 748-756.
129. Miki, Y. Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells / Y. Miki, J. Akimoto, K. Moritake, C. Hironaka, Y. Fujiwara // *Lasers in Medical Science*. – 2015. – V. 30. – № 6. – P. 1739-1745.
130. Chen, W. CuS–MnS<sub>2</sub> nano-flowers for magnetic resonance imaging guided photothermal/photodynamic therapy of ovarian cancer through necroptosis / W. Chen, X. Wang, B. Zhao, R. Zhang, Z. Xie, Y. He, A. Chen, X. Xie, K. Yao, M. Zhong, M. Yuan // *Nanoscale*. – 2019. – V.11. – № 27. – P. 12983-12989.
131. Dos Santos, A. F. Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells / A.F. Dos Santos, A. Inague, G.S. Arini, L.F. Terra, R.A.M. Wailemann, A.C. Pimentel, M.Y. Yoshinaga, R.R. Silva, D. Severino, D.R.Q. De Almeida, V.M. Gomes, A. Bruni-Cardoso, W.R. Terra, S. Miyamoto, M.S. Baptista, L. Labriola // *Cell Death Dis*. – 2020. – V.11. – № 12. – P. 1070.
132. Dixon, S. J. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death / S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht, R. Skouta, E.M. Zaitsev, C.E. Gleason, D.N. Patel, A.J. Bauer, A.M. Cantley, W.S. Yang, B. Morrison 3rd, B.R. Stockwell // *Cell*. – 2012. – V. 149. – № 5. – P. 1060-1072.

133. Xu, T. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy / T. Xu, W. Ding, X. Ji, X. Ao, Y. Liu, W. Yu, J. Wang // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2019. – V. 23. – № 8. – P. 4900-4912.

134. Dixon, S. J. Ferroptosis: bug or feature? / S.J. Dixon // *Immunological Reviews*. – 2017. – V. 277. – № 1. – P. 150-157.

135. Linkermann, A. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis / A. Linkermann, R. Skouta, N. Himmerkus, S.R. Mulay, C. Dewitz, F. De Zen, A. Prokai, G. Zuchtriegel, F. Krombach, P.S. Welz, R. Weinlich, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. Pasparakis, M. Bleich, J.M. Weinberg, C.A. Reichel, J.H. Bräsen, U. Kunzendorf, H.J. Anders, B.R. Stockwell, D.R. Green, S. Krautwald // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – № 47. – P. 16836-16841.

136. Yang, W. S. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4 / W.S. Yang, R. SriRamaratnam, M.E. Welsch, K. Shimada, R. Skouta, V.S. Viswanathan, J.H. Cheah, P.A. Clemons, A.F. Shamji, C.B. Clish, L.M. Brown, A.W. Girotti, V.W. Cornish, S.L. Schreiber, B.R. Stockwell // *Cell*. – 2014. – V. 156. – № 1-2. – P. 317-331.

137. Li, J. Ferroptosis: past, present and future / J. Li, F. Cao, H.L. Yin, Z.J. Huang, Z.T. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang // *Cell Death Dis*. – 2020. – V. 11. – № 2. – P. 88.

138. Ju, J. Mechanism of Ferroptosis: A Potential Target for Cardiovascular Diseases Treatment / J. Ju, Y.N. Song, K. Wang // *Aging and disease*. – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 261-276.

139. Cao, J.Y. Mechanisms of ferroptosis / J.Y. Cao, S.J. Dixon // *Cell Mol Life Sci*. – 2016. – V. 73. – № 11-12. – P. 2195-2209.

140. Friedmann Angeli, J. P. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice / J.P. Friedmann Angeli, M. Schneider, B. Proneth, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, V.J. Hammond, N. Herbach, M. Aichler, A. Walch, E. Eggenhofer, D. Basavarajappa, O. Rådmark, S. Kobayashi, T. Seibt, H. Beck, F. Neff, I. Esposito, R. Wanke, H. Förster, O. Yefremova, M.

Heinrichmeyer, G.W. Bornkamm, E.K. Geissler, S.B. Thomas, B.R. Stockwell, V.B. O'Donnell, V.E. Kagan, J.A. Schick, M. Conrad // *Nature Cell Biology*. – 2014. – V. 16. – № 12. – P. 1180-1191.

141. Yagoda, N. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels / N. Yagoda, M. von Rechenberg, E. Zaganjor, A.J. Bauer, W.S. Yang, D.J. Fridman, A.J. Wolpaw, I. Smukste, J.M. Peltier, J.J. Boniface, R. Smith, S.L. Lessnick, S. Sahasrabudhe, B.R. Stockwell // *Nature*. – 2007. – V. 447. – № 7146. – P. 864-868.

142. Yang, W. S. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells / W.S. Yang, B.R. Stockwell // *Chem Biol*. – 2008. – V. 15. – № 3. – P. 234-245.

143. Viswanathan, V. S. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway / V.S. Viswanathan, M.J. Ryan, H.D. Dhruv, S. Gill, O.M. Eichhoff, B. Seashore-Ludlow, S.D. Kaffenberger, J.K. Eaton, K. Shimada, A.J. Aguirre, S.R. Viswanathan, S. Chattopadhyay, P. Tamayo, W.S. Yang, M.G. Rees, S. Chen, Z.V. Boskovic, et al. // *Nature*. – 2017. – V. 547. – № 7664. – P. 453-457.

144. Tsoi, J. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress / J. Tsoi, L. Robert, K. Paraiso, C. Galvan, K.M. Sheu, J. Lay, D.J.L. Wong, M. Atefi, R. Shirazi, X. Wang, D. Braas, C.S. Grasso, N. Palaskas, A. Ribas, T.G. Graeber // *Cancer Cell*. – 2018. – V. 33. – № 5. – P. 890-904.

145. Meng, X. Triggered all-active metal organic framework: Ferroptosis machinery contributes to the apoptotic photodynamic antitumor therapy / X. Meng, J. Deng, F. Liu, T. Guo, M. Liu, P. Dai, A. Fan, Z. Wang, Y. Zhao // *Nano Letters*. – 2019. – V. 19. – № 11. – P. 7866-7876.

146. Zhu, T. Ferroptosis Promotes Photodynamic Therapy: Supramolecular Photosensitizer-Inducer Nanodrug for Enhanced Cancer Treatment / T. Zhu, L.

Shi, C. Yu, Y. Dong, F. Qiu, L. Shen, Q. Qian, G. Zhou, X. Zhu // *Theranostics*. – 2019. – V. 9. – № 11. – P. 3293-3307.

147. Xu, T. Enhanced Ferroptosis by Oxygen-Boosted Phototherapy Based on a 2-in-1 Nanoplatfom of Ferrous Hemoglobin for Tumor Synergistic Therapy / T. Xu, Y. Ma, Q. Yuan, H. Hu, X. Hu, Z. Qian, J.K. Rolle, Y. Gu, S. Li // *ACS Nano*. – 2020. – V. 14. – № 3. – P. 3414-3425.

148. Chen, Q. Iron-based nanoparticles for MR imaging-guided ferroptosis in combination with photodynamic therapy to enhance cancer treatment / Q. Chen, X. Ma, L. Xie, W. Chen, Z. Xu, E. Song, X. Zhu, Y. Song // *Nanoscale*. – 2021. – V. 13. – № 9. – P. 4855-4870.

149. Parzych, K. R. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation / K.R. Parzych, D.J. Klionsky // *Antioxid Redox Signal*. – 2014. – V. 20. – № 3. – P. 460-473.

150. Tekirdag, K. A. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: joint by a chaperone / K.A. Tekirdag, A.M. Cuervo // *J. Biol. Chem*. – 2018. – V. 293. – № 15. – P. 5414-5424.

151. Yang, Z. Eaten alive: a history of macroautophagy / Z. Yang, D.J. Klionsky // *Nat Cell Biol*. – 2010. – V. 12. – № 9. – P. 814-822.

152. Shi, Y. Apoptosis and autophagy induced by DVDMs-PDT on human esophageal cancer Eca-109 cells / Y. Shi, B. Zhang, X. Feng, F. Qu, S. Wang, L. Wu, X. Wang, Q. Liu, P. Wang, K. Zhang // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. – 2018. – V. 24. – P. 198-205.

153. Kessel, D. Apoptosis, paraptosis and autophagy: Death and survival pathways associated with photodynamic therapy / D. Kessel // *Photochem. Photobiol*. – 2019. – V. 95. – № 1. – P. 119-125.

154. Reiners, J. J. Jr. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy / J.J.Jr. Reiners, P. Agostinis, K. Berg, N.L. Oleinick, D. Kessel // *Autophagy*. – 2010. – V. 6. – № 1. – P. 7-18.

155. David, K. K. Parthanatos, a messenger of death / K.K. David, S.A. Andrabi, T.M. Dawson, V.L. Dawson // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2009. – V. 1. – № 14. – P. 1116-1128.
156. Soriano, J. Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos / J. Soriano, I. Mora-Espí, M.E. Alea-Reyes, L. Pérez-García, L. Barrios, E. Ibáñez, C. Nogués // *Sci Rep*. – 2017. – V. 7. – P. 41340.
157. Wang, L. Cycloheximide promotes paraptosis induced by inhibition of cyclophilins in glioblastoma multiforme / L. Wang, J.H. Gundelach, R.J. Bram // *Cell Death Dis*. – 2017. – V. 8. – № 5. – P. e2807.
158. Ram, B. M. Endoplasmic reticulum vacuolation and unfolded protein response leading to paraptosis like cell death in cyclosporine A treated cancer cervix cells is mediated by cyclophilin B inhibition / B.M. Ram, G. Ramakrishna // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – V. 1843. – № 11. – P. 2497-2512.
159. Kessel, D. Pathways to paraptosis after ER photodamage in OVCAR-5 cells / D. Kessel // *Photochem. Photobiol*. – 2019. – V. 95. – № 5. – P. 1239-1242.
160. Kessel, D. Effects of Combined Lysosomal and Mitochondrial Photodamage in a Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line: The Role of Paraptosis / D. Kessel, J.J.Jr. Reiners // *Photochem Photobiol*. – 2017. – V. 93. – № 6. – P. 1502-1508.
161. Kessel, D. Hypericin Accumulation as a Determinant of PDT Efficacy / D. Kessel // *Photochem Photobiol*. – 2020. – V. 96. – № 5. – P. 1144-1147.
162. Galluzzi, L. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / L. Galluzzi, A. Buqué, O. Kepp, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Nat Rev Immunol*. – 2017. – V. 17. – № 2. – P. 97-111.
163. Buytaert, E. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy / E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis // *Biochim Biophys Acta*. – 2007. – V. 1776. – № 1. – P. 86-107.

164. Henderson, B. W. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model / B.W. Henderson, V.H Fingar. // Photochem. Photobiol. – 1989. – V. 49. – № 3. – P. 299-304.
165. Fingar, V. H. Vascular effects of photodynamic therapy / V.H. Fingar // J Clin Laser Med Surg. – 1996. – V. 14. – № 5. – P. 323-328.
166. Wang, W. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT / W. Wang, L.T. Moriyama, V.S. Bagnato // Laser Phys. Lett. – 2012. – V. 10. – P. 023001.
167. Roberts, D. Tumor vascular shutdown following photodynamic therapy based on polyhematoporphyrin or 5-aminolevulinic Acid / D. Roberts, F. Cairnduff, I. Driver, B. Dixon, S. Brown // Int J Oncol. – 1994. – V. 5. – № 4. – P. 763-768.
168. Chen, B. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor / B. Chen, B.W. Pogue, I.A. Goodwin, J.A. O'Hara, C.M. Wilmot, J.E. Hutchins, P.J. Hoopes, T. Hasan // Radiat Res. – 2003. – V. 160. – № 4. – P. 452- 459.
169. Xiang, L. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor / L. Xiang, D. Xing, H. Gu, D. Yang, S. Yang, L. Zeng, W.R. Chen // J Biomed Opt. – 2007. – V. 12. – № 1. – P. 014001.
170. Longo, J. P. Photodynamic therapy with aluminum-chlorophthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors / J.P. Longo, S.P. Lozzi, A.R. Simioni, P.C. Morais, A.C. Tedesco, R.B. Azevedo // J Photochem Photobiol B. – 2009. – V. 94. – № 2. – P. 143-146.
171. Kabingu, E. Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy / E. Kabingu, A.R. Oseroff, G.E. Wilding, S.O. Gollnick // Clin Cancer Res. – 2009. – V. 15. – № 13. – P. 4460-4466.

172. Berraondo, P. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance / P. Berraondo, L. Minute, D. Ajona, L. Corrales, I. Melero, R. Pio // *Immunological Reviews*. – 2016. – V.274. – № 1. – P. 290-306.

173. Obeid, M. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death / M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Métivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Nat Med*. – 2007. – V. 13. – № 1. – P. 54-61.

174. Ghiringhelli, F. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors / F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. André, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, L. Zitvogel // *Nat Med*. – 2009. – V. 15. – № 10. – P. 1170-78.

175. Conte, A. High mobility group A1 protein modulates autophagy in cancer cells / A. Conte, S. Paladino, G. Bianco, D. Fasano, R. Gerlini, M. Tornincasa, M. Renna, A. Fusco, D. Tramontano, G.M. Pierantoni // *Cell Death Differ*. – 2017. – V. 24. – № 11. – P. 1948-1962.

176. Sistigu, A. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy / A. Sistigu, T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D.P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E.E. Baracco, C. Remédios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, O. Kepp, et al. // *Nat Med*. – 2014. – V. 20. – № 11. – P. 1301-1309.

177. Chiba, S. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1 / S. Chiba, M. Baghdadi, H. Akiba, H. Yoshiyama, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, Y. Fujioka, Y. Ohba, J.V. Gorman, J.D. Colgan, M. Hirashima, T. Uede, A. Takaoka, H. Yagita, M. Jinushi // *Nat Immunol*. – 2012. – V. 13. – № 9. – P. 832-42.

178. Vacchelli, E. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1 / E. Vacchelli, Y. Ma, E.E. Baracco, A. Sistigu, D.P. Enot, F. Pietrocola, H. Yang, S. Adjemian, K. Chaba, M. Semeraro, M. Signore, A. De Ninno, V. Lucarini, F. Peschiaroli, et al. // *Science*. – 2015. – V. 350. – № 6263. – P. 972-978.
179. Jolles, C. J. Systemic immunosuppression induced by peritoneal photodynamic therapy / C.J. Jolles, M.J. Ott, R.C. Straight, D.H. Lynch // *Am J Obstet Gynecol*. – 1988. – V. 158. – № 6 Pt 1. – P. 1446-1453.
180. Di Carlo, E. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions / E. Di Carlo, G. Forni, P. Lollini, M.P. Colombo, A. Modesti, P. Musiani // *Blood*. – 2001. – V. 97. – № 2. – P. 339-345.
181. Palucka, K. Cancer immunotherapy via dendritic cells / K. Palucka, J. Banchereau // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – V. 12. – № 4. – P. 265-277.
182. Kawamura, K. Differentiation, maturation, and survival of dendritic cells by osteopontin regulation / K. Kawamura, K. Iyonaga, H. Ichiyasu, J. Nagano, M. Suga, Y. Sasaki // *Clin Diagn Lab Immunol*. – 2005. – V. 12. – № 1. – P.206-212.
183. Dudek, A. M. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity / A.M. Dudek, S. Martin, A.D. Garg, P. Agostinis // *Front. Immunol*. – 2013. – V. 4. – P. 438.
184. Preise, D. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity / D. Preise, R. Oren, I. Glinert, V. Kalchenko, S. Jung, A. Scherz, Y. Salomon // *Cancer Immunol Immunother*. – 2009. – V. 58. – № 1. – P. 71-84.
185. Mitra, S. Tumor response to mTHPC-mediated photodynamic therapy exhibits strong correlation with extracellular release of HSP70 / S. Mitra, B.R. Giesselman, F.J. De Jesús-Andino, T.H. Foster // *Lasers Surg. Med*. – 2011. – V. 43. – № 7. – P. 632-643.

186. Korbelik, M. Photodynamic Therapy-Generated Cancer Vaccines / M. Korbelik // *Methods Mol Biol.* – 2010. – V. 635. – P. 147-153.
187. Fery-Forgues, S. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products / S. Fery-Forgues, D. Lavabre // *Journal of Chemical Education.* – 1999. – V. 76. – № 9. – P. 1260.
188. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *Journal of Immunological Methods.* – 1983. – V. 65. – № 1-2. – P. 55-63.
189. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2010. – 691с.
190. Шилягина, Н. Ю. Светодиодный излучатель для исследования *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии / Н.Ю. Шилягина, В.И. Плеханов, И.В. Шкунов, П.А. Шилягин, Л.В. Дубасова, А.А. Брилкина, Е.А. Соколова, И.В. Турчин, И.В. Балалаева // *Современные технологии в медицине.* – 2014. – Т. 6. – № 2. – С. 15-24.
191. Zargarian, S. Phosphatidylserine externalization, "necroptotic bodies" release, and phagocytosis during necroptosis / S. Zargarian, I. Shlomovitz, Z. Erlich, A. Hourizadeh, Y. Ofir-Birin, B.A. Croker, N. Regev-Rudzki, L. Edry-Botzer, M. Gerlic // *PLoS Biol.* – 2017. – V.15. – № 6. – P. e2002711.
192. Shlomovitz, I. Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death / I. Shlomovitz, M. Speir, M. Gerlic // *Cell Commun Signal.* – 2019. – V. 17. – № 1. – P. 139.
193. Паневин, В. Ю. Цифровая система визуализации флуоресценции для антибактериальной фотодинамической терапии в стоматологии / В.Ю. Паневин, А.Н. Софронов, Д.А. Фирсов, А.Л. Тер-Мартirosян // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки.* – 2015. – № 4 (230). – С. 77-83.
194. Kuznetsova, N. A. Generation of Singlet Oxygen with Anionic Aluminum Phthalocyanines in Water / N.A. Kuznetsova, N.S. Gretsova, V.M.

Derkacheva, S.A. Mikhalenko, L.I. Solov'eva, O.A. Yuzhakova, O.L. Kaliya, E.A. Luk'yanets // Russian Journal of General Chemistry. – 2002. – V. 72. – P. 300-306.

195. Bagrov, I. V. Comparative Study of the Photophysical Properties of Dimegine, Photoditazine, and Radachlorin / I.V. Bagrov, A.V. Dadeko, V.M. Kiselev, T.D. Murav'eva, A.M. Starodubtsev // Optics and Spectroscopy. – 2018 – V. 125. – № 6. – P. 903–910.

196. Owens, J. W. Phthalocyanine photophysics and photosensitizer efficiency on human embryonic lung fibroblasts / J.W. Owens, M. Robins // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP). – 2001. – V. 5. – № 5. – P. 460-464.

197. Ambroz, M. Preparative, analytical and fluorescence spectroscopic studies of sulphonated aluminium phthalocyanine photosensitizers / M. Ambroz, A. Beeby, A.J. MacRobert, M.S.C. Simpson, R.K. Svensen, D. Phillips // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1991 – V. 9. – № 1. – P. 87-95.

198. Isakau, H. A. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6–polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer–polymer interaction in vitro / H.A. Isakau, M.V. Parkhats, V.N. Knyukshto, B.M. Dzhagarov, E.P. Petrov, P.T. Petrov // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, – 2008. – V. 92. – №3. – P. 165-174.

199. Paul, S. Optimization in Solvent Selection for Chlorin e6 in Photodynamic Therapy / S. Paul, P.W.S. Heng, L.W. Chan // Journal of Fluorescence. – 2012. – V. 23. – № 2. – P. 283-291.

200. Брилкина, А. А. Исследование внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов трех типов в опухолевых клетках человека методом лазерной сканирующей микроскопии / А.А. Брилкина, Л.В. Дубасова, И.В. Балалаева, А.Г. Орлова, Е.А. Сергеева, А.Р. Катичев, Н.М. Шахова // Технологии живых систем. – 2011. – Т. 8. – № 8. – С. 32-39.

201. Brilkina, A. A. Monitoring of hydrogen peroxide production under photodynamic treatment using protein sensor HyPer / A.A. Brilkina, N.N. Peskova,

V.V. Dudenkova, A.A. Gorokhova, E.A. Sokolova, I.V. Balalaeva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018 – V. 178. – P. 296-301.

202. Bonneua, S. Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution / S. Bonneua, P. Morlie`reb, D. Brault // *Biochemical Pharmacology*. – 2004. – V. 68. – № 7. – P. 1443-1452.

203. Brilkina, A. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis / A. Brilkina, L. Dubasova, E. Sergeeva, A. Pospelov, N. Shilyagina, N. Shakhova, I. Balalaeva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018. – V. 191. – P. 128-134.

204. Berlanda, J. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT / J. Berlanda, T. Kiesslich, V. Engelhardt, B. Krammer, K. Plaetzer // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2010. – V.100. – № 3. – P. 173-180.

205. Шилов, И. П. Люминесцентная диагностика визуально и эндоскопически доступных опухолей на основе нефототоксичных иттербиевых комплексов порфиринов / И.П. Шилов, А.В. Иванов, В.Д. Румянцева, А.Ф. Миронов // *Фундаментальные науки - медицине. "Биофизические медицинские технологии"*. МАКС Пресс. – 2015. – Т. 2. – С. 110-144.

206. Zhou, F. Regulation of HSP70 on activating macrophages using PDT-induced apoptotic cells / F. Zhou, D. Xing, W.R. Chen // *Int J Cancer*. – 2009. – V. 125. – № 6. – P. 1380-1389.

207. Смирнова З. С. Фотодинамическая терапия опухолей мозга крыс с использованием Фотосенса / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, Л.М. Борисова, А.С. Халанстй, Г.А. Меерович, А.Ю. Барышников, Е.А. Коган, Е.А. Лукьянец, Г.И. Ворожцов // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2005. – Т. 4. – № 3. – С. 52-57.

208. Ермакова, К. В. Эффективность фотодинамической терапии фотосенсом глиобластомы 101/8 крыс / К.В. Ермакова, И.Ю. Кубасова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, З.С. Смирнова, Г.А. Меерович, Е.А. Коган, Е.А. Лукьянец, Г.Н. Ворожцов // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8. – № 4. – С. 73-78.

209. Гафтон, Г. И. Клинико-иммунологическая оценка эффективности неoadьювантной фотодинамической терапии в хирургическом лечении первичной меланомы кожи / Г.И. Гафтон, В.В. Анисимов, М.Л. Гельфонд, Ю.В. Семилетова, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, М.Ю. Мяснянкин // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Т. 1 – №2. – С. 31-38.

210. Droga-Mazovec, G. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues/ G. Droga-Mazovec, L. Bojic, A. Petelin, S. Ivanova, R. Romih, U. Repnik, G.S., Salvesen V. Stoka, V. Turk, B. Turk // J Biol Chem. – 2008. – V.283. – № 27. – P. 19140-19150.

211. Torii, S. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells / S. Torii, R. Shintoku, C. Kubota, M. Yaegashi, R. Torii, M. Sasaki, T. Suzuki, M. Mori, Y. Yoshimoto, T. Takeuchi, K. Yamada // Biochem J. – 2016. – V. 473. – № 6. – P. 769-777.

212. Tabas, I. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress / I. Tabas, D. Ron // Nat Cell Biol. – 2011. – V. 13. – № 3. – P. 184-190.

213. Machamer, C. E. The Golgi complex in stress and death / C.E. Machamer // Front Neurosci. – 2015. – V. 9.– P. 421.

214. He, Q. The Golgi Apparatus May Be a Potential Therapeutic Target for Apoptosis-Related Neurological Diseases / Q. He, H. Liu, S. Deng, X. Chen, D. Li, X. Jiang, W. Zeng, W. Lu // Front Cell Dev Biol. – 2020. – V. 8. – P. 830.

215. Kishino, A. Caspase-8 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Necroptosis Independent of the Apoptosis Pathway in Auditory Cells / A.

Kishino, K. Hayashi, M. Maeda, T. Jike, C. Hidai, Y. Nomura, T. Oshima // Int J Mol Sci. – 2019. – V. 20. – № 23. – P. 5896.